



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

**ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO EN
LOS GENES *TLRs* ENDOSOMALES Y ENFERMEDADES INMUNES EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

BIOL. EXP. FLOR TRINIDAD SÁNCHEZ BRENA

DIRECTORES

DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES

DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ

ASESORA

DRA. LORENA OROZCO OROZCO

MÉXICO, D.F. 5 DE MARZO DE 2015

El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Flor Trinidad Sánchez Brena agradece a CONACyT por otorgarle y distinguirla con la beca con número de registro: 494118.

Los miembros del jurado de examen designados por el Posgrado de Biología Experimental, abajo firmantes, aprobaron la tesis "ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO EN LOS GENES TLRs ENDOSOMALES Y ENFERMEDADES INMUNES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS" desarrollada por la Biol. Exp. Flor Trinidad Sánchez Brena quien realizó la presentación de la idónea comunicación de resultados y el examen de grado el 5 de Marzo de 2015 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.



PRESIDENTE

Dr. Humberto González Márquez
Lab. de Biología Molecular
Depto. de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana



SECRETARIO

Dr. David Cruz Robles
Lab. de Genómica
Depto. de Biología Molecular
Instituto Nacional de Cardiología
"Ignacio Chávez"



VOCAL

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Depto. de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana



VOCAL

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Lab. de Fisiología Celular
Depto. de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana

COMITÉ TUTORAL

“Análisis de Asociación entre polimorfismos de un solo nucleótido en los genes TLRs endosomales y enfermedades inmunes en pacientes pediátricos”

Flor Trinidad Sánchez Brena

5 de Marzo de 2015

Dra. Silvia Jiménez Morales Codirectora
Lab. de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas
Dirección de Investigación Médica
Instituto Nacional de Medicina Genómica
sjimenez@inmegen.gom.mx

Dr. Edmundo Bonilla González Codirector
Lab. de Biología Molecular
Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
mundo@xanum.uam.mx

Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco Asesora
Lab. de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas
Subdirectora de Investigación Médica
Instituto Nacional de Medicina Genómica
lorozco@inmegen.gob.mx

Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en colaboración con el Laboratorio de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

*La presente tesis está dedicada con cariño a Flor y Filo,
de quienes he recibido tanto.*

*A Azu, Fer y Leoncito,
gracias por todo lo que hemos compartido.*

*A Dnéfetm,
el amor de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi querida alma máter, la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y a los profesores que allí laboran, de quienes he aprendido en sus clases.

A mis tutores, la Dra. Silvia Jiménez, el Dr. Edmundo Bonilla, la Dra. Lorena Orozco, gracias por sus enseñanzas, apoyo, motivación y paciencia.

A mi comité de evaluación, el Dr. Humberto González, el Dr. David Cruz, el Dr. Pablo Damián y el Dr. Luis Enrique Gómez, gracias por sus aportaciones, apoyo y conocimiento compartido.

A la comunidad académica y administrativa de la UAMI, especialmente al Dr. Francisco J. Alarcón, la Lic. Angélica Ostos, la Lic. Violeta Luna y a el Lic. José Atenco, gracias por todo su apoyo y disponibilidad al posgrado.

A mi valiosa familia, gracias por sus palabras de aliento y cariño durante el camino.

Al amor de mi vida, Dnéfetm, gracias por todo, es un disfrute caminar a tu lado.

A mis queridos amigos, Armando, Nadia, Yuli, Atzin, David, Cristóbal, Ángeles, Angélica, Monse, Diana, Mireya, Enrique, Carlos y Eduardo, gracias por hacer muy divertida la travesía.

ÍNDICE

| | |
|--|------------------|
| ABREVIATURAS..... | x |
| LISTA DE FIGURAS..... | xv |
| LISTA DE TABLAS..... | xvi |
| RESUMEN..... | xviii |
| ABSTRACT..... | xx |
| <i>I. INTRODUCCIÓN.....</i> | <i>1</i> |
| Enfermedades inmunes..... | 2 |
| Hipótesis de la higiene..... | 2 |
| Asma, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide: ejemplos de EI..... | 5 |
| Genética de las enfermedades inmunes..... | 8 |
| Estudio de asociación: casos y controles..... | 8 |
| Fondo genético de riesgo común en EI..... | 11 |
| Receptores tipo Toll..... | 12 |
| TLRs endosomales..... | 14 |
| Polimorfismos en TLRs endosomales..... | 21 |
| Antecedentes..... | 23 |
| <i>II. JUSTIFICACIÓN.....</i> | <i>25</i> |
| <i>III. pregunta de investigación.....</i> | <i>26</i> |
| <i>IV. HIPÓTESIS.....</i> | <i>26</i> |
| <i>V. OBJETIVOS.....</i> | <i>27</i> |
| Objetivo general..... | 27 |
| Objetivos particulares..... | 27 |

| | |
|--|-----------|
| VI. MATERIAL Y MÉTODO | 28 |
| Población de estudio | 28 |
| Criterios de inclusión | 29 |
| Criterios de exclusión..... | 29 |
| Criterios de eliminación | 29 |
| Análisis molecular | 29 |
| Selección de SNPs | 30 |
| Genotipificación | 31 |
| Validación de resultados | 33 |
| Análisis <i>in silico</i> | 35 |
| Análisis estadístico | 35 |
| VII. RESULTADOS | 36 |
| Población estudiada | 36 |
| Análisis de genotipificación | 36 |
| Estudio de asociación con <i>TLR3</i> | 36 |
| Análisis de SNPs | 36 |
| Análisis de haplotipos | 39 |
| Estudio de asociación con <i>TLR7</i> | 41 |
| Análisis de SNPs | 41 |
| Análisis de haplotipos | 45 |
| Estudio de asociación con <i>TLR8</i> | 49 |
| Análisis de SNPs | 49 |
| Análisis de haplotipos | 49 |
| Estudio de asociación con <i>TLR9</i> | 55 |
| Análisis de SNPs | 55 |
| Análisis de haplotipos | 60 |

| | |
|---|-----------|
| Análisis de interacción génica..... | 61 |
| Efecto funcional de los SNPs <i>in silico</i> | 62 |
| Comparación con otras poblaciones | 64 |
| VIII. DISCUSIÓN | 67 |
| IX. CONCLUSIONES..... | 75 |
| X. PERSPECTIVAS | 76 |
| XI. REFERENCIAS | 77 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| AA | Aminoácido |
| ACR | Colegio Americano de Reumatología |
| AIM2 | Proteína Inducible de Interferón o Proteína Ausente en Melanoma 2 |
| AMEPAR | Asociación Mexicana de Familiares y Pacientes con Artritis Reumatoide |
| AP1 | Proteína Activadora 1 |
| ARJ | Artritis Reumatoide Juvenil |
| Asp | Ácido Aspártico |
| BANK1 | Proteína Adaptadora de Células B rica en Repeticiones de Ankirina |
| CCL2 | Ligando Quimiocina CC 2 |
| CNV | Variación en el Número de Copias |
| dbSNP | Base de Datos Pública de SNPs |
| DC | Células Dendríticas |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| dNTP | Desoxinucleótido |
| ddNTP | Didesoxinucleótido |
| dsDNA | DNA de doble cadena |
| EDTA | Ácido Etilendiaminotetraacético |
| EHW | Equilibrio de Hardy-Weinberg |
| EI | Enfermedades Inmunes |
| ESE | Potencializador de Splicing |
| ESS | Silenciador de Splicing |
| EULAR | Liga Europea contra el Reumatismo |

| | |
|--------------|---|
| FAM | 6-carboxi-fluoresceína |
| FCRL3 | Proteína Similar al Receptor Fc3 |
| FEV1 | Volumen Respiratorio Forzado por 1 seg. |
| GINA | Iniciativa Global para el Asma |
| Gln | Glutamina |
| HapMap | Proyecto Internacional del Mapeo de Haplotipos |
| HGM | Hospital General de México |
| HLA | Antígeno Leucocitario Humano |
| IC | Intervalo de Confianza |
| IFN α | Interferón Alfa |
| IFN β | Interferón Beta |
| IFN γ | Interferón Gamma |
| IFN1 | Interferón tipo 1 |
| I κ B | Proteína Inhibidora de la Cinasa de NF-kB |
| IL | Interleucina |
| IL1 β | Interleucina 1 Beta |
| ILR | Receptor de Interleucina |
| INER | Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias |
| INMEGEN | Instituto Nacional de Medicina Genómica |
| INP | Instituto Nacional de Pediatría |
| IRF | Factor Regulador del Interferón |
| IRAK | Cinasa Asociada con el Receptor de Interleucina 1 |
| IRAK-M | Cinasa Asociada con el Receptor de Interleucina en Macrófagos |

| | |
|--------|--|
| Ile | Isoleucina |
| LD | Desequilibrio de Ligamiento |
| LES | Lupus Eritematosos Sistémico |
| Leu | Leucina |
| LPS | Lipopolisacáridos |
| Lys | Lisina |
| MAF | Frecuencia del Alelo Menor |
| Mal | Proteína Adaptadora Tipo MyD88 |
| MAPK | Proteína Cinasa Activada por Mitógenos |
| Met | Metionina |
| miRNA | Micro RNA |
| MyD88 | Factor de Diferenciación Mieloide 88 |
| NF-kB | Factor Nuclear Kappa B |
| NLRP3 | Proteína con Dominio Pirina, Dominio de Repeticiones Ricas en Leucina y Dominio de Oligomerización y Unión a Nucleótidos 3 (Inflamasoma) |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OR | Razón de Momios |
| P | Probabilidad |
| PAMP | Patrón Molecular Asociado a Patógenos |
| pb | Pares de Bases |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| Phe | Fenilalanina |
| Pro | Prolina |
| PTPN22 | Tirosín Fosfatasa 22 |

| | |
|--------------|--|
| RANTES | Regulado en Activación, Expresado y Secretado por Células T Normales |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| rSNP | SNP Regulador |
| rsSNP | SNP-RNA estructurales |
| SIGIRR | Molécula Relacionada a IL1 que Contiene un Solo Dominio de Inmunoglobulina |
| SNP | Polimorfismo de un Solo Nucleótido |
| SNPns | SNP no Sinónimo |
| SOCS1 | Supresor de la Señalización de Citocinas 1 |
| SPINK5 | Proteína Inhibidora de la Enzima Serín Proteasa 5 |
| STAT4 | Transductor de la Señal y Activador de la Transcripción 4 |
| TAK1 | Cinasa Activada de TGF β |
| TAMRA | Tetrametilrodamina |
| TaqMan | Taq polimerasa + Pac Man |
| TBK1 | Cinasa de Unión al Activador de NF-kB |
| TDT | Test de Desequilibrio de Transmisión |
| TFBS | Sitio de Unión de Factores de Transcripción |
| TGF β | Factor de Crecimiento Transformante Beta |
| Th1/2 | Células T Colaboradoras tipo 1/ tipo 2 |
| TIR | Receptor Toll/IL1 |
| TLR | Receptor Tipo Toll |
| TMD | Dominio Transmembranal |
| TNF α | Factor de Necrosis Tumoral Alfa |
| TNFAIP3 | Proteína 3 Inducida por TNF α |

| | |
|---------|--|
| Treg | Células T Reguladoras |
| TRAF6 | Factor 6 Asociado a Receptores de TNF |
| TRAM | Proteína de Membrana Asociada a la Cadena de Translocación |
| TREX | Exonucleasa Reparadora 3 Prima |
| TRIF | Molécula Adaptadora 1 de los Receptores Tipo Toll |
| UNC93B1 | Chaperona unc-93 Homóloga a B1 |
| UTR | Región No Traducible del Gen |
| Val | Valina |
| VIC/TET | 6-carboxi-4-7-2-7-tetracloro-fluoresceína |
| VIH | Virus de Inmunodeficiencia Humana |
| VRS | Virus Respiratorio Sicitial |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hipótesis de la higiene y enfermedades inmunes (pág. 4)

Figura 2. Estudio de asociación casos y controles (pág. 9)

Figura 3. Familia de receptores tipo Toll en el ser humano (pág.13)

Figura 4. Señalización de los TLRs (pág. 16)

Figura 5. Técnica fluorescente de la 5' exonucleasa y discriminación alélica (pág. 32)

Figura 6. Secuenciación del SNP rs2159377 (pág.34)

Figura 7. Análisis de LD con el software HAPLOVIEW (pág. 35)

Figura 8. Análisis de LD entre SNPs del gen *TLR3* en población total (pág.40)

Figura 9. Análisis de LD entre SNPs del gen *TLR7* en población femenina (pág. 45)

Figura 10. Análisis de LD entre SNPs del gen *TLR7* en población masculina (pág. 45)

Figura 11. Análisis de LD entre SNPs del gen *TLR8* en población femenina (pág. 52)

Figura 12. Análisis de LD entre SNPs del gen *TLR8* en población masculina (pág. 52)

Figura 13. Análisis de LD entre SNPs del gen *TLR9* en población total (pág. 60)

Figura 14. Localización del SNP L412F en *TLR3* (pág. 64)

Figura 15. Frecuencias alélicas de SNPs de *TLR3* y *TLR7* en diferentes poblaciones (pág. 65)

Figura 16. Frecuencias alélicas de SNPs de *TLR8* y *TLR9* en diferentes poblaciones (pág. 66)

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los SNPs incluidos (pág. 30)

Tabla 2. Condiciones de PCR para el método TaqMan (pág. 32)

Tabla 3. Lista de *cebadores* para la secuenciación de los polimorfismos asociados (pág. 34)

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs de *TLR3* en población total con asma, LES y ARJ (pág. 37)

Tabla 5. Análisis de asociación entre SNPs en *TLR3* y pacientes con asma, LES y ARJ (pág. 38)

Tabla 6. Análisis de haplotipos de *TLR3* en población total con asma, LES y ARJ (pág.41)

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs de *TLR7* en población femenina con asma, LES y ARJ (pág. 43)

Tabla 8. Frecuencias alélicas de SNPs de *TLR7* en población masculina con asma, LES y ARJ (pág. 44)

Tabla 9. Análisis de haplotipos de *TLR7* en población femenina con asma, LES y ARJ (pág. 47)

Tabla 10. Análisis de haplotipos de *TLR7* en población masculina con asma, LES y ARJ (pág. 48)

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs de *TLR8* en población femenina con asma, LES y ARJ (pág. 50)

Tabla 12. Frecuencias alélicas de SNPs de *TLR8* en población masculina con asma, LES y ARJ (pág. 51)

Tabla 13. Análisis de haplotipos de *TLR8* en población femenina con asma, LES y ARJ (pág. 54)

Tabla 14. Análisis de haplotipos de *TLR8* en población masculina con asma, LES y ARJ (pág. 55)

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs de *TLR9* en población total con asma, LES y ARJ (pág. 56)

Tabla 16. Análisis de asociación entre rs352143 de *TLR9* y pacientes con asma, LES y ARJ (pág. 58)

Tabla 17. Análisis de haplotipos de *TLR9* en población total con asma, LES y ARJ (pág. 61)

Tabla 18. Análisis de interacción génica entre SNPs del gen *TLR9* en enfermedades inmunes (pág. 62)

Tabla 19. SNPs con posible efecto funcional (pág. 63)

RESUMEN

Introducción: Las enfermedades inmunes (EI) son patologías donde la homeostasis del sistema inmunitario se ve desregulada, llevando a manifestaciones clínicas como hiperrespuesta a alérgenos, inflamación crónica e incluso, respuesta autoinmune. Ejemplo de éstas son el asma, el lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis reumatoide juvenil (ARJ). Por su etiología, éstas son enfermedades multifactoriales en donde los factores genéticos tienen una gran contribución y además comparten un fondo genético de riesgo. De hecho, se ha descrito que polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en diversos genes candidato confieren riesgo para desarrollarlas. Los *TLRs* son valiosos genes candidato en el estudio de estas enfermedades, ya que codifican para una familia de proteínas que inicia la defensa contra patógenos al activar la respuesta inmune innata y dar paso a la respuesta adaptativa. **Objetivo:** identificar SNPs en genes *TLRs* endosomales asociados al riesgo o protección para padecer asma, LES o ARJ en población pediátrica mexicana. **Material y Método:** se realizó un estudio de casos y controles donde se incluyeron 1007 pacientes, de los cuales 417 fueron diagnosticados con asma, 377 con LES y 213 con ARJ. Como grupo control, se incluyeron 368 individuos sanos. A partir de DNA genómico y mediante la técnica de la 5´exonucleasa (TaqMan), se analizaron 21 SNPs localizados en 4 genes: *TLR3* (3), *TLR7* (6), *TLR8* (6) y *TLR9* (6). Los datos se analizaron mediante los programas FINETTI, HAPLOVIEW, EPIINFO, QUANTO, PLINK y SNP FUNCTION PREDICTION. La validación se realizó mediante secuenciación automática. **Resultados:** Se identificaron SNPs en los genes *TLR3*,

TLR7, y *TLR9* como posibles factores de riesgo genético para EI. En población total, el rs3775291 se asoció con asma y con LES (OR=1.3, p=0.04 y OR=1.65, p=0.003, respectivamente); el rs352143 se asoció con asma, con LES y con ARJ (OR=1.7, p=0.01; OR=2.01, p=0.0008 y OR=1.83, p=0.1, respectivamente). Al realizar el análisis de asociación después de estratificar por género, el rs179010 se asoció con asma y ARJ en varones (OR=3.1, p=0.02 y OR=9.5, p=0.01); el rs3775296 y el rs3775290 se asociaron con ARJ en varones (OR=1.94, p=0.009 y OR=1.78, p=0.007, respectivamente); y el rs5743733 se asoció con ARJ en niñas (OR=2.80, p=0.02). El análisis de haplotipos reveló que CCC de *TLR3* se asocia con asma, con LES (OR=0.76, p=0.03 y OR=0.73, p=0.01, respectivamente) y con ARJ sólo en varones (OR=0.57, p=0.02); ACT de *TLR3* se asocia con ARJ en varones (OR=2.03, p=0.01); AAACCC de *TLR8* se asocia con asma y ARJ en niñas (OR=0.18, p=0.0002 y OR=0.18, p=0.001, respectivamente); AAACGA y AAATGA de *TLR8* se asocian con ARJ en niñas (OR=0.18, p=0.04 y OR=0.09, p=0.04, respectivamente); CCC, CGA y TGA de *TLR8* se asocian con LES en niñas (OR=0.47, p=0.004; OR=0.20, p=0.0006 y OR=0.08, p=0.0001, respectivamente); y TT de *TLR9* se asocia con ARJ de ambos géneros (OR=6.53, p=0.002). **Conclusión:** Este trabajo aporta evidencias de la posible participación de variantes en los receptores endosomales como factores genéticos asociados al riesgo a padecer asma, LES y ARJ en los niños mexicanos. Además, muestra la necesidad de realizar otros estudios que permitan entender el papel de estas variantes en la patogénesis de las EI y su relación con el género.

ABSTRACT

Introduction: the immune diseases (ID) are pathologies where the immune system homeostasis is deregulated, leading to clinical manifestations as hyperresponsiveness to allergen, chronic inflammation, even autoimmune response. Example of these are asthma, systemic lupus erythematosus (SLE) and juvenile rheumatoid arthritis (JRA). For its etiology, they are multifactorial diseases in which genetic factors play a major contribution and also share a genetic risk fund. In fact, it is reported that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in various candidate genes confer risk to develop. The TLRs are valuable candidate genes in the study of these diseases, and encoding a protein family that starts the defense against pathogens by activating the innate immune response and give way to the adaptive response.

Objective: to identify SNPs in endosomal TLRs genes associated with risk or protection for developing asthma, SLE and JRA in Mexican pediatric population.

Material and Methods: we performed a case-control study in which 1007 patients were included, of whom 417 were diagnosed with asthma, 377 with SLE and 213 with ARJ. As a control group, 368 healthy individuals were included. From genomic DNA and by 5'exonucleasa technique (TaqMan) were analyzed 21 SNPs located in four genes: *TLR3* (3), *TLR7* (6) *TLR8* (6) and *TLR9* (6). Data were analyzed using FINETTI, HAPLOVIEW, EPIINFO, QUANTO, PLINK and SNP FUNCTION PREDICTION programs. Validation was performed by automated sequencing.

Results: we identified SNPs in *TLR3*, *TLR7*, and *TLR9* genes as potential genetic risk factors for ID. In total population, rs3775291 was associated with asthma and

SLE (OR=1.3, p=0.04 and OR=1.65, p=0.003, respectively); the rs352143 was associated with asthma, SLE and JRA (OR=1.7, p=0.01; OR=2.01, p=0.0008 and OR=1.83, p=0.1, respectively). After association analysis stratifying by gender, rs179010 was associated with asthma and ARJ in males (OR=3.1, p=0.02 and OR=9.5, p=0.01); rs3775296 and rs3775290 were associated with JRA in males (OR=1.94, p=0.009 and OR=1.78, p=0.007, respectively); and rs5743733 was associated with JRA in females (OR=2.80, p=0.02). Haplotype analysis revealed that CCC (*TLR3*) is associated with asthma, SLE (OR=0.76, p=0.03 and OR=0.73, p=0.01, respectively) and ARJ only in males (OR=0.57, p=0.02); ACT (*TLR3*) is associated with JRA in males (OR=2.03, p=0.01); AAACCC (*TLR8*) is associated with asthma and ARJ in females (OR=0.18, p=0.0002 and OR=0.18, p=0.001, respectively); AAACGA and AAATGA (*TLR8*) are associated with JRA in females (OR=0.18, p=0.04 and OR=0.09, p=0.04, respectively); CCC, CGA and TGA of *TLR8* are associated with SLE in females (OR=0.47, p=0.004; OR=0.20, p=0.0006 and OR=0.08, p=0.0001, respectively); TT of *TLR9* is associated with JRA both genders (OR=6.53, p=0.002). **Conclusion:** This study provides evidence for the possible involvement of variants in the endosomal receptors and genetic factors associated with the risk of developing asthma, SLE and JRA in Mexican children. It also shows the need for further studies to understand the role of these variants in the pathogenesis of ID and its relationship to gender.

