

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE" I.S.S.S.T.E.

No. DE REGISTRO 370-2009

"FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO CD24^V EN EL GEN
CD24 EN POBLACIÓN MEXICANA CLÍNICAMENTE
SANA"

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA

PRESENTA

DR. DIEGO SOTO CANDIA

ASESORES DE TESIS:

DRA. MARIA DEL CARMEN CHIMA GALAN
DRA. MARÍA EUGENIA VARGAS CAMAÑO

PROFESOR TITULAR:

DR. RICARDO LEOPOLDO GUIDO BAYARDO



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.

A G R A D E C I M I E N T O S

A mi esposa

Por su apoyo inagotable, por su amor y por la gran alegría que me ha dado.

A mi hija

Por ser la luz de mi vida.

A mis padres

Por su amor, por sus consejos y por su siempre apoyo incondicional.

A Araceli, José, Ana y Fanny.

Por ser más que mi familia, por estar ahí sin excepciones.

A Marlene, Gaby, Erika, Guillermo y Enrique

Por el gran equipo que logramos.

A mis asesores y a las personas involucradas en este proyecto

Por su invaluable apoyo brindado.

A mis maestros

Por su conocimiento, por tiempo y sobre todo *por su paciencia.*

ÍNDICE

1. Resumen.....	5
2. Antecedentes.....	6
3. Planteamiento del problema.....	11
4. Justificación.....	11
5. Hipótesis.....	11
6. Objetivos.....	12
5.1 Objetivo general.....	12
5.2 Objetivos secundarios.....	12
7. Material y métodos.....	13
7.1 Diseño del estudio.....	13
7.2 Ubicación espacio-temporal.....	13
7.3 Procedimiento.....	13
7.4 Muestreo.....	16
7.4.1 Sujetos de estudio.....	16
7.4.2 Criterios de selección de la muestra.....	16
7.4.2.1 Criterios de inclusión.....	16
7.4.2.2 Criterios de exclusión.....	16
7.4.2.3 Criterios de eliminación.....	16
7.5 Tamaño de la muestra.....	17
7.6 Definición de las variables y escalas de medición.....	17
7.7 Análisis estadístico.....	18
7.8 Consideraciones éticas.....	18
7.9 Cronograma de actividades.....	19
7.10 Logística.....	20

7.10.1 Recursos humanos.....	20
7.10.2 Recursos materiales.....	20
7.10.3 Recursos financieros.....	20
8. Resultados.....	21
9. Discusión y conclusiones.....	23
10. Anexos.....	25
10.1 Carta de consentimiento informado.....	25
10.2 Cuadros y gráficas.....	27
11. Bibliografía.....	30

1. RESUMEN

Antecedentes Científicos

La forma más común de variación del DNA en el genoma humano es el polimorfismo de un solo nucleótido. Los polimorfismos de *CD24* se han asociado al desarrollo de enfermedades autoinmunes, e incluso algunas formas de cáncer. No existen estudios sobre la prevalencia de los polimorfismos $CD24^v$ del gen *CD24* en la población mestiza mexicana.

Objetivo

Identificar la frecuencia del polimorfismo $CD24^v$ en población mexicana clínicamente sana.

Material y Métodos

Se tomaron muestras sanguíneas a personas clínicamente sanas de nacionalidad mexicana que acudieron al Banco de Sangre del CMN "20 de Noviembre" ISSSTE, y se analizaron: la presencia, las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo $CD24^v$ del gen *CD24*.

Resultados.

En el estudio se incluyeron 118 sujetos, de los cuales 77 (65 %) fueron hombres y 41 (35 %) mujeres. Referente a los diferentes genotipos del polimorfismo $CD24^v$ se encontró con mayor frecuencia al homocigoto silvestre, en el 59 % (70 individuos), el heterocigoto en un 40 % (47 sujetos) y un individuo con genotipo homocigoto mutante (1%). Se probó el equilibrio del polimorfismo $CD24^v$ de acuerdo al principio de Hardy-Weinberg, obteniendo un resultado de $\chi^2 = 5.2291$, con una $p = 0.0732$.

Conclusiones.

El polimorfismo $CD24^v$ más frecuente fue el homocigoto silvestre. En este estudio la distribución del polimorfismo $CD24^v$ no se encontró en equilibrio, de acuerdo a la Ley de Hardy-Weinberg. El conocimiento de la frecuencia de este polimorfismo en *CD24* determinará su utilidad en estudios de asociación genética, sobre todo en enfermedades autoinmunes.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la frecuencia alélica del polimorfismo CD24^v en la población mexicana clínicamente sana?

