



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"  
I.S.S.S.T.E

**"Estudio del polimorfismo *CD24*' en Lupus Eritematoso  
Sistémico, en pacientes del CMN 20 de Noviembre. Estudio piloto"**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TITULO DE

ESPECIALISTA EN:

ALERGIA E INMUNOLOGIA CLINICA

PRESENTA:

RUBEN DARIO JIMENEZ USCANGA

No. Registro 445.2011





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.

## AUTORIZACIONES

Dra. Aura Argentina Erazo Valle Solís

Subdirectora de Enseñanza e Investigación

Dra. María Eugenia Vargas Camaño

Jefa del Servicio de Inmunología Clínica y Alergia

Profesor Titular del Curso

Asesora de Tesis

Dra. María del Carmen Chima Galán

Medico adscrito del servicio de Genética Médica

Asesora de tesis

Dra. María Isabel Castrejón Vázquez

Profesor Adjunto del Curso

Asesor de Tesis

Dra. Fedra Irazoque Palazuelos

Jefa del Servicio de Reumatología

Asesor de Tesis

Dr. Rubén Darío Jiménez Uscanga

## INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
JUSTIFICACION.....	5
DEFINICION DEL PROBLEMA .....	5
HIPOTESIS.....	5
OBJETIVOS.....	6
MATERIAL Y METODOS.....	7
RESULTADOS.....	11
DISCUSION.....	12
BIBLIOGRAFIA.....	13
TABLAS Y FIGURAS.....	15
ANEXOS.....	18
1. Criterios diagn3sticos para LES.....	18
2. C3dula de recolecci3n de datos.....	19
3. Consentimiento informado grupo de estudio.....	20
4. Consentimiento informado grupo control.....	22
5. Extracci3n de DNA.....	24

## DEDICATORIA:

A mis padres y hermano y por que sin ellos, siempre con su apoyo incondicional, dándome las oportunidades que he recibido, simplemente no hubiera sido posible llegar a la meta hoy cumplida.

A mis sobrinas y sobrino que han dado alegría a mi familia nuclear, como un antecedente de lo maravilloso de ser niño, sin preocupaciones, con más alegrías que tristezas.

A mi esposa por otorgarme la dicha de estar a su lado a pesar de las incontables horas a mi lado sin condiciones, empujándome cada vez más para obtener logros, per se a la distancia y el tiempo que han transcurrido como fieles observadores de nuestro destino.

A la Familia Casillas Alvarez, Alvarez Robles, Duran Uscanga, porque ellos han caminado a mi lado en momentos difíciles y maravillosos.

A mis profesores: Ma. Eugenia Vargas Camaño, Ma. Isabel Castrejón Vázquez por darnos las bases para ser una mejor persona, un mejor ser humano, y un mejor profesional, orientándome siempre en las vicisitudes no sólo en Alergia e Inmunología Clínica, sino también en la vida misma.

A la Dra. Ma. Del Carmen Chima Galán, por su invaluable asesoría en esta obra y que sin ella no hubiera sido posible la realización del presente.

A mis compañeros (Karla, Gina, Almita) por convivir tantos momentos, en la tristeza, alegría, júbilo, amargura, discusiones y acuerdos, por todo ello, agradezco haber sido afortunado al convivir día con día, hombro con hombro, tanto en las condiciones de vida como en el profundo remolino del conocimiento.

## RESUMEN:

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es un padecimiento complejo de etiología multifactorial con predisposición genética, se calcula que más de 100 genes participan en su etiología. Su incidencia varía significativamente en los diferentes grupos étnicos y poblaciones, con una incidencia anual de 1.9 a 5.6 por 100,000 habitantes. Es más frecuente en mujeres que en varones en una relación 9 a 1. A nivel mundial, la incidencia es más alta en afroamericanos, hispanos, nativos americanos y asiáticos. Se presenta frecuentemente con síntomas constitucionales, tomando en cuenta los criterios diagnósticos de acuerdo al Colegio Americano de Reumatología. Se caracteriza por la formación de grandes cantidades de auto anticuerpos dirigidos contra la cromatina y de otros autoantígenos resultantes de la pérdida de la tolerancia en la célula B. El *CD24* puede mediar varias funciones importantes, la primera que se describió fue su actividad coestimuladora en la expansión clonal de células T. Cuando las células T entran a los órganos linfoides e interactúan con células presentadoras de antígeno no profesionales, *CD24* es capaz de proporcionar esta actividad coestimuladora. *CD24* tiene un SNP, que resulta en un reemplazo no conservador de alanina a valina (*CD24<sup>V</sup>*), que precede inmediatamente al sitio de anclaje GPI (posición  $\omega$ -1) condicionando la pérdida de actividad de *CD24*. Se ha descrito en otras poblaciones (europeas, asiáticas) que *CD24<sup>V</sup>* está asociado a Esclerosis Múltiple y LES como un factor de predisposición. Este es un estudio piloto que busca probar la participación de *CD24<sup>V</sup>* como factor predisponente a LES en mexicanos.

Palabras clave: Lupus, *CD24*, SNP *CD24<sup>V</sup>*

## BACKGROUND

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a complex multifactorial disease with genetic predisposition, it is estimated that over 100 genes involved in its etiology. Its incidence varies significantly in different ethnic groups and populations, with an annual incidence of 1.9 to 5.6 per 100,000 habitants. It is more common in women than in men in a ratio of 9 to 1. Worldwide, the incidence is higher in African Americans, Hispanics, Native Americans and Asians. Frequently presents with constitutional symptoms, taking into account the diagnostic criteria according to the American College of Rheumatology. Characterized by the formation of large quantities of autoantibodies directed against chromatin and other autoantigens, resulting in the loss of B cell tolerance. The *CD24* can mediate several important functions; the first to be described was its costimulatory activity in T cell clonal expansion. When T cells enter the lymphoid organs and interact with antigen presenting cells non professional *CD24* is able to provide this costimulatory activity. *CD24* has a SNP, resulting in a non-conservative replacement of alanine to valine (*CD24<sup>V</sup>*) wich immediately precedes the GPI anchor site (position  $\omega$ -1) conditioning the loss activity of *CD24*. It has been reported in other populations (European, Asian) that *CD24<sup>V</sup>* is associated with Multiple Sclerosis and SLE as a predisposing factor. This is a pilot study seeks to test the involvement of *CD24<sup>V</sup>* as a predisposing factor for SLE in Mexicans.