I. INTRODUCCIÓN

El proyecto del genoma humano permitió conocer la secuencia del DNA humano e identificar los más de 25 000 genes contenidos en él (Venter *et al.* 2001), junto con el desarrollo tecnológico, han permitido que, en los últimos años, se haya logrado generar una gran cantidad de información respecto a los factores que causan muchas de las enfermedades . Entre las contribuciones principales que han derivado de éste conocimiento, está la identificación y localización de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) en genes que tienen una implicación fisiológica importante. Gran número de estas variantes o polimorfismos se han asociado con el desarrollo, la gravedad o la respuesta al tratamiento de entidades tanto monogénicas como complejas.

Dentro de los genes candidato más ampliamente investigados por su asociación con el riesgo a padecer enfermedades inmunes (EI), se encuentra a los que codifican para los receptores tipo Toll (*TLRs*, por sus siglas en inglés). Los *TLRs* son genes que codifican para una familia de proteínas que participan en la respuesta inmune innata, actuando como la primera línea de defensa contra los patógenos bacterianos y virales. De hecho, varios estudios sugieren que algunos polimorfismos presentes en éstos genes confieren riesgo a padecer entidades autoinmunes, inflamatorias y alérgicas (Martínez Córdova *et al.* 2009). Más aún, los *TLRs* están siendo considerados como blancos terapéuticos potenciales en el tratamiento de

entidades que constituyen problemas de salud pública incluyendo las entidades mediadas por el sistema inmune (Aryan *et al.* 2014).

Enfermedades inmunes

Las EI son entidades en donde la homeostasis del sistema inmunitario se ve comprometida y cuyas manifestaciones clínicas van desde una respuesta autoinmune exacerbada, inflamación crónica sistémica o localizada, hasta hiperrespuesta a alérgenos que, para la mayoría de las personas, resultan inocuos. De hecho, la hipótesis de la higiene postula que el desbalance en la respuesta inmune puede conducir al desarrollo de entidades autoinmunes o alérgicas.

Hipótesis de la higiene

La activación y supresión del sistema inmunitario ha sido estrechamente vinculada con las células dendríticas, las que adquieren señales del microambiente para transmitir las a las células T, dirigiendo de esta forma su diferenciación hacia células T colaboradoras (Th) de tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2), o reguladoras (Treg). La hipótesis de la higiene propone que la falta de infecciones intensas en los individuos en edades tempranas puede alterar el sistema inmunológico humano, de tal manera que éste responde inadecuadamente a sustancias inocuas. Así, esta hipótesis ha establecido un marco inmunológico en el que el equilibrio entre la respuesta Th1 (asociada con infecciones bacterianas, virales y autoinmunidad), y la Th2 (asociada con las infecciones por helmintos y enfermedades alérgicas), es oscilante. Se ha

propuesto que la exposición limitada a los patógenos bacterianos y virales durante la infancia resulta en una estimulación insuficiente de las células Th1, lo que a su vez no puede contrarrestar la fuerte expansión de las células Th2, resultando en una predisposición a la alergia. En sentido inverso, una exposición limitada a helmintos y parásitos deriva en una insuficiente estimulación de las células Th2, dando lugar a las enfermedades autoinmunes. Esto se debe a que las respuestas Th1 y Th2 son antagónicas, aunado con una señalización constante, inducida por la misma desregulación, que reprime a las células Tregs encargadas de suprimir y controlar a las células Th1 y Th2 (Fig. 1) (Yazdanbakhsh *et al.* 2002).

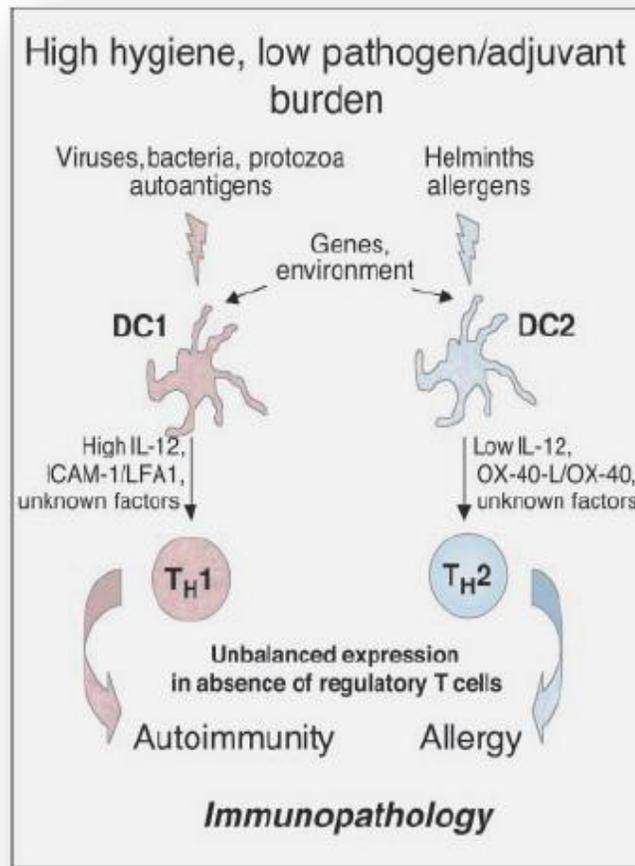


Figura 1. Hipótesis de la higiene y enfermedades inmunes: Individuos que crecieron en condiciones altamente higiénicas responden inadecuadamente frente a agentes patógenos, debido a una activación anómala de la respuesta inmune tipo T. Ésta respuesta se da después de que las células dendríticas (DC) procesan el antígeno y lo presentan al sistema inmunitario. La respuesta Th1 y Th2 son antagónicas, por lo que una sobreexpresión de cualquiera de ellas, reprime a la otra, generando un desbalance inmunológico que deriva en el desarrollo de enfermedades inmunes. (Tomada de: Yazdanbakhsh et al. 2002).

Asma, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide: ejemplos de EI

Una de las EI más prevalentes a nivel mundial, es el asma; de hecho, la OMS en el año 2011 comunicó que 235 millones de habitantes en el mundo padecían asma y, de éstos, 255,000 murieron. México no es la excepción, en el 2013 el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias reportó que de 5 a 10% de la población general padecía asma (INER 2014). Mientras que en población infantil, se estima que esta entidad afecta a más del 15% de los niños (Huerta y Penagos 2004). El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de los pulmones que estrecha las vías respiratorias a la vez que causa períodos repetidos de sibilancias (silbidos al respirar), presión en el pecho, dificultad para respirar y tos (NHLBI 2012). Su diagnóstico clínico se establece evaluando la función pulmonar y la reversibilidad de la broncoconstricción de las vías aéreas mediante espirometría, con la cual se estima el volumen espiratorio forzado por un segundo (FEV1). La obstrucción bronquial debe ser total o parcialmente reversible ante un tratamiento con broncodilatadores como salbutamol o albuterol y terbutalina. Una mejoría del FEV1 mayor del 12% después del tratamiento es indicativa del diagnóstico de asma (GINA 2014). En la mayoría de los casos pediátricos, el asma es de tipo caracterizada principalmente por niveles de IgE altos, como resultado de una hiperrespuesta Th2.

Aunque de prevalencia baja, el lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad mediada por el sistema inmune, que resulta de gran interés ya que es el

prototipo de las enfermedades autoinmunes. En México se ha reportado una prevalencia de LES del 0.06% y la incidencia de 1.8 a 7.6 casos por 100.000 personas al año (HGM 2012). Es una enfermedad que afecta, principalmente, al género femenino en una relación 9:1 con respecto a los varones y alrededor del 15% de los casos se manifiesta durante la infancia (Velázquez-Cruz *et al.* 2012). Ésta es una enfermedad crónica, donde la respuesta inmune se dirige contra una gran variedad de antígenos propios, dando como resultado daño en varios órganos y sistemas. Dentro de las moléculas que participan en la fisiopatología de LES se ha reportado a *IRF5*, el cual es un miembro de la familia de factores de transcripción de los IFN1, que regula las respuestas inmune e inflamatoria mediante la inducción de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL6 e IL12, cuya sobreexpresión es una de las características principales del LES. Éstos pacientes también presentan niveles séricos elevados de IFN α e IL10, los cuales junto con BANK1 rigen la actividad de los linfocitos productores de autoanticuerpos. La respuesta inmune característica de LES es de tipo Th1, éstos linfocitos hacen posible la producción de autoanticuerpos IgG de alta afinidad y son los autoanticuerpos que están íntimamente ligados con el daño tisular en el LES (Kyogoku y Tsuchiya 2007; Velázquez-Cruz *et al.* 2012; Enríquez-Mejía 2013).

Por otra parte, la artritis reumatoide juvenil (ARJ) es una enfermedad autoinmune que tiene un fuerte componente inflamatorio. Su prevalencia en México se desconoce pero según la Asociación Mexicana de Familiares y Pacientes con

Artritis Reumatoide A.C., alrededor de 6000 niños mexicanos la padecen, lo que corresponde aproximadamente al 0.2% de los menores de 16 años (AMEPAR 2012). De acuerdo con el Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés) y la Liga Europea Contra el Reumatismo, la ARJ se diagnostica clínicamente con base a los siguientes criterios: rigidez matutina, inflamación de articulaciones, presencia de nódulos reumatoides, cambios radiológicos típicos en manos y muñecas, niveles elevados de factor reumatoide en suero y, además, desde 2010 el diagnóstico precoz se apoya de las pruebas serológicas que miden los niveles de anticuerpos contra péptidos citrulinados, proteína C reactiva, velocidad de sedimentación globular y el hecho de que los pacientes precisen tratamiento con metotrexato (Gómez 2011). En general, la característica principal de la artritis reumatoide es que en la membrana sinovial de las articulaciones se produce una infiltración anormal de células inflamatorias como linfocitos Th17, células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, que interaccionan y secretan mediadores proinflamatorios clave. Entre estos últimos se encuentran $TNF\alpha$, $IL1\beta$, IL6, IL12, IL17, IL18 e $IFN\gamma$, los cuales están implicados en la perpetuación de la inflamación crónica. Así mismo, se presenta inhibición de la apoptosis, secreción de de MMPs y catepsinas, que median el proceso inflamatorio y la destrucción articular. Los linfocitos B actúan mediante la producción de autoanticuerpos, como células activadoras de los linfocitos T en su función de células presentadoras de antígeno y de activación de fibroblastos mediante la secreción de citocinas del tipo Th1 (Hamilton y Tak 2009; Chang *et al.* 2010; Sanchez-Ramon *et al.* 2011).

Genética de las enfermedades inmunes

Las EI son de etiología multifactorial o compleja, es decir, son causadas por la interacción de factores ambientales y genéticos, donde no existe un patrón de herencia definido y, a diferencia de las enfermedades monogénicas, en donde un solo gen es el causante de la enfermedad, en aquellas participan en su desarrollo varios genes. A la fecha, existen varias estrategias para identificar a los factores genéticos asociados con el riesgo de padecer enfermedades complejas como las EI; dentro de estos, los estudios de asociación han sido lo más utilizados. Éstos evalúan la co-ocurrencia de un marcador con la enfermedad en individuos no relacionados, permiten detectar genes con un efecto pequeño en la enfermedad y son menos costosos comparados con otros abordajes.

Estudio de asociación: casos y controles

Los estudios de asociación más ampliamente utilizados son los de casos y controles. En ellos se comparan las frecuencias de una variante alélica o polimorfismo específico entre el grupo de pacientes (casos) y una población de individuos sanos (controles). La predominancia o disminución del alelo en alguna de las poblaciones de estudio (casos o controles), sugiere que la variante podría estar asociada con la enfermedad, ya sea como factor de susceptibilidad o de protección (Fig. 2).

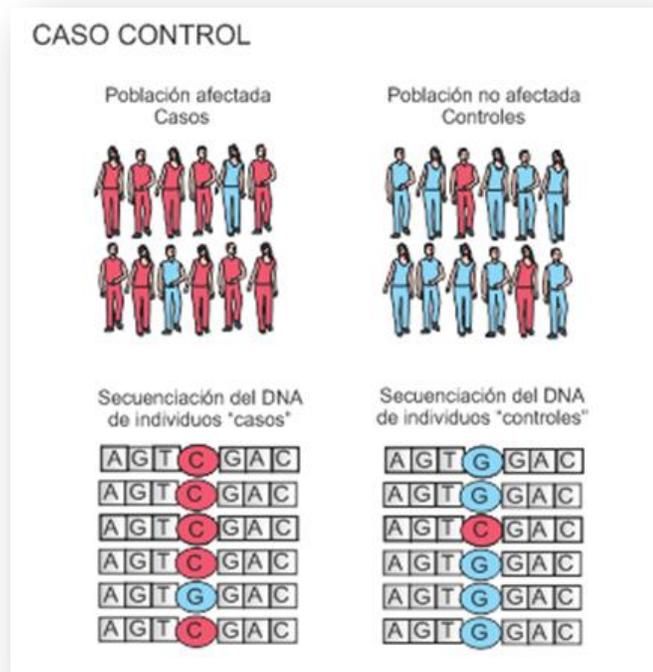


Figura 2. Estudio de asociación casos y controles. La variante C se encuentra con mayor frecuencia en la población de casos, por lo que se sugiere que ésta podría ser un factor de riesgo para la enfermedad en cuestión.

Así, los estudios de asociación se basan principalmente en el análisis de polimorfismos de genes candidatos, que, en general, son genes que, por su función, pueden tener un papel relevante en la fisiopatología de una enfermedad o estar implicados en la respuesta al tratamiento. Un polimorfismo se define como una variación en la secuencia de DNA presente en al menos el 1% de la población general y los de elección en este tipo de estudios son los SNPs, los cuales son las variaciones genéticas más abundantes y, además, la materia prima para la mayoría de los estudios genéticos y bases de datos (Johnson 2009). La secuencia del

genoma humano ha revelado que existe un SNP por cada 300pb, y que éstas variantes se distribuyen de manera no aleatoria por todo el genoma, de los cuales sólo una pequeña proporción (<1%) puede, potencialmente, alterar la función de las proteínas (Venter *et al.* 2001). Los SNPs se localizan en regiones diferentes de los genes por lo que pueden, o no, tener una importancia funcional, al afectar la cantidad y actividad de las proteínas codificadas en los genes respectivos (Ramirez-Bello *et al.* 2013). Los SNPs que se encuentran en las regiones promotoras de los genes se denominan reguladores (rSNP) y pueden afectar los niveles de expresión génica. Mientras que los llamados SNPs-RNA estructurales (srSNP) se encuentran tanto en los RNA primarios como en los secundarios, esto incluye a las regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR) y regiones intrónicas y codificantes (sin que ocurra un cambio de aminoácido), llegando a afectar la estructura y función de los RNA, incluyendo el corte y empalme (*splicing*), la regulación de la traducción de los RNAm a proteínas, la funcionalidad de las proteínas y la estabilidad de los RNAm, la poliadenilación de los RNAm, entre otros procesos biológicos normales de las células (Hernández-Romano *et al.* 2009; Sadee *et al.* 2011; Ramirez-Bello *et al.* 2013). Por último, los SNPs en regiones codificantes puede representar un cambio en la secuencia de una proteína (SNP no sinónimo) y, por lo tanto, potencialmente alterar su función o bien puede no cambiar su secuencia (SNP sinónimo) (Hernández-Romano *et al.* 2009).

La desventaja principal de los estudios de asociación de casos y controles es la estratificación poblacional, la cual puede generar falsos positivos. Una alternativa

potencial para eliminar la posibilidad de falsas asociaciones por estratificación es aplicar la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT), la cual compara la frecuencia con la que padres heterocigotos para un marcador, heredan un alelo a su hijo enfermo. Cuando uno de los alelos se transmite con mayor frecuencia en los pacientes se infiere que este puede estar asociado con la enfermedad o en desequilibrio de ligamiento (LD) con el gen causal (Santos *et al.* 2002).

Fondo genético de riesgo común en EI

Dentro de los genes candidato reportados más frecuentemente como factores de riesgo para las EI se incluyen: el complejo antígeno leucocitario humano (*HLA*) clase I y II, la tirosina-fosfatasa 22 (*PTPN22*), factor de necrosis tumoral alfa (*TNF α*), transductor de la señal y activador de la transcripción 4 (*STAT4*), interleucinas de respuesta Th1 y Th2 (*IL1*, *IL4*, *IL6*, *IL6R*, *IL13*, *IL17*, etc.), interferón gamma (*IFN γ*), el gen similar al receptor Fc 3 (*FCRL3*) y, recientemente, los receptores tipo Toll (*TLRs*) (Hirankarn *et al.* 2009; Jimenez-Morales *et al.* 2009; Ji *et al.* 2010; Orozco *et al.* 2011; Ramirez-Bello *et al.* 2013; Hussein *et al.* 2014). De hecho, se sabe que la desregulación de la señalización TLR puede causar autoinmunidad o alergia, contribuyendo al inicio y progresión de enfermedades autoinmunes, como AR, encefalitis autoinmune, miocarditis, hepatitis, enfermedad renal, LES, asma, rinosinusitis, etc. (Li *et al.* 2009).

Receptores tipo Toll

Los TLRs son proteínas transmembranales de tipo I, que poseen tres dominios: 1) un dominio extracelular, conformado por repeticiones ricas en leucinas, que reconoce patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs) específicos, 2) un dominio único transmembranal (TMD) y 3) un dominio intracelular o citoplasmático del receptor Toll-interleucina (TIR), necesario para la transducción de señales (Medzhitov 2001; Christmas 2010). Los PAMPs reconocidos por los TLRs incluyen lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos derivados de un grupo amplio de microbios como bacterias, virus, parásitos y hongos (Akira *et al.* 2006).

La señalización de los TLRs juega un papel importante en la activación del sistema inmune adaptativo mediante la inducción de citocinas proinflamatorias y la regulación por incremento de moléculas coestimuladoras de las células presentadoras de antígeno (Li *et al.* 2009). Además, la activación de los TLRs conduce a una cascada de señalización compleja que deriva en la expresión de quimiocinas, enzimas destructivas del tejido e IFN tipo I, moléculas que son indispensables en el mecanismo de defensa por parte del sistema inmunitario en contra de las moléculas extrañas (Brentano *et al.* 2005).

Estos receptores están ampliamente conservados entre las especies, los seres humanos tienen 10 TLRs funcionales conocidos, los cuales se pueden dividir con base en su localización celular y PAMPs de reconocimiento (Fig. 3). El primer grupo está integrado por los receptores que se localizan en la superficie de la célula

como TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10 y reconocen componentes de las paredes celulares bacterianas. El segundo grupo se compone por TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, que se expresan en compartimentos intracelulares como los endosomas y reconocen ácidos nucleicos bacterianos y virales (Kawai y Akira 2010). Estos últimos, son capaces de reconocer complejos inmunes que contienen ácidos nucleicos endógenos los cuales, en condiciones patológicas, pueden exacerbar o inducir autoinmunidad.

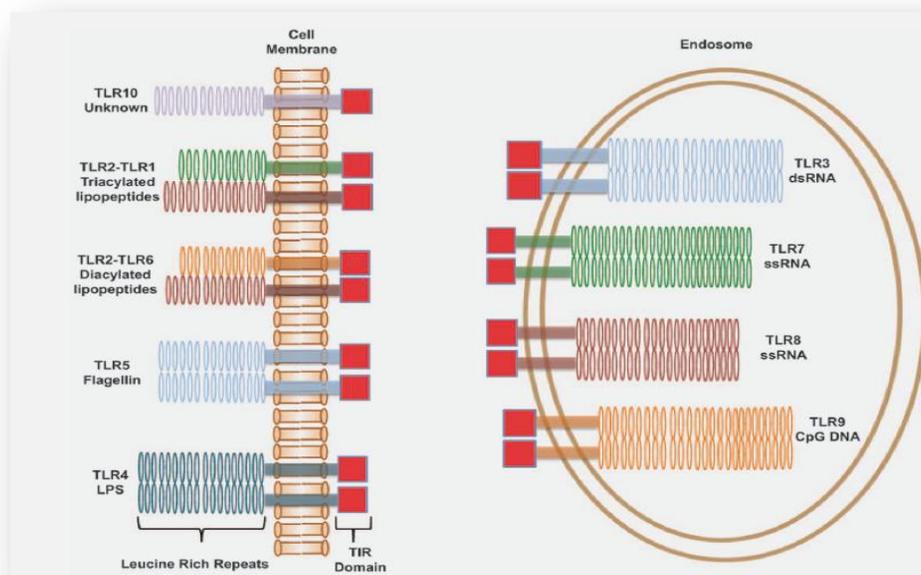


Figura 3. Familia de receptores tipo Toll en el ser humano. Los TLRs se clasifican de acuerdo con su localización en la célula y al tipo de ligando que reconocen. (Tomada de: Godfroy et al. 2012).

TLRs endosomales

Los TLRs 3, 7, 8 y 9 se expresan básicamente en el interior de las células (dendríticas y macrófagos), sobre el retículo endoplásmico y las membranas de los endosomas, donde detectan a los ácidos nucleicos microbianos. Aunque no todos los ligandos son producidos exclusivamente por los microbios, los elaborados por las células del huésped normalmente no se hallan en las zonas endosómicas. Además, los TLRs endosomales distinguen las sustancias propias de las ajenas según el lugar celular donde se encuentren los ligandos a los que se unen.

