



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Validación de un microarreglo de polimorfismos de un
solo nucleótido en inmunogenes asociados a Autismo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLÓGO

P R E S E N T A:

VANESSA SALVADOR RINCÓN



DRA. MIRNA EDITH MORALES MARÍN

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Reconocimientos académicos

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad que me dio de estudiar y formarme como bióloga en la Facultad de Ciencias, gracias por todo el conocimiento brindado, tanto de profesores, investigadores y compañeros.

A la Dra. Mirna Edith Morales Marín, por darme la oportunidad de trabajar con ella y desarrollar este proyecto. Gracias por la confianza, paciencia, conocimiento brindado durante todo este proceso, y por inspirarme a querer ser una mejor estudiante.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica por recibirme para llevar a cabo mi culminación como bióloga.

Al Dr. José Humberto Nicolini Sánchez, por abrirme las puertas de su laboratorio para mí formación, gracias por ser una gran inspiración como investigador.

A la Doctoras Violeta Gisselle López Huerta, Xochitl Helga Castro Martínez, Maricela Villagrán Santa Cruz, por formar parte de mi jurado y por sus observaciones en la revisión de la tesis.

Este proyecto se llevó a cabo gracias al financiamiento de CONACyT con registro FOSSIS 262115.

Agradecimientos personales

La culminación de esta tesis no hubiera sido posible, de no tener a personas importantes en mi vida, las cuales me apoyaron durante todo este proceso, así que todo este trabajo y esfuerzo va dedicado a ustedes.

Principalmente quiero agradecer a mi mamá María Teresa Rincón Pérez, por ser una gran mamá, gran amiga, por estar en los buenos y malos momentos, por brindarme tus consejos en el momento más oportuno. Gracias por no dejarme ceder tan fácil y brindarme tu mano, creo que está por demás mencionar los enormes sacrificios que has hecho para que logre todos mis objetivos.

A mí papá Norberto Salvador Castillo por llevarme desde los 3 o 4 años, material de laboratorio a casa, para que jugara, creo que fuiste uno de los pilares para que yo decidiera ser bióloga, reconozco todos los sacrificios que has hecho para que yo logre cada una de mis metas. Quiero agradecerte por estar para mí siempre, por darme la mejor cara con el fin de que todas las cosas me salgan como las planeo. Gracias por llevarme a la Facultad cuando me iba de práctica de campo y cargar todas mis mochilas. Gracias a ustedes papás, es que logré este primer objetivo. Los amo mucho.

Al tercer integrante de la familia y no por eso el menos importante, al que le quiero dedicar este trabajo es a mi hermano Daniel Alberto Salvador Rincón “El padrinito”; qué te digo a ti hermano, solo tengo agradecimiento hacia ti, gracias por esas pláticas, por darme consejos, por esos regaños para no ceder y rifarme, has sido un pilar muy importante en todos los sentidos y agradezco esos momentos en los que me sacas una sonrisa, porque definitivamente la vida sin ti, no sería tan divertida. Te quiero muchísimo. Gracias por confiar en mí siempre.

A mis Abuelitos María Amparo Pérez López y Carlos Rincón Ramírez, gracias por consentirme desde que tengo uso de razón y apoyarme en todas mis decisiones de vida, sin juzgarme y siempre brindándome un abrazo, un beso y su casa; siempre defendiéndome de mis papás. Gracias por cuidarme y hacer que no me faltara nunca nada, estoy muy agradecida con la vida por haber tenido unos abuelitos como ustedes.

Gracias infinitas a mi mejor amigo Mariano Ángel Rivera Hernández, ¡10 años de amistad y contando! gracias por ser el mejor amigo que me pude haber encontrado, por apoyarme en todo momento sin importar el día, la hora, la circunstancia, por estar en los buenos momentos, por estar ahí en mis momentos de enfermedad, de tristeza, de depresión, gracias por no juzgarme nunca y siempre estar para escucharme. Sabes que también estaré ahí para ti, siempre. Gracias por todo el apoyo brindado, en todo sentido. No sabes lo mucho que valoro tu amistad, gracias

por esas chelas, por eso cafés, por esos huaraches de la prepa. Espero sigamos pasando más cosas juntos.

Gracias a Guadalupe Briones Vidal, por los buenos recuerdos y aventuras que hemos pasado juntas. Gracias por tu amistad.

A mis amigos Adriana Carrasco, Karen Rodríguez, Diego Gutiérrez, Mario Oropeza, Betsy Alberdín, Paulina Corona y René jaja. Gracias por sacarme una sonrisa, siempre que la necesito, por esas pláticas y por esas aventuras en eje central mientras comíamos hot dogs xD, gracias por acompañarme y estar en este proceso de vida, hicieron más sencilla la vida en la facultad. Los quiero muchísimo.

A Abril Díaz, por siempre estar en los momentos más complicados y apoyarme incondicionalmente. Te quiero mucho. Gracias por estos 11 años de amistad.

A la última persona que le quiero agradecer, pero no por eso la menos importante es a Luis Enrique Montiel Reyes, gracias por el apoyo brindado.

A mis profesores de la Facultad, Saúl Cano, Rubí Bustamente, Cristín, Teresa Agredano, Julio Morán, Saúl Gómez, Juan Luis Pacheco, Isolda, José Aquiles y Juan Carlos Campuzano, por brindarme todo su conocimiento y su amor a la ciencia.

Finalmente quiero agradecer a todos los que estuvieron en mi vida durante este proceso, por cortos o largos plazos, porque al final también me dejaron aprendizaje, y todo eso me trajo hasta donde estoy ahora.

INDÍCE

Tabla de contenido	5
Abreviaturas	7
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Trastorno del espectro autista	9
1.2 Etiopatogenia.....	10
1.3 Interacciones entre el sistema nervioso y el sistema inmunitario en TEA	12
1.4 Genómica como herramienta en el estudio de enfermedades complejas	14
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1 Estudios de asociación y ligamiento en autismo	16
2.2 Alteraciones de los genes del sistema inmune asociados con autismo.....	19
2.3 Gen SLC11A1	22
2.4 Gen <i>IL7R</i>	22
2.5 Gen <i>TLR4</i>	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
4. OBJETIVOS	25
5. HIPÓTESIS	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1 Población de estudio y obtención de muestras	26
6.2 Toma de muestras.....	26
6.3 Extracción de ácidos nucleicos	27
6.4 Análisis de SNPs por medio de microarreglos de alta densidad	28
6.5 Cuantificación y evaluación de la calidad del DNA.....	28
6.6 Validación de los resultados de asociación del microarreglo	28
6.7 Genotipificación por el método fluorescente de 5' exonucleasa (Taqman).....	28
7. RESULTADOS	31
7.1 Datos clínicos y demográficos	31
7.2 Análisis de los SNPs de los genes <i>SLC11A1</i> , <i>IL7R</i> Y <i>TLR4</i>	32
7.3 Gen SLC11A1	32
7.4 Gen <i>IL7R</i>	34
7.5 Gen <i>TLR4</i>	35
8. DISCUSIÓN.....	38
9. CONCLUSIONES	42

10.	PERSPECTIVAS.....	43
11.	REFERENCIAS.....	43

Abreviaturas

TEA	Trastorno del espectro autista
IL	Interleucina
TNF	Factor de necrosis tumoral
IFN	Interferones
CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CNV	Variación en el número de copias
CNP	Polimorfismo en el número de copias
DbSNP	Base de datos de polimorfismos
SCID	Inmunodeficiencia combinada severa
TLR	Receptores tipo toll
LPS	Lipopolisacáridos
DSM	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales
ADI-R	Entrevista para el diagnóstico del autismo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RESUMEN

El trastorno del espectro autista (TEA), definido propiamente como un espectro se caracteriza principalmente por dificultades en la interacción social, deficiencias en la comunicación e intereses restringidos como conductas repetitivas. La prevalencia a nivel mundial, es de 1:160 recién nacidos, según la Organización Mundial de la Salud, pero se ha observado que esta cifra varía de acuerdo al país donde se estudie. Su heredabilidad es de las más altas, siendo alrededor del 80%. En México, no contamos con estudios suficientes que reporten la epidemiología actual ni que exploren las bases moleculares que puedan tener una participación relevante en el autismo. Se trata de un trastorno complejo, donde participan tanto factores genéticos, epigenéticos y ambientales. Evidencias recientes, sugieren fuertemente la participación de alteraciones del sistema inmune en la etiopatogenia de estos trastornos. Se han encontrado diferencias importantes en moléculas como citocinas, señalización deficiente por parte de las mismas, aumento en el número de algunos tipos celulares, entre otros. Debido a esto, el interés por encontrar en estas moléculas inmunes potenciales biomarcadores para la caracterización del autismo, ha cobrado gran relevancia. En este trabajo, se diseñó un microarreglo de polimorfismos de un solo nucleótido en inmunogenes, conteniendo 1440 SNPs en 400 genes y 96 marcadores de ancestría (Golden Gate, Illumina). Los resultados de este arreglo se validaron por la metodología de discriminación alélica por Taqman, eligiendo algunos de los SNPs contenidos en él (**rs3731865**, **rs10213865**, **rs4986791**). Esta metodología se basa en la utilización de sondas específicas para poder determinar el genotipo de cada muestra. La concordancia de los genotipos en ambas metodologías fue mayor al 95%. Adicionalmente se realizó una revisión exhaustiva individual de los genes del sistema inmune asociados para poder plantear una hipótesis biológica de su participación en el.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Trastorno del espectro autista

Los trastornos del espectro autista (TEA), son padecimientos neuropsiquiátricos que afectan a 1 de cada 160 niños, en su mayoría hombres, teniendo una relación 4:1. Con base en los estudios de concordancia de los TEA, en gemelos monocigóticos es del 60-90%; mientras que en dicigóticos, es del 3-6% [1,7]; Sólo alrededor del 15% de los casos han sido explicados por mutaciones genéticas conocidas en familias, pero éstas parecen no ser penetrantes. La enfermedad se inclina más hacia un origen poligénico, con cientos de *loci* haciendo pequeñas contribuciones a la etiología de la misma.