Key words: Lupus, *CD24*, SNP *CD24<sup>V</sup>*

## INTRODUCCION

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune multisistémica con una gran variabilidad en su presentación y curso. Su incidencia varía significativamente en los diferentes grupos étnicos y poblaciones, con una incidencia anual de 1.9 a 5.6 por 100,000 habitantes. Es más frecuente en mujeres que en varones en una relación 9 a 1. A nivel mundial, la incidencia es más alta en afroamericanos, hispanos, nativos americanos y asiáticos. Se presenta frecuentemente con síntomas constitucionales como fiebre, pérdida de cabello, fatiga, pérdida de peso y evidencia de inflamación difusa como linfadenopatía y hepatoesplenomegalia, afecciones a nivel de piel, del sistema musculoesquelético y renal son más comunes; también puede afectar el tracto gastrointestinal y miocardio.<sup>[1]</sup>

El diagnóstico de LES se basa en la presencia de 4 o más de los siguientes criterios: Eritema malar, eritema discoide, fotosensibilidad, úlceras orales, artritis, serositis, alteración renal, desorden neurológico, psicosis, alteraciones hematológicas, alteraciones inmunológicas y anticuerpos antinucleares<sup>(1)</sup>.

La célula B participa en la disregulación inmune en LES. En LES su característica inmunológica es la producción de grandes cantidades de auto anticuerpos dirigidos contra la cromatina y de otros autoantígenos resultantes de la pérdida de la tolerancia en la célula B. Esto lleva a un estado inflamatorio crónico, con lesión en diferentes órganos. Numerosos son los defectos genéticos que pueden afectar a la célula B en el LES: comprometiendo su activación, longevidad, ó apoptosis. Se describen múltiples moléculas en la alteración de la tolerancia de la célula B y en su selección negativa a nivel del timo que participan en LES, desde la expresión de receptores Fc (FcγRIIb), como sustitución de leucina por treonina en la posición 232), sobreexpresión de interferón (IFN) tipo I en la expresión génica, alteración en las moléculas de coestimulación como CD80, CD86, CD40L, marcadores de alojamiento de inflamación sistémica (CXCR3+) y negativos a nivel de ganglios linfáticos (CD62L-).

Entre las alteraciones descritas en célula B se encuentran:

- 1) Actuar como célula precursora de autoanticuerpos
- 2) Presentar autoantígenos a la célula T
- 3) Cooperar con organización y regulación de la respuesta inflamatoria a través de citocinas y quimiocinas como Interleucina (IL) 10 (IL-10), IL-6, INFγ, linfoxina alfa
- 4) Regular otras células inmunológicas<sup>[2]</sup>

Las moléculas CD pueden actuar de numerosas maneras: como receptores o ligandos celulares, lo que puede potencialmente iniciar una señal en cascada, alterando el comportamiento celular. Algunas proteínas no juegan un papel de señalización celular, pero tienen otras funciones, tales como la adhesión celular.<sup>[3,4]</sup> Es importante señalar que, mientras las moléculas CD son muy útiles en la definición de leucocitos su activación y función.<sup>[5,6]</sup>

Se describió *CD24*, al final de la década de 1970, como una glicoproteína con una estructura soluble en solventes orgánicos y termo-estable, se denominó J11d/M1.69 o antígeno termoestable (*ATE* en ratón; *CD24* en humanos).<sup>[7,8]</sup>

El *CD24* puede mediar varias funciones importantes, la primera que se describió fue su actividad coestimuladora en la expansión clonal de células T, especialmente cuando las células T entran a los órganos linfoides e interactúan con células presentadoras de antígeno no profesionales, siendo capaz de proporcionar actividad coestimuladora, pero su actividad puede ser anulada por B7-CD28. Se han identificado muchos ligandos para *CD24* (en células B activadas, macrófagos, astrocitos, oligodendrocitos, células T, células dendríticas, células pre-B, neuronas, células tumorales). Sin embargo, la especificidad del ligando parece ser dependiente del contexto celular, por ejemplo, se sabe que *CD24* se une en ocasiones a P-selectina. Se ha demostrado que *CD24* se expresa en una variedad de tipos celulares involucrados en padecimientos autoinmunes, como en LES y en esclerosis múltiple (EM).<sup>[9-11]</sup>

El gen humano *CD24* está localizado en el cromosoma 6q21, despliega un polimorfismo alélico de una sustitución de citosina por timina en la posición nucleotídica 226 del gen, lo que condiciona un cambio de alanina por valina en la proteína.<sup>[12,13]</sup> *CD24* tiene un SNP, que resulta en un reemplazo no conservador de alanina a valina (*CD24<sup>v</sup>*), que precede inmediatamente al sitio de anclaje GPI (posición  $\omega$ -1).<sup>[14]</sup>

La forma más común de variación del DNA en el genoma humano es el polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (de sus siglas en inglés, Single Nucleotide Polymorphism). Por convención, cuando una sustitución se presenta con una frecuencia mayor de 1% en una determinada población y no causa un fenotipo anormal se considera una variante o un polimorfismo. Los SNPs pueden afectar la función de un gen o ser neutrales. En la práctica, esta inferencia puede ser errónea, un SNP puede ser responsable de un fenotipo anormal, pero sólo en el contexto de un ambiente determinado o por la presencia simultánea de otros SNP's en diferentes sitios del genoma, sin lo cual no se expresa el fenotipo anormal.<sup>[15-17]</sup>



En 1990, el gen de *ATE* fue secuenciado y se descubrió que está compuesto por solo 27 aminoácidos.<sup>[8]</sup> Casi de inmediato, la molécula homóloga en el humano fue identificada como *CD24*.<sup>[7]</sup>

Piotrowski y cols, en Polonia, determinaron que el polimorfismo de *CD24<sup>v</sup>* tiene una prevalencia de 1.6 veces más alta en pacientes con LES que en controles sanos, en su población; este SNP en estado heterocigoto fue más frecuente en individuos sanos que en pacientes con LES, la diferencia en la distribución de estos genotipos fue estadísticamente significativa ( $p=0.0149$ )<sup>[18]</sup>. En otro estudio, Sánchez y cols., concluyen que el polimorfismo *CD24<sup>v</sup>*, en población española, es dos veces más frecuente en LES que en individuos sanos y se asocia a producción de autoanticuerpos; hallazgo similar en una cohorte de población alemana a través de un meta análisis que no se pudo confirmar en población suiza, en donde se considera el polimorfismo un factor de susceptibilidad para presentar LES.<sup>[19]</sup>