Los receptores endosomales inician la defensa crítica del organismo mediante una cascada de señalización que finaliza en la activación de factores de transcripción (Fig. 4). Dicha señalización se da después de que el receptor (dímero proteico) ha sido activado por el reconocimiento de PAMPs específicos. La dimerización o activación permite la unión de proteínas adaptadoras contenidas en el extremo citoplasmático del receptor, a través de las interacciones homotípicas entre los dominios TIR, presentes tanto en el receptor como en la proteína adaptadora (ejemplo: MyD88, Mal, TRIF y TRAM). Los TLRs emplean diversas combinaciones de adaptadores, lo que sienta las bases de los efectos comunes posteriores, exclusivos de los TLRs. Sin embargo, en todos los casos, las proteínas adaptadoras resultan decisivas para el ensamblaje de complejos señalizadores, que abarcan cinasas (normalmente miembros de la familia IRAK). Un efecto ulterior de la transmisión de señales por el TLR que resulta fundamental, es la activación del factor

de transcripción NF- κ B, requisito necesario para la expresión de muchos genes relacionados con la inmunidad innata y la inflamación (*TNF*, *IL1*, quimiocinas como CCL2, etc.) y moléculas de adhesión endotelial (ejemplo: selectina E). Los mismos TLRs que propician la activación de NF- κ B también suelen dar lugar a la activación de otro factor de transcripción llamado AP1. Estos dos procesos suponen una vía para la transmisión de señales que depende de la proteína MyD88. Excepto TLR3, todos los TLRs se unen a MyD88 que, en la mayoría de los casos, interacciona con los miembros de la familia de la cinasa asociada con el receptor IL1 (IRAK) y las proteínas IRAK hacen lo mismo con el factor asociado con el receptor del TNF6 (TRAF6) y lo activan. El TRAF6, que favorece la ubiquitinación de las moléculas señalizadoras, estimula a la cinasa 1 activada por el TGF- β (TAK1) que, a su vez, pone en marcha las cascadas de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y el inhibidor de la cinasa de NF- κ B (I κ B). Las cascadas de la cinasa MAP y la cinasa I κ B conducen a la activación y a la localización en el núcleo de los factores de transcripción AP1 y NF- κ B, respectivamente (Takeda *et al.* 2003; Kawai y Akira 2007; Keogh y Parker 2011; Godfroy *et al.* 2012).

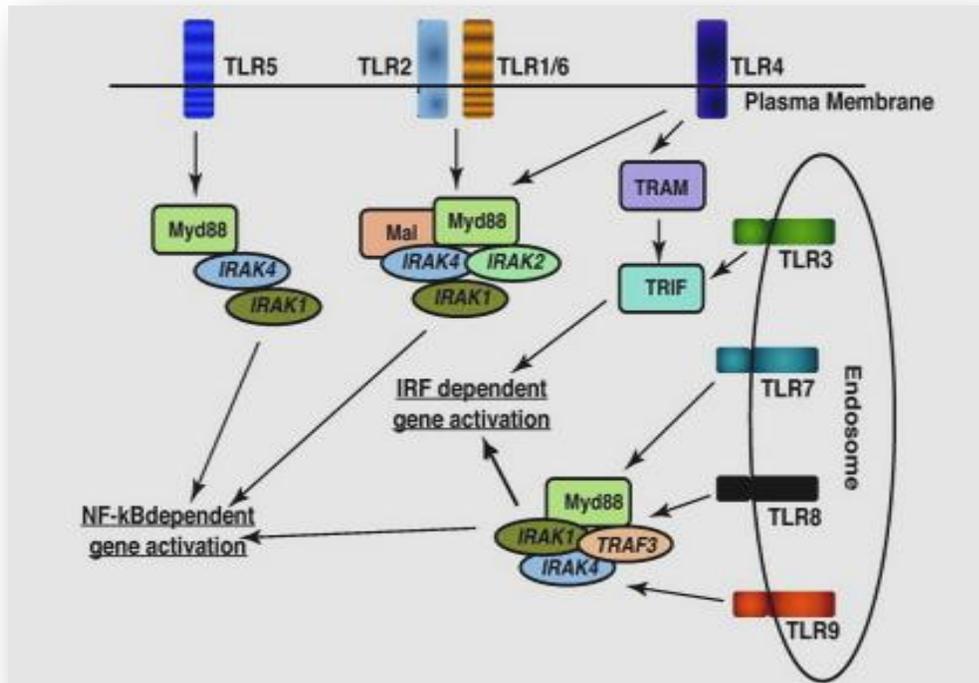


Figura 4. Señalización de los TLRs. Una vez que los receptores, ya sea de membrana plasmática o bien endosomales, reconocen a su ligando, inician una vía de señalización que finaliza en la activación de factores de transcripción como NF-kB o moléculas reguladoras como IRF. (Tomada de: Keogh y Parker 2011).

TLR3

El receptor TLR3 es el receptor endosómico para el RNA vírico (RNA de doble cadena asociado con infecciones), activa a IRF3 a través de la interacción con la proteína adaptadora TRIF, la cual activa la cinasa TBK1 (cinasa de unión al activador de NF-kB asociada a los miembros de la familia de TRAF). A continuación, TBK1 pone en marcha el factor de transcripción IRF3, que estimula la expresión de los genes correspondientes al IFN tipo 1, es decir, *IFN α* e *IFN β* . Estas citocinas bloquean la multiplicación vírica en las células, por tanto, los patrones moleculares producidos

por los virus movilizan los TLRs que estimulan la transcripción de citocinas antivíricas. El TRAF6 también es reclutado por el complejo transmisor de señales inducido por los ligandos de TLR3, lo que provoca la activación de NF- κ B (Takeda *et al.* 2003; Theofilopoulos *et al.* 2011). El gen *TLR3* se localiza en la región 3 del brazo largo del cromosoma 4 (4q35) y está conformado por 5 exones, sin embargo, la proteína es codificada por los exones 2-5 (Trejo-de la *et al.* 2014).

Se ha sugerido que TLR3 desempeña un papel importante en el remodelamiento de las vías respiratorias de pacientes asmáticos ya que se ha visto que su activación provoca un incremento de la producción de metaloproteínas de matriz (MMPs) a través de la generación de especies reactivas de nitrógeno en fibroblastos humanos de pulmón (Ichikawa *et al.* 2014).

Así mismo, en modelos de ratones con LES se ha visto que, al inducir la activación de TLR3, se incrementan los factores que pueden agravar la lesión tisular autoinmune debido a que las células dendríticas secretan IL6, CCL2 e INF α , aumentando sus niveles en suero, también se alteran en los niveles de autoanticuerpos anti-DNA que, en conjunto, resulta en que la nefritis lúpica se agrave (Patole *et al.* 2005).

Por otro lado, se ha sugerido que el RNA de doble cadena liberado de las células necróticas del fluido sinovial estaría activando la vía TLR3 y, consecuentemente, conduciendo a la génesis de AR (Brentano *et al.* 2005); además, se ha detectado la expresión de TLR3, 7 y 9 en el tejido sinovial humano de estos

pacientes (Roelofs *et al.* 2005; Kawane *et al.* 2006). Es de destacar que la hidroxicloroquina, un medicamento contra la malaria, es uno de los fármacos más antiguos utilizados con éxito en el tratamiento de la AR; parece que su modo de acción es que inhibe la acidificación de los endosomas, bloqueando la señalización de los TLRs situados en éste organelo (Kyburz *et al.* 2006).

TLR7 y TLR8

TLR7 y TLR8 reconocen RNA viral de cadena sencilla y pertenecen a la misma subfamilia de TLRs junto con TLR9, es decir, los que en la señalización pueden inducir la activación del regulador IRF7 (Keogh y Parker 2011). Los genes *TLR7* y *TLR8* se localizan en tándem en la región 2 del brazo corto del cromosoma X (Xp22) y son codificados por 2 exones (Trejo-de la *et al.* 2014).

En modelos experimentales de ratones con una expresión disminuida o nula de TLR7 y que son expuestos a infecciones virales repetidas se ha visto que desarrollan un fenotipo asmático (Kaiko *et al.* 2013), en tanto que, en modelos *in vitro* de ratón y humanos, se ha demostrado que la sobreexpresión de TLR7 confiere riesgo a padecer LES. En el caso de pacientes con LES, se sabe que los individuos llegan a formar inmunocomplejos de RNA, los cuales han sido implicados en la patogénesis de LES por la activación proinflamatoria vía TLR7 (Lau *et al.* 2005).

En AR la activación de las células sinoviales, particularmente de los fibroblastos, lleva a la secreción de moléculas efectoras proinflamatorias y

degradadoras de la matriz extracelular, pero lo que dispara ésta activación aberrante no se conoce (Ospelt y Gay 2009). Estudios en animales han mostrado que se les puede inducir el desarrollo de AR una vez que se les ha inyectado ligandos de TLRs endosomales, como RNA viral o motivos CpG de DNA bacteriano (Deng *et al.* 1999; Zare *et al.* 2004). Por otra parte, se sugiere que TLR8 está implicado en la actividad de los inflammasomas, ya que antagonistas sintéticos de este receptor llegan a inhibir la respuesta Th1, Th17, la actividad del inflammasoma NLRP3 y AIM2, así como la expresión de IL1 β en modelos de ratones con EI (Jiang *et al.* 2013).

TLR9

El receptor TLR9, que es esencial para el reconocimiento de las islas CpG no metiladas del DNA bacteriano, recluta a MyD88, lo que desemboca en la activación del IRF7, un factor de transcripción que, como IRF3, provoca que el gen *IFN1* se exprese; asimismo, la transmisión de señales del TLR9 también activa NF-kB (Takeda *et al.* 2003; Kawai y Akira 2007). El locus de *TLR9* se localiza en la región 2 del brazo corto del cromosoma tres (3p21.3) y contiene dos exones, siendo el segundo la región codificante más importante (Trejo-de la *et al.* 2014).

El papel de los receptores TLR en la patogénesis de enfermedades alérgicas, como el asma, resulta de la activación y regulación de la respuesta inmune, debido a que la estimulación de los productos microbianos permite que los TLRs influyan en la función de las células Treg, determinen el balance de la respuesta Th1/Th2 y la

diferenciación de células Th17; controlen la producción de citocinas de los mastocitos y la activación de eosinófilos; además de que en varios experimentos se demuestra que la estimulación, a través de TLRs, puede estar implicada tanto en el desarrollo como en la protección contra las enfermedades alérgicas (Debinska y Boznanski 2014). También se ha sugerido a los TLRs endosomales como blanco terapéutico, por ejemplo, se ha descrito que agonistas sintéticos de TLR7 y TLR9 tienen efectos positivos en modelos murinos de asma, en los que se incluye una reducción de los niveles de resistencia y elastancia de las vías respiratorias (Moisan *et al.* 2006; Ramaprakash *et al.* 2009). Por otro lado, se sabe que pacientes con LES presentan cantidades elevadas (por acumulación) de residuos de células muertas por apoptosis. Estos residuos contienen ácidos nucleicos en concentraciones altas, por lo que, al interactuar con los anticuerpos contra DNA (característicos de LES), forman complejos inmunes que estimulan la inflamación crónica por la vía TLR9 (Means *et al.* 2005; Ospelt y Gay 2009). Por otro lado, se ha descrito el papel controversial de TLR9 como regulador de LES ya que se ha visto que TLR9 dispara la señalización aberrante que induce la enfermedad debido al reconocimiento de los complejos anti-dsDNA, sin embargo en modelos de ratón con éste gen deletado se llega a presentar un LES de grado más severo (Yu *et al.* 2008).

Polimorfismos en TLRs endosomales

La capacidad para responder correctamente a los ligandos de los TLRs puede ser modificada por polimorfismos de un solo nucleótido en los genes *TLRs*. Además, varios reportes sugieren que sus variaciones genéticas están relacionadas con la susceptibilidad a varias EI (Trejo-de la *et al.* 2014). La primera investigación que demostró una mutación en un gen *TLR* con implicaciones fisiológicas y patológicas fue la que se detectó en ratones de la cepa C3H/HeJ. En este modelo, una sustitución del aminoácido prolina por histidina en la posición 712 de TLR4 provocó un fenotipo de hiporespuesta a LPS, lo que hizo a ésta cepa de ratones más susceptible a infecciones por bacterias Gram negativas (Poltorak *et al.* 1998; Hoshino *et al.* 1999).

Varios estudios han sugerido que polimorfismos en genes específicos de *TLRs* afectan la respuesta a virus y bacterias, y esto podría estar involucrado en el desarrollo de enfermedades como asma, LES y ARJ. Por ejemplo, del gen *TLR3* se ha reportado que el SNP rs1519309 se asocia con asma atópica en australianos pero no en niños canadienses (Daley *et al.* 2012). Mientras que rs3775291 del mismo gen, se ha asociado con el hecho de padecer AR en población Danesa (Laska *et al.* 2014). Así mismo, se ha reportado que los SNPs rs179008 de *TLR7* y rs2407992 de *TLR8* están asociados con la susceptibilidad al asma y a trastornos atópicos en población de Dinamarca (Moller-Larsen *et al.* 2008). En otra investigación, que incluyó las poblaciones europea y asiática, se mostró una asociación entre el SNP

rs3853839 (*TLR7*) con LES en pacientes asiáticos (Lee *et al.* 2012). En tanto que el haplotipo GG formado por rs3853839 (*TLR7*) y rs3764880 (*TLR8*) incrementan el riesgo de padecer LES en mujeres taiwanesas (Wang *et al.* 2014). Por otra parte, se ha documentado que otro tipo de polimorfismo, las variantes en el número de copias (CNVs) en el gen *TLR7*, son un factor de riesgo para padecer LES. En el estudio de García-Ortiz y col., se demostró una correlación entre el número de copias con la sobreexpresión de *TLR7* y el riesgo a padecer LES en población mexicana (García-Ortiz *et al.* 2010). Para *TLR9* también existen evidencias de asociación entre SNPs y el desarrollo de EI. Así, el polimorfismo -1237C/T, de su región promotora, afecta la transcripción (Lange *et al.* 2011); y el alelo C, se ha asociado con riesgo mayor a asma entre los estadounidenses de origen europeo (Lazarus *et al.* 2003).

Por otro lado, en una investigación realizada en población japonesa se vio que el alelo G de la variación genética 1174 del intrón 1 de *TLR9* está estrechamente asociada con un riesgo mayor de padecer LES (Tao *et al.* 2007). Así mismo, está reportada la asociación de rs352139 con LES en asiáticos (Lee *et al.* 2012). Mientras que en pacientes turcos se ha encontrado una relación entre el SNP rs187084 de *TLR9* y AR, pero no con rs3775290 de *TLR3* (Lee *et al.* 2013).

Antecedentes

Las investigaciones genómicas en México sobre asma, LES y ARJ han evidenciado una gran complejidad genética en los factores que predisponen al desarrollo de estas enfermedades en los niños mexicanos. Por un lado, polimorfismos en genes que son factores de riesgo para éstas entidades en otras poblaciones no lo son para nuestra población pero, por otro lado, se han aportado evidencias de que estas entidades mediadas por el sistema inmune comparten factores genéticos de riesgo.

Así, en un estudio preliminar donde se analizaron alrededor de 100 SNPs en niños con asma, se reportó que polimorfismos en genes como *IL4*, *IL4R*, *RANTES*, y *SPINK5*, no confieren riesgo para padecer asma en los niños mexicanos a diferencia de lo reportado en poblaciones caucásicas y asiáticas. Más aún, genes como *CHRM2* y *MMP9* se asociaron fuertemente con el riesgo a padecer asma en nuestra población (Orozco y Jiménez-Morales 2012) .

Por otra parte, se han reportado más de un centenar de genes asociados con las LES, principalmente en población adulta; sin embargo, únicamente alrededor de 50 han mostrado resultados reproducibles. Dentro de estos genes se incluyen aquellos que codifican para proteínas de la vía de señalización del IFN tipo I como *IRF5*, *IRAK*, *TREX1* y *TNFAIP3*, así como otras proteínas implicadas en la regulación inmune, la inflamación, la quimioatracción, la maduración de las células dendríticas y la pérdida de la tolerancia inmunológica (Harley *et al.* 2009). En estudios de casos y

controles realizados en adultos mexicanos se encontró asociación del alelo DRB*0301 de *HLA*, del polimorfismo 1267A/B del gen *HSP70-2* y del -238G/A del *TNF α* con el riesgo a desarrollar LES (Velázquez-Cruz *et al.* 2012).

Es interesante remarcar que, estudios realizados en niños con asma, LES y ARJ, han documentado que existe un fondo genético de riesgo común entre estas entidades y que algunos son específicos de patologías autoinmunes, alérgicas o inflamatorias en nuestra población. Por ejemplo, el alelo A del SNP -380A/G del gen *TNF α* confiere riesgo para padecer asma, LES y ARJ (Jimenez-Morales *et al.* 2009). Mientras que el SNP -169T/C localizado en la región 5' del gen *FCRL3* y el haplotipo CGCA del mismo gen confieren riesgo a padecer asma y ARJ pero no LES (Ramirez-Bello *et al.* 2013).

Sin duda, los receptores TLRs tienen un papel relevante en la respuesta inmune innata y adaptativa, por lo que alteraciones en su función pueden conducir al desarrollo de diversas EIs. Como un primer acercamiento para entender la fisiopatología de estas entidades en la población infantil mexicana, éste estudio pretende determinar si SNPs en los genes endosomales *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* se asocian con la susceptibilidad o protección a padecer asma, LES o ARJ en los niños.

II. JUSTIFICACIÓN

El asma, la ARJ y el LES son entidades mediadas por el sistema inmune, causadas tanto por la interacción de una gran cantidad de genes como por factores ambientales diversos. Son enfermedades complejas y de difícil diagnóstico ya que suelen confundirse con otros padecimientos inmunitarios o enfermedades infecciosas. Existe evidencia de que polimorfismos en genes implicados en la respuesta inmune, como los *TLRs* confieren riesgo para padecerlas. Los *TLRs* son receptores que tienen un papel fundamental en el reconocimiento de moléculas derivadas de patógenos como virus y bacterias. La activación de éstos durante la respuesta inmune, contribuye a un balance en la respuesta de tipo Th1 (autoinmunidad) o de tipo Th2 (alergias). Por lo tanto, polimorfismos en estos genes pueden contribuir al desarrollo de entidades como asma, LES y ARJ. Éstas, son enfermedades crónicas que requieren tratamiento de por vida, lo que resulta en un costo elevado para el individuo, la familia y el país. El hecho de dilucidar si SNPs en los receptores *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* están asociados con alguna de estas entidades en población mexicana, nos dará información de los factores genéticos que confieren riesgo para padecerlas. Este conocimiento puede, en un futuro, contribuir a un diagnóstico temprano, desarrollo de nuevos fármacos y tratamientos más específicos.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿SNPs localizados en los receptores *TLRs* endosomales podrían ser biomarcadores en el desarrollo de asma, LES o ARJ?

IV. HIPÓTESIS

Si SNPs en los genes *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* se asocian con el riesgo a padecer asma, LES y ARJ entonces estos podrían ser potenciales biomarcadores en el desarrollo de entidades inmunes.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar SNPs en genes *TLRs* endosomales asociados a la susceptibilidad o protección para padecer artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso sistémico o asma en población pediátrica mexicana.

Objetivos particulares

- Determinar si los SNPs analizados en los genes *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* confieren riesgo para EI.
- Conocer si existen SNPs o haplotipos asociados a asma, LES o ARJ de inicio temprano.
- Predecir el efecto funcional de los SNPs asociados.
- Evaluar interacción génica entre los SNPs estudiados.
- Comparar la frecuencia de los SNPs evaluados en la población sana con otras poblaciones

VI. MATERIAL Y MÉTODO

Para este proyecto se realizó un estudio de asociación de casos y controles, prospectivo, observacional, analítico y descriptivo.

Población de estudio

Se incluyeron un total de 1375 individuos no relacionados, de los cuales 368 fueron adultos sanos y 1007 pacientes pediátricos. De los pacientes, 417 tenían diagnóstico de asma, 377 de LES y 213 de ARJ. Todas las muestras fueron tomadas del banco de DNA del laboratorio de Inmunogenómica y enfermedades metabólicas del INMEGEN.

Los pacientes fueron reclutados de cuatro hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México, cada paciente fue evaluado y diagnosticado por el médico especialista correspondiente. Las muestras de los individuos sanos fueron obtenidas del banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría (INP). Los participantes fueron sujetos mayores de 18 años sin antecedentes de enfermedades autoinmunes, alérgicas, crónicas inflamatorias, cáncer o diabetes. El estudio contó con la aprobación de los comités de ética de las instituciones participantes. En el caso de los pacientes, las muestras de sangre periférica fueron tomadas después de que se contó con la carta de consentimiento informado, firmada por los padres o tutores y con el asentimiento de los pacientes.

Criterios de inclusión

Pacientes: con diagnóstico clínico confirmado por el médico especialista correspondiente. Para los individuos con asma, el diagnóstico se basó en los criterios publicados por la Sociedad Torácica Americana y la GINA. Los diagnósticos de ARJ y LES se basaron en los criterios publicados por el ACR y la EULAR. Así mismo, se incluyeron a los pacientes menores de 16 años cuyos padres o tutores firmaron la carta de consentimiento informado.

Controles: se incluyeron a individuos sanos mayores de 18 años sin antecedentes de enfermedades autoinmunes, asma o alergia.

Criterios de exclusión

Pacientes que padecían una enfermedad concomitante.

Criterios de eliminación

Se eliminaron del estudio a los pacientes y controles que después de dar su consentimiento, cambiaron de opinión y decidieron salirse del estudio. Además, de aquellos participantes de los cuales no se obtuvo una muestra que cumpliera con los estándares de calidad.

Análisis molecular

Para la formación del banco de DNA, de cada participante se tomaron 10 ml de sangre periférica en un tubo Vacutainer con EDTA como anticoagulante. La

extracción del DNA se realizó utilizando el kit de Qiagen y bajo las especificaciones del proveedor. Posteriormente, se evaluó la integridad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop).