En la década de los 90's, se empezó a estudiar el autismo desde la perspectiva genética mediante estudios de asociación y ligamiento, posteriormente los análisis del genoma completo y las variaciones en el número de copias siguieron en los esfuerzos por identificar *loci* potenciales que pudieran explicar genéticamente la enfermedad [18].

Los síntomas de estos trastornos son detectables en los primeros 3 años de vida [2]. Según el Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V), esta enfermedad se caracteriza por un conjunto de afecciones, dividido en dos amplias categorías: síntomas centrales y síntomas secundarios, los primeros se caracterizan por conductas repetitivas, así como problemas en la interacción social; mientras que los síntomas secundarios incluyen autolesiones, hiperactividad, depresión, ansiedad y agresión [5,3]. Los pacientes diagnosticados con TEA tienen variaciones en sus capacidades cognitivas, ya sea desde una discapacidad intelectual, hasta inteligencia muy desarrollada [4]; además este padecimiento genera altos costos socioeconómicos tanto para los padres como para el servicio de salud. La clínica Mexicana de Autismo, en colaboración con Eric Fombonne,

realizó en México el primer estudio de prevalencia de TEA, en el cual señalan que 1 de cada 115 niños y adolescentes tienen esta enfermedad, lo cual significa que en el país 94,800 niños de cero a cuatro años y 298,000 entre cinco y diecinueve padecen TEA [6].

1.2 Etiopatogenia

La etiología de los TEA no se conoce con exactitud, pero se considera una enfermedad multifactorial, donde interactúan factores genéticos, ambientales y epigenéticos.

Tabla 1. Tipos y ejemplos de factores de riesgo asociados a TEA [4].

Factores	Ejemplos
Genéticos	Heredados o mutaciones de las células germinales en los padres; comunes, raros o únicos, desde mutaciones puntuales hasta variaciones en el número de copias.
Epigenéticos	Metilación de las citosinas, acetilación de las histonas; posiblemente 5-hidroximetilación.
Ambientales	Edad del padre y abuelos varones, sustancias empleadas durante el embarazo.

Los factores genéticos para los TEA, no está puesta a discusión, ya que algunos de estos pacientes presentan mutaciones de *novo*, las cuales se encuentran en las células germinales y presentan un efecto determinante en el fenotipo. De igual forma existen alelos que se encuentran presentes en generaciones previas y que tienen un fuerte efecto individual fuerte, pero que a nivel poblacional son muy raros [4]. Algunos estudios demuestran que existen variantes genéticas relacionadas con el TEA, los cuales tienen un alto grado de pleiotropía, es decir que, un gen afecta a más de un fenotipo, y se ha demostrado que existen más de 1000 genes implicados en el TEA [45]. Por ejemplo, el gen **MAOA** (monoamino oxidasa-A), el cual juega un papel importante en la codificación de enzimas mitocondriales, que juegan un papel importante en la desaminación oxidativa de aminos, como lo son la

dopamina, serotonina y norepinefrina. Este gen se ha encontrado asociado a trastornos psiquiátricos, incluido el comportamiento antisocial, el cual es característico de individuos con TEA.

Por otra parte, la expresión del gen **TLR4** se encuentra elevada en las células B, lo que muestra un aumento de la señalización de **NF-κB** y el estrés oxidativo en sujetos con TEA. Las células B periféricas podrían estar asociadas a la inflamación oxidativa sistémica y contribuir a la disfunción inmunológica en el TEA [44].

Por otro lado, es bien sabido que existe una asociación entre el medio ambiente y los TEA. Cabe señalar que, la combinación de varios factores ambientales contribuye a un impacto significativo de esta enfermedad [8]. Por ejemplo, la exposición ambiental a sustancias nocivas, tales como el consumo de cigarro o alguna otra sustancia como marihuana o cocaína, así como la exposición a ciertos pesticidas, de igual forma los contaminantes del aire, e inclusive la edad de los padres pueden causar cambios profundos en el desarrollo y estructura del cerebro, afectando procesos neurológicos como la diferenciación celular, sinaptogénesis y la mielinización de los axones [9].

La modificación epigenética, en los últimos años, ha jugado un papel muy importante en los TEA, esto debido a que los genes asociados a las vías epigenéticas, conforman una proporción considerable de los genes candidatos a este trastorno [10]. La mayoría de estas alteraciones, pueden darse gracias a metilaciones o incluso acetilaciones [4].

1.3 Interacciones entre el sistema nervioso y el sistema inmunitario en TEA

Actualmente se han planteado nuevas hipótesis acerca de la relación entre las enfermedades psiquiátricas y anomalías en el sistema inmune, donde las evidencias sugieren que una parte de la etiología puede explicarse gracias a estas alteraciones [11].

En el cerebro se encuentran células del sistema inmune como macrófagos y células dendríticas, las cuales pueden responder al estímulo de citocinas y prostaglandinas producidas fuera del sistema nervioso [19]. Dichas citocinas, actúan también sobre el cerebro produciendo en las personas un efecto de enfermedad, inclusive de afectación física y depresión en pacientes sin antecedentes de enfermedades psiquiátricas.

Las citocinas constituyen una familia de polipéptidos, las cuales son producidas por diferentes tipos celulares, suelen actuar fundamentalmente como reguladores de la respuesta inmunitaria, e inflamatoria o como factores de crecimiento local [14][15]. La actuación biológica de estas moléculas se produce a través de su interacción con receptores de membrana específicos, los cuales comienzan o desencadenan reacciones bioquímicas en el interior de la célula diana, determinando su acción biológica. Dentro del grupo de las citocinas, podemos encontrar a las interleucinas (IL), factores de necrosis tumoral (TNF), interferones (IFN), CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos) y quimiocinas (Figura 1) [15].

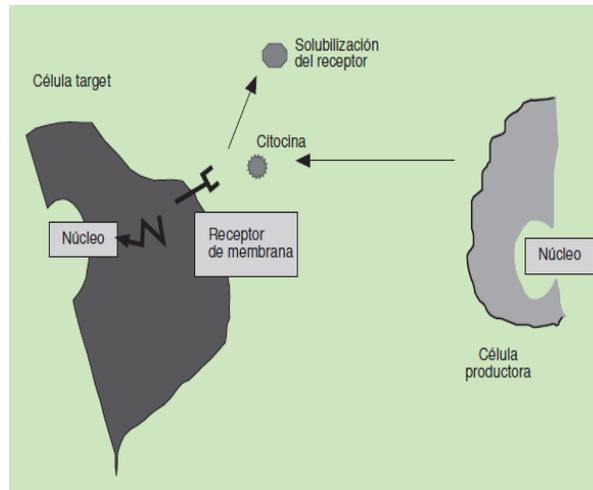


Figura 1. Actividad biológica de las citocinas a través de receptores de membrana [15].

Las citocinas se dividen en dos grandes grupos: proinflamatorias y antiinflamatorias, dentro de las primeras encontramos, que en el cerebro se localizan IL1beta, IL2, IL6, TNFalpha e IFN gamma. Se ha descrito que, una desregulación de la IL1beta provoca deficiencias en la memoria y aprendizaje [7]. Mientras que, las citocinas antiinflamatorias, tales como IL4, IL5 e IL10 confieren un efecto neuroprotector, en el caso de la IL4 se regula en el cerebro, cuando hay algún episodio de inflamación, induciendo la actividad de la microglía, evitando la apoptosis [7] [13].

Se sabe que la barrera hematoencefálica juega un papel clave en la permeabilidad de citocinas y anticuerpos que puedan interferir con los procesos de neurotransmisión, pero diversos estudios plantean el rompimiento de la misma, consistente con el incremento en la prevalencia de comorbilidad de enfermedades psiquiátricas e inmunes. Un ejemplo es el lupus eritematoso sistémico, donde del 25% al 75% de los pacientes cursan con padecimientos psiquiátricos, presentando ansiedad y alteraciones en el estado de ánimo y la conducta. La fisiopatología es principalmente mediada por autoanticuerpos contra antígenos sinápticos o intracelulares [20].

El autismo tiene importantes evidencias inmunológicas, ya que se ha observado desde el ambiente intrauterino que una infección por virus como

influenza, rubéola o citomegalovirus de madres en gestación, se correlaciona con un riesgo incrementado a que el niño padezca autismo, esto por la respuesta inmunológica que desencadena la madre, probablemente porque los anticuerpos impiden el desarrollo normal del sistema nervioso del feto [7]. Esto ha sido demostrado también en ratones, donde la progenie de madres infectadas con el virus de la influenza presenta alteraciones en la arquitectura neuronal y en el comportamiento como déficits en la interacción social, inhibición de prepulso, además de diferencias en los niveles de serotonina [21].

En miembros de familias con autismo, se han encontrado y asociado diferentes padecimientos autoinmunes por la presencia de autoanticuerpos en tejidos neurales como fiebre reumática, artritis reumatoide, psoriasis y diabetes tipo I [22].

En sangre periférica de pacientes con autismo, se han evidenciado varias funciones anormales como la de linfocitos T, autoanticuerpos, y elevación de citocinas proinflamatorias [23]. En estudios de casos y controles muestran que los pacientes con autismo presentan una alta incidencia de alergias a alimentos y rinitis, además de psoriasis.

En cerebros humanos y líquido cefalorraquídeo se han encontrado respuestas neurogliales relacionadas con inflamación, además de la presencia de quimiocinas y citocinas antiinflamatorias [23]. Citocinas como la ENA-78, atrayente de neutrófilos está elevada en niños con autismo, al igual que la IL6. Otras alteraciones encontradas son el incremento en las respuestas de células T, NK y monocitos [24].

1.4 Genómica como herramienta en el estudio de enfermedades complejas

La mayoría de las diferencias en el DNA de las personas se debe principalmente a polimorfismos, los cuales involucran de 1 a 1000 pb, así como también existen diversos tipos de anomalías a nivel cromosómico, las cuales son más frecuentes en pacientes con autismo, que la población en general (Tabla 2). [4]

Gracias a los estudios de secuenciación y microarreglos, se han podido detectar variaciones cromosómicas, ya sea comunes o *de novo*; tales como: deleciones, aneuploidías, traslocaciones e inversiones, que han contribuido a la identificación de genes candidatos o asociados a TEA. [4]

Tabla 2. Regiones cromosómicas asociadas a TEA, de acuerdo con estudios citogenéticos, microarreglos y secuenciación [4].