## **JUSTIFICACION**

En México no contamos con estudios acerca de la relación de  $CD24^V$  con LES. Resultados preliminares de la tesis titulada: "Frecuencia de polimorfismos del gen  $CD24$  en población mexicana clínicamente sana" realizada por el Dr. Diego Soto Candia, residente de Inmunología Clínica, como parte del proyecto de investigación: "Identificación de polimorfismos genéticos en  $CD24$  asociados a la disfunción neurológica presente en pacientes con Esclerosis Múltiple" apoyado por CONACYT; reportaron una frecuencia del polimorfismo  $CD24^V$  de 0.21, en una muestra de personas sanas del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE.

Es por ello que resulta de interés determinar si éste polimorfismo se encuentra asociado con la susceptibilidad de presentar LES, ya que los estudios previos señalan a  $CD24$  como un gen importante en la respuesta autoinmune, y por ser el LES otra enfermedad autoinmune de gran impacto en la salud de los derechohabientes del ISSSTE.

## **DEFINICION DEL PROBLEMA**

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es un padecimiento complejo de etiología multifactorial con predisposición genética, se calcula que más de 100 genes participan en su etiología. Estudios recientes reportan una asociación del polimorfismo  $CD24^V$  con la presencia de Lupus Eritematoso Sistémico. En México no existen antecedentes de este tipo de estudios, por lo que resulta de interés conocer la asociación de  $CD24^V$  en una muestra de pacientes con LES en el CMN "20 de Noviembre".

## **HIPOTESIS**

El polimorfismo  $CD24^V$  se relaciona a la presentación de Lupus Eritematoso Sistémico

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la asociación de  $CD24^V$  con la presencia de LES en pacientes de CMN “20 de Noviembre” del ISSSTE.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Determinar la distribución alélica y genotípica de  $CD24^V$  en pacientes con LES del CMN “20 de Noviembre” del ISSSTE.
2. Determinar la distribución alélica y genotípica de  $CD24^V$  en muestras de DNA de controles sanos que acudieron al banco de sangre del CMN “20 de Noviembre” del ISSSTE.
3. Determinar la asociación del polimorfismo  $CD24^V$  con la presencia de LES en pacientes del CMN “20 de Noviembre” del ISSSTE.

## MATERIAL Y METODOS

Se trata de un estudio piloto de casos y controles en el que se incluyeron pacientes con LES diagnosticados de acuerdo a los criterios de la Academia Americana de Reumatología (anexo 1), que acudieron de manera consecutiva a los servicios de Reumatología y Alergia e Inmunología Clínica del CMN "20 de Noviembre" ISSSTE, durante los meses de Enero y Febrero del 2012 y que fueron invitados a participar previo consentimiento informado (anexo 3); y personas sanas como grupo control que acudieron al banco de sangre de este CMN, cuyas muestras de DNA genómico se encuentran resguardadas en el laboratorio de medicina genómica, ya que fueron utilizadas en un estudio previo (anexo 4). A los pacientes seleccionados se les tomo 3 ml de sangre total en un tubo con EDTA para la extracción de DNA genómico con la técnica utilizada en el laboratorio de medicina genómica que combina el método salino y el de precipitación con cloroformo-alcohol isoamílico (anexo 5), (imagen 1).



Imagen 1 Precipitación de DNA en etanol absoluto

Se cuantificó la concentración de las muestras de DNA obtenidas por espectrofotometría para confirmar que todas tuvieran una concentración promedio de 100 ng/ $\mu$ L. Además se verificó la integridad de los ácidos nucleicos por electroforesis (imagen 2).

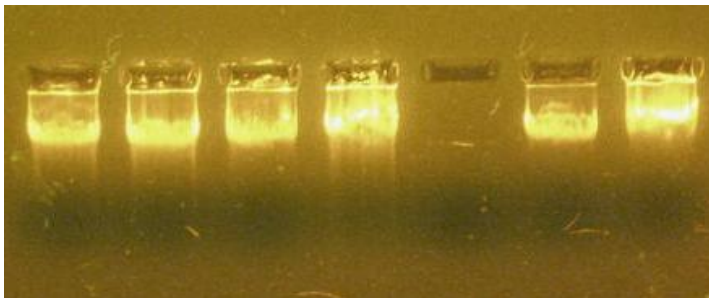


Imagen 2. DNA genómico

Para la genotipificación de CD24<sup>V</sup>, el cual se encuentra en el exón 2, primero se amplificó este exón por PCR (polymerase chain reaction) (imagen 3) de acuerdo a los siguientes parámetros y reactivos:



Imagen 3. Termociclador

Oligonucleótidos	Dirección	Secuencia
Sentido	5' - 3'	TTG TTG CCA CTT GGC ATT TTT GAG GC
Antisentido	3' - 5'	GGA TTG GGT TTA GAA GAT GGG GAA A

	1x	3x
Agua	6.5	19.5
Buffer (10x)	1.25 (1x)	3.75
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.5 (2mM)	1.5
dNTP's (10mM)	0.5 (0.4mM)	1.5
DMSO (100%)	0.6 (5%)	1.8
Fw (10 μM)	0.5 (0.4mM)	1.5
Rv (10 μM)	0.5 (0.4mM)	1.5
Taq Pol (5U/1 μl)	0.15 (1.5U)	0.45
DNA	2.0 ←	----
Vol. Final	12.5 μl	31.5 μl

Condición	Tiempo	Temperatura (°C)
Pre calentamiento	5 min	94
Desnaturalización	60 s	94
Alineamiento	60 s	50
Elongación	60 s	72
<b>35 ciclos</b>		
Extensión final	5 min	72

Se verificó la amplificación del exón 2 de 453 pares de bases (pb), por electroforesis y se visualizó en un transiluminador de rayos UV (imagen 5)

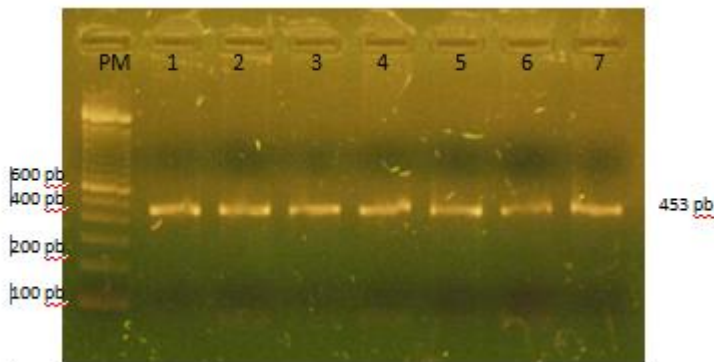


Imagen 5. Exon 2.

