

UACM

**Universidad Autónoma
de la Ciudad de México**

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“Estudio de los polimorfismos de los genes de las Metaloproteasas (MMPs) 1, 2, 3, 7, 9 y
12 en pacientes con Infarto Agudo al Miocardio”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

Nonanzit Iracema Pérez Hernández

Director de tesis

Dr. José Humberto Nicolini Sánchez

México, D.F. Diciembre, 2015.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

“Estudio de los polimorfismos de los genes de las Metaloproteasas (MMPs) 1, 2, 3, 7, 9 y 12 en pacientes con Infarto Agudo al Miocardio”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

Nonanzit Iracema Pérez Hernández

Director de tesis

Dr. José Humberto Nicolini Sánchez

Codirector

Dr. Gilberto Vargas Alarcón

México, D.F. Diciembre, 2015.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de:



Dr. Gilberto Vargas Alarcón
En el Instituto Nacional de Cardiología
"Ignacio Chávez"
Departamento de Biología Molecular

UACM

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE LA CIUDAD DE MÉXICO

Nada humano me es ajeno

Dr. Humberto Nicolini Sánchez
En el Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

UACM

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE LA CIUDAD DE MÉXICO

Nada humano me es ajeno

AGRADECIMIENTOS

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”



AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis:

Dr. Gilberto Vargas Alarcón, por todas las enseñanzas y el buen ejemplo de lo que es trabajar duro. Todas y cada una de sus palabras siempre han sido para mi motivo de superación, créame que ninguna de ellas ha sido en vano.

Dr. Humberto Nicolini Sánchez su amabilidad, calidez y comprensión ante lo difícil que es culminar un Doctorado, sinceramente agradezco todas sus observaciones a mi trabajo en cada seminario.

Dra. Sara Frías Vázquez por todos los conocimientos aportados para el beneficio de este trabajo y también por los consejos dados para el beneficio de mi persona.

A mis asesores de tesis:

Dra. Elisa Azuara (UACM), Dr. César López (UACM), Dr. David Cruz Robles (INCICH), Dr. José Manuel Rodríguez Pérez (INCICH). Muchas gracias por todas sus aportaciones para este trabajo, cada uno de los seminarios fue realmente enriquecedor a nivel profesional y personal.

A mis lectores de tesis:

Dr. Julio Granados Arriola (INCMNSZ), Dr. Joaquín Zúñiga Ramos (INER), Dra. Elisa Azuara (UACM), Dr. César López (UACM). Gracias por leer esta tesis, realizar sus valiosas observaciones y sobre todo por estar conmigo en el día más especial de mi carrera profesional.

AGRADECIMIENTOS

A mi Familia Rodríguez Pérez:

José Manuel te agradezco que siempre me has alentado a seguir, que compartimos el gusto por nuestra profesión, “por nuestras locuras” en la ciencia, por nunca darnos por vencidos a pesar de todas las adversidades, porque siempre al final del día sonreímos y nos vamos a casa. Pero nada de esto sería posible si no existiera el amor que nos tenemos.

Hijo Matías... espero que cuando aprendas a leer y leas esto, sientas que este agradecimiento hacia ti es de corazón, ya que llegaste a mi vida en el preciso momento y que mamá terminó este trabajo junto a ti porque así debía ser.

A mis Padres y Familia de Xalapa:

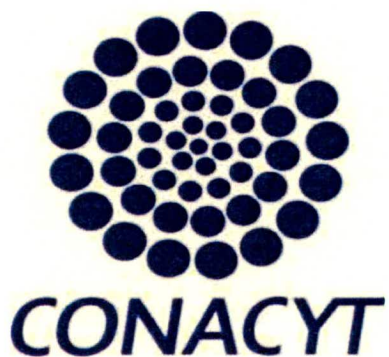
Papás y hermano, gracias por nunca soltar mi mano, por ayudarme en todo momento, por sus sacrificios, por estar y cuidar de Matías cuando más lo necesite, somos un equipo. A toda mi familia en Xalapa, porque siempre me han hecho sentir apapachada y muy amada por todos ustedes.

A mi familia de Loma Bonita:

Por todas sus muestras de cariño y aliento en cada momento difícil.

A mis amigos:

Sé que realmento cuento con cada uno de ustedes, soy afortunada de contar con gente tan maravillosa que siempre ha estado conmigo en las buenas y las no tanto. Gracias por su sincera amistad.



Este trabajo fue apoyado por CONACYT.

Ciencia Básica 2008 (Proyecto número 106012)

Título del proyecto:

Estudio de los polimorfismos de las metaloproteasas 1, 2, 3, 7, 9 y 12
en la susceptibilidad genética al desarrollo del infarto al miocardio.

INDICE

Abreviaturas	1
Abstract	4
Resumen	5
I. INTRODUCCIÓN	7
I.A. ANTECEDENTES GENERALES	9
1. EPIDEMIOLOGÍA	9
1.1. Morbilidad	9
2. ANATOMÍA CARDIOVASCULAR	13
2.1. Características exteriores	13
3. FISIOLOGÍA CARDIOVASCULAR	17
3.1. Bombeo del corazón	19
3.2. Endotelio	20
4. SÍNDROMES ISQUÉMICOS CORONARIOS AGUDOS	23
4.1. La placa ateroscleróticas	24
4.2. Lesiones iniciales	25
4.2.1. Tipo I o lesión inicial	25
4.2.2. Tipo II o arteria grasa	25
4.2.3. Tipo III o preateroma	26
4.3. Lesiones avanzadas	26
4.3.1. Lesión tipo IV o ateroma	26
4.3.2. Lesión tipo V o fibroateroma	26
4.4. Lesión tipo IV o placa complicada	26
4.5. La placa vulnerable	26
4.5.1. Marcadores serológicos de vulnerabilidad	27
5. DEFINICIÓN UNIVERSAL DEL INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO	29
5.1. Clasificación de los diferentes tipos de infarto	30

INDICE

- Tipo 1	30
- Tipo 2	30
- Tipo 3	30
- Tipo 4a	30
- Tipo 4b	30
- Tipo 5	30
5.2. Factores de riesgo a infarto	31
5.3. Medidas generales y tratamiento adjunto en la fase aguda de la cardiopatía isquémica.	32
6. CONCEPTOS PATOGENICOS DEL SÍNDROME CORONARIO AGUDO	33
6.1. Inicio de la enfermedad aterotrombótica: el papel del endotelio	35
6.2. Progresión de la placa de aterosclerosis	37
6.3. Lenta progresión de la placa	38
6.4. Rápida progresión de la placa	38
6.5. Procesos activos- Metaloproteasas y factores titulares	39
7. MANTENIMIENTO E INTERIGAD DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR	40
7.1. Matriz extracelular	40
8. FAMILIA DE LAS METALOPROTEASAS	
8.1. Estructura y función	45
8.2. Regulación y actividad de las Metaloproteasas	50
8.2.1. Transcripción	50
8.2.1.1. Regulación por citocinas	50
8.2.1.2. Regulación por transducción de señales y factores nucleares	51

INDICE

8.3. Activación de las pro-MMP	52
8.3.1. Bases estructurales de la activación	52
8.3.2. Compartimentos activadores	53
8.4. Inhibidores de las MMPs	53
8.4.1. TIMPS	53
8.4.1.1. Descripción del gen	54
8.4.1.2. Mecanismos de inhibición de TIMPs y sus variantes	55
8.4.1.3. Otros inhibidores endógenos de las MMPs	56
I.B. ESTADO DEL ARTE	58
I.C. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO	60
1. FACTOR MODIFICANTE DE LA REGULACIÓN	60
1.1. Regulación por polimorfismos de un solo nucleótido (rSNP)	60
2. POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA METALOPROTEASA	64
2.1. Polimorfismos en el promotor del gen de la Metaloproteasa 1	64
2.1.1. Nombres alternativos	64
2.1.2. Función	64
2.1.3. Regulación	64
2.1.4. Polimorfismo de estudio	64
2.2. Polimorfismos en el promotor del gen de la Metaloproteasa 2	
2.2.1. Nombres alternativos	65
2.2.2. Función	65
2.2.3. Regulación	65
2.2.4. Polimorfismo de estudio	65

INDICE

2.3. Polimorfismos en el promotor del gen de la Metaloproteasa 3	67
2.3.1. Nombres alternativos	67
2.3.2. Función	67
2.3.3. Regulación	67
2.3.4. Polimorfismo de estudio	67
2.4. Polimorfismos en el promotor del gen de la Metaloproteasa 7	69
2.4.1. Nombres alternativos	69
2.4.2. Función	69
2.4.3. Regulación	69
2.4.4. Polimorfismo de estudio	69
2.5. Polimorfismos en el promotor del gen de la Metaloproteasa 9	70
2.5.1. Nombres alternativos	70
2.5.2. Función	70
2.5.3. Regulación	70
2.5.4. Polimorfismo de estudio	70
2.6. Polimorfismos en el promotor del gen de la Metaloproteasa 12	71
2.6.1. Nombres alternativos	71
2.6.2. Función	71
2.6.3. Regulación	71
2.6.4. Polimorfismo de estudio	71
3. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN EN OTRAS POBLACIONES	73
4. JUSTIFICACIÓN	74

INDICE

5. HIPÓTESIS	75
II. OBJETIVOS	76
II. A. OBJETIVO GENERAL	77
II. B. OBJETIVOS PARTICULARES	77
III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	79
Continuación de la estrategia	80
IV. METODOLOGÍA	82
1. Diseño de estudio	82
2. Sujetos de estudio	
2.1. Puntaje de calcio y valor pronóstico	82
2.2. Criterios de inclusión	83
2.3. Criterios de exclusión	83
2.4. Requerimiento adicional para ambos grupos	84
3. Estudio genético	84
3.1. Extracción de DNA	84
3.1. 1. Cuantificación de DNA	84
3.2. PCR en tiempo real	84
3.3. PCR-RFLP	84
3.4. Extracción de RNA de tejidos de pacientes	85
3.5. Extracción de RNA de tejidos de controles	85
3.6. Expresión génica de MMP2	85
4. Cinecoronariografía	85
5. Análisis estadístico	86

INDICE

V. RESULTADOS	87
1. Polimorfismos estudiados de la MMP-1, 2, 3, 7, 9 y 12	88
1.1. Características de las muestras de estudio	89
1.2. Frecuencias alélicas y genotípicas	91
1.3. Modelos de herencia y variables de riesgo	94
1.4. Haplotipos	96
2. Cinecoronariografía	99
3. Expresión de MMP 2 en arterias coronarias de pacientes con infarto al miocardio	100
4. Cuantificación relativa para expresión génica de la MMP 2 usando PCR en tiempo real	100
VI. DISCUSIÓN	102
VII. CONCLUSIONES	108
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
IX. ANEXOS	131
Anexo 1. Artículos	132
Anexo 2. Técnicas	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corazón	14
Figura 2. Cara anterior del corazón	15
Figura 3. Fisiología cardiovascular	18
Figura 4. SICA	23
Figura 5. Iniciación progresión y complicación de la placa ateroscleróticas coronaria	33
Figura 6. Lesión aterosclerótica	34
Figura 7. Inicio de la enfermedad aterotrombótica	38
Figura 8. Síntesis y degradación de la MEC en aterosclerosis	43
Figura 9. Dominio estructural, general para cada grupo de MMPs	47
Figura 10. Estructura de ADAM y ADAMTS	49
Figura 11. Estructura de TIMP-1 y TIMP2	55
Figura 12. Importancia de los polimorfismos de un solo nucleótido	62
Figura 13. Mapa de haplotipos de MMP2	63
Figura 14. Mapa de haplotipos de MMP7 y MMP12	98
Figura 15. Cinecoronariografía de un paciente infartado	99
Figura 16. Plot de amplificación de pacientes (IM) y controles (niños)	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución porcentual de egresados hospitalarios por enfermedad del sistema circulatorio para cada grupo de edad 2007.	10
Tabla 2. MMPs y sus sustratos	46
Tabla 3. Polimorfismos estudiados en la MMP-1, 2, 3, 7, 9 y 12	88
Tabla 4. Distribución de factores de riesgo cardiovascular en pacientes con infarto al miocardio y sujetos control	90
Tabla 5. Frecuencia de alelos y genotipos de MMP-1, 2, 3, 7, 9 y 12	92
Continuación de tabla 5 ...	93
Tabla 6. Modelo de herencia de MMP2 -1575	94
Tabla 7. Correlación entre el polimorfismo MMP2 -1575 y variables de riesgo	95
Tabla 8. Modelo de herencia del polimorfismo MMP12 -82 en los pacientes con angiografía coronaria.	95
Tabla 9. Haplotipos del gen MMP2 en pacientes con IM y controles sanos.	97
Tabla 10. Haplotipos del MMP7 y MMP12 en pacientes con IM y controles sanos.	99
Tabla 11. Método de Ct comparativo entre pacientes infartados y controles niños .	101