Región	Fenotipos asociados a los TEA
22q11	Síndrome de DiGeorge, síndromes de duplicaciones o deleciones cromosómicas, síndrome velocardiofacial, síndrome de Opitz G/BBB
15q11-q13	Síndrome de duplicación, síndrome de Angelman, síndrome de Prader-Willi
17p11.2	Síndrome de Smith-Magenis, síndrome de Potocki-Lupski
16p11.2	Síndrome de deleción, síndrome de duplicación
1q21	Síndrome de duplicación, síndrome de deleción, trombocitopenia con ausencia de radio, psoriasis
Cromosoma X, Xp22, Xq13	Síndrome de deleción, condrodiasplasia punctata, síndrome de Asperger, autismo
Cromosoma 7, q22-q31	Retraso mental, autismo

Los estudios de asociación genética, buscan determinar la relación entre uno o más polimorfismos genéticos y un rasgo, los cuales podrían ser características de alguna enfermedad, en este caso el TEA. [17]

Los estudios de asociación tienen un mayor poder que los estudios de ligamiento para detectar efectos pequeños a pesar de que se utiliza una mayor cantidad de marcadores; esto debido a la recombinación genética que existe en los individuos no relacionados. [17] Se ha observado que la susceptibilidad genética a los trastornos complejos involucra una gran cantidad de genes, los cuales tienen pequeños efectos, esto junto con la identificación de un gran número de SNPs en todo el genoma, y la disminución de los costos de genotipificación, ha llevado a la importancia de los estudios de asociación en epidemiología genética.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios de asociación y ligamiento en autismo

En el genoma humano generalmente encontramos 46 cromosomas, de los cuales 23 son heredados de la madre, mientras que el otro par son provenientes del padre, de estos, 22 pares son autosomas homólogos y un par son cromosomas sexuales. A pesar de que el 99.9% del genoma humano es similar en las personas, la secuencia de DNA de un cromosoma puede variar de diferentes formas dentro de este porcentaje, ya sea por un efecto en la formación de proteínas, la susceptibilidad asociada a una enfermedad o por la variación de la misma secuencia [37].

Es importante señalar que la mayoría de las diferencias en las secuencias de DNA de una persona a otra, se deben a polimorfismos [4], los cuales se pueden definir como una variación en la secuencia de un locus determinado del DNA en los cromosomas en los individuos de una población [37]. Aquellos polimorfismos que afectan la región codificante y que producen cambios importantes en la estructura de las proteínas o en el mecanismo de

regulación de la expresión, puede traducirse en diferentes fenotipos, como por ejemplo el color de ojos [38].

Las variaciones en el DNA que involucran una sustitución en una base nitrogenada, se les conoce como polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), y están presentes en al menos 1% de la población. Existen algunos casos en las que las variaciones suelen ser de 1000 pb, esto puede deberse a inserciones, deleciones, inversiones o duplicaciones conocidas como variaciones en el número de copias (CNV). Cuando este tipo de variaciones tiene una frecuencia de al menos el 1%, se le conoce como polimorfismos en el número de copias (CNP), estos son menores a 10 000 pb y es común encontrarlos en genes que codifican para proteínas involucradas en la desintoxicación de sustancias e inmunidad [4].

Actualmente en el dbSNP, se han catalogado más de 9 millones de variantes en la secuencia de DNA, y se ha descrito que cada 200 pares de bases en el genoma humano, se presenta un SNP, basado en esta información, se esperaría que existieran aproximadamente 6 millones de SNPs en el genoma. [39]

Los SNPs pueden encontrarse en regiones codificantes, provocando una modificación de un aminoácido y como consecuencia la función de la proteína, a este tipo de SNP se le denomina **no sinónimo**. [39] Por otra parte, existen los SNPs “silenciosos” o también denominados SNPs **sinónimos**, estos generalmente tienden a no modificar la secuencia del gen, es decir que no hay un cambio en alguno de los aminoácidos (Tabla 3). [48] Generalmente los SNPs sinónimos, son los más polimórficos, lo que nos indicaría que estas variaciones pueden ser funcionalmente neutras, sin embargo, algunos de estos SNPs podrían tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo (Figura 2). [39, 48]

Tabla 3. Clasificación y localización de SNPs en el genoma [39].

Tipo de SNPs	Localización
iSNP	Regiones intrónicas
rSNP	Regiones reguladoras
gSNP	Regiones intergenómicas
cSNP	Regiones codificantes: Pueden estar representados por SNPs: <ul style="list-style-type: none"> • Sinónimos • No sinónimos

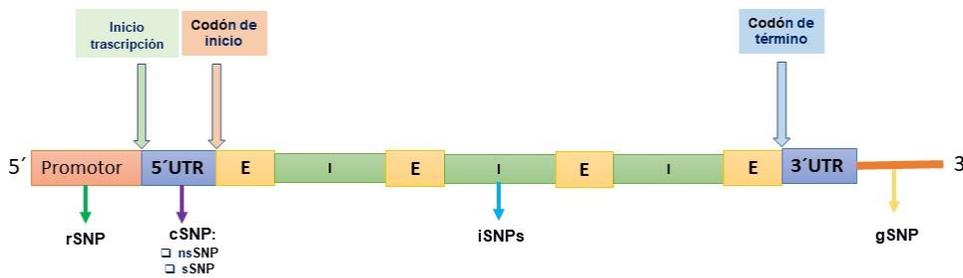


Figura 2. Clasificación de SNPs, de acuerdo a su localización en el genoma. E:exones;I:intrones; UTR: regiones no codificantes. Tomado y editado de [48]

Por otra parte es importante señalar que existen otro tipo de variantes a nivel genético, las cuales se denominan como microdeleciones y microduplicaciones; generalmente estas surgen durante la espermatogénesis u ovogénesis, estas suelen tener un tamaño mayor a los CNP, llegando inclusive a un millón de pb. [4] Este tipo de variaciones han sido encontradas en pacientes con retraso mental, esquizofrenia y TEA [40].

Es importante señalar que el análisis de polimorfismos en estudios de enlace genético y de asociación, son de gran importancia ya que nos ayudan a relacionar estas variantes genéticas con algún rasgo o enfermedad [41] como

en el caso del TEA, ya que nos da una aproximación para determinar si existe una relación con el componente genético.

En los estudios de asociación las variantes genéticas se comparan entre personas no emparentadas que han presentado la enfermedad (casos) y personas no emparentadas que no han presentado la enfermedad (controles) [4]. Mientras que los estudios de enlace genético tienen como objetivo analizar regiones cromosómicas en las cuales se encuentran diferentes alelos compartidos entre familiares afectados [4]. Es importante señalar que los estudios de asociación genética tienen un mayor poder sobre los estudios de enlace, ya que suelen detectar pequeños efectos, aunque se utilicen una mayor cantidad de marcadores, y esto se debe a que existe una mayor posibilidad de que el enlace sea destruido por recombinación y este se extienda a distancias más cortas en individuos distantemente emparentados [41].

Gracias a que los estudios de asociación operan a distancias cortas en el genoma, les ha garantizado a estos análisis una gran importancia en el mapeo fino de loci genéticos, inicialmente detectados por enlaces [41]. Es importante señalar que se han encontrado estudios, en los cuales se encuentra una susceptibilidad genética a trastornos complejos comunes en los cuales hay pequeños efectos de diversos genes.

2.2 Alteraciones de los genes del sistema inmune asociados con autismo

Mutaciones que ocurren en genes asociados al sistema inmunológico, o bien, que juegan un papel dual en el sistema nervioso y en el sistema inmunitario; respaldan la hipótesis de que el sistema inmunitario desempeña un papel importante en el desarrollo del TEA [7]. Por ejemplo, el riesgo del TEA se ha asociado con una variante genética en la región promotora del receptor tirosina quinasa MET, el cual contribuye al desarrollo de la corteza cerebral

y el cerebelo, de igual forma regula la función inmune y la tolerancia inmunológica [12].

Para identificar los genes afectados en el TEA, se han realizado estudios de enlace genético, en el cual se investigan regiones cromosómicas, y se encuentran alelos que suelen compartirse entre familiares afectados. En estos estudios, la frecuencia de las variantes genéticas se compara en personas no emparentadas que presentan el TEA y personas no emparentadas que no han presentado la enfermedad, comparando de esta forma los genes que han sido heredados por los padres y los que no han sido transmitidos por ellos para la contribución del TEA [4]. De igual forma, se han realizado estudios de asociación genética, estos se basan en casos y controles, con personas no emparentadas las cuales presentan o no la enfermedad, buscando los polimorfismos de asociación directa, los cuales son los causantes genéticos de la enfermedad y los rasgos relacionados con esta [17].

Tabla 4. Genes candidatos para autismo [4].

PRODUCTO DEL GEN	IDENTIFICACIÓN DEL GEN	FUNCIÓN DEL GEN
Neurexina 1	<i>NRXN1</i>	Se une a neuroliginas para la neurotransmisión y formación de contactos sinápticos
Transportador mitocondrial de aspartato/glutamato	<i>SLC25A12</i>	Transporte de aspartato de la mitocondria al citosol a cambio de glutamato
Receptor de oxitocina	<i>OXTR</i>	Receptor de hormona relevante en cognición social y conducta
Reelina	<i>RELN</i>	Activa las vías de señalización durante la migración neuronal
Protooncogén MET	<i>MET</i>	Protooncogén
Proteína con dominio similar a cabeza de tenedor P2	<i>FOX P2</i>	Factor de transcripción

Proteína 2 activadora para secreción dependiente de calcio	CADPS2	Involucrada en la exocitosis de vesículas que contienen neurotransmisores y neuropéptidos
Proteína 2 similar asociada a la contractina	CNTNAP2	Neurexina, interacciones entre células en el sistema nervioso
Proteína 2 con muesca (engrailed)	EN2	Factor de transcripción
Homólogo de fosfatasa y tensina	PTEN	Supresor de tumores
Factor neurotrófico derivado del cerebro	BDNF	Factor de sobrevivencia necesario para las neuronas estriatales en el cerebro
Subunidad alfa 1c de canal de calcio tipo L dependiente de voltaje	CACNA1C	Producción de canales de calcio
Receptor 1A de arginina vasopresina	AVPR1A	Media la contracción celular y proliferación
Proteína ligasa E3A a ubiquitina	UBE3A	Ligasa E3 y coactivador transcripcional
Receptor beta 3 de GABA	GABRB3	Neurotransmisión gabérgica
Transportador de serotonina	SLC6A4	Recaptación de serotonina a las neuronas presinápticas
Neuroligina 4	NLGN4	Ligando para la familia de neurexinas de receptores de la superficie celular
Neuroligina 3	NLGN3	Ligando para la familia de neurexinas de receptores de la superficie celular
Proteína de síndrome X frágil y retraso mental	FMR1	Posiblemente involucrada en la transcripción
Proteína 2 de unión a Metil-CpG	MECP2	Puede activarlo reprimir la transcripción

2.3 Gen SLC11A1

El gen *SLC11A1*, pertenece a la familia 11 de portadores de soluto (transportadores de iones metálicos divalentes acoplados a protones); en humanos, este gen se encuentra en el cromosoma 2q35 [25,26].

