



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS VARIANTES EN EL NÚMERO DE COPIAS DE LOS  
GENES *TLR7*, *TLR8* Y *TLR9* Y SU PAPEL EN LA PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN-  
ALFA EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

**T E S I S**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

QFB HUMBERTO GARCÍA ORTIZ

DIRECTOR DE TESIS: LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO  
FACULTAD DE MEDICINA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F. JUNIO DE 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, S.S., en colaboración con el Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI; el Hospital General Centro Médico “La Raza”; el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”; el Instituto Nacional de Pediatría. La dirección de esta tesis estuvo a cargo la Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco.

**El trabajo realizado en esta tesis contó con el financiamiento  
del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología:  
SALUD-2004- 01-153 y del Fondo para el  
Fomento de la Investigación Médica  
(FOFOI): FP-20003/014.**

## **Dedicado a:**

- A dios por brindarme esta vida y por todas las bendiciones que me ha dado y por la oportunidad de llegar al final de esta etapa de mi vida.
- A mis dos pequeños ángeles Helena y Catalina. Nunca pensé que unos seres tan pequeños pudieran provocar un amor tan grande. Ustedes son la inspiración más grande y la fuerza que necesito para seguir cada día.
- A mi mamá, gracias por todo tu amor y tu cariño. Tu valor y entereza para enfrentar cada prueba que te ha puesto la vida han sido el mejor ejemplo que he tenido para saber que siempre se puede salir adelante.
- A mi papá, gracias por siempre impulsarnos, por enseñarnos que el límite somos nosotros mismos, donde te encuentres siempre te llevo en mis pensamientos y en mi corazón.
- A mis hermanos Marcela, Javier, Alfonso y Araceli, gracias por todo su apoyo y todos esos momentos buenos, malos y felices que hemos pasado como familia, por la convivencia y vivencias a su lado, sin duda alguna ha sido una gran aventura que aun tiene por lo mejor por venir.
- A Laura, gracias por siempre estar a mi lado, apoyarme en los momentos buenos y malos y por nunca perder la fe en mí.
- A todas las personas con las que he tenido la fortuna de coincidir en esta vida. Familia, amigos, profesores, cada uno de ustedes han contribuido a que sea la persona que soy el día de hoy.

## **Agradecimientos**

- A la Dra. Orozco, por la confianza otorgada para la realización de este proyecto, por todas sus enseñanzas, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por siempre impulsarme para lograr objetivos cada vez más altos.
- Al Dr. Vicente Baca, por todas sus enseñanzas, apoyo y el entusiasmo que siempre puso en mi proyecto.
- Al Dr. Rafael Velázquez, por el apoyo brindado durante la realización del presente proyecto.
- A los miembros de mi comité tutor: La Dra. Gloria Soldevila y el Dr. Eduardo García Zepeda. Muchas gracias por sus enseñanzas, sus atinadas observaciones, correcciones y recomendaciones para que este proyecto llegara a buen puerto.
- A los miembros de mi Jurado de examen, los Doctores: Yolanda López Vidal, Luis Llorente Peters, Rubén Burgos Vargas y Humberto Nicolini, por las observaciones y correcciones realizadas a mi tesis, sin duda alguna ayudaron a elevar la calidad de mi trabajo.
- A todos los miembros del laboratorio, presentes y pasados: Francisco, Mirna, Nadia, Miguel, Angélica Méndez, Cecilia, Angélica Martínez, Emilio, Federico, Elvia, Isabel, Guadalupe, Yolanda, Juan Luis. Gracias por siempre devolverme una sonrisa y hacer más amena mi estadía en el laboratorio.
- Finalmente a mi mamá, gracias por siempre apoyarme y por enseñarme que el mejor camino para lograr nuestras metas en la vida es con honradez, trabajo y dedicación.

## Índice

<b>Dedicatorias</b>	IV
<b>Agradecimientos</b>	V
<b>Índice de Tablas</b>	IX
<b>Índice de Figuras</b>	X
<b>Abreviaturas</b>	XII
<b>Resumen</b>	XIV
<b>Abstract</b>	XVI
<b>Introducción</b>	1
Enfermedades Autoinmunes	1
Lupus Eritematoso Sistémico	2
LES una enfermedad compleja	5
Vía de los TLRs/IFN	8
<b>Justificación</b>	11
<b>Hipótesis</b>	12
<b>Objetivo general</b>	12
<b>Objetivos particulares</b>	12
<b>Estrategia general</b>	13

<b>Pacientes y métodos</b>	14
Pacientes	14
Extracción de ADN Genómico	14
Cuantificación de CNVs por PCR en Tiempo Real	14
Estimación de CNVs por PCR semicuantitativo	15
Asociación de CNVs con LESp	17
Estudio de expresión	17
Estudio <i>in vitro</i> para determinar la actividad de IFN $\alpha$	17
Detección de Citocinas	18
<b>Resultados</b>	21
Identificación de CNVs por diferentes estrategias	21
Análisis de asociación donde se comparó del número relativo de Copias de <i>TLR7</i> , <i>TLR8</i> y <i>TLR9</i> entre casos y controles	25
Análisis de regresión logística del número absoluto de copias de <i>TLR7</i> , <i>TLR8</i> y <i>TLR9</i> entre casos y controles	28
Comparación del número de copias los genes <i>TLR7</i> y <i>TLR8</i> entre pacientes pediátricos con LES, controles mestizos e indígenas mexicanos sanos.	31

Análisis de expresión	33
Correlación entre el número de copias de <i>TLR7</i> , <i>TLR8</i> y <i>TLR9</i> y la actividad de IFN $\alpha$	36
Evaluación de los niveles de citocinas medidas en suero por CBA y su correlación con las CNVs de los genes <i>TLR7</i> , <i>TLR8</i> y <i>TLR9</i>	39
<b>Discusión</b>	42
<b>Conclusiones</b>	47
<b>Bibliografía</b>	48
<b>Artículo</b>	60

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b>	Actualización de 1997 de los Criterios para el diagnóstico de LES de acuerdo al Colegio Americano de Reumatología	4
<b>Tabla 2</b>	Genes asociados a la susceptibilidad a LES de inicio en la infancia en población mexicana identificados por nuestro grupo.	7
<b>Tabla 3</b>	Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de CNVs en los genes <i>TLR7</i> , <i>TLR8</i> y <i>TLR9</i>	16
<b>Tabla 4</b>	Riesgo estimando que confieren CNVs de <i>TLR7</i> y <i>TLR8</i> para el desarrollo de LES en población mestiza Mexicana	30

## Índice de figuras

Figura 1	Correlación entre el número de copias de ajustadas por dos controles endógenos <i>TBP</i> y <i>HPRT1</i>	22
Figura 2	Correlación entre el número de copias de calculadas con dos pares de oligonucleótidos separados por más de 1.8 Kb	23
Figura 3	Determinación del número de copias de <i>TLR7</i> por densitometría.	24
Figura 4	Estudio de asociación entre el número de copias de los genes <i>TLR7</i> , <i>TLR8</i> y <i>TLR9</i> y el riesgo a desarrollar LES	26
Figura 5	Estudio de asociación del número de copias de los genes <i>TLR7</i> y <i>TLR8</i> estratificado por género femenino	27
Figura 6	Comparación de las frecuencias de CNVs de los genes <i>TLR7</i> , <i>TLR8</i> y <i>TLR9</i> entre distintas poblaciones	32
Figura 7	Correlación entre CNVs de los TLRs y sus niveles de expresión	34
Figura 8	Correlación entre los niveles de expresión de los TLRs y los niveles de expresión de IFN $\alpha$	35
Figura 9	Correlación entre los niveles de expresión de IFN $\alpha$ y su actividad medida en células Wish	37

Figura 10	Correlación entre los niveles de expresión de los TLRs y la actividad de IFN $\alpha$ medida en células Wish	38
Figura 11	Comparación de los niveles de IFN $\alpha$ entre pacientes con LES y controles sanos	40
Figura 12	Correlación entre el número de copias de los genes <i>TLR7</i> , <i>TLR8</i> y <i>TLR9</i> con el IFN score.	41

## Abreviaturas

EAs	Enfermedades autoinmunes
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
EM	Esclerosis múltiple
TH	Tiroiditis de Hashimoto
AR	Artritis reumatoide
LES	Lupus eritematoso sistémico
GWAS	Estudios de asociación amplios del genoma
HLA	Complejo principal de histocompatibilidad
ACR	Colegio americano de reumatología
LESp	LES pediátrico
LESa	LES de inicio en la etapa adulta
TLRs/IFN	Vía del interferón tipo I a través de la señalización por los receptores Toll-like
IFN $\alpha$	Interferón alfa
IFN $\beta$	Interferón beta
IFN $\gamma$	Interferón gamma
TLRs	receptores tipo Toll
PBMCs	células mononucleares de sangre periférica

CNVs Variaciones en el número de copias

CBA Cytometric Bead Array

## Resumen

Las enfermedades autoinmunes son un conjunto de entidades que resultan de la pérdida de tolerancia inmunológica hacia antígenos propios. El prototipo de estas enfermedades es el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), que afecta principalmente a mujeres en un radio de 9 mujeres por cada varón afectado. Entre el 15 y 17% de los casos de LES se presentan en la edad pediátrica (LESp) y aunque los signos y síntomas son similares en ambos grupos, en los niños la enfermedad se presenta con mayor gravedad y tiene un curso clínico más agresivo. Otra característica que exhiben los pacientes con LES es la elevada producción de interferones tipo 1 (IFN) que se han asociado a formas graves de la enfermedad. La etiopatogénesis de LES no es clara, sin embargo; se ha descrito que el componente genético juega un papel crucial en su desarrollo. A la fecha se han identificado más de 30 loci de susceptibilidad a LES ubicados en genes de la respuesta inmune, varios de estos loci se encuentran en genes que codifican para moléculas de la vía de señalización de los receptores toll-like (TLRs) e IFN (TLRs/IFN). Un estudio previo de nuestro grupo mostró que varios polimorfismos en genes en la vía de TLRs/IFN se encuentran asociados al desarrollo de LES en nuestra población y que algunos de estos genes como el factor regulador del IFN 5 (*IRF5*) tiene un mayor impacto en población mexicana en comparación con otras poblaciones.

Dentro de los principales inductores de esta vía se encuentran los TLRs, dentro de los que destacan *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* por su papel en el reconocimiento de ácidos nucleicos. Estudios en modelos murinos han resaltado la importancia de la dosis génica de estos receptores en el desarrollo de procesos autoinmunes. Una de las formas en que la dosis génica puede estar alterada en humanos es por medio de los polimorfismos llamados variaciones en el número de copias (CNVs), que se piensa son una de las principales fuentes de variación genética que más contribuyen a la variabilidad en el fenotipo

En el presente trabajo se investigó si existen CNVs en los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* y su posible relación con la susceptibilidad a LES y la inducción de  $IFN\alpha$ .

Los resultados de nuestro estudio de casos y controles muestran que *TLR7* y *TLR8* genes ligados al cromosoma X; son factores de riesgo para el desarrollo de LESp en nuestra población ( $P = 0.0019$  y  $0.0065$  respectivamente). Más aun que las CNVs en estos genes correlacionan con la expresión de ellos mismos y con la expresión de  $IFN\alpha$ . También demuestran que existe correlación entre los niveles de expresión de *TLR7* y *TLR8* con la actividad de  $IFN\alpha$  medida en células Wish, con el IFN score (promedio de la cantidad de citocinas inducibles por IFN presentes en suero de pacientes con LES) y con el mismo  $IFN\alpha$  medido por el ensayo de CBA.

Estos datos muestran claramente que la dosis génica de *TLR7* y *TLR8* confieren susceptibilidad a LESp en población mexicana. Aportando evidencia de la importancia de la dosis de genes ligados al cromosoma X en la susceptibilidad a LES. Además de sugerir que el mecanismo por el cual participan estos genes en la etiopatogénesis de LESp es través de la inducción del  $IFN\alpha$ .

## Abstract

Autoimmune diseases are a group of entities that result from the loss of immunological tolerance to self-antigens. The prototype of these diseases is Systemic Lupus Erythematosus (SLE), which primarily affects women within a female/male ratio of 9:1. Between 15 and 17% of SLE cases occur in children (pSLE) and although the signs and symptoms are similar in both groups, in children the disease has a more aggressive clinical course. Another key characteristic of SLE patients is the higher production of type 1 interferon (IFNs), which has been associated with severe forms of the disease. Although the pathogenesis of SLE is poorly understood, the genetic component plays a crucial role in its development. To date more than 30 SLE genetic susceptibility loci located in immune related genes had been identified, several of these loci are within genes coding for molecules involved in the Toll-like receptors (TLRs) and IFN (TLRs / IFN) signaling pathway. A previous study by our group showed that several polymorphisms in genes involved in this pathway such as IFN regulatory factor 5 (IRF5) are associated with the development of SLE in our population and showed a greater effect on Mexican population compared with other populations.

Between the main inductors of this pathway are the TLRs, notably within TLR7, TLR8 and TLR9 due by its role in the recognition of nucleic acids. Studies in murine models have highlighted the importance of gene dosage of these receptors in the development of autoimmune processes. One ways in that gene dosage can be altered in humans is through polymorphisms called in copy number variants (CNVs), which are one of the main sources of genetic variation and have a mayor contribution on the phenotype diversity.

In this study we investigated the presence of CNVs in *TLR7*, *TLR8* and *TLR9* gene and its possible relation with the susceptibility to SLE and the induction  $IFN\alpha$ .

The results of our case-control study of showed that both *TLR7* and *TLR8* a X-linked genes; are risk factors for developing pSLE in our population (P = 0.0019 and 0.0065 respectively). Moreover the CNVs in these genes correlate with their own expression

and IFN $\alpha$  expression. Also we showed a correlation between the expression levels of TLR7 and TLR8 with the IFN $\alpha$  activity measured in Wish cells, the IFN score and with the same IFN $\alpha$  measured by CBA assay.

These data clearly show that *TLR7* and *TLR8* gene dosage are an important genetic risk factor that confers susceptibility to pSLE in Mexican population. Providing evidence of the importance of the dosage of X-linked genes in SLE susceptibility and suggest that the mechanism by which these genes are involved in the pSLE etiopathogenesis is through the induction of IFN $\alpha$ .

## Introducción

### Enfermedades Autoinmunes

Las enfermedades autoinmunes (EAs) comprenden un grupo de desórdenes inflamatorios crónicos caracterizados por una pérdida de la tolerancia inmunológica hacia lo propio. Estos padecimientos se presentan en cerca del 5-10% de la población general y tienen una prevalencia de 90 casos por cada 100,000 individuos, de los cuales el 85% son mujeres [1].

Las EAs se caracterizan por una respuesta autoinmune celular o humoral que conllevan a la producción de autoanticuerpos y pueden ser órgano-específicas o sistémicas. Las EAs órgano específicas afectan un órgano o sistema específico, o aparecen como un daño histopatológico localizado; ejemplos de estas enfermedades son diabetes mellitus tipo 1 (DM1), esclerosis múltiple (EM), tiroiditis de Hashimoto (TH), enfermedad de Grave y enfermedad de Crohn, entre otras. Por el contrario las EAs sistémicas afectan a diversos órganos y sistemas, por ejemplo la artritis reumatoide (AR), granulomatosis de Wegener, psoriasis y el lupus eritematoso sistémico (LES) Estas enfermedades crónicas, se caracterizan por periodos alternantes de remisiones parciales y exacerbaciones de la enfermedad con una expresividad clínica muy variable. Independientemente de la heterogeneidad en la presentación clínica y los órganos afectados, todas ellas tienden a compartir mecanismos fisiopatológicos básicos [2].

Aunque la etiología de las EAs no se conoce con certeza, la agregación familiar y los estudios en gemelos han documentado su etiología compleja y la importancia del componente genético en su desarrollo. Actualmente, nuestra capacidad para dilucidar la base genética de la enfermedad continúa evolucionando gracias a los avances tecnológicos y a la capacidad de reunir grandes colecciones de muestras de pacientes, como los estudios de asociación amplios del genoma (GWAS, del inglés: Genome Wide Association Study) que han permitido identificar más de un centenar de genes asociados con el riesgo de padecer EAs. Así, se han identificado numerosas regiones cromosómicas implicadas en la etiología de varias EAs, como la región 1p13 que se

asocia con predisposición genética al desarrollo de la AR, el LES y la enfermedad de Crohn. Por el momento, el factor genético que mejor se ha caracterizado como marcador común de autoinmunidad son los genes del complejo principal de histocompatibilidad (HLA). Desde hace años se ha descrito que diversos alelos HLA-DR o HLA-DQ se asocian con susceptibilidad a numerosas EAs como AR, DM1 y LES [3]. Además, algunos estudios han mostrado la existencia de perfiles de expresión génica alterados muy similares para diversas enfermedades autoinmunes. Todos estos datos apoyan la hipótesis de una base etiopatogénica común compartida entre diversas EAs [4, 5] hecho, estos hallazgos podría explicar porque es común encontrar un alto grado de agregación familiar de estas enfermedades con más de un miembro afectado en la misma familia, tanto con una misma o con diferentes EAs. [6]

### **Lupus Eritematoso Sistémico**

El LES es el prototipo de las EAs y presenta una prevalencia de 1 por cada 2,000 nacidos vivos [7]. Esta entidad se presenta en relación de 9 mujeres por cada hombre. La prevalencia de esta enfermedad varía entre los diferentes grupos étnicos, presentándose entre 40 casos por cada 100,000 individuos en el norte de Europa y 200 casos por cada 100,000 individuos en personas de raza negra [8]. La producción de autoanticuerpos en LES está dirigida contra diversos componentes celulares, especialmente antígenos nucleares como nucleosomas (ADN de doble cadena e histonas), “spliceosomas” (ribonucleoproteínas como las Smith Sm y U1), ribonucleoproteínas citoplasmáticas (Ro/SSA, La/SSB) y fosfolípidos de membrana (cardiolipina). El daño histopatológico y el proceso inflamatorio sistémico característico de LES es causado por la formación y acumulación de complejos autoinmunes en diferentes órganos y tejidos, que a su vez contribuyen a la variabilidad en las manifestaciones clínicas de la enfermedad [9].

La presentación clínica del lupus es bastante heterogénea y el diagnóstico se realiza cuando un paciente cumple con al menos 4 de los 11 criterios establecidos por el colegio americano de reumatología (ACR) [10]. Estos incluyen desde manifestaciones dermatológicas como eritema malar, artritis o hasta afecciones severas como nefritis y

psicosis, incluyendo hallazgos inmunológicos y de laboratorio (Tabla 1). De hecho, la presentación clínica de la enfermedad en términos de síntomas y gravedad puede variar de manera considerable entre pacientes e incluso en el mismo paciente a través del tiempo.

Se estima que entre el 15-20% de los casos de LES inicia antes de 16 años de edad, el cuál en la mayoría de los estudios se define como LES pediátrico (LESp) [11-18]. Existen pocos estudios que comparan directamente el LESp con el LES de inicio en la etapa adulta (LESa) y aunque los síntomas son similares, el LESp tiene una forma de presentación y un curso clínico más grave que el LESa, con una mayor frecuencia de ciertas manifestaciones clínicas como nefritis y afectación a los sistemas nervioso y hematológico.[12-13, 17-23]. Por lo tanto, es probable que en la población infantil el componente genético de susceptibilidad sea mayor que en el adulto y posiblemente exista una relación entre el número de alelos implicados con la edad de inicio, la prevalencia de ciertas manifestaciones clínicas y la gravedad del padecimiento [24]. En apoyo a esto, se ha estimado que los antecedentes familiares del LES son 5 veces más frecuentes en niños (25%) que en adultos (5%) [24].

Tabla 1.- Actualización de 1997 de los Criterios para el diagnóstico de LES de acuerdo al Colegio Americano de Reumatología

Criterio	Definición
Eritema Malar	Eritema fijo plano o elevado, que se localiza sobre las prominencias malares, sin afectación de los pliegues nasolabiales
Eritema Discoide	Erupción discoide, placas eritematosas elevadas con descamación queratótica adherente
Fotosensibilidad	Erupción cutánea provocada por una reacción inusual de los rayos solares
Ulceras Orales	ulceración oral o nasofaríngea usualmente indolora
Serositis	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Pleuritis.- Dolor pleural y/o frote auricular diagnosticado por un médico y/o derrame pleural</li> <li>b) Pericarditis.- Documentada por electrocardiograma o frote y/o evidencia de derrame pericardial</li> </ul>
Artritis no erosiva	Que involucre dos a más articulaciones periféricas, caracterizada por dolor, hinchazón o derrame
Glomerulonefritis	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Proteinuria persistente &gt; 0.5 g por día o &gt; 3+ si no se cuantifico</li> <li>b) Cilindros celulares pudiendo ser células rojas, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos</li> </ul>
Desórdenes Neurológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Convulsiones: en ausencia de fármacos o trastornos metabólicos conocidos. ej. Uremia, cetoacidosis o desbalance electrolítico</li> <li>b) Psicosis: en ausencia de fármacos o trastornos metabólicos conocidos. ej. Uremia, cetoacidosis o desbalance electrolítico</li> </ul>
Desórdenes Hematológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Anemia Hemolítica con reticulocitosis</li> <li>b) Leucopenia &lt; 4000/mm<sup>3</sup> en más de 2 ocasiones</li> <li>c) Linfopenia &lt; 1,500/mm<sup>3</sup> en más de 2 ocasiones</li> <li>d) Trombocitopenia &lt; 100,000/mm<sup>3</sup> en ausencia de fármacos inductores</li> </ul>
Desórdenes Inmunológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Anticuerpos Anti-ADN: Niveles anormales de anticuerpos contra ADN propio</li> <li>b) Anticuerpos Anti-Sm: presencia de Ac contra el antígeno nuclear Smith</li> <li>c) Hallazgos positivos de Ac antifosfolípidos en: <ul style="list-style-type: none"> <li>1) Niveles séricos anormales de Ac anticardiolipina tipo IgG o IgM</li> <li>2) Prueba positiva para anticoagulante lúpico (método estándar)</li> <li>3) Falso positivo para <i>Treponema pallidum</i> en los últimos 6 meses</li> </ul> </li> </ul>
Presencia de Autoanticuerpos Antinucleares	Títulos anormales de anticuerpos antinucleares medidos por inmunofluorescencia o algún ensayo equivalente

## LES una Enfermedad Compleja

La gravedad, incidencia y heterogeneidad clínica del LES varían de acuerdo con el grupo étnico y el género, presentándose con una prevalencia mayor en grupos étnicos no europeos [25-27]. Estas observaciones, junto con la prominente agregación familiar ( $\lambda_s = 8-29$ ), la elevada heredabilidad (>66 %) y la alta concordancia entre gemelos monocigotos (20-40%) en comparación con gemelos dicigotos (2-5%), han documentado que el componente genético juega un papel crucial en el desarrollo del LES [28, 29].