Selección de SNPs

En el estudio se incluyeron 21 SNPs, los cuales fueron seleccionados con base en reportes previos de asociación con patologías inmunes en otras poblaciones (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los SNPs incluidos.

| GEN | SNP | LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA | REGIÓN DEL GEN | ALELO | CAMBIO DE aa | TIPO DE SNP |
|------|-----------|--------------------------|----------------|-------|--------------|-------------|
| TLR3 | rs3775290 | Chr.4: 187004217 | Exón | C/T | Phe 459 Phe | Sinónimo |
| TLR3 | rs3775291 | Chr.4: 187004074 | Exón | C/T | Leu 412 Phe | no sinónimo |
| TLR3 | rs3775296 | Chr.4: 186997767 | 5'UTR | C/A | | |
| TLR7 | rs179008 | Chr.X: 12903659 | Exón | A/T | Gln 11 Leu | no sinónimo |
| TLR7 | rs3853839 | Chr.X: 12907658 | 3'UTR | C/G | | |
| TLR7 | rs5743733 | Chr.X: 12889708 | Intrón | C/G | | |
| TLR7 | rs179019 | Chr.X: 12889969 | Intrón | A/C | | |
| TLR7 | rs179010 | Chr.X: 12902885 | Intrón | C/T | | |
| TLR7 | rs1634323 | Chr.X: 12888127 | Intrón | A/G | | TAG SNP |
| TLR8 | rs5744077 | Chr.X: 12937187 | Exón | A/G | Met 10 Val | no sinónimo |
| TLR8 | rs2159377 | Chr.X: 12937513 | Exón | C/T | Asp 118 Asp | Sinónimo |
| TLR8 | rs5741887 | Chr.X: 12935998 | Intrón | A/T | | |
| TLR8 | rs2109134 | Chr.X: 12927186 | Intrón | A/T | | |
| TLR8 | rs3747414 | Chr.X: 12939412 | Exón | A/C | Ile 751 Ile | Sinónimo |
| TLR8 | rs2407992 | Chr.X: 12939112 | Exón | C/G | Leu 651 Leu | Sinónimo |
| TLR9 | rs352140 | Chr.3: 52256697 | Exón | C/T | Pro 545 Pro | Sinónimo |
| TLR9 | rs187084 | Chr.3: 52261031 | Intrón | A/G | | |
| TLR9 | rs352144 | Chr.3: 52261468 | | G/T | | |
| TLR9 | rs5743836 | Chr.3: 52260782 | Intrón | A/G | | |
| TLR9 | rs352143 | Chr.3: 52264907 | Exón | C/T | Lys 196 Lys | Sinónimo |
| TLR9 | rs352139 | Chr.3: 52258372 | Intrón | C/T | | |

Genotipificación

La genotipificación se realizó mediante discriminación alélica, usando el método fluorescente de la 5' exonucleasa (TaqMan). Para cada ensayo de discriminación alélica se diseñaron 2 sondas específicas, marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes para cada sonda: VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2. Ambas sondas contienen en el extremo 3' un desactivador de la fluorescencia o *quencher* (TAMRA) con el cual, mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los *cebadores* hibridan con una secuencia específica del molde de DNA. Si éste contiene la secuencia polimórfica de interés, la sonda Taqman también hibrida con su secuencia homóloga. Durante la PCR, la AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda marcada durante la amplificación y liberar el fluorocromo de la acción del *quencher* (reportero), de tal manera que, dadas las condiciones de astringencia utilizadas durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente es capaz de hibridar. Por lo tanto, por medio de esta técnica fue posible diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida y determinar el genotipo de cada individuo para cada SNP (Fig. 5). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de acuerdo con las especificaciones establecidas por el proveedor Applied Biosystems (Tabla 2) en termocicladores 9700 HT. La lectura de la fluorescencia para la discriminación alélica se llevó a cabo en el equipo PCR tiempo real.

Tabla 2. Condiciones de PCR para el método TaqMan.

| CICLOS | TEMPERATURA | TIEMPO |
|--------|-------------|--------|
| 1 | 50°C | 2 m |
| | 95°C | 10 m |
| 45 | 95°C | 15 s |
| | 60°C | 1 m |
| 1 | 4°C | ∞ |

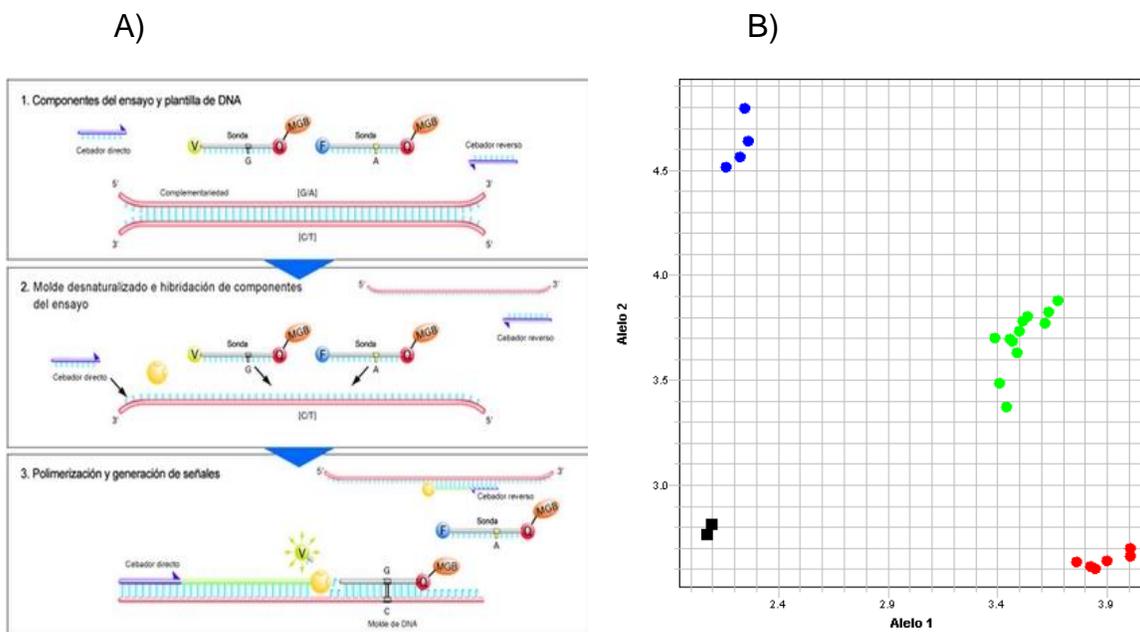


Figura 5. Técnica fluorescente de la 5' exonucleasa (A). Discriminación alélica (B): que muestra los niveles de fluorescencia para cada alelo. En rojo VIC (homocigoto para el alelo 1), en azul FAM (homocigoto para el alelo 2) y en verde, la combinación de ambas fluorescencias (heterocigotos). En negro se ven los controles.

Validación de resultados

Los resultados de la genotipificación se validaron mediante secuenciación automática (Fig. 6), eligiendo muestras al azar pero representando los tres genotipos (heterocigoto y homocigoto para ambos alelos) de los SNPs asociados. Los *cebadores* específicos para cada uno de los 4 SNPs validados (Tabla 3) fueron diseñados con el programa Primer 3. En la reacción de secuenciación se utilizó una mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs) y didesoxinucleótidos (ddNTPs) a concentraciones que crean una probabilidad finita de que un ddNTP se incorpore en lugar del correspondiente dNTP en cada posición de la cadena naciente. La incorporación de un ddNTP bloquea la elongación de la cadena y esto da como resultado una población de fragmentos de DNA truncados de longitud diferente. La identidad del nucleótido que termina la cadena en cada posición se pudo identificar con una única reacción de elongación combinando los 4 ddNTPs pero marcando cada uno de éstos específicamente. La población de moléculas resultante se separó por tamaños mediante electroforesis capilar, y la secuencia se obtuvo correlacionando el orden de los fragmentos en el capilar con el ddNTP en que termina cada uno de ellos.

Tabla 3. Lista de cebadores para la secuenciación de los polimorfismos asociados.

| SNP | CEBADOR | SECUENCIA | TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO (°C) | PRODUCTO (PB) |
|-----------|------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------|
| rs5743733 | TLR7-3733F | AGG ATT TCC TGC TCT CCT GA | 63 | 398 |
| | TLR7-3733R | CAA TGA ATT TGA GGG CAA GG | 63 | 398 |
| rs2159377 | TLR8-9377F | TAC AGG AAG TTC CCC AAA CG | 60 | 383 |
| | TLR8-9377R | GCA GTT CCA GGC CAA ATA GA | 60 | 383 |
| rs3747414 | TLR8-7414F | GCT TGA CTT ACG TGG AAA CAA A | 60 | 300 |
| | TLR8-7414R | TTC AGA TGT TCA TCC ATC CAT C | 60 | 300 |
| rs2407992 | TLR8-7992F | AGC AGG CGT AAC ACA TCA TCT | 60 | 475 |
| | TLR8-7992R | GGG TAG GTG GGA AAT CCT GT | 60 | 475 |

Secuencia que flanquea al SNP rs2159377:
AATGGCTTGA ATATCACAGA C/T GGGGCATTCC TCAACCTAAA

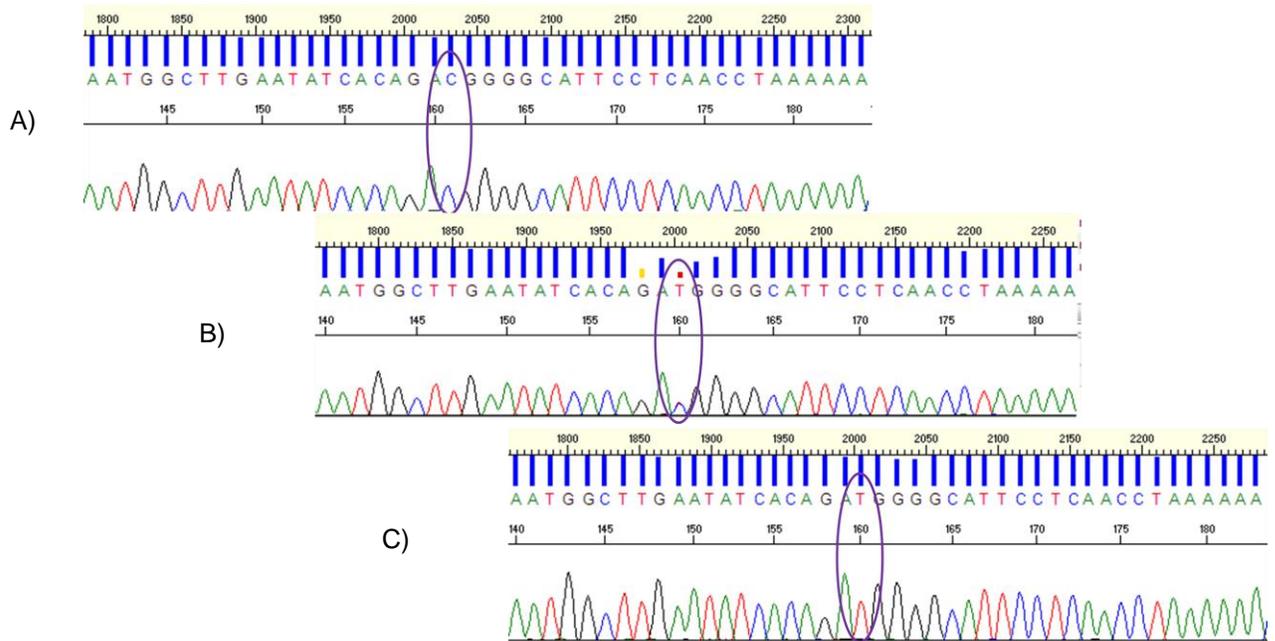


Figura 6. Secuenciación del SNP rs2159377 de TLR8. A): genotipo CC (homocigoto del alelo ancestral), B): genotipo CT (heterocigoto) y C): genotipo TT (homocigoto del alelo con menor frecuencia).

Análisis *in silico*

Para predecir el efecto funcional de los SNPs asociados se utilizó el programa bioinformático SNP Function Prediction (<http://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snpfunc.htm>).

Análisis estadístico

La evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se realizó mediante el programa FINNETI (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Para determinar la significancia estadística de los datos se empleó la prueba de X^2 implementada en el programa Statcalc de EpilInfo V. 6. El análisis de LD (Fig. 7) y de haplotipos se realizó mediante el programa HAPLOVIEW V. 3.32 (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>). Mientras que el análisis de interacción génica se realizó con el software PLINK (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>). Para evaluar el poder estadístico del estudio se utilizó el programa QUANTO, considerando las prevalencias de asma, LES y ARJ, una MAF de 1% y asumiendo un modelo de riesgo aditivo.

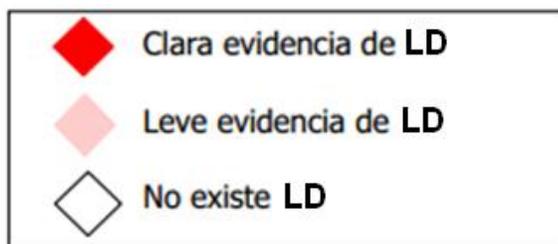


Figura 7. Análisis de LD con el software HAPLOVIEW.
El color de los rombos indica el grado de LD entre las variantes.

VII. RESULTADOS

Población estudiada

En el estudio se incluyeron 1375 individuos no relacionados, de los cuales 368 fueron adultos sanos y 1007 pacientes pediátricos. De estos últimos, 417 fueron pacientes con asma, 163 (39%) mujeres y 254 (61%) hombres. Mientras que de los 377 niños con LES, 313 (83%) correspondieron a mujeres y solamente 64 (17%) fueron hombres. Por otro lado, 126 (59%) de los 213 casos con ARJ fueron mujeres y 87 (41%) hombres. La población control se conformó de 184 (50%) mujeres y 184 (50%) hombres.

Análisis de genotipificación

Para todos los polimorfismos estudiados, la distribución de los genotipos tanto en casos como en controles, se encontró en HWE. Este apartado no dice absolutamente nada, me parece que lo tienes que explicar mejor.

Estudio de asociación con *TLR3*

Análisis de SNPs

En el análisis comparativo de los SNPs del gen *TLR3* entre controles y casos con asma, LES y ARJ, se observó que las frecuencias de los alelos menores (MAFs) de cada una de las variantes evaluadas fue mayor en pacientes que en controles, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 4). Por ejemplo

el rs3775296A se presentó en el 13% de los individuos sanos, en tanto que éste se detectó en el 17% de la población con ARJ y en el 16% tanto de población con LES como con asma. Para el caso del alelo rs3775291T, la frecuencia en población sana fue del 25%, y en lúpicos y artríticos, fue de 29% y 28%, respectivamente. Cabe hacer notar que, en los pacientes con asma, el rs3775291 mostró una asociación estadísticamente significativa (OR=1.3, IC 95% [1.0-1.68], p=0.0485), sin embargo, ésta se perdió después de corregir los datos mediante comparaciones múltiples. Por otra parte, el rs3775290 tuvo una MAF del 32% en individuos sanos, mientras que en la población asmática fue del 36% y en la población con LES y ARJ del 37%.

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs de TLR3 en población total con asma, LES y ARJ.

| ID SNP | POBLACIÓN | FRECUENCIAS DE GENOTIPOS (%) | | | FRECUENCIAS DE ALELOS (%) | | P |
|-----------|-----------------|------------------------------|-----------|-----------|---------------------------|----------|---------------|
| | | CC | CA | AA | C | A | |
| rs3775296 | | CC | CA | AA | C | A | |
| | CONTROLES N=302 | 76 | 21 | 3 | 87 | 13 | |
| | ASMA N=352 | 72 | 24 | 4 | 84 | 16 | 0.158 |
| | LES N=346 | 72 | 25 | 3 | 84 | 16 | 0.263 |
| | ARJ N=175 | 70 | 25 | 5 | 83 | 17 | 0.092 |
| rs3775291 | | CC | CT | TT | C | T | |
| | CONTROLES N=266 | 59 | 33 | 8 | 75 | 25 | |
| | ASMA N=308 | 50 | 40 | 10 | 70 | 30 | 0.0485 |
| | LES N=363 | 48 | 45 | 7 | 71 | 29 | 0.075 |
| | ARJ N=205 | 52 | 41 | 7 | 72 | 28 | 0.340 |
| rs3775290 | | CC | CT | TT | C | T | |
| | CONTROLES N=324 | 47 | 41 | 12 | 68 | 32 | |
| | ASMA N=380 | 42 | 43 | 15 | 64 | 36 | 0.112 |
| | LES N=343 | 40 | 45 | 15 | 63 | 37 | 0.060 |
| | ARJ N=161 | 40 | 45 | 15 | 63 | 37 | 0.132 |

El análisis de estratificación por género reveló una asociación género dependiente entre el rs3775296 (OR=1.94, IC 95% [1.13-3.31], p=0.0095) y rs3775290 (OR=1.78, IC 95% [1.14-2.77], p=0.0071) con ARJ en población masculina (Tabla 5); y, en el caso de asma, el rs3775291 confiere riesgo, igualmente, sólo en la población masculina (OR=1.44, IC 95% [1.0-1.68], p=0.043). En población con LES, éste último muestra asociación en un modelo dominante (CC vs CT, OR=1.65 IC 95% [1.17-2.31], p=0.0034) y aditivo (CC vs [CT + TT], OR=1.52 IC 95% [1.10-2.09], p=0.0096).

Tabla 5. Análisis de asociación entre SNPs en TLR3 y pacientes con asma, LES y ARJ.

| ID SNP | POBLACIÓN | CONTROLES (%) | CASOS (%) | OR [IC 95%] | P |
|-------------|---------------|---------------|-----------|------------------|---------------|
| ARJ | | | | | |
| | MASCULINA | n=314 | n=142 | | |
| | Alelos | | | | |
| | C | 86 | 76 | | |
| | A | 14 | 24 | 1.94 [1.13-3.31] | 0.0095 |
| | | n=157 | n=71 | | |
| Rs3775296 | Genotipos | | | | |
| | CC | 76 | 58 | | |
| | CA | 21 | 35 | | |
| | AA | 3 | 7 | | |
| | Modelos | | | | |
| | CC vs CA | | | 2.21 [1.18-4.15] | 0.012 |
| | CC vs AA | | | 3.65 [0.93-14.2] | 0.048 |
| | CC vs CA + AA | | | 2.37 [1.30-4.31] | 0.0041 |
| ASMA | | | | | |
| | Pobl. TOTAL | n=532 | n=616 | | |
| | Alelos | | | | |
| | C | 75 | 71 | | |
| | T | 25 | 29 | 1.3 [1.0-1.68] | 0.048 |
| rs3775291 | | n=266 | n=308 | | |
| | Modelos | | | | |
| | CC vs CT | | | 1.41 [0.99-2.01] | 0.053 |
| | CC vs TT | | | 1.42 [0.79-2.57] | 0.23 |
| | CC vs CT + TT | | | 1.41 [1.01-1.97] | 0.038 |

| ASMA | | | | | |
|---------------------|---------------|-------|-------|------------------|---------------|
| MASCULINA | | n=316 | n=424 | | |
| Alelos | C | 77 | 70 | | |
| | T | 23 | 30 | 1.44 [0.99-2.10] | 0.043 |
| | | n=158 | n=212 | | |
| Genotipos | CC | 52 | 56 | | |
| | CT | 40 | 34 | | |
| | TT | 8 | 10 | | |
| Modelos | CC vs CT | | | 0.77 [0.50-1.20] | 0.25 |
| | CC vs TT | | | 1.20 [0.56-2.58] | 0.63 |
| | CC vs CT + TT | | | 0.84 [0.55-1.27] | 0.41 |
| LES | | | | | |
| Pobl. TOTAL | | n=532 | n=726 | | |
| Alelos | C | 75 | 71 | | |
| | T | 25 | 29 | 1.25 [0.97-1.62] | 0.075 |
| | | n=266 | n=363 | | |
| Modelos | CC vs CT | | | 1.65 [1.17-2.31] | 0.0034 |
| | CC vs TT | | | 1.01 [0.54-1.86] | 0.96 |
| | CC vs CT + TT | | | 1.52 [1.10-2.09] | 0.0096 |
| ARJ | | | | | |
| MASCULINA | | n=314 | n=142 | | |
| Alelos | C | 67 | 53 | | |
| | T | 33 | 47 | 1.78 [1.14-2.77] | 0.0071 |
| | | n=157 | n=71 | | |
| rs3775290 Genotipos | CC | 45 | 25 | | |
| | CT | 41 | 54 | | |
| | TT | 14 | 21 | | |
| Modelos | CC vs CT | | | 2.34 [1.21-4.50] | 0.0099 |
| | CC vs TT | | | 2.68 [1.16-6.20] | 0.018 |
| | CC vs CT + TT | | | 2.43 [1.30-4.52] | 0.0044 |

Análisis de haplotipos

El análisis de haplotipos reveló un LD alto entre las tres variantes de *TLR3* tanto en asma (>83), LES (>95) y ARJ (>93) (Fig. 8).