SLC11A1 codifica para una proteína transmembrana α helicoidal de múltiples segmentos que funciona principalmente como transportador de cationes divalentes como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , así como de otros metales divalentes a través de las membranas; esta proteína se expresa principalmente en los monocitos, los cuales son los precursores circulantes de macrófagos y células dendríticas, principales células presentadoras de antígeno en el sistema inmune [26,27]. Esta proteína, tiene efectos pleiotrópicos sobre la función de macrófagos, los cuales son importantes en la resistencia contra los patógenos intracelulares [25].

La sobreactivación de este gen podría potencialmente inducir a enfermedades autoinmunes e inmunes, tales como la diabetes tipo I. Las variantes genéticas en la región del gen *SLC11A1* se asocian con diversas enfermedades inmunes infecciosas y crónicas como artritis reumatoide [28],[29], enfermedad inflamatoria intestinal [30,31,25], enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple [32], y recientemente se ha asociado con cáncer de esófago [25,33].

2.4 Gen IL7R

La proteína codificada por el gen *IL7R* es un receptor de interleucina 7 (IL7). Esta proteína es parte importante del receptor IL7 y del receptor de linfopoyetina estromal tímica; dichos receptores se encuentran anclados en la membrana celular de las células del sistema inmune [36].

El receptor de IL7 se encuentra en las células B, T y en las primeras células formadoras de sangre. El receptor de linfopoyetina se encuentra en diversos tipos de células inmunes, incluidas las B, T, monocitos y células dendríticas,

estas células identifican sustancias extrañas y defienden al cuerpo contra infecciones y enfermedades. Las mutaciones en el gen *IL7R*, pueden causar una forma de inmunodeficiencia combinada severa (SCID), en el cual los individuos afectados, tienen una función inmune disminuida y son propensos a infecciones recurrentes y persistentes [36].

2.5 Gen *TLR4*

Los receptores tipo Toll (TLR), son receptores transmembrana de tipo 1, los cuales guardan una homología con la proteína Toll de *Drosophila* y con los receptores IL-1 [43]. La proteína codificada por este gen pertenece a estos receptores (TLR), los cuales juegan un papel importante en el reconocimiento de patógenos y en la activación del sistema inmune innato. Lo anterior se debe a que reconocen patrones moleculares asociados a agentes infecciosos y regulan la producción de citocinas para el desarrollo de una inmunidad efectiva [42]. Es importante señalar que actualmente se conocen 11 TLR en humanos, cada uno tiene un patrón de expresión diferente en tejidos linfoides y no linfoides [43]. Este receptor se ha asociado en eventos de transducción de señales inducidos por lipopolisacáridos (LPS). Las mutaciones en este gen se han asociado con diferencias en la respuesta de LPS [42].

Existe evidencia en la cual se observa una relación en la enfermedad del TEA, con respecto a los receptores tipo Toll, ya que se ha demostrado que la activación de *TLR4* aumenta la producción de citocinas proinflamatorias, así como con síntomas autistas en la descendencia [44].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los TEA abarcan diversos síntomas, la etiología exacta no se conoce con exactitud, pero se considera una enfermedad compleja multifactorial, en la cual participan factores ambientales, genéticos y epigenéticos. Recientemente, han surgido nuevas hipótesis acerca de la relación del sistema inmune, donde las evidencias sugieren que una parte de la etiología del TEA puede explicarse por alteraciones inmunológicas. En el cerebro se encuentran células de la microglía, las cuales responden al estímulo de citocinas y prostaglandinas producidas fuera del sistema nervioso, dichas citocinas actúan sobre el cerebro produciendo un efecto de enfermedad, afectación física y depresión.

En autismo existen evidencias importantes, donde la infección de madres en gestación correlaciona con algunos síntomas de variables específicas del autismo, como los déficits en la comunicación social y conductas repetitivas. En miembros de familias con autismo, se han encontrado autoanticuerpos en tejidos neurales y de procesos autoinmunes. De igual forma, se han encontrado importantes alteraciones en vías de señalización de genes ligados al sistema inmune, tales como *IL1RL1*, *CDK2*, *TLR4*, *IL7R*, *SLC11A1*, por decir algunos, en los que podemos encontrar desde variaciones en el número de copias, inserciones, deleciones, etc.

Por lo anterior, con este trabajo se pretende generar conocimiento científico al contar con una batería de marcadores (SNPs) que ayuden a explicar la etiología inmunológica del espectro autista, pues la mayoría de trabajos reportados hasta ahora se han realizado en población caucásica, asiática y estadounidense principalmente, dejando de lado a los mexicanos. Como sabemos el origen étnico es muy importante en el estudio de marcadores genéticos de enfermedades complejas, debido a las variaciones que se han observado entre poblaciones. Específicamente en TEA, se han encontrado variantes genéticas particulares dependiendo de la población que se estudie, razón por la cual es muy importante caracterizarla en mexicanos.

Para este proyecto se propuso utilizar una matriz comercial, la cual se personalizó añadiendo 1440 SNPs de genes de nuestro interés, asociados a sistema Inmune, con el fin de detectar cuáles se encuentran asociados al espectro autista en población mexicana, incluyendo marcadores de ancestría. El propósito principal de este trabajo fue validar los resultados del estudio de asociación por una metodología diferente, la discriminación alélica. Dicha información dará la pauta para la búsqueda de nuevos biomarcadores que puedan servir en un futuro para un mejor diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Validar los resultados de genotipificación, obtenidos de un microarreglo de alta densidad de polimorfismos tipo SNP en inmunogenes en pacientes autistas, posterior a un análisis de asociación genética.

Objetivos particulares

Describir la posible función de los genes del sistema inmune cuyos SNPs fueron asociados con autismo.

Comparar los datos encontrados con lo reportado en bases de datos.

5. HIPÓTESIS

La genotipificación por discriminación alélica coincidirá con los genotipos obtenidos de las mismas muestras en el microarreglo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Población de estudio y obtención de muestras

Se colectaron 96 muestras de pacientes autistas con edades de entre los 6 y 25 años de edad (para nuestro estudio de validación se utilizó una N=35), con base en los criterios del DSM-IVR- DSM-V, utilizando los criterios de la escala ADI-R. Dicha recolección de muestras y diagnóstico de los pacientes, fue realizada por paido-psiquiatras especialistas. Se utilizaron datos previos de 200 muestras de pacientes psiquiátricamente sanos.

Posteriormente se construyó una base de datos con información detallada de cada uno de los individuos participantes, en la cual se registró género, edad, origen geográfico, antecedentes familiares, manifestaciones clínicas, tratamiento administrado, entre otros.

Tanto en los casos, como en los controles, se tomó como criterio de inclusión que; dos generaciones anteriores hayan nacido en México y además que no refirieran antecedentes extranjeros. Por otra parte, se tomó como criterio de exclusión que no cumplieran con lo anterior para ambos casos, que se retiraran del estudio o no firmaran el consentimiento informado, así como en los controles sanos que refirieran antecedentes de alguna enfermedad psiquiátrica o autoinmune.

6.2 Toma de muestras

A los pacientes y controles, se les tomó una muestra de epitelio bucal, con la ayuda de un hisopo estéril. Dichas muestras se codificaron inmediatamente según las normas internacionales, proporcionando un número único de identificación para proteger los datos de las personas que participaron en el estudio.

6.3 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos de raspados bucales, a partir de hisopos se realizó mediante un kit comercial (Qiagen, Pure gene gentra, L.A., California, USA.). Para ello, primero se agregó 1 ml de buffer de lisis celular y 3 μ l de proteinasa K en un tubo. Posteriormente se introdujo el hisopo completo y se dejó en la solución por un periodo de 48 horas, agitando constantemente para el rompimiento de las membranas. Pasado dicho periodo de tiempo, el hisopo se sacó y escurrió, para poder cortar la esponja. En seguida se centrifugó a 3500 rpm, durante 10 minutos, para poder recuperar la mayor cantidad de solución. Se volvió a centrifugar la esponja del hisopo a 3500 rpm, durante un periodo de 5 minutos, ya que se obtuvo la cantidad deseada, se mantuvo a 4°C hasta su extracción.

Una vez obtenida la muestra deseada, se le añadieron 350 μ l de buffer de precipitación de proteínas y se agitó vigorosamente durante tres minutos, en seguida se dejó reposar en hielo, durante 5 minutos, para favorecer la precipitación de proteínas. Transcurrido este lapso, la muestra se volvió a agitar y se dejó reposar durante otros 5 minutos nuevamente en hielo. Se sacó la muestra y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante con pipeta, el cual se trasladó a un tubo falcon nuevo y estéril desechando el botón.

Teniendo el sobrenadante, se le añadió 1 ml de isopropanol frío, con 5 μ l de glucógeno, agitando suavemente el tubo sin invertir; se dejó 24 horas a 4°C. Pasado este lapso de tiempo, la muestra fue centrifugada a 3500 rpm durante 15 minutos a 10°C, para posteriormente decantar el sobrenadante, cuidando que no se tirara el botón que correspondía al DNA precipitado.