Por otro lado, la variabilidad genética como causa de variación en la expresión del LES se sustenta en reportes que muestran que los pacientes afro e hispano-americanos tienen la mayor incidencia de nefritis y problemas hematológicos con una evolución más grave y una mayor mortalidad [30-32]. Asimismo, en la población hispana/mestiza existe además una edad de aparición más temprana [33]. Por otra parte, recientemente se encontró una correlación significativa entre la proporción del componente amerindio y el incremento en el número de alelos de riesgo para LES [34]. En contraste, se ha demostrado que los pacientes con LESp que tienen al menos un abuelo con ancestría europea, tienen un riesgo menor de desarrollar nefritis lúpica grave que los pacientes pediátricos hispanos, asiáticos y afro-americanos sin ancestría europea, independientemente del nivel socioeconómico [35].

En LES ha habido un gran avance en el estudio de los factores genéticos asociados a su desarrollo. De hecho, mediante estrategias de gen candidato o a través de escaneos por GWAS se han logrado identificar más de 30 genes consistentemente replicados. La gran mayoría de estos genes se agrupan en tres vías de señalización: la del interferón tipo I a través de la señalización por los receptores Toll-like (TLRs/IFN), la de depuración de complejos inmunes y la de respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, aún no se han logrado identificar muchos de los factores genéticos involucrados en el padecimiento y particularmente en poblaciones de origen amerindio, como la nuestra [34].

En un estudio previo realizado por nuestro grupo, se lograron identificar diversas variantes de susceptibilidad para el desarrollo del LESp en 11 genes del sistema inmune; algunos de ellos se encontraron asociados a ciertas manifestaciones clínicas como nefropatía lúpica (Tabla 2). Por otra parte, ciertos loci mostraron un gran impacto en la población mexicana, indicando que existen diferencias étnicas importantes con otras poblaciones. Un ejemplo de esto es el gen que codifica para el Factor Regulador del Interferon 5 (*IRF5*), el cual codifica para un factor de transcripción encargado de regular la transcripción de interferones tipo 1 y citocinas pro-inflamatorias. En este gen se encontró un haplotipo (TCA) de riesgo para el desarrollo de LES con una frecuencia de homocigotos significativamente más elevada que en la europea (19.9% vs 3.3%) y un OR de los más altos reportados para esta entidad (10.46) [36]. La elevada frecuencia de este haplotipo y el alto riesgo que confiere para desarrollar lupus en la población mexicana, hace de éste un marcador potencial para la detección de individuos altamente susceptibles. Más aún polimorfismos en otros genes involucrados la vía de los TLRs/IFN1 como *ITGAM*, *IRAK1* y *STAT1-STAT4*, también se encontraron asociados al riesgo a desarrollar LESp en nuestra población. Estos hallazgos muestran la importancia de esta vía en el desarrollo del LES en población mexicana y sugieren la posible participación de otros genes de la inmunidad innata en la etiopatogenia de esta entidad.

Tabla 2.- Genes asociados a la susceptibilidad a LES dé inicio en la infancia en población mexicana identificados por nuestro grupo.

Gen	SNPs analizados	SNP asociado	Alelo Asociado	OR (95% IC)	Referencia
<i>PTPN22</i>	1	1858C/T	1858T	3.19 (1.35-7.52)	Baca V, et al. <i>Genes and Immunity</i> 2006; 7:693-96.
<i>PDCD1</i>	3	PD1.3G/A	PD1.3 <sup>a</sup>	2.73 (1.35-5.56)	Velázquez-Cruz R, et al. <i>Eur J Hum Genet</i> 2007; 15:336-41.
<i>IRF5</i>	3	rs2004640 rs2070197 rs10954213	T C A	10.46 (7.71– 13.21)	Linga-Reddy P, et al. <i>Hum Genet</i> 2007; 121:721-27.
<i>STAT1- STAT4</i>	5	rs1467199	G	1.46 (1.09-1.97)	Abelson AK, et al. <i>Ann Rheum Dis</i> 2009; 68:1746-53.
<i>ITGAM</i>	1	rs1143679	A	1.83 (1.69-1.98)	Han S, et al. <i>Hum Mol Genet</i> 2009; 18:1171-80.
<i>TNF- alfa</i>	2	-308G/A	-308A	2.77 (1.96-3.93)	Jiménez-Morales S, et al. <i>Hum Immunol</i> 2009; 70:251-56.
<i>IRAK1- MECP2</i>	14	LD	LD	1.38 (1.09-1.75)	Manuscrito en Preparación
<i>NRF2</i>	2	-653 G/A	A	1.81 (1.04-3.12)	Córdova EJ. et al. <i>Lupus</i> . 2010.
<i>HMOX1</i>	Repetido (GT) <sub>n</sub>	>25 Copias	-	1.47 (1.14-1.89)	Córdova EJ. et al. <i>Clin Exp Rheumatol</i> . 2012.

## Vía de los TLRs/IFN

Datos clínicos y experimentales han documentado que niveles elevados de interferón alfa (IFN $\alpha$ ) en el suero de pacientes con LES, correlacionan directamente con la gravedad de la enfermedad [37-41]. En el mismo sentido, en años recientes también se demostró la sobreexpresión de genes inducibles por el IFN $\alpha$  (firma del IFN) que correlacionan con varias manifestaciones clínicas de LES, como glomerulonefritis, afección del sistema nervioso central y la presencia de desórdenes hematológicos, lo que sugiere que la firma del IFN podría ser un biomarcador para las formas más graves de la enfermedad [42-44].

Entre los principales inductores de la vía del IFN se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs), dentro de los cuales TLR7, TLR8 y TLR9 podrían tener relevancia en el desarrollo de LES, ya que estos pueden ser activados por ARN y ADN, dos de las principales moléculas que pueden contribuir a la ruptura de la tolerancia periférica contra antígenos propios, producción de autoanticuerpos y el consecuente desarrollo de autoinmunidad [45].

Lo anterior se ve reforzado por estudios *in vivo* donde se utilizan modelos murinos de LES. Un hecho interesante es que ratones machos BXSB obtenidos de la cruce entre una hembra C57BL/6 (B6) y un macho SB/Le desarrollan un fenotipo autoinmune más grave que el observado en las hembras, mientras que los machos obtenidos de la cruce recíproca (SB/Le hembra y B6 macho) desarrollan una forma leve de lupus murino. Por esta observación se llegó a concluir que la exacerbación de la autoinmunidad en los machos, había sido por un locus ligado al cromosoma Y (locus Yaa), provisto por el macho SB/Le [46]. Sin embargo, posteriormente se determinó que este locus es el resultado de una translocación de aproximadamente 4 Mb del cromosoma X al Y, que da como resultado la duplicación de al menos 16 genes, donde el candidato más importante dentro de este locus debido a su función es *tlr7*. De hecho, el fenotipo autoinmune más grave en estos ratones se atribuye al incremento en la dosis y expresión de este gen, que conlleva a un incremento en la transducción de señales de la vía del interferón tipo 1 [47, 48]. En apoyo a esto, estudios recientes utilizando el mismo modelo animal demuestran que la delección de la copia extra de *tlr7*,

reverte la mayor parte del fenotipo autoinmune atribuible a la mutación *Yaa* [49, 50]. Otro de los genes candidatos importantes localizados dentro del locus *Yaa* es *tlr8*, que aunque en ratones se postula no es funcional, es un excelente gen candidato para el desarrollo de LES en humanos.

En el mismo sentido, Deane y cols. mediante la generación de varias cepas de ratones transgénicos con diferente número de copias del gen *tlr7*, demuestran que los niveles de expresión de *tlr7* correlacionan con la gravedad del fenotipo autoinmune, así como con varias anormalidades del sistema inmune en comparación con la cepa silvestre (B6) [51]. Estos estudios sugieren que el incremento en el número de copias de genes involucrados en la respuesta inmune exacerba la autoinmunidad y por consecuencia, este fenómeno podría tener un papel importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes a través de la alteración de la dosis génica.

Por otro lado, estudios en modelos “Knock out” para el gen *tlr9*, arrojan resultados muy controversiales, ya que parece que este gen puede tener tanto efecto inmunoestimulador [52] como regulador [53-55], sugiriendo que el efecto de *tlr9* es dependiente del fondo genético de la cepa en el cual se realice el estudio. En humanos, no existe evidencia de asociación significativa de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de *TLR9* y el desarrollo de LES [56-58]; sin embargo, estudios de expresión han revelado que al igual que *TLR7*, estos receptores se encuentran sobreexpresado en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con LES [59, 60]. Aún más, la sobre-expresión de *TLR7* y *TLR9* correlaciona con la sobre-expresión de *IFN $\alpha$* , frecuentemente elevado en el suero de pacientes con LES activo, lo que sugiere que estos receptores podrían jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad [60].

Estas observaciones podrían apoyar la posibilidad de que la sobreexpresión de *TLR9* sea consecuencia de otro tipo de polimorfismos como las variaciones en el número de copias (CNVs, del inglés: *copy number variants*), se observó que este gen se encuentra en una región del cromosoma 3 (3p21.3) que presenta una ganancia de 3 copias en la población en general [61]. Los polimorfismos CNVs son el principal tipo de diversidad genética entre los humanos y se definen como duplicaciones o deleciones de un

segmento de ADN de 1Kb o más, que se presentan con una frecuencia mayor al 1% en la población. Por otra parte, parece ser que entre el 12 y el 20% del genoma humano contiene este tipo de polimorfismos [62, 63].

En el mismo sentido, estudios recientes han documentado la participación de la alteración de la dosis génica a través de los CNVs, en la etiopatogenia de algunas enfermedades [64-69]. Interesantemente, reportes recientes documentaron que la presencia de este tipo de polimorfismos en los genes *FCGR3B*, *C4* y *CCL3L1* se asocian con el desarrollo de LES en humanos [70-73].

## Justificación

La identificación de los genes involucrados en la predisposición a las EAs contribuirá al entendimiento de su fisiopatología, al desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico, prevención/pronóstico y a la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

En la identificación de factores genéticos asociados con enfermedades complejas, una de las estrategias más utilizadas es la realización de estudios de asociación de casos y controles de genes candidatos, que se basan en la comparación de marcadores genéticos de riesgo entre individuos afectados y controles sanos seleccionados de la misma población. Uno de los pasos fundamentales en este tipo de estudios es la selección del gen candidato para su análisis. En el caso de las enfermedades autoinmunes, los genes implicados en los mecanismos moleculares y celulares alterados en la autoinmunidad o los relacionados con el desequilibrio entre mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios son los mejores candidatos.

Por otro lado, existen grandes evidencias de que la vía de los TLRs/IFN tiene un papel crucial en el desarrollo de LES, lo que sugiere que variantes en genes que codifican para moléculas involucradas en esta vía, podrían jugar un papel importante en el desarrollo/etiopatogénesis de esta enfermedad. De estos posibles candidatos resaltan los receptores toll-like que se expresan en endosomas TLR7, TLR8 y TLR9, donde se ha documentado que alteración en su expresión o en la dosis génica de estos receptores altera la respuesta inmune y contribuye al desarrollo de la autoinmunidad. Una de las formas en la cual la dosis génica puede estar modificada en humanos es a través de los polimorfismos del tipo CNVs, los cuales han mostrado ser una de las principales fuentes de variación genética y de las que mayor impacto tienen en la diversidad fenotípica. Estudios recientes documentaron que la presencia de estos polimorfismos en genes de la respuesta inmune como *CCL5*, *FCGR3B* y *C4*, que además son asociados al desarrollo de LES en otras poblaciones. En el presente trabajo se determinó si existen CNVs en los genes TLR7, TLR8 y TLR9 y se evaluó su contribución en el desarrollo de LESp en población mexicana.

## **Hipótesis**

Si CNVs de los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* alteran la expresión del interferón-alfa, podrían tener un papel importante en la etiopatogénesis de LESp.

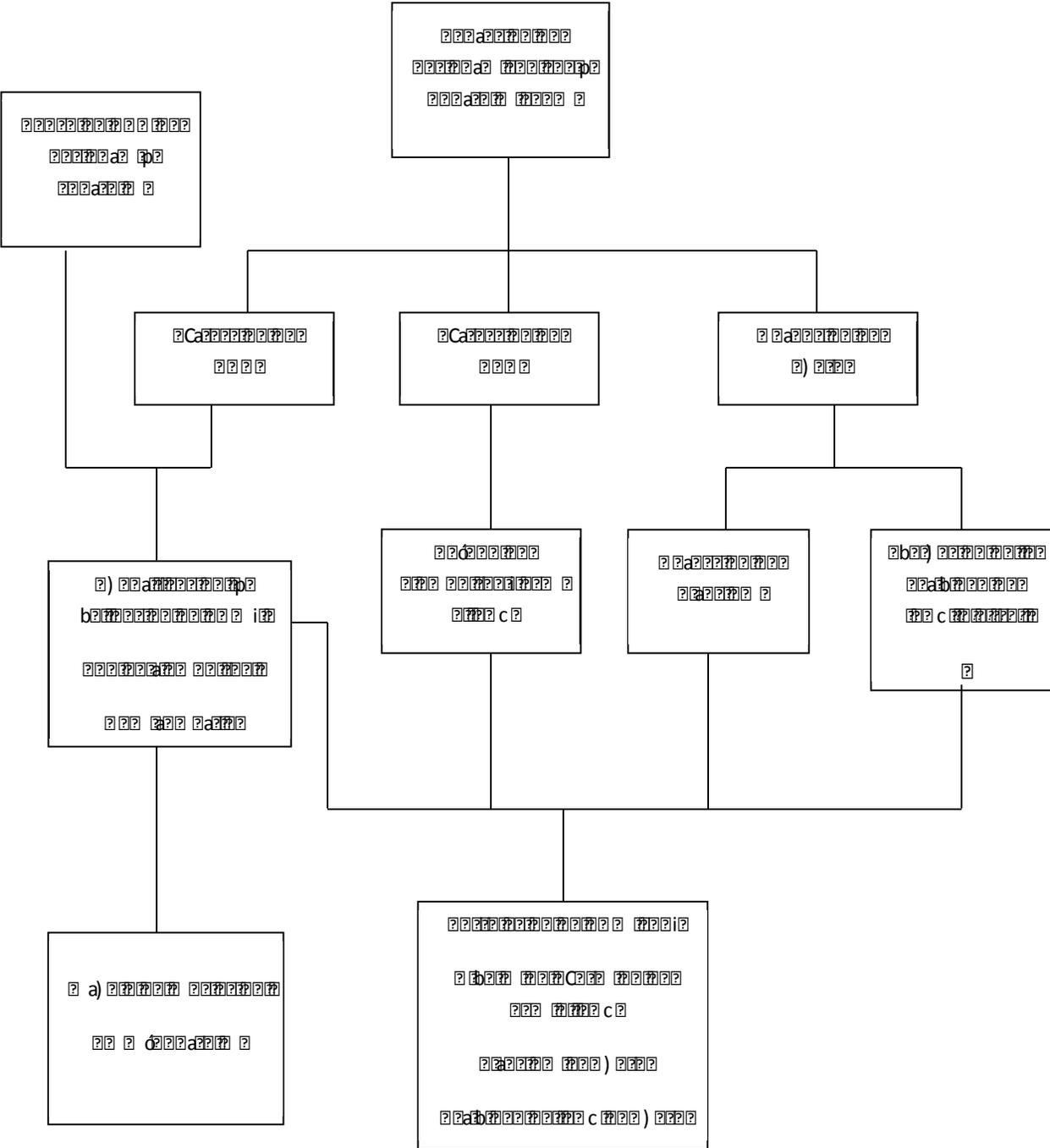
## **Objetivo general**

Determinar si polimorfismos en el número de copias de los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* contribuyen a la susceptibilidad para desarrollar LESp y conocer si estos polimorfismos influyen en la expresión del *IFN $\alpha$* .

## **Objetivos particulares**

- Determinar si CNVs de los genes *TLR7*, *8* y *9* se encuentran asociadas con la susceptibilidad a desarrollar LESp.
- Establecer si existe correlación del genotipo con la presencia de nefritis lúpica.
- Conocer si la presencia de CNVs en los genes *TLR7*, *8* y *9* influyen en sus niveles de expresión y en los niveles de expresión del *IFN $\alpha$*  y citocinas inducibles.

# Estrategia general



## **Pacientes y métodos**

### **Pacientes**

En este trabajo se incluyeron 328 pacientes con diagnóstico de LES antes de los 16 años de edad, de acuerdo con los criterios del ACR [10]. La proporción de mujeres fue de 82% (269) y de hombres 18% (59) hombres, con un promedio de edad al inicio de los síntomas de  $11.61 \pm 2.07$  años. Adicionalmente se incluyeron 403 individuos aparentemente sanos, sin antecedentes de enfermedades autoinmunes como grupo control, con una proporción de 85% (341) mujeres y 15% (62) hombres. Todos los pacientes y controles fueron captados previo consentimiento informado del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y del Instituto Nacional de Pediatría. De forma alternativa se incluyeron 200 mujeres indígenas mazahuas del estado de México como grupo de replica y para comprar la frecuencias de las CNVs estimadas en cada grupo.

### **Extracción de ADN Genómico**

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica utilizando el Kit de extracción Puregene de GENTRA. Alternativamente la extracción del ADN se llevó a cabo utilizando el Kit Maxikit de QIAGEN. La integridad del ADN se verificó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El ADN obtenido se cuantificó por espectrofotometría de UV.

### **Cuantificación de las CNVs por PCR en Tiempo Real**

La estimación de CNVs de los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* se llevó a cabo a partir de ADN genómico mediante PCR cuantitativo en tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen. Debido a que las CNVs se definen como duplicaciones o deleciones iguales o mayores a 1Kb, para cada gen se diseñó un par alternativo de oligonucleótidos separados por una distancia mínima de 1.5 Kb (tabla 3). Las diferencias en la concentración de las muestras se controlaron normalizando con dos genes "housekeeping" como controles endógenos, uno localizado en un autosoma (*TBP*; 6q27.1) y otro ligado al cromosoma X (*HPRT1*; Xq26.1). Las reacciones se

hicieron por triplicado para cada gen utilizando SYBR green como sistema de detección en un equipo de tiempo real ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 15 s y 72°C por 30 s.

Los productos de PCR se verificaron por curvas de disociación y en geles de agarosa. El cálculo de CNVs se realizó con base en los métodos de curva estándar y  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [74], utilizando como calibrador un control femenino donde previamente se observaron dos copias de *TLR7*, *TLR8* y *TLR9*.

Las curvas estándar se generaron a partir de diluciones seriadas 2:1 de ADN genómico de la muestra usada como calibrador (40-1.25 ng/μl). Sólo se utilizaron curvas donde el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ) fuera mayor o igual a 0.99.

La prueba de correlación de Spearman se utilizó para establecer la correlación entre el número de copias estimadas por PCR en tiempo real, utilizando los dos pares alternativos de oligonucleótidos y los dos controles endógenos

### **Estimación de CNVs por PCR semicuantitativo**

Para validar los datos obtenidos del tiempo real se realizó un PCR semicuantitativo, coamplificando en una reacción de PCR a *TLR7* y un gen endógeno (*TBP*). Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa a 90 Volts por 1 h y después se determinó la intensidad de las bandas de ambos productos utilizando el software KODAK Molecular Imaging Software V 4.0. (Kodak Molecular Imaging Systems). El cociente de la intensidad de la banda de *TLR7*-1 entre la de *TBP* se utilizó como una medida de la dosis génica de *TLR7*. De manera alternativa se utilizó la muestra de un paciente con síndrome de Klinefelter (47,XXY) como control positivo de número de copias de *TLR7* (2 copias). Para evaluar la reproducibilidad en la estimación de las CNVs de *TLR7* por PCR en tiempo real y PCR semicuantitativo se utilizó la prueba de correlación de Spearman.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de CNVs en los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9*

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Amplicon (bp)	Distancia (bp)
<i>TLR7</i>	TLR7-1	F-5'GGCTAGATGGTTTCCTAAAACCTCTG3'	228	1811
		R-5'GGTACACAGTTGCATCTGAAATCG3'		
<i>TLR7</i>	TLR7-2	F-5'TCAGCCACAACCAACTGACCAC3'	219	1811
		R-5'GCAACATCTTCAGATTGTTGAGGAC3'		
<i>TLR8</i>	TLR8-1	F-5'ACATAACTAAAGAGGGCATTTC AAG3'	233	2246
		R-5'AATGTATTTGATCTGGGTGTTGCTC3'		
<i>TLR8</i>	TLR8-2	F-5'ACCATGGTTATGTTGGCTGCCCTG3'	207	2246
		R-'GCTCTCTTCAAGGTGGTAGCGCAGC3'		
<i>TLR9</i>	TLR9-1	F-5'CGCCCTGCACCCGCTGTCTCT3'	249	2799
		R-5'AGGCTGGGCAGGTGGGCAAAGTC3'		
<i>TLR9</i>	TLR9-2	F-5'CGGCAAAGTGGGCGAGATGAGGAT3'	242	2799
		R-5'TGGGCCAGCACAAACAGCGTCTT3'		
<i>TBP</i>	TBP	F-5'GTGAGAAGATGGATGTTGAGTTGC3'	151	151
		R-5'CCAGATAGCAGCACGGTATGAG3'		
<i>HPRT1</i>	HPRT1	F-5'ATTCTTTGCTGACCTGCTGGATT3'	145	145
		R-5'ACCTACTGTTGCCACTAAAAGAA3'		

## **Asociación de CNVs con LESp**

Para establecer las diferencias en la distribución de CNVs de *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* entre casos y controles, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, Donde se utilizaron los valores obtenidos de la estimación de CNVs por PCR en tiempo real (número relativo de copias).

