Rev Esp Cardiol. 2011;64(11):1056–1059

Comunicación breve

El polimorfismo R753Q del *toll-like receptor 2* se asocia a un aumento en el riesgo de sufrir endocarditis infecciosa

Juan Bustamante[a,*], Eduardo Tamayo[b], Santiago Flórez[a], Juan J. Telleria[c], Elena Bustamante[b], Javier López[d], J. Alberto San Román[d] y F. Javier Álvarez[e]

[a] *Servicio de Cirugía Cardiaca, Instituto de Ciencias del Corazón (ICICOR), Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, España*
[b] *Servicio de Anestesiología y Cuidados Críticos, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, España*
[c] *Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM/CSIC), Universidad de Valladolid, Valladolid, España*
[d] *Servicio de Cardiología, Instituto de Ciencias del Corazón (ICICOR), Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid, España*
[e] *Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, Valladolid, España*

Historia del artículo:
Recibido el 20 de diciembre de 2010
Aceptado el 20 de febrero de 2011
On-line el 23 de julio de 2011

Palabras clave:
Inmunidad innata
Polimorfismo genético de un solo nucleótido
Toll-like receptor 2
Endocarditis infecciosa

RESUMEN

La capacidad para responder a los ligandos de *toll-like receptors* (TLR) puede verse afectada por polimorfismos de un solo nucleótido en genes que codifican TLR. Estudiamos la influencia de los polimorfismos TLR2 (R753Q, R677W), TLR4 (D299G, T399I) y CD14 (C-159T) en 65 pacientes consecutivos con endocarditis infecciosa. El grupo control (n = 66) estuvo formado por voluntarios sanos. Todos los polimorfismos fueron genotipados mediante análisis de restricción después de su amplificación. Se observó asociación de endocarditis con variantes de TLR2 R753Q ($p < 0{,}001$) y no se encontró asociación con otros polimorfismos. Los genotipos TLR2 R753Q, codominantes (*odds ratio* = 13,33), recesivo (*odds ratio* = 9,12) y dominantes (*odds ratio* = 3,65) mostraron asociación positiva con el fenotipo de endocarditis infecciosa. El polimorfismo TLR2 R753Q se asoció a una mayor susceptibilidad a sufrir endocarditis infecciosa. Son necesarios futuros estudios para validar estos resultados e identificar otros factores genéticos de riesgo.
© 2011 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Toll-Like Receptor 2 R753Q Polymorphisms Are Associated With an Increased Risk of Infective Endocarditis

Keywords:
Innate immunity
Single nucleotide polymorphism
Toll-like receptor 2
Infective endocarditis

ABSTRACT

The ability to respond to the ligands of toll-like receptors (TLR) could be affected by single nucleotide polymorphisms in TLR codifying genes. The influence of the polymorphisms TLR2 (R753Q, R677W), TLR4 (D299G, T399I) and CD14 (C-159T) was consecutively studied in 65 patients with infective endocarditis. The control group (n=66) consisted of healthy volunteers. All the polymorphisms were genotyped by means of restriction analysis after their amplification. An association between endocarditis and variants of TLR2 R753Q ($P < .001$) was observed, but no association with other polymorphisms was found. The TLR2 R753Q co-dominant (odds ratio=13.33), recessive (odds ratio=9.12) and dominant (odds ratio=3.65) genotypes showed a positive association with the infective endocarditis phenotype. The polymorphism TLR2 R753Q was associated with a greater susceptibility towards the development of infective endocarditis. Further studies are required to validate these results and identify other genetic risk factors.

Full English text available from: www.revespcardiol.org
© 2011 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

INTRODUCCIÓN

La incidencia anual de endocarditis oscila entre 15 y 60 casos por millón de habitantes[1,2]. El pronóstico es malo y no ha cambiado en las últimas cuatro décadas[2]. Incluso con tratamiento antibiótico, la tasa de mortalidad es superior al 30% en la mayor parte de los estudios y puede llegar a ser de un 70% en determinados grupos de población de alto riesgo[2]. El mecanismo patogénico a través del cual se produce la infección del endocardio es multifactorial. Sin embargo, los factores hereditarios e inmunitarios pueden contribuir también a su desarrollo y han sido poco estudiados[1,3].