Para detectar el polimorfismo en el gen *CD24* se utilizó la enzima de restricción Bst XI. Después de haber corroborado la presencia del DNA en el producto de PCR en un gel de agarosa se realiza la técnica de RFLP, primero se realizara una mezcla de buffer, agua y la enzima Bst XI, para añadir 5µl de esta mezcla a cada tubo eppendorf que contiene 10µl del producto de PCR, para un total de 15µl. Se colocan los tubos eppendorf en el termoblock (imagen 6) a 65°C por 3 horas.

	1x	3x
PCR	10	---
Buffer (10x)	1.5 (1x)	4.5
Bst XI	0.5 (5 u)	1.5
H2O	3.0	9.0
Vol. Final	15 µl	15 µl



Imagen 6. Termoblock

Ya que transcurrió el tiempo señalado, se realiza una electroforesis de las muestras, para observar con cámara de luz UV, el resultado del corte de la enzima, esto nos indicara la genotipificación que tuvo la muestra estudiada para este gen.

Digestión de CD24 con Bst XI- Polim C226T (imagen 7):

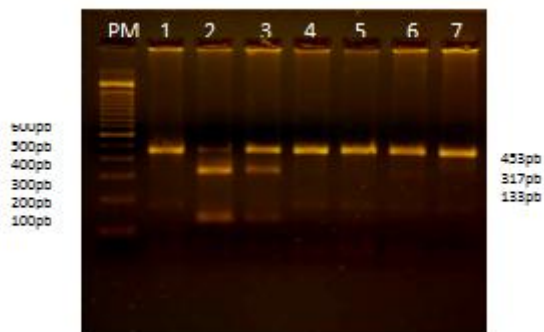


Imagen 7. PCR exón 2 CD24<sup>v</sup>

## RESULTADOS

Durante el período de Enero a Febrero del 2012, se incluyeron en el grupo control 32 pacientes, 9 mujeres (28.12%) y 23 hombres (71.87%), y en el grupo de estudio 33 pacientes, de los cuáles un paciente femenino se eliminó al no obtenerse DNA de la muestra sanguínea, probablemente por conteo linfocítico bajo ( $<500 \text{ cel/mm}^3$ ). La relación mujer:hombre fue de 7:1, 28 fueron mujeres (87.5%) y 4 hombres (12.5%); Con una mediana para edad de  $40 \pm 1$  años, con una media aritmética de 37 años. La distribución por lugar de origen de los pacientes fue: 23 pacientes del D.F., 3 del estado de Morelos, 2 de Oaxaca, 1 de los estados de Veracruz, Chiapas, Guanajuato, Pachuca (cuadro 4); en relación con la presentación clínica del LES lo dividimos como mucocutáneo articular 7 pacientes (21.87%), relacionado con Síndrome antifosfolípido (SAAF) 3 pacientes (9.37%), Hematológica (anemia hemolítica) 1 paciente (3.12%), Vasculitis 3 pacientes (9.37%), Otras presentaciones 2 pacientes (6.25%) (cuadro 5), y en relación a si presentaron o no nefropatía 16 pacientes (50%) (cuadro 6).

Para determinar la presencia de asociación del polimorfismo CD24<sup>V</sup> en los pacientes con LES, se genotipificaron ambos grupos de estudio: En 19 de los pacientes se determinó el genotipo homocigoto silvestre (59.37%), 12 fueron heterocigotos (37.49%), y sólo un paciente homocigoto polimórfico (3.12%); mientras que en los controles, 17 de determinaron heterocigoto silvestre, 14 heterocigotos (43.75%), y un paciente homocigoto polimórfico (3.12%) (cuadro 1). Para establecer la diferencia estadística del polimorfismo CD24<sup>V</sup> con LES, se consideró el alelo polimórfico y normal con relación a los pacientes y controles (cuadro 2) resultando una  $X^2$  de 0.17 que al comparar en tabla con una significancia de 0.05, y un grado de libertad (3.84) con una  $p < 0.05$  y por lo tanto no hay diferencia estadísticamente significativa.

Para comprobar si CD24<sup>V</sup> es un alelo de susceptibilidad a LES, se realizó la prueba de OR (odds ratio), encontrándose: un resultado de 0.84, por lo que la presencia del alelo CD24<sup>V</sup> no representa una susceptibilidad en LES, por el contrario, puede establecerse en este estudio piloto como una probabilidad de estar presente en la población mexicana sin LES.



## DISCUSION Y CONCLUSIONES

El Lupus Eritematoso Sistémico es una de las enfermedades autoinmunes con mayor impacto en la salud a nivel mundial, por la variedad de manifestaciones clínicas y el compromiso de grupos multidisciplinarios para su atención y tratamiento.

Considerando que LES es una enfermedad autoinmune, donde hay participación de interacciones celulares (Cel T, Cel B, Cel presentadoras de antígenos, CD 80, 86, 40L entre otras) con resultado de autoanticuerpos y autoantígenos que modifican la coestimulación de cel. B, el gen CD24 resulta un buen candidato de estudio ya que participa en la estimulación de células T y coestimulación de células B como parte fundamental en la producción de autoanticuerpos en esta entidad; y su SNP funcional CD24<sup>v</sup> se ha determinado en otras poblaciones como un factor predisponente para LES.