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Distribución porcentual de egresos hospitalarios por institución para cada enfermedad cardiovascular 2007 .	11
Gráfica 2. Distribución porcentual de mortalidad hospitalaria por institución para cada enfermedad cardiovascular 2007	12
Gráfica 3. Expresión del gen de la MMP2, controles vs pacientes	101

ABREVIATURAS

- ADAM**, del inglés *desintegrin and metalloprotease domain*, dominio de metaloproteasa y desintegrina.
- ADAMTS**, del inglés *desintegrin and metalloproteases with trombospondina motif*, metaloproteasa y desintegrina con motivos de trombospondina.
- ADMA**, del inglés *asymmetric dimethylarginine*, dimetil arginina asimétrica.
- ADN**, ácido desoxirribonucleico.
- AGRE**, elemento rico en AG.
- AP-2**, del inglés *activated protein 2*, proteína activadora 2.
- CAD**, del inglés *coronary artery disease*, enfermedad arterial coronaria.
- CBFA1**, factor A1 de unión al núcleo.
- CLG1**, colagenasa 1.
- CPK**, creatinina fosfoquinasa.
- CSF**, del inglés *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, factor estimulante de colonias de monocitos.
- DDAH**, del inglés *dimethylarginine dimethylaminohydrolase*, dimetil arginina dimetil amino hidrolasa.
- DM**, diabetes mellitus.
- ECA**, enzima convertora de angiotensina.
- eNOS**, del inglés *endothelial nitric oxide synthase*, óxido nítrico sintasa endotelial.
- ER**, elemento de respuesta.
- ET-1**, endotelina 1.
- FGF**, factor de crecimiento fibroblástico.
- FT**, factor tisular.
- GWAS**, del inglés *genome-wide association study*, estudio de asociación del genoma completo.
- HDL**, del inglés *high density lipoprotein*, lipoproteínas de alta densidad.
- HG**, dominio de bisagra.
- hsCRP**, del inglés *high sensitivity C-reactive protein*, proteína C reactiva de alta sensibilidad.
- IAM**, infarto agudo del miocardio.
- IAM CEST**, infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST.
- IAM SEST**, infarto agudo del miocardio sin elevación del segmento ST.
- ICAM-1**, del inglés *intercellular adhesion molecule 1*, molécula de adhesión intercelular 1.
- IFN**, interferon.

ABREVIATURAS

- IGF**, factor de crecimiento similar a la insulina.
- IL-1 β** , interleucina 1 beta.
- IL-2**, interleucina 2.
- IL-4**, interleucina 4.
- IL-8**, interleucina 8, quimiocina para neutrófilos.
- INF- γ** , interferon gamma.
- LDL**, del inglés *low density lipoprotein*, lipoproteínas de baja densidad.
- LPa**, lipoproteína (a).
- MAPK**, del inglés *mitogen-activated protein kinases*, proteínas quinasas activadas.
- MEC**, matriz extracelular.
- MCF-7**, del inglés *human breast adenocarcinoma cell line*, línea celular de adenocarcinoma de mama humano.
- MCP-1**, del inglés *monocyte chemoattractant protein*, quimiocina para monocitos.
- MCSF**, del inglés *macrophage colony stimulating factor*, factor estimulante de colonias de macrofagos.
- MMPs**, del inglés *matrix metalloproteinase*, metaloproteasa de matriz.
- MMP1**, del inglés *matrix metalloproteinase*, metaloproteasa de matriz tipo 1.
- MMP2**, del inglés *matrix metalloproteinase*, metaloproteasa de matriz tipo 2.
- MMP3**, del inglés *matrix metalloproteinase*, metaloproteasa de matriz tipo 3.
- MMP7**, del inglés *matrix metalloproteinase*, metaloproteasa de matriz tipo 7.
- MMP9**, del inglés *matrix metalloproteinase*, metaloproteasa de matriz tipo 9.
- MMP12**, del inglés *matrix metalloproteinase*, metaloproteasa de matriz tipo 12.
- mRNA**, del inglés *ribonucleic acid*, ácido ribonucleico mensajero.
- MT-MMP**, del inglés *membrane-type MMP*, metaloproteasa de tipo membrana.
- NF- κ B**, del inglés *nuclear factor kappa B*, factor nuclear kappa B.
- NO**, por sus siglas en inglés *nitric oxide*, óxido nítrico.
- Ox-LDL**, del inglés *oxidized-low density lipoprotein*, lipoproteínas de baja densidad oxidadas.
- Pb**, pares de base.
- PCR**, del inglés *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.
- PDGF**, del inglés *platelet derived growth factor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas.

ABREVIATURAS

PTCA, del inglés *percutaneous transluminal coronary angioplasty*, angioplastia coronaria transluminal percutánea.

RECK, proteína rica en cisteína, que induce la reversión con motivos kazal.

RFLPs, del inglés *restriction fragment length polymorphism*, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

RNA, del inglés *ribonucleic acid*, ácido ribonucleico.

rSNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*, polimorfismo de un solo nucleótido regulador.

TCF4, factor 4 de las células T.

TGF- β , del inglés *transforming growth factor*, factor de crecimiento beta.

TFPI, del inglés *tissue factor pathway inhibitor*, vía de inhibidores de factor tisular.

TFPI2, del inglés *tissue factor pathway-inhibitor-2*, vía de inhibidores de factor tisular 2.

TIE, elemento inhibidor de TGF beta.

TIMPs, del inglés *tissue inhibitor of metalloproteinase*, inhibidor tisular de metaloproteasas.

TNF- α , del inglés *tumoral necrosis factor*, citocina proinflamatoria.

TS, trombospondina tipo 1.

SH, grupo sulfhidrilo.

SICA, síndrome isquémico coronario agudo.

SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*, polimorfismo de un solo nucleótido.

SP, péptido señal.

Sp1, factor de transcripción humano.

STAT, transductores de señales y activadores de la transcripción.

VCAM-1, del inglés *vascular cell adhesion molecule 1*, molécula de citoadhesión vascular 1.

Introduction

Myocardial infarction (MI) is the main clinical presentation of coronary artery disease (CAD). This pathology is one of the leading causes of death worldwide. Therefore, many efforts have been made to understand the complex pathophysiology and trigger mechanisms underlying plaque disruptor and thrombus formation in the coronary artery. Recent evidencesuggests that metalloproteases (MMPs) are highly involved vascular connective tissueremodeling, which is an essential step that ultimately results in plaque rupture and atherothrombotic phenomenon. Thus, the aim of this work was to study promoter region polymorphisms of *MMP* genes, with the intention to elucidate the role of thesepolymorphisms,in extracellular matrix breakdown and ultimately atherosclerotic plaque rupture.

Materials and methods

Ten *MMP* genes polymorphisms were studied, seven of them were genotyped by Taqman assays using real-time PCR and three polymorphisms were determined by PCR-RFLP, this in aMexican Mestizo population that involved 300 patients with previous history of MI and 300 healthy controls.

Results

For both groups, a similar polymorphisms frequenciesdistribution was calculatedin *MMP1-1607 1G/2G* (rs1799750), *MMP2-1306* (rs243865), *MMP2-790* (rs243864), *MMP2-735* (rs22850553), *MMP3-1612 5A/6A* (rs3025058), *MMP7-153* (rs11568819), *MMP7-181* (rs11568818) and *MMP12-82* (rs2276109). However, in *MMP2-1575* (rs243866), patients showed increased frequency of allele A and AA genotype when compared with controls (pC= 0.001; OR= 1.58 and p = 0.036; OR = 2.37, respectively). According to the dominant model, individuals with AG + AA genotype had 1.65 times the risk of developing the MI (p=0.002). Additionally, two haplotypes where identified in this gene one provide risk and the other protection for studied disease.

Regarding *MMP9-1562* (rs3918242) MI patients showed increased frequency of T allele and genotype CT when compared with healthy controls (OR= 2.32; 95%CI= 1.15-4.73; pC= 0.02 and OR= 2.40, 95%CI= 1.17-4.97, pc= 0.02, respectively). Furthermore, the C allele and CC genotype of the same polymorphic site for *MMP-9*, showed decreased frequency in patients with MI when compared with healthy controls (OR= 0.43; 95%CI= 0.21-0.87; pC= 0.02 and OR= 0.42, 95%CI= 0.20-0.86; pc= 0.02, respectively). Moreover, *MMP12-82* polymorphism (rs2276109) is associated with the number of affected coronary arteries.

Conclusions

MMP2-1575 (rs243866) and *MMP-1562* (rs3918242)genes polymorphisms may be involved in the development of myocardial infarction in Mexican Mestizo population.

Introducción

La enfermedad arterial coronaria (EAC) y una de sus manifestaciones, el infarto al miocardio (IM), representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Muchos esfuerzos se han realizado para entender el mecanismo de la secuencia de eventos que desencadenan el IM, destacando la ruptura de las placas y la formación de trombos en la arteria coronaria. Reportes sugieren que las metaloproteasas (MMPs) están implicadas en la destrucción del tejido conectivo previo a la ruptura de la placa y al fenómeno aterotrombótico. Por lo cual el objetivo del trabajo fue estudiar polimorfismos en la región promotora en los genes de las MMPs, para conocer el papel que desempeñan, en enfermedades en donde la desestructuración de la matriz extracelular es un hallazgo característico como lo es la ruptura de la placa aterosclerótica que conlleva al infarto.

Materiales y Métodos

Se estudiaron en total diez polimorfismos en los genes de las MMPs, de los cuales siete sitios fueron genotipificados por ensayos Taqman empleando PCR en tiempo Real y tres polimorfismos determinados por PCR-RFLP en 300 pacientes con IM y 300 individuos sanos como grupo control.

Resultados

Una distribución similar en las frecuencias de los polimorfismos en los genes *MMP1-1607 1G/2G* (rs1799750), *MMP2-1306* (rs243865), *MMP2-790* (rs243864), *MMP2-735* (rs22850553), *MMP3 -1612 5A/6A*, *MMP7-153* (rs11568819), *MMP7-181* (rs11568818) y *MMP12-82* (rs2276109) fue observada en ambos grupos. Sin embargo, en el polimorfismo del gen de *MMP2 -1575* (rs243866), los pacientes mostraron incremento en la frecuencia del alelo *A* y genotipo *AA* al compararse con los controles ($pC=0.001$; $RM=1.58$ y $pC=0.036$; $RM=2.37$, respectivamente). De acuerdo al modelo dominante, individuos que presentaron genotipos *AG + AA* tenían 1.65 veces más riesgo de desarrollar la enfermedad ($p=0.002$). Adicionalmente se identificaron en este mismo gen dos haplotipos, uno de riesgo y uno de protección.

Con respecto a *MMP9 -1562* (rs3918242) los pacientes con MI mostraron incremento en la frecuencia del alelo *T* y genotipo *CT* al compararse con los controles sanos ($RM=2.32$; $IC\ 95\%=1.15-4.73$; $pC=0.02$ y $RM=2.40$; $IC\ 95\% = 1.17-4.97$ $pC=0.02$, respectivamente). Por otro lado, el alelo *C* y genotipo *CC* del mismo sitio polimórfico del gen de la *MMP-9* mostró disminución de frecuencia en los pacientes con MI

RESUMEN

al compararse con los controles sanos (RM= 0.43; IC 95%= 0.21-0.87; pC=0.02 y RM= 0.42; IC 95%= 0.20-0.86; pC=0.02, respectivamente).

Por último, el polimorfismo del gen *MMP12-82* (rs2276109) se asoció al número de vasos dañados.

Conclusiones

Los resultados sugieren que los polimorfismos en los genes de *MMP2 -1575* (rs243866) y *MMP9 -1562* (rs3918242) podrían estar participando para el desarrollo del infarto al miocardio.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad arterial coronaria (CAD por sus siglas en inglés) y una de sus más terribles manifestaciones, el infarto agudo al miocardio (IAM), es una de las mayores causas de muerte en el mundo. Muchos esfuerzos se han hecho para entender el mecanismo de la secuencia de eventos que desencadenan el IAM destacando la ruptura de las placas y la formación de trombos en la arteria coronaria. En la última década muchos trabajos se han enfocado a estudiar el papel de la inflamación y de la predisposición genética en el desarrollo de este padecimiento. La composición de la placa y la degradación de la matriz extracelular (MEC) han sido consideradas de mayor interés (*Samnegard A, y cols., 2005*).