Los *toll-like receptors* (TLR) intervienen en el sistema inmunitario innato. Hasta la fecha, se han identificado 11 tipos de TLR que reconocen diferentes componentes antigénicos de los patógenos que se han conservado evolutivamente en clases específicas de microorganismos. Estos antígenos incluyen componentes de la pared celular de bacterias Gram-positivas (lipoproteínas y ácidos lipoteicoicos, detectados por TLR2) y Gram-negativas (lipopolisacárido [LPS], detectado por TLR4). En la identificación del LPS interviene el complejo del receptor de LPS del cual CD14 y TLR4 son componentes fundamentales[4].

* Autor para correspondencia: Servicio de Cirugía Cardiaca, Instituto de Ciencias del Corazón (ICICOR), Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Ramón y Cajal 3, 47005 Valladolid, España.
Correo electrónico: jbustamantemunguira@gmail.com (J. Bustamante).

0300-8932/$ – see front matter © 2011 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.
doi:10.1016/j.recesp.2011.02.024

Los datos existentes indican que la capacidad de ciertos individuos para responder adecuadamente a los ligandos de TLR puede verse afectada por polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes que codifican TLR que den lugar a alteraciones en la susceptibilidad a sufrir infecciones o procesos inflamatorios[5]. El polimorfismo genético TLR2 R753Q se ha relacionado con variaciones en la respuesta a estafilococo[6] y el polimorfismo R677W se ha asociado con un aumento de la susceptibilidad a lepra y tuberculosis en poblaciones asiáticas[7]. Se han descrito dos mutaciones frecuentes del gen de TLR4: TLR4 D299G y T399I. Estas mutaciones se han relacionado con un aumento del riesgo de infecciones por bacterias Gram-negativas y *shock* séptico[4,8]. Un polimorfismo en la región del promotor del gen CD14 se asocia a un aumento en la prevalencia de infecciones por bacterias Gram-negativas[9].

Nuestra hipótesis fue que la presencia de polimorfismos en los genes que codifican estos receptores de la inmunidad innata se podía asociar a un aumento en la prevalencia de endocarditis infecciosa. Analizamos la frecuencia de los polimorfismos TLR2 (R753Q, R677W), TLR4 (D299G, T399I) y CD14 (C-159T) en pacientes con endocarditis infecciosa y en controles sanos.

MÉTODOS

Pacientes y controles

Se estudió a 65 pacientes (57 varones, 8 mujeres; media ± desviación estándar de edad, 63,7 ± 11,9 [intervalo, 32-85] años) diagnosticados consecutivamente de endocarditis infecciosa según los criterios de Duke entre diciembre de 2005 y diciembre de 2008 (flujo de inclusión de pacientes: 2006, 22 pacientes; 2007, 17; 2008, 26). El grupo control (n = 66) lo formaron donantes de sangre sanos (55 varones, 11 mujeres; edad, 61,7 ± 10,2 [32-79] años). Los pacientes y los controles formaban parte de una población homogénea; todos ellos eran de raza caucásica y residentes en la misma región (Castilla y León, España). Cada participante dio su consentimiento para participar en el estudio, previamente aprobado por el comité de investigación del hospital.

Preparación del ADN genómico y cuantificación

Se extrajeron muestras de 2 ml de sangre total en tubos con recubrimiento de ácido etilendiaminotetraacético mediante punción venosa periférica. Se extrajo el ADN genómico de las muestras de sangre total con el uso del MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche; Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis de polimorfismos en los genes

Todos los polimorfismos se genotipificaron mediante análisis de restricción tras amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se realizaron 35 ciclos de PCR en termociclador (GeneAmp9700, Perkin-Elmer Cetus; Norwalk, Connecticut, Estados Unidos). Se sintetizaron los cebadores (VWR International Eurolab; Barcelona, España). La reacción de PCR consistió en 50 ng de ADN, 10 pm de cada cebador, 10 μl de mezcla maestra de PCR (Promega; Madison, Wisconsin, Estados Unidos) y 20 μl de agua.

Los cebadores de PCR de TLR2 p.R677W (rs5743706) fueron 5'CAATCCCCCCTTCAAGTTG-3' y 5'-CAGTTCATACTTGCACCACTC-3'. El programa de termociclado consistió en 94 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s (SsiI, Fermentas; Burlington, Canadá).

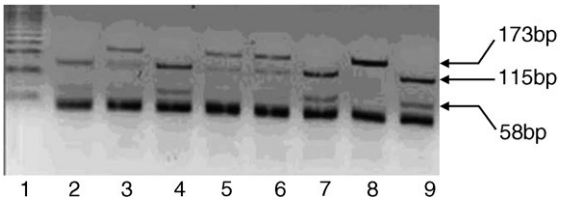

Figura 1. Migración electroforética del polimorfismo del *toll-like receptor* 2p.R753Q.