En este estudio de pacientes mexicanos, no encontramos diferencias estadísticamente significativa ( $X^2$  0.17) ni se considera un factor de predisposición para LES (OR de 0.84) en comparación con lo reportado por Elena Sánchez y cols, con un OR de 3.16 en población española, 1.54 en una cohorte de pacientes alemanes y de 1.45 en una cohorte de pacientes suecos, y Piotrowski y cols., con un OR de 1.49 en población polaca, claro está, que el tamaño de muestra en promedio de los grupos previamente estudiados incluyeron más de 250 pacientes y más de 300 controles, lo que probablemente modifica nuestros resultados; cabe mencionar que nuestra población tiene mayor diversidad genética que las poblaciones previamente estudiadas.

Es necesario entonces, el estudio con más pacientes y controles para establecer si realmente existe o no asociación del SNP CD24<sup>v</sup> con LES en población mexicana, y sobre todo, determinar si se trata de un alelo de protección como parecen sugerir estos resultados para nuestra población, más que un factor de riesgo. Sería importante también establecer diferencias por la distinta ubicación geográfica de los pacientes entre los grupos estudiados.

Este estudio refuerza la conclusión del realizado en población mexicana sana de la predominancia del alelo silvestre CD24<sup>av</sup>, encontrando que también los pacientes lo presentan con mayor frecuencia.

Sin existir una correlación estadísticamente significativa, la presencia del alelo silvestre CD24<sup>av</sup> estuvo presente en la gravedad de la afectación renal, lo que llevaría a suponer que el SNP CD24<sup>v</sup> se pudiera relacionar a la protección del daño renal.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Benseler Susanne M, Silverman Earl D. Systematic Lupus Erythematosus. *Rheum Dis Clin N Am* 33 (2007) 471–498
- 2.- Sadia Ahmed, MD, Jennifer H. Anolik. B-cell Biology and Related therapies in Systemic Lupus Erythematosus. *Rheum Dis Clin N Am* 36 (2010) 109–130
- 3.- Rojas Espinosa. *Inmunología (de memoria)*. 3ª edición. Editorial Panamericana, 2006: 75-76.
- 4.- Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L, Buckley C, Clark G, Drbal K, Engel P, Hart D, Horejsi V, Isacke C, Macardle P, Malavasi F, Mason D, Olive D, Saalmueller A, Schlossman SF, Schwartz-Albiez R, Simmons P, Tedder TF, Ugucioni M, Warren H. "CD molecules 2005: human differentiation molecules". *Blood* 2005; 106 (9): 3123-6.
- 5.- Bernard A, Boumsell L. Human leukocyte differentiation antigens. *Presse Med* 1984; 13(38): 2311-6.
- 6.- Fiebig H, Behn I, Gruhn R, Typlt H, Kupper H, Ambrosius H. Characterization of a series of monoclonal antibodies against human T cells. *Allerg Immunol* 1984; 30(4): 242-50.
- 7.- Kay R, Rosten PM, Humphries RK. CD24, is a signal transducer modulating B cell responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J immunol* 1991; 147: 1412-1416.
- 8.- Kay R, Takey F, Humphries RK. Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens. *J immunol* 1990; 145: 1952-1959.
- 9.- Yang Liu, Pan Zheng. CD24, a genetic checkpoint in T cell homeostasis and autoimmune disease. *Trends in immunol* 28:315-320
- 10.- Steinman L: Multiple sclerosis: a two stage disease. *Nat. Immunol* 2001; 2: 762-764.
- 11.- Sánchez E, Abelson AK, Sabio J, et al. Association of CD24 gene polymorphism with susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2007; 56(9): 3080-3086.
- 12.- Zarn JA, Jackson DG, Bell MV, Jones T, Weber E, Sheer D, Waibel R, Stahel RA. The small cell lung cancer antigen cluster-4 and the leukocyte antigen CD24 are allelic isoforms of the same gene (CD24) on chromosome band 6q21. *Cytogenet Cell Genet* 1995: 119–125.
- 13.- Jevsek M, Jaworski A, Polo-Parada L, Kim N, Fan J, Landmesser L, Burden S. CD24 is expressed by myofiber synaptic nuclei and regulates synaptic transmission. [Proc Natl Acad Sci U S A](#) 2006; 103(16): 6374-6379.
- 14.- Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA.(1993) *J. Exp. Med.* 177, 57–68.
- 15.- Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D. Genetics, biochemistry and molecular bases of variant human phenotypes. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B. *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8th ed. New York: Mc Graw Hill, 2001; 3-45.

16.- Chesney RW, Friedman A, Kanto WP, Stanton BF, Stull TL. Pediatric practice and education in the genomic/posgenomic era. *J Pediatr* 2002; 141: 453-458.

17.- Subramanian G, Adams MD, Venter JC, Broder S. Implications of the human genome for understanding human biology and medicine. *JAMA* 2001; 286: 2296-2307.

18.- Piotrowski P, Lianeri M, Wudarski M, Łacki J. K., Jagodzinski P. P. CD24 Ala57Val gene polymorphism and the risk of Systemic Lupus Erythematosus. *Tissue Antigens* 2010; **75**: 696–700

19.- Elena Sánchez y cols. Association of a *CD24* Gene Polymorphism With Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2007;56(9):3080–3086

20.- Hernández Sampeien Roberto, Fernández Collado Fernando, Baptista Lucio Pilar. Metodología de la Investigación 3ra. Edición. Mc-Graw-Hill 2003. Pp: 366

21.- Soto Candia Diego, Guido Bayardo Ricardo L., Chima Galán María del Carmen, Vargas Camaño Ma. Eugenia. Frecuencia del Polimorfismo *CD24<sup>v</sup>* en el gen *CD24* en población mexicana clínicamente sana. No. Registro 370-2009.

Cuadro 1

	PACIENTES	%	CONTROLES	%
Homocigoto silvestre	19	59.37	17	53.12
Heterocigoto	12	37.49	14	43.75
Homocigoto polimórfico	1	3.12	1	3.12

		Grupos		
		Pacientes	Controles	Total
Alelos	Polimórfico	14	16	30
	Silvestre	50	48	98
	Total	64	64	128

Cuadro 2.

