



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES DE LAS
METALOPROTEASAS (MMPs) 1 Y 3 EN PACIENTES CON
INFARTO AL MIOCARDIO

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

RICARDO ORTÍZ ALARCÓN



DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ MANUEL RODRIGUÉZ PÉREZ

ASESOR DE TESIS:
DRA. RAQUEL RETANA UGALDE

2014

Esta tesis la dedicado con mucho respeto y admiración a mis padres, mi hermano y a Angélica Barrios como una pequeña prueba de mi gratitud por el cariño e inmenso apoyo que me han brindado... los Amo

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. José Manuel Rodríguez Pérez** por darme la confianza, la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y por apoyarme constantemente en la realización de esta tesis.

A la **Dr. Nonanzit Pérez Hernández** por sus consejos y enseñanzas durante la realización del proyecto.

A la **Dr. Raquel Retana Ugalde** por apoyarme infinitamente y guiarme durante mi formación profesional, así como brindarme el tiempo para la mejora de esta tesis.

A la **Q.F.B. Patricia Vidal Millán** por ser una excelente profesora que incentivo mi gusto por el área bioquímica clínica y por mostrarme que la pasión es la clave del éxito.

Al **Q.F.B. Francisco Javier Parada García** y al **M. en C. Rodrigo Anibal Mateos Nava** por el tiempo dedicado a la lectura y revisión del presente trabajo.

Finalmente, pero no menos importantes a **Paola Ojeda** y **Emmanuel López** por su gran apoyo y comprensión pero sobre todo por su amistad, los quiero mucho.

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE CUADROS	3
A. RESUMEN	4
B. INTRODUCCIÓN.....	5
C. MARCO TEÓRICO.....	7
C.1 Cardiopatía isquémica e infarto al miocardio	7
C.1.1 Fisiopatología	11
C.2 Matriz extracelular (MEC)	15
C.3 Metaloproteasas de matriz (MMPs)	17
C.3.1 Papel de las MMPs en aterosclerosis	20
C.4 Metaloproteasa de matriz-1/Colagenasa intersticial.....	22
C.4.1 Estructura	23
C.4.2 Síntesis y regulación	24
C.4.3 Función biológica.....	27
C.4.4 Polimorfismo de estudio	27
C.5 Metaloproteasa de matriz-3/Estromelisin-1.....	28
C.5.1 Estructura	29
C.5.2 Síntesis y regulación	30
C.5.3 Función biológica.....	32
C.5.4 Polimorfismo de estudio	33
D. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
E. HIPÓTESIS	36
F. OBJETIVOS	37
F.1 Objetivo general:.....	37
F.2 Objetivos específicos:.....	37
G. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	38
G.1 Tipo de estudio	38
G.2 Población de estudio	38

G.3 Variables	40
G.4 Metodología.....	41
<i>G.4.1 Extracción de ADN</i>	41
<i>G.4.2 Cuantificación de ADN</i>	41
<i>G.4.3 Estandarización de la técnica</i>	41
<i>G.4.4 Amplificación de ADN por PCR</i>	41
<i>G.4.5 Verificación de los amplificados</i>	42
<i>G.4.6 Digestión</i>	42
<i>G.4.7 Tipificación de los polimorfismos</i>	42
G.5 Análisis estadístico	43
H. RESULTADOS	44
I. DISCUSIÓN.....	47
J. CONCLUSIÓN.....	50
K. REFERENCIAS	51
L. ANEXOS.....	57
L.1 Extracción de ADN.	57

ABREVIATURAS

AIC	Criterio de información de Akaike	mV	Milivoltios
ADP	Adenosín difosfato	NGF	Factor de crecimiento nervioso
CML	Células musculares lisas	ON	Óxido nítrico
ADN	Ácido desoxirribonucleico	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DTT	Ditiotreitol	PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
ECG	Electrocardiograma	ProMMPs	Forma inactiva de las MMPs
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	RM	Razón de momios
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	SCA	Síndrome coronario agudo
EGTA	Ácido etilenglicol tetracético	SDF-1	Factor derivado del estroma-1
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
FAP	Factor activador de plaquetas	SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico	TE	Solución Tris-EDTA
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg	TGF	Factor de crecimiento tumoral
IAM	Infarto agudo al miocardio	TIMP	Inhibidores tisulares de las metaloproteasas
IAM	Infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST	TKM-1	Solución de Tris-HCl pH 7.6, KCl, MgCl ₂ y EDTA
CEST	Infarto agudo al miocardio sin elevación del segmento ST	TKM-2	Solución de Tris-HCl pH 7.6, KCl, MgCl ₂ , NaCl y EDTA
SEST	Índice de confianza	TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
IC	Molécula de adhesión intercelular-1	VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares-1
ICAM-1	Interferón gamma	VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
IFN-γ	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1		
IGF-1	Interleucina		
IL	Infarto al miocardio		
IM	Lipoproteína de baja densidad		
LDL	LDL mínimamente modificado		
LDLmm	LDL oxidada		
LDLox	Proteína quimiotáctica de monocitos 1		
MCP-1	Matriz extracelular		
MEC	Factor inhibidor de macrófagos		
MIF	Metaloproteasas de matrix		
MMPs			

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las 10 principales causas de muerte en el mundo.....	7
Figura 2. Principales causas de muerte en México.....	8
Figura 3. Esquema de los mecanismos celulares y moleculares que dan origen al inicio y progresión de las lesiones ateroscleróticas.....	13
Figura 4. Microanatomía de trombosis arterial coronaria.....	13
Figura 5. Esquema simplificado de la diversidad de las lesiones en la aterosclerosis coronaria.....	15
Figura 6. Estructura de la MMP1 y MMP3.....	23
Figura 7. Gen de la MMP-1.....	25
Figura 8. Activación de las proMMPs.....	26
Figura 9. Gen de la MMP-3.....	30

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Diferentes aspectos en la definición del infarto agudo de miocardio.....	9
Cuadro II. Características y especificidad de las principales metaloproteasas.....	19
Cuadro III. Características demográficas y clínicas de la población de estudio....	44
Cuadro IV. Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos de las Metaloproteasas.....	45
Cuadro V. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de las MMPs en pacientes con IM y grupo control.....	45
Cuadro VI. Análisis de asociación del polimorfismo MMP1 -1607 2G/1G con diferentes modelos genéticos.....	46
Cuadro VII. Análisis de asociación del polimorfismo MMP3 -1171 6A/5A con diferentes modelos genéticos.....	46

A. RESUMEN

La cardiopatía isquémica es la principal causa de mortalidad en el mundo, los factores de riesgo convencionales no explican por completo la presencia del infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. Dentro de las causas predisponentes para cardiopatía isquémica se tienen a los factores genéticos y dentro de ellos los polimorfismos. Las metaloproteasas de matriz son enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular para el mantenimiento de la homeostasis vascular; los polimorfismos *MMP1-1607* (6A/5A) y *MMP3-1171* (2G/1G) se ha asociado con el incremento de las concentraciones plasmáticas de la MMP1 y MMP3, respectivamente, y por tanto en la ruptura de la placa aterosclerótica.

OBJETIVOS: En el presente estudio, se evaluó la posible asociación entre los polimorfismos ubicados en la MMP1 y MMP3 con el desarrollo de IAM con elevación del segmento ST, en población mexicana.

MATERIALES Y METODOS: Se analizaron los polimorfismos de las metaloproteasas 1 y 3 por medio de la técnica PCR-RFLP en 251 pacientes con diagnóstico de IAM por ruptura de placa aterosclerótica (209 hombres y 42 mujeres) admitidos al departamento de urgencias y unidad coronaria del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y 285 sujetos aparentemente sanos, que constituyeron el grupo de comparación (134 hombres y 151 mujeres).

RESULTADOS: En los polimorfismos estudiados no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la distribución genotípica entre ambos grupos, posteriormente se realizó el análisis de riesgo estimado por medio de cuatro modelos de herencia (codominante, dominante, recesivo y heterocigoto), sin embargo, no se obtuvieron valores significativos en ningún modelo de herencia, por tanto, no se pudo llevar a cabo un análisis considerando las variables clínico-demográficas.

CONCLUSIÓN: Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que estas variantes genéticas (*MMP1-1607* y *MMP3-1171*) no se asocian al padecimiento de infarto al miocardio por ruptura de placa aterosclerótica en la población mexicana.

B. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar de morbilidad y mortalidad en casi dos terceras partes de la población mundial. Cada año, mueren alrededor de 17 millones de personas por enfermedad cardiovascular y se estima que cada 4 segundos ocurre un evento coronario y cada 5 segundos un evento vascular cerebral^(1,2).

En México al igual que en otros países emergentes y en la mayoría de los países desarrollados la prevalencia de las enfermedades crónicas no transmisibles, tales como hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus tipo 2, obesidad y aterosclerosis, entre otras, han demostrado un crecimiento exponencial en las últimas dos décadas, llegando a superar la prevalencia de las enfermedades transmisibles en el adulto sin excluir a los adolescentes y a la población infantil. A esta transformación se ha aplicado el término de *transición epidemiológica*; en países como México, la transición epidemiológica genera un doble problema de salud pública y un grave problema social, además de un descontrol de los sistemas de salud que se ven enfrentados al impacto económico-social⁽¹⁻³⁾.

Las enfermedades cardiovasculares tienen una etiología multifactorial con participación de factores genéticos y ambientales, por lo que la identificación de genes de susceptibilidad tiene relevancia para el desarrollo de nuevos tratamientos y la predicción del riesgo de enfermedad. Así, la estrategia ha sido analizar los polimorfismos presentes en genes candidatos que codifican para proteínas importantes en el sistema homeostático encargado de mantener el buen funcionamiento del sistema cardiovascular⁽⁴⁾.

En la actualidad, muchos estudios se enfocan en conocer el papel que desempeñan las Metaloproteasas de Matriz (MMPs) en aquellas enfermedades en las que la pérdida de la estructuración de la Matriz Extracelular (MEC) es una característica. Reportes previos, sugieren que las MMPs están implicadas en la destrucción del tejido conectivo previo a la ruptura de la placa y el fenómeno aterotrombótico.

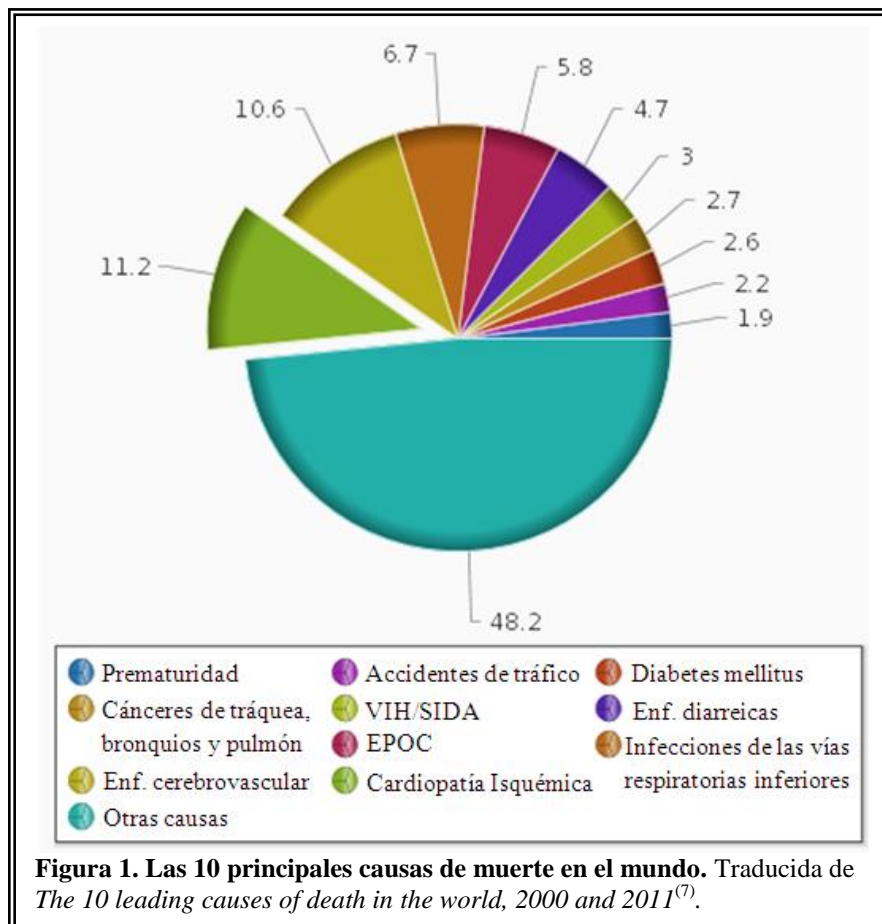
Las MMPs 1 y 3 son proteínas relevantes en la patogénesis del Infarto al Miocardio (IM) ya que degradan la matriz extracelular debilitando las arterias e interfieren en la biomecánica de la capa fibrosa, la degradación excesiva de estas fibras de colágeno es reconocido como un mecanismo importante para la ruptura de la placa aterosclerótica^(5,6).