Los cebadores de PCR de TLR2 p.R753Q (rs5743708) fueron 5'-GAAGAGAACAATGATGCTGCCATTC-3' y 5'CTAGGACTTTATCG-CAGCTCTC-3'. El programa de termociclado consistió en 94 °C durante 30 s, 49 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s (SsiI, Fermentas; Burlington, Canadá) (fig. 1).

Los cebadores de PCR de TLR4 p.D299G (rs4986790) fueron 5'-ACTTAGACTACTACCTCGGTG-3' y 5'-GATTTGAGTTTCAATGTGG-GAAAC-3'. El programa de termociclado consistió en 94 °C durante 30 s, 53 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s (HphI, Fermentas; Burlington, Canadá).

Los cebadores de PCR de TLR4 p.T399I (rs4986791) fueron 5'-TCTCAAAGTGATTTTGGGACGA-3 y 5'-GTTCTCAAAGTGATTTT-GGGAATG-3'. El programa de termociclado consistió en 94 °C durante 30 s, 56 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s (MboI, Fermentas; Burlington, Canadá).

Los cebadores de PCR de CD14 c.-159C>T (rs2569190) fueron 5'-TCACCTCCCCACCTCTCTT-3' y 5'-CCTGCAGAATCCTTCCTGTT-3'. El programa de termociclado consistió en 94 °C durante 30 s, 59 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s (HaeIII, Roche; Mannheim, Alemania).

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS Inc. versión 15.0 (SPSS Inc.; Chicago, Illinois, Estados Unidos). La distribución de los genotipos (TLR2 R677W, TLR2 R753Q, TLR4 D299G, TLR4 T399I y C-159T CD14) se evaluó con el equilibrio de Hardy-Weinberg en pacientes y controles[10]. Se utilizó la prueba de la t de Student para la comparación de las variables numéricas dentro de un mismo grupo y la correlación de Pearson para la evaluación de la correlación de variables numéricas. Se utilizó la prueba de la χ^2 y la prueba exacta de Fisher (cuando fue apropiado) para la comparación de los grupos. Los datos se expresaron en forma de media ± desviación estándar y se aceptó como significación estadística un valor de $p \leq 0{,}05$.

Se utilizó regresión logística para estimar el efecto del genotipo TLR2 R753Q en la probabilidad de que un paciente tuviera un fenotipo de endocarditis infecciosa en tres modelos genéticos (recesivo, codominante y dominante), según lo aplicado en estudios previos[11].

RESULTADOS

La endocarditis fue de origen extrahospitalario en 44 pacientes (67,7%), se detectó cardiopatía previa en 39 (60%), se identificó al menos un factor de riesgo en 31 (47,7%) y las enfermedades predisponentes fueron las siguientes: diabetes mellitus, 12 (18,5%); alcoholismo, 6 (9,2%); cáncer, 4 (6,1%); insuficiencia renal crónica, 3 (4,6%), y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, 6 (9,2%). Se aislaron gérmenes Gram-positivos como agente causal en 50 (76,9%) pacientes (el 46,1% *Staphylococcus* y el 30,8% *Streptococcus*), mientras que el agente etiológico fue un germen

Tabla 1
Distribución de los polimorfismos génicos de *toll-like receptor* 2 y 4 y CD14 en pacientes con endocarditis y en los controles