El OR a un intervalo de confianza al 95% se calculó con un modelo de regresión logística multivariado. Esto se realizó utilizando en número absoluto de copias de cada gen como variable predictiva y el sexo y la afección renal como covariables. Como categoría de referencia se utilizó la media del número de copias observadas en el grupo de controles femeninos y masculinos (para *TLR7* y *TLR8*, CNVs = 2 para mujeres y 1 para hombres).

### **Estudio de expresión**

Para establecer si la variación en el número de copias de los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* influyen tanto en sus niveles de expresión como en los del *IFN $\alpha$* , se cuantificaron los transcritos de estos genes por PCR en tiempo real en una muestra de 30 pacientes pediátricos con LES, donde se conocía el número de copias de los TLRs. El ARN se obtuvo de sangre total usando el Kit Paxgene Blood ARN (Preanalytix). La síntesis de ADNc se llevó a cabo usando el Kit TaqMan transcripción reversa (Applied Biosystems, Foster City, CA).

La cuantificación del RNAm de *TLR7*, *TLR8*, *TLR9* e *IFN $\alpha$*  se determinó de acuerdo al método descrito por Komatsuda utilizando como control endógeno al gen *GAPDH* [60]. La estimación de los niveles de expresión se realizó con el método comparativo de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [74].

### **Estudio in vitro para determinar la actividad de IFN $\alpha$**

Para evaluar si los polimorfismos asociados tienen una influencia en la inducción de la vía del *IFN $\alpha$* , se evaluó la capacidad de los componentes del plasma o suero para

causar la expresión de genes inducibles por IFN $\alpha$  en células blanco sensibles a esta citocina. Datos de la literatura indican que el IFN $\alpha$ , más que el IFN $\beta$  o el IFN $\gamma$ , se encuentra presente en las muestras de plasma y/o suero de pacientes con LES.

Los genes inducidos específicamente por IFN $\alpha$  y cuyo incremento en su expresión son indicadores de la actividad de dicho interferón son: el gen de resistencia a mixovirus 1 (MX1), el gen de la protein-quinasa activada por ARN de doble cadena (PKR) y el de la proteína con repetidos de tetracopéptidos inducible por IFN $\alpha$  1 (IFIT1) [75].

En este ensayo las células WISH (CCL-25; American Type Culture Collection) se estimularon con el suero o plasma de pacientes y controles con número de copias conocido de *TLR7*, *TLR8* y *TLR9*. Estas células se caracterizan por tener una alta sensibilidad al IFN $\alpha$ , lo que se traduce en la expresión de genes que son específicamente inducibles por esta citocina [75]. Para lograr esto, las células WISH se crecieron por triplicado en medio esencial mínimo y se estimularon con el suero o plasma de pacientes y controles sanos, como control positivo se utilizaron células estimuladas con IFN $\alpha$  recombinante y como control negativo se incluyeron células sin ningún tipo de estímulo. Los niveles de expresión de los genes se evaluaron por RT-PCR en tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen [75], y se normalizaron con un gen endógeno. Para evaluar la actividad de IFN $\alpha$ , se calculó la media de los niveles de expresión observada para cada gen inducido (*MX1*, *PKR* e *IFIT1*) en cultivos independientes por el suero de al menos 20 controles. La media obtenida de los controles se utilizó como referencia para medir la actividad de IFN $\alpha$ . Esta última se calculó con el promedio de las desviaciones estándar (SD) de los niveles de expresión de *MX1*, *PKR* e *IFIT1* en cada paciente con respecto a la media observada en controles [75].

### **Detección de Citocinas**

Una vez determinadas las CNVs y los niveles de expresión de los *TLRs*, se investigó como éstos polimorfismos afectan los niveles de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y del mismo IFN $\alpha$ .

Las proteínas ensayadas fueron citocinas con perfil pro-inflamatorio tipo Th1 como TNF $\alpha$ , IL-6 e IL12; quimiocinas inducibles por IFN $\alpha$ : IP-10, MCP-1 IL-8 y el mismo IFN $\alpha$ . Estas moléculas se eligieron debido a que han mostrado estar desreguladas en pacientes con LES y con base en su papel potencial en la etiopatogénesis de la enfermedad. [76-81]

La determinación de las citocinas se realizó mediante citometría de flujo con la técnica de CBA (Cytometric Bead Array). Esta técnica emplea una mezcla de partículas revestidas de anticuerpos para capturar sustancias solubles, lo que permite la determinación simultánea de varias citocinas a partir de una muestra de suero y/o plasma. La cuantificación se llevo cabo utilizando el kit Human Soluble Protein Master Buffer Kit (BD Biosciences) de acuerdo a las condiciones especificadas por el fabricante. La cantidad de fluorescencia emitida por estas partículas es directamente proporcional a la cantidad de proteínas presentes en el suero, La cantidad de analito presente en el suero se determino con el software FCAP array v1.0 (BD Biosciences).

Por otro lado, se calculó la concentración de IFN para cada muestra, éste se realizó tomando el promedio de la cantidad de quimiocinas inducibles por IFN (IL-8, IP-10, MCP-1) en cada muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$IFN\ score = \sum \frac{(Quim - PromQuim)}{SDQuim}$$

Donde el IFN score se define como la sumatoria de la expresión de cada quimiocina menos el promedio de la expresión de éstas en controles, dividido por la desviación estándar observada en controles. El uso de esta ecuación nos permite eliminar la variación dada en cada determinación debido a diferencias en la concentración de la muestra [43, 76, 79].

Para establecer la correlación entre las CNVs de *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* y la actividad de IFN $\alpha$ , así como con la cantidad de las citocinas y quimiocinas en suero (IFN score) ensayadas por CBA se uso por la prueba de correlación de Spearman.

## Resultados

### Identificación de CNVs por diferentes estrategias

La determinación de las CNVs de los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* por PCR en tiempo real fue altamente reproducible. La estimación del número relativo de copias de los TLRs mostró una correlación cercana al 100% tomando como referencia 2 controles endógenos (*TBP* y *HPRT1*) de manera independiente con un valor de  $r$  para *TLR7* de 0.979, para *TLR8* de 0.912 y para *TLR9* de 0.975 con una  $P$  en todos los casos  $< 0.0001$  (Fig. 1).

Así mismo, cuando se usaron dos pares de oligonucleótidos separados por una distancia mayor de 1.8 Kb para la estimación de CNVs por PCR en tiempo real, los resultados fueron altamente reproducibles para cada uno de los genes ensayados (*TLR7*  $r = 0.912$ ; *TLR8*  $r = 0.911$  y *TLR9*  $r = 0.949$ ;  $P$  en todos los casos  $< 0.0001$ ) (Fig. 2). Por ambas estrategias los resultados documentaron el mismo de número de copias.

Como método de validación del número de copias se utilizó el análisis por densitometría. La comparación de los resultados obtenidos por densitometría y por PCR en tiempo real, mostraron una correlación altamente significativa:  $r = 0.8522$ ,  $P < 0.0001$  (Fig. 3d). Tanto los perfiles de densitometría como de PCR en tiempo real mostraron la presencia de hasta 4 copias de *TLR7* tanto en pacientes como en controles (Fig. 3a y 3b). Lo anterior fue demostrado al estimar la relación entre la intensidad de las bandas de *TLR7* y compararlas con la intensidad del gen de referencia (Fig. 3c).

Debido a que tanto *TLR7* como *TLR8* se encuentran en posiciones aledañas dentro del cromosoma X (Xp22.3), se descartó que ambos genes se encuentren dentro de la misma CNV. Para esto se compararon las CNVs estimadas en de ambos genes con un modelo de regresión lineal. Los resultados de la regresión lineal sugieren que las CNVs en ambos genes son independientes y que por la tanto, *TLR7* y *TLR8* pueden estar ejerciendo efectos independientes ( $R^2 = 0.03$ ,  $P > 0.05$ ). Cabe resaltar que por primera vez se están reportando CNVs en el gen *TLR8*.

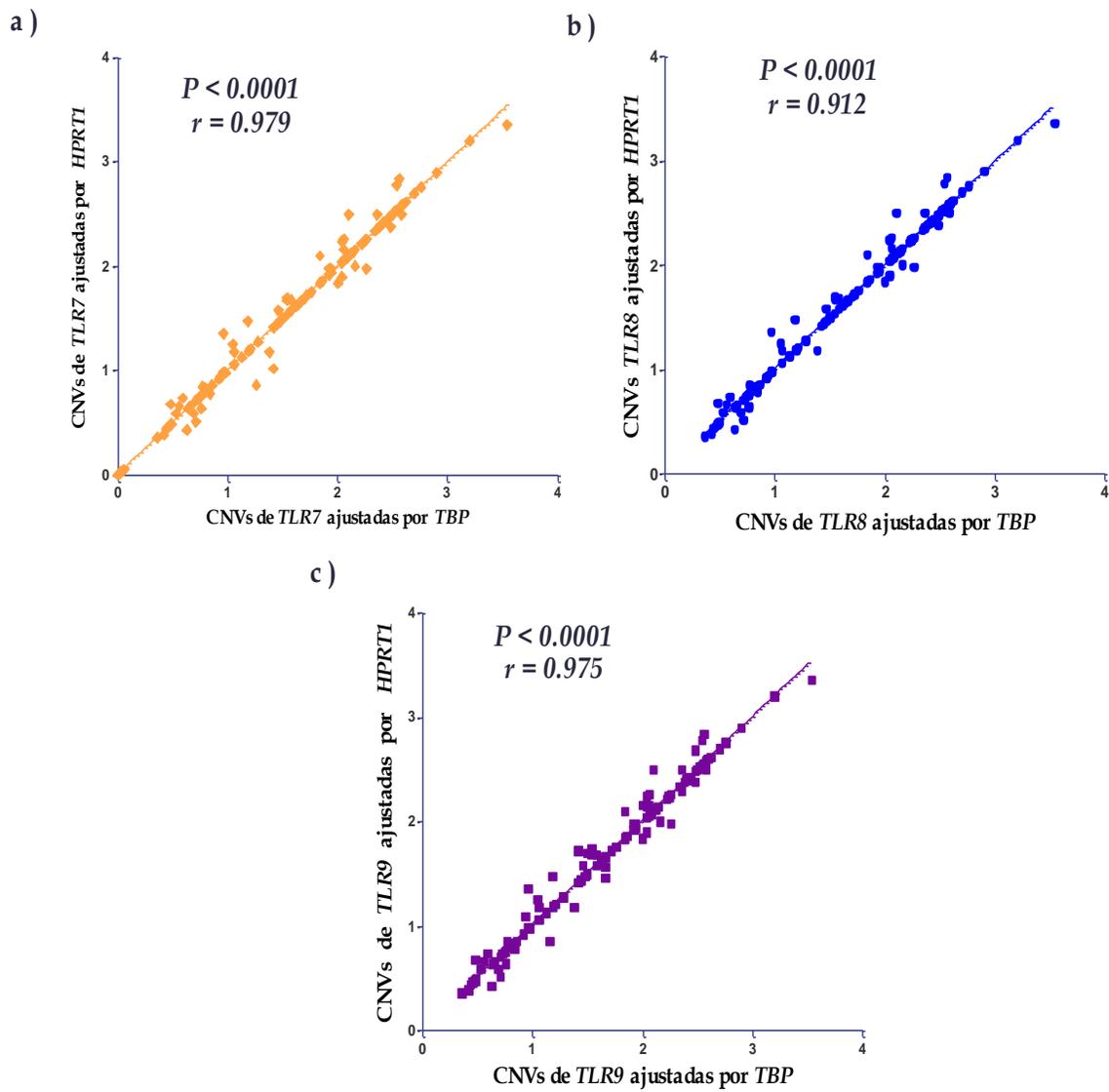


Figura 1.- Correlación entre el número de copias de ajustadas por dos controles endógenos *TBP* y *HPRT1*; a) TLR7, b) TLR8 y c) TLR9 Cada punto en la gráfica representa la estimación de CNVs para un individuo por diferentes metodologías.

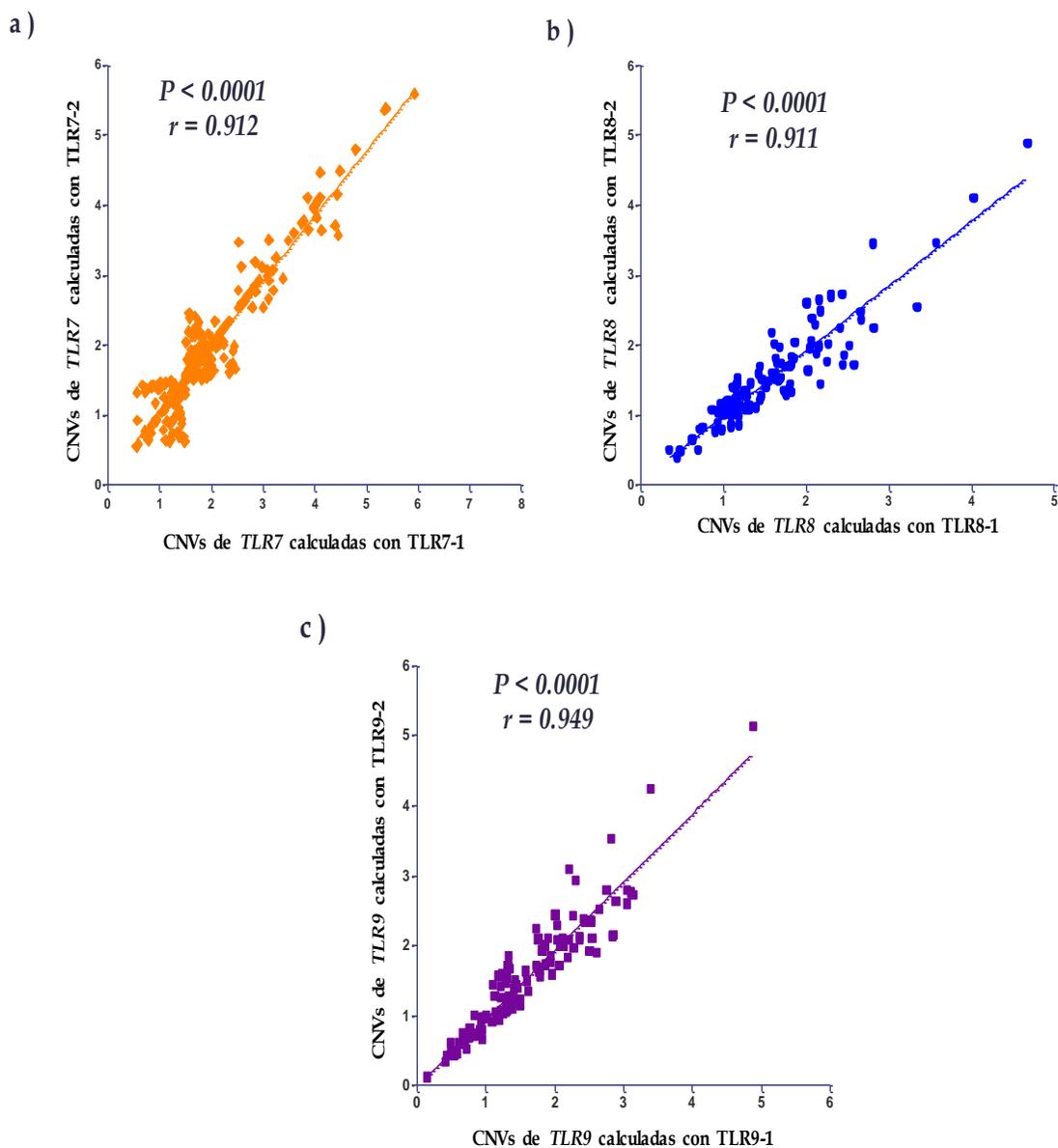


Figura 2.- Correlación entre el número de copias de calculadas con dos pares de oligonucleótidos separados por más de 1.8 Kb; **a)** TLR7, **b)** TLR8 y **c)** TLR9. Cada punto en la gráfica representa la estimación de CNVs para un individuo por diferentes metodologías.

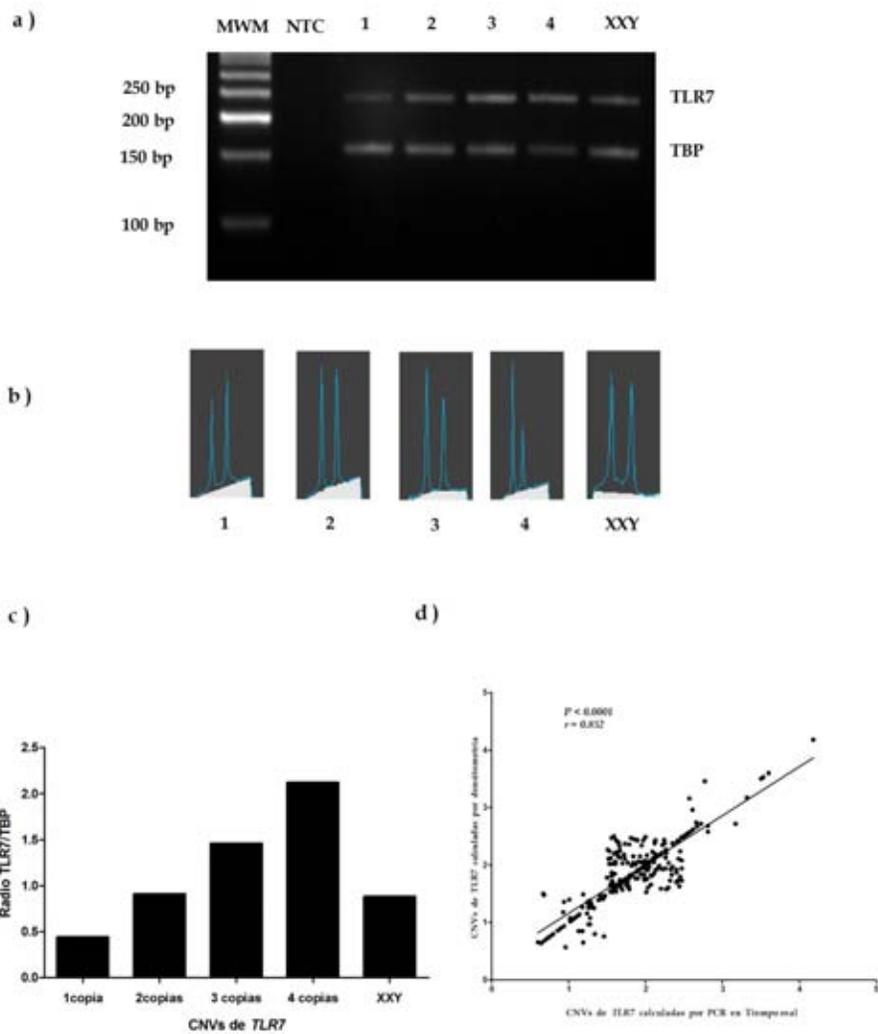


Figura 3.- Determinación del número de copias de *TLR7* por densitometría. La intensidad de las bandas de ambos productos se midió con el Software KODAK Molecular Imaging Software V 4.0. Las CNVs de *TLR7* se determinaron ajustando por la intensidad de la banda de *TBP*. **a)** Gel representativo de los genotipos obtenidos por densitometría. La numeración indica las CNVs obtenidas. **b)** Perfiles de densitometría del gel anterior, el primer pico representa la banda de *TLR7* y el segundo el de *TBP*, los números indican las CNVs de *TLR7*. **c)** El cociente de TLR7-1/TBP que se utilizó como medida de dosis génica. **d)** Correlación entre el número de copias calculadas por PCR en tiempo real y densitometría. Adicionalmente se incluyó la muestra de un paciente con síndrome de Klinefelter (XXY) como control de copias. MWM= marcador de pesos moleculares, NTC = control negativo.

### **Análisis de asociación donde se comparó del número relativo de Copias de *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* entre casos y controles**

Una vez confirmada la presencia de CNVs en el grupo de estudio, se comparó el número de copias de *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* entre casos y controles. Los resultados mostraron un incremento significativo del número de copias de *TLR7* y *TLR8* en el grupo de pacientes pediátricos en comparación con los controles ( $P = 0.0019$  y  $P = 0.0065$  respectivamente, Fig. 4 a y 4 b), lo que sugiere que estos polimorfismos pueden estar asociados al desarrollo de LES. La distribución del número de copias de *TLR9* no mostró diferencias significativas entre pacientes y controles ( $P = 0.529$ , Fig. 4 c), por lo que este se descartó del estudio de estratificación por género y de regresión logística para el cálculo de ORs.

Cuando se estratificó la muestra por género, se observó una asociación significativa específica del género femenino tanto para *TLR7* como para *TLR8* ( $P < 0.0001$  y  $P = 0.0008$  respectivamente; Fig. 5). Aunque en el género masculino no se observaron diferencias entre casos y controles (*TLR7*:  $P = 0.083$ ; *TLR8*:  $P = 0.073$ , Fig. 6), hay que considerar que el tamaño de muestra de este grupo de pacientes es muy pequeño ( $n=58$ ). Por otra parte, la prueba de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre los grupos de pacientes con y sin afección renal y el número de copias de *TLR7* y *TLR8* ( $P > 0.05$ ). Estos resultados sugieren que más que estar asociados con alguna manifestación clínica de la enfermedad en particular, las CNVs de estos genes se encuentran asociados con la susceptibilidad para desarrollar la enfermedad.