2. ANTECEDENTES CIENTIFICOS

Tradicionalmente, y desde sus inicios a partir de la aplicación de las Leyes de Méndel a las enfermedades humanas, la Genética Clínica o Genética Médica se ha dedicado principalmente al estudio de enfermedades monogénicas raras y de desórdenes cromosómicos. El gran avance en los últimos años, en particular el generado por el Proyecto Genoma Humano (PGH), está extendiendo los alcances de esta disciplina a las enfermedades comunes, lo que pronto cambiará nuestros conceptos de la práctica clínica. Actualmente hemos entrado a un periodo de transición entre la era genómica y la posgenómica, en la cual el conocimiento genético será una herramienta crítica para poder proporcionar una atención médica adecuada. ^[1,2]

Si la genética es la ciencia que se ocupa del estudio de la herencia, sus mecanismos y consecuencias, la genómica es el campo o área de la genética que se encarga de los estudios estructurales y funcionales del genoma. La principal diferencia con la genética es que no estudia la función y consecuencias de un gen en particular, sino la de todos los genes y las interacciones entre ellos. ^[3,4] La medicina genómica puede ser definida como el uso del análisis genotípico para incrementar la calidad de la atención médica, incluyendo la identificación presintomática de susceptibilidad a la enfermedad, las intervenciones preventivas, la selección de la farmacoterapia y el diseño de un tratamiento personalizado con base en el genotipo de cada individuo. ^[5]

Un concepto tradicional de la genética médica es que la enfermedad genética es únicamente la manifestación más obvia y frecuentemente más extrema de las diferencias genéticas, sobrepuestas a un genoma enteramente dentro de la variabilidad genética normal. Sin embargo, el concepto de enfermedad genética debe ampliarse para abarcar a las enfermedades multifactoriales, de las cuales siempre se ha aceptado que tienen un componente genético. ^[2]

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). Dicho de manera sencilla, un SNP es la sustitución de una base púrica o pirimídica por otra en una determinada posición de la cadena de DNA. Generalmente, los SNP son bialélicos, es decir, existen sólo dos formas alternativas para determinado gene en locus específico, en una población. La definición de una mutación, como un cambio heredable en la secuencia de nucleótidos del DNA que puede afectar el fenotipo, puede ser algo arbitrario y relativo. 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. La neutralidad suele inferirse cuando un SNP no afecta a la proteína codificada. Por ejemplo, un cambio de un nucleótido en un exón que no modifica el aminoácido o cae dentro de la redundancia del código genético; mientras que, si codifica para un aminoácido diferente o produce un codón de alto (la proteína presentaría diferencias estructurales o estaría truncada), sería una mutación. 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 en diferentes sitios del genoma, sin lo cual no se expresa el fenotipo anormal. ^[6,7,8]

Las siglas CD, "cluster of differentiation" en inglés (grupo de moléculas de diferenciación) es un protocolo usado para la identificación e investigación de moléculas de superficie celular presentes en los leucocitos. Las moléculas CD pueden actuar de numerosas maneras, con frecuencia actúan como receptores o ligandos celulares, lo que puede potencialmente iniciar una señal en cascada, alterando el comportamiento celular. Algunas proteínas no juegan un rol de señalización celular, pero tienen otras funciones, tales como la adhesión celular. ^[9,10]

La nomenclatura CD fue propuesta y establecida en la Primera Conferencia y Taller Internacional sobre Diferenciación de Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA), que se celebró en París en 1982. Este sistema estaba destinado para la clasificación de muchos anticuerpos monoclonales generados en diferentes laboratorios alrededor del mundo contra epítomos

sobre moléculas de superficie de los leucocitos. Desde entonces, se ha expandido a muchos otros tipos celulares, y más de 320 CD han sido identificados. Es importante señalar que, mientras las moléculas CD son muy útiles en la definición de leucocitos, no son meramente marcadores de superficie celular, como por ejemplo las moléculas CD4 y CD8, que son fundamentales en el reconocimiento de antígenos. ^[11,12]

Históricamente al final de los años 70s, una glicoproteína con una estructura similar a lípidos, soluble en solventes orgánicos y termo-estable, fue identificada, y nombrada J11d/M1.69 o antígeno termoestable (ATE en ratón; CD24 en humanos). En 1990, el gen de ATE fue secuenciado y se descubrió que está compuesto por solo 27 aminoácidos.^[13] Casi de inmediato, la molécula homóloga en el humano fue identificada como *CD24*. ^[14] La comparación con la estructura primaria reveló varios sitios potenciales de glucosilación de ligandos O ó N. Progresivamente a *CD24* se le ha descubierto que cerca de la mitad de sus aminoácidos son compuestos de residuos de serina y treonina, que son sitios potenciales de unión para glicanos O, representando a un tipo de molécula de mucina. Se asume que los sitios de glucosilación ligados a O han emergido en la mitad de la molécula N-terminal, creando una molécula densamente empaquetada de glicanos en el extremo de la molécula. Los sitios de glucosilación adicionales están ubicados en la superficie de la membrana.