El infarto agudo al miocardio es predominantemente causado por la ruptura de la placa aterosclerótica coronaria. El IAM también ocurre debido al fenómeno inflamatorio que se inicia cuando las lipoproteínas circulantes quedan atrapadas en la matriz extracelular subendotelial y se oxidan, adquiriendo así propiedades proinflamatorias que dan lugar a una cadena de eventos que van desde el depósito de monocitos circulantes que exacerban la respuesta inflamatoria al fagocitar los lípidos, la producción excesiva de elementos de la matriz extracelular y reclutamiento de nuevas células. Todos estos eventos van provocando un aumento en el volumen del ateroma o placa ateromatosa y la consecuente disminución de la luz arterial llegando incluso a ocluirla por completo lo que generará isquemia del tejido irrigado por tal vaso (*Corti R, y cols., 2003*) (*García-Moll X y cols., 1999*).

1. EPIDEMIOLOGÍA

Desde hace 25 años la mortalidad por enfermedad coronaria cardíaca ha bajado sustancialmente en algunos países debido a la prevención y a los mejores tratamientos para esta enfermedad y para los síndromes coronarios agudos. Estudios epidemiológicos y ensayos clínicos mostraron que la tasa de mortalidad de los pacientes con infarto al miocardio que llegan vivos al hospital ha disminuido. Sin embargo, la mortalidad sigue siendo alta para los pacientes con infarto al miocardio que están fuera del hospital. La mayoría de todas las muertes ocurren fuera del hospital y se considera un problema de salud pública de considerable importancia (*Shin-ichi As, y cols., 2011*).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares, como el infarto al miocardio y accidente cerebrovascular, cobran 17.5 millones de vidas al año en el mundo. (*Federación Mundial del Corazón 2009*). Estas enfermedades se pueden prevenir al cambiar estilos de vida, malos hábitos y conductas de riesgo, por lo que resulta imperioso favorecer su prevención. México ha comenzado a enfrentarse a enfermedades crónicas como la hipertensión y la diabetes mellitus, entre otras.

1.1. Morbilidad

De acuerdo a la Federación Mundial del Corazón (2009), las enfermedades cardiovasculares, es decir, del corazón y de los vasos sanguíneos son:

- Cardiopatía coronaria – enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco (miocardio).
- Enfermedades cerebrovasculares – enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro.
- Arteriopatías periféricas – enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores.
- Cardiopatía reumática – lesiones del miocardio y de las válvulas cardíacas debidas a la fiebre reumática, una enfermedad causada por bacterias denominadas estreptococos.
- Cardiopatías congénitas – malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento.
- Trombosis venosas profundas y embolias pulmonares – coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse (émbolos) y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones.

Los ingresos hospitalarios permiten conocer el impacto de estas enfermedades en nuestro país, al mostrar el diagnóstico de la población atendida. Para analizar las causas de los problemas relacionados con el

corazón se consideraron las enfermedades hipertensivas, que es uno de los principales factores asociados con las enfermedades cardiovasculares.

En 2007, del total de ingresos hospitalarios en México (18,536,322), las enfermedades relacionadas con problemas cardiacos representan casi uno por ciento (89 mil 773 casos). Estas enfermedades tienen presencia en toda la población. De la población con alguna afección cardíaca, se observa que en niños menores de 5 años cerca del 50% han presentado cardiomiopatías o insuficiencias cardiacas, enfermedades relacionadas con alteraciones durante la etapa fetal; asimismo, en 3 de cada 10 niños de 5 a 14 años se reportan complicaciones con su sistema circulatorio por hemorragias intraencefálicas (18.5%) y por otras hemorragias intracraneales no traumáticas (16.5%); de igual forma, cerca del 30% de la población con alguna afección cardíaca de 15 a 44 años, han sufrido de hemorragia intraencefálica (16.5%) y enfermedades renales hipertensivas (13.7%) (*Sistema Nacional de Información en Salud 2010 (SINAIS)*).

El 20.5% de la población de 45 a 54 años con alguna complicación cardíaca tuvo un infarto agudo al miocardio, seguida por otras enfermedades cerebrovasculares (15.2%) y por hipertensión esencial (14.2%). En los adultos de 65 años y más, el conjunto de otras enfermedades cerebrovasculares se observa el porcentaje más alto de ingreso (20.2%), seguido por el infarto agudo al miocardio (19.2%) y la hipertensión esencial (15.3%) (*SINAIS 2010*).

Tabla 1. Distribución porcentual de egresos hospitalarios por enfermedad del sistema circulatorio para cada grupo de edad 2007.

Enfermedades del sistema circulatorio*	Grupos de edad					
	<1 año	De 1 a 4 años	De 5 a 14 años	De 15 a 44 años	De 45 a 64 años	65 y más años
Hipertensión esencial (primaria)	1.0	10.0	5.5	10.8	14.2	15.3
Enfermedad renal hipertensiva	0.2	1.6	5.1	13.7	7.7	4.9
Infarto agudo del miocardio	0.6	0	0.4	11.3	20.5	19.2
Enfermedad isquémica crónica del corazón	0.2	0.0	0.4	3.4	9.2	13.8
Cardiomiopatía	32.9	15.2	21.3	5.1	1.8	0.9
Insuficiencia cardíaca	19.5	30.0	13.8	10.5	8.8	10.6
Complicaciones y descripciones mal definidas de enfermedad cardíaca	8.0	5.6	3.9	1.6	1.0	1.1
Hemorragia subaracnoidea	3.4	7.2	9.1	11.5	6.5	2.7
Hemorragia intraencefálica	16.7	7.6	18.5	16.5	13.9	10.1
Otras hemorragias intracraneales no traumáticas	17.1	8.4	16.5	2.8	1.4	1.2
Otras enfermedades cerebrovasculares	0.4	14.4	5.5	12.7	15.2	20.2

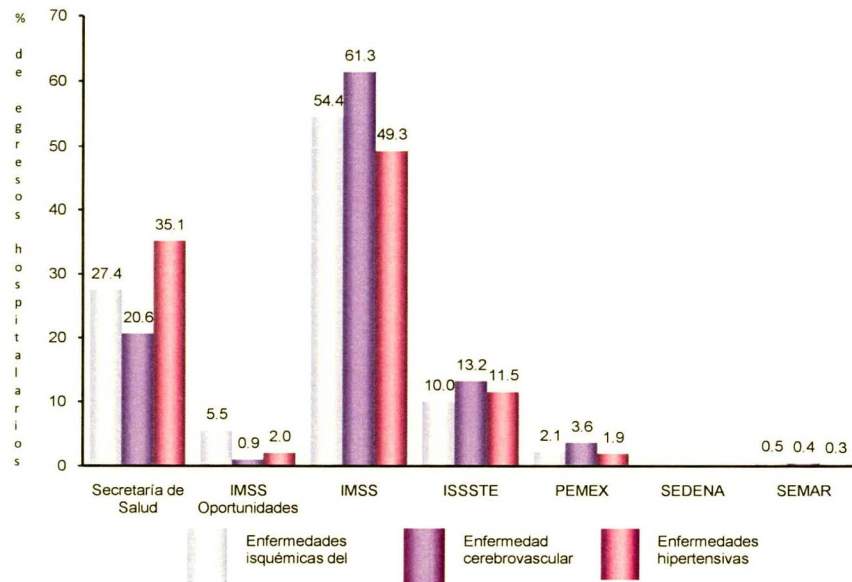
* Se excluyeron del análisis las enfermedades relacionadas con circulación pulmonar.
(FUENTE: SINAI (2009). *Cubos dinámicos de egresos hospitalarios.*)

En el análisis de la población con alguna afección cardiaca por género, se observa que las cinco principales enfermedades cardiovasculares son:

-- Entre los hombres, el infarto agudo del miocardio (7.7%), seguido de otras enfermedades cerebrovasculares (6.5%), hipertensión esencial –primaria– (4.7%), enfermedad isquémica crónica del corazón (4.4%) y hemorragia intraencefálica (4.3%).

--Entre las mujeres, otras enfermedades cerebrovasculares (7.3%), seguidas de hipertensión esencial –primaria– e infarto agudo del miocardio (ambas con 6.4%), insuficiencia cardiaca (4.6%) y la enfermedad isquémica crónica del corazón (4.5%).

En cuestión de los egresos hospitalarios por enfermedades cardiacas, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) es la institución que atiende al mayor número de casos para este grupo de enfermedades, seguido de la Secretaría de Salud (SSA) y por el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado (ISSSTE). El 54.4% de las enfermedades isquémicas lo atiende el IMSS, 27.4% la SSA y el ISSSTE solo atiende al 10% de los casos (*SINAIS 2010*).



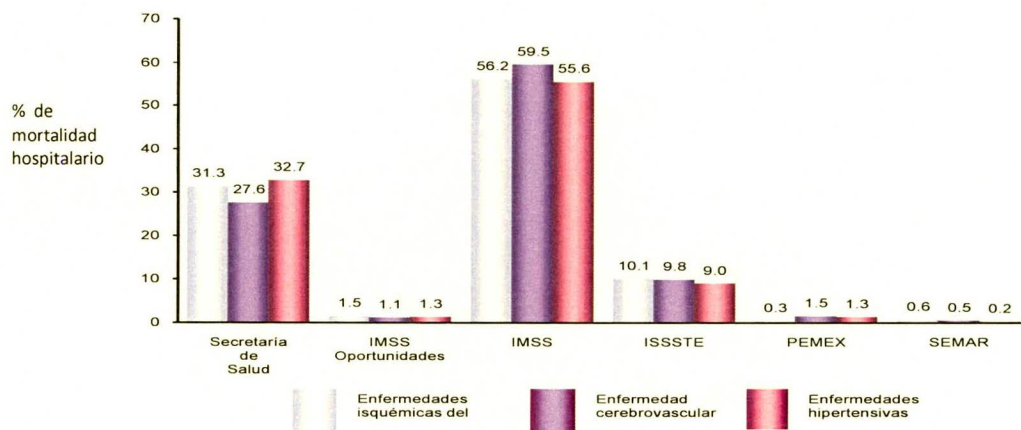
Gráfica 1. Distribución porcentual de egresos hospitalarios por institución para cada enfermedad cardiovascular 2007 (*FUENTE: SINAIS (2007). Secretaría de Salud*).

De acuerdo con la información disponible a 2007, poco más de 87 mil personas fallecieron a causa de alguna enfermedad del corazón. La tasa más alta de mortalidad para este tipo de afecciones la presentan las enfermedades isquémicas, siendo mayor para las mujeres en relación con los varones (60.5 y 45.7 respectivamente); la segunda causa son las enfermedades cerebrovasculares siendo relativamente más alta para los hombres que para las mujeres (28.6 contra 26.7, respectivamente); las enfermedades hipertensivas tienen una incidencia mayor para los varones (15.6) en relación a la presentada en las mujeres (12.0).

Respecto a instituciones, en 2007, el IMSS es donde se presentó el mayor porcentaje de mortalidad por enfermedad cerebrovascular (59.5%), seguida por la SSA (27.6%) y el ISSSTE (9.8%).

Para las enfermedades isquémicas del corazón, en el IMSS se observó la tasa más alta (56.2%), seguido por la SSA (31.3%) y el ISSSTE (10.1%); por último, en cuanto a las enfermedades hipertensivas, las tasas más altas se presentaron en el IMSS (55.6%), seguido por la SSA (32.7%) y el ISSSTE (9.0%).

Cabe aclarar que el comportamiento de los porcentajes de mortalidad para cada institución está directamente relacionado con la proporción de población que es atendida por cada una de ellas. (*Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2008*).



Gráfica 2. Distribución porcentual de mortalidad hospitalaria por institución para cada enfermedad cardiovascular 2007(FUENTE: SINAIS (2007) Secretaría de Salud).

2. ANATOMÍA CARDIOVASCULAR

El aparato cardiovascular está constituido por un corazón y los vasos sanguíneos. La función del aparato cardiovascular es distribuir oxígeno y nutrientes para las células y recoger bióxido de carbono y desechos del metabolismo celular; regula esta función de transporte al adaptarla a las necesidades momentáneas del organismo para ello cuentan con el tejido muscular liso o visceral, que puede modificar el diámetro de las arterias y el miocardio, músculo estriado que pueden modificar su capacidad de bombeo. Por tanto el tejido muscular y los factores que regulan su función son de significativa importancia y se ha considerado a la sarcómera como la unidad funcional del músculo estriado, sea cardíaco o esquelético.

La regulación de la función del músculo visceral está determinada por acción hormonal y por la inervación del sistema nervioso autónomo. Sus divisiones simpática y parasimpática regulan el diámetro arterial y la contracción miocárdica de forma automática sin nuestra voluntad.

En los niveles de organización biológica la sangre es considerada como tejido. El órgano que produce sus elementos formes es la médula ósea, la formación de plasma depende del aporte de líquidos y nutrientes que se absorben en el tubo digestivo mas la regulación hidroelectrolítica del riñón como principales factores. La sangre o tejido hematopoyético se estudia por separado del aparato cardiovascular; no bastante, su función está íntimamente interrelacionada (*Aranda F, 2012*).