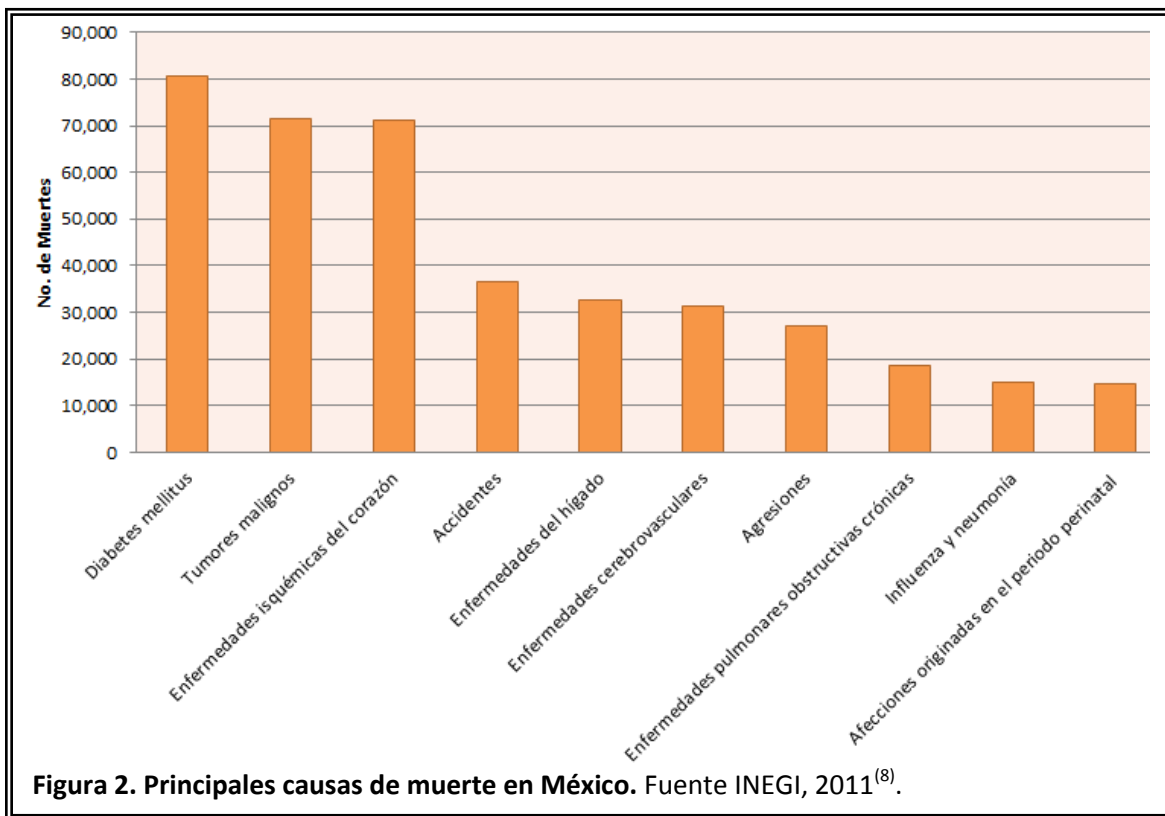
Se sabe que polimorfismos ubicados en las regiones promotoras de los genes que codifican para las MMPs están relacionados con los niveles de expresión de estas moléculas, por tanto, el estudio de estos polimorfismos puede contribuir a identificar individuos susceptibles para padecer IM. A futuro será muy importante para definir su papel en el desarrollo de este padecimiento en la población mexicana y así permitir tratamientos mejor dirigidos.

C. MARCO TEÓRICO

C.1 Cardiopatía isquémica e infarto al miocardio

La cardiopatía isquémica es la principal causa de muerte a nivel mundial, representando el 11.2% de las defunciones, Figura 1⁽⁷⁾; dicha enfermedad consiste en una serie de procesos fisiopatológicos que tienen como punto final la pérdida de la relación aporte-demanda de oxígeno y demás nutrientes dispensables para el metabolismo de la célula cardíaca. En México, la cardiopatía isquémica ocupa el tercer lugar con el 12% de las defunciones, solo siendo antecedida por la diabetes mellitus y los tumores malignos, Figura 2⁽⁸⁾.





La principal manifestación de la cardiopatía isquémica es el Síndrome Coronario Agudo (SCA) que a su vez se subdivide en Infarto Agudo al Miocardio Con Elevación del Segmento ST (IAM CEST) y en Síndrome Coronario Agudo sin Elevación del Segmento ST donde se incluyen el Infarto Agudo al Miocardio Sin Elevación del Segmento ST (IAM SEST) y angina inestable^(9,10).

El IM es un trastorno multifactorial y poligénico complejo, el cual resulta de la interacción entre la composición genética de una persona y diversos factores ambientales⁽¹¹⁾. El Infarto Agudo al Miocardio (IAM) se caracteriza por dolor torácico (típico o atípico) sugestivo de isquemia o equivalente isquémico, en reposo o ejercicio, mayor de 20 minutos, asociado a disnea y actividad simpático-adrenérgica; se define en relación a características clínicas, electrocardiográficas,

bioquímicas y patológicas (Cuadro I). La Organización Mundial de la Salud sobre la base de estudios de prevalencia, definió el IAM mediante la presencia de por lo menos dos de los siguientes criterios: 1) dolor torácico sugestivo de isquemia típico o atípico, 2) elevación de marcadores de macro necrosis, 3) cambios ECG característicos con presencia de ondas Q patológicas⁽¹²⁾.

Cuadro I. Diferentes aspectos en la definición del infarto agudo de miocardio. Tomada de *Guías clínicas para el manejo del infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST*⁽¹²⁾.

Patología:	Muerte celular miocárdica
Clínica:	Síntomas isquémicos
Bioquímica:	Biomarcadores de muerte celular en estudios de sangre
Electrocardiograma:	Evidencia de isquemia miocárdica (cambios del segmento ST). Evidencia de tejido con pérdida de actividad eléctrica (ondas Q)
Alteraciones funcionales:	Reducción o pérdida de perfusión tisular. Anormalidades en la contractilidad parietal del corazón.

Con base en la última definición del infarto, éste se clasifica en función de sus diferencias patológicas, clínicas y pronósticas quedando de la siguiente manera⁽¹³⁾:

- Tipo 1: IM espontáneo relacionado a isquemia, debido a la ruptura de placa aterosclerótica o ulceración, erosión o disección con la subsecuente trombosis.
- Tipo 2: IM secundario a isquemia, debido a un desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno, por ejemplo: disfunción endotelial, espasmo coronario, embolismo, arritmias, anemia, insuficiencia respiratoria, hipotensión o hipertensión.

- Tipo 3: Muerte cardíaca súbita, después de síntomas sugestivos de isquemia miocárdica acompañada de cambios ECG presumibles de isquemia o bloqueo de rama izquierda de *novo*, sin ser posible la toma de muestra de sangre para la medición de biomarcadores cardíacos o si se tomaron no hubo elevación de los mismos por el tiempo transcurrido del evento.
- Tipo 4a: IM relacionado con intervención percutánea coronaria.
- Tipo 4b: IM asociado con trombosis del stent, detectado por angiografía coronaria o autopsia.
- Tipo 5: IM relacionado a cirugía de revascularización coronaria.

Los factores de riesgo en la aparición de un IM se fundamentan en la enfermedad aterosclerótica, e incluyen⁽¹²⁻¹⁴⁾:

- Hipertensión arterial.
- Edad (varones mayores de 40 años, mujeres post menopaúsicas).
- Género masculino.
- Tabaquismo.
- Hipercolesterolemia.
- Homocisteinemia.
- Diabetes mellitus.
- Obesidad.
- Estrés.

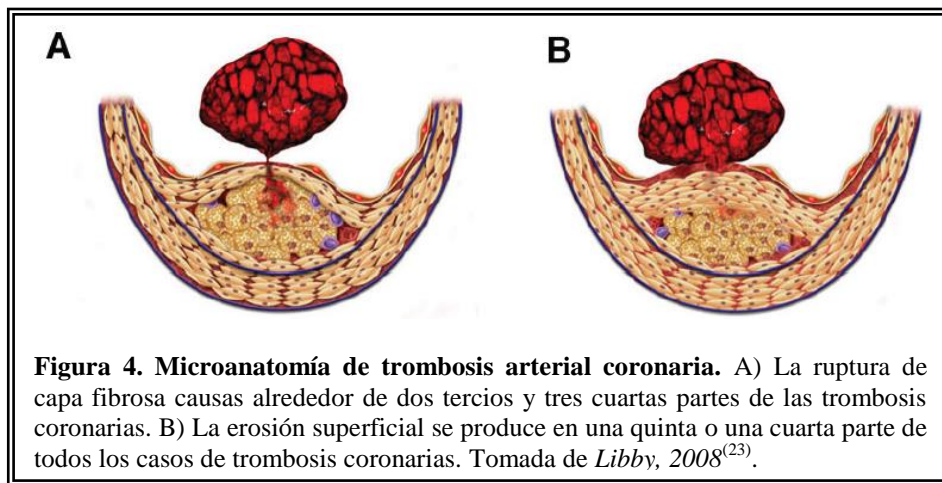
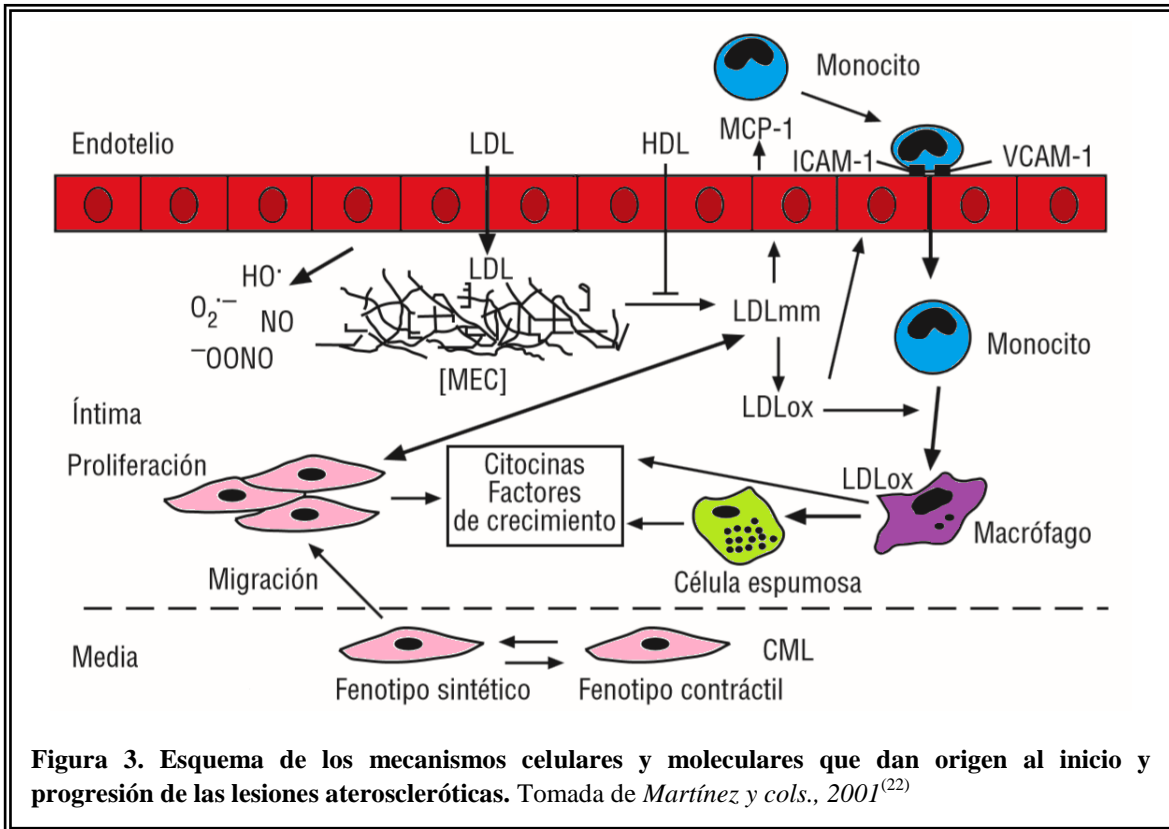
Se ha demostrado que dichos factores producen disfunción endotelial al bloquear la sintasa del óxido nítrico endotelial y al activar el estrés oxidativo lo que reduce la producción de óxido nítrico; por tanto provocan vasoconstricción coronaria, favoreciendo la adhesión de macrófagos a la pared endotelial y la trombosis intrarterial, por lo cual, participan en la génesis de los síndromes isquémicos agudos⁽¹⁵⁾. Sin embargo, el 8% de los pacientes que han sufrido un IAM, no presentan los factores de riesgo mencionados anteriormente; esto indica que existen otros factores implicados en el proceso aterogénico e IM. En los últimos años se han observado avances importantes en el conocimiento de la genética molecular y junto con los avances tecnológicos en el análisis de variantes genéticas (estudios análisis de ligamiento y análisis de asociación del genoma completo) han ayudado a entender la genética de la aterosclerosis, y aunque han implicado varios *loci* y genes candidatos en la predisposición a la enfermedad cardíaca coronaria, IM o en ambos, los genes que contribuyen a la susceptibilidad genética a estas enfermedades aún no se han identificado por completo^(11,16-18).