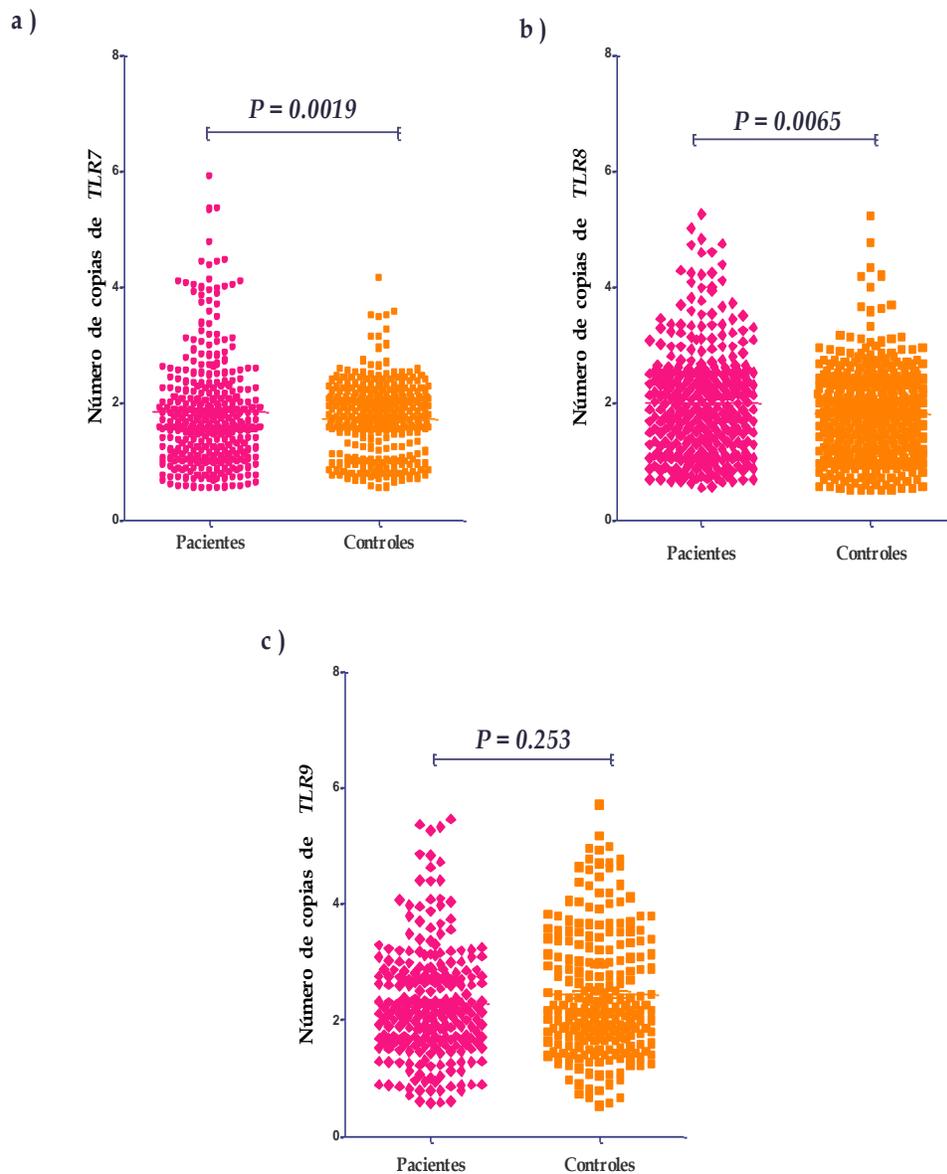


Figura 4.- Estudio de asociación entre el número de copias de los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* y el riesgo a desarrollar LES. Los resultados de la prueba estadística de Mann Whitney indican que existen diferencias significativas entre el grupo de pacientes y controles para **a)** *TLR7* ( $P=0.0019$ ) y **b)** *TLR8* ( $P = 0.0065$ ), pero no para **c)** *TLR9* ( $P = 0.253$ ). Cada punto en la gráfica representa un individuo y las barras la media  $\pm$  SD.

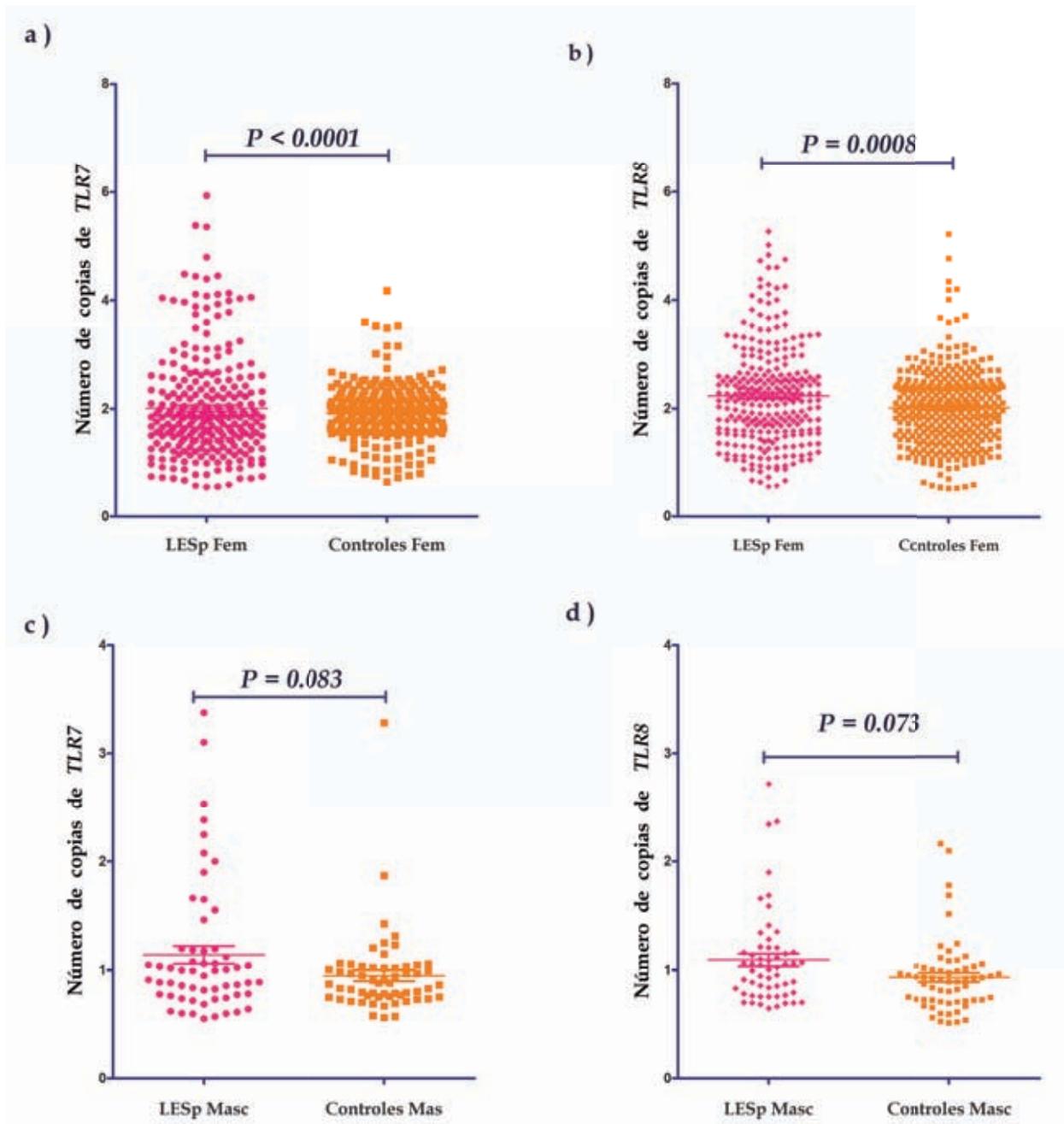


Figura 5.- Estudio de asociación del número de copias de los genes *TLR7* y *TLR8* estratificado por género femenino. Los resultados de la prueba estadística de Mann Whitney indican que existen diferencias significativas entre el grupo de pacientes y controles femeninos **a)** *TLR7* ( $P < 0.0001$ ) y **b)** *TLR8* ( $P = 0.0008$ ). mas no así en la muestra de individuos masculinos **c)** *TLR7* ( $P=0.083$ ) y **d)** *TLR8* ( $P = 0.073$ ). Cada punto en la gráfica representa un individuo y las barras la media  $\pm$  SD.

## **Análisis de regresión logística del número absoluto de copias de *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* entre casos y controles**

El número absoluto de copias de *TLR7* fue significativamente mayor en los pacientes con LES de ambos sexos. La presencia de más de 2 copias (mediana = 3 copias; rango 3–6) se observó en el 22.7% (61/269) de las pacientes femeninas con LES comparado con el 8.8% (30/341) de los controles femeninos (mediana = 3 copias; rango 3–4). Así mismo, la presencia de más de una copia de *TLR7* se observó en el 17.2% (10/59) de los pacientes masculinos (mediana = 2 copias; rango 2–3), comparado con el 3.4% de los controles masculinos, donde sólo se observó un control con 2 copias y otro con 3 (2/62) (mediana = 2 copias; rango 2–3).

El análisis de regresión logística mostró un riesgo incrementado para desarrollar LES en los pacientes femeninos con más de 2 copias de *TLR7* (OR = 3.07, P < 0.0001). Interesantemente, el riesgo para desarrollar LES fue mayor en el grupo de pacientes masculinos que presentaron más de una copia del gen *TLR7* (OR = 6.61; P = 0.005) (Tabla 4).

Por otro lado la frecuencias de 2 o más copias del gen *TLR8* fue de 31.6% (85/269, mediana = 3 copias; intervalo 3–5) en el grupo de pacientes femeninos y de 19.6% (67/341, mediana = 3 copias; rango 3–5) en el grupo de controles femeninos. Al analizar el grupo del género masculino las frecuencias fueron muy similares tanto en el grupo de pacientes como en el de controles, 6 de 59 en los pacientes masculinos (10.2%, mediana = 2 copias; rango 2–3) y en 5 de 62 controles (8.1%, mediana = 2 copias; rango 2–3).

Los riesgos calculados para *TLR8* con el estudio de regresión logística muestran que la presencia de más de 2 copias de *TLR8* es un factor de riesgo para el desarrollo de LES en los pacientes femeninos (OR = 1.66, P < 0.0001). A diferencia del alto riesgo observado en el grupo del género masculino para *TLR7*, para *TLR8* no se encontraron diferencias significativas entre casos y controles del género masculino (OR = 1.40, P < 0.754) (Tabla 4).

Cuando se estratificó el grupo de pacientes femeninos por la presencia o ausencia de nefritis lúpica y se comparó el número relativo de copias de *TLR7* y *TLR8* entre ambos grupos, no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.96$  y  $P = 0.46$ , respectivamente).

Con referencia a lo anterior, cuando se compararon de manera independiente los grupos de pacientes femeninos con o sin nefritis lúpica contra los controles femeninos, ambos grupos mostraron una asociación significativa con la presencia de más de 2 copias de los genes *TLR7* (OR = 3.30,  $P < 0.0001$  vs. OR = 2.49,  $P = 0.005$ , respectivamente) y *TLR8* (OR = 1.78,  $P < 0.0001$  vs. OR = 1.99,  $P = 0.0005$ , respectivamente), confirmando que el número incrementado de copias de estos genes se asocia con la susceptibilidad para desarrollar LESp (Tabla 4).

Tabla 4. Riesgo estimando que confieren CNVs de *TLR7* y *TLR8* para el desarrollo de LES en población mestiza Mexicana

Grupos Comparados	CNVs	Casos n/N* (%)	Controles n/N* (%)	OR	95% I.C.	P**
<i>TLR7</i>						
Mujeres	>2	61/269 (22.7)	30/341 (8.8)	3.07	1.90-4.97	<0.0001
Varones‡	>1	10/59 (16.9)	2/62 (3.2)	6.61	1.44-32.30	0.005
Mujeres con nefritis	>2	38/163 (23.3)	30/341 (8.8)	3.30	1.93-5.63	<0.0001
Mujeres sin nefritis	>2	18/91 (19.8)	30/341 (8.8)	2.49	1.30-4.77	0.005
<i>TLR8</i>						
Mujeres	>2	85/269 (31.6)	67/341 (19.6)	1.66	1.39-1.98	<0.0001
Varones‡	>1	6/59 (10.2)	5/62 (8.1)	1.40	0.41-4.86	0.754
Mujeres con nefritis	>2	53/163 (32.5)	67/341 (19.6)	1.78	1.37-2.35	<0.0001
Mujeres sin nefritis	>2	28/91 (30.8)	67/341 (19.6)	1.99	1.36-2.93	0.0005

\* n/N = Total de individuos con pérdidas o ganancias/número total de individuos.

\*\* Obtenido por Regresión Logística.

‡ Para el grupo de varones el valor de corte para estimar el riesgo fue mayor de 1 copia.

### **Comparación del número de copias los genes *TLR7* y *TLR8* entre pacientes pediátricos con LES, controles mestizos e indígenas mexicanos sanos**

De manera alternativa se calculó el número de copias de los TLRs en una muestra de 200 mujeres indígenas mazahuas del estado de México. Éstas se compararon con los datos obtenidos previamente de nuestra muestra de pacientes pediátricos con LES y el grupo control. Al comparar las frecuencias entre las distintas poblaciones, se observó que en la población de mazahuas el rango de CNs en esta población fue de 1 a 3 para los 3 genes analizados, a diferencia de lo observado en el grupo de controles mestizos donde el rango fue de 1 a 5 copias. La frecuencia de ganancias (más de dos copias) para el gen *TLR7* fue muy similar entre los mazahuas y los controles mestizos (9.2% vs. 8.8%), lo que confirma los datos obtenidos previamente (Fig. 3 a).

Por otro lado, al comparar la frecuencia de ganancias para el gen *TLR8* entre los mazahuas y los controles mestizos se encontraron diferencias importantes entre la distribución de estas (26.9% vs. 19.6%) (Fig. 6 b) sugiriendo que estas CNVs pudieron ser heredades en la población mestiza moderna de nuestros ancestros nativos americanos. En contraste la frecuencia de ganancias en el gen *TLR9* fue menor en el grupo de individuos indígenas en comparación con los pacientes con LES y los controles sanos (26.3% vs. 38.5% y 37.1% respectivamente, Fig. 3 c).

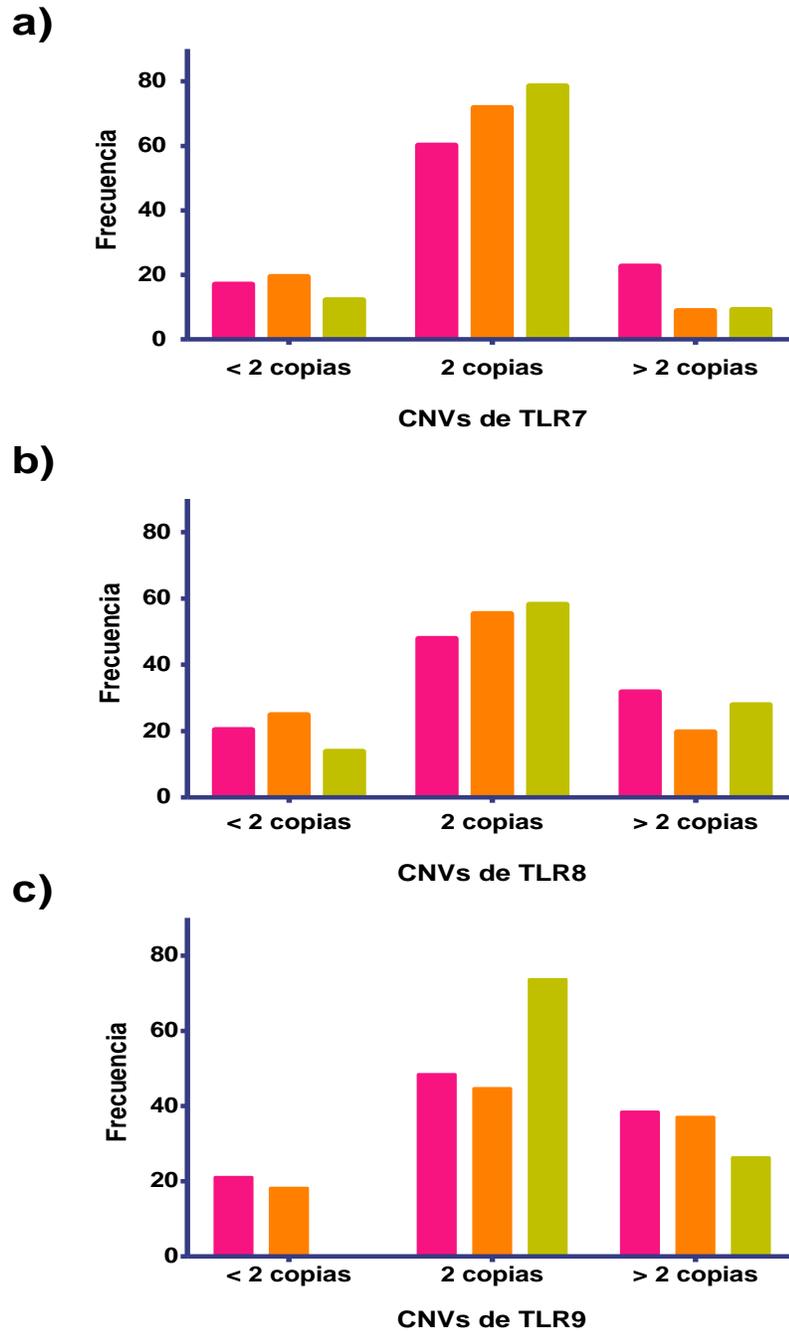


Figura 6.- Comparación de las frecuencias de CNVs de los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* entre distintas poblaciones. a) Frecuencias de *TLR7*, b) Frecuencias de *TLR8* y c) Frecuencias de *TLR9*. Las barras rosas representan a los pacientes con LES, las barras naranjas a los controles mestizos y las barras verdes la población indígena.

## Análisis de expresión

El estudio de expresión se realizó a partir del ADNc obtenido de muestras de ARNm de un grupo de 30 pacientes con CNVs de *TLR7* y *TLR8* en un rango de 1 a 5 copias y de *TLR9* en un rango de 1 a 4 copias. Los niveles de expresión de estos genes se midieron por PCR en tiempo real, utilizando como control endógeno al gen *GAPDH* y como calibrador un control femenino con 2 copias de *TLR7*, *TLR8* y *TLR9*. Los rangos de expresión estuvieron entre 0.45 y 8 veces en comparación con el calibrador para *TLR7* y entre 0.40 y 6.0 veces en comparación con el calibrador para *TLR8* y *TLR9*. Los resultados obtenidos indican que existe una correlación significativa entre el número de copias de los genes *TLR7*, 8 y 9 con sus niveles de expresión (Fig. 7).

Los niveles de expresión de los tres genes fue significativamente más alta en los casos que en los controles. Los niveles de expresión de *TLR7* mostró una media de 4.12, 95% (IC 2.31-6.71) en los casos y 1.30 (95% IC 1.12-1.81) en los controles ( $P < 0.0001$ ). Para *TLR8* la media de los niveles expresión en los casos fue de 2.22 (95% IC 1.83-2.61) mientras que en los controles ésta fue de 0.70 (95% IC 0.43-0.97) ( $P < 0.0001$ ). En el caso de *TLR9* los pacientes presentaron una media de expresión de 2.05 (95% IC 1.65-2.46) y los controles de 1.27 (95% IC 1.03-1.51) ( $P = 0.008$ ).

Estos datos documentan que la alteración en la dosis génica dada por estos polimorfismos tiene un impacto sobre la expresión del gen.

Así mismo, la evaluación de los niveles de ARNm de *IFN $\alpha$*  en el mismo grupo reveló que en la mayoría de los controles no se detecta la expresión de este gen. Sin embargo, en los pacientes existe una correlación significativa entre la expresión de *IFN $\alpha$*  y la cantidad de ARNm de *TLR7* ( $r = 0.625$ ,  $P = 0.0005$ ; Fig. 8 a) y *TLR8* ( $r = 0.492$ ,  $P = 0.017$ ; Fig. 8 b). Notablemente, esta correlación no se encontró para el gen *TLR9* ( $r = 0.121$ ,  $P = 0.533$ ; Fig. 8 c). Lo anterior sugiere que aunque CNVs de *TLR9* afectan directamente sus niveles de expresión, ésta no tiene un impacto directo en la inducción del *IFN $\alpha$* .