Estudios bioquímicos han demostrado que la glucosilación de *CD24* es altamente variable y dependiente del tipo de célula. En ratones y en humanos varios genes *CD24* se han identificado, todos de los cuales excepto uno, parecen ser pseudogenes. El gen humano *CD24* localizado en el cromosoma 6q21, despliega un polimorfismo alélico 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. ^[15,16]

A pesar de su utilidad como un marcador de diferenciación, la función de *CD24* permanece oculta. La remoción del gen *CD24* en células madre embrionarias de ratones fueron viables y exhibieron un leve bloqueo en la

linfopoyesis para células B, sugiriendo que la maduración de dichas células es influenciada por la expresión de CD24. Al disminuir la expresión de CD24 en los eritrocitos, hubo una disminución de su vida media, una mayor tendencia para la agregación y una mayor susceptibilidad para la lisis hipotónica. ^[17] La expresión ectópica de CD24 en linfocitos T conlleva a una mejor estimulación de linfocitos durante la respuesta inmune secundaria. La sobreexpresión de CD24 en linfocitos ha sugerido que los niveles de CD24 pueden determinar la capacidad de supervivencia y de proliferación en progenitores linfoides T y B. Estudios con anticuerpos mostraron que la unión covalente con CD24 induce apoptosis en precursores de células B y la supresión de anti-CD40 induce proliferación de linfocitos B maduros en reposo. ^[18,19] Recientemente, también se descubrió la inducción de apoptosis por la vía anti-CD24 en células humanas del Linfoma de Burkitt. ^[8] Además, se considera que CD24 participa en la regulación de la proliferación de linfocitos T. En algunos estudios, se han usado anticuerpos durante un proceso infeccioso, CD24 fue identificada como una importante molécula co-estimuladora, aunque su ligando en linfocitos T aún es desconocida. ^[20]

Hasta ahora, solo se ha identificado a P-selectina como ligando de CD24, además se sabe que en condiciones fisiológicas CD24 es capaz de soportar la adhesión de neutrófilos a plaquetas o células endoteliales activadas. ^[21] Estos hechos pueden ser importantes para la progresión de metástasis tumorales, ya que CD24 se expresa en muchas células de carcinomas humanos. ^[22]

Se ha demostrado que CD24 se expresa en una variedad de tipos celulares involucrados en padecimientos autoinmunes, como en esclerosis múltiple (EM) y en lupus eritematoso sistémico. ^[23,24] Las células que lo pueden presentar y que participan en la patogénesis de EM incluyen células T activadas, células B, macrófagos, células dendríticas, y células locales presentadoras de antígeno en el sistema nervioso central (SNC), tales como células endoteliales, vasculares, astrocitos y microglia. ^[25,26,27] Está bien establecido que en el ratón, CD24 media una vía co-estimuladora independiente de CD28 que promueve la activación de células T, CD4 y CD8.

[28,29] Además, se ha demostrado que CD24 modula la interacción entre el antígeno muy tardío 4- molécula de adhesión 1 fibronectina-vascular (VLA-4-FVCAM-1), que se requiere para la migración de células T al SNC, lo que promueve el desarrollo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en el ratón.^[30,31]

CD24 ha mostrado ser esencial en la inducción de EAE en ratones^[32] ya que controla un punto crítico de la patogénesis después de que se producen las células T autorreactivas.^[33] El gen *CD24* humano tiene un SNP, que resulta en un reemplazo no conservador de alanina a valina (CD24v), que precede inmediatamente al sitio de anclaje GPI (posición ω -1).^[34]

Estudios poblacionales, han demostrado la asociación de CD24v con la EM: Zhou encontró que el polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP) CD24^{v/v}, se asocia con mayor susceptibilidad y con una progresión más rápida de la EM en pacientes estadounidenses^[35].

Actualmente las enfermedades crónicas, infecciosas y degenerativas son las principales causas de mortalidad en México.^[36] Estos problemas de salud representan una seria carga financiera para el estado, es así que resulta fundamental el desarrollo de nuevas estrategias para la prevención y para el diagnóstico temprano, así como tratamientos más efectivos, que permitan reducir los costos de atención a la salud, disminuir la morbi-mortalidad y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Recientemente una nueva práctica de la Medicina, la Medicina Genómica, que se encarga de identificar las variantes genómicas (perfil genotípico) que confieren susceptibilidad o resistencia al desarrollo de enfermedades, en poblaciones o grupos específicos, permitirá mejorar la calidad de atención médica, al identificar a los grupos de riesgo. Sin embargo, la población mexicana tiene una estructura genética particular, que aún no se conoce en su totalidad, de manera que resulta primordial identificar las variantes genéticas que caracterizan a nuestra población.^[37]

4. JUSTIFICACIÓN

No existen estudios sobre la prevalencia de los polimorfismos $CD24^V$ del gen $CD24$ en la población mestiza mexicana. Los polimorfismos de $CD24$ se han asociado por una parte, al desarrollo y a la evolución de enfermedades autoinmunes, y con la protección contra estas, respectivamente. 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. Todo lo cual, redundará en una mejor atención para los pacientes del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

5. HIPOTESIS

Hipótesis de Investigación (H_1)

Se desconoce la frecuencia del gen $CD24$ en población mexicana.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar la frecuencia del polimorfismo CD24^v en población mexicana clínicamente sana.