C.1.1 Fisiopatología

En más del 85% de los casos, el principal mecanismo fisiopatogénico es la obstrucción del flujo coronario desencadenado por la ruptura de una placa asociada a inflamación, trombosis aguda (aterotrombosis), vasoconstricción y microembolización ocasionando la disminución de la perfusión miocárdica. Sin embargo, la enfermedad que subyace tras el IM es, de forma casi invariable, la aterosclerosis coronaria⁽¹⁹⁻²¹⁾.

La formación de la placa aterosclerótica se origina en zonas donde existe una disfunción endotelial que facilita la infiltración de LDL al espacio subendotelial, interaccionando con proteínas de la MEC y sufren procesos de modificación. Primeramente se originan LDL mínimamente modificadas (LDLmm) y posteriormente LDL con mayor grado de oxidación (LDLox). Las LDLox alteran la producción de óxido nítrico (ON) y con ello perturban todas las funciones protectoras de éste sobre la pared vascular. Posteriormente, los monocitos se adhieren al endotelio activado que sobreexpresa ICAM-1 y VCAM-1, los cuales son atraídos por las LDLox retenidas en la pared y por la producción incrementada de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), los monocitos penetran en la pared y son activados a macrófagos, proceso en el que también intervienen las LDLox; los macrófagos captan las LDL modificadas y se transforman en células espumosas. Por otro lado, las células musculares lisas (CML) de la media son activadas por citocinas y factores de crecimiento liberados en las lesiones y se transforman a un fenotipo sintético, migran a la íntima atraídas por factores quimio-atrayentes y proliferan contribuyendo a la evolución de las lesiones ateroscleróticas, Figura 3^(21,22).

Típicamente, dos morfologías de placas ateroscleróticas son asociadas con eventos coronarios agudos: ruptura de placa y erosión de placa. En menores casos (2-7%) son atribuibles a una tercera morfología denominada nódulo calcificado, Figura 4^(20,21).



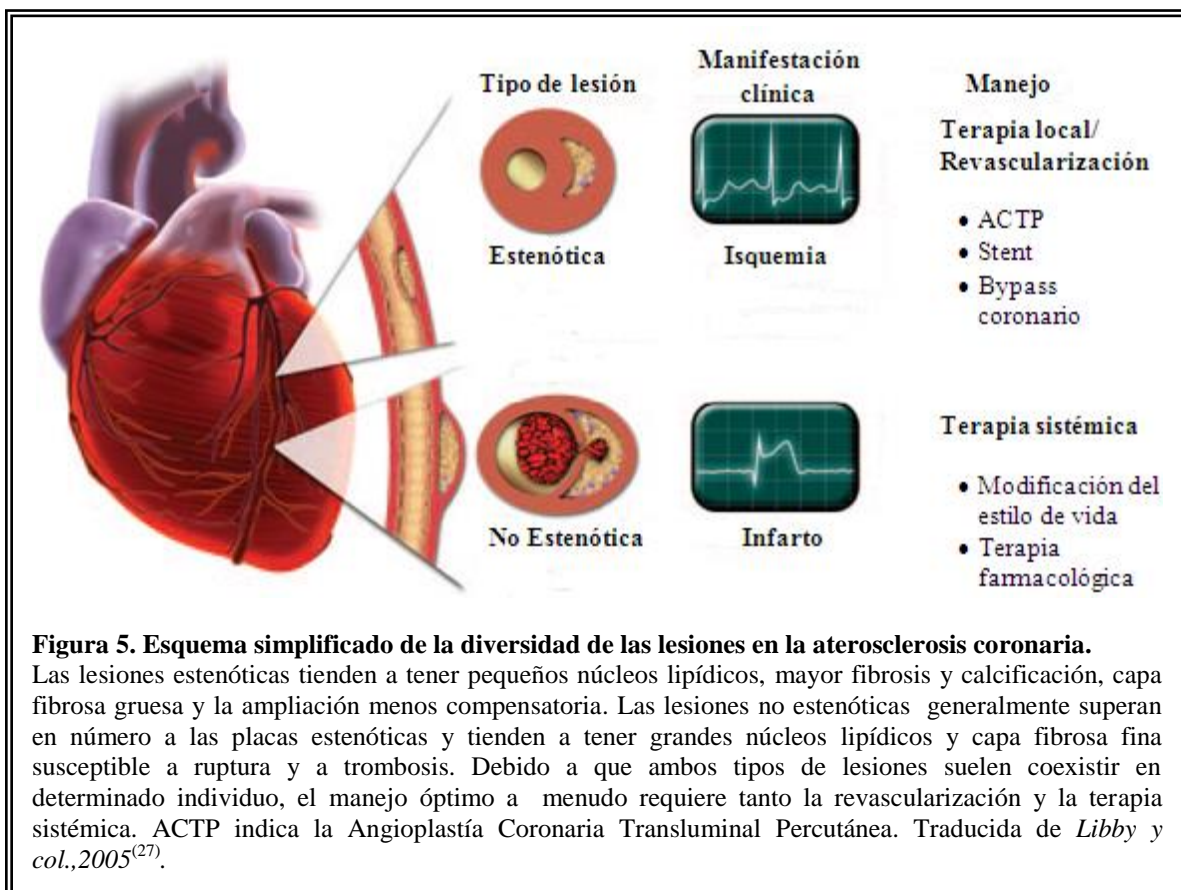
El proceso que conlleva al IAM se inicia cuando la placa aterosclerótica sufre ruptura o erosión con la consiguiente exposición del material subyacente

constituido por lípidos, células inflamatorias tipo linfocitos, monocitos, macrófagos y células musculares lisas que son activadas a través de mediadores del tipo: tromboxano A₂, ADP, Factor Activador de Plaquetas (FAP), trombina, factor tisular, radicales libres; lo que lleva a la activación del proceso de coagulación con adhesión y agregación de plaquetas y generación de un trombo oclusivo con fibrina y abundantes glóbulos rojos, con lo cual se provoca la isquemia. La estabilidad de la placa ateromatosa depende del aumento en la actividad de las enzimas hidrolíticas producidas por los macrófagos que van degradando la matriz celular, y de la inhibición en la producción de colágeno por parte de las células musculares lisas inducidas por IFN- γ o de la inducción de su muerte celular por apoptosis, ya que estos acontecimientos pueden debilitar la capa fibrosa del ateroma, haciéndola más frágil y propensa a una ruptura, de manera que cualquier fuerza mecánica puede fragmentarla con la consiguiente formación de un trombo^(14,24).

Por otra parte, un aumento en el volumen de la placa ateromatosa y la consecuente disminución de la luz arterial, llega incluso a ocluir la arteria por completo generando isquemia; la disminución abrupta del flujo coronario condicionará micro o macronecrosis si no se activa la lisis endógena o se establece un abordaje de reperfusión terapéutico efectivo^(12,25).

Una característica clave, en el desarrollo del IM es la pérdida de la estructura de la MEC, la cual se encarga del mantenimiento y la integridad del sistema cardiovascular. En condiciones normales las fibras de elastina y colágeno resisten la pérdida de estructura espontánea y pueden degradarse por las MMPs o, de forma indirecta, por los activadores del plasminógeno. La pared del vaso, que

comprende células endoteliales, células musculares lisas y la MEC, es muy sensible a diversos estímulos, incluidas las fuerzas mecánicas y factores neuro-humorales. Las células musculares lisas detectarán cualquier cambio que pueda dar lugar a la modificación y remodelación de MEC en la pared del vaso^(26,27); en la Figura 5, se resumen las manifestaciones clínicas y el manejo de la aterosclerosis coronaria dependiendo del tipo de lesión.



C.2 Matriz extracelular (MEC)

La MEC es un complejo retículo de proteínas e hidratos de carbono, cuyos componentes son secretados por las mismas células del tejido, la cual crea un

ambiente especial en los espacios entre las células, contribuye a unir las células para formar los tejidos y es sitio de reserva de las hormonas que controlan el crecimiento y la diferenciación celular. También proporciona el armazón a través del cual se pueden desplazar las células, en particular durante los estadios iniciales de la diferenciación^(28,29).

Las MEC de los distintos tejidos están formadas por una gran cantidad de componentes en común, que se clasifican en tres grandes grupos: 1) proteoglicanos y glucosaminoglicanos, 2) proteínas estructurales (colágeno fibroso y elastina), y 3) proteínas de adhesión (fibronectina y laminina). Sin embargo, la composición exacta de la matriz varía en los distintos tejidos, lo cual refleja la función especializada de cada uno. La interacción de la célula con la MEC desencadena cascadas de señalización que promueven la diferenciación, migración y movilización celular esenciales para el mantenimiento de la homeostasis^(28,29).

En la MEC cardiovascular el colágeno tipo I, colágeno tipo III y la elastina son los componentes que predominan, éstos se sintetizan y se regulan por las células vasculares; están dispuestos en una malla entrelazada para proporcionar las propiedades estructurales y mecánicas para las funciones de los vasos. El colágeno tipo I se ha considerado en la contribución de la rigidez vascular, proporcionando resistencia a la tracción, mientras que el tipo III contribuye a la extensibilidad del vaso. En las placas ateroscleróticas, el colágeno I, III y la elastina están presentes conjuntamente, sosteniendo la integridad de las capas fibrosas, por tanto, la remodelación de la MEC es un paso importante en la patogénesis de enfermedades vasculares⁽³⁰⁾.

Los componentes de la MEC requieren de una familia de proteasas denominadas Metaloproteasas de Matriz (MMPs) para el mantenimiento de la homeostasis vascular, cuya misión es degradar las proteínas integrantes de la MEC en su medio ambiente y activar factores de crecimiento, receptores de superficie y moléculas de adhesión^(28,31).

C.3 Metaloproteasas de matriz (MMPs)

Las MMPs constituyen una familia de enzimas proteolíticas (endopeptidasas), producidas por diversos tipos celulares, que degradan numerosos componentes de la MEC, así como otras proteínas no relacionadas; muchas de las cuales se han caracterizado en células de los vasos sanguíneos⁽³²⁾.

Como su nombre sugiere, las MMPs fueron inicialmente caracterizadas como proteasas degradantes de matriz indicando colectivamente que estas enzimas pueden degradar todos los componentes de la MEC, teniendo influencia en muchos procesos importantes, pertenecen a la familia de las metalopeptidasas conocida como “metzinas”, ya que su sitio activo contiene un ión zinc (Zn^{2+}); y aunque poseen una similitud estructural en la secuencia de aminoácidos, un gen diferente controla cada una de ellas. Se clasifican en subgrupos basados en su funcionalidad, estructura y dependiendo del sustrato que son capaces de degradar en: *colagenasas*, *gelatinasas*, *estromelinas*, *MMPs tipo membrana* y otras, Cuadro II^(33,34).

Las MMPs intervienen en la mayoría de los procesos fisiológicos que requieren la remodelación de la MEC y tienen un papel bien definido en procesos celulares

diversos como la proliferación y la apoptosis. Además de esta función reparadora y de remodelación (reabsorción ósea, recambio endometrial, entre otras), la presencia de niveles elevados de algunas MMP se ha asociado a la destrucción tisular en una amplia variedad de procesos patológicos como diseminación de metástasis tumorales, artritis, formación de aneurismas, aterosclerosis, entre otras⁽³⁵⁻³⁷⁾.

Todas las MMPs tienen en su estructura tres regiones o dominios diferentes: 1) el dominio propéptido (prodominio), 2) el dominio catalítico y 3) el extremo carboxi(C)-terminal, cada uno de ellos con una función específica (las cuales se mencionan más adelante).

Las principales características de las MMPs son^(38,39):

- Se sintetizan como proenzimas inactivas (zimógenos) que pueden almacenarse en los gránulos de las células inflamatorias, aunque la mayoría se secretan o se encuentran ancladas a la superficie celular o a otras proteínas de membrana o de la MEC.
- Requieren activación enzimática para llevar a cabo su acción proteolítica.
- El sitio activo (catalítico) contiene zinc y precisa un segundo cofactor como el calcio (Ca^{2+}).
- Su actividad enzimática es óptima a pH fisiológico.
- Su acción proteolítica es regulada por la presencia de los Inhibidores Tisulares de las Metaloproteasas (TIMPs) y, en menor medida, por la α_2 -macroglobulina plasmática.