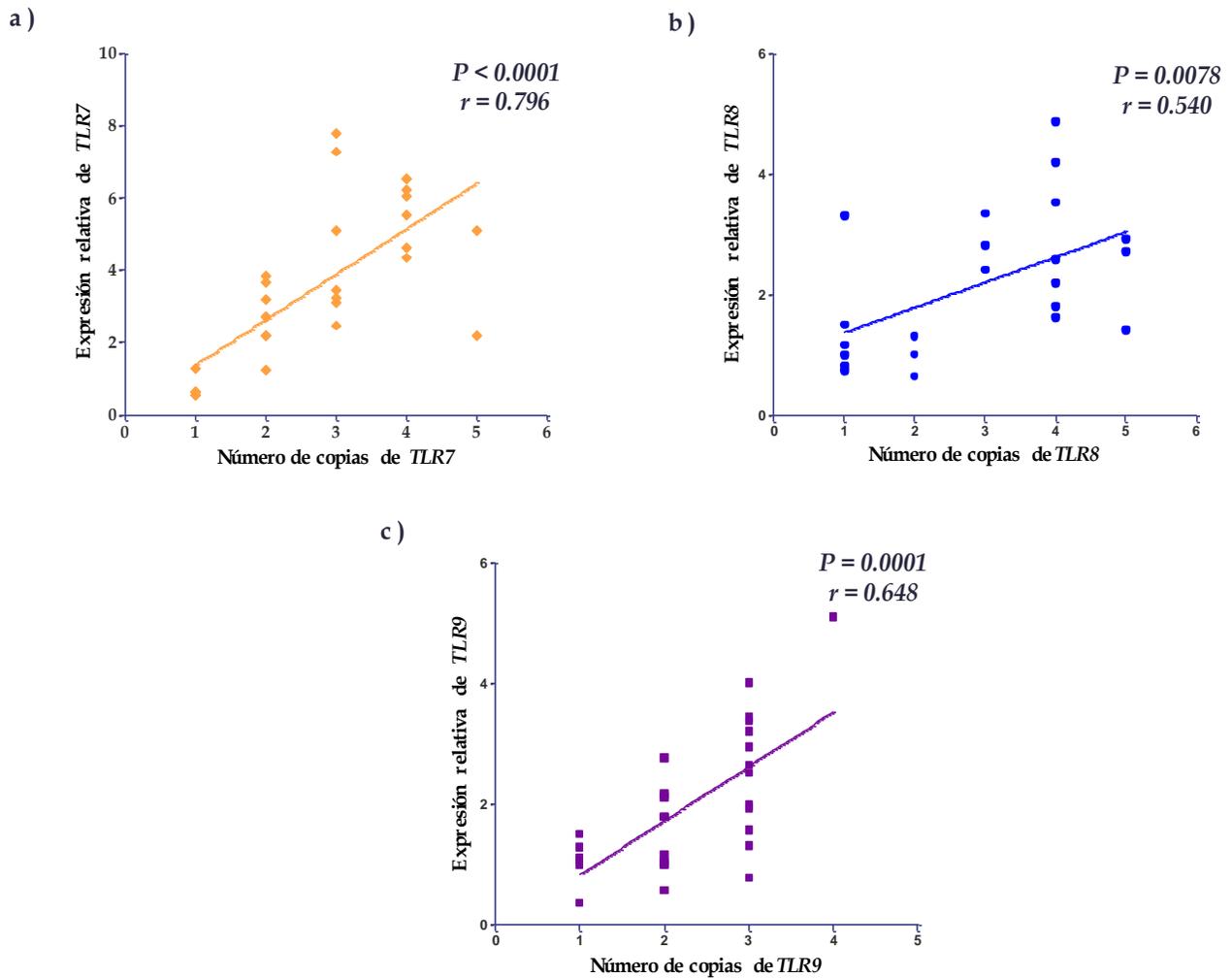


Figura 7.- Correlación entre CNVs de los TLRs y sus niveles de expresión. Los niveles de expresión de cada gen se calcularon acorde al método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  utilizando un control femenino como calibrador. La prueba de Spearman muestra una fuerte correlación entre: **a)** CNVs de *TLR7* y sus niveles de expresión ( $P < 0.0001$ ,  $r = 0.796$ ). **b)** CNVs de *TLR8* y sus niveles de expresión ( $P = 0.002$ ,  $r = 0.548$ ). **c)** CNVs de *TLR9* y sus niveles de expresión ( $P = 0.0001$ ,  $r = 0.648$ ).

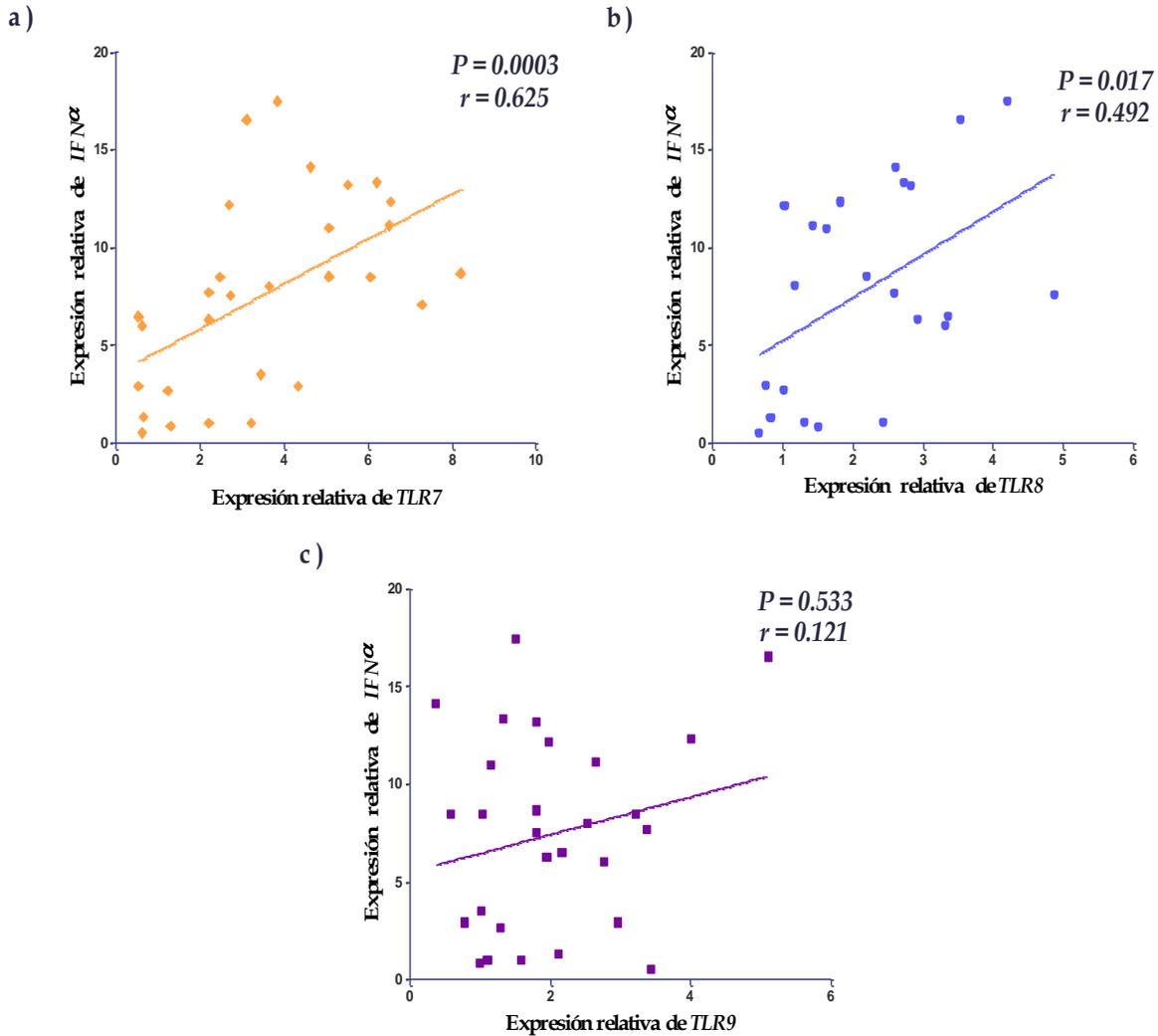


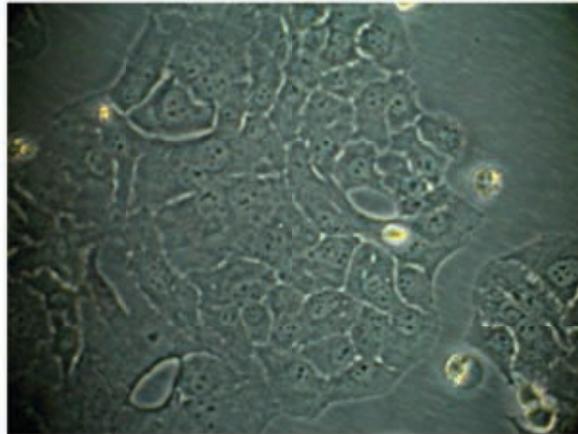
Figura 8.- Correlación entre los niveles de expresión de los TLRs y los niveles de expresión de  $IFN\alpha$ . Se encontró una correlación significativa entre los niveles de expresión de **a) TLR7** y **b) TLR8** con los niveles de expresión de  $IFN\alpha$ , mas no así con **c) TLR9** y los niveles de expresión de  $IFN\alpha$ .

## Correlación entre el número de copias de *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* y la actividad de IFN $\alpha$

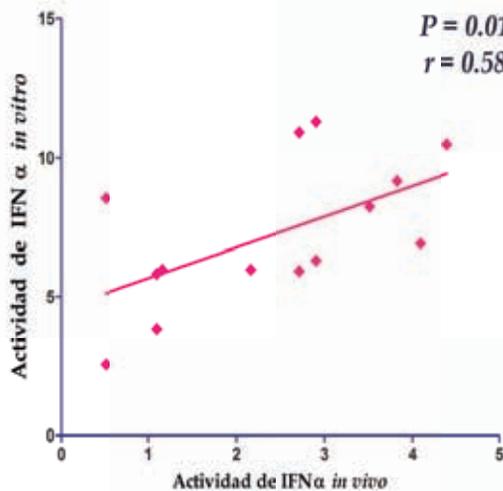
Para evaluar la actividad de IFN $\alpha$  se realizaron ensayos en células Wish, los cuales fueron validados por dos estrategias: 1) se estableció la correlación entre la actividad del IFN $\alpha$  medida en las células Wish y directamente en los pacientes (relación *in vitro in vivo*) y 2) se estableció la correlación entre los niveles de expresión de IFN $\alpha$  medido en los pacientes y la actividad de IFN $\alpha$  medida en las células Wish. Los resultados mostraron una correlación significativa entre la actividad del IFN $\alpha$  medida *in vitro* y la actividad de IFN $\alpha$  medida *in vivo* ( $r = 0.582$ ,  $P = 0.011$ ; Fig. 9a). Estos resultados son muy similares a los reportados por Niewold ( $r = 0.524$ ,  $P = 0.0001$ ), lo cual demuestra la confiabilidad de nuestra estimación [75]. A su vez se mostró que también los niveles de expresión de IFN $\alpha$  en pacientes correlacionan fuertemente con su actividad ( $r = 0.771$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 9b). Cuando se comparó la actividad de IFN $\alpha$  entre casos y controles se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.005$ ; Fig. 9c). En los controles sanos se encontró una media de actividad de IFN $\alpha$  de 3.65 (95% IC 2.48-4.83) mientras que en los casos se observó una media de 11.51 (95% IC, 9.44-13.57). Estos resultados son similares a los observados por Niewold y cols., lo que confirma la importancia de la vía del IFN $\alpha$  en el desarrollo de LES [75].

Por otro lado la actividad de IFN $\alpha$  correlaciona fuertemente con la expresión de *TLR7* ( $r = 0.57$ ,  $P = 0.001$ ) y con la de *TLR8* ( $r = 0.54$ ,  $P = 0.008$ ), pero no con la de *TLR9* ( $r = 0.12$ ,  $P = 0.54$ ). Estos datos son congruentes con los resultados previos donde se muestra que la expresión de *TLR9* no afecta la expresión de IFN $\alpha$ . Todos estos datos sugieren fuertemente que tanto *TLR7* como *TLR8* son factores genéticos de riesgo para el desarrollo de LES en nuestra población y que además estos tienen una implicación directa sobre la vía del IFN, la cual ha sido ampliamente relacionada con el desarrollo de LES.

a)



b)



c)

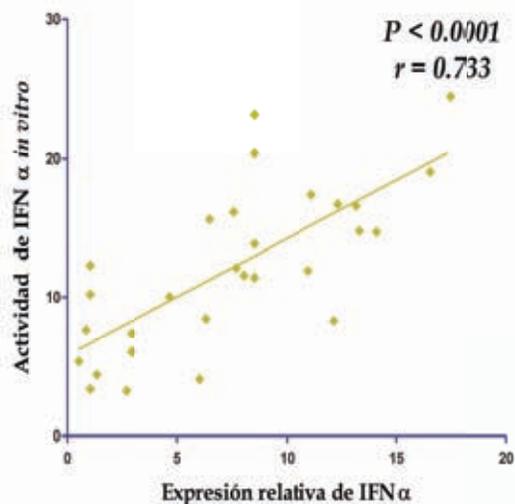


Figura 9.- Correlación entre los niveles de expresión de IFN $\alpha$  y su actividad medida en células Wish a) Células Wish a las 20 h. de ser cultivadas en medio esencial mínimo y el suero de pacientes con LESP y controles sanos; b) correlación entre la actividad de IFN $\alpha$  medida *in vitro* e *in vivo*; c) Correlación de los niveles de expresión de IFN $\alpha$  y la actividad de este medida en células Wish. Para establecer la correlación se utilizó la prueba de Spearman. Cada punto en la gráfica representa un individuo y la línea señala la pendiente que mejor se ajusta.

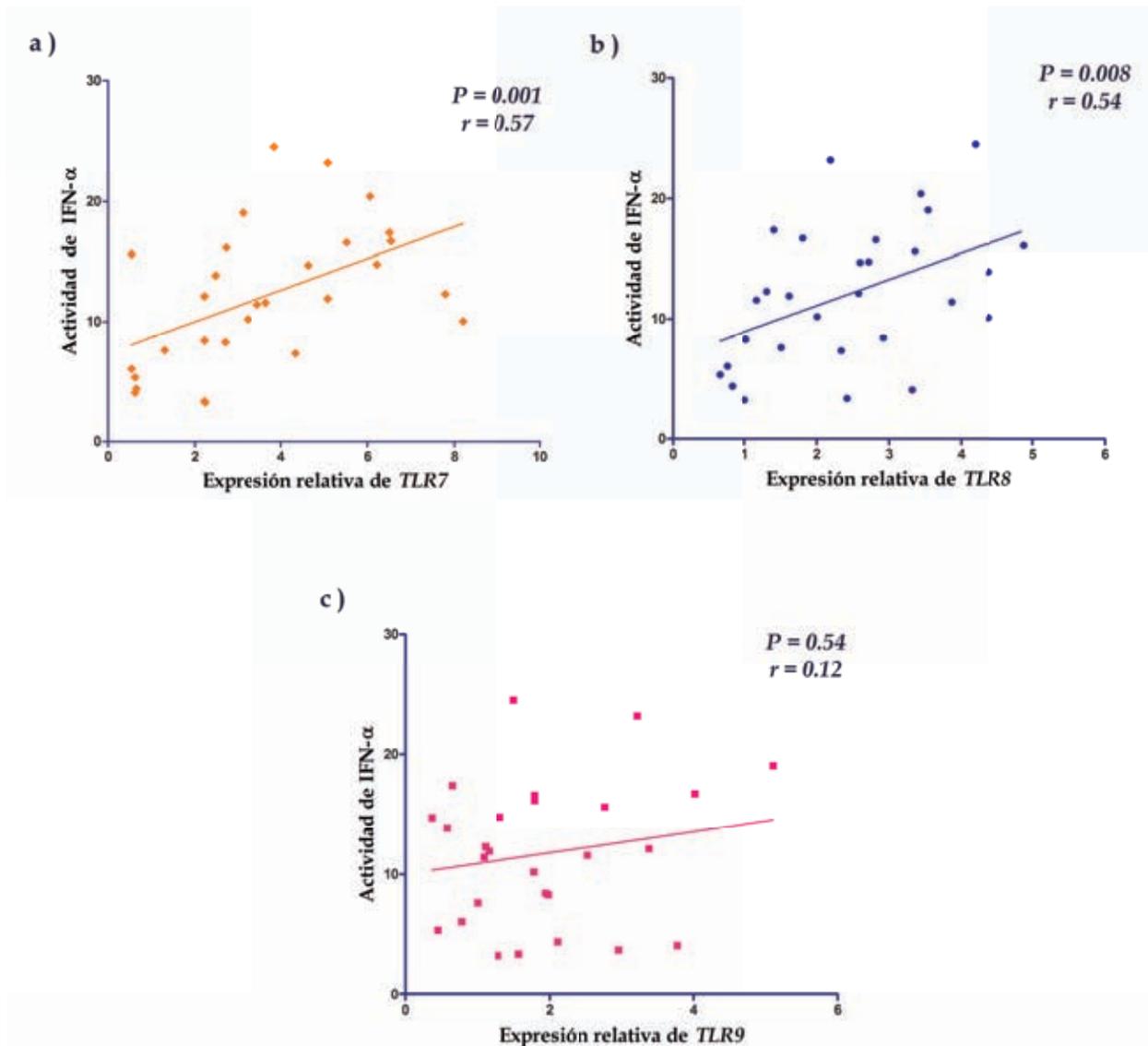


Figura 10.- Correlación entre los niveles de expresión de los TLRs y la actividad de IFN $\alpha$  medida en células Wish a) expresión relativa de TLR7 vs. actividad de IFN $\alpha$ . b) expresión relativa de TLR8 vs. actividad de IFN $\alpha$  y c) expresión relativa de TLR9 vs. actividad de IFN $\alpha$ . La correlación se calculó con la prueba de Spearman. Cada punto en la gráfica representa un individuo y la línea señala la pendiente que mejor se ajusta.

### **Evaluación de los niveles de citocinas medidas en suero por CBA y su correlación con las CNVs de los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9***

Los niveles de citocinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-12) estuvieron por debajo del límite de detección recomendado por el kit (LD = 10 pg/ $\mu$ l) por lo que no fue posible la comparación entre casos y controles.

El IFN medido por CBA y el IFN score calculado mostraron una correlación significativa ( $P < 0.0001$ ,  $r = 0.671$ ), lo que muestra la confiabilidad del uso del IFN score como una medida directa del IFN presente en el medio. De la misma manera, cuando se comparó el IFN $\alpha$  medido por CBA con la actividad de IFN $\alpha$  en células Wish también se encontró una correlación significativa ( $P = 0.001$ ,  $r = 0.599$ ).

Tanto la comparación de los niveles del IFN $\alpha$  como el promedio de la expresión de las citocinas inducibles por interferón (IFN score) entre casos y controles mostró diferencias significativas (Fig. 11), lo que sustenta observaciones previas del incremento significativo de IFN $\alpha$  en los pacientes con LES [Bennett et al. 2003, Bauer et al. 2006, Fu et al. 2008].

Finalmente cuando comparamos estos resultados con el número de copias de los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* previamente estimado, sólo se encontró correlación significativa entre el IFN $\alpha$  score y las CNVs de *TLR7* y *TLR8* (Fig. 12), corroborando la observación previa de la correlación de las CNVs de estos genes con la expresión de IFN $\alpha$  y la inducción de sus genes blanco. Estos resultados apoyan el posible papel de las CNVs de *TLR7* y *TLR8* en el desarrollo de LES, a través de la inducción desregulada de la vía del IFN $\alpha$ .

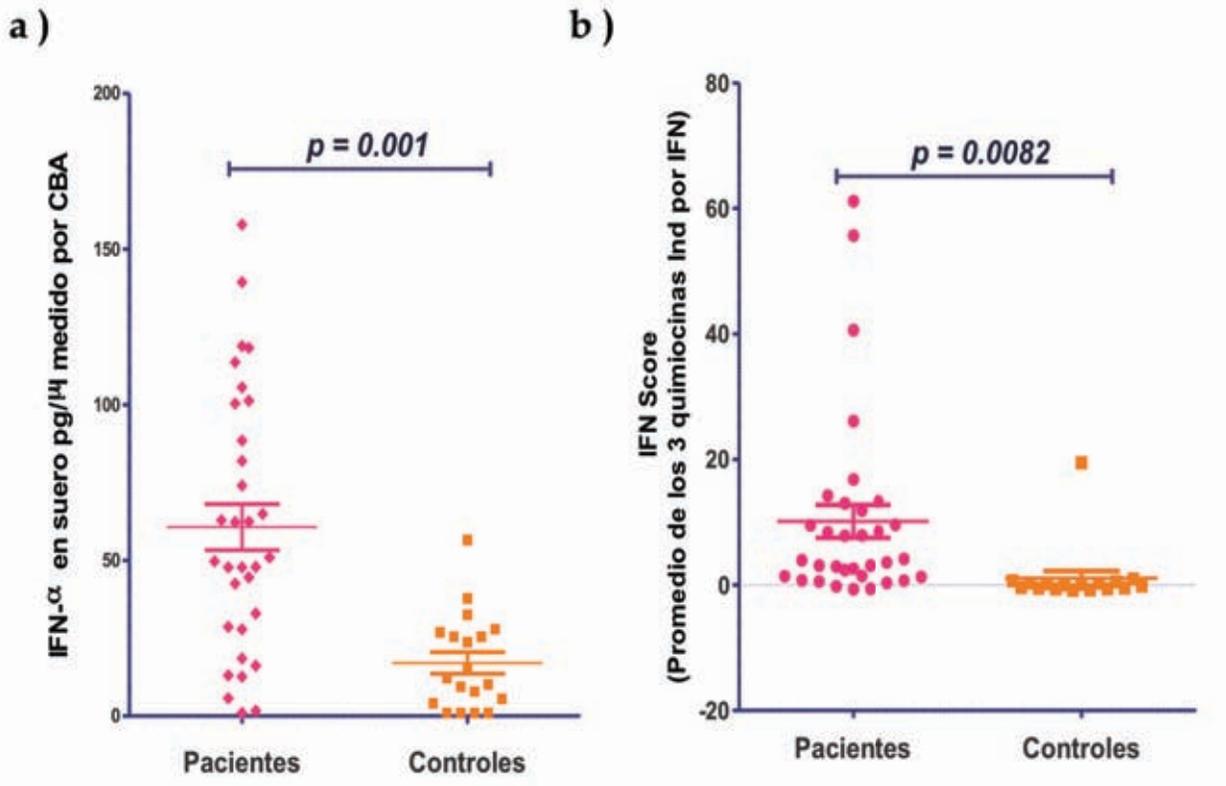


Figura 11.- Comparación de los niveles de IFN $\alpha$  entre pacientes con LES y controles sanos de a) los niveles de IFN $\alpha$  en suero y b) el IFN score calculado con el promedio de la cantidad de cada quimiocina inducible por IFN (IL-8, IP-10, MCP-1) medidas por la técnica de CBA.