2.1. Características exteriores

De manera tradicional el corazón ha sido descrito anatómicamente como un órgano aislado, una vez disecado y extraído de la caja torácica.

El corazón tiene forma triangular, por lo que existe una base superior y un vértice inferior. En un sentido simplista se puede considerar como un "cono truncado" con cuatro caras: anterior o esternocostal, posterior o diafragmática derecha e izquierda. Pero al realizar un corte transversal a nivel de los ventrículos se puede observar que el corazón corresponde a una pirámide de tres caras, por lo tanto no es cuadrangular como se pretende, remeda el triángulo escaleno.

La cara anterior es convexa, la cara posterior es plana y la cara lateral izquierda corresponde a la pared libre del ventrículo izquierdo, también convexa. Al analizar los dos bordes del corazón, el derecho, que es el producto de la unión de la cara anterior y el posterior, forma un ángulo menor de 90°, es decir es un ángulo agudo, por lo que se les llaman borde agudo del corazón; esté borde del ángulo estrecho no constituye una cara. El borde izquierdo, ángulo producto de la unión de la pared lateral con las caras anterior y posterior, es mayor de 90°, es decir un ángulo obtuso, por lo que se denomina borde obtuso o

borde romo del corazón y forma la tercera cara. En estos bordes discurren las arterias coronarias del margen agudo y del margen obtuso.

La tradicional y simple concepción anatómica del órgano aislado ha cambiado con el advenimiento de las técnicas de imagen, pues ahora es indispensable relacionarlo con los órganos que lo rodean y realizar un análisis *in situ*. No es fácil explicar y entender que el corazón tiene cara anterior, pero no tiene cara posterior. Estos nuevos conceptos pueden causar confusión, por lo que se debe aclarar: el corazón *in situ* se localiza en el mediastino medio e inferior y se dispone espacialmente con su base superior, posterior y derecha y su vértice inferior, anterior e izquierdo.

Es decir, el corazón se dirige desde la base hacia la punta, de atrás hacia adelante, de arriba hacia abajo y de derecha a izquierda. Hay además leve rotación del corazón a la izquierda. Al trazar una línea imaginaria, medial en el órgano, el corazón se dispone a 45° sobre un plano horizontal, "el eje anatómico" (Aranda F, 2012).

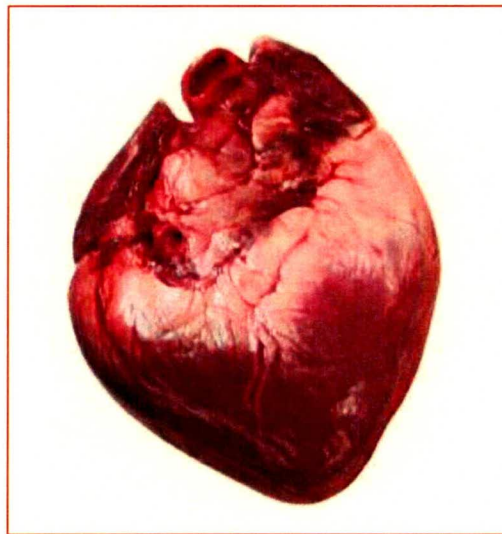


Figura 1. Corazón.

El diafragma es el plano horizontal que está en un contacto con una pared cardiaca; vista en esta disposición *in situ* es la cara inferior, misma que anatómicamente en el corazón aislado, se denomina posterior. El eje anatómico es variable de acuerdo con la constitución de la caja torácica de cada individuo. En aquellos de tórax ancho el corazón tiende disponerse horizontal y en los de tórax alargado se disponen sentido vertical, lo cual modifica discretamente el eje anatómico.

La base del corazón es posterior, *in situ*, se relaciona con el esófago y la columna vertebral, y se sitúa entre la sexta y la novena vértebra dorsales. Aunque la base del corazón es posterior, hasta ahora no se ha conceptualizado como la cara posterior del corazón. Debido a la rotación izquierda del corazón, la mayor parte de la base corresponde a la aurícula izquierda, que cuando se dilata ocasiona desplazamiento del esófago.

La punta o vértice cardíaco es anterior y se relaciona con la parrilla esternocostal; por lo regular se sitúa en el quinto espacio intercostal izquierdo a nivel de la línea medioclavicular, aunque en algunos corazones de disposición vertical puede alcanzar el sexto espacio intercostal.

La cara anterior que se proyecta hacia la parrilla esternocostal está formada por 1) una parte de la aurícula derecha; 2) el ventrículo derecho; y 3) una parte del ventrículo izquierdo. No se observa la aurícula izquierda que corresponde a la base y cara posteroinferior del corazón (Aranda F, 2012).

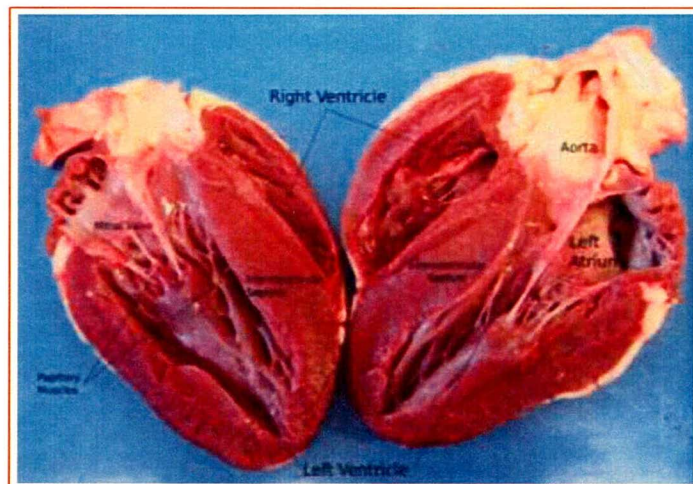


Figura 2. Cara anterior del Corazón.

La cara inferoposterior en su posición apical está en contacto con el diafragma, pero debido a su disposición a 45° se eleva y deja de contactar al diafragma, por lo que de manera estricta esta cara no es una cara diafragmática en su totalidad. La porción basal que no está en contacto con el diafragma también se ha denominado dorsal (por muchos años se clasificaron los infartos de esta localización como dorsales) y la cara diafragmática es la cara inferior pero en su porción apical (que condicionaba la denominación de los infartos de cara diafragmática ahora llamados inferoapicales).

La cara lateral del corazón corresponde al borde obtuso o borde romo del corazón, es decir la pared lateral o libre del ventrículo izquierdo (*Aranda F, 2012*).

3. FISILOGIA CARDIOVASCULAR

En un sentido amplio, la fisiología estudia las bases fisicoquímicas que permiten a un organismo permanecer vivo. La comprensión de la patología del sistema cardiovascular no puede concebirse sin el conocimiento del estado normal de su funcionamiento.

La función básica del sistema cardiovascular es el transporte rápido de nutrientes, por ejemplo, oxígeno, glucosa, ácidos grasos, vitaminas, fármacos, agua, entre muchos, por todos los tejidos del cuerpo, así como la recolección y eliminación de desechos metabólicos como CO₂, urea, creatinina, u otros. También funciona como un sistema de control, ya que distribuye y secreta por sí mismo péptidos bioactivos como los natriuréticos, renina, óxido nítrico, endotelinas, prostaglandinas y otros.

Además la actividad del sistema cardiovascular es fundamental en el control de la temperatura corporal, debido a que transporta el calor de los órganos internos a la superficie y regula, por tanto, la pérdida de calor a través de la piel. De igual manera, en la reproducción proporciona un mecanismo hidráulico para la erección genital.

De hecho, factores como temperatura, concentración de oxígeno, pH, composición de electrolitos, osmolaridad y muchos más que forman parte del medio interno corporal requieren un control preciso. El proceso que permite mantener la estabilidad del ambiente interno se conoce como homeostasis, un término acuñado por Walter Bradford Cannon, con base en el concepto de *milieu intérieur*, descrito en trabajos previos por Claude Bernard en 1913 (*Massó Rojas F, y cols., 2012*).

El agua constituye alrededor del 60% del peso corporal y se distribuye de forma principal en tres compartimentos: intracelular, intersticial e intravascular o plasmático. Las dos terceras partes de agua corporal se encuentran dentro del compartimento intracelular, el cual se comunica con el espacio intersticial a través de la membrana plasmática. Del total del fluido extracelular sólo una pequeña proporción corresponde al que está contenido en los vasos sanguíneos, junto con los elementos formes de la sangre (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), el líquido intravascular se intercambia con el líquido intersticial a través de las paredes de los capilares dentro de los órganos. De este modo se produce un recambio continuo de fluidos entre los tres compartimentos. Sin embargo, el líquido intersticial no alcanza a procesar grandes cantidades de nutrientes y de desechos, debido a que su volumen es inferior a la mitad del volumen del líquido intracelular. Por ello, el sistema circulatorio, constituye un elemento esencial para mantener la homeostasis del organismo. Conforme la sangre pasa a través de los capilares se

lleva a cabo un intercambio de solutos entre el espacio intersticial y el plasma mediante la difusión, y el resultado neto de dicho proceso es mantener en equilibrio ambos espacios.

Existen al menos tres requisitos para que este mecanismo funcione:

a) un adecuado flujo sanguíneo a través de los capilares, b) la composición química de la sangre debe ser óptima para su intercambio con los solutos del intersticio y, por ende, finamente regulada y c) la distancia de difusión debe ser corta (alrededor de 10 μm). No obstante, la difusión resulta un mecanismo poco eficiente para el intercambio de sustancias que se producen en el órgano y luego se deben cambiar por otras que se encuentren a más de 1 m de distancia. Esto se lleva a cabo mediante el proceso de convección, por el cual las sustancias viajan disueltas o contenidas en el flujo sanguíneo (*Massó Rojas F, y cols., 2012*).

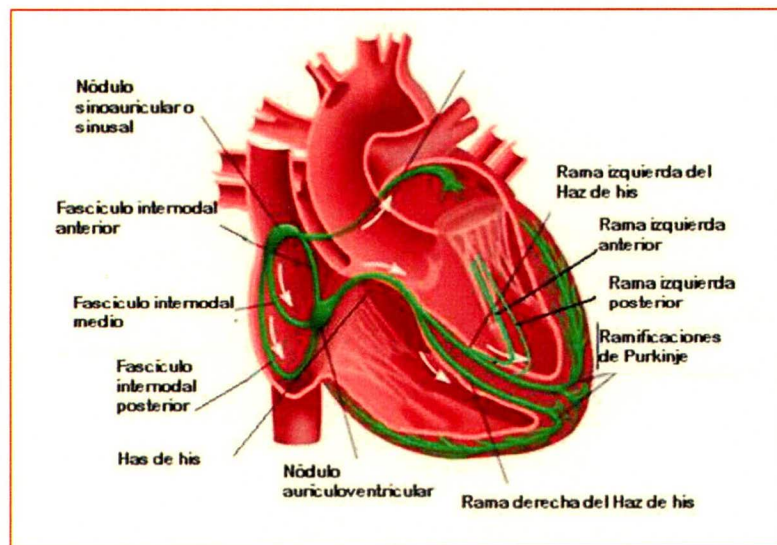


Figura 3. Fisiología cardiovascular

La mayor parte de los órganos intervienen en el cambio continuo de la composición de los fluidos de los tres compartimentos enunciados antes, pero algunos son de particular relevancia, como los pulmones, que se encuentran comunicados con el medio ambiente externo y se encargan del intercambio de gases. Otros tejidos que alteran de manera significativa la composición de la sangre son los riñones, ya que participan en la regulación de los electrolitos. Esta función es tan importante para conservar la homeostasis del organismo que los riñones reciben un poco más de la quinta parte del flujo de sangre. Algunos órganos se pueden adaptar con rapidez a una disminución del flujo sanguíneo; así, la piel tolerará grandes restricciones de flujo para conservar la temperatura corporal. En contraste con lo anterior, el cerebro y el corazón toleran muy poca disminución del flujo sanguíneo, por lo que de inmediato manifiestan anomalías funcionales. Por ejemplo, la falta de flujo sanguíneo en el cerebro puede conducir en cuestión de segundos a la pérdida del estado de conciencia y causar daños permanentes si el flujo es interrumpido por más de 4 minutos. De la misma manera, el corazón consume hasta 75% del oxígeno que recibe para mantener su función de bombeo, por lo que una interrupción abrupta en el flujo coronario –aún por periodos muy cortos de tiempo- produce alteraciones importantes en su funcionamiento y en casos extremos causa incluso, la muerte del tejido.

En resumen, la función principal del sistema cardiovascular es mantener la sangre en una circulación constante que permita el intercambio de las sustancias necesarias para el adecuado funcionamiento de cada una de las células con los productos de desecho generados por las mismas y eliminar estos últimos en órganos como pulmones, riñones o hígado (*Massó Rojas F, y cols., 2012*).