6.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Identificar la presencia del polimorfismo CD24^v del gen *CD24* en población mexicana clínicamente sana.
2. Obtener las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo CD24^v en población mexicana clínicamente sana.
3. Conocer la correlación de la presencia de los polimorfismos del gen *CD24* con variables demográficas como: género y lugar de origen.

7. MATERIAL Y METODOS

7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Observacional

Transversal

Descriptivo

Prospectivo

Abierto

7.2 UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL

El estudio se realizó en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del I.S.S.S.T.E., en el periodo comprendido entre marzo y junio del 2009. Las muestras se obtuvieron de las personas que acudieron como donadoras del Banco de Sangre y que aceptaron participar en el estudio; y el procesamiento de muestras se realizó en el Laboratorio de Medicina Genómica de este hospital.

7.3 PROCEDIMIENTO

Previo consentimiento informado (Anexo 1) y llenado de la cédula de recolección de datos (Anexo 2), a las personas se les tomaron 3 ml de sangre periférica, para la extracción de DNA (a través de un método salino), de acuerdo al siguiente procedimiento:

PRIMERA FASE

1. Se transfirieron 500 μ l de sangre total en un microtubo de 1.5 ml, al que se adicionaron 500 μ l de solución de lisis y se mezcló en vortex
2. Se incubó durante 30 min a 4°C
3. Se centrifugó a 14,000 RPM por 2 min y se decantó el sobrenadante
4. Se lavó con 1 ml de solución de lisis y se resuspendió el botón
5. Se centrifugó nuevamente a 14,000 RPM por 2 min y se decantó el sobrenadante
6. Se adicionó 1 ml de solución salina y se resuspendió
7. Se centrifugó otra vez a 14,000 RPM por 2 min y se decantó el sobrenadante
8. Se resuspendió el botón en 570 μ l de NaCl 5.0 mM y se agregaron 40 μ l de SDS al 10%
9. Se agitó por 5 min, se añadieron 200 μ l de NaCl saturado y se mezcló
10. Se centrifugó a 14,000 RPM por 10 min
11. Se recuperó la fase líquida
12. Se adicionaron 600 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1 y se agitó por 2 min
13. Se centrifugó a 14,000 RPM por 6 min
14. Se transfirió la fase superior a un frasco con 5 ml de etanol absoluto frío (-20 ° C)
15. Se almacenó toda la noche (o 2 hrs) a -20°C

SEGUNDA FASE

1. Con la micropipeta se tomó cuidadosamente el DNA, el cual se transfirió a un microtubo de 0.5 μ l que contenía 400 μ l de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 RPM por 6 min.
2. Se decantó el etanol y se secó el DNA a temperatura ambiente. Se resuspendió el botón con 100 μ l de agua o TE (10:1).

El fragmento de DNA que contiene el polimorfismo CD24^V se amplificó por PCR (por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction)). Los oligonucleótidos y condiciones de la reacción se muestran a continuación:

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

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

Los productos de PCR se colocaron en un gel de agarosa al 2% teñido con BrEt (bromuro de etidio) a una concentración menor de 5 µg/µl y se separaron en base al desplazamiento del DNA cargado negativamente en un campo eléctrico. El tamaño del fragmento esperado es de 453 pares de bases y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.

El cambio de C por T produce un sitio de corte para la enzima de restricción *Bst*XI en el nucleótido 215, lo que permitió diferenciar dos alelos (normal y polimórfico) mediante el análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP's). Para lo cual se colocó el producto de PCR y la enzima de restricción *Bst*XI en un microtubo, para su incubación a 50° durante 16 horas. Los productos digeridos se separaron en un gel de agarosa al 2.5%.

El alelo polimórfico T226 se dividió en 2 fragmentos (de 317 y 136 pares de bases), mientras que el alelo C226 (normal) fue resistente al corte. La combinación de los dos tipos de productos indicó la heterocigocidad en el sujeto estudiado, y la presencia del polimorfismo en ambos alelos, homocigocidad.

7.4 MUESTREO

7.4.1 SUJETOS DE ESTUDIO

Personas que acudieron a donar al Banco de Sangre del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del I.S.S.S.T.E. y que cumplieron los criterios de selección.