Cuadro II. Características y especificidad de las principales metaloproteasas (MMP)

MMP (tipo)	Denominación	Sustrato MEC	Sustrato no MEC
Colagenasas			
<u>MMP-1</u>	Colagenasa-1	Colágenos I, II, III, VII, VIII y X, gelatina, proteoglicanos, tenascina, entactina	α 1-AT, IL-1 β , pro-TNF, IGFBP-3, MMP-2, MMP-9
MMP-8	Colagenasa-2	Colágenos I, II, III, V, VIII y X, gelatina, agrecan	α 1-AT, α 2-AP, fibronectina
MMP-13	Colagenasa 3	Colágenos I, II, III, IV, IX, X y XIV, gelatina, tenascina, fibronectina, agrecan, osteonectina	MMP-9, PAI-2
Gelatinasas			
MMP-2	Gelatinasa A	Colágenos I, IV, V, VII, X, XI y XIV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina, agrecan, versican, osteonectina, proteoglicanos	IL-1 β , α 1-PI, MMP-1, MMP-9, MMP-13
MMP-9	Gelatinasa B	Colágenos IV, V, VII, X, XIV, gelatina, elastina, agrecan, versican, proteoglicanos, osteonectina	α 1-AT, IL-1 β , plasminógeno
Estromalisinas			
<u>MMP-3</u>	Estromalisina-1	Colágenos III, IV, V y IX, gelatina, agrecan, versican, proteoglicanos, tenascina, fibronectina, laminina, osteonectina	α 1-AT, ATIII, ovostatina, IL-1 β , amiloide A, IGFB-3, fibrinógeno, plasminógeno, MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-13
MMP-10	Estromalisina-2	Colágenos III, IV, V, gelatina, caseína, agrecan, elastina, proteoglicanos	MMP-1, MMP-8
MMP-11	Estromalisina-3	Caseína, laminina, fibronectina, gelatina, colágeno IV, transferrina	α 1-AT, caseína, IGFB-1
Tipo membrana			
MMP-14	MT1-MMP	Colágenos I, II y III, caseína, elastina, fibronectina, vitronectina, tenascina, proteoglicanos, laminina, entactina	α 1-AT, MMP-2, MMP-13
MMP-15	MT2-MMP	Tenascina, fibronectina, laminina	MMP-2
MMP-16	MT3-MMP	Colágeno III, gelatina, caseína, fibronectina	MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	ND	MMP-2
MMP-24	MT5-MMP	ND	MMP-2
MMP-25	MT6-MMP	ND	MMP-2
Otras			
MMP-7	Matrilisina	Colágenos IV y X, gelatina, agrecan, proteoglicanos, fibronectina, laminina, entactina, tenascina, caseína transferrina, integrina b4, osteonectina, elastina	MMP-1, MMP-2, MMP-9, plasminógeno, α 1-AT
MMP-12	Metaloelastasa	Colágeno IV, gelatina, elastina, caseína, laminina, proteoglicanos, fibronectina, vitronectina, entactina	α 1-AT, fibrinógeno y fibrina, plasminógeno, mielina
MMP-20	Enamelisina	Amelogenina	ND
MMP-23A	MMP-21	ND	ND
MMP-23B	MMP-22	ND	ND
MMP-26	Matrilisina 2	Colágeno IV, fibrinógeno, fibronectina, caseína	MMP-9
MMP-27	ND	ND	ND
MMP-28	Epilisina	Caseína	ND

MEC: matriz extracelular; α 1-AT: α -1-antitripsina; ATIII: antitrombina; IGFB: factor de crecimiento similar a la insulina; PAI: inhibidor del activador del plasminógeno; ND: no determinado. Tomada de *Páramo y cols., 2007*⁽³²⁾.

La mayoría de las MMPs presentan un rol central en la embriogénesis y en procesos fisiológicos normales como: eventos reproductivos, remodelación tisular, cicatrización de heridas, angiogénesis, proliferación y motilidad celular⁽³⁸⁾. La actividad de las MMPs está regulada intra y extracelularmente en 3 ámbitos: transcripcional, post-transcripcional y a través de interacción con inhibidores específicos⁽³²⁾.

Hay evidencia de que las MMPs están involucradas en todas las fases del proceso aterosclerótico, desde la lesión inicial hasta la trombosis, debido a las alteraciones en la homeostasis de la MEC. El espectro de las MMPs en la aterosclerosis está condicionado por el tipo celular predominante, los factores solubles y la interacción células-MEC⁽³⁹⁾.

C.3.1 Papel de las MMPs en aterosclerosis

Existe evidencia de que alteraciones en la homeostasis de la MEC, como secuencia de cambios en la síntesis, en la degradación, o en ambas, se han asociado con enfermedades vasculares⁽²⁶⁾.

La aterosclerosis se define como una enfermedad vascular de evolución crónica, dinámica y evolutiva que aparece por el concurso de tres factores principales: disfunción endotelial, inflamación y trombosis. Se caracteriza por la oclusión progresiva de las arterias por placas de ateroma que pueden llegar a producir insuficiencia arterial crónica (angina de pecho, isquemia cerebral transitoria o angina mesentérica) o bien déficit agudo de la circulación por trombosis oclusiva

(infarto al miocardio, cerebral o mesentérica)⁽¹⁵⁾. La progresión gradual desde la acumulación de colesterol a la complicación por la inestabilidad de la placa es fuertemente asociada con la remodelación de la MEC⁽³⁰⁾.

La degradación de la MEC por acción de las MMPs promueve la migración y proliferación celular y el desarrollo de la placa; durante las fases iniciales, el remodelado de la MEC representa un mecanismo compensador que evita la estenosis arterial y, en fases tardías del proceso aterosclerótico la degradación de la capa fibrosa o la erosión endotelial mediada por MMPs favorece la ruptura y la desestabilización, y promueve la trombosis. La participación de las MMPs se considera clave en este proceso^(40,41).

El proceso aterogénico cursa con la modificación sistémica del contenido de la MEC debido a la activación de las células endoteliales y monocitos en respuesta a diversas citocinas proinflamatorias, como el TNF- α y las interleucinas, así como las LDLox, aumentando así la expresión de MMPs. De igual forma en respuesta a estos estímulos, las células del músculo liso migran hacia la capa media de la pared del vaso donde se dividen y sintetizan MEC, contribuyendo con la acumulación de estría grasa^(30,42).

La posible interacción entre la placa aterosclerótica y el proceso inmune, puede ser la causa de la inestabilidad de la capa fibrosa debido a la disminución de colágeno tipo III, ya que éste ayuda en la regulación de la fibrillogénesis del colágeno tipo I; la formación anormal de las fibrillas causa una disminución en la cantidad de fibras de colágeno maduros, que afecta directamente a las propiedades mecánicas de las paredes arteriales y desestabiliza la capa fibrosa^(30,32,42).

Si bien, a escala vascular, existen evidencias de una estrecha asociación entre las MMPs y la vulnerabilidad de la placa, hay más controversia con los resultados observados en la clínica. Diversos estudios han demostrado que los polimorfismos de los genes que codifican para las MMPs se vinculan con la propensión para padecer aterosclerosis y enfermedades relacionadas^(16,26,43,44).

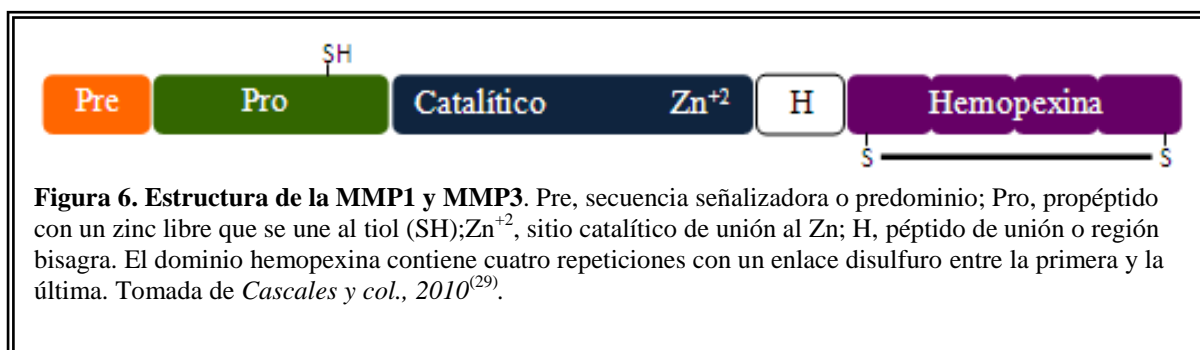
C.4 Metaloproteasa de matriz-1/Colagenasa intersticial

Fue descubierta en 1962, cuando *Gross y Lapiere*⁽⁴⁵⁾ intentaban establecer la manera en que un renacuajo perdía su cola durante la metamorfosis y observaron la capacidad enzimática de ésta para degradar el colágeno a pH neutro; el término *colagenasa intersticial* fue inicialmente usado para describirla, ya que escinde colágenos intersticiales (tipo I, II y III). La colagenasa fibroblástica humana fue la primera colagenasa vertebral en ser purificada hasta la homogeneidad como una proteína y en ser clonada^(46,47), por tanto, de igual forma se le ha nombrado *colagenasa vertebral*, *colagenasa mamífera* o *colagenasa fibroblástica* y más recientemente se le ha nombrado *colagenasa-1* para distinguirla de otros miembros de la familia matrixina que escinden colágenos intersticiales. Con el fin de evitar ambigüedad, el mejor nombre para describirla es metaloproteasa de matriz-1 (MMP1)^(48,49).

La MMP1 es ampliamente distribuida en el organismo ya que es producida por múltiples células como son: fibroblastos, keratinocitos, células endoteliales, macrófagos, hepatocitos, condrocitos y osteoblastos⁽³⁹⁾.

C.4.1 Estructura

La MMP1 humana es una preproenzima de 469 aminoácidos formada por un predominio (19 aminoácidos), un dominio pro-péptido (80 aminoácidos), un dominio catalítico (162 aminoácidos), un péptido de unión (16 aminoácidos) y el dominio hemopexina (192 aminoácidos)⁽⁴⁹⁾, tal como se muestra en la Figura 6.



La secuencia señalizadora N-terminal o predominio posee una señal rica en aminoácidos hidrofóbicos que destinan la síntesis polipeptídica al retículo endoplásmico, lugar donde es removida durante la transportación de la molécula hacia el exterior de la célula. El dominio pro-péptido es responsable de mantener la proenzima inactiva, presenta una cisteína localizada en una secuencia conservada, opuesta al átomo de zinc del sitio activo y es coordinado a él a través de un grupo tiol (-SH). El dominio catalítico contiene la región conservada de unión al zinc; indica la especificidad del sitio de rotura mediante huecos de especificidad que se unen a residuos de aminoácidos adyacentes. El dominio catalítico está conectado por un péptido de unión a un dominio carboxi(C)-terminal, con homología a la hemopexina, una glicoproteína sérica que participan en el

transporte del grupo hemo, éste dominio hemopexina media la especificidad del sustrato y la interacción con los TIMPs^(29,50,51).

C.4.2 Síntesis y regulación

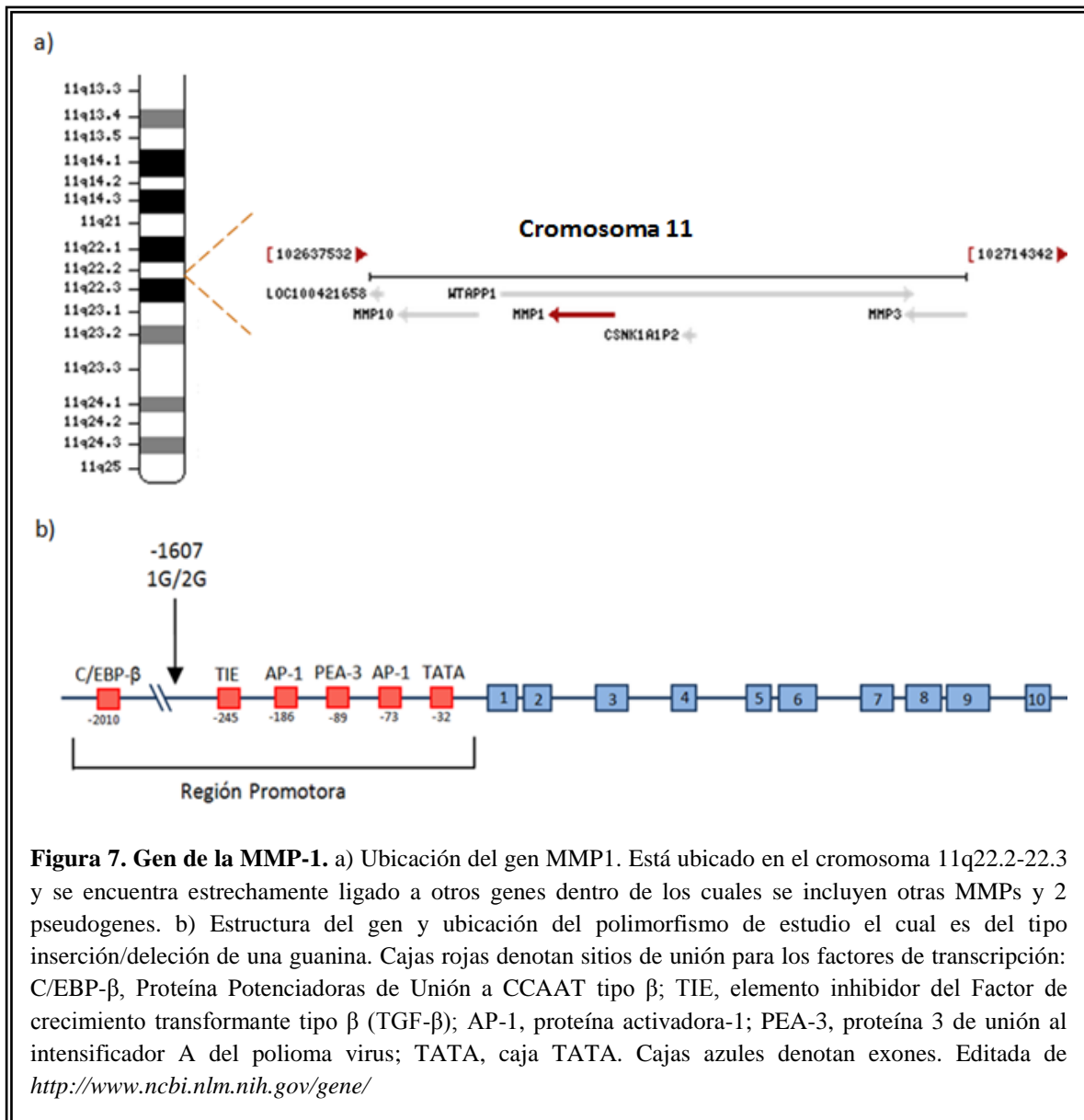
La MMP1 es sintetizada como un polipéptido y es secretada como una proenzima. La estructura del gen de la MMP1 contiene diez exones y nueve intrones en 8-12 kbp de ADN, es localizado en el humano en el brazo largo del cromosoma 11 en la región 11q22.2-22.3, Figura 7^(49,51).