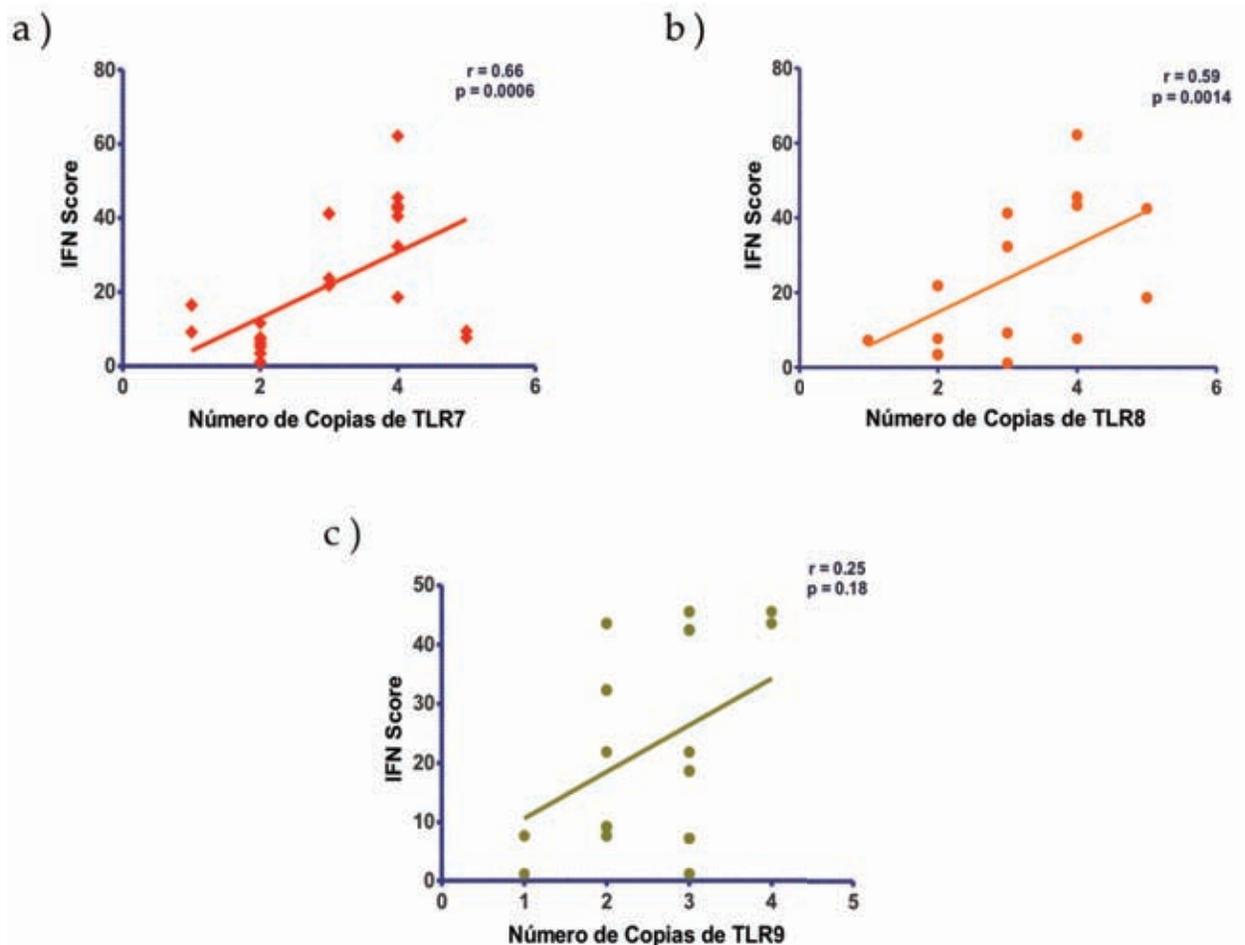


Figura 12.- Correlación entre el número de copias de los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* con el IFN score. Los resultados muestran una correlación significativa.

## Discusión

En años recientes se ha incrementado la evidencia de la participación del sistema inmune innato en la generación y mantenimiento de la respuesta autoinmune. Una de las vías mejor conocidas que induce una respuesta inmune innata es la transducción de señales celulares a través de los receptores tipo Toll. En los seres humanos, a la fecha se han reportado al menos 11 TLRs, de los cuales TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 están localizados en los compartimientos endosomales, donde estos receptores reconocen ácidos nucleicos derivados de virus y de complejos inmunes endógenos. Estos ligandos endógenos son los principales blancos de autoanticuerpos en LES, ya que pueden contribuir a la ruptura de la tolerancia periférica contra antígenos propios y propiciar el desarrollo de la autoinmunidad [82, 83]. *TLR7* y *TLR8* se encuentran en loci aledaños sobre el cromosoma X y aunque ambos reconocen específicamente ARN de cadena sencilla derivado de virus o complejos inmunes asociados con ARN propio y son capaces de inducir la secreción de grandes cantidades de IFN $\alpha$ , crucial en la patogénesis de LES, muestran patrones distintos de expresión [84-86]. Por un lado *TLR7* se expresa en células dendríticas plasmacitoides (pDCs) y por el otro *TLR8* se expresa en células de origen mieloide [85]. Así, existen al menos dos rutas distintas por la cual se puede inducir la producción de IFN $\alpha$  en pacientes con LES, aunque se ha demostrado que otros genes involucrados en esta ruta pueden participar en el desarrollo de la enfermedad. De hecho, existen algunos ejemplos de variantes en otros genes de la ruta del interferón tipo 1 que se han asociado al desarrollo de LES en población mexicana, tales como el gen que codifica para la cinasa 1 asociada al receptor de interleucina 1 (*IRAK1*), las cinasas traductoras de señales 1 y 4 (*STAT1* y *STAT4*), entre otros.

Uno de los genes más importantes en la etiopatología del LES en población mexicana es *IRF5*, que puede ser activado a través de la vía de *TLR7* para inducir la expresión de IFN $\alpha$  y confiere uno de los riesgos más elevados para desarrollar LES en nuestra población (OR = 10.46) [36]. Por otro lado estudios de asociación de casos y controles, donde se analizaron SNPs en *TLR7* y *TLR8* han mostrado que ambos genes confieren

susceptibilidad para desarrollar LES en poblaciones de origen caucásico y asiático [87-90]. Toda esta evidencia apoya el papel crucial de esta vía en la etiopatogénesis de esta enfermedad

Dado lo anterior, en este trabajo determinamos la contribución de variaciones en el número de copias de los genes *TLR7*, *TLR8* y *TLR9* en la susceptibilidad para desarrollar LES de inicio en edad pediátrica. En este estudio se demuestra por primera vez que el incremento en el número de copias correlaciona con la sobre-expresión de los 3 genes, pero particularmente en *TLR7* y *TLR8*, el número de copias correlaciona a su vez con el incremento del ARNm de *IFN $\alpha$* .

Por otra parte, nuestros resultados mostraron una asociación entre el número elevado de copias de los genes *TLR7* y *TLR8* con el riesgo de desarrollar LESp en pacientes mexicanos. Aunque el número del grupo de pacientes masculino es muy pequeño (n=58). Interesantemente, cuando se realizó un análisis de regresión logística se observó que los pacientes masculinos que contenían más de una copia de *TLR7* tenían un riesgo para desarrollar LES más alto (OR = 6.61) que el observado en mujeres con más de dos copias del gen (OR = 3.07). Sin embargo esta tendencia no se encontró con *TLR8*, lo que sugiere que CNVs en *TLR7* y *TLR8* pueden ser un factor de riesgo importante para el desarrollo de LES dependiente de género. En apoyo a esto, la variación en el número de copias en otros genes como *FCGR3B*, *C4* y *CCL3L1* se han descrito como un mecanismo en el desarrollo de la patología autoinmune [71-73, 91].

En contraste con nuestros hallazgos, Kelley y cols. no encontraron asociación de la variación en el número de copias de *TLR7* y el desarrollo de LES [92]. Sin embargo, el trabajo de Kelley y cols., incluyó sólo 50 pacientes caucásicos y 49 afroamericanos, así como 91 controles pareados por sexo y origen étnico, con la limitante de que el tamaño de muestra es muy pequeño, por lo que pudiera tener un bajo poder estadístico que incrementa al analizar dos poblaciones genéticamente muy distantes entre sí, sin tomar en cuenta la heterogeneidad genética, ampliamente demostrada entre las poblaciones. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que estas diferencias fenotípicas

podieran ser explicadas por diferencias en el fondo genético entre ambos grupos de pacientes.

Por otra parte, en nuestros pacientes se demostró que los niveles de expresión de *TLR7* correlacionan de manera significativa con el número de copias del gen, sugiriendo que así como en modelos murinos de lupus, un aumento en el número de copias de este gen, da como resultado la sobre-expresión de su propio ARNm. Estos hallazgos sugieren que la presencia de CNVs podría ser una de las causas del incremento de los niveles de ARNm de *TLR7* encontrado en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LES [60]. Nuestros hallazgos también documentaron que las CNVs en estos genes, a través de la alteración en la dosis génica, tienen una implicación a nivel funcional sobre la vía del IFN $\alpha$ , observación corroborada por varios ensayos funcionales en este trabajo, lo que sugiere fuertemente que el mecanismo por el cual estos genes participan en el desarrollo de LES es a través de la inducción de la vía del IFN $\alpha$ , la cual se ha visto fuertemente involucrada en la fisiopatología de la enfermedad.

Al comparar la frecuencia de CNVs en *TLR8* en diferentes poblaciones, muestra que en la población mazahua, la frecuencia de estas CNVs son mayores con respecto a mestizos sanos. Aunque no se cuentan con datos de la frecuencia de CNVs en el gen *TLR8* en poblaciones de origen europeo, específicamente españoles, estos datos sugieren que el incremento en el número de copias de *TLR8* pudo haber sido heredado por nuestros ancestros amerindios y apoya la hipótesis de que el componente amerindio es un factor de riesgo para el desarrollo de LES en nuestra población. Por otro lado, a pesar de que no existen estudios epidemiológicos de la incidencia de LES en poblaciones amerindias, es importante señalar que el LES es más frecuente en poblaciones hispanas en comparación con poblaciones caucásicas [93]. Aunado a lo anterior estudios recientes han mostrado que el componente amerindio incrementa el riesgo a desarrollar LES [94, 95] y recientemente se determinó que los individuos de ascendencia amerindia tienen 2.4 veces más alelos de riesgo para desarrollar LES que los individuos de ascendencia europea [34].

Con respecto a *TLR9*, un fuerte candidato para el desarrollo de LES por su papel en el reconocimiento de ADN endógeno, diferentes estudios han mostrado resultados controversiales donde se reporta la asociación de algunos SNPs en *TLR9* con la susceptibilidad a LES [87, 96]; por otro lado se ha documentado que no existe asociación de diversos SNPs localizados en el gen *TLR9* con el riesgo para desarrollar LES [56-58]. Nuestros resultados apoyan el hecho de que *TLR9* no es un factor genético de riesgo para el desarrollo de LES, ya que las variaciones en el número de copias de este gen tampoco se encontraron asociadas al riesgo a desarrollar LES en nuestra población. De hecho, a diferencia de lo observado con *TLR7* y *TLR8*, el incremento del número de copias de este gen no correlacionó con el incremento en la expresión de IFN $\alpha$ , lo que podría explicar la ausencia de asociación de CNVs en este gen con LES. Sin embargo no se puede descartar el posible papel de éste a través de otros mecanismos ya que recientemente, se han descrito subpoblaciones de células B que expresan fuertemente a TLR9 en la membrana celular [96].

La asociación de *TLR7* y *TLR8*, genes ligados al cromosoma X, podría explicar, en parte la elevada prevalencia del LES en mujeres. Es bien sabido que el LES afecta principalmente a mujeres y que uno de los factores que juega un papel importante es la alteración en la dosis génica de genes ligados al cromosoma X. Un ejemplo de esto es el gen *CD40LG*, que codifica para una molécula co-estimuladora de células B, el cual se encuentra hipometilada en pacientes femeninos con LES, causando una doble dosis de este gen y su sobreexpresión en comparación con controles sanos [98]. Más aún, estas observaciones son apoyadas por resultados obtenidos en modelos murinos para lupus, donde la alteración en la dosis de genes ubicados en el cromosoma X, específicamente *tlr7* juega un papel fundamental en la gravedad de la autoinmunidad.

De hecho, la importancia de la dosis de genes ligados al cromosoma X en el riesgo para el desarrollo de lupus, ha sido sugerida al observar que varones con síndrome de Klinefelter (47,XXY) tienen un riesgo similar al de las mujeres para desarrollar lupus [99]. Aunado a lo anterior, se ha documentado la existencia de otros genes en el cromosoma X que contienen SNPs fuertemente asociados a LES tanto de inicio en la edad pediátrica como en la etapa adulta, como *IRAK1* [100] y *MECP2* [101].

Resaltando la importancia de genes ligados al cromosoma X en el desarrollo de procesos autoinmunes.

En conclusión, nuestros datos muestran claramente que la dosis génica de *TLR7* y *TLR8* son factores de riesgo importantes para la susceptibilidad a LESp en población mexicana. El riesgo que confieren las CNVs de *TLR7* es mas alto en varones, los provee de nueva evidencia acerca de la importancia de la dosis de genes ligados al cromosoma X en la susceptibilidad a LESp. Nuestros resultados también apoyan la noción de que la alta prevalencia de LES en mujeres puede ser explicada en parte por la dosis de genes ligados al cromosoma X. Además de sugerir que el mecanismo por el cual *TLR7* y *TLR8* participan en la etiopatogénesis de LESp es través de la inducción del  $IFN\alpha$ .

## Conclusiones

- Nuestros resultados documentan por primera vez la presencia de CNVs en el gen *TLR8*, al igual que lo reportado en *TLR7* y *9*.
- El incremento de la dosis génica de los genes *TLR7* y *TLR8*, pero no de *TLR9*, es un factor de riesgo para el desarrollo de LES en nuestra población.
- La presencia de CNVs en los genes *TLR7*, *8* y *9* afectan sus niveles de expresión.
- Se sugiere que el papel de los genes *TLR7* y *TLR8* en la etiopatogenia de LES es a través de la inducción de la vía del IFN $\alpha$ .
- Estos resultados sugieren que la dosis de genes contenidos en el cromosoma X podría tener un papel importante en el desarrollo de procesos autoinmunes en humanos.

## Bibliografía

1. Gregersen PK, Olsson LM. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:363-91.
2. Shoenfeld, Y., R. Cervera, and M.E. Gershwin, *Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases.* 1st ed. 2008: Humana Press.
3. Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet* 2005;50:264–66.
4. Wieczorek S, Hoffjan S, Chan A, Rey L, Harper L, Fricke H, Holle JU, Gross WL, Epplen JT, Lamprecht P. Novel association of the CD226 (DNAM-1) Gly307Ser polymorphism in Wegener's granulomatosis and confirmation for multiple sclerosis in German patients. *Genes Immun.* 2009;10(6):591-5.
5. Tabata H, Hara M, Kitani A, Hirose T, Norioka K, Harigai M, Suzuki K, Kawakami M, Kawagoe M, Nakamura H. Expression of TLiSA1 on T cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1989;52(3):366-75.
6. Anaya JM(1), Corena R, Castiblanco J, Rojas-Villarraga A, Shoenfeld Y. The kaleidoscope of autoimmunity: multiple autoimmune syndromes and familial autoimmunity. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2007. 3(4): p. 623- 635.
7. Wallace DJ, Hahn BH . *Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes.* 2007. 8th Edition. Elsevier.
8. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum*, 1995. 38(4): p. 551-8.
9. Namjou, B., J. Kilpatrick, and J.B. Harley, *Genetics of clinical expression in SLE. Autoimmunity*, 2007. 40(8): p. 602-12 .
10. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997.40(9):1725.

11. Brunner HI, Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MD, Silverman ED. Difference in disease features between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008. 58(2):556-62.
12. Font J, Cervera R, Espinosa G, Pallarés L, Ramos-Casals M, Jiménez S, García-Carrasco M, Seisdedos L, Ingelmo M. Systemic lupus erythematosus (SLE) in childhood: analysis of clinical and immunological findings in 34 patients and comparison with SLE characteristics in adults. *Ann Rheum Dis.* 1998. 57(8):456-9.
13. Hersh AO, von Scheven E, Yazdany J, Panopalis P, Trupin L, Julian L, Katz P, Criswell LA, Yelin E. Differences in long-term disease activity and treatment of adult patients with childhood- and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009. 61(1):13-20.
14. Hoffman IE, Lauwerys BR, De Keyser F, Huizinga TW, Isenberg D, Cebecauer L, Dehoorne J, Joos R, Hendrickx G, Houssiau F, Elewaut D. Juvenile-onset systemic lupus erythematosus: different clinical and serological pattern than adult-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2009. 68(3):412-5.
15. Rood MJ, ten Cate R, van Suijlekom-Smit LW, den Ouden EJ, Ouwkerk FE, Breedveld FC, Huizinga TW. Childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus: clinical presentation and prognosis in 31 patients. *Scand J Rheumatol.* 1999. 28(4):222-6.
16. Tucker LB. Making the diagnosis of systemic lupus erythematosus in children and adolescents. *Lupus.* 2007. 16(8):546-9.
17. Tucker LB, Menon S, Schaller JG, Isenberg DA. Adult- and childhood-onset systemic lupus erythematosus: a comparison of onset, clinical features, serology, and outcome. *Br J Rheumatol.* 1995. 34(9):866-72.
18. Tucker LB, Uribe AG, Fernández M, Vilá LM, McGwin G, Apte M, Fessler BJ, Bastian HM, Reveille JD, Alarcón GS. Adolescent onset of lupus results in more aggressive disease and worse outcomes: results of a nested matched case-control study within LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LVII). *Lupus.* 2008. 17(4):314-22.
19. Carreño L, López-Longo FJ, Monteagudo I, Rodríguez-Mahou M, Bascones M, González CM, Saint-Cyr C, Lapointe N. Immunological and clinical differences between juvenile and adult onset of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1999;8(4):287-92.

20. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Doménech I, Aydintug AO, Jedryka-Góral A, de Ramón E, The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients *Medicine (Baltimore)*. 1993. 72(2):113-24.
21. Pande I, Sekharan NG, Kailash S, Uppal SS, Singh RR, Kumar A, Malaviya AN. Analysis of clinical and laboratory profile in Indian childhood systemic lupus erythematosus and its comparison with SLE in adults. *Lupus*. 1993. 2(2):83-7.
22. Ramírez Gómez LA, Uribe Uribe O, Osio Uribe O, Grisales Romero H, Cardiel MH, Wojdyla D, Pons-Estel BA; Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus (GLADEL), Catoggio LJ, Soriano ER, Imamura PM, Manni JA, Grimaudo S, Sarano J, Maldonado-Cocco JA, Arriola MS, Gómez G, García MA, Marcos AI, Marcos JC, Scherbarth HR, Marino PC, Motta EL, Drenkard C, Gamron S, Buliubasich S, Onetti CM, Caeiro F, Alvarellos A, Saurit V, Gentiletti S, Quagliatto N, Gentiletti AA, Machado D, Abdala M, Palatnik S, Berbotto GA, Battagliotti CA, Sato E, Sella EM, Souza AS, Costallat LT, Bertolo MB, Coimbra IB, Borba Neto EF, Bonfá E, Tavares JC, Brenol, Xavier R, Mucenic T, Cavalcanti Fde S, Duarte AL, Marques CD, Da Silva NA, de O e Silva AC, Pacheco TF, Molina-Restrepo JF, Molina-López J, Iglesias-Gamarra A, Iglesias-Rodríguez A, Egea-Bermejo E, Guzmán-Moreno RA, Restrepo-Suárez JF, Guibert-Toledano M, Reyes-Llerena GA, Massardo L, Gareca N, Jacobelli S, Neira OJ, Guzmán LR, Garcia-Kutzbach A, Castellanos C, Cajas E, Pascual-Ramos V, Barile-Fabris LA, Miranda-Limón JM, Amigo MC, Silveira LH, De La Torre IG, Orozco-Barocio G, Estrada-Contreras ML, del Pozo MJ, Aranda Baca LE, Quezada AU, Huerta-Yáñez GF, Acevedo-Vásquez EM, Alfaro-Lozano JL, Cucho-Venegas JM, Segami MI, Chung CP, Alva-Linares M, Abadi I, Chacón-Díaz R, Al Snih Al Snih S, Esteva-Spinetti MH, Vivas J. Childhood systemic lupus erythematosus in Latin America. The GLADEL experience in 230 children. *Lupus*. 2008. 17(6):596-604.
23. Shergy WJ, Kredich DW, Pisetsky DS. Patterns of autoantibody expression in pediatric and adult systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1989. 16(10):1329-34.
24. Michel M, Johanet C, Meyer O, Francès C, Wittke F, Michel C, Arfi S, Tournier-Lasserre E, Piette JC; Group for Research on Auto-Immune Disorders (GRAID). Familial lupus erythematosus. Clinical and immunologic features of 125 multiplex families. *Medicine (Baltimore)*. 2001. 80(3):153-8.
25. Lau CS, Yin G, Mok MY. Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. *Lupus*. 2006. 15(11):715-9.

26. Lockshin, MD. Sex differences in autoimmune disease. *Lupus*. 2006;15(11):753-6.
27. Uribe AG, McGwin G. Jr, Reveille JD, Alarcón, GS. What have we learned from a 10-year experience with the LUMINA (Lupus in Minorities; nature vs. Nurture) cohort? Where are we heading? *Autoimmun Rev*. 2004 Jun;3(4):321-9.
28. Alarcón-Segovia D, Alarcón-Riquelme ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR, Pons-Estel BA; Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus Eritematoso (GLADEL). Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis Rheum*. 2005 Apr;52(4):1138-47.
29. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, Walker A, Mack TM. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1992. 35(3):311-8.
30. Hiraki LT, Benseler SM, Tyrrell PN, Harvey E, Hebert D, Silverman ED. Ethnic differences in pediatric systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2009;36(11):2539-46.
31. Miettunen PM, Ortiz-Alvarez O, Petty RE, Cimaz R, Malleson PN, Cabral DA, Ensworth S, Tucker LB. Gender and ethnic origin have no effect on longterm outcome of childhood-onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2004;31(8):1650-4.
32. Seligman VA, Lum RF, Olson JL, Li H, Criswell LA. Demographic differences in the development of lupus nephritis: a retrospective analysis. *Am J Med*. 2002;112(9):726-9.
33. Boon SJ, McCurdy D. Childhood systemic lupus erythematosus. *Pediatric annals*. 2002;31(7), 407-17.
34. Sanchez E, Webb RD, Rasmussen A, Kelly JA, Riba L, Kaufman KM, Garcia-de la Torre I, Moctezuma JF, Maradiaga-Ceceña MA, Cardiel-Rios MH, Acevedo E, Cucho-Venegas M, Garcia MA, Gamron S, Pons-Estel BA, Vasconcelos C, Martin J, Tusié-Luna T, Harley JB, Richardson B, Sawalha AH, Alarcón-Riquelme ME. Genetically determined Amerindian ancestry correlates with increased frequency of risk alleles for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010;62(12):3722-9.