	PACIENTES		CONTROLES	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
Homocigoto silvestre	3	16	12	5
Heterocigoto	1	11	10	4
Homocigoto polimórfico	0	1	1	0
Total	4	28	23	9

Cuadro 3

Lugar de origen	Número de participantes n=32	%
Distrito Federal (D.F.)	23	71.87
Morelos	3	9.35
Oaxaca	2	6.25
Chiapas	1	3.12
Guanajuato	1	3.12
Pachuca	1	3.12
Veracruz	1	3.12

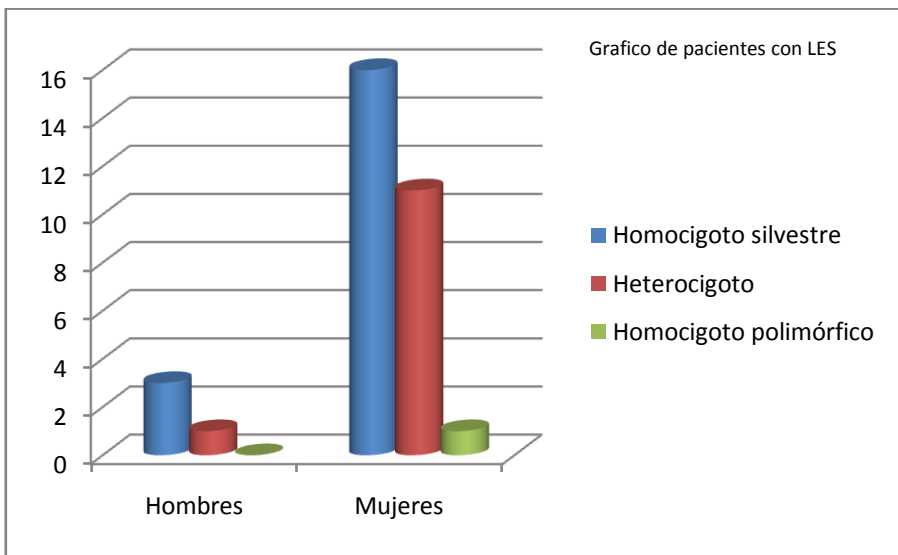
Cuadro 4

Presentación LES	Silvestre	Heterocigoto	Homocigoto polimórfico
Mucocutáneo articular	4	3	0
Anemia hemolítica	1	0	0
SAAF	1	2	0
Vasculitis	1	2	0
Nefropatía	12	3	1
Otros	0	2	0
Total	19	12	1

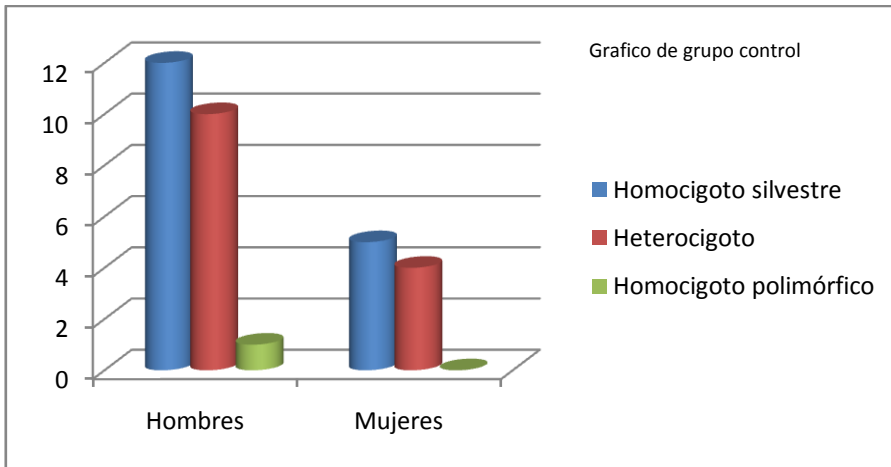
Cuadro 5

Nefropatía por estadio (biopsia renal)	Silvestre		Heterocigoto		Homocigoto polimórfico	
	paciente	%	paciente	%	Paciente	%
Nefropatía I	0	0	1	8.33	0	0
Nefropatía II	6	31.58	1	8.33	0	0
Nefropatía III	2	10.52	0	0	1	100
Nefropatía IV	1	5.26	1	8.33	0	0
Nefropatía V	3	15.78	0	0	0	0
Sin nefropatía	7	36.84	9	75.0	0	0