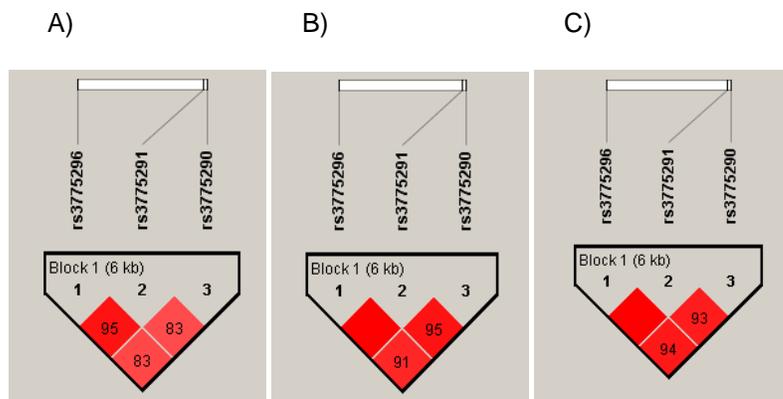


Figura 8. Análisis de LD entre los 3 SNPs seleccionados del gen TLR3 en población total: asma (A), LES (B) y ARJ (C).

En asma se identificaron 6 haplotipos, mientras que en LES y ARJ fueron 4, de los cuales únicamente el CCC presentó diferencias estadísticamente significativas en la población asmática (OR=0.76, IC 95% [0.60-0.95], $p=0.013$) y en la población con LES (OR=0.73, IC 95% [0.58-0.91], $p=0.005$) (Tabla 13).

Después de estratificar éste haplotipo por género, se presentó con mayor frecuencia en controles que en pacientes con LES de población masculina (40% vs 28%, respectivamente; OR=0.59, IC 95% [0.36-0.95], $p=0.018$), lo mismo que en población masculina con ARJ, donde la frecuencia fue mayor en los controles (40.9% vs 28.3%; OR=0.57, IC 95% [0.36-0.89], $p=0.0097$). Así mismo, en este grupo de varones con ARJ, se identificó al haplotipo ACT como de riesgo para padecer esta entidad autoinmune (OR=2.03, IC 95% [1.18-3.49], $p=0.0048$) (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de haplotipos de TLR3 en población total con asma, LES y ARJ.

| ENTIDAD INMUNE | HAPLOTIPO | CONTROLES (%) | CASOS (%) | OR [IC 95%] | P | P AJUSTADA* |
|----------------|-----------|---------------|-----------|------------------|--------------|--------------|
| ASMA | CCC | 40 | 34 | 0.76 [0.60-0.95] | 0.013 | 0.039 |
| | CTC | 25 | 27 | | 0.312 | |
| | CCT | 19 | 19 | | 0.9 | |
| | ACT | 12 | 14 | | 0.35 | |
| | CTT | 1.2 | 2.1 | | 0.2 | |
| | ACC | 0.9 | 1.8 | | 0.12 | |
| LES | CCC** | 40 | 32 | 0.73 [0.58-0.91] | 0.005 | 0.015 |
| | CTC | 25 | 29 | | 0.17 | |
| | CCT | 19 | 22 | | 0.33 | |
| | ACT | 12 | 14 | | 0.23 | |
| ARJ | CCC*** | 40 | 35 | | 0.08 | |
| | CTC | 25 | 27 | | 0.45 | |
| | CCT | 19 | 19 | | 0.91 | |
| | ACT**** | 12 | 17 | | 0.06 | |

*Valor de P después de ajustar por la corrección de Bonferroni; **CCC, haplotipo asociado a LES en población masculina OR=0.59 IC 95% [0.36-0.95], p=0.018, p*=0.054; ***CCC, haplotipo asociado a ARJ en población masculina, OR=0.57 IC 95% [0.36-0.89], p=0.0097, p*=0.029; ****ACT, haplotipo asociado a ARJ en población masculina, OR=2.03 IC 95% [1.18-3.49], p=0.0048, p*=0.014.

Estudio de asociación con *TLR7*

Análisis de SNPs

Dado que el gen *TLR7* se localiza en el cromosoma X, el análisis comparativo de los 6 SNPs (rs1634323, rs5743733, rs179019, rs179010, rs179008 y rs3853839) se realizó estratificando por género. La distribución de los alelos no mostró diferencias significativas excepto para el rs5743733C en ARJ donde el 92% en mujeres sanas lo portaron, mientras que en las pacientes con ARJ la frecuencia fue del 97% (OR=2.8, IC 95% [1.12-6.99], p=0.021) (Tabla 7). Para el caso de la

población masculina, las frecuencias entre controles y pacientes con patologías inmunes sólo mostraron diferencias significativamente estadísticas para el rs179010 en los varones con asma (OR=3.1, IC 95% [1.0-10.29], p=0.0255) y con ARJ (OR=9.5, IC 95% [1.2-205.14], p=0.0109) (Tabla 8).

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs de TLR7 en población femenina con asma, LES y ARJ.

| ID SNP | POBLACIÓN | FRECUENCIAS DE GENOTIPOS (%) | | | FRECUENCIAS DE ALELOS (%) | | P |
|-----------|----------------|------------------------------|-----------|-----------|---------------------------|----------|---------------|
| | | AA | AG | GG | A | G | |
| rs1634323 | | | | | | | |
| | CONTOLES N=153 | 99 | 1 | - | 99.7 | 0.3 | |
| | ASMA N=108 | 99 | 1 | - | 99.5 | 0.5 | 1.235 |
| | LES N=272 | 99 | 1 | - | 99.6 | 0.4 | 1.007 |
| | ARJ N=113 | 98 | 2 | - | 99 | 1 | 0.661 |
| rs5743733 | | CC | CG | GG | C | G | |
| | CONTOLES N=153 | 85 | 14 | 1 | 92 | 8 | |
| | ASMA N=128 | 90 | 9 | 1 | 94 | 6 | 0.464 |
| | LES N=247 | 84 | 16 | - | 92 | 8 | 0.897 |
| | ARJ N=102 | 94 | 6 | - | 97 | 3 | 0.021* |
| rs179019 | | AA | AC | CC | A | C | |
| | CONTOLES N=149 | 3 | 15 | 82 | 10 | 90 | |
| | ASMA N=113 | 4 | 23 | 73 | 16 | 84 | 0.060 |
| | LES N=282 | 3 | 23 | 74 | 14 | 86 | 0.100 |
| | ARJ N=96 | 3 | 21 | 76 | 14 | 86 | 0.290 |
| rs179010 | | CC | CT | TT | C | T | |
| | CONTOLES N=102 | 83 | 15 | 2 | 91 | 9 | |
| | ASMA N=85 | 84 | 14 | 2 | 91 | 9 | 0.974 |
| | LES N=284 | 82 | 17 | 1 | 90 | 10 | 0.877 |
| | ARJ N=93 | 83 | 14 | 3 | 90 | 10 | 0.764 |
| rs179008 | | AA | AT | TT | A | T | |
| | CONTOLES N=169 | 69 | 28 | 3 | 83 | 17 | |
| | ASMA N=147 | 74 | 22 | 4 | 85 | 15 | 0.334 |
| | LES N=270 | 66 | 29 | 5 | 81 | 19 | 0.461 |
| | ARJ N=114 | 63 | 33 | 4 | 79 | 21 | 0.283 |
| rs3853839 | | CC | CG | GG | C | G | |
| | CONTOLES N=153 | 21 | 44 | 35 | 43 | 57 | |
| | ASMA N=120 | 25 | 33 | 42 | 42 | 58 | 0.673 |
| | LES N=282 | 17 | 41 | 42 | 37 | 63 | 0.064 |
| | ARJ N=117 | 26 | 33 | 41 | 42 | 58 | 0.787 |

*rs5743733C OR=2.80, IC 95% [1.12-6.99].

Tabla 8. Frecuencias alélicas de SNPs de TLR7 en población masculina con asma, LES y ARJ

| ID SNP | POBLACIÓN | FRECUENCIAS DE ALELOS (%) | | P |
|-----------|-----------------|---------------------------|----------|-----------------|
| | | A | G | |
| rs1634323 | | | | |
| | CONTROLES N=111 | 100 | - | - |
| | ASMA N=187 | 100 | - | - |
| | LES N=49 | 100 | - | - |
| | ARJ N=75 | 100 | - | - |
| rs5743733 | | C | G | |
| | CONTROLES N=131 | 98 | 2 | |
| | ASMA N=203 | 95 | 5 | 0.205 |
| | LES N=46 | 96 | 4 | 0.182 |
| | ARJ N=72 | 96 | 4 | 0.274 |
| rs179019 | | A | C | |
| | CONTROLES N=72 | 14 | 86 | |
| | ASMA N=194 | 13 | 87 | 0.821 |
| | LES 52 | 19 | 81 | 0.444 |
| | ARJ N=65 | 14 | 86 | 0.968 |
| rs179010 | | C | T | |
| | CONTROLES N=81 | 85 | 15 | |
| | ASMA N=135 | 96 | 4 | 0.0255* |
| | LES N=50 | 96 | 4 | 0.094 |
| | ARJ N=66 | 98 | 2 | 0.0109** |
| rs179008 | | A | T | |
| | CONTROLES N=162 | 88 | 12 | |
| | ASMA N=222 | 83 | 17 | 0.219 |
| | LES N=50 | 84 | 16 | 0.992 |
| | ARJ N=77 | 91 | 9 | 0.656 |
| rs3853839 | | C | G | |
| | CONTROLES N=145 | 30 | 70 | |
| | ASMA N=156 | 39 | 61 | 0.232 |
| | LES N=50 | 36 | 64 | 0.608 |
| | ARJ N=82 | 34 | 66 | 0.914 |

*rs179010C OR=3.1, IC 95% [1.0-10.29]; **rs179010C OR=9.5, IC 95% [1.2-205.14].

Análisis de haplotipos

El análisis de haplotipos en *TLR7* reveló que, prácticamente, no hay LD entre las variantes estudiadas de éste gen en las entidades inmunes estudiadas. Únicamente en población femenina se ve LD entre rs1634323 y rs179010 para LES y ARJ (Fig. 9).

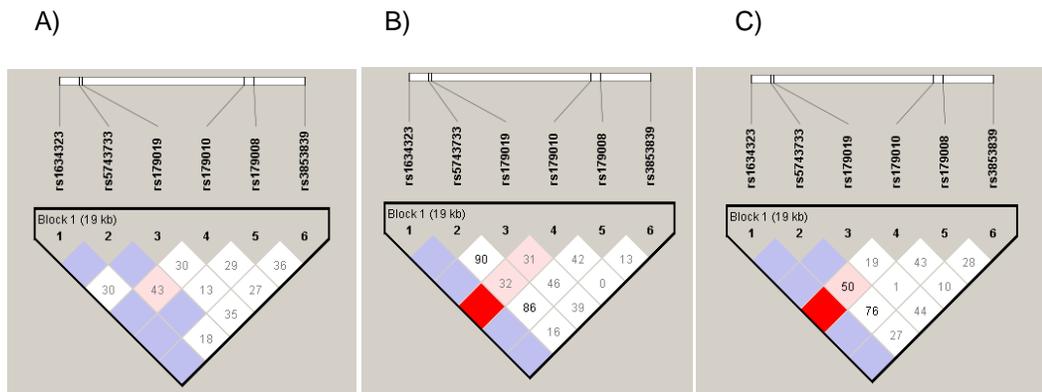


Figura 9. Análisis de LD entre variantes del gen *TLR7* en población femenina: asma (A), LES (B) y ARJ (C).

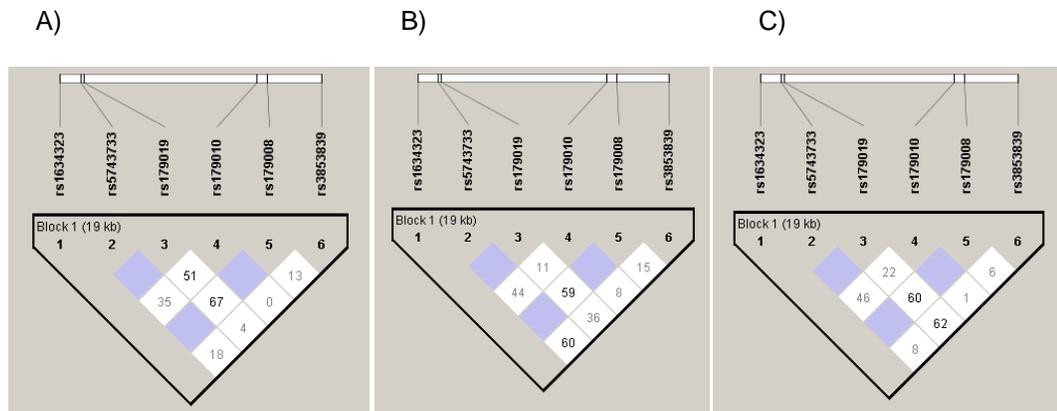


Figura 10. Análisis de LD entre variantes del gen *TLR7* en población masculina: asma (A), LES (B) y ARJ (C).

En la población femenina se identificaron 9 haplotipos para asma, 10 para LES y 10 para ARJ. El haplotipo ACCCAC, el cual mostró una frecuencia en controles de 28.7% y en casos con LES del 22.8%, mostró diferencias significativas (OR=0.73, IC 95% [0.53-1.01], $p=0.048$). Sin embargo, al aplicar la corrección de Bonferroni la significancia estadística se pierde. En ARJ, aunque el AGCCAC presentó una frecuencia mayor en controles (3.2%) que en casos (0.5%) (OR=0.14, IC 95% [0.01-1.06], $p=0.0367$) la significancia estadística se pierde al corregir por Bonferroni (Tabla 9).

En el caso de la población masculina se encontraron 10 haplotipos en asma, 10 en LES y 8 en ARJ, sin embargo, no se identificaron haplotipos con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 10).

Tabla 9. Análisis de haplotipos de TLR7 en población femenina con asma, LES y ARJ.

| ENTIDAD INMUNE | HAPLOTIPO | CONTROLES (%) | CASOS (%) | OR [IC 95%] | P | P AJUSTADA* |
|----------------|-----------|---------------|-----------|-------------------|--------------|-------------|
| ASMA | ACCCAG | 35 | 34 | | 0.78 | |
| | ACCCAC | 29 | 28 | | 0.83 | |
| | ACCCTG | 10 | 8 | | 0.59 | |
| | ACACAG | 5 | 8 | | 0.14 | |
| | ACCCTC | 5 | 3 | | 0.42 | |
| | AGCTAG | 3 | 4 | | 0.92 | |
| | AGCCAC | 3 | 2 | | 0.5 | |
| | ACATAC | 2 | 4 | | 0.21 | |
| | CACTG | 1 | 1 | | 0.53 | |
| LES | ACCCAG | 35 | 35 | | 0.9 | |
| | ACCCAC | 28 | 22 | 0.73 [0.53- 1.01] | 0.048 | 0.28 |
| | ACCCTG | 9 | 10 | | 0.56 | |
| | ACACAG | 5 | 8 | | 0.18 | |
| | ACCCTC | 5 | 6 | | 0.84 | |
| | AGCTAG | 3 | 3 | | 0.89 | |
| | AGCCAC | 3 | 3 | | 0.73 | |
| | ACATAC | 2 | 2 | | 0.58 | |
| | AGCCAG | 0.8 | 1 | | 0.19 | |
| | ACATAG | 0.9 | 1 | | 0.45 | |
| ARJ | ACCCAG | 34 | 34 | | 0.84 | |
| | ACCCAC | 30 | 30 | | 0.96 | |
| | ACCCTG | 8 | 9 | | 0.9 | |
| | ACACAG | 6 | 7 | | 0.43 | |
| | ACCCTC | 5 | 6 | | 0.73 | |
| | ACATAC | 2 | 2 | | 0.82 | |
| | AGCCAC | 3 | 0.5 | 0.14 [0.01-1.06] | 0.036 | 0.21 |
| | ACCTAG | 1 | 2 | | 0.51 | |
| | CACTG | 1 | 1 | | 0.9 | |
| | AGCTAG | 1 | 1 | | 0.8 | |

*Valor de P después de ajustar por la corrección de Bonferroni.

Tabla 10. Análisis de haplotipos de TLR7 en población masculina con asma, LES y ARJ.

| ENTIDAD INMUNE | HAPLOTIPO | CONTROLES (%) | CASOS (%) | P |
|----------------|-----------|---------------|-----------|-------|
| ASMA | ACCCAG | 43 | 39 | 0.45 |
| | ACCCAC | 22 | 25 | 0.53 |
| | ACCCTG | 9 | 12 | 0.31 |
| | ACACAG | 8 | 5 | 0.31 |
| | ACCCTC | 3 | 4 | 0.46 |
| | ACATAG | 5 | 2 | 0.11 |
| | ACATAC | 2 | 2 | 0.77 |
| | ACACAC | 1 | 2 | 0.66 |
| | AGCCAC | 0.8 | 2 | 0.29 |
| | AGCTAG | 1 | 1 | 0.57 |
| LES | ACCCAG | 39 | 37 | 0.8 |
| | ACCCAC | 25 | 22 | 0.65 |
| | ACACAG | 12 | 14 | 0.71 |
| | ACCCTG | 8 | 9 | 0.89 |
| | ACCTAG | 5 | 1 | 0.27 |
| | ACCCTC | 3 | 2 | 0.9 |
| | ACCTAC | 0.8 | 3 | 0.27 |
| | AGCCAC | 1 | 2 | 0.11 |
| | ACACAC | 1 | 2 | 0.72 |
| | ACATAC | 0.9 | 1 | 0.72 |
| ARJ | ACCCAG | 41 | 44 | 0.84 |
| | ACCCAC | 22 | 26 | 0.96 |
| | ACACAG | 11 | 12 | 0.9 |
| | ACCCTG | 8 | 7 | 0.43 |
| | ACATAG | 5 | 1 | 0.73 |
| | ACCCTC | 3 | 2 | 0.82 |
| | ACCTAC | 3 | 0.1 | 0.036 |
| | AGCTAG | 1 | 2 | 0.51 |

*Valor de P después de ajustar la por corrección de Bonferroni.

Estudio de asociación con *TLR8*

Análisis de SNPs

Del análisis de los 6 SNPs del gen *TLR8* (rs2109134, rs5741887, rs5744077, rs2159377, rs2407992 y rs3747414) se obtuvo que, aunque las MAFs de estos SNPs en los individuos sanos difirieron con respecto a las frecuencias observadas en los pacientes, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tablas 11 y 12).

Análisis de haplotipos

El análisis en *TLR8* mostró que existe LD entre 3 de las variantes estudiadas de éste gen: rs2159377, rs2407992 y rs3747414, siendo más alto en población masculina que en población femenina y más alto en LES y ARJ (>95) en comparación con el grupo de asma (Figs. 11 y 12).

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs de TLR8 en población femenina con asma, LES y ARJ.

| ID SNP | POBLACIÓN | FRECUENCIAS DE GENOTIPOS (%) | | | FRECUENCIAS DE ALELOS (%) | | P |
|------------|-------------------|------------------------------|----|----|---------------------------|-----|------|
| | | AA | AT | TT | A | T | |
| rs2109134 | CONTOLES N=157 | 95 | 5 | - | 97.5 | 2.5 | |
| | ASMA N=134 | 97 | 3 | - | 98.5 | 1.5 | 0.37 |
| | ARJ N=115 | 97 | 3 | - | 99 | 1 | 0.37 |
| rs5741887 | CONTOLES N=181 | 98 | 2 | - | 99 | 1 | |
| | ASMA N=133 | 98 | 2 | - | 99 | 1 | 1.01 |
| | ARJ N=114 | 96 | 4 | - | 98 | 2 | 0.32 |
| rs5744077 | CONTOLES N=119 | 98 | 2 | - | 99 | 1 | |
| | ASMA N=135 | 99 | 1 | - | 99.6 | 0.4 | 1.06 |
| | ARJ N=110 | 99 | 1 | - | 99.5 | 0.5 | 1.11 |
| rs21599377 | CONTOLES N=161 | 41 | 43 | 16 | 63 | 37 | |
| | ASMA N=134 | 38 | 41 | 21 | 59 | 41 | 0.30 |
| | LES N=268 | 37 | 46 | 17 | 60 | 40 | 0.47 |
| | ARJ N=111 | 37 | 43 | 20 | 59 | 41 | 0.32 |
| rs2407992 | CONTOLES N=159 | 47 | 42 | 11 | 68 | 32 | |
| | ASMA N=130 | 49 | 39 | 12 | 69 | 31 | 0.75 |
| | LES N=266 | 48 | 43 | 9 | 70 | 30 | 0.47 |
| | ARJ N=118 | 56 | 36 | 8 | 74 | 26 | 0.09 |
| rs3747414 | CONTOLES N=168 | 43 | 45 | 12 | 65 | 35 | |
| | ASMA N=129 | 49 | 39 | 12 | 69 | 31 | 0.29 |
| | LES N=261 | 37 | 52 | 11 | 63 | 37 | 0.62 |
| | ARJ N=114 | 53 | 36 | 11 | 71 | 29 | 0.15 |

Tabla 12. Frecuencias alélicas de los SNPs de TLR8 en población masculina con asma, LES y ARJ.

| ID SNP | POBLACIÓN | FRECUENCIAS DE ALELOS (%) | | P |
|------------|-----------------|---------------------------|------|------|
| | | A | T | |
| rs2109134 | | | | |
| | CONTROLES N=160 | 99 | 1 | |
| | ASMA N=225 | 98 | 2 | 0.69 |
| | ARJ N=79 | 97.5 | 2.5 | 0.49 |
| rs5741887 | | A | T | |
| | CONTROLES N=131 | 100 | - | |
| | ASMA N=215 | 100 | - | - |
| | ARJ N=76 | 98.5 | 1.5 | 0.18 |
| rs5744077 | | A | G | |
| | CONTROLES N=137 | 100 | - | |
| | ASMA N=233 | 99 | 1 | 0.27 |
| | ARJ N=73 | 98.5 | 1.5 | 0.18 |
| rs21599377 | | C | T | |
| | CONTROLES N=147 | 61 | 39 | |
| | ASMA N=205 | 66 | 34 | 0.18 |
| | LES N=49 | 67 | 33 | 0.40 |
| | ARJ N=72 | 62.5 | 37.5 | 0.76 |
| rs3747414 | | A | C | |
| | CONTROLES N=160 | 71 | 29 | |
| | ASMA N=208 | 70 | 30 | 0.49 |
| | LES N=39 | 61.5 | 38.5 | 0.34 |
| | ARJ N=81 | 72 | 28 | 0.77 |

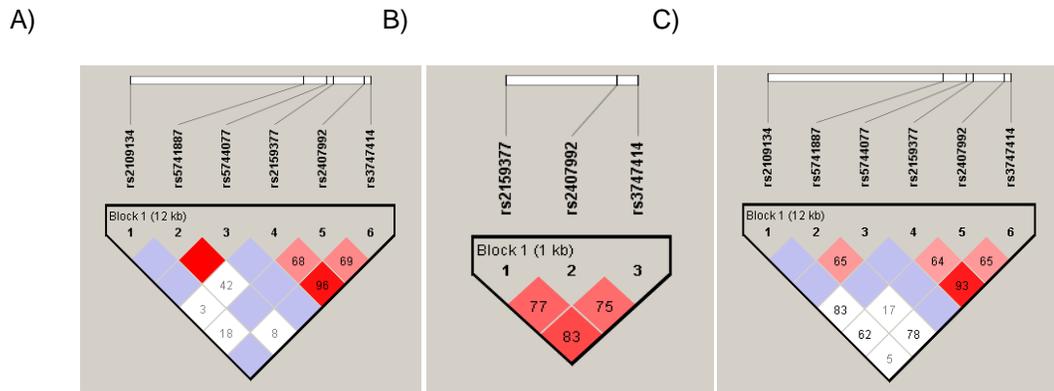


Figura 11. Análisis de LD entre variantes del gen TLR8 en población femenina: asma (A), LES (B) y ARJ (C).