35. Frankovich JD, Hsu JJ, Sandborg CI. European ancestry decreases the risk of early onset, severe lupus nephritis in a single center, multiethnic pediatric lupus inception cohort. *Lupus*. 2012;21(4):421-9.
36. Reddy MV, Velázquez-Cruz R, Baca V, Lima G, Granados J, Orozco L, Alarcón-Riquelme ME. Genetic association of IRF5 with SLE in Mexicans: higher frequency of the risk haplotype and its homozygosity than Europeans. *Hum Genet*. 2007;121(6):721-7.
37. Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Geis SA, Stahl NI, Decker JL, Notkins AL. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1979 5;301(1):5-8.
38. Ytterberg SR, Schnitzer TJ. Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;25(4):401-6.
39. Preble OT, Black RJ, Friedman RM, Klippel JH, Vilcek J. Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science*. 1982;216(4544):429-31.
40. Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm G, Vallin H, Rönnblom L. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus*. 2000;9(9):664-71.
41. Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Peterson MG, Crow MK. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum*. 2005;52(5):1491-503.
42. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V, Gregersen PK, Behrens TW. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2610-5.
43. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*. 2003;197(6):711-23.
44. Bauer JW, Baechler EC, Petri M, Batliwalla FM, Crawford D, Ortmann WA, Espe KJ, Li W, Patel DD, Gregersen PK, Behrens TW. Elevated serum levels of

interferon- regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus. *PLoS Med.* 2006;3(12):e491.

45. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, Chang B, Duramad O, Coffman RL. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005;202(8):1131-9.
46. Murphy ED, Roths JB. A Y chromosome associated factor in strain BXSB producing accelerated autoimmunity and lymphoproliferation. *Arthritis Rheum.* 1979;22(11):1188-94.
47. Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, Tarasenko T, Satterthwaite AB, Bolland S. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science.* 2006;312(5780):1669-72.
48. Subramanian S, Tus K, Li QZ, Wang A, Tian XH, Zhou J, Liang C, Bartov G, McDaniel LD, Zhou XJ, Schultz RA, Wakeland EK. A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(26):9970-5.
49. Fairhurst AM, Hwang SH, Wang A, Tian XH, Boudreaux C, Zhou XJ, Casco J, Li QZ, Connolly JE, Wakeland EK. Yaa autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7. *Eur J Immunol.* 2008;38(7):1971-8.
50. Santiago-Raber ML, Kikuchi S, Borel P, Uematsu S, Akira S, Kotzin BL, Izui S. Evidence for genes in addition to Tlr7 in the Yaa translocation linked with acceleration of systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2008;181(2):1556-62.
51. Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, Feigenbaum L, Town T, Ward JM, Flavell RA, Bolland S. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity.* 2007;27(5):801-10.
52. Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RA, Shlomchik MJ. Toll- like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity.* 2006;25(3):417-28.
53. Lartigue A, Courville P, Auquit I, François A, Arnoult C, Tron F, Gilbert D, Musette P. Role of TLR9 in anti-nucleosome and anti-DNA antibody production in *lpr* mutation- induced murine lupus. *J Immunol.* 2006;177(2):1349-54.

54. Wu X, Peng SL. Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus. *Arthritis Rheum.* 2006;54(1):336-42.
55. Yu P, Wellmann U, Kunder S, Quintanilla-Martinez L, Jennen L, Dear N, Amann K, Bauer S, Winkler TH, Wagner H. Toll-like receptor 9-independent aggravation of glomerulonephritis in a novel model of SLE. *Int Immunol.* 2006;18(8):1211-9.
56. Hur JW<sup>1</sup>, Shin HD, Park BL, Kim LH, Kim SY, Bae SC. Association study of Toll-like receptor 9 gene polymorphism in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 2005;65(3):266-70.
57. De Jager PL, Richardson A, Vyse TJ, Rioux JD. Genetic variation in toll-like receptor 9 and susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006;54(4):1279-82.
58. Demirci FY, Manzi S, Ramsey-Goldman R, Kenney M, Shaw PS, Dunlop-Thomas CM, Kao AH, Rhew EY, Bontempo F, Kammerer C, Kamboh MI. Association study of Toll-like receptor 5 (TLR5) and Toll-like receptor 9 (TLR9) polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2007;34(8):1708-11.
59. Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Nakamura M, Yatsushashi H, Kimura H, Ishibashi H, Eguchi K. Toll-like receptor expression in lupus peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol.* 2007;34(3):493-500.
60. Komatsuda A, Wakui H, Iwamoto K, Ozawa M, Togashi M, Masai R, Maki N, Hatakeyama T, Sawada K. Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2008;152(3):482-7.
61. Wong KK, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, MacAulay C, Ng RT, Brown CJ, Eichler EE, Lam WL. A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet.* 2007;80(1):91-104.
62. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C,

- Jones KW, Scherer SW, Hurler ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444(7118):444- 54.
63. Cooper GM, Nickerson DA, Eichler EE. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nat Genet*. 2007;39(7 Suppl):S22-9.
64. Lafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*. 2004;36(9):949- 51.
65. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Manér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. 2004;305(5683):525-8.
66. Eichler EE, Sankoff D. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science*. 2003;301(5634):793-7.
67. Cooper GM, Nickerson DA, Eichler EE. Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nat Genet*. 2007;39(7 Suppl):S22-9.
68. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurler ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444(7118):444- 54.
69. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, Redon R, Bird CP, de Grassi A, Lee C, Tyler-Smith C, Carter N, Scherer SW, Tavaré S, Deloukas P, Hurler ME, Dermitzakis ET. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science*. 2007;315(5813):848-53.
70. Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, Mangion J, Robertson-Lowe C, Marshall AJ, Petretto E, Hodges MD, Bhangal G, Patel SG, Sheehan-Rooney K, Duda M, Cook PR, Evans DJ, Domin J, Flint J, Boyle JJ, Pusey CD, Cook HT. Copy number polymorphism in *Fcgr3* predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature*. 2006;439(7078):851-5.

71. Fanciulli M, Norsworthy PJ, Petretto E, Dong R, Harper L, Kamesh L, Heward JM, Gough SC, de Smith A, Blakemore AI, Froguel P, Owen CJ, Pearce SH, Teixeira L, Guillevin L, Graham DS, Pusey CD, Cook HT, Vyse TJ, Aitman TJ. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat Genet.* 2007;39(6):721-3.
72. Yang Y, Chung EK, Wu YL, Savelli SL, Nagaraja HN, Zhou B, Hebert M, Jones KN, Shu Y, Kitzmiller K, Blanchong CA, McBride KL, Higgins GC, Rennebohm RM, Rice RR, Hackshaw KV, Roubey RA, Grossman JM, Tsao BP, Birmingham DJ, Rovin BH, Hebert LA, Yu CY. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. *Am J Hum Genet.* 2007;80(6):1037-54.
73. Mamtani M, Rovin B, Brey R, Camargo JF, Kulkarni H, Herrera M, Correa P, Holliday S, Anaya JM, Ahuja SK. CCL3L1 gene-containing segmental duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(8):1076-83.
74. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001;25(4):386-401.
75. Niewold TB, Hua J, Lehman TJ, Harley JB, Crow MK. High serum IFN- $\alpha$  activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2007;8(6):492-502.
76. Bauer JW, Baechler EC, Petri M, Batliwalla FM, Crawford D, Ortmann WA, Espe KJ, Li W, Patel DD, Gregersen PK, Behrens TW. Elevated serum levels of interferon-regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus. *PLoS Med.* 2006;3(12):e491.
77. Al-Mutairi S, Al-Awadhi A, Raghupathy R, Al-Khawari H, Sada P, Al-Herz A, Rawoot P. Lupus patients with pulmonary involvement have a pro-inflammatory cytokines profile. *Rheumatol Int.* 2007;27(7):621-30.
78. Eilertsen GØ, Nikolaisen C, Becker-Merok A, Nossent JC. Interleukin-6 promotes arthritis and joint deformation in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2011;20(6):607-13.

79. Fu Q, Chen X, Cui H, Guo Y, Chen J, Shen N, Bao C. Association of elevated transcript levels of interferon-inducible chemokines with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):R112.
80. Gigante A, Gasperini ML, Afeltra A, Barbano B, Margiotta D, Cianci R, De Francesco I, Amoroso A. Cytokines expression in SLE nephritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(1):15-24.
81. Sule S, Rosen A, Petri M, Akhter E, Andrade F. Abnormal production of pro- and anti-inflammatory cytokines by lupus monocytes in response to apoptotic cells. *PLoS One.* 2011;6(3):e17495.
82. Patole PS, Pawar RD, Lichtnekert J, Lech M, Kulkarni OP, Ramanjaneyulu A, Segerer S, Anders HJ Coactivation of Toll-like receptor-3 and -7 in immune complex glomerulonephritis. *J Autoimmun.* 2007;29(1):52-9.
83. Pawar RD, Ramanjaneyulu A, Kulkarni OP, Lech M, Segerer S, Anders HJ. Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(6):1721-31.
84. Bauer S, Pigisch S, Hangel D, Kaufmann A, Hamm S. Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Immunobiology.* 2008;213(3-4):315-28.
85. Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X, Tomai MA, Alkan SS, Vasilakos JP. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J Immunol.* 2005;174(3):1259-68
86. Diebold SS. Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(7):813-23. doi: 10.1016/j.addr.2007.11.004.
87. dos Santos BP, Valverde JV, Rohr P, Monticielo OA, Brenol JC, Xavier RM, Chies JA. TLR7/8/9 polymorphisms and their associations in systemic lupus erythematosus patients from southern Brazil. *Lupus.* 2012;21(3):302-9.
88. Armstrong DL, Reiff A, Myones BL, Quismorio FP Jr, Klein-Gitelman M, McCurdy D, Wagner-Weiner L, Silverman E, Ojwang JO, Kaufman KM, Kelly JA, Merrill JT, Harley JB, Bae SC, Vyse TJ, Gilkeson GS, Gaffney PM, Moser KL, Putterman C, Edberg JC, Brown EE, Ziegler J, Langefeld CD, Zidovetzki R,

Jacob CO. Identification of new SLE-associated genes with a two-step Bayesian study design. *Genes Immun.* 2009;10(5):446-56.

89. Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N. 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.* 2011;13(2):R41.
90. Shen N, Fu Q, Deng Y, Qian X, Zhao J, Kaufman KM, Wu YL, Yu CY, Tang Y, Chen JY, Yang W, Wong M, Kawasaki A, Tsuchiya N, Sumida T, Kawaguchi Y, Howe HS, Mok MY, Bang SY, Liu FL, Chang DM, Takasaki Y, Hashimoto H, Harley JB, Guthridge JM, Grossman JM, Cantor RM, Song YW, Bae SC, Chen S, Hahn BH, Lau YL, Tsao BP. Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15838-43.
91. Wu YL, Yang Y, Chung EK, Zhou B, Kitzmiller KJ, Savelli SL, Nagaraja HN, Birmingham DJ, Tsao BP, Rovin BH, Hebert LA, Yu CY. Phenotypes, genotypes and disease susceptibility associated with gene copy number variations: complement C4 CNVs in European American healthy subjects and those with systemic lupus erythematosus. *Cytogenet Genome Res.* 2008;123(1-4):131-41.
92. Kelley J, Johnson MR, Alarcón GS, Kimberly RP, Edberg JC. Variation in the relative copy number of the TLR7 gene in patients with systemic lupus erythematosus and healthy control subjects. *Arthritis Rheum.* 2007;56(10):3375-8.
93. Stichweh D, Pascual V. [Systemic lupus erythematosus in children]. *An Pediatr (Barc).* 2005;63(4):321-9.
94. Seldin MF, Qi L, Scherbarth HR, Tian C, Ransom M, Silva G, Belmont JW, Gamron S, Allievi A, Palatnik SA, Saurit V, Paira S, Graf C, Guillerón C, Catoggio LJ, Prigione C, Berbotto GA, García MA, Perandones CE, Truedsson L, Abderrahim H, Battagliotti CG, Pons-Estel BA, Alarcon-Riquelme ME. Amerindian ancestry in Argentina is associated with increased risk for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2008 Jun;9(4):389-93. doi: 10.1038/gene.2008.25. Epub 2008 Apr 10.

95. Molineros JE1, Kim-Howard X, Deshmukh H, Jacob CO, Harley JB, Nath SK. Admixture in Hispanic Americans: its impact on ITGAM association and implications for admixture mapping in SLE. *Genes Immun.* 2009;10(5):539-45.
96. Zhou XJ, Lv JC, Cheng WR, Yu L, Zhao MH, Zhang H. Association of TLR9 gene polymorphisms with lupus nephritis in a Chinese Han population. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28(3):397-400.
97. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Chavarin P, Pozzetto B, Richard Y, Garraud O. Identification of two subpopulations of purified human blood B cells, CD27<sup>-</sup> CD23<sup>+</sup> and CD27<sup>high</sup> CD80<sup>+</sup>, that strongly express cell surface Toll-like receptor 9 and secrete high levels of interleukin-6. *Immunology.* 2008;125(3):430-7.
98. Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest.* 1996;97(9):2063-73.
99. Scofield RH, Bruner GR, Namjou B, Kimberly RP, Ramsey-Goldman R, Petri M, Reveille JD, Alarcón GS, Vilá LM, Reid J, Harris B, Li S, Kelly JA, Harley JB. Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome. *Arthritis Rheum.* 2008;58(8):2511-7.
100. Jacob CO, Zhu J, Armstrong DL, Yan M, Han J, Zhou XJ, Thomas JA, Reiff A, Myones BL, Ojwang JO, Kaufman KM, Klein-Gitelman M, McCurdy D, Wagner-Weiner L, Silverman E, Ziegler J, Kelly JA, Merrill JT, Harley JB, Ramsey-Goldman R, Vila LM, Bae SC, Vyse TJ, Gilkeson GS, Gaffney PM, Moser KL, Langefeld CD, Zidovetzki R, Mohan C. Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(15):6256-61.
101. Sawalha AH, Webb R, Han S, Kelly JA, Kaufman KM, Kimberly RP, Alarcón-Riquelme ME, James JA, Vyse TJ, Gilkeson GS, Choi CB, Scofield RH, Bae SC, Nath SK, Harley JB. Common variants within MECP2 confer risk of systemic lupus erythematosus. *PLoS One.* 2008;3(3):e1727.

# Association of *TLR7* copy number variation with susceptibility to childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population

Humberto García-Ortiz,<sup>1</sup> Rafael Velázquez-Cruz,<sup>1</sup> Francisco Espinosa-Rosales,<sup>2</sup> Silvia Jiménez-Morales,<sup>1</sup> Vicente Baca,<sup>3</sup> Lorena Orozco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genomic of Complex Diseases Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Department of Immunology, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Department of Rheumatology, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Mexico City, Mexico

## Correspondence to

Lorena Orozco, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur 4124, Torre Zafiro II, 6° piso, Colonia Jardines del Pedregal, México City, DF, CP 01900, México; lorozco@inmegen.gob.mx

Accepted 14 February 2010

## ABSTRACT

**Objective** Variations in gene copy number (CNV) have been recognised as a heritable source of susceptibility in human complex diseases. Recent studies have shown that *Tlr7* gene dosage has a significant contribution in the autoimmune-enhancing effect in mouse models of systemic lupus erythematosus (SLE). A study was therefore performed to investigate whether CNVs in *TLR7* contribute to the genetic component of childhood-onset SLE.

**Methods** A case-control association study was performed in 328 Mexican children with SLE and 403 healthy controls. Determination of CNVs of *TLR7* was achieved by real-time PCR using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Expression levels of *TLR7* and interferon  $\alpha$  (*IFN\alpha*) were determined in 23 patients. In addition, a stratification analysis was performed to investigate the association of *TLR7* gene copy number (CN) with lupus nephritis.

**Results** A significant increase was found in the relative *TLR7* gene CN in females patients with SLE compared with female controls ( $p < 0.0001$ ). However, logistic regression analysis by gender showed a higher OR (OR 6.61,  $p = 0.005$ ) in male patients with  $> 1$  copy of *TLR7* than in female patients with  $> 2$  copies (OR 3.07,  $p < 0.0001$ ). This association was not observed with lupus nephritis. *TLR7* mRNA levels correlated significantly with *TLR7* CN and with *IFN\alpha* mRNA levels.

**Conclusion** These results show that an increase in *TLR7* CN is a risk factor for childhood-onset SLE and provide new evidence for a role for X-linked gene dosage in SLE susceptibility. There is also evidence to suggest that *TLR7* may be involved in the pathogenesis of SLE through the induction of *IFN\alpha*.

## INTRODUCTION

Congenetic dissection of lupus-prone mouse strains has provided important insights into the genetic basis for susceptibility to systemic lupus erythematosus (SLE).<sup>1</sup> The BXSB male mice, obtained from a cross between a C57BL/6 (B6) female and an SB/Le male, develops a severe form of murine lupus.<sup>2–3</sup> The autoimmune-enhancing effect in BXSB males was attributed to the Y-linked autoimmune accelerator (Yaa) locus.<sup>3</sup> However, the Yaa Y chromosome produces or exacerbates the disease only when combined with other autoimmune-promoting genes.<sup>4–7</sup> It has been shown that the genetic lesion underlying Yaa results from a duplication and translocation to the Y chromosome of a cluster of at least 16 X-linked genes.<sup>8–9</sup> This gene duplication in male mice carrying Yaa leads to a twofold increase in the expression of several of the translocated genes including *Tlr7*,

the major candidate gene for causation of the Yaa-associated phenotype. Although it has been demonstrated that the upregulation of *Tlr7* has a significant contribution in the Yaa-associated autoimmune phenotypes, it has been suggested that additional duplicated genes present in the translocated X chromosome segment may contribute to the Yaa phenotype.<sup>10–11</sup> Nevertheless, Deane *et al*<sup>12</sup> clearly established the role of *Tlr7* gene dosage, demonstrating that the additional copy of *Tlr7* in the Yaa mice is required to produce the accelerated autoimmunity and that the other genes in the translocation are not sufficient. Furthermore, they showed in transgenic mice lines bearing 4–32 copies of the gene that a substantial increase in *Tlr7* mRNA expression caused a severe inflammatory response, a profound dendritic cell dysregulation and early mortality.

Gene copy number variations (CNVs), the major kind of genetic diversity, have recently been proposed as a driving force for phenotypic variation and modification of disease risk in humans through gene dosage or position effects.<sup>13–16</sup> It has been found that CNVs affecting genes of the immune system can predispose to human autoimmune diseases.<sup>17–20</sup> In this context, we investigated whether *TLR7* gene CN is associated with susceptibility to childhood-onset SLE in Mexican patients.

## METHODS

### Patients and controls

We studied 328 unrelated Mexican-Mestizo patients with childhood-onset SLE. All patients were  $< 16$  years of age at onset of disease and fulfilled the American College of Rheumatology (ACR) criteria for the diagnosis of SLE.<sup>21</sup> Of these, 269 (82%) were female and 59 (18%) were male, with a mean  $\pm$  SD age at onset of 11.61  $\pm$  2.07 years in the whole group. In addition, 403 blood bank donors were included as a healthy control group. The controls were sex-matched, consisting of 341 female subjects (85%) and 62 male subjects (15%). All patients and controls were drawn from tertiary care paediatric hospitals in Mexico City.

Stratification analysis was performed in the SLE cohort to investigate the *TLR7* CN association with renal disorder. In 19 patients (5.8%) data on renal disorder were not available and these patients were excluded from the analysis. According to the ACR criteria, 192 patients (62%) were considered as having lupus nephritis and, of these, 129 (67.2%) were confirmed by kidney

## Extended report

biopsy. One hundred and seventeen patients were free of renal involvement (38%).

### Copy number (CN) estimation

Determination of CNVs of the *TLR7* gene was performed by real-time PCR using a SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) in a final volume of 10  $\mu$ l using 20 ng genomic DNA. All samples were tested in triplicate using two pairs of specific primers for *TLR7* (Xp22.3) within a distance of 1.8 kb. *TLR7*-1 primer sequences used were: 5'-GGCTAGATGGTTTCCTAAACTCT-3' (forward) and 5'-GGTACACAGTTGCATCTGAAATCG-3' (reverse). *TLR7*-2 primer sequences used were: 5'-TCAGCCACAACCAACTGACCAC-3' (forward) and 5'-GCAACATCTTCAGATTGTGAGGAC-3' (reverse). Reactions were conducted in an ABI PRISM 7900 HT Instrument (Applied Biosystems). Thermal cycling conditions were 95°C for 3 min followed by 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 15 s and 72°C for 30 s.

The CNV calculation was performed by the standard curve and  $\Delta\Delta C_t$  methods<sup>22</sup> using two housekeeping genes: the autosomal gene TATA box binding protein (*TBP*) (6q27.1) and the X-linked gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*) (Xq26.1) as intrasample controls. We used a female healthy control bearing two copies of *TLR7* as intersample control (calibrator). To generate standard curves, six serial 1:2

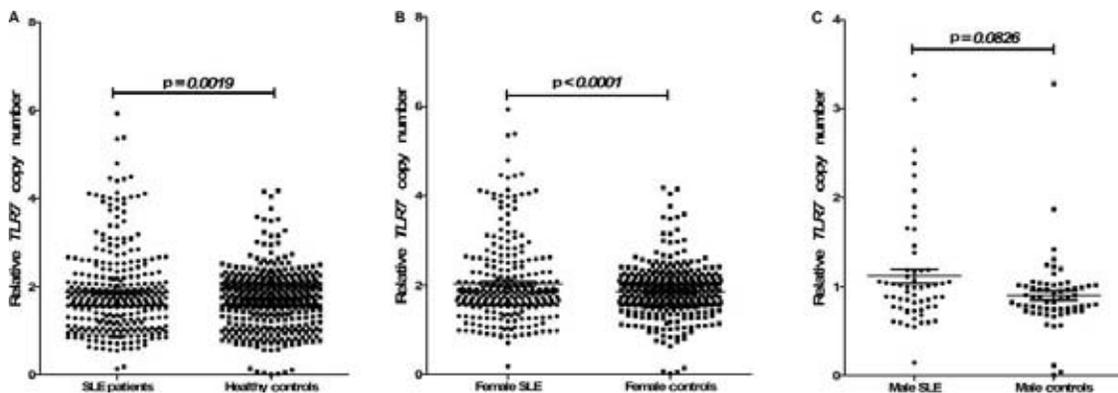
dilutions (40–1.25 ng) of genomic DNA were used from the calibrator sample.