7.4.2 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

7.4.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Mujeres y hombres de 18 a 65 años de edad
- Que tengan padres y abuelos mexicanos
- Personas clínicamente sanas
- Haber nacido en la República Mexicana
- Aceptar voluntariamente participar en el estudio (firmar hoja de consentimiento informado)

7.4.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Personas con parentesco entre sí.
- Antecedentes hereditarios de enfermedad autoinmune y/o neurológica.

7.4.2.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

- Muestras insuficientes para realizar el estudio molecular e inmunológico

7.5 TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra se determinó con muestreo no probabilístico, ya que se seleccionaron los individuos de acuerdo a la definición de polimorfismo genético: cambio nucleotídico que no confiere alteraciones estructurales ni funcionales en la proteína, con una frecuencia de al menos 1% en la población (muestra por criterios). Por lo que al menos se requería de 100 personas. Se estudiaron 118 individuos.

7.6 DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y ESCALAS DE MEDICION

Variable Independiente:

Género

Variable dependiente:

Polimorfismo CD24^v en el gen *CD24*

Nombre	Definición operativa	Tipo de variable	Clasificación	Fuente de datos
GENERO	Característica biológica que diferencia hombre-mujer	Cualitativa	Masculino Femenino	Cédula de registro.
Polimorfismos CD24 ^v del gen <i>CD24</i>	Variación en la secuencia del gen <i>CD24</i> , el cual es una sialoglicoproteína de la membrana del linfocito B unida a Glicosilfosfaftidilinositol	Cualitativa	Presente Ausente	Cédula de registro.

7.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el análisis de los resultados se aplicaron pruebas de estadística descriptiva para cada variable, como distribución de frecuencias, medidas de tendencia central y de variabilidad. La distribución de los diferentes genotipos (alelos) en cada grupo, se analizó a través de Equilibrio de Hardy-Weinberg.

7.8 CONSIDERACIONES ETICAS

Dado que se trató de una investigación en seres humanos se cumplió con los principios éticos necesarios para su realización, para lo cual se presentó una carta de Consentimiento Informado a los participantes del estudio, que garantizó los principios de autonomía, no maleficencia y confidencialidad de la información clínica y genética individual, con base en la Ley General de Salud (Artículos 22-27, 34-56 y 100), la Declaración Universal sobre el Genoma y Derechos Humanos, promulgada por la UNESCO en 2003, el informe Belmont de guías éticas para la protección de los sujetos humanos de investigación biomédica y la Declaración de Helsinki modificada en la 52^a Asamblea General en Edimburgo Escocia, Octubre 2000, nota de Clarificación sobre el párrafo 29, añadida por la Asamblea General, Washington, 2002.

El protocolo fue sometido para su aprobación por el Comité de Investigación y de Ética del CMN “20 de Noviembre”, ISSSTE. (Anexo 1 Carta de Consentimiento Informado)

7.9 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Marzo 2009	Abril 2009	Mayo 2009	Junio 2009
Entrega de protocolo de investigación	X			
Selección de controles y recolección de datos y muestras	X			
Extracción y cuantificación de DNA		X		
Estandarización y desarrollo de técnicas moleculares		X		
Análisis estadístico de los datos epidemiológicos y moleculares			X	
Escritura de tesis			X	
Impresión y entrega de tesis final				X
Escritura del artículo y envío a revista indexada				X

7.10 LOGÍSTICA

7.10.1 RECURSOS HUMANOS

La realización del presente protocolo de investigación, requirió de la participación de médicos, químicos y biólogos, capacitados en las diferentes técnicas moleculares y sus aplicaciones; así como en el análisis de resultados. El tiempo fue variable en la participación de cada uno de los mencionados, con el plan de seguir el cronograma establecido.

7.10.2 RECURSOS MATERIALES

- Libreta de registro de pacientes
- Hoja de recolección de datos
- Lápices
- Computadora (Excel, Word)
- Equipo necesario del laboratorio de Medicina Genómica:
 - Microcentrífuga
 - Vortex
 - Termociclador de gradiente de punto final.
 - Pipetas de presión positiva de diferentes rangos.
 - Cámaras electroforéticas horizontales.
 - Transiluminador de luz ultravioleta
 - Secuenciador Beckman-Coulter

7.10.3 RECURSOS FINANCIEROS

Principalmente los asignados por el fondo FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE y los destinados a los servicios de Medicina Genómica, Neurología e Inmunología Clínica y Alergia.

Esta investigación requirió de consumibles y reactivos para el desarrollo de las técnicas de Biología Molecular como extracción de DNA, PCR, RFLP's y secuenciación, con un costo aproximado de \$25,000.00 M.N.

9. DISCUSION

Este es el primer estudio de la frecuencia del polimorfismo CD24^v del gen *CD24* en la población mestiza mexicana clínicamente sana; en el que se incluyeron individuos no relacionados, nacidos en la República Mexicana, con padres y abuelos mexicanos, con el propósito de asegurar que los alelos fueran de origen mexicano. Donde se obtuvo como proporción del genotipo más frecuente al homocigoto silvestre (0.59), seguido del heterocigoto (0.4) y finalmente el homocigoto mutante en 0.01.