3.1. Bombeo del corazón

El sistema de bombeo del corazón es relativamente simple si se considera el importante trabajo que realiza a lo largo de toda la vida. Está formado por el corazón, los grandes vasos, el saco pericárdico y la cavidad torácica entera. Los grandes vasos permiten la llegada y salida de todo el volumen sanguíneo hacia todo el organismo.

El corazón está constituido por el músculo cardíaco, cuyo grado de especialización es muy alto y presenta características únicas que le permiten contraerse y relajarse de forma continua durante toda la vida.

El corazón presenta dos cámaras con paredes delgadas denominadas aurículas, que actúan como reservorios, la del lado derecho para la sangre de retorno de todo el organismo rica en CO₂ y la del lado izquierdo que recibe la sangre oxigenada de los pulmones. Estas cavidades se encuentran separadas de los ventrículos por las válvulas auriculoventriculares. Las paredes de los ventrículos son más gruesas que las

de las aurículas, sin embargo las del ventrículo derecho son más delgadas que las del izquierdo. La razón de ello es que la del ventrículo derecho bombea sangre a la circulación pulmonar mediante un sistema de alta capacitancia, es decir, que puede controlar grandes cambios en el flujo sanguíneo sin incrementar la presión de manera significativa, además presenta baja resistencia (*Massó Rojas F, y cols., 2012*).

Por su parte, el ventrículo izquierdo bombea sangre dentro de un circuito de alta resistencia, como lo es la circulación sistémica, tal función requiere presiones de salida más elevadas y una mayor masa muscular.

Como ya se mencionó, el corazón tiene válvulas unidireccionales entre las aurículas y los ventrículos encausan el flujo sanguíneo en un sólo sentido, pero además presenta este mismo tipo de válvulas entre los ventrículos y los grandes vasos (aorta y arteria pulmonar).

Bajo condiciones normales y si las válvulas funcionan de manera adecuada, se produce un flujo laminar a través del corazón, pero si las válvulas se vuelven disfuncionales por ser muy estrechas (estenosis) o muy laxas (insuficiencia), el flujo sanguíneo se torna turbulento y genera una vibración que se puede detectar como un sonido que denominamos *soplo*. Éste se puede escuchar mejor en ciertas áreas del tórax y coincide con momentos específicos de la apertura y cierre de válvulas durante determinado tiempo. El análisis de tales variables permite investigar la causa de alguna disfunción que origine esta turbulencia en el flujo sanguíneo. En algunas ocasiones los soplos se deben a comunicaciones anormales que se producen en las diferentes cavidades del corazón, o bien a alteraciones hematológicas; además, se debe señalar que algunos soplos son normales en los niños y que no todos estos ruidos tienen su origen en alteraciones cardíacas. También hay que recordar que el flujo turbulento de aire en los pulmones se llega a escuchar como un soplo, lo que llevaría a confundirlo con alguna patología valvular (*Massó Rojas F, y cols., 2012*).

3.2. Endotelio

Un componente del sistema cardiocirculatorio al que hasta hace poco tiempo se había prestado poca atención, pero que ha adquirido mayor relevancia en el control de la presión arterial y la coagulabilidad de la sangre es el endotelio, el cual está formado por una monocapa de células que recubren los vasos y el corazón. Su superficie es muy grande, cercana a 280 m² en el músculo esquelético y a 90 m² en los pulmones. El endotelio forma una barrera semipermeable que mantiene el plasma y las células sanguíneas dentro de los vasos, pues su glicocálix limita la salida de las proteínas plasmáticas y permite el intercambio de agua y sustancias en los tejidos, mediante uniones intercelulares especializadas llamadas uniones celulares. En su superficie, la célula endotelial cuenta con receptores para muchos agentes vaso

activos como la acetilcolina y además es sensible a la fricción (shear stress) generada por la sangre, puede secretar moléculas como el óxido nítrico (NO), prostaciclina y endotelina; estos agentes ejercen a la vez su acción de forma paracrina sobre las células musculares, lo que regula el flujo sanguíneo local.

La célula endotelial también lleva a cabo actividad enzimática en su superficie, de especial interés es la presencia de la enzima convertora de angiotensina que transforma a la angiotensina I en angiotensina II, una molécula con gran capacidad vasoconstrictora. Otras moléculas secretadas por el endotelio son el óxido nítrico y las prostaciclina, las cuales no sólo son sustancias vasodilatadoras sino que también inhiben la agregación plaquetaria. Por otra parte, el endotelio es capaz de secretar el factor de von Willebrand, una molécula que participa en la cascada de coagulación, por lo que se puede decir que el endotelio regula, al menos de forma parcial, la capacidad de coagulación de la sangre. Otro fenómeno en el que el endotelio tiene una función crucial es el proceso inflamatorio, ya que secreta sustancias que atraen a las células inmunocompetentes, como la interleucina 8 (IL-8) y la proteína quimiotáctica para monocitos 1 (MCP-1), expresa además en su superficie una respuesta a otras moléculas producidas por el propio sistema inmune, por ejemplo el TNF- α o el INF- γ , o bien metabolitos como las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (ox-LDL), moléculas de adhesión como las selectinas P y E y las adhesinas VCAM-1 e ICAM-1, las cuales promueven la adhesividad de los leucocitos y su extravasación a los sitios de inflamación. Este proceso es esencial en el desarrollo de depósito de lípidos en las placas de aterosclerosis, de tal relevancia es su participación que hoy en día se considera a la aterosclerosis una enfermedad inflamatoria crónica. El endotelio también desempeña una función central en el inicio de la angiogénesis, este fenómeno es de importancia vital en el crecimiento de los tejidos y en mantener una mejor irrigación en el corazón, en especial después de haber sufrido graves daños. Uno de los resultados más importantes que ha arrojado la mejor comprensión de la función del endotelio es el concepto de disfunción endotelial, pues ha permitido identificar los riesgos que sufren las personas con función deficiente del endotelio, sobre todo en cuanto al desarrollo de aterosclerosis y algunas otras enfermedades del sistema cardiocirculatorio.

El endotelio es un productor importante de NO (óxido nítrico, por sus siglas en inglés), una molécula que se genera de forma continua a partir de la L-arginina en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (eNOS), la acción de esta enzima se puede potencializar a través de los receptores que responden a la fricción y se encuentran en la superficie vascular del endotelio, el NO es una sustancia determinante en la conservación del tono vascular, junto con las endotelinas. El efecto vasodilatador que ejercen los nitratos se debe en gran parte a su actividad semejante a la que produce el NO. La presencia de canales de

entrada rectificadores de K^+ favorece la formación de potenciales intracelulares de -30 a -60Mv en la célula endotelial. Los receptores en su superficie de sustancias vasoactivas, como histamina y bradicinina, al ocuparse con su ligando activan la fosfolipasa C, inducen el incremento citoplasmático de Ca^{2+} , tanto del extracelular como el que se encuentra en los depósitos intracelulares, esto dispara la secreción de NO y aumenta la permeabilidad de la microvasculatura (*Massó Rojas F, y cols., 2012*).

4. SINDROMES ISQUÉMICOS CORONARIOS AGUDOS

Los síndromes isquémicos coronarios agudos (SICA) comprenden un conjunto de entidades nosológicas que representan distintos estadios de un proceso fisiopatológico único: la isquemia miocárdica aguda, que suele ser secundaria (aunque no forzosamente) a aterosclerosis coronaria complicada con fenómenos aterotrombóticos *in situ*. La base de este proceso es la complicación de una placa de ateroma previamente existente en un vaso coronario que desencadena los procesos de adhesión, activación y agregación plaquetaria con activación de la cascada de la coagulación y la consecuente formación de un trombo que provoca distintos grados de obstrucción al flujo coronario. Su forma de presentación esta determinada por la gravedad del daño de la placa, el estado de la sangre en ese momento (proinflamación-procoagulación), la asociación o no de vasoespasmo y el estado previo del miocardio, de manera que puede variar entre angina estable (AI), infarto miocárdico agudo sin elevación del segmento ST (IAM SEST) o infarto miocárdico agudo con elevación del segmento ST (IAM CEST).

Existen varias diferencias patogénicas que determinan el tipo específico de síndrome coronario agudo que se desarrolla. La gravedad del daño de la placa, la carga trombótica en el momento de la rotura y, asociado con ello, el vasoespasmo, desempeña un papel fisiológico determinante en la presentación clínica de los diferentes síndromes coronarios agudos (*Massó Rojas F, y cols., 2012*).

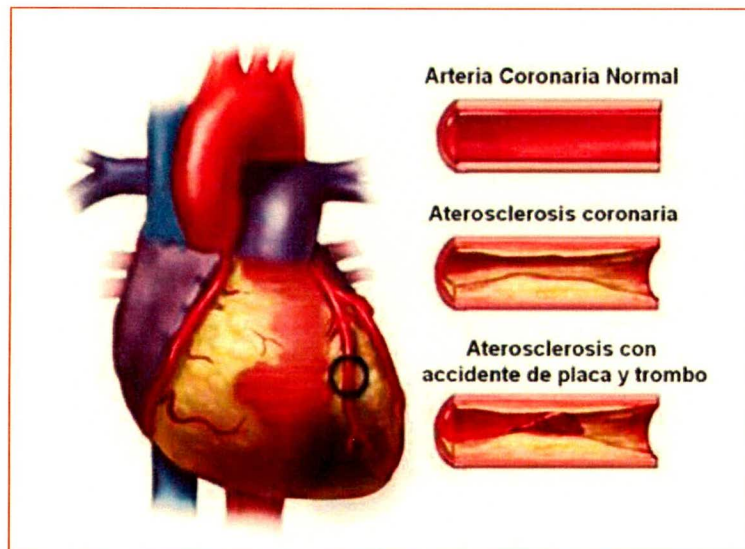


Figura 4. SICA.

4.1. La placa aterosclerótica

La aterosclerosis humana es un proceso patológico de origen multifactorial, con participación multisistémica y de extraordinaria complejidad; se comporta como un desorden inflamatorio crónico que involucra el sistema vascular, al inmunológico y al endocrinometabólico, y produce manifestaciones locales y sistémicas.

En condiciones fisiológicas, las lipoproteínas que penetran en el espacio subendotelial se devuelven a la sangre circulante por un mecanismo de transporte inverso del colesterol, en el cual participan las HDL. Cuando se produce disfunción endotelial, el aumento de la permeabilidad de la pared de los vasos origina un aumento en la penetración de las LDL en la pared vascular, lo cual excede la posibilidad del sistema del transporte inverso del colesterol para devolverlo al torrente sanguíneo. Aunado a esto, algunos factores de riesgo como la diabetes y el hábito de fumar reducen la cantidad de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y disminuyen aún más la eliminación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Por último, el proceso puede exacerbarse en pacientes con diabetes, en quienes la glucosilación de las LDL reduce el reconocimiento de estas lipoproteínas por los receptores de LDL, con lo que disminuye su eliminación (Tuñón J, y cols., 2000) (Rizo-Rivera EO, y cols., 2009).

Todos estos hechos originan un aumento en el periodo en que permanecen las lipoproteínas dentro del espacio subendotelial, donde se someten a una oxidación leve, principalmente por las células endoteliales, lo que produce unas LDL mínimamente modificadas (MM-LDL) que, junto al estrés oxidativo presente en el ambiente, la presencia de angiotensina II y la reducción de la fuerza de cizallamiento en las zonas con propensión a la aterosclerosis, son capaces de activar el factor nuclear kappa-B (NF-KB), factor de transcripción que aumenta la expresión de moléculas que participan en los pasos de captación de monocitos. Dichas moléculas se pueden dividir en dos grupos (Rizo-Rivera EO, y cols., 2009):

1. Moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1, selectina E). Responsables del movimiento y de la adhesión de monocitos a la pared de los vasos.
2. Moléculas quimioatrayentes (MCP-1, IL-8). Que provocan la entrada de monocitos en la pared de los vasos.

Una vez en el espacio subíntimo, los monocitos se transforman en macrófagos, los cuales oxidan a las MM-LDL y producen ox-LDL. Este proceso se ve favorecido por la angiotensina II y por la glucosilación previa de las LDL. Los macrófagos captan a estas ox-LDL, proceso mediado por el factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF) y estimulado por la angiotensina II. Los macrófagos así activados pueden estimular la expresión celular de la enzima convertora de angiotensina (ECA) y la síntesis de

angiotensina II, lo que lleva a un ciclo de retroalimentación positiva. Además debido a que no existe ningún mecanismo de saturación en los macrófagos, siguen captando lípidos y se someten a una sobrecarga que produce una degeneración en las células hasta que se convierten en las denominadas *células espumosas*, las cuales finalmente mueren y liberan los lípidos que formarán el *núcleo lipídico*, junto con sustancias tóxicas, como enzimas, radicales libres y aniones superóxido (*Li Z, y cols., 1996*).