Polimorfismo genético	Frecuencias genotípicas	Endocarditis (n = 65)	Controles (n = 66)	χ^2 de Pearson	p	Frecuencias alélicas	Endocarditis	Controles	OR (IC del 95%)	χ^2	p
TLR2 R677W											
	CC	36 (55,4)	41 (62,2)			C	95 (73,1)	104 (78,8)	0,731 (0,413-1,291)	1,1696	0,2795
	TC	23 (35,4)	22 (33,3)	1,3393	0,5119	T	35 (26,9)	28 (21,2)			
	TT	6 (9,2)	3 (4,5)								
TLR2 R753Q											
	R/R	30 (46,1)	50 (75,8)			R	87 (66,9)	115 (87,1)	0,299 (0,16-0,56)	15,1335	0,0001
	R/Q	27 (41,6)	15 (22,7)	13,8662	0,001	Q	43 (33,1)	17 (12,9)			
	Q/Q	8 (12,3)	1 (1,5)								
TLR4 D299G											
	D/D	53 (81,5)	60 (90,9)			D	117 (90)	125 (94,7)	0,504 (0,194-1,307)	2,049	0,152
	D/G	11 (16,9)	5 (7,6)	2,6762	0,2624	G	13 (10)	7 (5,3)			
	G/G	1 (1,5)	1 (1,5)								
TLR4 T399L											
	T/T	60 (92,3)	59 (89,4)			T	125 (96,2)	124 (93,9)	1,613 (0,513-5,066)	0,6811	0,409
	T/I	5 (7,7)	6 (9,1)	1,0084	0,604	I	5 (3,8)	8 (6,1)			
	I/I	0 (0)	1 (1,5)								
CD14 C-159T											
	C/C	20 (30,8)	21 (31,8)			C	70 (53,8)	75 (56,8)	0,887 (0,545-1,443)	0,2341	0,628
	C/T	30 (46,1)	33 (50)	0,493	0,7815	T	60 (46,2)	57 (43,2)			
	T/T	15 (23,1)	12 (18,2)								

IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio;* TLR: *toll-like receptor.*
Los valores expresan n (%).

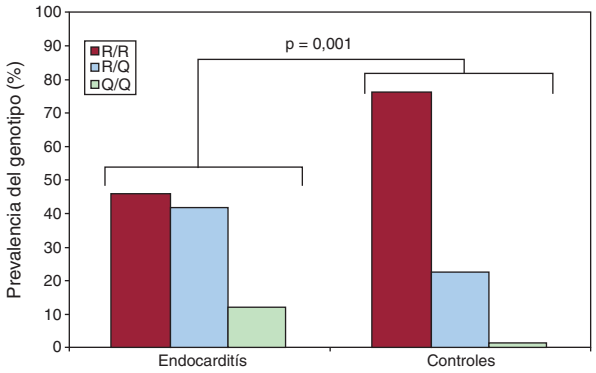

Figura 2. Prevalencia de los genotipos correspondientes a los grupos de endocarditis y control para el polimorfismo R753Q del *toll-like receptor 2*.

Gram-negativo en 5 (7,7%). No se aisló ningún microorganismo en 9 (13,8%) pacientes, y 39 pacientes (60%) requirieron tratamiento quirúrgico; la tasa de mortalidad hospitalaria fue del 30,8% (n = 20).

Distribución de genotipos y frecuencias alélicas en pacientes y controles

En el análisis de los genes (tabla 1), se observaron asociaciones significativas con endocarditis infecciosa con el TLR2 R753Q tanto para el genotipo (p = 0,001) (fig. 2) como para las variantes alélicas (p = 0,0001). No se observó asociación alguna con otros polimorfismos. El genotipo y las frecuencias alélicas del polimorfismo TLR2 R753Q fueron similares a las frecuencias observadas por otros grupos en poblaciones caucásicas.

Se realizaron otros análisis mediante regresión logística para evaluar las variantes significativas de TLR2 R753Q. Realizando el análisis de los tres modelos genéticos, se evaluó el efecto del genotipo de mayor riesgo en comparación con el de menor riesgo y la probabilidad de presentar el fenotipo de endocarditis infecciosa (tabla 2). Los tres modelos genéticos fueron significativos y el codominante fue el que asociaba mayor riesgo. Para los modelos recesivo y codominante, las *odds ratio* (OR) para los efectos del genotipo en cuanto a presentar un fenotipo de endocarditis infecciosa fueron de 9,12 y 13,33, respectivamente, mientras que para el modelo dominante fue OR = 3,65.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que muestra que el polimorfismo TLR2 R753Q se asocia a un aumento significativo en el riesgo de sufrir endocarditis infecciosa y que los genotipos codominante, recesivo y dominante se asocian al fenotipo de endocarditis infecciosa.

Se ha descrito que los SNP R677W[7] y R753Q[8] en el gen que codifica el TLR2 conllevan aumento del riesgo de enfermedades infecciosas.