En relación al género, también predominó el genotipo homocigoto silvestre tanto en hombres como en mujeres, sin embargo, el porcentaje fue mayor en las mujeres con un 70%, y en los hombres en el 52.56 %. En el caso del genotipo heterocigoto se identificó mayor frecuencia en hombres con relación a las mujeres (47 vs 29.5 %). El único caso con el genotipo homocigoto mutante se presentó en una mujer.

En lo que respecta a la frecuencia alélica, el alelo homocigoto mutante se encontró en una proporción de 0.21, y el silvestre a la proporción restante de 0.79.

En genética de poblaciones el principio de Hardy-Weinberg establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio, mientras no actúe la selección natural ni otro factor que provoque mutación. ^[38] La ley de Hardy-Weinberg afirma que bajo ciertas condiciones, tras una generación de apareamiento al azar las frecuencias de los genotipos de un gen individual se fijan en un valor de equilibrio particular que se representan como una función sencilla de frecuencias: la frecuencia genotípica para el homocigoto dominante CCp^2 , la del heterocigoto CT es $2pq$ y la del homocigoto recesivo en este caso homocigoto mutante TT es q^2 . Donde “p” es el alelo normal y “q” el alelo mutante. ^[39]

Las poblaciones en equilibrio alélico son idealizadas porque requieren de condiciones como apareamiento aleatorio, tamaño infinito y que no exista selección, mutación ni migración. ^[40]

En este estudio la distribución del polimorfismo CD24^V no se encontró en equilibrio, de acuerdo a la Ley de Hardy-Weinberg, probablemente por ser para este tipo de estudios una muestra pequeña de la población. Las poblaciones pequeñas presentan un cambio aleatorio en las frecuencias genotípicas, debido al defecto de muestreo y a la deriva génica.

No obstante, el estudio muestra un precedente de la presencia de este polimorfismo en estado homocigoto, por lo que deberá considerarse el análisis de un mayor número de individuos, con lo que se podría corroborar por una parte la frecuencia alélica del polimorfismo y por otra, si esta variante genética se encuentra distribuida de forma equilibrada en nuestra población o no.

El conocimiento de la frecuencia de este polimorfismo en *CD24* podrá determinar su utilidad en estudios de asociación genética, sobre todo en enfermedades autoinmunes.

Los resultados del estudio forman parte de los avances logrados a la fecha del proyecto: "IDENTIFICACION DE POLIMORFISMOS GENETICOS DE CD24 ASOCIADOS A LA DISFUNCION NEUROLOGICA EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MULTIPLE"- C01-69809, apoyado por los fondos en salud 2007 del CONACYT.

Conclusiones.

El polimorfismo $CD24^V$ más frecuente fue el homocigoto silvestre. En este estudio la distribución del polimorfismo $CD24^V$ no se encontró en equilibrio, de acuerdo a la Ley de Hardy-Weinberg. El conocimiento de la frecuencia de este polimorfismo en *CD24* determinará su utilidad en estudios de asociación genética, sobre todo en enfermedades autoinmunes.

10. ANEXOS

10.1 Carta de Consentimiento Informado.



Subdirección General Médica
Subdirección de Regulación y Atención Hospitalaria

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



Anexo 1



CENTRO MEDICO NACIONAL



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D.F. a _____ de _____ del 2009

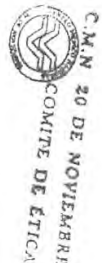
Yo _____ de manera libre y voluntaria DOY MI CONSENTIMIENTO, para ingresar al estudio titulado: "**FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS EN EL GEN CD24 EN POBLACIÓN MEXICANA CLINICAMENTE SANA**", podré retirarme del estudio en el momento en que lo decida sin que ello afecte la atención que recibo del Instituto.

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 período aproximado de 12 meses. El propósito de este estudio es conocer la frecuencia de los polimorfismos CD24^v y P1527^{del} en población mexicana clínicamente sana, ya que no existen estudios sobre la prevalencia de los polimorfismos CD24^v 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 período 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.