A dicho botón, se le añadieron 1500 μ l de etanol frío al 70% y se agitó suavemente hasta que se despegó, una vez realizado este paso, se volvió a centrifugar a 3500 rpm, durante 15 minutos a 10 °C, se retiró el sobrenadante

con pipeta y se dejó secar el tubo completamente. Finalmente, se resuspendió con 60 µl de buffer de suspensión de DNA

6.4 Análisis de SNPs por medio de microarreglos de alta densidad

Se utilizó un microarreglo sobre diseño, (Golden Gate) de la empresa Illumina, el cual contiene 1440 SNPs en alrededor de 400 genes del sistema inmune y 96 marcadores de ancestría.

Los datos se analizaron mediante un estudio de asociación de casos y controles utilizando el programa Plink. Se tomó el valor de $p < 0.05$ como significativo.

6.5 Cuantificación y evaluación de la calidad del DNA

Las muestras de DNA obtenidas se cuantificaron por espectrofotometría con el equipo Nanodrop, a una longitud de onda de 260nm, evaluando los parámetros 260/230 y 260/280. Con estos datos se realizaron diluciones de las muestras a 50ng/µl para los ensayos de genotipificación. A la par, se corrieron geles de agarosa al 1% para evaluar la integridad de las muestras.

6.6 Validación de los resultados de asociación del microarreglo

Se escogieron tres SNPs asociados para las validaciones mediante el método fluorescente de 5' exonucleasa Taqman con sondas específicas para cada uno (rs 10213865 gen *IL7R*, rs 4986791 gen *TLR4*, rs 3731865 gen *SLC11A1*) de la marca Applied Biosystems, siguiendo los protocolos del fabricante. Estos SNPs fueron analizados en forma independiente.

6.7 Genotipificación por el método fluorescente de 5' exonucleasa (Taqman)

Para los ensayos de discriminación alélica, cada sonda utilizada, se encontraba marcada en el extremo 5' con flurocromos diferentes FAM para el alelo 1 y VIC para el alelo 2; mientras que el extremo 3' contaba con un "quencher" (TAMRA), el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la

emisión de fluorescencia. Durante la reacción de PCR, los oligonucleótidos hibridan con una secuencia específica del segmento del gen que contiene la secuencia polimórfica, la sonda Taqman de igual forma 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 colorante fluorescente de la acción del "quencher", de tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizada durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente fue capaz de hibridar. Por lo tanto es posible diferenciar un alelo del otro con base en la longitud de onda de la fluorescencia emitida (Figura 3).

Para la reacción Taqman, se colocaron las muestras de DNA de pacientes, en placas de 96 pozos con controles negativos. Para dicha reacción, se preparó el Mastermix, bajo las siguientes condiciones (Tabla 5).

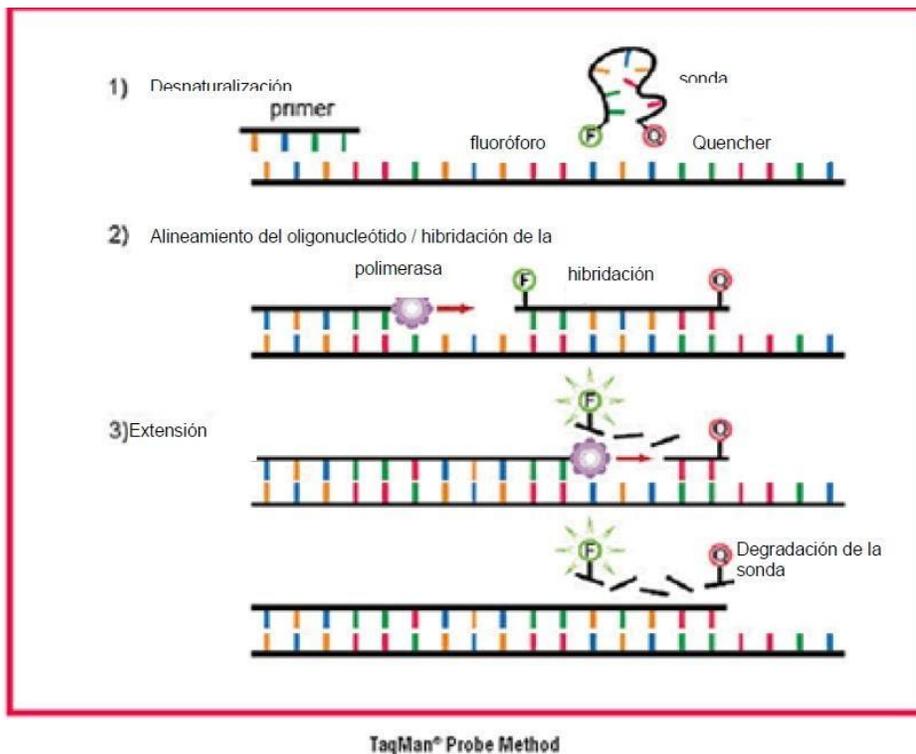
Tabla 5. Reacción Taqman para una muestra de DNA a una concentración de 10ng/ul

Reactivo	Cantidad
H2O libre de nucleasas	2.25µl
Master mix	2.5µl
Sonda	0.25µl
DNA	2µl

Una vez preparado el master mix, se prosiguió a agregar 5µl de este, a cada uno de los pozos. Finalmente se realizó la PCR en tiempo real en el equipo Quant Studio de Applied Biosystems, con las siguientes condiciones de termociclado (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones de termociclado para Taqman

Temperatura	Tiempo de cada ciclo
50°C	2 minutos
95°C	10 minutos
95°C	15 segundos (35 ciclos)
60°C	1 minuto
4°C	Final



Tomada de www.appliedbiosystems.com

Figura 3. Esquema de reacción Taqman. 1) Desnaturalización, las hebras de DNA se separan por efecto de la temperatura; 2) En el alineamiento, tanto los oligonucleótidos como las sondas Taqman hibridan con su secuencia complementaria en la muestra de DNA; 3) Al llevarse a cabo la extensión por la DNA polimerasa con función de 5' exonucleasa, la sonda se degrada permitiendo la emisión de fluorescencia.

Una vez obtenidos los resultados de la reacción de amplificación, se determinó el genotipo de las muestras, dependiendo de su posición en el plano, utilizando el programa Quant Studio Design & Analysis Software. Los genotipos obtenidos se compararon con el microarreglo, así como con la base de datos de “The 1000 genomes project phase 3 browser” (Figura 4).

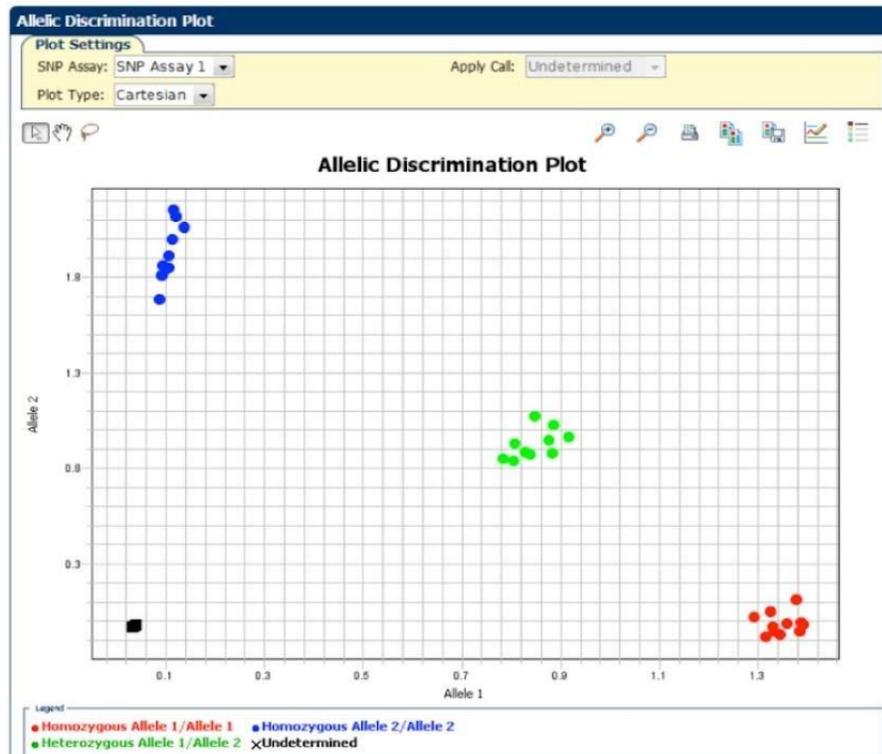


Figura 4. Discriminación alélica mediante la técnica de Taqman. En verde se muestran los heterocigotos para el alelo 1,2; en rojo los homocigotos para el alelo 1; en azul los homocigotos para el alelo 2 y en negro se presentan los controles negativos o alelos indeterminados.

7. RESULTADOS

7.1 Datos clínicos y demográficos

Al analizar las 35 muestras de los pacientes; 28 individuos fueron (80%) del sexo masculino y siete (20%) del sexo femenino. (Figura 5). La relación de género masculino:femenino fue aproximadamente 4:1, por lo tanto los resultados apoyan lo encontrado en la literatura [7].