Los productos tóxicos lesionan el endotelio, que en algunas zonas puede ser incluso destruido y desaparecer. Los macrófagos y algunas plaquetas activadas segregan factores de crecimiento, como PDGF (por sus siglas en inglés Platelet-derived growth factor), que estimulan la proliferación y migración de las células musculares lisas de la media. Esta fase proliferativa aumenta con el descenso de la molécula antiproliferativa óxido nítrico y con el incremento de angiotensina II. Las células del músculo liso también secretan factores de crecimiento, además de cubrir el núcleo ateromatoso y producir proteínas de matriz (colágeno, elastina y proteoglicanos), con las que se conforma la cubierta fibrosa (*Wood KM, y cols., 1993*).

Una vez formadas, las placas ateroscleróticas pueden crecer lentamente si se mantiene el proceso aterogénico o complicarse de forma brusca. Stara clasificó las placas ateroscleróticas en seis tipos, dentro de los tres diferentes estadios de evolución (*Stary HC, y cols., 1994*):

1. Lesiones iniciales: placas tipo I, II y III.
2. Lesiones avanzadas: placas tipo IV y V.
3. Lesión complicada: placa tipo VI.

4.2. Lesiones iniciales

4.2.1. Tipo I o lesión inicial. Consiste en depósitos de lípidos detectables sólo microscópicamente en la íntima, junto a la presencia de macrófagos, algunos de los cuales presentan numerosas inclusiones de lípido en el citoplasma, lo que da lugar a la célula espumosa.

4.2.2. Tipo II o estría grasa. Es la consecuencia de la progresión de la enfermedad, y es detectable desde edades tempranas en individuos de la sociedad accidental. Consiste en estratos de células espumosas en mucho mayor número que en las lesiones anteriores, también aumenta el número de macrófagos y aparecen células musculares lisas que comienzan a cargar su citoplasma de lípidos. Ocasionalmente hay linfocitos T y mastocitos, en menor número. Puede haber algunos pequeños acúmulos de lípidos extravasculares dispersos.

4.2.3. *Tipo III o preateroma*. Presenta mayores depósitos extracelulares de lípidos que la tipo II, así como más reclutamiento de células musculares lisas y linfocitos (*Rizo-Rivera EO, y cols., 2009*) (*Wood KM, y cols., 1993*).

4.3. Lesiones avanzadas

Se consideran lesiones avanzadas aquellas en las que se les da una alteración estructural por la acumulación de las células, lípidos y componentes de matriz; su importancia radica en su susceptibilidad a sufrir complicaciones. Dentro de esta categoría están las placas tipo IV, V de Stary.

4.3.1. *Lesión tipo IV o ateroma*. Es una lesión con mayor complejidad que la tipo III, en la que las células espumosas se disponen en múltiples capas junto con células musculares lisas, con abundante lípido extracelular (formando lo que denomina núcleo lipídico) y tejido conjuntivo en una disposición progresivamente más compleja.

4.3.2. *Lesión tipo V o fibroateroma*. Se caracteriza por aumento de tejido colágeno, alteración de la capa media de la pared vascular con células musculares lisas de la túnica media en disposición irregular, junto con las células espumosas, macrófagos y linfocitos. Es característico que, de forma muy similar a los procesos inflamatorios, los linfocitos T y B se acumulen en las zonas perivasculares de la placa (adyacentes a los vasos *vasorum*). Actualmente se considera a las lesiones tipo IV y V como las que presentan mayor probabilidad de complicarse (*Rizo-Rivera EO, y cols., 2009*) (*Wood KM, y cols., 1993*).

4.4. Lesión tipo IV o placa complicada

Presenta una disrupción de la superficie, con trombo o sin él, que interrumpe de forma aguda el flujo sanguíneo al miocardio.

4.5. La placa vulnerable

Es aquella que por sus características está propensa a una rotura/fisura o una rápida progresión que limite en forma parcial o que obstruya totalmente el flujo coronario y origine así un síndrome coronario agudo (*Stary HC, y cols., 1994*). La complicación de una placa vulnerable es, por lo tanto, el sustrato fisiopatológico común de los SICA (*Glaxiola E, y cols., 2007*). El término vulnerabilidad abarca todos aquellos aspectos que pueden provocar que una placa se complique. Existen dos factores determinantes

de la vulnerabilidad de la placa: su composición y su tamaño. Sesenta por ciento de los infartos ocurre en lesiones con estenosis menores de 50%, 18%, con lesiones entre los 50 y 70%, y sólo 14% de los infartados, con lesiones mayores de 70%, por lo que, en general, los SICA son más dependientes de trombo que de placa, y es el tamaño del trombo lo que determina el compromiso total del flujo al miocardio (*Benne MR, y cols., 1995*) (*Ip JH, y cols., 1990*).

A pesar de que es posible clasificar una placa como vulnerable, todavía no se conocen los mecanismos fisiopatológicos que expliquen el inicio de un SICA, aunque muy probablemente esté relacionado con:

1. Rotura de la placa. Desencadenada por elevación brusca de la presión intravascular, de la frecuencia del pulso, de la contracción cardíaca y del flujo sanguíneo coronario, aunque puede ser también espontánea.
1. Trombosis. Ésta puede ser espontánea si existe tendencia trombótica sistémica, ya sea por la activación plaquetaria, la hipercoagulabilidad y/o el deterioro de la fibrinólisis (sangre vulnerable), o secundaria a activación de la coagulación por una rotura previa de la placa.
2. Vasoconstricción. Ésta representa un obstáculo funcional, generalizado o de carácter local alrededor de una placa coronaria, producto de disfunción endotelial. La erosión superficial de la capa endotelial sin rotura de la capa fibrosa ocasiona hasta una cuarta parte de las trombosis coronarias agudas. Quizá los mismos procesos que causan la rotura de la capa fibrosa puedan contribuir también a la erosión superficial, o sea, la proteólisis y la muerte celular (apoptosis). De esta forma, la inflamación puede promover tanto la erosión superficial como la trombosis y la rotura de la placa, lo cual aumenta la degradación local de los constituyentes de la matriz extracelular y la muerte celular (*Naghavi M, y cols., 2003*).

4.5.1. Marcadores serológicos de vulnerabilidad (Malpartida F, y cols., 2007):

1. Perfil lipoproteico anormal (por ejemplo, elevación de LDL, disminución de HDL, Lp(a)).
2. Marcadores no específicos de inflamación (hsCRP, CD40L, ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, leucocitosis).
3. Marcadores de síndrome metabólico (por ejemplo, diabetes, hipertrigliceridemia).
4. Marcadores específicos de activación inmune (por ejemplo, anticuerpos anti-LDL, anticuerpos anti-HPS)

5. Marcadores de peroxidación lipídica (por ejemplo, ox-LDL, ox-HDL).
6. Homocisteína
7. PAPP-A
8. Marcadores de apoptosis (por ejemplo, ligando Fas/Fas)
9. ADMA/DDAH
10. Ácidos grasos circulantes no esterificados.

5. DEFINICIÓN UNIVERSAL DEL INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO

A lo largo de los años se han realizado modificaciones a la definición de infarto del miocardio, sin embargo, más allá de estos cambios en la definición de esta enfermedad, el diagnóstico de infarto del miocardio representa para los pacientes un fuerte infarto, con consecuencias psicológicas, económicas y legales que en ocasiones no son tomadas en cuenta por los médicos. Desde 1974, el diagnóstico de infarto del miocardio se basó en recomendaciones de la Organización mundial de la Salud (OMS), que dictaba considerar la presencia de elementos clínicos, electrocardiográficos y bioquímicos; y el diagnóstico se establecía al existir al menos dos de los tres criterios, sin distinción o jerarquía de alguno. El creciente avance de la práctica clínica cardiovascular, junto con el desarrollo de técnicas de imágenes y la evolución hacia biomarcadores de mayor precisión, obligó en el año 2000 a la creación de un documento de redefinición del infarto del miocardio, avalado por la European Society of Cardiology (ESC) y el American College of Cardiology (ACC), en donde el marcador de necrosis miocárdica pasaba a jugar un rol fundamental y obligatorio para su definición (*Arai K, y cols., 2008*).

Desde la redefinición del infarto agudo del miocardio publicada en el año 2000 se conoce la utilidad de nuevos biomarcadores con mayor sensibilidad y especificidad, así como de nuevas técnicas de imagen que pueden detectar zonas de necrosis miocárdicas muy pequeñas, de <1.0 g, que anteriormente pasaban inadvertidas y no se diagnosticaban.

Se recomienda la determinación de biomarcadores más específicos, como son las troponinas T o I, que cuando resultan positivas por arriba de la percentila 99 indican necrosis miocárdica con una gran precisión; en ausencia de troponina se puede solicitar la fracción MB de la creatinina que, aunque es de menor sensibilidad, sí resulta de utilidad para el diagnóstico de infarto del miocardio.

Tanto los biomarcadores como otras técnicas de diagnóstico permitieron definir los síndromes coronarios agudos en dos grandes grupos: sin elevación del ST y con elevación del ST. El grupo sin elevación del ST se divide a su vez en angina inestable e infarto sin elevación del ST, el cual puede evolucionar con onda Q o sin onda Q; esta evolución la puede presentar también el infarto con elevación del ST (*Antman E, y cols., 2001*).

Otro consenso global más reciente se derivó en la Definición universal del infarto del miocardio desde varias perspectivas publicadas en el 2007 y realizada en conjunto con la ESC y el ACC. Este grupo de trabajos de expertos consideran en la definición de infarto del miocardio: biomarcadores, electrocardiograma, estudios de imagen, intervenciones clínicas, perspectiva e implicaciones globales.

5.1. Clasificación de los diferentes tipos de infarto:

La clasificación clínica de los diferentes tipos de infarto del miocardio se lista de la siguiente manera:

- Tipo 1. Infarto del miocardio espontáneo relacionado a isquemia, debido a un evento coronario primario, como erosión de una placa y/o rotura, fisura o disección.
- Tipo 2. Infarto del miocardio secundario a isquemia debido a incremento del consumo de oxígeno o disminución del aporte, por ejemplo, espasmo arterial coronario, embolia coronaria, anemia, arritmias, hipertensión o hipotensión.
- Tipo 3. Muerte súbita cardíaca inesperada, incluido para cardíaco que conlleva a menudo síntomas sugestivos de isquemia miocárdica, y va acompañado de elevación del segmento ST presumiblemente nuevo o bloqueo de la rama izquierda del haz de His nuevo o evidencia de trombo fresco o una arteria coronaria que esté documentado por angiografía o autopsia, pero que la muerte haya ocurrido antes de haber obtenido las muestras de sangre o antes de que los biomarcadores aparezcan positivos en sangre.
- Tipo 4a. Infarto del miocardio asociado a angioplastia coronaria.
- Tipo 4b. Infarto del miocardio asociado con trombosis del stent documentado por angiografía o autopsia.
- Tipo 5. Infarto del miocardio asociado con cirugía de revascularización coronaria (*Thygesen K, y cols., 2007*).

Así, el infarto tipo 1 corresponde a la gran mayoría de los infartos, incluidos casi todos los pacientes que llegan a los servicios de urgencias; es el prototipo de la fisiopatología de esta enfermedad, es decir, la trombosis coronaria precedida por la rotura o fisura de una placa de aterosclerosis.

El infarto tipo 2 es consecuencia de un desbalance entre el aporte y la demanda de oxígeno. Si bien estos pacientes son menos frecuentes, es importante poder identificarlos, debido a que el tratamiento será en algunos aspectos diferente al convencional; estos pacientes pueden encontrarse en medio de un estado de sepsis, anemia grave, arritmias, alteraciones graves de la presión arterial o un estado protrombótico que les condicione embolia hacia las arterias coronarias.

El infarto tipo 3 es el relacionado a muerte súbita cardíaca, ocurrida antes de la evidencia del daño miocárdico con marcadores, con la presencia de un trombo fresco en una arteria demostrada por angiografía o autopsia; este es un grupo más seleccionado y, por ende, menos frecuente.

El infarto tipo 4 se subdivide en 4a y 4b. El 4a esta asociado a intervención coronaria percutánea, con biomarcadores en valores mayores a tres veces por arriba de percentila 99 del límite superior de referencia; los niveles menores a esto son indicativos de necrosis miocárdica periprocedimiento. Si bien la necrosis es muerte celular, no corresponde propiamente a infarto al miocardio.

El subtipo 4b es el infarto relacionado a trombosis del stent; un evento cada vez más frecuente en nuestro medio.