En tejidos normales adultos los niveles de MMP1 son usualmente bajos, por el contrario, su expresión es elevada cuando el sistema enfrenta cambios tal como en la cicatrización de heridas, procesos de reparación o remodelación tisular como ocurre en múltiples condiciones patológicas. La expresión de la MMP1 es transcripcionalmente regulada por factores de crecimiento, hormonas y citocinas; mientras que la actividad proteolítica es regulada a través de la interacción con activadores e inhibidores⁽⁵²⁾.

C.4.2.1 Regulación transcripcional

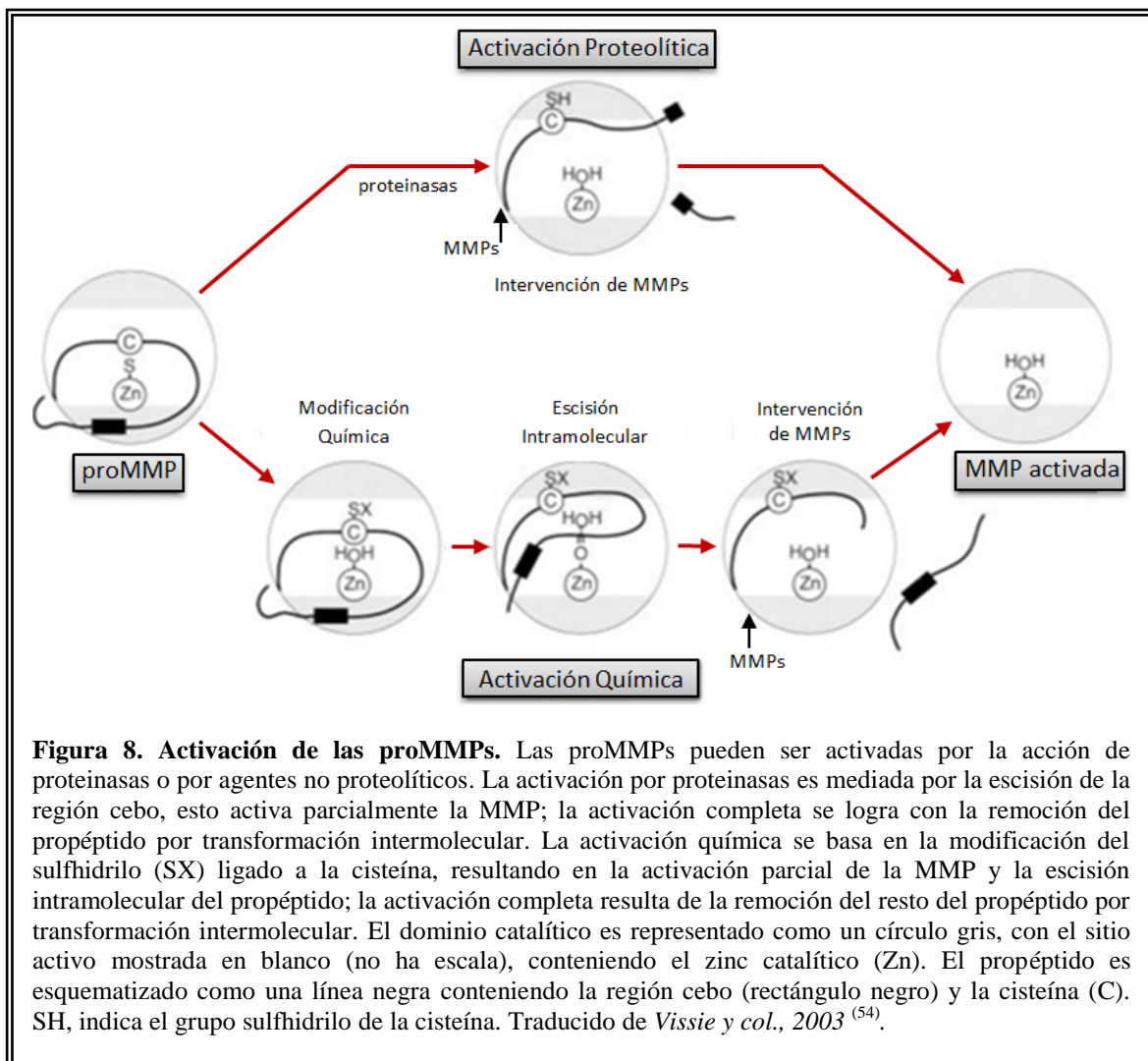
La región promotora del gen contiene diversos sitios de unión para factores de transcripción, mismos que representan un paso importante en la regulación de la expresión de la MMP (Figura 7.b). Dentro de las citocinas inductoras de la MMP1 se incluyen: factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-1, -2, -7 y -9, factor de crecimiento hepatocitario, factor estimulante de

colonias de granulocitos y macrófagos, interferón beta y gamma, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento transformante (TGF) alfa y la interleucina (IL)-1,-4, -5, -6, -8 y -10. Por otro lado, el TGF- β , el ácido trans-retinoico y los retinoides sintéticos suprimen la transcripción de la MMP1^(51,53).



C.4.2.2 Activación de la pro-colagenasa

La activación de la proenzima ocurre cuando el enlace entre la cisteína del dominio pro-péptido y el zinc catalítico es interrumpido ya sea por proteólisis o por alteración química como en el caso de la oxidación o el tratamiento con compuestos mercurícos; la activación por proteólisis es mediada por la estromelina-1 (MMP3), tripsina, plasmina y algunas serin proteasas, Figura 8^(49,51,54).



C.4.2.3 Inhibición local de la MMP1

La activación extracelular del zimógeno puede ser seguida ya sea por la unión al sustrato o por la interacción con algún inhibidor. En general, la actividad de las metaloproteasas es inhibida por una familia de cuatro inhibidores endógenos conocidos como Inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs). La MMP1 es inhibida estequiométricamente por el TIMP-1, aunque de igual forma puede ser inhibida por el TIMP-2 y TIMP-3, ya que forman un complejo con el zinc catalítico⁽⁵⁴⁾.

C.4.3 Función biológica

La MMP1 al igual que la MMP-8,-13 y -14, son los únicos miembros de las MMPs capaces de degradar el colágeno fibrilar en su dominio triple helicoidal, dejando las moléculas inestables térmicamente las cuales se desenrollan formando gelatina, misma que puede ser degradada por otros miembros de la familia MMPs. Además, la MMP1 puede escindir otros componentes de la matriz extracelular como son: el agregano, el versicano, el perlecano, la caseína, el nidógeno, las serpinas y la tenascina-C⁽⁵⁵⁾.

C.4.4 Polimorfismo de estudio

Los polimorfismos representan variaciones naturales en la secuencia del ADN los cuales pueden ocurrir en más de una forma, estas variaciones aparecen en al

menos el 1% de la población. Aproximadamente el 90% de las variaciones son SNP (polimorfismos de un solo nucleótido, por sus siglas en inglés) debido al intercambio de una sola base en la secuencia del ADN, aunque la mayoría presenta una funcionalidad neutral, algunos SNPs ejercen efectos alelo-específicos en la regulación de la expresión génica o en la función de la proteína codificada, los cuales subyacen diferencias individuales en varios rasgos biológicos, en la susceptibilidad a una enfermedad o en ambas⁽⁵⁶⁾.

El polimorfismo a estudiar, se localiza en la región promotora del gen en la posición -1607; resulta de la inserción/delección de una guanina creando dos alelos. Un alelo tiene una sola guanina (1G) y el otro alelo tiene dos guaninas (2G) en el sitio polimórfico (Figura 7.b), ensayos en el promotor han indicado que el SNP de estudio es un polimorfismo funcional, las dos guaninas juntas con una adenina adyacente (5'-GGA-3') crean un sitio de unión para los factores de transcripción de la familia ETS (Erythroblastic Transforming Sequence, por sus siglas en inglés) resultando en un aumento en la expresión de la MMP-1 en fibroblastos y en células de melanoma, por tanto dicho polimorfismo se ha asociado con múltiples enfermedades^(56,57).

C.5 Metaloproteasa de matriz-3/Estromelisin-1

El nombre estromelisin denota una metaloproteasa derivada del estroma celular que hidroliza componentes de la MEC, su actividad enzimática fue reportada por primera vez en 1974 como una metaloproteasa degradante de proteoglicanos de

cartílago y como una proteinasa neutral de fibroblastos de conejo. Posteriormente, *Okada y col.*⁽⁵⁸⁾ purificaron dos isoformas de la enzima a partir del cultivo de sinoviocitos reumatoides humanos y se refirieron a ella como metaloproteasa de matriz-3 (MMP3) para distinguirla de la colagenasa intersticial (MMP1) y la gelatinasa A (MMP2). La estromelina 1 y la MMP1 tienen masas moleculares similares y son a menudo secretadas por los mismos tipos celulares⁽⁵⁹⁾.

La MMP3 no es detectada en cultivo de células normales, sin embargo, puede expresarse en fibroblastos, condrocitos, células endoteliales, macrófagos, células del músculo liso vascular, osteoblastos y queratinocitos en respuesta del estímulo apropiado. La enzima escinde proteínas de la MEC y proteínas no pertenecientes a la MEC, mostrando una fuerte preferencia por los aminoácidos hidrofóbicos y exhibiendo su actividad óptima a pH 5.5-6.0 con una actividad extendida a un pH de 7.5-8.0 para la mayoría de los sustratos^(60,61).

C.5.1 Estructura

La MMP3 presenta estructura homóloga con otras MMPs, entre ellas la MMP1 (Figura 6). La preproenzima de la MMP3 humana es de 477 aminoácidos consiste en un predominio (17 aminoácidos), un dominio pro-péptido (82 aminoácidos), un dominio catalítico (165 aminoácidos), un péptido de unión (25 aminoácidos) y el dominio hemopexina (188 aminoácidos); cada uno de los dominios presenta la misma función a la descrita para la MMP1⁽⁵⁹⁾.

C.5.2 Síntesis y regulación

La MMP3 es sintetizada como una preproenzima y es secretada de la célula como una proenzima de 57kDa. El gen humano de la MMP3 es localizado en el cromosoma 11q22-23, en donde se localizan otros genes de las MMPs (-1, -7, -10, -8, -12, -13, -20, -26), Figura 9⁽⁵⁹⁾.