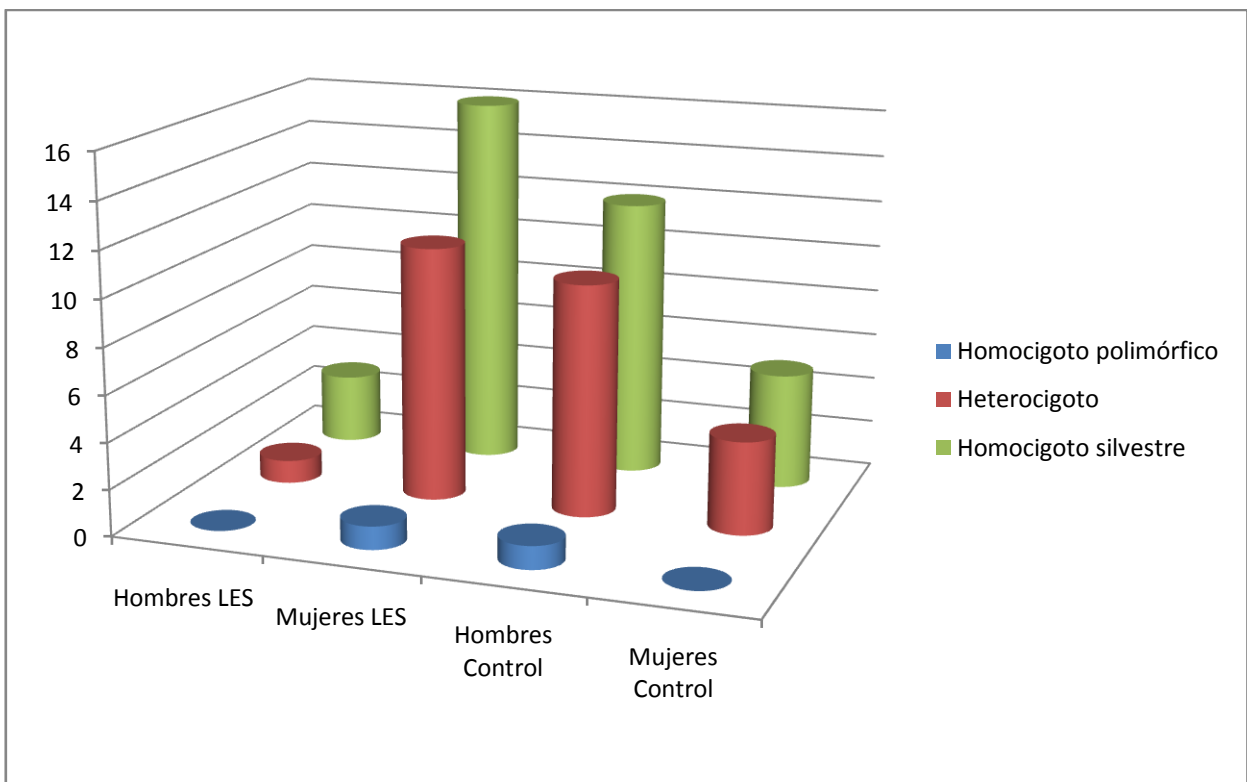
Cuadro 6



Gráfica 1. Distribución de genotipo de acuerdo a género en el grupo de estudio



Gráfica 2. Distribución de genotipo de acuerdo a género en el grupo control



Gráfica 3. Comparación por género y genotipo entre el grupo de estudio y el grupo control

## Anexo 1

CRITERIOS DIAGNOSTICOS PARA LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO	
ERUPCION MALAR	Eritema fijo, plano o alto en la región malar, que tiende a preservarse en los pliegues nasolabiales.
ERUPCION DISCOIDE	Eritema elevado con parches adherentes queratósicos y folicular, cicatrices atróficas en lesiones antiguas.
FOTOSENSIBILIDAD	Eritema como resultado de una reacción inusual a la luz solar por historia del paciente u observación de un médico.
ULCERAS ORALES	Úlceras orales o nasofaríngeas, usualmente dolorosas, observadas por un médico.
ARTRITIS	Artritis no erosiva en dos o más articulaciones con sensibilidad, efusión ó edema.
SEROSITIS	Pleuritis (historia convincente de dolor pleural o frotamiento pericárdico documentado por un médico ó pericarditis evidente) documentado por electrocardiograma, frotamiento o efusión pericárdica.
ALTERACION RENAL	Proteinuria persistente mayor de 0.5 g/dL (ó mayor a 3 +, si no se cuenta con cuantificación) ó cilindros celulares, pueden ser eritrocitos, hemoglobina, tubulares, granulares o mixtas.
ALTERACION NEUROLOGICA	Convulsiones ó Psicosis en ausencia de fármacos causantes ó alteraciones metabólicas ( uremia, cetoacidosis, desequilibrio hidroelectrolítico)
ALTERACION HEMATICA	Anemia hemolítica con reticulocitosis o leucopenia menor de 4000 /mm <sup>3</sup> o linfopenia menor de 1500/mm <sup>3</sup> en dos o más ocasiones, o trombocitopenia menor de 100/000 mm <sup>3</sup> en ausencia de fármacos causantes
ALTERACION INMUNOLOGICA	Preparación celular positiva para Lupus Eritematoso, ó Anticuerpos anti-DNA positivos, ó DNA nativo en títulos anormales, o presencia de antígeno nuclear anti-Sm, o serología falsa/positiva para sífilis conocida 6 meses previos o confirmada por inmovilización de Treponema pallidum o anticuerpos para Troponema por fluorescencia
ANTICUERPOS ANTINUCLEARES	Títulos anormales o anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o estudio equivalente en cualquier punto, y en ausencia de fármacos conocidos asociados que inducen Síndrome de Lupus

**Anexo 2 CEDULA DE RECOLECCION DE DATOS**

N=	Género	Edad	Origen	Escolaridad	Ocupación	Tiempo de Evolución	Comorbilidades
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							
32							



### ANEXO 3



CENTRO MEDICO NACIONAL  
**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES**

México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2011

Yo \_\_\_\_\_ de manera libre y voluntaria DOY MI CONSENTIMIENTO, para participar en el estudio titulado: **“Estudio del polimorfismo  $CD24^V$  en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico del CMN “20 de Noviembre”. Estudio piloto.** De igual manera tengo la libertad de retirarme del mismo, en el momento que lo decida sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto.

Se me ha informado que el estudio ha sido aceptado y aprobado por el Comité de Investigación y la Comisión de Ética en Investigación del Hospital CMN “20 de Noviembre ISSSTE”, donde se realizará la investigación por un período aproximado de 12 meses. Se me ha explicado que el propósito de dicho proyecto es analizar si el polimorfismo genético  $CD24^V$  está relacionado con la susceptibilidad a presentar Lupus Eritematoso Sistémico.

Mi participación en este estudio consistirá en la obtención de datos clínicos que se encuentran en mi expediente, además se tomarán 5 ml de mi sangre, de la que se obtendrá DNA (material de la herencia). Las muestras se almacenaran en el laboratorio de Medicina Genómica, bajo la responsabilidad de los investigadores, por un periodo de 5 años, existiendo la posibilidad de utilizarlas posteriormente en otros estudios relacionados con el Lupus Eritematoso Sistémico y se buscará la presencia del polimorfismo  $CD24^V$ .

También se me ha dado a conocer que existe un riesgo mínimo de hematoma y/o infección por la punción venosa que se realizará para obtener la muestra sanguínea, se me ha dado la seguridad de que la realización de este estudio no pondrá en riesgo mi integridad física ó mental.

Se espera que los resultados de esta investigación permitan conocer algunos aspectos genéticos que participan en el origen del Lupus Eritematoso Sistémico. Los resultados agrupados que deriven del estudio podrán ser presentados en publicaciones y/o foros médicos, protegiendo la identidad de cada paciente, ya que los datos personales, clínicos y derivados de los estudios genéticos de los pacientes serán manejados de forma confidencial y anónima, al codificar el nombre de quien proviene la información.

Nombre del paciente (o representante legal):

Firma:

Dirección:

Teléfono (casa):

Teléfono (trabajo):

Nombre del testigo:

Firma:

Nombre del testigo:

Firma:

Nombre del investigador:

Firma:

En caso de dudas o requerir información adicional en relación con el proyecto de investigación, usted puede contactar con la Dra. María del Carmen Chima G. en el siguiente número telefónico: (55) 52-00-50-03, extensión 14605 o con el Dr. Rubén Darío Jiménez Uscanga a la extensión 14325.