El infarto tipo 5 es el evento relacionado a cirugía de revascularización, con valores 5 veces por arriba de la percentila 99 del límite superior de referencia, además de presentar nuevas ondas Q patológicas, o BRIHH nuevo, o una oclusión de puente o de arteria coronaria nativa, demostrado por angiografía o evidencia por imágenes de pérdida nueva de miocardio viable. Según esta nueva definición universal, el infarto del miocardio que se trata y reperfunde comúnmente en los servicios de urgencias y unidades coronarias es el tipo 1, el cual ocupa la gran mayoría de los casos y hacia el cual está encaminada la mayor parte de la investigación clínica con relación al tratamiento adjunto y nuevas técnicas de intervención coronaria. Sin embargo, se considera que una entidad que también es de gran relevancia es la angina inestable. Se considera que la angina inestable es un trastorno de importancia similar al del infarto del miocardio, clasificándose en de riesgo alto y de riesgo común; este último incluye a los pacientes que no presentan troponinas positivas, pero sí factores de riesgo, características clínicas y cambios electrocardiográficos. En la percepción de la cardiopatía isquémica aguda en ocasiones se subestima el riesgo bajo, debido a que el tejido miocárdico o en riesgo no necesariamente se deberá manifestar con una pequeña expresión de biomarcadores; además, la sensibilidad y especificidad de las escalas para calcular este riesgo tampoco es de 100% (*Hamm CW, y cols., 2000*).

5.2. Factores de riesgo a infarto

Se definen como las características que posee el individuo que se asocian de forma estadística con la prevalencia de la enfermedad coronaria o con la tasa de acontecimientos de la misma. Los principales factores de riesgo que se asocian con la enfermedad coronaria son (*Gandur Silvia, y cols., 2004*):

- Edad (Según los registros de la Sociedad Mexicana de Cardiología la edad oscila entre los 45 años, pero en ocasiones entre los 30 y 35 años).
- Género masculino
- Niveles elevados de colesterol

- Hipertrigliceridemia
- Hipertensión
- Tabaquismo
- Diabetes
- Antecedentes familiares de la enfermedad
- Obesidad
- Sedentarismo

5.3. Medidas generales y tratamiento adjunto en la fase aguda de la cardiopatía isquémica.

La piedra angular en el tratamiento de la cardiopatía isquémica es la terapia de reperfusión junto con la antitrombótica, pero no menos importante es el tratamiento adjunto. Dicho tratamiento, que consta de oxigenoterapia, analgesia y medicamentos antihisquémicos (para disminuir el remodelado ventricular) e hipolipemiantes (estatinas), debe iniciarse desde que el paciente llega al servicio de urgencias y se diagnostica con un SICA (*Martínez Sánchez C, y cols., 2012*).

6. CONCEPTOS PATOGENICOS DEL SÍNDROME CORONARIO AGUDO

Hoy en día la trombosis subyace en la mayoría de las complicaciones de la aterosclerosis, notablemente la angina inestable y el infarto al miocardio.

Un consenso ha surgido del papel que juega la inflamación y el papel decisivo en la patofisiología de estos eventos trombóticos agudos (*Peter Libby, y cols., 2001*).

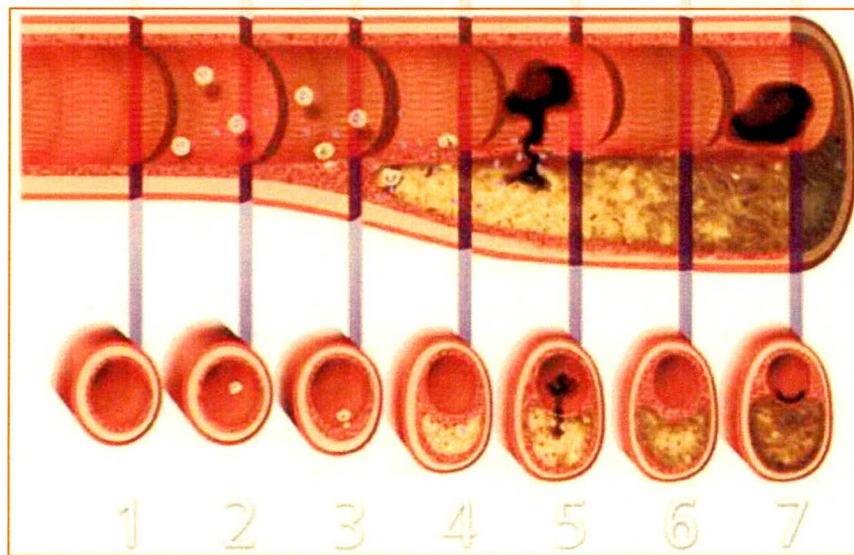


Figura 5. Iniciación, progresión y complicación de la placa aterosclerótica coronaria. Esta arteria cruza por varios estadios de la evolución del ateroma. 1. Arteria normal, 2. Inicio de la lesión, 3. Evolución al estado fibroadiposo, 4. Progresión de la lesión, 5. Ruptura de la capa fibrosa, 6. Acumulación de colágeno y expansión de células de músculo liso, 7. En algunos casos, el trombo ocluye la luz de la arteria (*Peter Libby, y cols., 2001*).

Existen dos hipótesis de patogénesis, la “incrustación” y la hipótesis de “lípidos”, están implicadas dentro de nuevos conceptos que integran varios factores que contribuyen a la iniciación y evolución de esta enfermedad. El endotelio disfuncional y la inflamación son conocidos por tener un papel esencial en la iniciación y progresión de la enfermedad aterosclerótica. La aterosclerosis y los procesos trombóticos aparentan ser interdependientes y pueden ser integrados bajo el mismo término de “aterotrombosis”.

La aterotrombosis es una enfermedad sistémica implicada en la íntima y en la media de las arterias, incluyendo la aorta, la carótida, la coronaria y las arterias periféricas. El segundo cambio puede ocurrir bajo la línea media y la adventicia, particularmente en estadios más avanzados de la enfermedad. Los procesos biológicos implicados en la media son probablemente responsables por el remodelamiento de la pared vasal, durante el crecimiento de la placa y la ruptura de la placa. La ruptura de las placas ateroscleróticas muestran una alta incidencia de expansión (también conocidas como remodelación positiva), grandes áreas de placa y una gran incidencia de ruptura de lámina elástica interna, comparadas con las placas no rotas.

Por razones desconocidas algunas arterias como la braquial y la mamaria interna, son altamente resistentes a la aterotrombosis. Aunque las arterias coronarias epicardiales aparentan ser las más susceptibles, las arterias intramiocardiales son altamente resistentes a la aterosclerosis.

Las placas aterotrombóticas están compuestas de tejido conectivo y matriz extracelular (incluyendo colágeno, proteoglicanos, fibras elásticas de fibronectina), lípidos (colesterol cristalino, ésteres de colesterol, fosfolípidos), células inflamatorias (monocitos derivados de macrófagos, linfocitos T), células de musculo liso, trombina y depósitos de calcio. Las proporciones de estos componentes varían en diferentes placas, esta es una de las razones para tener un espectro de lesiones.

Estudios *post-mortem* revelaron una notable heterogeneidad en la morfología de la placa y en la composición de varios vasos, incluso en el mismo individuo.

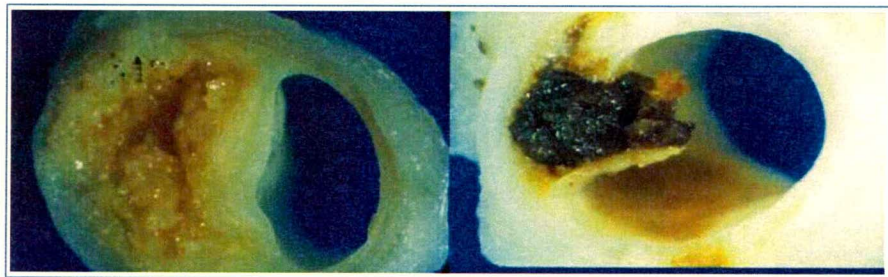


Figura 6. Lesión aterosclerótica (*Almeida Gómez J, y cols., 2006*)

Las evidencias indican que la composición de las placas están propensas a la ruptura y son más determinantes en futuros eventos isquémicos. Las placas propensas a romperse en las arterias coronarias también llamadas de “alto riesgo” o placas “vulnerables”, tienden a tener delgadas capas fibrosas, un gran centro de lípidos y un alto contenido de macrófagos.

Las placas vulnerables en la arteria coronaria y las placas de alto riesgo propensas a romperse en las arterias carótidas, tienen varias estenosis. Por lo tanto, se ve una perspectiva más global de enfermedad aterotrombótica sistémica, el término placa de “alto riesgo”, más que un término de placa vulnerable (que implica sólo la presencia de un centro rico en lípidos) es más apropiado para definir una placa propensa a ruptura.

La heterogeneidad es notable en la composición de las placas aterotrombóticas humanas, incluso en los mismos individuos. Por lo tanto, las herramientas de imagen no invasivas y fidedignas, son capaces de detectar enfermedad aterotrombótica temprana en varias regiones y caracterizar la composición de las placas que son clínicamente deseables. Las herramientas podrían mejorar el entendimiento de los mecanismos patofisiológicos bajo los procesos aterotrombóticos y mejorar el riesgo de estratificación de la enfermedad más eficientemente. Estas herramientas también pueden permitir óptimos tratamientos y mejorar el monitoreo de la respuesta vascular (*Roberto Corti, y cols., 2003*).

6.1. Inicio de la enfermedad aterotrombótica: el papel del endotelio

El endotelio, la capa interna de los vasos sanguíneos, es un órgano autocrino y paracrino dinámico. Este regula las contracciones, secreciones y actividades mitogénicas en la pared vascular, como la trombogenicidad sanguínea, por la producción de varias sustancias activas locales.

“La homeostasis vascular”, se define como la habilidad del sistema vascular para el mantenimiento normal de las condiciones hemorreológicas, es garantizada por el control adecuado de la vasomoción a través de la producción balanceada de vasodilatadores potentes como el óxido nítrico (NO) y la vasoconstricción como la endotelina-1 (ET-1).

El daño mínimo crónico para el endotelio arterial es fisiológico y se obtiene de los resultados de un disturbio en el flujo sanguíneo en los puntos de flexión y cerca de la bifurcación en el árbol arterial. El endotelio responde a mecanismos y señales químicas de la sangre por la liberación de mediadores que modulan el tono y la estructura vascular, la función plaquetaria, coagulación y adhesión de monocitos.

Algunos de los factores de riesgo cardiovascular clásicos han sido reconocidos como inductores de disfunción endotelial por la reducción de la biodisponibilidad de NO, incrementando el contenido en el

tejido de ET-1 y la activación de vías de señalización pro-inflamatorias como el factor nuclear kappa B. La vía de traducción de señales del factor nuclear *kappa B* es un regulador esencial de la transcripción de un número de genes pro-inflamatorios, como los que llevan a la expresión de varias citocinas, enzimas y moléculas de adhesión (moléculas de adhesión intercelular 1 -ICAM-1- moléculas de adhesión celular vascular 1 -VCAM-1- y E-selectinas).

En la hipercolesterolemia, por ejemplo, la relajación del endotelio se deteriora, mientras que la contracción y adhesión de monocitos y plaquetas se potencia. Sin embargo, la corrección farmacológica de la hiperlipidemia por estatinas ha mejorado la función normal del endotelio. Otros estudios han demostrado que los pacientes con disfunción vasomotora endotelial coronaria, en la presencia de varios estímulos, han incrementado el riesgo de eventos clínicos.

La “hemostasia vascular”, es definida como la habilidad del sistema vascular para el mantenimiento de la fluidez sanguínea y la integridad vascular, para compensar la coagulación intrínseca de la sangre. El factor Von Willebrand es una proteína implicada en la coagulación de la sangre, así como media la actividad de plaqueta a plaqueta y las interacciones entre plaquetas y la pared basal. Ambos tipos de interacciones son vitales en el mantenimiento del balance entre el sangrado y la coagulación. En condiciones fisiológicas, la actividad del endotelio normal apoya el estado líquido de la sangre y previene la activación de las células circulantes. En este contexto, el NO y las prostaglandinas son los inhibidores de plaquetas de todos los agentes endoteliales.

La disfunción endotelial y la integridad endotelial provoca una serie de reacciones bioquímicas y moleculares que sirven para detener el flujo sanguíneo y reparar la pared del vaso. El primer paso en la reparación de la pared del vaso y la prevención de la pérdida excesiva de sangre son la vasoconstricción, la adhesión de plaquetas y la formación de fibrina en el lugar del daño, el cual causa una forma de agregado hemostático. La agregación plaquetaria es mediada a través de varios agentes, incluyendo adenosin fosfato, tromboxano A₂ y metaloproteasa-2. También la cascada de coagulación extrínseca es activada a través de interacciones entre el factor tisular vascular (FT) y el flujo sanguíneo, conduciendo a la generación in vivo de trombina, el principal agonista de la activación de plaquetas y la formación de trombina. La fibrina interactúa con las plaquetas activadas para formar una estructura de engrane que es indispensable para la consistencia adecuada y la estabilidad del trombo mural adhesivo.