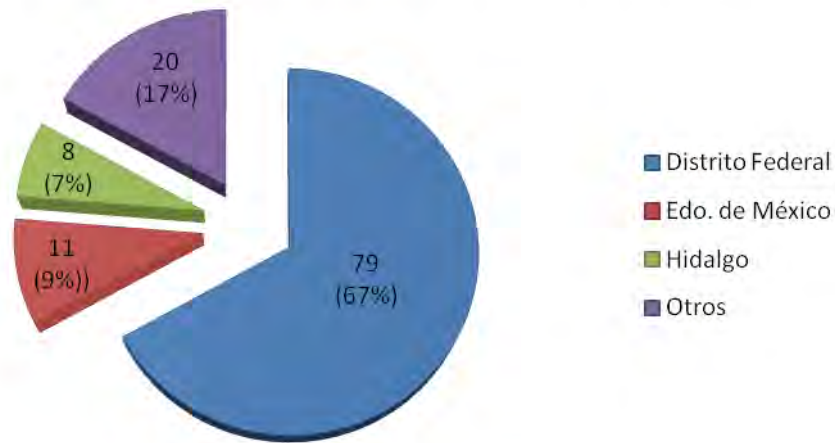


10.2. Cuadros y gráficas.

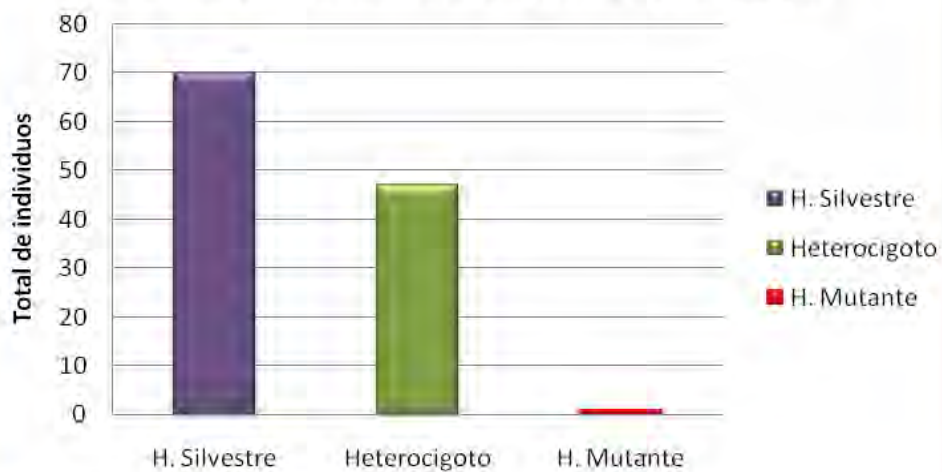
Cuadro 1. Características de los individuos	
Total	118
Mujeres (%)	41 (35)
Hombres (%)	77 (65)
Edad (años)*	34.18 ± 10.71
Rango de edad, en años	18 – 64
* Los valores se expresan en media y desviación estándar.	

Cuadro 2. Polimorfismo de <i>CD24</i> por lugar de origen (%)			
Origen	Homocigoto silvestre	Heterocigoto	Homocigoto mutante
Distrito Federal	46 (39)	32 (27)	1 (1)
Edo de México	9(7.63)	2 (1.7)	0
Otros	15 (12.7)	13 (11.1)	0

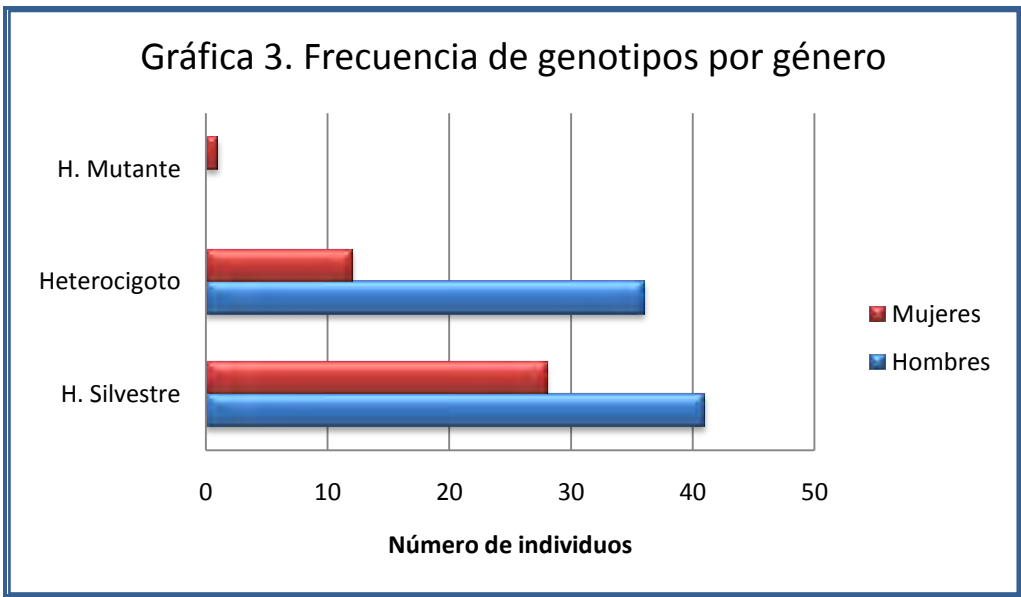
Gráfica 1. Total de participantes según su origen



Gráfica 2. Frecuencia de genotipos CD24^v



Gráfica 3. Frecuencia de genotipos por género



11. BIBLIOGRAFIA

1.- Green ED. The Human Genome Project and its impact on the study of human disease. 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; 259-298.