Tabla 2
Análisis de regresión logística de las variantes genéticas de R753Q del *toll-like receptor 2* asociadas a la endocarditis infecciosa (todos los pacientes, n = 131)

Variante genética y SNP de referencia	Modelo recesivo		Modelo codominante		Modelo dominante	
	OR (IC del 95%)	p	OR (IC del 95%)	p	OR (IC del 95%)	p
TLR2 R753Q	9,12 (1,11-75,18)	0,04[a]	13,33 (1,59-111,92)	0,017[b]	3,65 (1,73-7,69)	0,001[c]

IC: intervalo de confianza; OR: *odds ratio;* SNP: polimorfismos de un solo nucleótido; TLR: *toll-like receptor.*
Se presentan las OR para el genotipo de máximo riesgo en comparación con el genotipo de mínimo riesgo.
El número de pacientes (131) refleja los genotipos disponibles. Se indican a continuación las comparaciones de genotipos específicos.
[a] Los valores corresponden a la comparación del genotipo QQ con la combinación de los genotipos R/Q y RR.
[b] Los valores corresponden a la comparación del genotipo QQ con el genotipo RR.
[c] Los valores corresponden a la comparación de la combinación de los genotipos R/Q y QQ con el genotipo RR.

El polimorfismo R753Q fue identificado por primera vez por Lorenz et al[6]. Se ha descrito también una asociación positiva con *Mycobacterium tuberculosis* y con la fiebre reumática aguda causada por bacterias Gram-positivas (*Streptococcus* betahemolítico)[12]. Nuestros resultados concuerdan con estudios previos. Sin embargo, en un estudio de 420 pacientes consecutivos con infecciones graves por *S. aureus,* Moore et al no observaron asociación alguna con este SNP[13].

Por lo que respecta al SNP TLR2 R677W, en nuestro estudio no se observaron diferencias en la distribución de los genotipos o los alelos. Esto concuerda con los datos existentes en la literatura, puesto que este polimorfismo sólo se ha identificado en poblaciones asiáticas con lepra lepromatosa, y no en poblaciones caucásicas europeas[7].

Los SNP TLR4 D299G y C-159T CD14 muestran una asociación positiva con varias enfermedades infecciosas como el *shock* séptico causado por gérmenes Gram-negativos[4,8,9]. En nuestro estudio no se observó una correlación positiva con endocarditis infecciosa, probablemente debido a que sólo el 7,7% de los pacientes presentaron endocarditis por Gram-negativos.

En resumen, observamos que el polimorfismo del TLR2 R753Q comporta un aumento en la susceptibilidad a sufrir endocarditis infecciosa. Será necesario reproducir este estudio en grupos de población con características diferentes para demostrar la validez de los resultados e identificar otros factores genéticos asociados que puedan comportar un aumento del riesgo de endocarditis infecciosa, dada la importancia de la variabilidad de la información genética.

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por la Gerencia de Salud, Consejería de Sanidad, Junta de Castilla y León [GRS 143/A/07], por Redes Temáticas, RD06/0001/0020 y por la Obra Social Caja Burgos.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

1. King JW, Nguyen VQ, Conrad SA. Results of a prospective statewide reporting system for infective endocarditis. Am J Med Sci. 1988;295:517–27.
2. San Román JA, López J, Vilacosta I, Luaces M, Sarriá C, Revilla A, et al. Prognostic stratification of patients with left-sided endocarditis determined at admission. Am J Med. 2007;120:369.e1–7.
3. Mylonakis E, Calderwood SB. Infective endocarditis in adults. N Engl J Med. 2001;345:1318–30.
4. Schröder NW, Schumann RR. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. Lancet Infect Dis. 2005;5: 156–64.
5. Cook DN, Pisetsky DA, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. Nat Immunol. 2004;5:975–9.
6. Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, Arbour NC, Schwartz DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. Infect Immun. 2000;68:6398–401.
7. Kang TJ, Chae GT. Detection of toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. FEMS Immunol Med Microbiol. 2001;31:53–8.
8. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SM, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of Gram-negative infections. J Infect Dis. 2002;186:1522–5.
9. Sutherland AM, Walley KR, Russell JA. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and Toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. Crit Care Med. 2005;33:638–44.
10. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics. 1992;48:361–72.
11. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, et al.; Gene Modifier Study Group. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. N Engl J Med. 2005;353:1443–53.
12. Berdeli A, Celik HA, Ozyürek R, Dogrusoz B, Aydin HH. TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with acute rheumatic fever in children. J Mol Med. 2005;83:535–41.
13. Moore CE, Segal S, Berendt AR, Hill AV, Day NP. Lack of association between Toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe disease caused by Staphylococcus aureus. Clin Diagn Lab Immunol. 2004;11:1194–7.