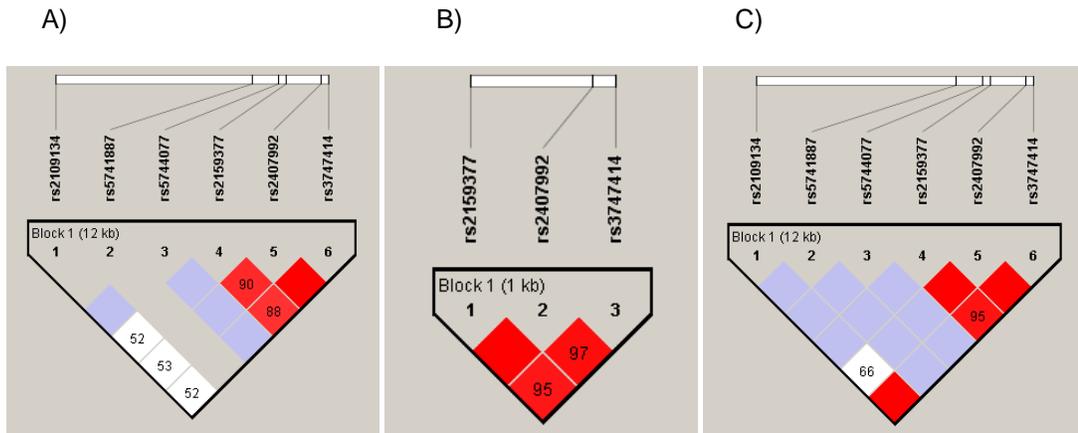


Figura 12. Análisis de LD entre variantes del gen TLR8 en población masculina: asma (A), LES (B) y ARJ (C).

En la población femenina con asma se identificaron 6 haplotipos, 7 para LES y 7 para ARJ. De los cuales, el haplotipo AAACCC se encontró con diferencias estadísticas significativas en asma (OR=0.18, IC 95% [0.07-0.43], p=0.0002) y ARJ (OR=0.18, IC 95% [0.07-0.45], p=0.001) aún corrigiendo con Bonferroni. Además los haplotipos CCC (OR=0.47, IC 95% [0.28-0.78], p=0.004), CGA (OR=0.20, IC 95% [0.07-0.54], p=0.0006) y TGA (OR=0.08, IC 95% [0.01-0.36], p=0.00017) mostraron significancia estadística con LES en población femenina. En ARJ, los haplotipos AAACGA (OR=0.18, IC 95% [0.03-0.81], p=0.04) y AAATGA (OR=0.09, IC 95% [0-0.68], p=0.04) también mostraron significancia estadística (Tabla 13).

En lo que se refiere a la población masculina, para asma se encontraron 5 haplotipos, 4 en LES y 5 en ARJ, sin embargo, ninguno mostró diferencias estadísticamente significativas (Tabla 14).

Tabla 13. Análisis de haplotipos de TLR8 en población femenina con asma, LES y ARJ.

| EI | HAPLOTIPO | CONTROLES (%) | CASOS (%) | OR [IC 95%] | P | P AJUSTADA* |
|------|-----------|---------------|-----------|------------------|-----------|----------------|
| ASMA | AAATCA | 30 | 37 | | 0.07 | |
| | AAACGC | 22 | 29 | 1.44 [0.99-2.08] | 0.044 | 0.26 |
| | AAACCA | 21 | 26 | | 0.16 | |
| | AAACCC | 12 | 2 | 0.18 [0.07-0.43] | 0.0000034 | 0.0002 |
| | AAACGA | 4 | 1 | 0.22 [0.05-0.82] | 0.011 | 0.06 |
| | AAATGA | 4 | 0.9 | 0.16 [0.02-0.73] | 0.01 | 0.06 |
| LES | TCA | 31 | 36 | | 0.13 | |
| | CGC | 21 | 28 | | 0.04 | 0.24 |
| | CCA | 23 | 25 | | 0.47 | |
| | CCC | 12 | 6 | 0.47 [0.28-0.78] | 0.0014 | 0.0042 |
| | CGA | 5 | 1 | 0.20 [0.07-0.54] | 0.0002 | 0.0006 |
| | TGA | 4 | 0.4 | 0.08 [0.01-0.36] | 0.000029 | 0.00017 |
| | TCC | 1 | 2 | | 0.17 | |
| ARJ | AAATCA | 31 | 40 | 1.47 [1.03-2.10] | 0.022 | 0.13 |
| | AAACCA | 21 | 29 | 1.50 [1.02-2.22] | 0.032 | 0.19 |
| | AAACGC | 21 | 22 | | 0.74 | |
| | AAACCC | 12 | 2 | 0.18 [0.07-0.45] | 0.000018 | 0.001 |
| | AAACGA | 4 | 0.8 | 0.18 [0.03-0.81] | 0.007 | 0.04 |
| | AAATGA | 4 | 0.6 | 0.09 [0-0.68] | 0.007 | 0.04 |
| | ATACCC | 0.6 | 2 | | 0.1 | |

*Valor de P después de ajustar por la corrección de Bonferroni.

Tabla 14. Análisis de haplotipos de TLR8 en población masculina con asma, LES y ARJ.

| EI | HAPLOTIPO | CONTROLES (%) | CASOS (%) | P |
|------|-----------|---------------|-----------|------|
| ASMA | AAACCA | 32 | 37 | 0.35 |
| | AAATCA | 39 | 32 | 0.14 |
| | AAACGC | 24 | 25 | 0.73 |
| | AAACCC | 2 | 1 | 0.43 |
| | TAACGC | 1 | 0.9 | 0.71 |
| LES | TCA | 39 | 34 | 0.51 |
| | CCA | 30 | 29 | 0.83 |
| | CGC | 26 | 31 | 0.43 |
| | CCC | 3 | 2 | 0.88 |
| ARJ | AAATCA | 39 | 38 | 0.88 |
| | AAACCA | 32 | 33 | 0.83 |
| | AAACGC | 24 | 21 | 0.65 |
| | AAACCC | 2 | 2 | 0.80 |
| | TAACGC | 1 | 1 | 0.93 |

Estudio de asociación con *TLR9*

Análisis de SNPs

La genotipificación de los SNPs del gen *TLR9* y el análisis comparativo entre casos y controles reveló que solamente el rs352143 muestra diferencias estadísticamente significativas entre controles (6%) comparado con pacientes con asma (10%, OR=1.70, IC 95% [1.08-2.69], p=0.015), con LES (12%, OR=2.01, IC 95% [1.30-3.14], p=0.00089) y con ARJ (11%, OR=1.83, IC 95% [1.08-3.09], p=0.012) (Tabla 15).

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas de SNPs de TLR9 en población total con asma, LES y ARJ.

| ID SNP | POBLACIÓN | FRECUENCIAS DE GENOTIPOS (%) | | | FRECUENCIAS DE ALELOS (%) | | P |
|-----------|----------------|------------------------------|-----------|-----------|---------------------------|----------|------------------|
| | | CC | CT | TT | C | T | |
| rs352140 | | | | | | | |
| | CONTOLES N=311 | 25 | 47 | 28 | 49 | 51 | |
| | ASMA N=361 | 20 | 49 | 31 | 45 | 55 | 0.145 |
| | LES N=347 | 21 | 52 | 27 | 47 | 53 | 0.562 |
| | ARJ N=176 | 23 | 47 | 30 | 46 | 54 | 0.470 |
| rs352139 | | CC | CT | TT | C | T | |
| | CONTOLES N=310 | 31 | 46 | 23 | 54 | 46 | |
| | ASMA N=356 | 30 | 49 | 21 | 55 | 45 | 0.912 |
| | LES N=347 | 28 | 52 | 20 | 54 | 46 | 0.995 |
| | ARJ N=170 | 30 | 48 | 22 | 54 | 46 | 0.981 |
| rs5743836 | | AA | AG | GG | A | G | |
| | CONTOLES N=320 | 89 | 10 | 1 | 94 | 6 | |
| | ASMA N=357 | 84.5 | 15 | 0.5 | 92 | 8 | 0.134 |
| | LES N=351 | 86 | 14 | - | 93 | 7 | 0.325 |
| | ARJ N=170 | 84.5 | 15 | 0.5 | 92 | 8 | 0.141 |
| rs187084 | | AA | AG | GG | A | G | |
| | CONTOLES N=309 | 31 | 44 | 25 | 53 | 47 | |
| | ASMA N=353 | 34 | 44 | 22 | 56 | 44 | 0.206 |
| | LES N=350 | 26 | 52 | 22 | 52 | 48 | 0.820 |
| | ARJ N=173 | 29 | 49 | 22 | 53 | 47 | 0.868 |
| rs352144 | | GG | GT | TT | G | T | |
| | CONTOLES N=285 | 1 | 6 | 93 | 4 | 96 | |
| | ASMA N=335 | 1 | 5 | 94 | 3 | 97 | 0.602 |
| | LES N=350 | 1 | 8 | 91 | 4 | 96 | 0.406 |
| | ARJ N=178 | 1 | 7 | 92 | 4 | 96 | 0.584 |
| rs352143 | | CC | CT | TT | C | T | |
| | CONTOLES N=268 | 0.5 | 11.5 | 88 | 6 | 94 | |
| | ASMA N=336 | 2 | 17 | 81 | 10 | 90 | 0.010* |
| | LES N=346 | 1 | 21 | 78 | 12 | 88 | 0.00089** |
| | ARJ N=165 | 0.5 | 20.5 | 79 | 11 | 89 | 0.012*** |

*rs352143C OR=1.70, IC 95% [1.08-2.69]; **rs352143C OR=2.01, IC 95% [1.30-3.14]; ***rs352143C OR=1.83, IC 95% [1.08-3.09].

Al estratificar por género y hacer el análisis, se encontró que el alelo rs352143C mantiene la significancia estadística en niñas con asma (OR=2.08, IC 95%, p=0.0257), en niñas con LES (OR=2.11, IC 95%, p=0.0105), varones con LES (OR=2.08, IC 95%, p=0.0436) y varones con ARJ (p=0.0336) (Tabla 16). También se hizo el análisis comparativo entre pacientes lúpicos con y sin nefritis, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticas significativas.

Tabla 16. Análisis de asociación entre rs352143 de TLR9 y pacientes con asma, LES y ARJ.

| POBLACIÓN | | CONTROLES (%) | CASOS (%) | [OR IC 95%] | P |
|-------------|--------------|---------------|-----------|-------------------|---------------|
| ASMA | | | | | |
| Pobl. TOTAL | | n=.536 | n=672 | | |
| Alelos | C | 6 | 10 | 1.70 [1.08-2.69] | 0.015 |
| | T | 94 | 90 | | |
| | | n=268 | n=336 | | |
| Modelos | CC vs CT | | | 1.59 [0.99-2.54] | 0.05 |
| | CC vs TT | | | 5.18 [0.62-43.39] | 0.09 |
| | CC vs CT+ TT | | | 1.70 [1.07-2.69] | 0.02 |
| ASMA | | | | | |
| FEMENINA | | n=264 | n=244 | | |
| Alelos | C | 5 | 11 | 2.08 [1.04-4.23] | 0.025 |
| | T | 95 | 89 | | |
| | | n=132 | n=122 | | |
| Genotipos | CC | 1 | 3.5 | | |
| | CT | 10 | 17 | | |
| | TT | 89 | 79.5 | | |
| Modelos | CC vs CT | | | 1.96 [0.93-4.12] | 0.07 |
| | CC vs TT | | | 4.86 [0.53-44.25] | 0.12 |
| | CC vs CT+ TT | | | 2.17 [1.07-4.40] | 0.029 |
| LES | | | | | |
| Pobl. TOTAL | | n=536 | n=692 | | |
| Alelos | C | 6 | 11 | 2.01 [1.30-3.14] | 0.0010 |
| | T | 94 | 89 | | |
| | | n=268 | n=346 | | |
| Modelos | CC vs CT | | | 2.06 [1.31-3.25] | 0.001 |
| | CC vs TT | | | 3.50 [0.39-31.61] | 0.23 |
| | CC vs CT+ TT | | | 2.11 [1.34-3.30] | 0.0009 |
| LES | | | | | |
| FEMENINA | | n=264 | n=566 | | |
| Alelos | C | 5 | 11 | 2.11 [1.14-3.94] | 0.010 |
| | T | 95 | 89 | | |
| | | n=132 | n=283 | | |

| | | | | | |
|-----------|---------------|----|------|-------------------|--------------|
| Genotipos | CC | 1 | 1.5 | | |
| | CT | 10 | 20.5 | | |
| | TT | 89 | 78 | | |
| Modelos | CC vs CT | | | 2.37 [1.24-4.50] | 0.007 |
| | CC vs TT | | | 1.59 [0.16-15.49] | 0.68 |
| | CC vs CT + TT | | | 2.31 [1.24-4.31] | 0.006 |

LES

| | | | | | |
|-----------|---------------|-------|-------|-------------------|--------------|
| MASCULINA | | n=272 | n=114 | | |
| Alelos | C | 6 | 12 | 2.08 [0.95-4.53] | 0.043 |
| | T | 94 | 88 | | |
| | | n=136 | n=57 | | |
| Genotipos | CC | - | 2 | | |
| | CT | 13 | 23 | | |
| | TT | 87 | 75 | | |
| Modelos | CC vs CT | | | 1.98 [0.89-4.38] | 0.08 |
| | CC vs TT | | | 8.17 [0.32-204.4] | 0.10 |
| | CC vs CT + TT | | | 2.13 [0.97-4.66] | 0.05 |

ARJ

| | | | | | |
|-------------|---------------|-------|-------|-------------------|--------------|
| Pobl. TOTAL | | n=536 | n=330 | | |
| Alelos | C | 6 | 10 | 1.83 [1.08-3.09] | 0.016 |
| | T | 94 | 90 | | |
| | | N=268 | N=165 | | |
| Modelos | CC vs CT | | | 1.99 [1.17-3.38] | 0.010 |
| | CC vs TT | | | 1.81 [0.11-29.26] | 0.66 |
| | CC vs CT + TT | | | 1.98 [1.17-3.35] | 0.009 |

ARJ

| | | | | | |
|-----------|---------------|-------|-------|-------------------|--------------|
| MASCULINA | | n=262 | n=132 | | |
| Alelos | C | 6 | 13 | 2.11 [0.99-4.47] | 0.033 |
| | T | 94 | 87 | | |
| | | n=131 | n=66 | | |
| Genotipos | CC | - | 2 | | |
| | CT | 14 | 24 | | |
| | TT | 86 | 74 | | |
| Modelos | CC vs CT | | | 2.05 [0.96-4.34] | 0.05 |
| | CC vs TT | | | 6.87 [0.27-171.8] | 0.13 |
| | CC vs CT + TT | | | 2.17 [1.03-4.57] | 0.03 |

Análisis de haplotipos

Con el análisis de haplotipos se observó que existe un grado alto de LD entre las variantes de *TLR9* en las tres patologías inmunes estudiadas (Fig. 13).

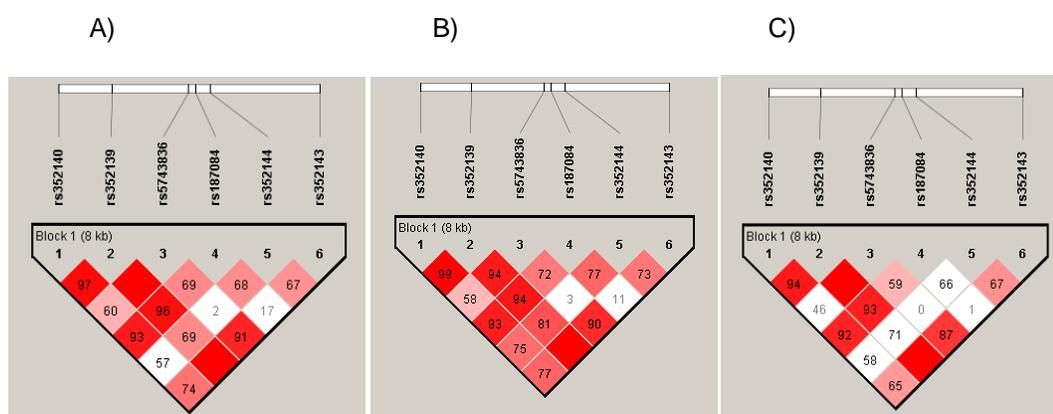


Figura 13. Análisis de LD entre variantes del gen *TLR9* en población total: asma (A), LES (B) y ARJ (C).

En asma se encontraron 5 haplotipos, en LES 4 y en ARJ 7. No obstante, sólo TCGATC se distribuyó de manera diferencial entre controles (4%) y casos (6.6%) con asma (OR=1.70, IC 95% [1.02-2.83], $p=0.0325$). En tanto que en ARJ se encontró diferencia estadística significativa para el haplotipo CCGATC, ya que es más frecuente en casos (2.3%) que en controles (0.8%) (OR=3.14, IC 95% [0.93-11.12], $p=0.0475$). Sin embargo, ambos haplotipos pierden la significancia al corregir los datos por comparaciones múltiples. De manera interesante, el haplotipo TT formado por las variantes rs352140 y rs352139, se identificó con significancia estadística en la población con ARJ (OR=6.53, IC 95% [1.65-30.06], $p=0.0014$) (Tabla 17).

Ningún haplotipo presentó diferencias significativas al estratificar por género ni cuando se hizo el análisis en pacientes lúpicos con nefritis.

Tabla 17. Análisis de haplotipos de TLR9 en población total con asma, LES y ARJ.

| EI | HAPLOTIPO | CONTROLES (%) | CASOS (%) | OR [IC 95%] | P | P AJUSTADA* |
|------|-----------|---------------|-----------|-------------------|--------|---------------|
| ASMA | CTAATT | 44 | 44 | | 0.96 | |
| | TCAGTT | 41 | 41 | | 0.82 | |
| | TCGATC | 4 | 6 | 1.70 [1.02-2.83] | 0.032 | 0.19 |
| | TCAGGC | 2 | 2 | | 0.83 | |
| | TCAATT | 1 | 1 | | 0.87 | |
| LES | CTAATT | 44 | 44 | | 0.94 | |
| | TCAGTT | 41 | 41 | | 0.84 | |
| | TCGATC | 4 | 5 | | 0.13 | |
| | TCAGGC | 2 | 3 | | 0.28 | |
| ARJ | CTAATT | 44 | 40 | | 0.26 | |
| | TCAGTT | 41 | 41 | | 0.99 | |
| | TCGATC | 3 | 4 | | 0.38 | |
| | TCAGGC | 2 | 2 | | 0.96 | |
| | CCGATC | 0.8 | 2 | 3.14 [0.93-11.12] | 0.047 | 0.28 |
| | TCAATT | 1 | 0.8 | | 0.5 | |
| | TT** | 0.5 | 2 | 6.53 [1.65-30.06] | 0.0014 | 0.0028 |

*Valor de P después de ajustar por la corrección de Bonferroni; **Haplotipo formado por los alelos de las variantes rs352140 y rs352139.