Alternatively, real-time PCR data were validated by semi-quantitative PCR using *TBP* and *TLR7*-1 primers in a multiplex-PCR method. Band intensities on ethidium bromide-stained gels (4% agarose) were analysed using the Kodak Molecular Imaging Software V4.0. (Kodak Molecular Imaging Systems, New Haven, Connecticut, USA). The determination of *TLR7* gene CN was calculated normalising by the intensity of *TBP* bands. A patient with Klinefelter syndrome (47, XXY) was included as a control for *TLR7* gene dosage.

### Expression analysis

Total RNA was obtained from whole blood of patients with SLE with a PAXgene Blood RNA kit (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland). The cDNA synthesis was carried out with a TaqMan reverse transcription reagents kit according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems).

An expression assay was performed to measure the *TLR7* and *IFN $\alpha$*  mRNA levels in a set of 23 children with SLE with known CNVs of *TLR7* ranging from one to five copies. Of these, 17 were girls and 6 were boys. Real-time RT-PCR was carried out as previously described,<sup>25</sup> with some differences. We used Power SYBR Green master mix (Applied Biosystems) and 5 pmol of each primer in a final reaction volume of 20  $\mu$ l.



**Figure 1** Comparisons of the relative *TLR7* copy number (CN) between children with systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy controls. *TLR7* CN was determined by real-time PCR normalising against TATA box binding protein as described in the Methods section. (A) Whole group of patients with SLE versus healthy controls. (B) Female patients with SLE versus healthy controls. (C) Male patients with SLE versus healthy controls. The significance of the differences between the distribution of *TLR7* CN in cases and controls was estimated by the non-parametric Mann-Whitney U test. Symbols represent individual subjects. Bars show the mean  $\pm$  SD for each group.

**Table 1** Estimated risk of *TLR7* copy number for development of systemic lupus erythematosus

Gender group*	Absolute copy number	Cases, n/N† (%)	Controls, n/N† (%)	OR	95% CI	p Value‡
Females	<2	46/269 (17.1)	66/341 (19.3)	0.95	0.62 to 1.45	0.808
	>2	61/269 (22.7)	30/341 (8.8)	3.07	1.90 to 4.97	<0.0001
Males	<1	1/59 (1.7)	3/62 (4.8)	0.54	0.39 to 0.74	0.437
	>1	10/59 (16.9)	2/62 (3.2)	6.61	1.44 to 32.30	0.005
Females with lupus nephritis	<2	31/163 (19.0)	66/341 (19.3)	0.84	0.76 to 0.92	0.417
	>2	38/163 (23.3)	30/341 (8.8)	3.30	1.93 to 5.63	<0.0001
Females without lupus nephritis	<2	14/91 (15.4)	66/341 (19.3)	0.89	0.78 to 1.13	0.699
	>2	18/91 (19.8)	30/341 (8.8)	2.49	1.30 to 4.77	0.005

\*Reference category to estimate risk was two copies for females and one copy for males.

†n/N subjects with more or less copy number than the reference category/sample size.

‡Obtained by logistic regression.

The fold change in expression of *TLR7* and *IFN $\alpha$*  was measured according to the standard curve and  $\Delta\Delta C_t$  method using a healthy male control harbouring a single copy of *TLR7* as a calibrator. The reaction was conducted in an ABI PRISM 7900 HT instrument (Applied Biosystems).

**Statistical analysis**

The non-parametric Mann–Whitney U test was used to compare the distribution of the relative *TLR7* CN between cases and controls. ORs with 95% CI were estimated by multivariate logistic regression models using SPSS 16.0 software (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA), with absolute *TLR7* gene CN as predictor variable and gender and renal involvement as covariates. Otherwise, owing to the small number in the male group, when we stratified by the presence or absence of lupus nephritis, only female patients were analysed. Because of missing renal data, 15 female patients were discarded from the logistic regression analysis.

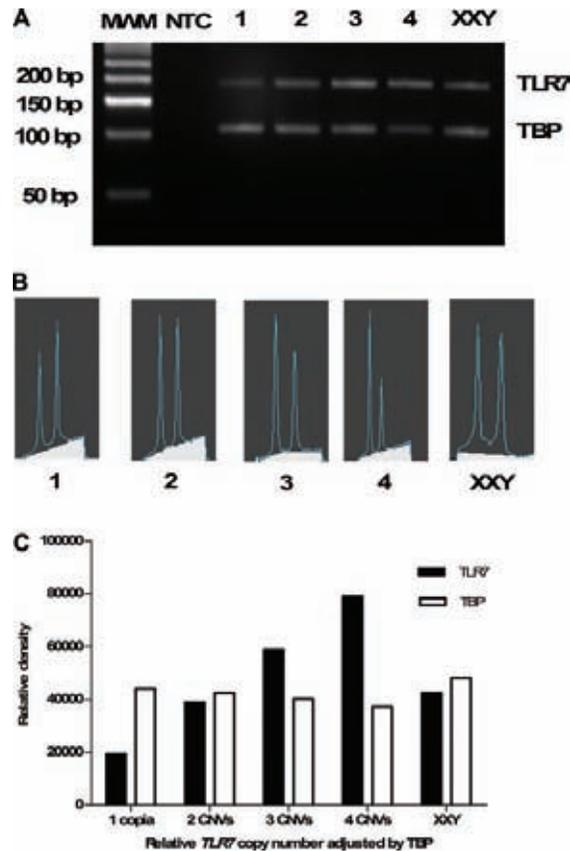
A reference category was chosen from the median *TLR7* CN obtained in both the female and male control groups (CN=2 for females and CN=1 for males), as previously described.<sup>19,20</sup> Based on the reference category, the risk of acquiring SLE associated with the absolute *TLR7* CN was estimated by comparing cases and controls grouped by CN >2 or <2 for females and CN >1 or <1 for males.

The Spearman correlation coefficient rank test using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, California, USA) was used to determine the correlation between *TLR7* relative CN estimated by real-time PCR using two pairs of primers and two housekeeping genes. This test was also used to correlate the densitometric analysis with real-time PCR data as well as CNVs with *TLR7* and *IFN $\alpha$*  expression levels.

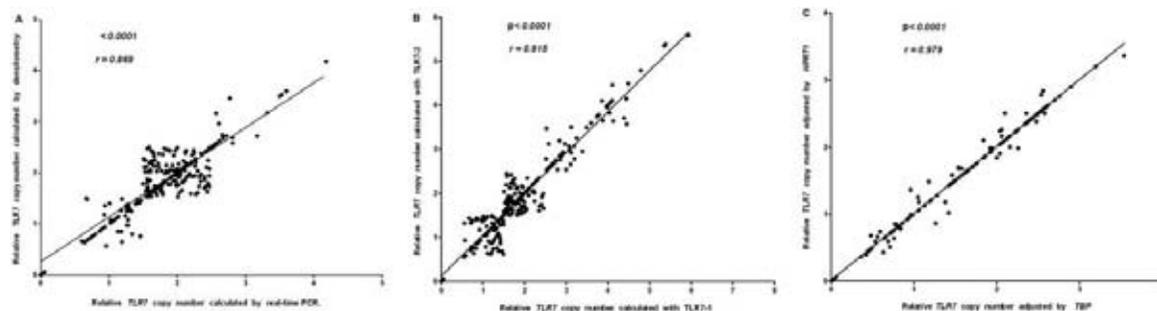
**RESULTS**

Relative *TLR7* CN estimated by real-time PCR was significantly increased in the whole group of children with SLE compared with controls ( $p=0.0019$ , figure 1A). Although the stratification analysis by gender showed a significant association only in female patients ( $p<0.0001$ , figure 1B), a trend for an association was observed when *TLR7* CN was compared between male patients with SLE and male controls ( $p=0.0826$ , figure 1C).

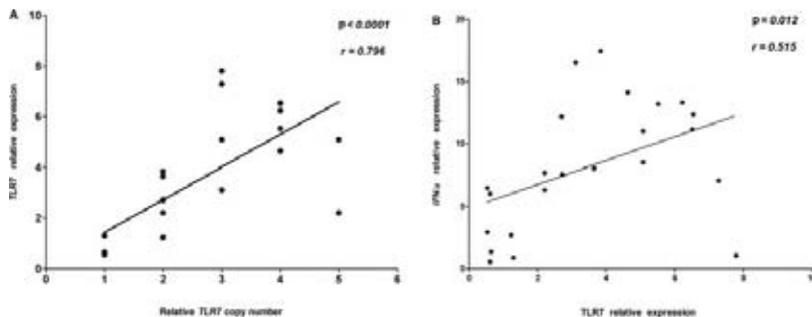
Absolute *TLR7* CN analysis showed >2 copies in 61 of 269 (22.7%) female patients with SLE (median 3 copies; range 3–6) compared with only 30 of 341 (8.8%) female controls (median



**Figure 2** *TLR7* copy number (CN) determined by semiquantitative PCR. TATA box binding protein (*TBP*) and *TLR7*-1 primers were used in a multiplex-PCR. (A) Electrophoresis of *TBP* and *TLR7* PCR products on 4% agarose gel. Top numbers indicate *TLR7* CN in different patients with systemic lupus erythematosus. CNVs, variations in gene CN; MWM, mass weight marker; NTC, non-template control; XXY, patient with Klinefelter’s syndrome. (B) Left peak: densitometry analysis of the *TLR7*-1 product; right peak: densitometry analysis of the *TBP* product. Numbers indicate *TLR7* CN. (C) Relative density of subjects with different *TLR7* CNs; relative CN was estimated by the ratio *TLR7/TBP* as follows: 0.45 for 1 copy, 0.98 for 2 copies, 1.5 for 3 copies and 2.3 for 4 copies.



**Figure 3** Correlation between different strategies used to estimate *TLR7* copy number (CN). (A) *TLR7* CN calculated by both densitometry and real-time PCR. (B) *TLR7* CN using two pairs of primers separated 1.8 kb within the *TLR7* gene (*TLR7*-1 and *TLR7*-2). (C) *TLR7* CN normalising against two housekeeping genes (TATA box binding protein (*TBP*) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*)). The Spearman correlation coefficient rank test was used to evaluate the reproducibility of *TLR7* CN estimation.



**Figure 4** Direct correlation between expression level of *TLR7* mRNA in patients with systemic lupus erythematosus and either (A) *TLR7* high copy number or interferon  $\alpha$  (*IFN* $\alpha$ ) mRNA levels. Each point represents individual subjects.

3 copies; range 3–4). In the male group we observed >1 copy of *TLR7* in 10 of 59 (16.9%) patients with SLE (median 2 copies; range 2–3), but only in 2 of 62 (3.2%) male controls (one patient had 2 copies and the other had 3 copies; table 1). Furthermore, logistic regression analysis using the absolute *TLR7* gene CN showed an increased risk of SLE in female patients with >2 copies of *TLR7* (OR 3.07,  $p < 0.0001$ ). Interestingly, a higher risk of developing SLE was observed in male patients with >1 copy of *TLR7* (OR 6.61,  $p = 0.005$ ; table 1). Otherwise, logistic regression models showed an increased risk in female cases with high *TLR7* CN either with or without lupus nephritis when both groups were compared with female controls (table 1).

Real-time PCR analysis was validated by semiquantitative PCR, as described in the Methods section (figure 2). The CN estimation of *TLR7* was highly reproducible by these two methods, supporting the accuracy of our findings ( $r = 0.86$ ,  $p < 0.0001$ ; figure 3A). Furthermore, we are also confident in the precision of the real-time PCR method because the relative *TLR7* CN correlated strongly between samples using both sets of primers (*TLR7*-1 and *TLR7*-2) to amplify the *TLR7* gene ( $r = 0.91$ ,  $p < 0.0001$ ; figure 3B) and two housekeeping genes (*TBP* and *HPRT1*) as endogenous controls ( $r = 0.97$ ,  $p < 0.0001$ ; figure 3C).

On the other hand, the *TLR7* mRNA expression levels in whole blood cells from 23 patients with SLE showed a direct correlation with the *TLR7* CN observed in each patient ( $r = 0.79$ ,  $p < 0.0001$ ; figure 4A). Furthermore, expression levels of *TLR7* mRNA correlated significantly with those of *IFN* $\alpha$  mRNA ( $r = 0.51$ ,  $p = 0.012$ ; figure 4B).

## DISCUSSION

Toll-like receptors (TLRs) are key receptors of the innate immune system and recognise highly conserved components of pathogens such as lipids, proteins and nucleic acids.<sup>24</sup> To date, at least 11 TLRs have been reported in humans; TLRs 3, 7, 8 and 9 are located intracellularly in the endosomal compartments where these receptors recognise RNA and DNA molecules derived from viruses. However, they may also recognise endogenous nucleic acid ligands within immune complexes and in pathological conditions can intensify or result in autoimmunity.<sup>25–27</sup> *TLR7*, an X-linked gene, is expressed in human plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and specifically recognises single-stranded RNA derived from viruses or immune complexes associated with self-RNA, which activates pDCs and induces the secretion of large amounts of *IFN* $\alpha$  which has a pivotal role in the pathogenesis of SLE.<sup>28–30</sup> B cells

also express *TLR7* and can be activated by immune complexes containing self-RNA through B cell receptor/*TLR7* engagement and differentiate into a plasma cell.<sup>26</sup> Otherwise, the autoimmune-enhancing effect in BXSB males attributed to the Yaa locus containing a duplicate gene dosage of *Tlr7*<sup>3</sup> has highlighted the importance of this gene in the aetiological pathogenesis of SLE. In humans, the importance of X-linked gene dosage in the risk of developing SLE was recently suggested in male patients with Klinefelter's syndrome (47, XXY), who showed a similar risk of developing SLE as that estimated in women in the normal population.<sup>31</sup> More recently an X-linked gene, the interleukin 1 receptor associated kinase 1 (*IRAK1*), was involved for the first time as a risk factor for SLE.<sup>32</sup> Taking these data together, it is possible that *TLR7* gene dosage and/or its expression could be important in the aetiological pathogenesis of human SLE. We therefore investigated whether variations in *TLR7* gene dosage contribute to the genetic component of childhood-onset SLE.

In contrast with a recent study by Kelley *et al*<sup>33</sup> which found no significant concordance between *TLR7* gene CN and the SLE phenotype, we found a significant association between the relative CN of *TLR7* and the risk of developing SLE. Furthermore, logistic regression analysis by gender showed that male patients with SLE with >1 copy of *TLR7* had an OR to develop SLE higher than that observed in female patients with SLE with >2 copies of the gene (OR 6.61 vs OR 3.07). It is possible that these discrepancies were due to differences in ethnicity or in the genetic background between childhood-onset and adult-onset SLE. Nevertheless, it is also possible that the study by Kelley *et al* was underpowered to detect an association because it included only 50 Caucasian and 49 African-American patients with SLE (55 female and 44 male) and 91 sex- and ethnicity-matched healthy controls.

Downstream *TLR7* signalling involves a family of adaptor proteins that couple proteins and kinases, among which interferon regulatory factor 5 (*IRF5*) and *IRAK1* gene polymorphisms have recently been associated with an increased risk of developing SLE in humans.<sup>32–34</sup> We have previously reported a very high OR in Mexican patients with SLE homozygous for a risk haplotype in *IRF5* gene (OR 10.46).<sup>35</sup> These results therefore potentially link molecules involved in the *TLR7* pathway that control the type I *IFN* system into the pathogenesis of SLE, and suggest that these genetic changes could contribute to the sustained overproduction of *IFN* $\alpha$  in these patients. It has recently been found that *TLR7* mRNA expression is upregulated in peripheral blood mononuclear cells from patients with SLE.<sup>25</sup> In our patients we showed that the expression levels of

*TLR7* mRNA correlated significantly with the *TLR7* gene CN, suggesting that an increase in *TLR7* gene dosage results in the upregulation of *TLR7* mRNA expression in humans as well as in murine models of lupus. Furthermore, there was a correlation between expression levels of *TLR7* mRNA and those of *IFN $\alpha$*  mRNA, suggesting that a possible role of *TLR7* in the pathogenesis of SLE could be through type I *IFN* production.

Congenetic dissection strategy has provided murine models of SLE to characterise the genetic interactions that drive the development of severe disease. The addition of the Yaa locus to the B6 SLE1 strain drives the transition to fatal lupus nephritis at a relatively young age.<sup>8</sup> We therefore also investigated the possible association between the *TLR7* CNVs with lupus nephritis in Mexican children with SLE, but we observed an increased risk of the *TLR7* gene CN in females with and without lupus nephritis (table 1), indicating that high *TLR7* CN is a risk factor for SLE but not for lupus nephritis.

In conclusion, our data clearly show that the gene dosage of *TLR7* is an important risk factor for susceptibility to childhood-onset SLE in the Mexican population. The risk was very high in male patients with an increased *TLR7* CN, providing new evidence for the role of X-linked gene dosage in the susceptibility to SLE. Our results also support the notion that the female predominance of SLE may in part be explained by X-linked chromosome gene dosage. We also show evidence to suggest that the role of *TLR7* in the pathogenesis of SLE could be through the induction of *IFN $\alpha$* .

**Acknowledgements** The authors thank the patients and their parents for their collaboration in this project.

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree for HGO at Doctorado en Ciencias Biomédicas Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

**Funding** HGO was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), scholarship No 210338. This study was supported by a grant from the CONACYT (SALUD-2004-01-153).

**Competing interests** None.

**Patient consent** Obtained.

**Ethics approval** This study was conducted with the approval of the Centro Médico Nacional Siglo XXI and the Instituto Nacional de Medicina Genómica and the Instituto Nacional de Pediatría.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

## REFERENCES

1. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, *et al*. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* 2001;**15**:397–408.
2. Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, *et al*. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med* 1978;**148**:1198–215.
3. Murphy ED, Roths JB. A Y chromosome associated factor in strain BXSB producing accelerated autoimmunity and lymphoproliferation. *Arthritis Rheum* 1979;**22**:1188–94.
4. Hudgins CC, Steinberg RT, Klinman DM, *et al*. Studies of consomic mice bearing the Y chromosome of the BXSB mouse. *J Immunol* 1985;**134**:3849–54.
5. Izui S, Higaki M, Morrow D, *et al*. The Y chromosome from autoimmune BXSB/MpJ mice induces a lupus-like syndrome in (NZW x C57BL/6)F1 male mice, but not in C57BL/6 male mice. *Eur J Immunol* 1988;**18**:911–15.
6. Morel L, Croker BP, Blenman KR, *et al*. Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:6670–5.
7. Kikuchi S, Fossati-Jimack L, Moll T, *et al*. Differential role of three major New Zealand Black-derived loci linked with Yaa-induced murine lupus nephritis. *J Immunol* 2005;**174**:1111–17.
8. Subramanian S, Tus K, Li QZ, *et al*. A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:9970–5.
9. Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, *et al*. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science* 2006;**312**:1669–72.
10. Fairhurst AM, Hwang SH, Wang A, *et al*. Yaa autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7. *Eur J Immunol* 2008;**38**:1971–8.
11. Santiago-Raber ML, Kikuchi S, Borel P, *et al*. Evidence for genes in addition to Tlr7 in the Yaa translocation linked with acceleration of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2008;**181**:1556–62.
12. Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, *et al*. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity* 2007;**27**:801–10.
13. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, *et al*. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006;**444**:444–54.
14. Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, *et al*. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* 2007;**315**:848–53.
15. Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet* 2005;**1**:e49.
16. Sharp AJ. Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease. *Hum Mutat* 2009;**30**:135–44.
17. Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, *et al*. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 2006;**79**:439–48.
18. Linzmeier RM, Ganz T. Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23. *Genomics* 2005;**86**:423–30.
19. Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, *et al*. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* 2006;**439**:851–5.
20. Fanciulli M, Norsworthy PJ, Petretto E, *et al*. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat Genet* 2007;**39**:721–3.
21. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, *et al*. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;**25**:1271–7.
22. Giulietti A, Overbergh L, Valcckx D, *et al*. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001;**25**:386–401.
23. Komatsuda A, Wakui H, Iwamoto K, *et al*. Up-regulated expression of toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2008;**152**:482–7.
24. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;**17**:1–14.
25. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, *et al*. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and toll-like receptors. *Nature* 2002;**416**:603–7.
26. Lau CM, Broughton C, Tabor AS, *et al*. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med* 2005;**202**:1171–7.
27. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, *et al*. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005;**202**:1131–9.
28. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, *et al*. Recognition of single-stranded RNA viruses by toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:5598–603.
29. Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, *et al*. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* 2005;**202**:1575–85.
30. Savarese E, Chae OW, Trowitzsch S, *et al*. U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood* 2006;**107**:3229–34.
31. Scofield RH, Bruner GR, Namjou B, *et al*. Klinefelter's syndrome (47, XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome. *Arthritis Rheum* 2008;**58**:2511–17.
32. Jacob CO, Zhu J, Armstrong DL, *et al*. Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;**106**:6256–61.
33. Kelley J, Johnson MR, Alarcón GS, *et al*. Variation in the relative copy number of the TLR7 gene in patients with systemic lupus erythematosus and healthy control subjects. *Arthritis Rheum* 2007;**56**:3375–8.
34. Sigurdsson S, Nordmark G, Göring HH, *et al*. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2005;**76**:528–37.
35. Reddy PL, Velázquez-Cruz R, Baca V, *et al*. Genetic association of IRF5 with SLE in Mexicans: higher frequency of the risk haplotype and its homozygosity than Europeans. *Hum Genet* 2008;**121**:721–7.