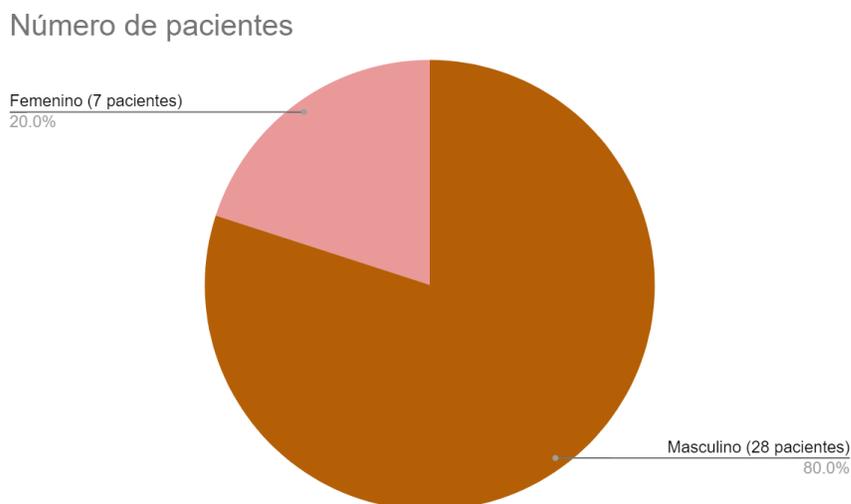


Figura 5. Representación del número de pacientes masculinos y femeninos analizados en la validación. (n=35)

7.2 Análisis de los SNPs de los genes *SLC11A1*, *IL7R* Y *TLR4*

Los estudios de asociación y ligamiento, como se mencionó anteriormente, son utilizados para identificar las variantes genéticas que influyen en las enfermedades complejas. Un alelo en un locus de interés se encuentra asociado con un rasgo, si este aparece con una tasa de frecuencia mayor en la población afectada [46]. Del estudio de asociación genética de casos y controles, se seleccionaron tres de los SNPs asociados con TEA para validar los resultados obtenidos de la genotipificación del microarreglo. Aunado a lo anterior, se consultó la base de datos de los 1000 genomas (The 1000 genomes project phase 3 browser) y se comparó la información generada. Los SNPs en los genes asociados *SLC11A1*, *IL7R*, y *TLR4* fueron analizados.

7.3 Gen *SLC11A1*

El análisis de los resultados obtenidos con el rs3731865, se presenta de manera resumida en la tabla 7 y 8. En este caso, dicho SNP nos muestra un cambio de nucleótido de G/C, siendo el alelo G el ancestral y en mayor frecuencia según la información de la base de datos de 1000 genomas. Al

realizar las validaciones por la técnica de Taqman, comparando con los resultados del microarreglo GoldenGate, nos arroja datos muy similares en cuanto a frecuencias, mientras que en la base de datos (1000 genomas) nos muestra una diferencia significativa, ya que esta última es de una población abierta, lo anterior nos indicaría que este SNP se encuentra en mayor frecuencia en pacientes con TEA.

Al ser un SNP que se encuentra en una región intrónica (no codificante), no hay cambio en la secuencia del aminoácido y por lo tanto, no modifica a la secuencia, por lo que es un SNP sinónimo. Como se mencionó anteriormente, este gen juega un papel fundamental como proteína de resistencia para los macrófagos [47].

Tabla 7. Localización del SNP rs3731865 en el genoma

SNP	Gen	Localización	Número de exones
rs3731865	SLC11A1	2q35 Intrón	16

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs3731865 de **SLC11A1** encontradas en las muestras del microarreglo y validadas por la técnica de taqman, así como su comparación con la base de datos de 1000 genomes.

Genotipo	Golden	Taqman	1000 genomes project phase 3 browser
G/G	51.42% (18)	48.57% (17)	51.6% (33)
C/G	48.57% (17)	45.71% (16)	37.5% (24)
C/C	0% (0)	0% (0)	10.9% (7)
Indefinido		5.71% (2)	
Alelos	Golden	Taqman	1000 genomes project phase 3 browser
G	75.71% (53)	71.42% (50)	70.3% (90)
C	24.28% (17)	22.85% (16)	29.7% (38)
Indefinido		5.55% (4)	

7.4 Gen IL7R

De acuerdo con los datos mostrados en la tabla 9, el polimorfismo rs10213865, el cual codifica para el gen *IL7R*, se encuentra en una región intrónica (no codificante), no se han reportado otras isoformas asociadas a este SNP; lo anterior fue verificado en NCBI.

Es importante señalar que la base de datos de los 1000 genomas, nos arroja que dicho SNP, muestra un cambio de A/C, siendo el alelo A el ancestral, ya que se observa una mayor frecuencia para dicho alelo. Este gen se encuentra asociado a algunas otras enfermedades autoinmunes, tales como la dermatitis y a la sarcoidosis. (NCBI)

Los siguientes datos (Tabla 10) nos muestran una asociación en lo encontrado por el microarreglo y lo validado por Taqman, por lo cual podemos concluir que este SNP se encuentra asociado a TEA, es importante señalar que existe una diferencia significativa en lo encontrado y en lo reportado en la base de los 1000 genomas, lo cual nos indicaría que el alelo se encuentra en pacientes con TEA.

Tabla 9. Localización del Rs10213865 en el genoma

SNP	Gen	Localización	Número de exones
rs10213865	<i>IL7R</i>	5p13.2 Intrón	8

Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs10213865 de **IL7R** encontradas en las muestras del microarreglo y validadas por la técnica de taqman, así como su comparación con la base de datos de 1000 genomes.

Genotipo	Golden	Taqman	1000 genomes project phase 3 browser
C/C	22.85% (8)	22.85% (8)	4.7% (3)
C/A	77.14% (27)	74.28% (26)	32.8% (21)
A/A	0% (0)	0% (0)	62.5% (40)
Indefinido		2.85% (1)	
Alelos	Golden	Taqman	1000 genomes project phase 3 browser
A	38.57% (27)	37.14% (26)	78.9% (101)
C	61.42% (43)	60% (42)	21.1% (27)
Indefinido		2.85% (2)	

7.5 Gen *TLR4*

En las tablas 11, 12, y 13 se muestran los resultados obtenidos por el polimorfismo rs4986791, el cual se encuentra asociado al gen *TLR4*, en una secuencia genómica este es un cSNP no sinónimo, debido a que dicha variación se encuentra localizada dentro de una secuencia exónica, y el cambio nucleotídico modifica al aminoácido (Tabla 11).

Tabla 11. Para el polimorfismo rs4986791 podemos observar que existen tres isoformas distintas, las cuales se deben a una modificación traduccional de aminoácido (Thr / Ile), esto debido al cambio de una de las bases (C/T), sin embargo estas modificaciones codifican para el mismo gen **TLR4**. (Tomada de NCBI)

Tipo de molécula	Cambio	Aminoácido (codón)	Término SO
TLR4 transcripción variante 1	NM_138554.5:c.1196C>T	T [ACC] > I [ATC]	Variante de secuencia de codificación
TLR4 transcripción variante 3	NM_003266.4:c.1076C>T	T [ACC] > I [ATC]	Variante de secuencia de codificación
TLR4 transcripción variante 4	NM_138557.3:c.596C>T	T [ACC] > I [ATC]	Variante de secuencia de codificación
Precursor de isoforma A del receptor 4 tipo Toll	NP_612564.1:p.Thr399Ile	T (Thr) > I (Ile)	Variante sin sentido
Isoforma C del receptor 4 similar a Toll	NP_003257.1:p.Thr359Ile	T (Thr) > I (Ile)	Variante sin sentido
Isoforma D del receptor 4 similar a Toll	NP_612567.1:p.Thr199Ile	T (Thr) > I (Ile)	Variante sin sentido

En la tabla 12, y 13 podemos encontrar los datos asociados en cuanto a localización y frecuencias genotípicas, alélicas del polimorfismo.

Tabla 12. En esta tabla podemos observar que el gen **TLR4** se encuentra presente en una secuencia exónica, en el cromosoma 9:120475602, dicho gen cuenta con 3 isoformas, las cuales se denominan cSNP.

SNP	Gen	Localización	Número de isoformas	Número de exones
rs4986791	TLR4	9q33.1 Exónica	3	4

Tabla 13. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo s4986791 de **TLR4** encontradas en las muestras del microarreglo y validadas por la técnica de taqman, así como su comparación con la base de datos de 1000 genomes.

Genotipo	Golden	Taqman	1000 genomes project phase 3 browser
C/C	48.57% (17)	48.57% (17)	93.8% (60)
T/T	5.71% (2)	5.71% (2)	0% (0)
T/C	45.71% (16)	42.85% (15)	8.7% (9)
Indeterminado		2.85% (1)	
Alelos	Golden	Taqman	1000 genomes project phase 3 browser
C	71.42% (50)	70% (49)	96.9% (124)
T	28.57% (20)	27.14% (19)	3.1% (4)
Indefinido		2.85% (2)	

De acuerdo a los resultados mostrados es importante señalar que la base de datos de los 1000 genomes, nos arroja que dicho SNP, muestra un cambio de C/T, siendo el alelo C el ancestral (Vic), ya que se observa una mayor frecuencia para este alelo.

Debido a que este gen cuenta con tres isoformas distintas, es importante señalar que no solo se encuentra asociado a TEA y enfermedades neurodegenerativas, sino a algunas otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como la hepatitis C, diabetes tipo II, por mencionar algunas. (NCBI)

Finalmente, los datos nos muestran una correlación en lo encontrado por el microarreglo y la validación por medio de Taqman. Es importante señalar que

existe una diferencia significativa en lo encontrado y lo reportado en la base de los 1000 genomes, ya que esta última es la población control, lo cual nos indicaría que este gen se encuentra asociado a alteraciones del sistema inmune en pacientes con TEA.

8. DISCUSIÓN

Los Trastornos del espectro autista (TEA) son catalogados como enfermedades complejas, en la cual participan factores ambientales, genéticos, epigenéticos, sin embargo, a la actualidad no se encuentran bien esclarecidos. Dado lo anterior, es importante conocer los genes que se encuentran involucrados en el desarrollo de esta enfermedad.

Para este trabajo se analizaron tres SNPs encontrados en los genes ***TLR4***, ***SLC11A1***, ***IL7R***, los cuales se han reportado asociados a enfermedades autoinmunes e inflamatorias. La importancia de este estudio, radica en que una parte de la etiología del TEA está dada por alteraciones inmunológicas, por lo que es de suma importancia caracterizar a nivel genómico las variaciones de estos genes en población mexicana, dado que no hay estudios al respecto.