Y si usted quisiera discutir su participación con una persona que no esté directamente involucrado en el proyecto (delegado del comité de ética o persona autorizada) nosotros lo invitamos a contactar con el Dr. Abel Archundia García, Presidente del Comité del Ética en Investigación a la extensión 14629 o con la Dra. Silvia García, Coordinadora de Investigación a la extensión 14609.

## Anexo 4



Subdirección General Médica  
Subdirección de Regulación y Atención Hospitalaria

Departamento de Investigación  
**GUIA PARA LA ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO DE  
INVESTIGACIÓN**



CENTRO MEDICO NACIONAL



### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2009

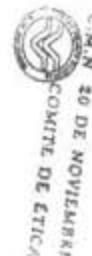
Yo \_\_\_\_\_ de manera libre y voluntaria DOY MI CONSENTIMIENTO, para ingresar al estudio titulado: "FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS EN EL GEN CD24 EN POBLACIÓN MEXICANA CLINICAMENTE SANA", podré retirarme del estudio en el momento en que lo decida sin que ello afecte la atención que recibo del Instituto.

Se me ha informado que el estudio ha sido aceptado y aprobado por el Comité Local de Ética e Investigación Clínica del Hospital CMN "20 de Noviembre ISSSTE", donde se realizará el estudio, por un periodo aproximado de 12 meses. El propósito de este estudio es conocer la frecuencia de los polimorfismos CD24<sup>v</sup> y P1527<sup>del</sup> en población mexicana clínicamente sana, ya que no existen estudios sobre la prevalencia de los polimorfismos CD24<sup>v</sup> y P1527 del gen CD24 en la población mestiza mexicana. La identificación de la frecuencia con que se presentan estas variantes genéticas en los mexicanos permitirá realizar estudios predictivos a grupos de riesgo, así como un diagnóstico más certero, un tratamiento adecuado y oportuno, para un mejor control de los padecimientos autoinmunes, además la estructuración y aplicación de nuevos tratamientos sobre blancos terapéuticos.

Para la realización de esta investigación se tomarán 3 ml de mi sangre, de la que se obtendrá DNA (las muestras se almacenarán en el laboratorio de Medicina Genómica bajo la responsabilidad de los investigadores relacionados en el proyecto, por un periodo de 10 años, existiendo la posibilidad de utilizarlas posteriormente en otros estudios relacionados con enfermedades autoinmunes, después de dicho periodo las muestras serán destruidas).

Estoy consciente que mi participación en este estudio no representa un beneficio directo para mi persona. Los resultados obtenidos servirán para futuras investigaciones relacionadas con factores genéticos asociados a diferentes enfermedades.

Se me ha dado la seguridad de que la realización de este estudio no pondrá en riesgo mi integridad física ó mental, y que los datos obtenidos serán manejados de forma confidencial y anónima, pero que los resultados agrupados que se deriven del mismo, podrán ser presentados en publicaciones o foros científicos y médicos.





Subdirección General Médica  
Subdirección de Regulación y Atención Hospitalaria

*Departamento de Investigación*  
**GUIA PARA LA ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO DE  
INVESTIGACIÓN**



Nombre del participante:

Firma:

Dirección:

Teléfono (casa):

Teléfono (trabajo)

Nombre del testigo:

Firma:

Nombre del testigo:

Firma:

Nombre del investigador: Dr. Diego Soto Candia

Firma:

En caso de dudas o requerir información adicional en relación con el proyecto de investigación, usted puede contactar al Dr. Diego Soto Candia en el número telefónico: (55) 52-00-50-03, extensión 14526 y 14523 (Servicio de Inmunología Clínica y Alergia); o bien a la Dra. María del Carmen Chima Galán al teléfono: (55) 52-00-50-03, extensión 14605 y 14507 (Laboratorio de Medicina Genómica).

Y si usted quisiera discutir su participación con una persona que no esté directamente involucrado en el proyecto (delegado del comité de ética o persona autorizada) nosotros lo invitamos a contactar con el Dr. Abel Archundia García, Presidente del Comité de Ética al teléfono (55) 52-00-50-03, extensión 14629; o bien, a la Coordinación de Investigación del CMN "20 de Noviembre", ISSSTE con la Dra. Silvia García, al teléfono: (55) 52-00-50-03, ext. 14609.



## Anexo 5

### EXTRACCION DE DNA

#### Primera fase

1. 500µl de sangre total en tubo ependorf de 1.5 ml
2. adicionar 500µl de solución de lisis
3. vortexear
4. incubar 30 minutos a 4°C
5. centrifugar a 14,000 rpm por 2 minutos
6. decantar el sobrenadante
7. lavar con 1 ml de solución de lisis
8. vortexear
9. centrifugar a 14,000 rpm x 2 minutos
10. decantar el sobrenadante
11. adicionar 1 ml de solución de lisis
12. vortexear
13. centrifugar a 14,000 rpm por 2 minutos
14. decantar el sobrenadante
15. resuspender el botón en 570µl de NaCl 5.0 mM
16. vortexear
17. adicionar 40µl de SDS al 10%
18. vortexear durante 5 minutos
19. adicionar 200µl de cloruro de sodio saturado
20. vortexear
21. centrifugar 14,000 rpm por 10 minutos
22. recuperar la fase líquida
23. adicionar 600µl cloroformo-alcohol isoamilico 49:1
24. vortexear 2 minutos
25. centrifugar a 14,000 rpm por 6 minutos
26. transferir la fase superior a un frasco conteniendo 5 ml de etanol absoluto frío (-20°C)
27. almacenar toda la noche a -20°C
28. transferir el DNA a un tubo ependorf de 0.5ml que contenga 400µl de etanol 70%
29. centrifugar a 14,000 rpm x 6 minutos
30. decantar el etanol
31. dejar secar el DNA a temperatura ambiente
32. resuspender de acuerdo al botón con agua

#### Segunda fase

1. Con la micropipeta se tomará cuidadosamente el DNA, el cual se transfirió a un microtubo de 0.5 µl que contenía 400 µl de etanol al 70% y se centrifugará a 14,000 RPM por 6 min.
2. Se decantará el etanol y se secará el DNA a temperatura ambiente. Se suspenderá el botón con 100 µl de agua o TE (10:1).