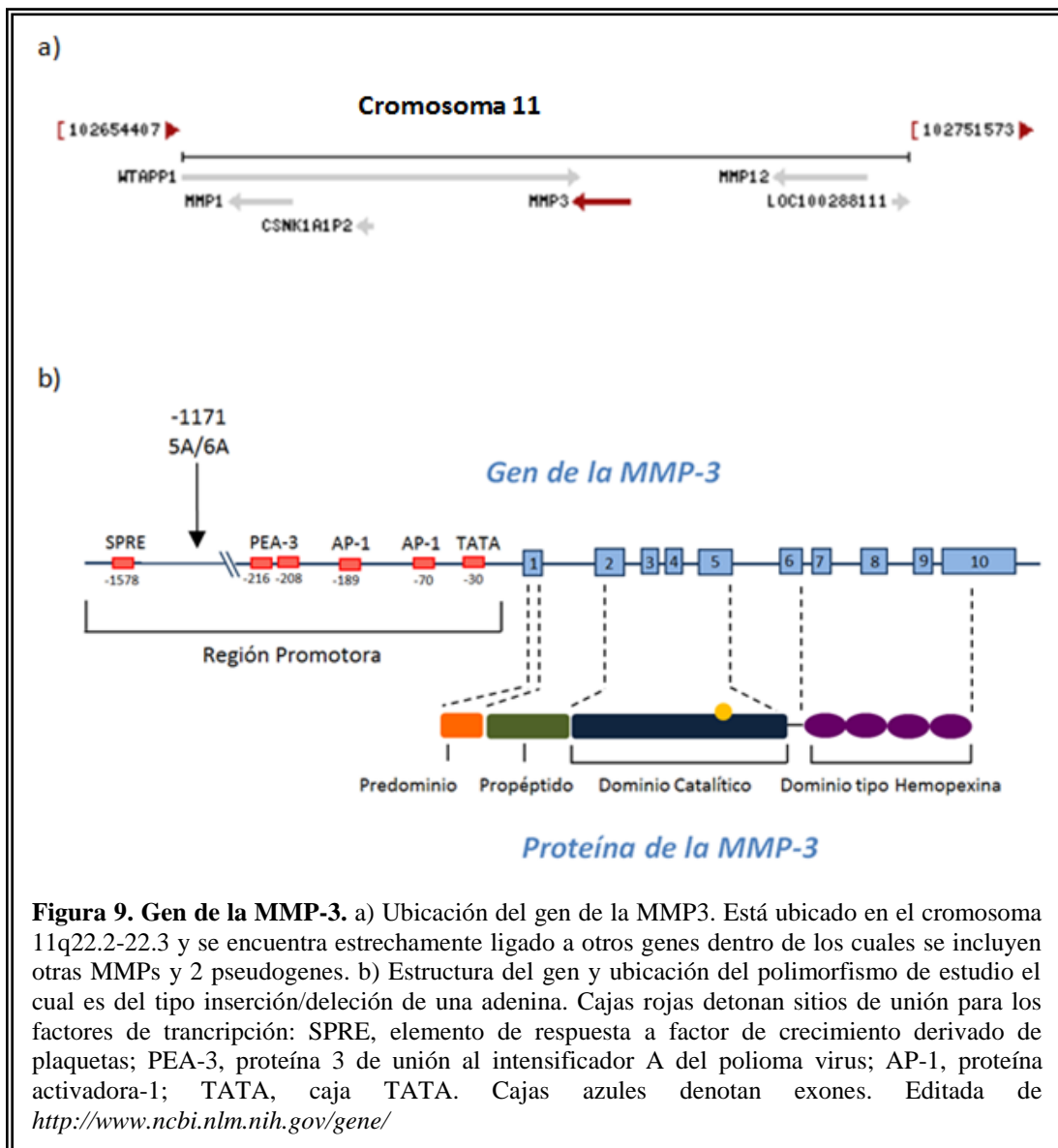


Figura 9. Gen de la MMP-3. a) Ubicación del gen de la MMP3. Está ubicado en el cromosoma 11q22.2-22.3 y se encuentra estrechamente ligado a otros genes dentro de los cuales se incluyen otras MMPs y 2 pseudogenes. b) Estructura del gen y ubicación del polimorfismo de estudio el cual es del tipo inserción/delección de una adenina. Cajas rojas detonan sitios de unión para los factores de transcripción: SPRE, elemento de respuesta a factor de crecimiento derivado de plaquetas; PEA-3, proteína 3 de unión al intensificador A del poliovirus; AP-1, proteína activadora-1; TATA, caja TATA. Cajas azules denotan exones. Editada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

C.5.2.1 Regulación transcripcional

La región promotora del gen contiene los elementos TATA, AP-1 y dos PEA-3, mismos que representan un paso importante en la regulación de la expresión de la MMP. Los agentes inductores de la MMP3 incluyen: citocinas inflamatorias (IL-1, TNF α , MIF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), oncostatina M, factor derivado del estroma-1 (SDF-1), forbol, irradiación UV, amiloideserico A, microglobulina- β_2 , fibronectina, relaxina, bradiquinina, trombina- α y la transformación celular oncogénica. La síntesis de la MMP3 es suprimida por el ácido retinoico, glucocorticoides, estrógeno, progesterona, TGF- β , el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1), IL-4, lipoxina A4, IFN- γ , entre otros^(39,62).

C.5.2.2 Activación de la pro-estromelina 1

La activación de la proenzima es llevada a cabo de manera similar a la descrita en la MMP1, en donde la activación es acomplejada por organomercuriales como el acetato de 4-amino fenilmercurio, por calentamiento a pH bajo, o por proteinasas como tripsina, quimiotripsina, triptasa, quimasa, plasmina, calicreina plasmática, elastasa leucocitaria, catepsina G, pseudolisina y termolisina. La activación por organomercuriales es iniciada por perturbación de la proenzimas antes que por interacción con la Cys del pro-péptido. La activación por proteinasas es iniciada por ataque proteolítico sobre los aminoácidos cercanos a la mitad del pro-péptido

localizados entre el primer y el segundo α -hélice. La escisión de esta región desestabiliza la interacción entre la Cys y el Zinc catalítico. Esto genera un intermediario de vida corta el cual experimenta autoescisión intermolecular, específicamente en el enlace His82-Phe83, resultando en una enzima activa de 45 kDa^(54,63,64).

C.5.2.3 Inhibición de la MMP3

La MMP3 es inhibida por el TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, α_2 -macroglobulina y ovo-macroglobulina en forma estequiométrica. La enzima es fuertemente inhibida por agentes quelantes como 1,10 fenantrolina, EDTA, EGTA, cisteína y DTT. La interacción de la MMP-3 con hidroxapatita induce cambios estructurales en la enzima y promueve autólisis e inactivación⁽⁶⁵⁾.

C.5.3 Función biológica

La MMP3 escinde un amplio número de proteínas de la MEC, no pertenecientes a la MEC y de la superficie celular. De igual forma, la MMP3 participa en la activación de las pro-colagenasas (MMP-1, -8, -13) y pro-gelatinasa B (MMP9). Esto sugiere que la enzima participa en el recambio fisiológico de la matriz y en la destrucción patológica de los tejidos actuando directamente sobre las proteínas no pertenecientes y pertenecientes de la MEC o indirectamente por la activación de otras matrixinas^(61,66).

C.5.4 Polimorfismo de estudio

El gen de la MMP3 humano presenta un polimorfismo tipo SNP en el promotor, un alelo con cinco adeninas (5A) y otro con seis adeninas (6A) en la posición -1171. El promotor con 6A en el sitio polimórfico es aproximadamente dos veces menos activo en la actividad transcripcional que el alelo con 5A, sugiriendo un posible aumento en el depósito de la matriz debido a los reducidos niveles en la expresión de la MMP3^(61,67).

D. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El IM representa la manifestación más significativa de la cardiopatía isquémica. Diversos estudios^(11,17) han demostrado la importancia de los factores genéticos, la interacción entre múltiples genes y los factores de riesgo ambientales, sin embargo, los resultados de estos estudios siguen siendo controversiales y sin consenso sobre sus implicaciones. Además, a causa de las diferencias raciales y étnicas en los polimorfismos genéticos, es importante construir una base de datos con los polimorfismos relacionados con el IM en población mexicana, ya que un enfoque para la prevención de esta condición es identificar los genes de susceptibilidad a la enfermedad.

Las MMPs 1 y 3 son proteínas relevantes en la patogénesis del IM ya que degradan la MEC debilitando las arterias e interfieren en la biomecánica de la capa fibrosa. La degradación excesiva de estas fibras de colágeno es reconocido como un mecanismo importante para la ruptura de la placa aterosclerótica⁽⁶⁾.

Como en muchas enfermedades, el IM también tiene un fondo genético donde los polimorfismos juegan un papel importante, se ha sugerido que los polimorfismos ubicados en las regiones promotoras de los genes que codifican para las MMPs 1 y 3 están relacionados con los niveles de expresión de estas moléculas. Los estudios encontrados en la literatura son escasos y en la población mexicana no hay alguno que determine la relación de estos polimorfismos y el IM, que es el

síndrome coronario agudo con mayor número de mortalidad e incidencia; por lo que se considera trascendental establecer dicha relación en la población mexicana a fin de conocer si existen alelos condicionantes de riesgo e inclusive los que tienen efecto protector para permitir establecer estrategias de prevención y tratamiento.

Por todo lo anterior se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Existirá relación entre los polimorfismos de las regiones promotoras de la MMP1 y MMP3 con el padecimiento de IM?

E. HIPÓTESIS

Si las MMPs 1 y 3 contribuyen al debilitamiento de la placa aterosclerótica con la subsecuente ruptura provocando una aterotrombosis y como consecuencia el IM; asimismo sus genes presentan sitios polimórficos los cuales regulan su producción, de ahí que algunos de sus alelos podrían diferenciar la susceptibilidad o resistencia de los pacientes para presentar IM.

F. OBJETIVOS

F.1 Objetivo general:

Determinar los SNPs localizados en los genes de las MMPs 1 y 3 (rs1799750 y rs35068180, respectivamente) involucrados en la degradación de la MEC y por tanto, en la ruptura de la placa de aterosclerosis.

F.2 Objetivos específicos:

Determinar las frecuencias de las variantes ubicadas en los sitios polimórficos de los genes promotores que codifican para las MMPs 1 y 3 en un grupo de pacientes mexicanos con IM y en un grupo control sin antecedentes familiares ni clínicos de IAM.

Comparar las frecuencias, entre los grupos de estudio con el fin de definir si algún SNP de las MMPs 1 y 3 estudiadas pudieran estar confiriendo susceptibilidad o protección para el desarrollo de este padecimiento en la población mexicana.

G. DISEÑO EXPERIMENTAL

G.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio de casos y controles de los polimorfismos -1607 y -1171 localizados en las MMPs 1 y 3 respectivamente, en pacientes con IM.

G.2 Población de estudio

G.2.1 Pacientes

El estudio incluyó 251 individuos mexicanos, no relacionados entre sí, que ingresaron al Departamento de Urgencias y Unidad Coronaria del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” con diagnóstico de IAM por ruptura de placa aterosclerótica.

G.2.1.1 Criterios de Inclusión:

- Hombres y mujeres mayores de 35 años.
- Que el motivo de ingreso al Instituto haya sido por IAM manifestado por:
 - Síntomas de dolor tipo anginoso (opresivo) localizado en el tórax, el cual se puede irradiar hacia la base del cuello, la mandíbula o hacia las extremidades superiores con una duración de más de 30 minutos y que se acompañe de síntomas neurovegetativos (sudoración, sensación de náuseas o vómito, sensación o acción de micción o defecación).

- Cambios electrocardiográficos consistentes con infarto agudo de miocardio: Elevación del segmento ST de > 0.1 mV en dos o más de las derivaciones contiguas electrocardiográficas. Asimismo se puede considerar un nuevo hallazgo o nueva presunción de bloqueo completo de la rama izquierda del haz de *His* asociado a los síntomas previamente referidos.
- El individuo estudiado debe ser mexicano y que dos generaciones previas a él sean nacidas en México.

G.2.1.2 Criterios de exclusión:

- Pacientes menores de 35 años.
- Dolor torácico ocasionado por otras causas: disección aórtica, pericarditis, valvulopatías, traumatismo u osteocondritis.
- Pacientes con enfermedades cerebro vasculares, como isquemia cerebral transitoria o cualquier indicio de daño estructural del sistema nervioso central como: neoplasia intracraneal o intraespinal, aneurisma o malformación arteriovenosa.
- Retinopatía diabética hemorrágica u otra condición hemorrágica oftálmica.

G.2.2 Grupo control

Se incluyó a 285 individuos sanos, sin parentesco con los pacientes incluidos en el estudio. Para ser considerado sano, el grupo control debió estar libre de síntomas y sin antecedentes familiares o clínicos de enfermedad cardiovascular, principalmente IM y presentar un ECG normal.

G.2.3 Como requerimiento adicional para ambos grupos (pacientes y controles):

A todos los individuos se les invitó a participar en el estudio y se obtuvo el consentimiento informado voluntario, éste fue de riesgo mínimo ya que solo incluía la venopunción antecubital para la obtención de 10 mL de sangre periférica.

El presente proyecto cumplió con los requisitos del comité institucional de ética e investigación del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

G.3 Variables

G.3.1 Dependientes:

- Polimorfismo en los genes de la MMP1 y MMP3

G.3.2 Independientes:

- Sujetos que presentan IM (Casos).
- Sujetos que no presentan sintomatología de IM (Controles).

G.3.3 Intervinientes:

- Edad de los individuos de estudio.
- Género de los individuos de estudio.
- Parámetros antropométricos.
- Mediciones bioquímicas.

G.4 Metodología

G.4.1 Extracción de ADN

A partir de la muestra extraída en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante se extrajo el ADN genómico por medio de la técnica de expulsión salina (Véase Anexo 1).

G.4.2 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizó con el equipo automatizado nanoDrop (ND-1000 spectrophotometer), la longitud de onda con la que se leyó el ADN fue a 260 nm. Por medio de diluciones se realizó el ajuste de la concentración para la obtención de 100 ng/μl de ADN.

G.4.3 Estandarización de la técnica

Se realizó la optimización de las condiciones a emplear en cada uno de los procesos.

G.4.4 Amplificación de ADN por PCR

A partir de las disoluciones del ADN genómico, se amplificaron los siguientes sitios polimórficos utilizando primers⁽³⁷⁾ sintetizados por la compañía Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

✓ MMP1 -1607

Primers: Forward 5'-TGACTTTTAAAACATAGTCTATGTTCA-3'

Reverse 5'-TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTCATAGC-3'

✓ MMP3-1171

Primers: Forward 5'-GGTTCTCCATTTCCTTTGATGGGGGGAAAGA-3'
Reverse 5'-CTTCCTGGAATTTACATCACTGCCACCACT-3'

G.4.5 Verificación de los amplificados

Se realizó por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

G.4.6 Digestión

Se sometieron a digestión los productos de PCR empleando las siguientes enzimas de restricción sintetizadas por la compañía ThermoScientific (Hudson, NH, USA).