El SNP rs4986791 (C/T) es un polimorfismo funcional del gen ***TLR4*** [49], el cual tiene 3 isoformas (Tabla 13), en las que existe un cambio de una treonina (Thr), por una isoleucina (Ile). Este polimorfismo, modula la respuesta de defensa innata del huésped contra las infecciones y su frecuencia en diversas poblaciones se debe a presiones de selección, las cuales dependen de la interacción con los patógenos locales [49,50]. Estudios demuestran que este SNP se encuentra asociado a diversas enfermedades, como es el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal, tuberculosis, hepatitis C, diabetes tipo II. En el caso de las enfermedades infecciosas de intestino, se ha observado un desequilibrio de células T, como células reguladoras T, Th1, Th2 y Th17, así como de citocinas. [49,51]. Por otra parte, estudios recientes han demostrado que los receptores TLR están asociados a un desarrollo adecuado de la

placenta, pero este polimorfismo muestra una susceptibilidad a padecer preeclampsia [52].

La alteración o disfunción de las células del sistema inmune, da como resultado la liberación de moléculas proinflamatorias como citocinas, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales se consideran claves en la patología de los TEA [44].

El gen *TLR4* se localiza en el cromosoma 9 (Tabla 14) y juega un papel muy importante asociado a vías inflamatorias [49]. Pertenece a los receptores tipos Toll, los cuales están asociados a la expresión de agentes presentadores de antígenos, los cuales participan en el reconocimiento molecular de patógenos que no se encuentran en las células del hospedero [43]. Es el principal receptor de lipopolisacáridos (LPS) expresado en macrófagos, células dendríticas, células epiteliales y el epitelio intestinal [49]. La señalización ***TLR4*** es importante en relación con la patogénesis de TEA, a través de la producción de citocinas, quimiocinas, etc [44]. Por ejemplo, un estudio reciente demuestra que existe una mayor producción de citocinas proinflamatorias a partir de células mononucleares de sangre periférica, de niños autistas, tras la estimulación con el ligando LPS de ***TLR4*** [44,53].

También se ha mostrado que la señalización de ***TLR4***, activa los NFκB, conduciendo a la transcripción de citocinas proinflamatorias y ROS, como un componente de la respuesta inflamatoria, y estos NFκB se han encontrado en altas concentraciones en la sangre periférica y sistema nervioso central de pacientes con TEA. Por otra parte, este tipo de hallazgos podría tener una implicación terapéutica importante, ya que podría desarrollar antagonistas de ***TLR4***, para bloquear la señalización de este en el autismo [44,54].

El SNP rs10213865 (A/C) es un polimorfismo del gen ***IL7R***, el cual se encuentra localizado en el cromosoma 5 (Tabla 10), y se ha asociado a esclerosis múltiple, asma y diabetes tipo I. ***IL7R*** juega un papel importante

como inmunomodulador en las células dendríticas, principalmente con la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), la cual es un homólogo a IL7 (interleucina 7) y es producida en las células de origen epitelial en el timo, pulmón, intestino y piel [55].

La IL7 es una citocina que es crucial para el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune. La interacción de IL7 con el receptor **IL7R** estimula la diferenciación de células madre hematopoyéticas en células progenitoras linfoides, proliferación de células de linaje linfoide (células B, T, NK), y la homeostasis de células linfoides. La expresión de **IL7R** aumenta o disminuye estrictamente durante el desarrollo de las células B y T. En tejidos no hematopoyéticos la expresión del gen se ha identificado en un conjunto menor, el cual incluye células gliales y trofoblastos placentarios [57].

Existe una asociación del SNP (rs10213865 C/T) del gen **IL7R** en su región intrónica con la sarcoidosis y la enfermedad de Löfgren [55]. Por otro lado, es importante señalar que este gen (**IL7R**) funciona como un receptor pleiotrópico para la vía de señalización de IL7 en enfermedades autoinmunes. **IL7R** interactúa con la cadena gamma (CD132) y alfa (CD127), formando el complejo de señalización. La interacción entre IL7 e **IL7R** es vital para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células T, fundamentalmente las células T CD4+, las cuales se encuentran presentes en lesiones inflamatorias de pacientes con esclerosis múltiple [56]. En el caso de la leucemia linfoblástica, se han observado mutaciones exónicas del gen **IL7R**.

Es importante destacar que actualmente este gen no ha sido estudiado para TEA, este es el primer proyecto en realizarlo en población pediátrica mexicana. Sin embargo, existe una relación de este polimorfismo a desórdenes autoinmunes, como los que se mencionaron anteriormente. Mientras que en los resultados obtenidos (Tablas 11 y 12), podemos observar que tanto en el microarreglo, como en la validación coinciden, lo cual nos indicaría que la asociación de este gen con diferentes enfermedades

autoinmunes mostrados en otras poblaciones, sugiere la existencia de un componente de alteraciones fisiológicas comunes y un fondo genético compartido, aunado al hecho de que los mecanismos patológicos son similares en todas ellas.

El SNP 3731865 (G/C) asociado al gen **SLC11A1**, se encuentra localizado en el cromosoma 2, no cuenta con isoformas para este gen (Tabla 7). **SLC11A1** es el gen 1, miembro de la familia de portadores de solutos 11, al cual también se le conoce como proteína natural de macrófagos asociada a la resistencia (**Nramp1**) [58].

SLC11A1 se expresa en monocitos, los cuales son los precursores de macrófagos y células dendríticas, principales células presentadoras de antígeno en el sistema inmune. Este gen tiene efectos pleiotrópicos sobre la función de los macrófagos, los cuales son importantes en la resistencia a los patógenos intracelulares; los cuales incluyen liberación de óxido nítrico, flujo de L-arginina, actividad tumoral y antimicrobiana, regulación de quimiocina, factor de necrosis tumoral, interleucina-1b, entre otros [25].

Blackwell y colaboradores encontraron un microsatélite polimórfico potencialmente funcional en la región promotora del gen **SLC11A1** humano [34,35,25]. Se encontró que en el alelo 3, la actividad de la región promotora es más fuerte, provocando una mayor expresión del gen **SLC11A1**, en relación con el alelo 2, lo cual provoca una hiperactivación crónica de macrófagos, lo que predispone a enfermedades autoinmunes (como artritis reumatoide, sarcoidosis, enfermedad de Kawasaki, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal) pero protege contra enfermedades infecciosas [25]. De hecho, se han informado asociaciones en otros polimorfismos como rs17235409, rs17235416, y rs3731865 en enfermedades infecciosas [25].

Con base en los resultados obtenidos (Tabla 8 y 9), podemos observar que existe una correlación del SNP (rs3731865 G/C) con la validación por medio

de Taqman, y con lo obtenido en la literatura, podemos decir que existen estudios que señalan que la sobreexpresión de **SLC11A1** induce a la formación de enfermedades autoinmunes, por lo tanto, lo vuelven un gen candidato para trastornos inmunes y autoinmunes como la diabetes tipo I. Se ha demostrado también que este gen participa en la supresión de IL-10, y el gen que codifica para esta interleucina se ha asociado recientemente a la susceptibilidad de padecer diabetes tipo I, así como con el riesgo de colitis ulcerosa, y de lupus eritematoso sistémico [25,59]. Finalmente, este gen podría ser un gen altamente candidato para explicar el TEA, sin embargo, esta tesis es uno de los primeros estudios que propone a este gen como candidato para la enfermedad.

9. CONCLUSIONES

- ✚ La validación de los polimorfismos por la metodología de Taqman, coincide con lo detectado por el microarreglo, lo cual nos indica que, ambas metodologías de genotipificación son concordantes.
- ✚ Esta tesis es el primer trabajo enfocado en estudiar genes candidatos del sistema inmune asociados a TEA, en población pediátrica mexicana.
- ✚ El TEA es una enfermedad multifactorial, por lo cual es importante seguir con la búsqueda y estudio de más genes candidatos.
- ✚ Es importante para futuras investigaciones, utilizar una N mayor para conocer si las frecuencias genotípicas y alélicas de los genes *TLR4*, *SLC11A1* e *IL7R* son diferentes a las reportadas en otras poblaciones abiertas, además de la mexicana.
- ✚ El análisis y validación de los SNPs (rs3731865, rs10213865, rs4986791), sugiere que estos genes se encuentran fuertemente asociados a infecciones y enfermedades del sistema inmune.
- ✚ Los genotipos de las muestras en los SNPs de los genes *SLC11A1*, *TLR4* e *IL7R* coinciden con el microarreglo y la validación por Taqman.

- ✚ La concordancia de datos del microarreglo con la validación de Taqman, respecto a las diferencias de los 1000 genomas (datos control), nos indica que los polimorfismos de los genes se encuentran asociados a TEA.

10. PERSPECTIVAS

- ✚ Replicar el estudio de asociación en pacientes con TEA en población mexicana, con una N mayor.
- ✚ Realizar un análisis de expresión génica, en los inmunogenes donde se encontraron SNPs asociados y analizar si estos tienen un efecto directo sobre los RNA mensajeros.
- ✚ Analizar el efecto de estos genes, sobre vías de señalización en individuos con TEA mediante biología de sistemas.
- ✚ Proponer una batería de potenciales biomarcadores que ayuden a un mejor diagnóstico y/o pronóstico del paciente.

11. REFERENCIAS

- 1.- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2017. Trastornos del Espectro Autista.

- 2.- Levy, S.E, Mandell, D.S, Schultz, R.T. 2010. Autism. *NIH Public Access*. 374(9701): 1627–1638
- 3.- Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales. 5 ed. 2016. *American Psychiatric Association*.
- 4.- Díaz, A.A, Díaz, M.M. 2013. Contribución genética, ambiental y epigenética en la susceptibilidad a los trastornos del espectro autista. *Revista de Neurología*. 57: 556-68.
- 5.-Fakhoury, M. 2015. Autistic spectrum disorders: A review of clinical features, theories and diagnosis. *Elsevier*.
- 6.- Secretaría de Salud. 2016. Boletín epidemiológico. México. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/deteccion-temprana-de-trastorno-del-espectro-autista-permite-la-inclusion-social-y-escolar>
- 7.- Mead, J., Ashwood P. 2014. Evidence supporting an altered immune response in ASD. *Elsevier*.
- 8.- Gardene, H., Spiegelman, D., Buka, S. L. 2009. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br.J. Psychiatry*.
- 9.- Lyall, K., Schmidt, R.J., Hertz-Picciotto, I., 2014. Maternal Lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders. *International Journal of Epidemiology*.
- 10.- Loke, J, Y., Hannan, J, A., Craig, M, J., 2015. The role of epigenetic change in autism spectrum disorders. *Frontiers in neurology*.
- 11.- Najjar, S., Pearlman, M, D., Alper, K., Najjar, A., Devinsky, O., 2013. Neuroinflammation and psychiatric illness. *Journal of neuroinflammation*.
- 12.- Campbell, D, B., Sutcliffe,S, J., Ebert, J, F., Militerni R., Bravaccio, C., Trillo, S., Elia, M., Schneider, C., Melmed, R., Sacco, R., Persico, M,

A., Levitt, P. , 2006. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. PNAS.