2.- Cervantes PA. Genómica, medicina y sociedad. Rev Med Hosp Gen Mex 2003; 66 (4): 224-234.

3.- McKusick VA, Ruddle FH. A new discipline, a new name, a new journal. Genomics 1987; 1: 1-2.

4.- Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine – a primer. N Engl J Med 2002; 34: 1512-1520.

5.- Collins FS, Guttmacher AE. Genetics moves into the medical mainstream. JAMA 2001; 286: 2322-2324.

6.- 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.

7.- 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.

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

9.- Rojas Espinosa. Inmunología (de memoria). 3ª edición. Editorial Panamericana, 2006: 75-76.

10.- 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.

11.- Bernard A, Boumsell L. Human leukocyte differentiation antigens. *Presse Med* 1984; 13(38): 2311-6.

12.- 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.

13.- Kay R, Takey F, Humphries RK. Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens. *J Immunol* 1990; 145: 1952-1959.

14.- 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.

15.- 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.

16.- 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): 6374-9.

17.- Nielsen PJ, Lorenz B, Muller AM, Wenger RH, Brombacher F, Simon M, von der Weid T, Langhorne WJ, Mossmann H, Kohler G. Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice. *Blood* 1997; 89: 1058–1067.

- 18.- Chappel MS, Hough MR, Mittel A, Takei F, Kay R, Humphries RK. C ross-linking the murine heat-stable antigen induces apoptosis in B cell precursors and suppresses the anti-CD40-induced proliferation of mature resting B lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 184: 1638–1649.
- 19.- Suzuki T, Kiyokawa N, Taguchi T, Sekino T, Katagiri Y, Fujimoto J. CD 24 induces apoptosis in humen B cells via the glycolipid-enriched membrane domains/rafts-mediated signaling system. *The Journal of Immunology* 2001; 166: 5567-5577.
- 20.- Liu Y, Jones B, Aruffo A, Sullivan KM, Linsley PS, Janeway Jr CA. Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J Exp Med* 1992; 175: 437–445.
- 21.- Lim SC. CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2005; 59: S351-S354.
- 22.- Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *Journal of Molecular Histology* 2004;35; 255-262.
- 23.- 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.
- 24.- Steinman L: Multiple sclerosis: a two stage disease. *Nat. Immunol* 2001; 2: 762-764.
- 25.- Hubbe M, Altevogt P. *Eur. J. Immunol* 1994; 24: 731–737.
- 26.- Zhou Q, Wu Y, Nielsen PJ, Liu Y. *Eur. J. Immunol* 1997; 27: 2524-2528.

- 27.- Roncarolo MG, Levings, MK. The role of different subsets of T regulatory cells controlling autoimmunity. *Curr Op Immunol* 2001; 12: 676-683.
- 28.- De Bruijn ML, Peterson PA, Jackson MR. *J. Immunol* 1996; 156: 2686-2692.
- 29.- Enk AH, Katz SI. *J. Immunol* 1994 ; 152: 3264–3270.
- 30.- Liu Y, Wenger RH, Zhao M, Nielsen PJ. *J. Exp. Med* 1997; 185: 251–262.
- 31.- Wu Y, Zhou Q, Zheng P, Liu Y. *J. Exp. Med* 1998; 187: 1151–1156.
- 32.- Bai XF, Liu JQ, Liu X, Guo Y, Cox K, Wen J, Zheng P, Liu Y. *J. Clin. Invest* 2000. 105, 1227–1232.
- 33.- Hahne M, Wenger RH, Vestweber D, Nielsen PJ. *J. Exp. Med* 1994; 179: 1391–1395.
- 34.- Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA.(1993) *J. Exp. Med.* 177, 57–68.
- 35.- Zhou Q, Rammohan K, Lin S, Zhou R, Rammohan K, Lin S, et al. CD24 is a genetic modifier for risk and progression of multiple sclerosis. [Proc Natl Acad Sci U S A](#) 2003; 100(25): 15041-15046.
- 36.- Roncarolo MG, Levings, MK. The role of different subsets of T regulatory cells controlling autoimmunity *Curr Op Immunol* 2001; 12: 676-683.
- 37.- Secretaría de Salud, Estadísticas y evaluación, Principales causas de muerte 2001 (www.ssa.gob.mx)
- 38.- Castle W. E. The laws of Galton and Mendel and some laws governing race improvement by selection. *Proc. Amer. Acad. Arts. Sci.* 1903; 35: 233-242.

39.- Iniesta R, Guiñó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Gac Sanit 2005; 19(4):333-41.

40.- Crow J.F. Hardy, Weinberg and language impediments. Genetics 1999; 152: 821-825.