MMP1 -1607. Enzima AluI, la cual reconoce al alelo 1G en el sitio 5'-AGCT-3'

MMP3-1171. Enzima PstI(Tth111I), la cual reconoce al alelo 5A en el sitio 5'-GACNNNGTC-3'

G.4.7 Tipificación de los polimorfismos

Se realizó por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa a 4.0% teñidos con bromuro de etidio.

✓ MMP1 -1607.

Los alelos 2G fueron representados por una banda de ADN con tamaño de 269 pb y los alelos 1G fueron representados por dos bandas de ADN con tamaños de 241 y 28 pb. Los heterocigotos mostraron una combinación de ambos alelos (269, 241 y 28 pb).

✓ MMP3 -1171.

Los alelos 6A fueron representados por una banda de ADN con tamaño de 129 pb y los alelos 5A fueron representados por dos bandas de ADN con tamaños de 97 y 32 pb. Los heterocigotos mostraron una combinación de ambos alelos (129, 97 y 32 pb).

G.5 Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de las MMPs 1 y 3 analizados se obtuvieron por conteo directo. En cada grupo de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) por medio de la prueba de Chi-cuadrada (χ^2). Las diferencias entre grupos se determinaron usando la prueba de χ^2 de Mantel-Haenzel, la cual combina tablas de contingencia de 2x2 usando el programa estadístico EPIINFO (V. 5.0; USD Incorporated 1990, Stone Mountain, GA, EUA); para datos cuantitativos se utilizó *t* de student. El valor de *p* se manejó con un nivel de significancia establecido como <0.05; el riesgo relativo con intervalo de confianza del 95% (IC) fue evaluado como razón de momios (RM) utilizando el método de Woolf⁽⁶⁸⁾. La hipótesis de herencia fue evaluada de acuerdo a cuatro modelos: codominante, dominante, recesivo y heterocigoto por medio del programa SNPStat's (bioinfo.iconcologia.net/SNPstats).

H. RESULTADOS

Las características demográficas y clínicas de los grupos de estudio se muestran en el Cuadro III. La distribución observada de la media de edad y de dislipidemia fue similar entre el grupo de pacientes y el grupo control, sin embargo, como era de esperarse la frecuencia del hábito de fumar, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión fue mayor en los pacientes que en los controles. Dentro del grupo de pacientes, 25.1% muestran daño en un solo vaso y 50.6% en dos o tres vasos sanguíneos. Por otro lado, 7.6% de los pacientes presentan calcificaciones coronarias.

Cuadro III. Características demográficas y clínicas de la población de estudio

Variable	Casos (n=251)	Controles (n=285)	valor de p*
Edad	59.39±10.91	59.58±5.86	0.799 [†]
Sexo (M/F)	209/42	134/151	<0.001
IMC(kg/m ²)	27.27±4.22	28.23±4.16	0.008 [†]
Hábito de fumar			
Fumadores	171 (68.1%)	47 (16.5%)	<0.001
No fumadores	80 (31.9%)	238 (83.5%)	
Consumo de alcohol			
Si	91 (36.2%)	144 (50.5%)	<0.001
No	160 (63.8%)	141 (49.5%)	
Diabetes mellitus tipo 2			
Si	105 (41.8%)	37 (13%)	<0.001
No	146 (58.2%)	248 (87%)	
Hipertensión			
Si	181 (72.1%)	145 (50.9%)	<0.001
No	70 (27.9%)	140 (49.1%)	
Dislipidemia			
Si	160 (63.8%)	197 (69.1%)	0.188
No	91 (36.2%)	88 (30.9%)	
Angiografía coronaria			
Un vaso	63 (25.1%)		
Dos o tres vasos	127 (50.6%)		
Calcificaciones coronarias	19 (7.6%)		

* Prueba de χ^2 de Mantel-Haenzel; [†] Prueba de t-student

Se analizó el HWE para cada uno de los SNP de los genes de las metaloproteasas (MMP1 y MMP3) y en cada uno de los grupos estudiados mediante una prueba de χ^2 . Los valores obtenidos se muestran en el cuadro IV, donde se observa que el SNP de la MMP1 presentó una desviación al HWE en ambos grupos de estudio.

Cuadro IV. Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos de las Metaloproteasas

SNP	Casos (n= 251)		Controles (n=285)	
	valor de p	χ^2	valor de p	χ^2
MMP-1-1607 2G/1G	<0.0001	35.04	<0.0001	47.56
MMP-3-1171 6A/5A	0.17	2.14	0.78	0.18

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de las MMPs (rs1799750 y rs3568180), mostraron una distribución similar en ambos grupos de estudio ya que en ninguna de las comparaciones alélicas y genotípicas la p es menor a 0.05, Cuadro V.

Cuadro V. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de las MMPs en pacientes con IM y grupo control.

		Casos (n=251)	Controles (n=285)	RM	IC 95%	p
<i>MMP1 -1607 2G/1G (rs1799750)</i>						
Alelos	2G	464(92%)	530(93%)	0.92	0.58-1.46	0.73
	1G	38(8%)	40(7%)	1.09	0.68-1.72	0.73
Genotipos	2G/2G	221(88%)	254(89%)	0.9	0.53-1.54	0.69
	1G/2G	22(9%)	22(8%)	1.15	0.62-2.12	0.66
	1G/1G	8(3%)	9(3%)	1.01	0.38-2.66	0.98
<i>MMP3 -1171 6A/5A (rs35068180)</i>						
Alelos	6A	354(71%)	403(71%)	0.99	0.76-1.29	0.95
	5A	148(29%)	167(29%)	1.01	0.78-1.31	0.95
Genotipos	6A/6A	120(48%)	141(49%)	0.94	0.67-1.31	0.70
	6A/5A	114(45%)	121(42%)	1.13	0.80-1.59	0.49
	5A/5A	17(7%)	23(8%)	0.83	0.43-1.59	0.57

Se elaboró un análisis de riesgo estimado por medio de cuatro modelos de herencia (codominante, dominante, recesivo y heterocigoto) relacionando el infarto de miocardio con los polimorfismos de las MMPs (Cuadros VI y VII). Sin embargo, no se obtuvieron valores estadísticamente significativos en ningún modelo de herencia.

Cuadro VI. Análisis de asociación del polimorfismo MMP1 -1607 2G/1G con diferentes modelos genéticos.

Modelo	Genotipo	Controles (n=285)	Casos (n=251)	RM (95% CI)	Valor de p	AIC
Codominante	2G/2G	254	221	1	0.91	746.7
	1G/2G	22	22	1.15 (0.62-2.13)		
	1G/1G	9	8	1.02 (0.39-2.69)		
Dominante	2G/2G	254	221	1	0.7	744.7
	1G/2G-	31	30	1.11 (0.65-1.90)		
	1G/1G					
Recesivo	2G/2G-	276	243	1	0.98	744.9
	1G/2G					
	1G/1G	9	8	1.01 (0.38-2.66)		
Heterocigoto	2G/2G-	263	229	1	0.66	744.7
	1G/1G					
	1G/2G	22	22	1.15 (0.62-2.13)		

Cuadro VII. Análisis de asociación del polimorfismo MMP3 -1171 6A/5A con diferentes modelos genéticos.

Modelo	Genotipo	Controles (n=285)	Casos (n=251)	RM (95% CI)	Valor de p	AIC
Codominante	6A/6A	141	120	1	0.72	746.3
	6A/5A	121	114	1.11 (0.78-1.58)		
	5A/5A	23	17	0.87 (0.44-1.70)		
Dominante	6A/6A	141	120	1	0.7	744.7
	6A/5A-	144	131	1.07 (0.76-1.50)		
	5A/5A					
Recesivo	6A/6A-	262	234	1	0.57	744.6
	6A/5A					
	5A/5A	23	17	0.83 (0.43-1.59)		
Heterocigoto	6A/6A-	164	137	1	0.49	744.4
	5A/5A					
	6A/5A	121	114	1.13 (0.80-1.59)		

I. DISCUSIÓN

El IM es un trastorno multifactorial y poligénico complejo, el cual resulta de la interacción entre la composición genética y diversos factores ambientales⁽¹¹⁾. Tradicionalmente se han considerado factores de riesgo ambientales o también denominados modificables al tabaquismo, diabetes, hipertensión arterial, sedentarismo, dislipidemia y obesidad^(12,13). Sin embargo, en la última década se han identificado variantes genéticas denominadas polimorfismos las cuales se han asociado al desarrollo del IM^(17,69).

Las MMPs son proteínas relevantes en la patogénesis del IM, ya que degradan la matriz extracelular debilitando las arterias e interfieren en la biomecánica de la capa fibrosa⁽⁶⁾. De igual forma, cambios en la expresión de las MMPs en tejido vascular y cardíaco han sido implicados en la patogénesis de diversas condiciones cardiovasculares incluidas aterosclerosis, aneurisma, restenosis post-angioplastia, entre otras^(26,70).

Pérez-Hernández y cols.⁽⁷¹⁾ realizaron en un estudio en población mexicana, encontrando en base al modelo dominante, que individuos con el alelo A en *MMP2-1575* poseen 1.65 veces mayor riesgo de desarrollar IM ($p=0.002$). En este sentido, no se han reportado estudios de asociación de *MMP1-1607* y *MMP3-1171* con el IM en nuestra población, por tanto, en el presente estudio se analizaron 251 pacientes con diagnóstico de IAM por ruptura de placa aterosclerótica y 285 sujetos aparentemente sanos para evaluar las frecuencias de los polimorfismos de las MMPs 1 y 3 como posible factor de riesgo en la población.

➤ *MMP1-1607*

En los resultados obtenidos, las frecuencias genotípicas de *MMP1-1607* no se encontraron en HWE en ambos grupos de estudio, sin embargo, la desviación no es debida a un error de laboratorio, ya que al igual a lo descrito por Alp y cols.⁽⁷²⁾ se procedió a genotipar por segunda vez 50 muestras elegidas al azar obteniendo resultados consistentes, por lo cual, la desviación obtenida al HWE puede deberse al tamaño de los grupos de estudio, que exista un desequilibrio de ligamiento entre el polimorfismo estudiado con otros polimorfismos, o ambos^(73,74).

Ye y cols.⁽⁷⁵⁾ en un estudio en población caucásica, reportaron que el riesgo de enfermedad coronaria se reduce en individuos homocigotos para el alelo 2G en comparación con los que son homocigotos para el alelo 1G (RM= 0.6, 95% IC: 0.3-0.9; $p= 0.041$). Sin embargo, en el presente estudio al igual que Ghaderian y cols.⁽⁷⁶⁾ en un estudio en población iraní, las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas fueron similares en los grupos de estudio, no encontrando asociación del polimorfismo *MMP1-1607* con IM.

Por otra parte, Román-García y cols.⁽⁷⁷⁾ encontraron una asociación significativa del haplotipo 2G₋₁₆₀₇G₋₅₁₉T₋₃₄₀ de la *MMP1* con el riesgo de IM en población española (RM= 2.40; 95% IC: 1.27–4.55; $p<0.006$), por lo cual podría darse continuidad al estudio ampliándose el número de polimorfismos a evaluar.

➤ *MMP3-1171*

Con base en las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas no se encontró asociación del polimorfismo -1171 6A/5A con el IM, al igual a lo reportado por

Sakowicz y cols.⁽⁶⁹⁾; sin embargo, nuestros resultados difieren de lo reportado por Yamada y cols.⁽¹¹⁾ ya que encuentran significativo al alelo 6A, bajo el modelo dominante, con el riesgo a sufrir IM en mujeres japonesas (RM= 4.7; 95% IC: 2.0-12.2; $p < 0.001$); en contraste, Beyzade y cols.⁽⁷⁸⁾ reportan que caucásicos con el genotipo 5A/5A presentan el doble de riesgo de IM (RM= 2.02; 95% IC: 1.14-3.60; $p = 0.016$) e individuos heterocigotos (5A/6A) presentan un riesgo menor (RM= 1.78; 95% IC: 1.05-3.00; $p = 0.032$).

Las diferencias en los resultados anteriores puede deberse a la variación étnica, la heterogeneidad de los grupos estudiados o a los diferentes tamaños de muestras⁽⁷⁹⁾; cabe mencionar que la población mexicana presenta características genéticas diferentes a otras poblaciones; debido a que nuestra carga genética está formada por una mezcla de genes que se han estado combinando por más de 500 años, conformada por un 56% de genes amerindios, 40% de genes caucásicos y 4% de genes negroides⁽⁴⁾; además de los diferentes estilos de vida y costumbres que hacen a ciertas poblaciones más susceptibles que a otras a padecer ciertas patologías, por lo cual, datos reportados en otras poblaciones no se pueden aplicar a la población mexicana.^(4,79)

Finalmente, Nojiri y cols.⁽⁸⁰⁾ relacionan el haplotipo 5A-1G como un riesgo genético para el IM (RM= 1.97; $p = 0.0082$), en el presente estudio no fue posible realizar el análisis de haplotipos para evitar errores tipo I o tipo II debido a la desviación obtenida al HWE en la *MMP-1607*.

J. CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que estas variantes genéticas (*MMP1-1607* y *MMP3-1171*) no se asocian al padecimiento de infarto al miocardio por ruptura de placa aterosclerótica en la población mexicana.

K. REFERENCIAS

1. Rosas-Peralta M, Attie F. Enfermedad cardiovascular. Primera causa de muerte en adultos de México y el mundo. Arch Cardiol Mex. 2007; 77: 91-93.
2. Velazquez-Monroy O, et al. Prevalencia e interrelación de enfermedades crónicas no transmisibles y factores de riesgo cardiovascular en México. Arch Cardiol Mex. 2003; 73: 62-77.
3. Rosas Peralta M, et al. Re-encuesta Nacional de Hipertensión Arterial (RENAHTA): Consolidación Mexicana de los Factores de Riesgo Cardiovascular. Cohorte Nacional de Seguimiento. Arch Cardiol Mex. 2005; 75: 96-111.
4. Vargas-Alarcón G. Polimorfismos genéticos en enfermedades cardiovasculares. La experiencia en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Arch Cardiol Mex. 2007; 77: 88-93.
5. Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase -1, -2 or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation and death, in vitro. J Clin Invest. 1998; 101: 1478-1487.
6. Newby A, Johnson J. Genetic strategies to elucidate the roles of matrix metalloproteinases in atherosclerotic plaque growth and stability. Circ Res. 2005; 97: 958-960.
7. World Health Organization. [Internet]; 2013 [citado 8 de Noviembre 2013]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>.
8. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. [Internet]; 2013 [citado 8 de Noviembre 2013]. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>.
9. Férrez SM, Lupi M. El comportamiento del miocardio en la isquemia y en la reperfusión. Madrid: Elsevier; 2004.
10. Carlos A, Cassiani M, Cabrera AG. Síndromes coronarios agudos: Epidemiología y diagnóstico. Salud Uninorte. 2009; 25: 118-134.
11. Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. N Engl J Med. 2002; 347: 1916-1923.
12. García A, Sánchez CJ, Martínez C, Llamas G, et al. Guías clínicas para el manejo del infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST. Arch Cardiol Mex. 2006; 76: S12-S120.

13. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 60: 1581-1598.
14. Aguilar J, Garabito RD. Infarto agudo de miocardio. *Rev Paceaña Med Fam.* 2008; 5: 102-114.
15. Guadalajara JF. *Cardiología.* 6a ed. Distrito Federal: Méndez Editores; 2006.
16. Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. *Tratado de cardiología.* Distrito Federal: Intersistemas; 2012.
17. Yamada Y, Ichihara S, Nishida T. Molecular genetics of myocardial infarction. *Genomic Med.* 2008; 2: 7-22.
18. Gómez M, Valle V, Arós F, Sanz G, et al. LDL oxidada, lipoproteína(a) y otros factores de riesgo emergentes en el infarto agudo de miocardio (estudio FORTIAM). *Rev Esp Cardiol.* 2009; 62: 373-382.
19. López A, Macaya C. *Libro de la salud cardiovascular del hospital clínico San Carlos y la fundación BBVA.* Bilbao: Fundación BBVA; 2009.
20. Llevadot J. *Síndromes coronarios agudos.* Madrid: Elsevier; 2004.
21. Arbad-Zadeh A, Nakano M, Virmani R, Fuster V. Acute coronary events. *Circulation.* 2012; 125: 1147-1156.
22. Martínez J, Llorente V, Badimon L. *Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas.* *Rev Esp Cardiol.* 2001; 54: 218-231.
23. Libby, P. The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Intern Med.* 2008; 263: 517-27.
24. Espondaburu OR, Fara VA, Inés L. El proceso aterogénico y su desarrollo en las enfermedades autoinmunes. *Acta Bioquim Clin L.* 2004; 38: 181-192.
25. Corti R, Fuster V, Badimon JJ. Pathogenetic concepts of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41: 7S-14S.
26. Bohórquez JC. Metaloproteinasas de matriz: su implicación en las enfermedades vasculares periféricas. *Angiología.* 2006; 58: 269-277.
27. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 2005; 111: 3481-3488.
28. Lodish H, Darnell J. *Biología celular y molecular.* 4a ed. Madrid: Editorial Medica Panamericana; 2002.

29. Cascales M, Álvarez JÁ. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An R Acad Nac Farm.* 2010; 76: 59-84.
30. Hoe Kong C, Yun Lin X, Cheng Woo C, Chew Wong H, Et al. Characteristics of aortic wall extracellular matrix in patients with acute myocardial infarction: tissue microarray detection of collagen I, collagen III and elastin levels. *Interac Cardiovasc Thorac Surg.* 2013; 16: 11-15.
31. Rodríguez JA, Orbe J, Páramo JA. Metaloproteasas, remodelado vascular y síndromes aterotrombóticos. *Rev Esp Cardiol.* 2007; 60: 959-67.
32. Páramo JA, Montero I, Rodríguez JA, Orbe J. Metaloproteasas en aterosclerosis: implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas. *Clin Invest Arterioscl.* 2005; 17: 133-141.
33. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274: 21491-21494.
34. Creemers E, Cleutjens J, Smits J, Daemen M. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction. A new prevent heart failure?. *Circ Res.* 2001; 89: 201-210.
35. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10: 602-608.
36. Van P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukocyte Biol.* 2007; 82: 1375-1381.
37. Fang S, Jin X, Li Y, Guo W, Et al. Polymorphisms in the MMP1 and MMP3 promoter and non-small cell lung carcinoma in North China. *Carcinogenesis.* 2005; 26: 481-486.
38. McDonnell S, Morgan M, Lynch C. Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes. *Biochem Soc T.* 1999; 27: 734-740.
39. Amálinei C, Cáruntu ID. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol.* 2007; 48: 323-334.
40. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 2004; 90: 2493-2503.
41. Sukhova GK, Shönbeck U, Rabkln E, Schoen FJ, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circ Res.* 1999; 99: 2503-2509.
42. Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Et al. Interstitial collagenase (MMP1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circ Res.* 1995; 92: 1393-8.
43. Newby AC. Metalloproteinases and Vulnerable Atherosclerotic Plaques. *Trends Cardiovasc Med.* 2007; 17: 253-258.

44. Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and Extracellular Matrix. *J Atheroscler Thromb.* 2003; 10: 267-274.
45. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *P Natl Acad Sci USA.* 1962; 48: 1014-1022.
46. Bauer EA, Eisen AZ, Jeffrey JJ. Immunologic relationship of a purified human skin collagenase to other human and animal collagenases. *Biochim Biophys Acta.* 1970; 206: 152-160.
47. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Baur EA, et al. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem.* 1986; 261: 6600-6605.
48. Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukocyte Biol.* 2007; 82.
49. Cawston TE. Matrix Metalloproteinase-1/Interstitial Collagenase. En Rawlings ND, Salvesen G, editores. *Handbook of Proteolytic Enzymes.* 3a ed. Londres: Elsevier; 2013. p. 718-725.
50. Jeffery JJ. Interstitial Collagenses. En Parks WC, Mecham RP, editores. *Matrix Metalloproteinases.* San Diego: Academic press; 1998. p. 15-40.
51. Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37: 283-288.
52. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3: 207-214.
53. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2001; 4: 157-164.
54. Vissie R, Nagese H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92: 827-839.
55. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!. *Curr Opin Cell Biol.* 2001; 13: 534-540.
56. Arakaki PA, Marques MR, Santos MC. MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological processes. *J Bioscience.* 2009; 34: 313-320.
57. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res.* 1998; 58: 5321-5325.

58. Okada Y, Nagase H, Harris EDJ. Matrix metalloproteinases 1, 2, and 3 from rheumatoid synovial cells are sufficient to destroy joints. *J Rheumatol*. 1987; 14: 41-42.
59. Nagase H. Matrix Metalloproteinase 3/Stromelysin 1. En Rawling ND, Salvesen G, editores. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 3a ed. Londres: Elsevier; 2013. p. 763-774.
60. Wilhelm SM, Shao ZH, Housley TJ, Seperack P, et al. Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1). Identification as the cartilage acid metalloprotease and effect of pH on catalytic properties and calcium affinity. *J Biol Chem*. 1993; 268: 21906-21913.
61. Munhoz A, Godoy AL, Santos LG. MMP-3 polymorphisms: genetic marker in pathological processes (Review). *Mol Med Rep*. 2010; 3: 735-740.
62. Birkedal H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4: 197-250.
63. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res*. 2003; 59: 812-823.
64. Jeong H, Parks WC. Control of matrix metalloproteinases catalytic activity. *Matrix Biol*. 2007; 26: 587-596.
65. Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Euro Respir J*. 2011; 38: 191-208.
66. Wei L, Shi YB. Matrix metalloproteinase stromelysin-3 in development and pathogenesis. *Histol Histopathol*. 2005; 20: 177-185.
67. Niu W, Qi Y. Matrix metalloproteinase family gene polymorphisms and risk for coronary artery disease: systematic review and meta-analysis. *Heart*. 2012; 98: 1483-1491.
68. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet*. 1955; 19: 251-253.
69. Sakowicz A, Fendler W, Lelonek M, Sakowicz B, et al. Genetic polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patient under 45 years of age. *Biochem Genet*. 2013; 51: 230-242.
70. Ye S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovasc Res*. 2006; 69: 636-645.
71. Pérez-Hernández N, Vargas-Alarcón G, Martínez-Rodríguez N, Martínez-Ríos MA, et al. The matrix metalloproteinase 2-1575 gene polymorphism is associated with the risk of developing myocardial infarction in Mexican patients. *J Atheroscler Thromb*. 2012; 19: 718-727.

72. Alp E, Menevse S, Tulmac M, Yilmaz A, Et al. The role of matrix metalloproteinase-2 promoter polymorphisms in coronary artery disease. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011; 15: 193-202.
73. Soriguer F, Morcillo S. ¿Qué hacer cuando en los estudios de epidemiología biomolecular la distribución genotípica no se ajusta al equilibrio de Hardy-Weingerg?. *Endocrinol Nutr*. 2007; 54: 169-173.
74. Burton PR, Tobin MD, Hopper JL. Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet*. 2005; 366: 941-951.
75. Ye S, Gale CR, Martyn CN. Variation in the matrix metalloproteinase-1 gene and risk of coronary heart disease. *Eur Heart J*. 2003; 24: 1668-1671.
76. Ghaderian SM, Akbarzadeh R, Tabatabaei AS. Genetic polymorphisms and plasma levels of matrix metalloproteinases and their relationships with developing acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis*. 2010; 21: 330-335.
77. Román-García P, Coto E, Reguero JR, Cannata-Andía JB, et al. Matrix metalloproteinase 1 promoter polymorphisms and risk of myocardial infarction: a case-control study in a Spanish population. *Coron Artery Dis*. 2009; 20: 383-386.
78. Beyzade S, Zhang S, Wong Yk, Day IN, et al. Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 2130-2137.
79. Srivastava P, Kapoor R, Mittal RD. Influence of matrix metalloproteinase gene polymorphisms in healthy north indians compared to variations in other ethnic groups worldwide. *Asian Pac J C Prev*. 2009; 10: 1127-1130.
80. Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, et al. Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanes. *Inter JCardiol*. 2003; 92: 181-186.
81. Lahiri DK, Nunberger I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19: 5444.

L. ANEXOS

L.1 Extracción de ADN.

Método de expulsión salina. Modificada de Lahiri y col.⁽⁸¹⁾

- Recolectar 5-6 mL de sangre total con EDTA como anticoagulante
- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos y desechar el plasma.
- Separar las células nucleadas con TKM-1 (3/4 partes)
- Pasar la muestra a un tubo Falcon de 50 mL y agregar TKM-1 hasta obtener un volumen de 20 mL.
- Adicionar 130 µL de Tritón X-100
- Agitar durante 10 minutos en el OrbitronRotator II
- Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm
- Desechar el sobrenadante
- Resuspender el pellet en TKM-1 hasta la marca y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos (repetir el paso 9, las veces necesarias hasta obtener el pellet de color blanco)
- Agregar 800 µL de TKM-2
- Con la ayuda de una pipeta traspasar a un tubo Eppendorf y adicionar 50 µL de SDS 10%
- Agitar la muestra en el vortex
- Incubar 10 minutos a 55°C
- Agitar nuevamente la muestra en el vortex
- Adicionar 300 µL de NaCl a una concentración 5M
- Colocar la muestra en la microcentrifuga a 14000 rpm durante 5 minutos.
- Tomar el sobrenadante y transvasar el volumen a dos tubos Eppendorf (rotulados como 20°C y -70°C para su almacenaje)
- Adicionar 900µL de etanol absoluto a temperatura ambiente en cada uno de los tubos.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C de temperatura.

- Decantar el sobrenadante
- Adicionar 900 μL de etanol al 70% frío
- Centrifuga a 4°C por 5 minutos a 14000 rpm
- Descartar el sobrenadante
- Introducir las muestras abiertas en el Speed back 10 minutos (para eliminar el exceso de etanol de la muestra)
- Agregar 150 μL de TE
- Incubar a 65°C mínimo durante 15 minutos
- Medir la concentración del ADN a 260 nm