Análisis de interacción génica

El análisis de interacción génica entre todos los SNPs estudiados y las EI evaluadas, reveló que el SNP rs352143 de TLR9 está en interacción con otros SNPs

del mismo gen y que tiene un efecto potencial de riesgo o protección para asma, LES o ARJ. Así, en asma los datos sugieren que existe interacción entre éste y el rs5743836, ya que en conjunto confieren riesgo (OR= 10.38, p=0.043) para asma; mientras que en interacción con el rs187084 tiene un efecto de protección (OR=0.42, p=0.010). Así mismo, en LES la interacción de estas dos últimas variantes (rs352143 y rs187084) también estaría brindando protección (OR=0.43, p=0.021), en tanto que la interacción de rs352143 y rs352139 sería de riesgo (OR=2.53, p=0.039). En el caso de ARJ, los datos sugieren que existe una interacción entre el rs352143 y el rs352144 mostrando protección (OR=0.20, p=0.051) para padecer esta enfermedad (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis de interacción génica entre SNPs del gen TLR9 en enfermedades inmunes.

| SNP1 | SNP2 | ENFERMEDAD | OR | χ^2 | P |
|----------|-----------|------------|--------------|----------|---------|
| rs352143 | rs5743836 | ASMA | 10.38 | 4.07 | 0.0436 |
| | rs187084 | ASMA | 0.4206 | 6.585 | 0.01028 |
| | rs352139 | LES | 2.539 | 4.222 | 0.03991 |
| | rs187084 | LES | 0.434 | 5.301 | 0.02131 |
| | rs352144 | ARJ | 0.2077 | 3.806 | 0.05106 |

Efecto funcional de los SNPs *in silico*

El análisis *in silico* del efecto potencial de las variantes, reveló que los rs179010 (*TLR7*), rs187084 (*TLR9*), rs352144 (*TLR9*) y rs5743836 (*TLR9*) podrían ser variantes que afectan el sitio de unión a los factores de transcripción (TFBS) del gen respectivo. Mientras tanto, el rs352143 (*TLR9*) se identificó como una variante

que podría afectar el dominio de *splicing*, silenciando éste proceso, mientras que rs3775296 (*TLR3*) afecta sólo el proceso de *splicing*. El rs3775291 (*TLR3*) es un SNP no sinónimo ya que cambia el codón CTC por TTC, y provoca un cambio del AA leucina (L) por fenilalanina (F) en la posición 412 de la proteína (Fig. 14), y que podría afectar el fenotipo, perjudicando la secuencia y estructura de la proteína. El rs179008 (*TLR7*) y el rs5744077 (*TLR8*) también son SNPs no sinónimos, sin embargo, las herramientas *in silico* predicen que esto no afectan el fenotipo pero sí podrían afectar el proceso de *splicing*. Aparentemente, rs3853839 estaría afectando el sitio del gen *TLR7* donde se da la unión con los miRNAs (Tabla 19).

Tabla 19. SNPs con posible efecto funcional.

| GEN | ID SNP | TFBS | Sitio de Splicing | Splicing (ESE o ESS) | Dominio de Splicing | Sitio de unión a miRNA | SNPns | Codón de paro | Fenotipo | Secuencia | Estructura |
|------|-----------|------|-------------------|----------------------|---------------------|------------------------|-------|---------------|--------------|-----------|------------|
| TLR3 | rs3775291 | -- | -- | -- | -- | -- | Y | -- | Posible daño | 1 | 1 |
| | rs3775296 | -- | -- | Y | -- | -- | -- | -- | -- | -- | - |
| TLR7 | rs179008 | -- | -- | Y | -- | -- | Y | -- | No daño | -- | -- |
| | rs179010 | Y | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | rs3853839 | -- | -- | -- | -- | Y | -- | -- | -- | -- | -- |
| TLR8 | rs5744077 | -- | -- | Y | -- | -- | Y | -- | No daño | -- | -- |
| TLR9 | rs187084 | Y | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | rs352143 | -- | -- | Y | Y | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | rs352144 | Y | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | rs5743836 | Y | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

Se indica si el SNP: Afecta el sitio de unión de factores de transcripción (TFBS); o el sitio de splicing; si afecta potencializando el proceso de splicing exónico (ESE) o silenciándolo (ESS); si perjudica al desaparecer el dominio de splicing; si perjudica el proceso de traducción al afectar el sitio de unión al miRNA; si se trata de un SNP no sinónimo (SNPns); si tiene algún efecto en el codón de paro; si podría afectar a nivel de fenotipo; y por último, si el SNP podría estar afectando la secuencia y la estructura de la proteína (Sunyaev *et al.* 2001; Yue *et al.* 2006; Xu *et al.* 2007; Xu *et al.* 2007).

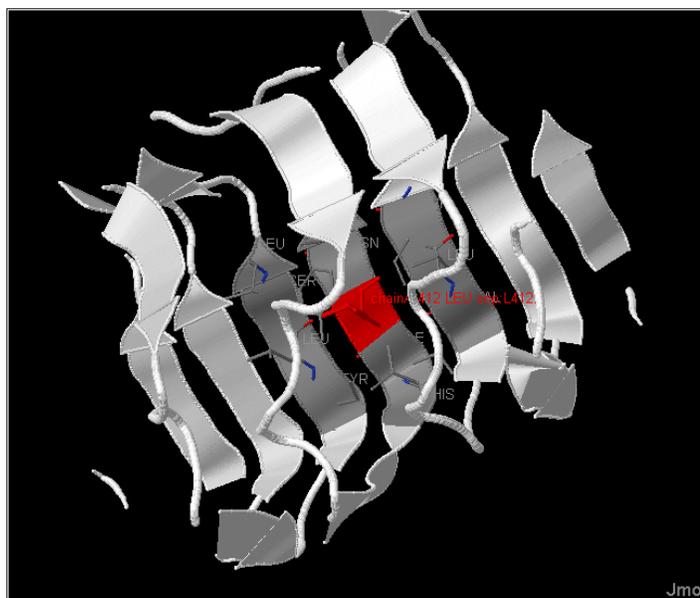


Figura 14. Localización del SNP L412F en TLR3. Donde rojo=daño y amarillo=inofensivo.

Comparación con otras poblaciones

El análisis comparativo entre nuestra población y las reportadas por el proyecto HapMap para otras poblaciones, reveló diferencias en la distribución de los alelos analizados (Figs. 15 y 16). Por ejemplo, el alelo rs3853839G (*TLR7*), se encontró con frecuencia mayor en nuestra población que en la europea, pero menos frecuentemente cuando se comparó con asiáticos. O el alelo rs2109134T (*TLR8*), que presentó una frecuencia baja comparada con la frecuencia reportada para la población africana y europea pero que en población asiática no ha sido reportado.

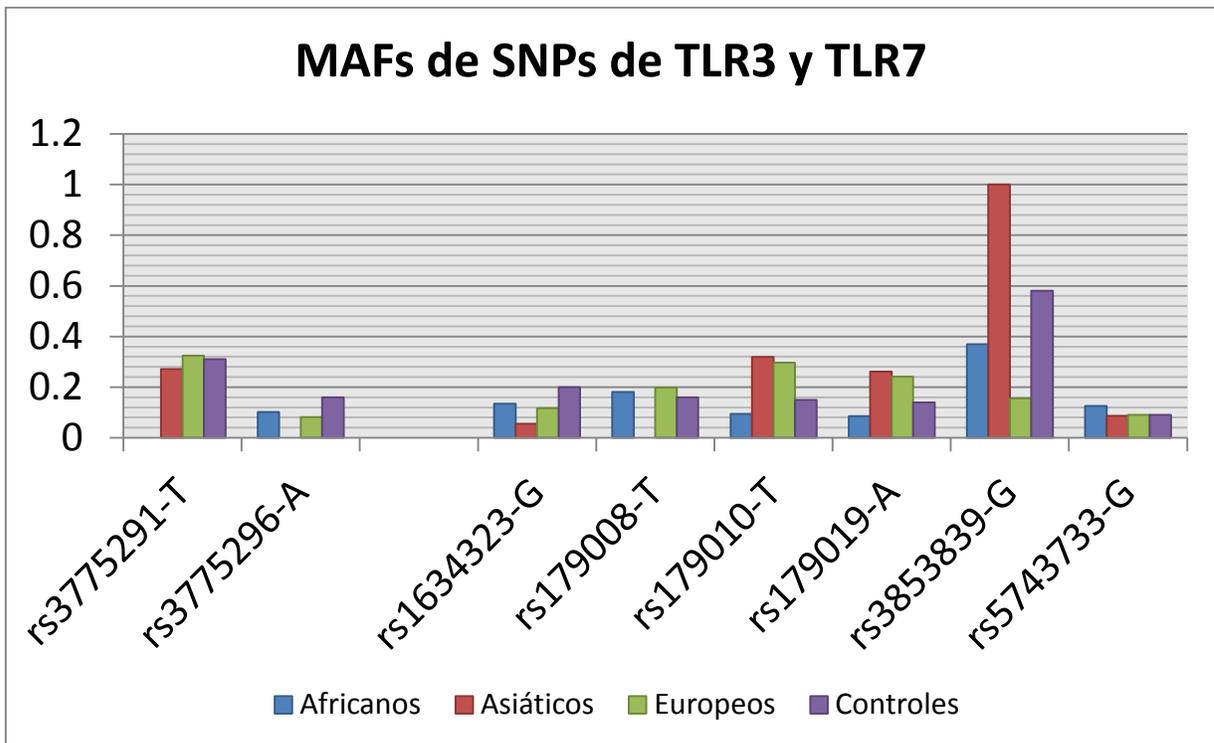


Figura 15. Frecuencias alélicas de SNPs de los genes TLR3 y TLR7 en diferentes poblaciones.

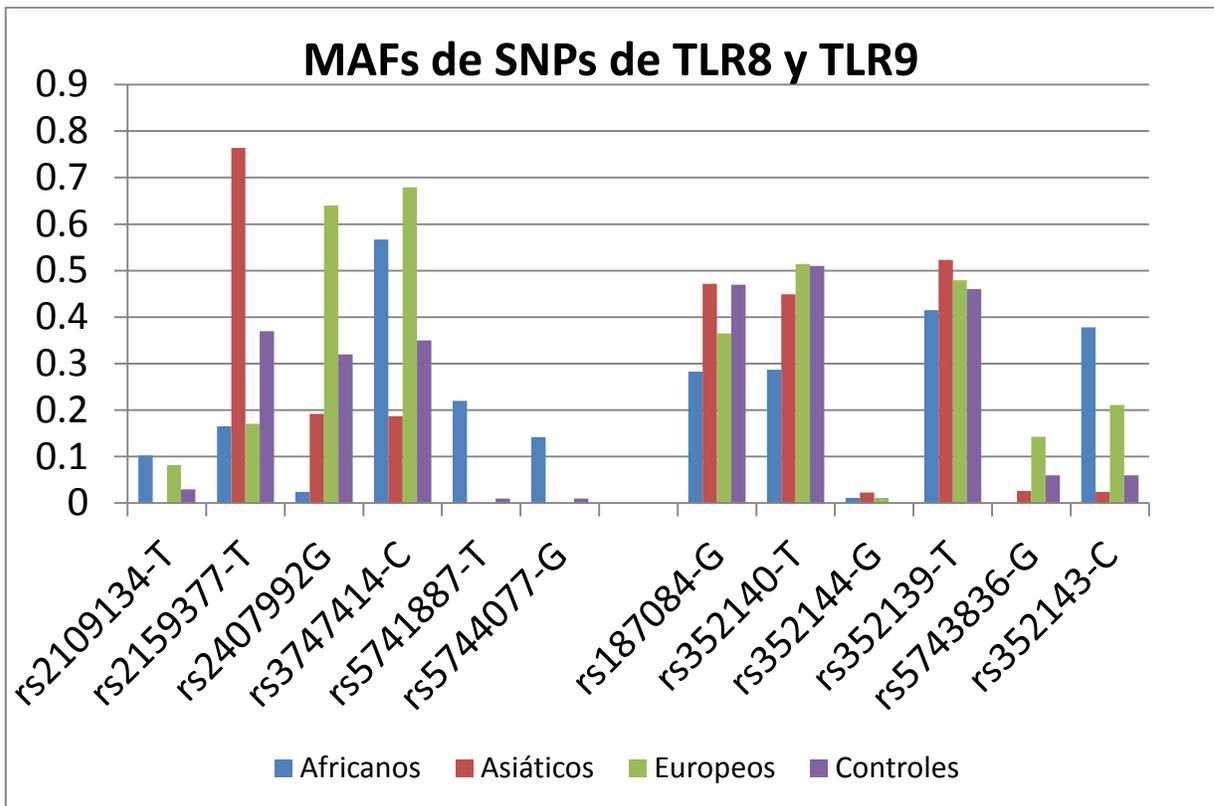


Figura 16. Frecuencias alélicas de SNPs en los genes TLR8 y TLR9 en diferentes poblaciones.

VIII. DISCUSIÓN

Las enfermedades mediadas por el sistema inmune son entidades complejas que resultan de la interacción entre factores ambientales y genéticos. A la fecha, se han identificado más de un centenar de polimorfismos en un gran número de genes como asociados con el riesgo o protección para padecer estas patologías, algunas que se comparten entre ellas y otras específicas de cada una. Por su función en la respuesta inmune innata y adaptativa, los *TLRs* representan genes candidato importantes en la identificar genes y sus variantes asociados con el desarrollo enfermedades mediadas por el sistema inmune.

En el presente estudio, evaluando niños con asma, LES y ARJ se encontró que la relación de género masculino/femenino en la prevalencia de las enfermedades evaluadas es similar a lo reportado en la literatura. Así, para asma hubo una prevalencia mayor en varones que en mujeres (1.56:1) como se ha reportado en la literatura, donde la prevalencia es más alta en varones que en niñas en una relación de 3:2 entre los 6 y 11 años aumentando a una relación de 8:5 entre los 12 y 17 años de edad (Akinbami *et al.* 2011). En el caso de LES, se observó una prevalencia del 83% en niñas y del 17% en niños, un poco mayor a lo reportado para ésta entidad, donde se ha visto que la proporción mujer/varón es de aproximadamente 9:1 (Romaní *et al.* 2008). Mientras que en el caso de ARJ, en la población aquí estudiada se observó que la mayoría de los pacientes son mujeres (59%), también un resultado un poco mayor a lo reportado en la literatura, donde se ha observado

una relación femenino/masculino 2-3:1 para EE.UU y de 6-7:1 en América del sur (Massardo 2009).

En el análisis de genotipificación, de todos los polimorfismos, éstos se encontraron en HWE, por lo que se puede inferir que no hay sesgos en la selección de la muestra, que el componente genético de la población evaluada es el resultado de apareamientos aleatorios, no se trata de poblaciones endogámicas o con apareamiento selectivo y no sugieren deriva génica. Lo anterior significa que nuestra población fue seleccionada al azar y que la muestra de estudio es representativa de la población objetivo.

El estudio de asociación de variantes en el gen *TLR3* reveló que el alelo T del rs3775291 podría ser un factor de riesgo para padecer asma en población masculina (OR=1.44), y para LES en población total (OR=1.65). El rs3775291 es un SNP no sinónimo que al cambiar un nucleótido, sustituye el codón CTC por ITC, y lleva a un cambio de los aminoácidos leucina por fenilalanina en la posición 412 de la proteína (Fig. 14) y que, de acuerdo con el análisis *in silico*, se trata de una variante que podría afectar el fenotipo ya que se encuentra en la región codificante del gen, lo que implica también, una afectación en la estructura de la proteína que reconoce RNA viral e induce la producción de interferón tipo 1. De hecho, se ha visto que un porcentaje alto de sustituciones de aminoácidos (SNPs) puede resultar en la reducción de la estabilidad de la estructura de la proteína correspondiente (Yue *et al.* 2005). Este SNP tiene un *svm profile* de -0.24 y un *svm structure* de -0.61, lo que se

interpreta como un SNP perjudicial (Yue y Moult 2006); ya que hay una alteración del efecto hidrofóbico en el dominio transmembranal de la proteína, con una ganancia de 1.3 kcal/mol. Recordemos que, a menudo, el efecto hidrofóbico contribuye más a la estabilidad de una estructura proteica que la suma de sus restantes interacciones no covalentes (Müller-Esterl 2008). El rs3775291 se ha asociado con el riesgo de padecer AR y LES en población caucásica (Laska *et al.* 2014); y también con la susceptibilidad a VIH. Así mismo, recientemente, se ha descrito que las infecciones virales en vías respiratorias están asociadas con la patogénesis de asma, reportándose que defectos en la respuesta interferón tipo I y tipo III inducida por virus, hacen a los individuos más susceptibles a infecciones virales ya que la apoptosis de la célula infectada no se presenta o es deficiente, además de que se ha argumentado que agentes víricos como el VRS, presentado en la infancia, es un factor causal probable en el desarrollo del asma pediátrico (Matsumoto y Inoue 2014).

Por otro lado, el alelo A de rs3775296 y el alelo T de rs3775290 mostraron asociación con el riesgo (OR=1.94 y OR=1.78, respectivamente) a padecer ARJ en población masculina. Curiosamente, el haplotipo ACT, que incluye los dos alelos de riesgo, presentó un OR mayor al observado para cada variante (OR=2.03) en la población con ARJ. Mientras que el haplotipo CCC, que incluye los alelos ancestrales se asocia con la protección a padecer asma, LES y ARJ sólo en hombres (OR=0.76, OR=0.73 y OR=0.57, respectivamente).

El análisis *in silico* de rs3775296A sugiere que podría afectar potencializando o amplificando el *splicing* exónico (ESE) ya que éste SNP se localiza dentro de la región promotora del gen, en la posición 1 de la secuencia *forward*, AAGAAT (RESCUE-ESE). Como ya se mencionó, el receptor activa la producción de IFN tipo 1; en estos casos de autoinmunidad y, probablemente como consecuencia de la presencia de este SNP, *TLR3* estaría sobreexpresado, induciendo una sobreexpresión de IFN α , pues se ha visto que pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas, sobre todo con LES, presentan un incremento de los niveles de IFN en sangre (Crow et al. 2014). Además de que se ha reportado que en población China, el análisis funcional revela diferencias significativas entre la regulación de la expresión de *TLR3* con los diferentes genotipos de rs3775296 (Yang et al. 2013).

No existen evidencias de asociación entre SNPs de *TLR3* y asma en otras poblaciones, sin embargo, rs3775291 se ha asociado con la susceptibilidad a padecer AR y LES en población danesa (Laska et al. 2014; Laska et al. 2014); y rs3775296 con LES en población Taiwanesa (Yang et al. 2013; Wang et al. 2014). Así mismo, rs3775296 junto con rs3775290 se han asociado con el riesgo a padecer osteoartritis en población asiática (Yang et al. 2013).

Del gen *TLR7*, el rs5743733C mostró una asociación significativa con las niñas que padecen ARJ (OR=2.8, p=0.021). En otras poblaciones se ha visto

asociado con riesgo alto de infección por el virus de hepatitis C en chinos y con susceptibilidad a vasculitis en asiáticos (Song *et al.* 2013; Xue *et al.* 2014).

Aunque el tamaño de la población de varones estudiados con asma y ARJ puede generar sesgos en los resultados, el alelo C de rs179010, que mostró asociación con asma y ARJ en niños, es otra variante de interés ya que el análisis *in silico*, revela que la podría alterar en sitios de unión a factores de transcripción y por ende afectar los niveles proteicos. Esta variante junto con rs179019 se han asociado con el riesgo a padecer LES en mujeres japonesas (Kawasaki *et al.* 2011).

En la población europea, el rs179008 de *TLR7* ha sido asociado con asma (Moller-Larsen *et al.* 2008); mientras que el rs3853839, con LES, tanto en hombres como en mujeres de población danesa y con mujeres taiwanesas (Enevold *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014); y el rs1634323 en mujeres chinas (Tian *et al.* 2012), sin embargo, esta tendencia no se presenta en ésta población de estudio.

El receptor TLR7 tiene la función de reconocer RNA viral de cadena sencilla y, generalmente, la señalización inducida por este receptor en enfermedades inmunes se ha visto sostenida, dando un proceso inflamatorio crónico. Se ha descrito su papel en las células dendríticas plasmocíticas de enfermedades inmunes, donde se ha visto la relación entre infecciones virales y autoinmunidad, ya que las células dendríticas, al ser células del sistema inmunitario, son capaces de secretar grandes cantidades de interferón tipo I. Esta función está relacionada con la expresión de receptores tipo Toll, especialmente TLR7 y TLR9, que están diseñados para detectar ácidos

nucleicos en los endosomas tempranos. Una vez activada la célula dendrítica plasmocítica puede promover la inmunidad y autoinmunidad, por lo que, aunque los mecanismos exactos no se conocen, los SNPs pueden conferir pequeños cambios en su actividad o en sus niveles de expresión, que deriven en el desarrollo de procesos inmunes patológicos (Santana-de Anda *et al.* 2013).

De los seis SNPs del gen *TLR8*, ninguno mostró asociación con enfermedades inmunes. Nuestros hallazgos son controversiales a los descritos en la literatura, ya que la variante rs2407992 ha sido reportada como asociada con asma en población europea (Moller-Larsen *et al.* 2008).

Sin embargo, el análisis de haplotipos que incluyó las variantes rs21599377, rs2407992 y rs3747414, reveló que el haplotipo formado por los alelos ancestrales está fuertemente asociado con la protección a asma (AAACCC: OR=0.18, p=0.0000034), LES (CCC:OR= 0.47, p=0.0014) y ARJ (AAACCC: OR= 0.18, p=0.000018) en niñas mexicanas. No se conoce el efecto de este haplotipo en la estructura de la proteína, sin embargo, se sugiere que TLR8 podría tener un papel como regulador de TLR7 y posible prevención de autoinmunidad espontánea. Lo anterior se basa en el hecho de que se ha demostrado que, ratones con *tlr8* deletado, tienden a sobreexpresar TLR7, a desarrollar una hiperrespuesta a ligandos de TLR7, mayor activación de NF-kB y un aumento en los niveles séricos de autoanticuerpos contra ribonucleoproteínas y DNA de cadena doble (Demaria *et al.* 2010).

En el caso de *TLR9*, se identificó que el alelo C del SNP rs352143, se asocia con las patologías inmunes estudiadas, dando un riesgo a padecer asma (OR=1.70, p=0.015), LES (OR=2.01, p=0.0010) y ARJ (OR=1.83, p=0.016). El rs352143 se localiza en región codificante del gen y se trata de un SNP sinónimo de lisina que, de acuerdo con nuestro análisis, podría estar afectando el *splicing* exónico. Varios estudios han demostrado que los polimorfismos sinónimos pueden afectar el *splicing*, la estabilidad y estructura del RNAm, así como el plegamiento de la proteína. Estos cambios pueden tener un efecto significativo sobre la función de las proteínas, cambiar la respuesta celular a los blancos terapéuticos y, a menudo, explicar las respuestas individuales diferentes de los pacientes a un mismo medicamento (Hunt *et al.* 2009). Este polimorfismo fue el único del gen *TLR9* que, de forma individual, mostró asociación con las poblaciones del estudio mientras que, de acuerdo con lo reportado en la bibliografía, se ha asociado con LES en mujeres danesas (Laska *et al.* 2014).