13.- Brietze, E, R., Stabellini, R., Grassi-Oliveira., Lafer, B., 2011. Cytokines in bipolar disorder: recent findings, deleterious effects but promise for future therapeutics. CNS Spectr.

14.- Conti, F., 2010. Fisiología Médica. Ed. McGraw Hill. 1ª Ed. pp. 703-711

15.- Filella, X., Molina, R., Ballesta, AM., 2002. Estructura y función de las citocinas. Elsevier. pp.47-88

16.- Postal, M., Costallat L, T., Appenzeller, S., 2011. Neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology and management. CNS Drugs.

17.- Cordell, J, H., Clayton, G,D., 2005. Genetic epidemiology 3: Genetic association studies. Lancet.

18.- Abrahams, B. S., and D. H. Geschwind. 2008. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. Nat Rev Genet.

19.- Dantzer, R., J. C. O'Connor, G. G. Freund, R. W. Johnson, and K. W. Kelley. 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat Rev Neurosci.

20.- Postal, M., L. T. Costallat, and S. Appenzeller. 2011. Neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology and management. CNS Drugs.

21.- Patterson, P. H. 2009. Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. Behav Brain Res.

22.- Gesundheit, B., J. P. Rosenzweig, D. Naor, B. Lerer, D. A. Zachor, V. Prochazka, M. Melamed, D. A. Kristt, A. Steinberg, C. Shulman, P.

Hwang, G. Koren, A. Walfisch, J. R. Passweg, J. A. Snowden, R. Tamouza, M. Leboyer, D. Farge-Bancel, and P. Ashwood. 2013. Immunological and autoimmune considerations of Autism Spectrum Disorders. *J Autoimmun*

23.- Vargas, D. L., C. Nascimbene, C. Krishnan, A. W. Zimmerman, and C. A. Pardo. 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 57.

24.- Mostafa, G. A., and L. Y. Al-Ayadhi. 2015. The possible link between elevated serum levels of epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 (ENA-78/CXCL5) and autoimmunity in autistic children. *Behav Brain Funct*

25.- HM, Y.J., Downes, K., MM, Howson, J., Nutland, S., E, Stevens, H., M, Walker, N., and A, Todd, J. 2011. Evidence of association with type 1 diabetes in the SLC11A1 gene region. *BMC, Medical Genetics*.

26.- A. Triantaphyllopoulos, K., A. Baltoumas, F., J. Hamodrakas, S. 2018. Structural characterization and molecular dynamics simulations of the caprine and bovine solute carrier family 11 A1 (SLC11A1). *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. CrossMark.

27.- HaemAtlas. [<http://dil.t1dbase.org/page/HaemAtlasView>].

28.- Shaw MA, Clayton D, Atkinson SE, Williams H, Miller N, Sibthorpe D, Blackwell JM: Linkage of rheumatoid arthritis to the candidate gene NRAMP1 on 2q35. *J Med Genet* 1996, 33(8):672-677.

29.- Ates Ö, Dalyan L, Müsellim B, Hatemi G, Türker H, Öngen G, Hamuryudan V, Topal-Sarıkaya A: NRAMP1 (SLC11A1) gene polymorphisms that correlate with autoimmune versus infectious disease susceptibility in tuberculosis and rheumatoid arthritis. *International Journal of Immunogenetics* 2009, 36(1):15-19.

30.- Hofmeister A, Neibergs HL, Pokorny RM, Galandiuk S: The natural resistance-associated macrophage protein gene is associated with Crohn's disease. Surgery 1997, 122(2):173-178, discussion 178-179.

31.- Kotlowski R, Bernstein CN, Silverberg MS, Krause DO: Population-based case-control study of alpha 1-antitrypsin and SLC11A1 in Crohn's disease and ulcerative colitis. Inflamm Bowel Dis 2008, 14(8):1112-1117

32.- Kotze MJ, de Villiers JNP, Rooney RN, Grobbelaar JJ, Mansvelt EPG, Bouwens CSH, Carr J, Stander I, du Plessis L: Analysis of the NRAMP1 Gene Implicated in Iron Transport: Association with Multiple Sclerosis and Age Effects. Blood Cells, Molecules, and Diseases 2001, 27(1):44-53.

33.- Zaahl MG, Warnich L, Victor TC, Kotze MJ: Association of functional polymorphisms of SLC11A1 with risk of esophageal cancer in the South African Colored population. Cancer Genetics and Cytogenetics 2005, 159(1):48-52.

34.- Blackwell JM, Barton CH, White JK, Searle S, Baker AM, Williams H, Shaw MA: Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. Mol Med 1995, 1(2):194-205.

35.-Searle S, Blackwell JM: Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. J Med Genet 1999, 36(4):295-299

36.- Genetics home reference. IL7R. [<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL7R>]

37.- Burton, R. P., Tobin, D. M., Hooper, L. J. 2005. Genetic Epidemiology 1. Key concepts in genetic epidemiology. Lancet, 366. 941-951.

- 38.- Bajo, A. J. M., Coroleu, L. B. 2009. Fundamentos de reproducción. Ed. Médica panamericana. pp 287.
- 39.- Checa Caratachea, M. A., 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. Volumen 20. Número 3. Páginas. 213-221
- 40.- Morrow EM. Genomic copy number variation in disorders of cognitive development. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 2010; 49: 1091-104.
- 41.- Cordell, H. J., Clayton D. G. 2005. Genetic epidemiology 3. Genetic association studies. Lancet 2005; 366: 1121–31
- 42.- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=7099
- 43.- Mesa, V. M., Patiño, P. J. 2006. Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. Inmunología. Vol. 25. Núm 2: 115-130.
- 44.- Nadeem, A., Ahmad F. S., Bakheet, A. S., Al-Harbi, N. O., Al-Ayadhi, Y. L., Attia, M. S., Zoheir, M.A. K. 2016. Toll-like receptor 4 signaling is associated with upregulated NADPH oxidase expression in peripheral T cells of children with autism. Elsevier.
- 45.- Márquez Muñoz, A. C., 2019. Respuesta electrofisiológica temprana ante expresiones faciales de infantes, sensibilidad materna y polimorfismo MAOA uVNTR en madres de niños con autismo. Tesis. UNAM.
- 46.- Morales Marín, M. E., 2008. Polimorfismos en los genes PTPN22 y PDCD1 y su asociación con la susceptibilidad a desarrollar artritis reumatoide juvenil en población mexicana. Tesis. UNAM.

- 47.- Franco, B. J.M., Chociay, G. M. F., Zago, A. M., Roselino, A. M. 2016. Association of the solute carrier family 11 member 1 gene polymorphisms with susceptibility to leprosy in a Brazilian sample. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 111(2): 101-105.
- 48.- Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 2003;12:205-216.
- 49.- Ao, R., Wang, Y., Zhnag Dao-Rong., Du, Ya-Qi. 2015. Role of TLR4 rs4986790A>G and rs4986791C>T Polymorphisms in the Risk of Inflammatory Bowel Disease. Hindawi Publishing Corporation. *Gastroenterology Research and Practice*.
- 50.- M. Ioana, B. Ferwerda, S. Farjadian et al. 2012 High variability of TLR4 gene in different ethnic groups in Iran. *Innate Immunity*, vol. 18, no. 3, pp. 492–502.
- 51.- M. Mohammadi, M. J. Zahedi, A. R. Nikpoor, M. R. Baneshi, and M. M. Hayatbakhsh. 2013. Interleukin-17 serum levels and TLR4 polymorphisms in ulcerative colitis. *Iranian Journal of Immunology*, vol. 10, no. 2, pp. 83–92.
- 52.- Mohammadpour-Gharehbagh, A., Jahantigh, D., Eskandari, M., et al. 2019. The role of TNF- α and TLR4 polymorphisms in the placenta of pregnant women complicated by preeclampsia and in silico analysis. Elsevier. *International Journal of Biological Macromolecules* 134. pp. 1205–1215.
- 53.- Enstrom, A.M., Onore, C.E., Van de Water, J.A., Ashwood, P., 2010. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain Behav. Immun.* 24, 64–71. García Bueno, B., Caso, J.R., Madrigal.

- 54.- Young, A.M., Campbell, E., Lynch, S., Suckling, J., Powis, S.J., 2011. Aberrant NFkappaB expression in autism spectrum condition: a mechanism for neuroinflammation. *Front. Psychiatry* 13 (2), 27.
- 55.- Heron, M., Grutters, J.C., Van Moorsel, C.H.M., et.al. 2009. Variation in IL7R predisposes to sarcoid inflammation. *Genes and immunity* 10. pp 647-653.
- 56.- Liu, H., Huang, J., Dou, M. et al. 2017. Variants in the IL7RA gene confer susceptibility to multiple sclerosis in Caucasians: evidence based on 9734 cases and 10436 controls. *Scientific reports*.
- 57.- Min Sung Kim MS., Nak Gyun Chung MD., Myung Shin Kim MD., Nam Jin Yoo MD., Sug Hyung Lee MD. 2012. Somatic mutation of IL7R exon 6 in acute leukemias and solid cancers. Elsevier.
- 58.- Franco Brochado, M.J., Chociay Gatti, M.F., Zago, A.M., Roselino, A.M. 2016. Association of the solute carrier family 11 member 1 gene polymorphisms with susceptibility to leprosy in a Brazilian sample. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 111(2): 101-105.
- 59.- Fritsche G, Nairz M, Werner ER, Barton HC, Weiss G. 2008. Nramp1- functionality increases iNOS expression via repression of IL-10 formation. *European Journal of Immunology*. 38(11):3060-3067