El rs187084, ha sido asociado con el riesgo a padecer AR en población turca (Lee *et al.* 2013), sin embargo, en este trabajo no se han reproducido esos datos, siendo que en el análisis *in silico* se vio que potencialmente podría estar afectando el sitio de unión de factores de transcripción del gen. El rs352140 y rs352139 se ha asociado con el riesgo a padecer LES en población China (Lee *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2014) pero no el rs5743836.

De forma interesante, con el análisis de asociación de haplotipos se identificó que el haplotipo TT formado por los alelos de rs352140 y rs352139 de *TLR9* está potencialmente asociado con el riesgo a padecer ARJ (OR=6.53, p=0.0028) en nuestra población. Un haplotipo formado de más variante pero que incluye estos dos alelos se ha asociado con LES en una población del norte de China (Zhang *et al.* 2014). Finalmente, el análisis de interacción génica reveló que hay interacción entre el rs352143 de *TLR9* con otras variantes del mismo gen: con rs5743836 (OR=10.38) y rs187084 (OR=0.42) en asma; con rs352139 (OR=2.53) y rs187084 (OR=0.43) en LES; y, con rs352144 (OR=0.20) en ARJ.

Estos hallazgos reflejan la complejidad genética de las entidades inmunes y apoyan la hipótesis de que las variantes asociadas tienen un efecto aditivo para el desarrollo de una enfermedad; pero además revelan la necesidad de realizar análisis de interacción génica entre las variantes evaluadas para detectar las combinaciones genéticas que constituyen factores genéticos de riesgo de éstas y otras patologías comunes.

Las diferencias detectadas en nuestro estudio con respecto a lo reportado en otras poblaciones pueden ser el reflejo de la heterogeneidad genética en los factores de susceptibilidad entre los distintos grupos étnicos. Sin embargo, se requiere del análisis de una muestra más grande, otras poblaciones, otros genes y otros SNPs para el estudio y entendimiento de las enfermedades complejas.

IX. CONCLUSIONES

1. Variantes alélicas de los genes *TLR3* (rs3775291, rs3775296 y rs3775290), *TLR7* (rs179010 y rs5743733) y *TLR9* (rs352143) son factores potenciales de riesgo para desarrollar asma, LES y ARJ en población infantil mexicana.
2. Haplotipos en el gen *TLR8* (AAACCC, AAACGA y AAATGA) protegen para estas tres Els; mientras que haplotipos en *TLR3* (CCC y ACT) y *TLR9* (TT) se asocian con el riesgo a padecerlas.
3. Existe interacción génica entre polimorfismos de un solo nucleótido del gen *TLR9* que contribuye a padecer asma y LES.
4. Existen diferencias genéticas entre la población mexicana y otras poblaciones.

X. PERSPECTIVAS

Esta tesis aporta conocimiento de los factores genéticos que se asocian con el desarrollo de enfermedades inmunes y complejas. Sin embargo, todavía no es posible descifrar muchos de los mecanismos moleculares involucrados en la etiopatología del asma, LES o la ARJ. Por lo tanto, se propone abundar en la investigación, validando el efecto fisiológico a nivel celular, de las variantes que de acuerdo a este trabajo mostraron asociación, así como de los haplotipos mediante mutagénesis dirigida en modelos *in vitro*. También se propone hacer el análisis de SNPs en otros genes que tienen que ver con el procesamiento correcto de los TLRs endosomales, como el que codifica para la chaperona UNC93B1 o que participan en la regulación negativa de la vía de señalización TLR, por ejemplo, *SOCS1*, *IRAK-M* y *SIGIRR*.

XI. REFERENCIAS

- Akinbami, L. J., Moorman, J. E. y Liu, X. (2011). Asthma prevalence, health care use, and mortality: United States, 2005-2009. *Natl Health Stat Report*(32): 1-14.
- Akira, S., Uematsu, S. y Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**(4): 783-801.
- AMEPAR. (2012). "La Artritis Idiopática Juvenil. Asociación Mexicana de Familiares y Pacientes con Artritis Reumatoide A.C." from <http://www.amepar.org.mx/la-enfermedad/57-artritis-idiopatica-juvenil-aij>.
- Aryan, Z., Holgate, S. T., Radzioch, D. y Rezaei, N. (2014). A new era of targeting the ancient gatekeepers of the immune system: Toll-like agonists in the treatment of allergic rhinitis and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* **164**(1): 46-63.
- Brentano, F., Kyburz, D., Schorr, O., Gay, R. y Gay, S. (2005). The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cell Immunol* **233**(2): 90-6.
- Brentano, F., Schorr, O., Gay, R. E., Gay, S. y Kyburz, D. (2005). RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. *Arthritis Rheum* **52**(9): 2656-65.
- Crow, M. K., Olfieriev, M. y Kirou, K. A. (2014). Targeting of type I interferon in systemic autoimmune diseases. *Transl Res*.
- Chang, S. K., Gu, Z. y Brenner, M. B. (2010). Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11. *Immunol Rev* **233**(1): 256-66.
- Christmas, P. (2010). Toll-Like Receptors: Sensors that Detect Infection. *Nature Education*
- Daley, D., Park, J. E., He, J. Q., Yan, J., Akhabir, L., et al. (2012). Associations and interactions of genetic polymorphisms in innate immunity genes with early viral infections and susceptibility to asthma and asthma-related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* **130**(6): 1284-93.
- Debinska, A. y Boznanski, A. (2014). The role of Toll-like receptors in the pathogenesis of allergic diseases - where is the truth? *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **68**: 230-7.
- Demaria, O., Pagni, P. P., Traub, S., de Gassart, A., Branzk, N., et al. (2010). TLR8 deficiency leads to autoimmunity in mice. *J Clin Invest* **120**(10): 3651-62.
- Deng, G. M., Nilsson, I. M., Verdrengh, M., Collins, L. V. y Tarkowski, A. (1999). Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med* **5**(6): 702-5.

- Enevold, C., Nielsen, C. H., Jacobsen, R. S., Hermansen, M. L., Molbo, D., *et al.* (2014). Single nucleotide polymorphisms in genes encoding Toll-like receptors 7, 8 and 9 in Danish patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* **41**(9): 5755-63.
- Enríquez-Mejía, M. (2013). Systemic lupus erythematosus pathophysiology. *Medicina e Investigación* **1**: 8-16.
- García-Ortiz, H., Velázquez-Cruz, R., Espinosa-Rosales, F., Jiménez-Morales, S., Baca, V., *et al.* (2010). Association of TLR7 copy number variation with susceptibility to childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Ann Rheum Dis* **69**(10): 1861-5.
- GINA. (2014). "What is asthma. Global Initiative for Asthma." from <http://www.ginasthma.org/FAQs?faqid=1>.
- Godfroy, J. I., Roostan, M., Moroz, Y. S., Korendovych, I. V. y Yin, H. (2012). Isolated Toll-like receptor transmembrane domains are capable of oligomerization. *PLoS One* **7**(11): e48875.
- Gómez, A. (2011). [New criteria for the classification of rheumatoid arthritis]. *Reumatol Clin* **6S3**: S33-7.
- Hamilton, J. A. y Tak, P. P. (2009). The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* **60**(5): 1210-21.
- Harley, I. T., Kaufman, K. M., Langefeld, C. D., Harley, J. B. y Kelly, J. A. (2009). Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* **10**(5): 285-90.
- Hernández-Romano, J., Martínez-Barnetche, J. y Valverde-Garduño, V. (2009). Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. *Salud Pública de México* **51**: 455-462.
- HGM. (2012). "Guías de Diagnóstico y tratamiento: Lupus Eritematoso Sistémico. Hospital General de México." from http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/reuma/guias/7lupus.pdf.
- Hirankarn, N., Tangwattanachuleeporn, M., Wongpiyabovorn, J., Wongchinsri, J. y Avihingsanon, Y. (2009). Association of IL-18 gene polymorphism (-137C) with arthritis manifestations in SLE: combined effect with IFN gamma gene polymorphism (+874A). *Clin Rheumatol* **28**(2): 219-23.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., *et al.* (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* **162**(7): 3749-52.

- Huerta, J. y Penagos, M. (2004). Asma en niños. México, 1a edición.
- Hunt, R., Sauna, Z. E., Ambudkar, S. V., Gottesman, M. M. y Kimchi-Sarfaty, C. (2009). Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol* **578**: 23-39.
- Hussein, Y. M., Alzahrani, S. S., Alharthi, A. A., Ghonaim, M. M., Alhazmi, A. S., *et al.* (2014). Association of serum cytokines levels, interleukin 10 -1082G/A and interferon-gamma +874T/A polymorphisms with atopic asthma children from Saudi Arabia. *Cell Immunol* **289**(1-2): 21-6.
- Ichikawa, T., Sugiura, H., Koarai, A., Minakata, Y., Kikuchi, T., *et al.* (2014). TLR3 activation augments matrix metalloproteinase production through reactive nitrogen species generation in human lung fibroblasts. *J Immunol* **192**(11): 4977-88.
- INER. (2014). "Clínica de Asma en Niños. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias." from http://www.iner.salud.gob.mx/contenidos/clinica_asma_ninos.html.
- Ji, J. D., Lee, W. J., Kong, K. A., Woo, J. H., Choi, S. J., *et al.* (2010). Association of STAT4 polymorphism with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* **37**(1): 141-7.
- Jiang, W., Zhu, F. G., Bhagat, L., Yu, D., Tang, J. X., *et al.* (2013). A Toll-like receptor 7, 8, and 9 antagonist inhibits Th1 and Th17 responses and inflammasome activation in a model of IL-23-induced psoriasis. *J Invest Dermatol* **133**(7): 1777-84.
- Jimenez-Morales, S., Velazquez-Cruz, R., Ramirez-Bello, J., Bonilla-Gonzalez, E., Romero-Hidalgo, S., *et al.* (2009). Tumor necrosis factor-alpha is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Hum Immunol* **70**(4): 251-6.
- Johnson, A. D. (2009). Single-nucleotide polymorphism bioinformatics: a comprehensive review of resources. *Circ Cardiovasc Genet* **2**(5): 530-6.
- Kaiko, G. E., Loh, Z., Spann, K., Lynch, J. P., Lalwani, A., *et al.* (2013). Toll-like receptor 7 gene deficiency and early-life Pneumovirus infection interact to predispose toward the development of asthma-like pathology in mice. *J Allergy Clin Immunol* **131**(5): 1331-9 e10.
- Kawai, T. y Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* **13**(11): 460-9.
- Kawai, T. y Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**(5): 373-84.

- Kawane, K., Ohtani, M., Miwa, K., Kizawa, T., Kanbara, Y., *et al.* (2006). Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* **443**(7114): 998-1002.
- Kawasaki, A., Furukawa, H., Kondo, Y., Ito, S., Hayashi, T., *et al.* (2011). TLR7 single-nucleotide polymorphisms in the 3' untranslated region and intron 2 independently contribute to systemic lupus erythematosus in Japanese women: a case-control association study. *Arthritis Res Ther* **13**(2): R41.
- Keogh, B. y Parker, A. E. (2011). Toll-like receptors as targets for immune disorders. *Trends Pharmacol Sci* **32**(7): 435-42.
- Kyburz, D., Brentano, F. y Gay, S. (2006). Mode of action of hydroxychloroquine in RA-evidence of an inhibitory effect on Toll-like receptor signaling. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**(9): 458-9.
- Kyogoku, C. y Tsuchiya, N. (2007). A compass that points to lupus: genetic studies on type I interferon pathway. *Genes Immun* **8**(6): 445-55.
- Lange, N. E., Zhou, X., Lasky-Su, J., Himes, B. E., Lazarus, R., *et al.* (2011). Comprehensive genetic assessment of a functional TLR9 promoter polymorphism: no replicable association with asthma or asthma-related phenotypes. *BMC Med Genet* **12**: 26.
- Laska, M. J., Hansen, B., Troldborg, A., Lorenzen, T., Stengaard-Pedersen, K., *et al.* (2014). A non-synonymous single-nucleotide polymorphism in the gene encoding Toll-like Receptor 3 (TLR3) is associated with sero-negative Rheumatoid Arthritis (RA) in a Danish population. *BMC Res Notes* **7**: 716.
- Laska, M. J., Troldborg, A., Hansen, B., Stengaard-Pedersen, K., Junker, P., *et al.* (2014). Polymorphisms within Toll-like receptors are associated with systemic lupus erythematosus in a cohort of Danish females. *Rheumatology (Oxford)* **53**(1): 48-55.
- Lau, C. M., Broughton, C., Tabor, A. S., Akira, S., Flavell, R. A., *et al.* (2005). RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med* **202**(9): 1171-7.
- Lazarus, R., Klimecki, W. T., Raby, B. A., Vercelli, D., Palmer, L. J., *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**(1): 85-91.
- Lee, Y. H., Bae, S. C. y Song, G. G. (2013). Meta-analysis demonstrates association between TLR polymorphisms and rheumatoid arthritis. *Genet Mol Res* **12**(1): 328-34.

- Lee, Y. H., Lee, H. S., Choi, S. J., Ji, J. D. y Song, G. G. (2012). Associations between TLR polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol* **30**(2): 262-5.
- Li, M., Zhou, Y., Feng, G. y Su, S. B. (2009). The critical role of Toll-like receptor signaling pathways in the induction and progression of autoimmune diseases. *Curr Mol Med* **9**(3): 365-74.
- Martínez Córdova, Z., Calzadilla Lugo, F. y García González, I. (2009). Role of polymorphisms of recognition receptor from Toll patterns in case of transplant. *Rev Cubana Med* **48**: 88-100.
- Massardo, L. (2009). Artritis Reumatoidea. *Apuntes de Reumatología*: 1-27.
- Matsumoto, K. y Inoue, H. (2014). Viral infections in asthma and COPD. *Respir Investig* **52**(2): 92-100.
- Means, T. K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M. R., Golenbock, D. T., *et al.* (2005). Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* **115**(2): 407-17.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**(2): 135-45.
- Moisan, J., Camateros, P., Thuraisingam, T., Marion, D., Koohsari, H., *et al.* (2006). TLR7 ligand prevents allergen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilia in allergic asthma by a MYD88-dependent and MK2-independent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**(5): L987-95.
- Moller-Larsen, S., Nyegaard, M., Haagerup, A., Vestbo, J., Kruse, T. A., *et al.* (2008). Association analysis identifies TLR7 and TLR8 as novel risk genes in asthma and related disorders. *Thorax* **63**(12): 1064-9.
- Müller-Esterl, W. (2008). Bioquímica: Fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Barcelona, Reverté.
- NHLBI. (2012). "Qué es el asma. National Heart, Lung, and Blood Institute." from <http://www.nhlbi.nih.gov/health-spanish/health-topics/temas/asthma/>.
- Orozco, G., Eyre, S., Hinks, A., Bowes, J., Morgan, A. W., *et al.* (2011). Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* **70**(3): 463-8.
- Orozco, L. y Jiménez-Morales, S. (2012). Anexo II Genómica del asma. Genética Clínica.
- Ospelt, C. y Gay, S. (2009). TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* **42**(4): 495-505.
- Patole, P. S., Grone, H. J., Segerer, S., Ciubar, R., Belemezova, E., *et al.* (2005). Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like

- receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells. *J Am Soc Nephrol* **16**(5): 1326-38.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**(5396): 2085-8.
- Ramaprakash, H., Ito, T., Standiford, T. J., Kunkel, S. L. y Hogaboam, C. M. (2009). Toll-like receptor 9 modulates immune responses to *Aspergillus fumigatus* conidia in immunodeficient and allergic mice. *Infect Immun* **77**(1): 108-19.
- Ramirez-Bello, J., Jimenez-Morales, S., Espinosa-Rosales, F., Gomez-Vera, J., Gutierrez, A., *et al.* (2013). Juvenile rheumatoid arthritis and asthma, but not childhood-onset systemic lupus erythematosus are associated with FCRL3 polymorphisms in Mexicans. *Mol Immunol* **53**(4): 374-8.
- Ramirez-Bello, J., Vargas-Alarcon, G., Tovilla-Zarate, C. y Fragoso, J. M. (2013). [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]. *Gac Med Mex* **149**(2): 220-8.
- Roelofs, M. F., Joosten, L. A., Abdollahi-Roodsaz, S., van Lieshout, A. W., Sprong, T., *et al.* (2005). The expression of Toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of Toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* **52**(8): 2313-22.
- Romaní, F., Atencia, F., Cuadra, J. y Canelo, C. (2008). Systemic lupus erythematosus in a male patient: presentation of a case. *An Fac med* **69**: 37-41.
- Sadee, W., Wang, D., Papp, A. C., Pinsonneault, J. K., Smith, R. M., *et al.* (2011). Pharmacogenomics of the RNA world: structural RNA polymorphisms in drug therapy. *Clin Pharmacol Ther* **89**(3): 355-65.
- Sanchez-Ramon, S., Lopez-Longo, F. J. y Carreno, L. (2011). [Interleukins network in rheumatoid arthritis pathophysiology: beyond proinflammatory cytokines]. *Reumatol Clin* **6S3**: S20-4.
- Santana-de Anda, K., Gomez-Martin, D., Soto-Solis, R. y Alcocer-Varela, J. (2013). Plasmacytoid dendritic cells: key players in viral infections and autoimmune diseases. *Semin Arthritis Rheum* **43**(1): 131-6.
- Santos, J. L., Perez, F., Carrasco, E. y Albala, C. (2002). [Use of case-parents trio for epidemiological studies of association between genetic polymorphisms and complex diseases]. *Rev Med Chil* **130**(11): 1307-15.
- Song, G. G., Choi, S. J., Ji, J. D. y Lee, Y. H. (2013). Toll-like receptor polymorphisms and vasculitis susceptibility: meta-analysis and systematic review. *Mol Biol Rep* **40**(2): 1315-23.

- Sunyaev, S., Ramensky, V., Koch, I., Lathe, W., 3rd, Kondrashov, A. S., *et al.* (2001). Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet* **10**(6): 591-7.
- Takeda, K., Kaisho, T. y Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**: 335-76.
- 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**(7): 905-9.
- Theofilopoulos, A. N., Kono, D. H., Beutler, B. y Baccala, R. (2011). Intracellular nucleic acid sensors and autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res* **31**(12): 867-86.
- Tian, J., Ma, Y., Li, J., Cen, H., Wang, D. G., *et al.* (2012). The TLR7 7926A>G polymorphism is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Mol Med Rep* **6**(1): 105-10.
- Trejo-de la, O. A., Hernandez-Sancen, P. y Maldonado-Bernal, C. (2014). Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes Immun*: 1-11.
- Velázquez-Cruz, R., Jiménez-Morales, S., Ramírez-Bello, J., Aguilar-Delfín, I., Salas-Martínez, G., *et al.* (2012). [Systemic lupus erythematosus: genomics of the disease]. *Gac Med Mex* **148**(4): 371-80.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**(5507): 1304-51.
- Wang, C. M., Chang, S. W., Wu, Y. J., Lin, J. C., Ho, H. H., *et al.* (2014). Genetic variations in Toll-like receptors (TLRs 3/7/8) are associated with systemic lupus erythematosus in a Taiwanese population. *Sci Rep* **4**: 3792.
- Xu, Z., Kaplan, N. L. y Taylor, J. A. (2007). Tag SNP selection for candidate gene association studies using HapMap and gene resequencing data. *Eur J Hum Genet* **15**(10): 1063-70.
- Xu, Z., Kaplan, N. L. y Taylor, J. A. (2007). TAGster: efficient selection of LD tag SNPs in single or multiple populations. *Bioinformatics* **23**(23): 3254-5.
- Xue, X. X., Gong, J. M., Tang, S. D., Gao, C. F., Wang, J. J., *et al.* (2014). Single Nucleotide Polymorphisms of Toll-Like Receptor 7 in Hepatitis C Virus Infection Patients from a High-Risk Chinese Population. *Inflammation*.
- Yang, H. Y., Lee, H. S., Lee, C. H., Fang, W. H., Chen, H. C., *et al.* (2013). Association of a functional polymorphism in the promoter region of TLR-3 with osteoarthritis: a two-stage case-control study. *J Orthop Res* **31**(5): 680-5.
- Yazdanbakhsh, M., Kreamsner, P. G. y van Ree, R. (2002). Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* **296**(5567): 490-4.

- Yu, P., Musette, P. y Peng, S. L. (2008). Toll-like receptor 9 in murine lupus: more friend than foe! *Immunobiology* **213**(2): 151-7.
- Yue, P., Li, Z. y Moulton, J. (2005). Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. *J Mol Biol* **353**(2): 459-73.
- Yue, P., Melamud, E. y Moulton, J. (2006). SNPs3D: candidate gene and SNP selection for association studies. *BMC Bioinformatics* **7**: 166.
- Yue, P. y Moulton, J. (2006). Identification and analysis of deleterious human SNPs. *J Mol Biol* **356**(5): 1263-74.
- Zare, F., Bokarewa, M., Nenonen, N., Bergstrom, T., Alexopoulou, L., *et al.* (2004). Arthritogenic properties of double-stranded (viral) RNA. *J Immunol* **172**(9): 5656-63.
- Zhang, J., Zhu, Q., Meng, F., Lei, H. y Zhao, Y. (2014). Association study of TLR-9 polymorphisms and systemic lupus erythematosus in northern Chinese Han population. *Gene* **533**(1): 385-8.