Las células endoteliales juegan un papel central en el control de la hemostasia; un endotelio disfuncional podría generar un ambiente pro trombótico favorable para el desarrollo de lesiones ateroscleróticas y complicaciones trombóticas (*Roberto Corti, y cols., 2003*).

6.2. Progresión de la placa de aterosclerosis

La disfunción endotelial es considerada el precursor que inicia el proceso de aterosclerosis y es caracterizada por la expresión de moléculas de adhesión para participar en el “homing” e infiltrar monocitos. Los monocitos migran dentro del sub endotelio, donde se transforman en macrófagos. Este proceso de diferenciación incluye la regulación de varios receptores, incluyendo el CD36 y los receptores scavenger A, que son responsables para la internalización de las lipoproteínas de baja densidad oxidantes (LDL) (*Yoshico M, y cols., 2011*). Una vez enriquecidos, los macrófagos se transforman en células espumosas que llevan a la formación de estrías grasas. Esta actividad de macrófagos libera mitógenos y quimio atrayentes que perpetúan el proceso por reclutamiento adicional de macrófagos y células de músculo liso vascular dentro de la media dañada. Esto podría eventualmente comprometer el lumen vascular. El reclutamiento de células musculares lisas y macrófagos podrían contribuir significativamente para el crecimiento de la placa, no sólo mediante el aumento de su número, sino también por la síntesis de componentes de matriz extracelular. La proporción entre las células de músculo liso vascular y los macrófagos juegan un importante papel en la vulnerabilidad de la placa por la actividad lítica implicada. Los macrófagos son capaces de elaborar MMPs. Estas enzimas contribuyen a la ruptura de la placa y la formación de trombos por la digestión de la matriz extracelular.

La progresión de las lesiones ateroscleróticas son variables y no están muy bien entendidas. Se podría esperar que la aterogénesis y la progresión de la lesión son lineales. Sin embargo, los estudios de angiografías coronarias demostraron que la progresión en humanos no es lineal ni previsible. Un análisis de varios estudios inesperadamente revelaron que más del 75% de infartos al miocardio ocurren en áreas suministradas ligeramente estenosadas (<50%) en arterias coronarias identificadas en un angiograma previo. Sin embargo, en la base de los resultados patológicos, el desarrollo de la placa puede ser dividida en progresión lenta o rápida (*Roberto Corti, y cols., 2003*) (*Yoshico M, y cols., 2011*).

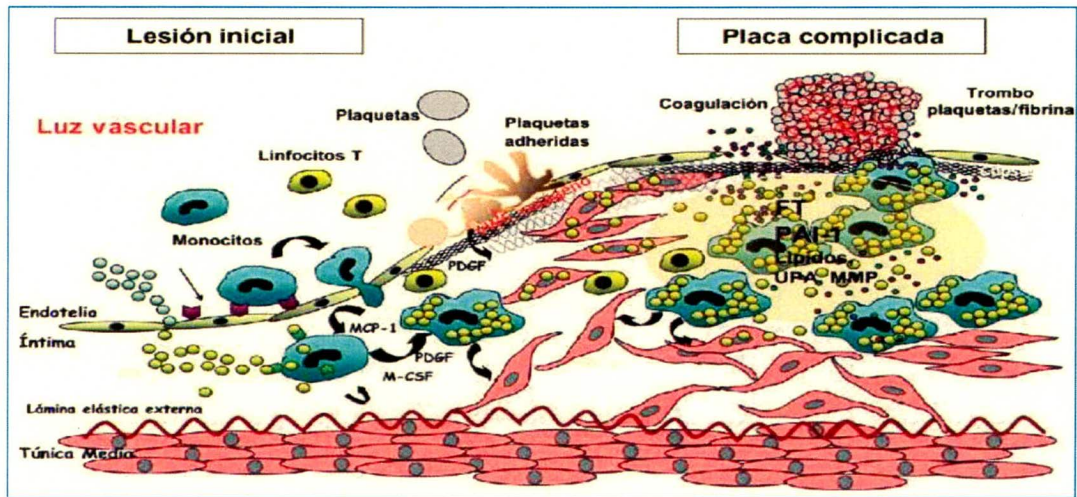


Figura 7. Inicio de la enfermedad aterotrombótica (Tomado de www.revespcardiol.org).

6.3. Lenta progresión de la placa

La continúa infiltración de monocitos/macrófagos dentro de la placa es particularmente dependiente de factores como las moléculas endoteliales de adhesión, MCP-1, GM-CSF e IL-2 para linfocitos. Los macrófagos pueden eventualmente someterse a muerte por apoptosis en la que aparente es una estrategia de defensa para proteger la pared del vaso de una acumulación excesiva de lipoproteínas. Aunque todavía es incierto, si la muerte celular dispara la liberación de MMPs, este fenómeno probablemente lleva a la liberación de micropartículas de membrana, causando la exposición de fosfatidilserina en la superficie celular y confiere una potente actividad pro coagulante. Las partículas liberadas cuentan para casi toda la actividad de los FT (factores tisulares) presentes en la placa y pueden ser los principales contribuidores de la iniciación de la cascada de coagulación y trombosis después de la ruptura de la placa (Roberto Corti, y cols., 2004).

6.4. Rápida progresión de la placa

La rápida progresión de la placa es mediada por un trombo. La evidencia sugiere que la ruptura de la placa, la subsecuente trombosis y la organización del trombo fibroso también son importantes en la progresión de la aterosclerosis tanto en pacientes asintomáticos como en los que tienen angina estable. La ruptura de la placa con un subsecuente cambio en la placa geométrica y trombosis, resulta en una complicada lesión. Como un rápido cambio en la geometría de la placa aterosclerótica puede resultar la oclusión aguda o sub-oclusión con manifestaciones clínicas de angina estable u otros SICAs. Con más

frecuencia, al parecer el cambio rápido resulta en un trombo mural sin evidencia de síntomas clínicos. Este tipo de trombo puede ser el que más contribuye para la progresión de aterosclerosis. Varios factores de circulación sistémica y local pueden influenciar el grado y la duración del depósito del trombo en el tiempo de la ruptura de la placa coronaria (*Roberto Corti, y cols., 2004*).

6.5. Procesos activos - Metaloproteasas y factores tisulares –

El proceso de la ruptura de la placa es, no puramente mecánico. La inflamación, juega un papel central en la ruptura de la placa. Especímenes con aterectomía de pacientes con SICA revelaron áreas muy ricas en macrófagos, y estas células son capaces de degradar matriz extracelular por la secreción de enzimas proteolíticas como las metaloproteasas (MMPs) colagenasas, gelatinasas, estromelisininas y otras). Estas enzimas pueden remover la capa fibrosa y predisponerse a la ruptura. Las MMPs y otros inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs), como TIMP-1 y TIMP-2, son cruciales para el remodelamiento vascular. Ciertamente las MMPs pueden ser particularmente activas en la desestabilización de la placa (*Roberto Corti, y cols., 2003*).

Por otro lado, el factor tisular (FT) que es una glicoproteína de poco peso, inicia la cascada de coagulación extrínseca y se cree que es el mayor regulador de la coagulación, hemostasia y trombosis. El análisis de co-localización de especímenes con aterectomía coronaria de pacientes con angina estable presentan una fuerte relación entre el FT y los macrófagos. Esta relación sugiere una trombogenicidad mediada en pacientes con angina estable y SICA. Se ha observado que en especímenes de arterias carótidas presentan que el FT es co-localizado en macrófagos apoptóticos y liberan micropartículas más que en los macrófagos biológicamente activos. La inhibición específica de FT vascular por la vía de inhibidores de FT (TFPI) fue asociada con una reducción significativa de la formación del trombo en placas ricas en lípidos. Interesantemente, en modelos de cerdos con daño arterial, la administración TFPI durante la angiografía coronaria percutánea previene la formación del trombo sin incremento de complicaciones de sangrado, y esto reduce la hiperplasia en la íntima afectando las células del músculo liso (*Roberto Corti, y cols., 2003*).

7. MANTENIMIENTO E INTEGRIDAD DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR

7.1. Matriz extracelular

El mantenimiento y la integridad del sistema cardiovascular es uno de los principales papeles de matriz extracelular (MEC). En condiciones normales las fibras de elastina y colágeno resisten la desestructuración espontánea y pueden degradarse por las metaloproteasas de matriz (MMP) o, de forma indirecta, por los activadores del plasminógeno (*Bohórquez-Sierra J.C., y cols., 2006*). La MEC es un complejo retículo de proteínas e hidratos de carbono, que crea un ambiente especial en los espacios entre las células. La matriz contribuye a unir las células para formar los tejidos y es sitio de reserva de las hormonas que controlan el crecimiento y la diferenciación de células. También proporciona el armazón a través del cual se pueden desplazar las células, en particular durante los estadios iniciales de la diferenciación (*Lodish H, y cols., 2003*).

La matriz extracelular consta de tres componentes proteicos principales: **proteoglucanos** muy viscosos, que protegen las células; fibras de **colágeno** insolubles, que proporcionan fortaleza y resistencia; y **proteínas de la matriz multiadhesivas** solubles, que fijan estos componentes a los receptores de la superficie celular. Distintas combinaciones de estos componentes adaptan la fortaleza de la matriz extracelular para propósitos diversos. Por ejemplo, los animales contienen muchos tipos de matrices extracelulares, cada una especializada para una función particular, como fuerza (en el tendón), amortiguación (cartílago) o adhesión. En el caso de las células del músculo liso que rodean las arterias en humanos, la matriz extracelular debe proporcionar conexiones fuertes pero flexibles. La MEC no es sólo un marco o armazón inerte que sostiene o rodea a las células. También se comunica en forma directa o indirecta con las vías de señales intracelulares que imparten a las células para que desempeñen funciones específicas. Los componentes específicos de la MEC pueden activar en forma directa las vías de transducción de señales citosólicas a través de la fijación a receptores proteicos de adhesión celular en la membrana plasmática. Como alternativa, a través de la fijación de factores de crecimiento y otras hormonas, la matriz puede secuestrar estas señales de las células o, por el contrario, presentarlas a las células, por lo que de modo indirecto induce o inhibe las vías de señales (*Lodish H, y cols., 2003*).

La arquitectura global de un tejido está determinada por los mecanismos de adhesión, en los que no sólo intervienen las interacciones intercelulares sino también las interacciones entre las células y la matriz. En los epitelios y los grupos celulares más organizados de animales, por ejemplo, en los músculos se encuentra una matriz extracelular de fibras de colágeno, proteoglicanos y proteínas multiadhesivas de la matriz que los rodea y subyace. Esta capa de material de la matriz desempeña varios papeles. Organiza las

células para formar los tejidos y coordina sus funciones; además proporciona una vía para las migraciones celulares y sus moléculas activan las vías clásicas de transducción de señales, que inducen el crecimiento y la proliferación de las células así como la expresión génica. En todos estos numerosos efectos de la matriz intervienen las moléculas de adhesión celular (CAM) ligadas a membrana que se fijan directamente a los componentes de la MEC y del citoesqueleto. Las integrinas son la principal clase de CAM que median en la adhesión entre las células y la matriz. Sin embargo, otras CAM, entre ellas las selectinas y los proteoglicanos sindecán, también fijan las moléculas de la matriz (Lodish H, y cols., 2003). Las integrinas son heterodímeros de subunidades α y β y el sitio de fijación del ligando se compone de partes de ambas cadenas. En mamíferos se componen por lo menos 22 heterodímeros de integrina; esta diversidad de integrinas y sus ligandos en la matriz permite a las células migrar hacia sus ubicaciones correctas durante la morfogénesis tisular, y contribuye a esculpir el esquema corporal de un embrión.

La adhesión firme a la matriz extracelular impide la migración celular. Los cambios patológicos a nivel molecular son caracterizados por el cambio en la constitución cualitativa y cuantitativa de la MEC y la constitución de los miocitos. Estos cambios son el resultado de la remodelación del tejido, como la síntesis, degradación, maduración e incorporación individual de los componentes de la MEC que forman una estructura altamente organizada pero no sólo estructural sino que también regulando y comunicando funciones (Tyagi SC, y cols., 1997) (Maisch B., 1996). Un cambio lento de matriz extracelular es característico de un tejido cardíaco sano: la síntesis y la degradación son un balance dinámico. La estructura medular de la MEC miocárdica está formada por una red que consiste en colágeno fibrilar, colágeno tipo I y III que son extremadamente resistentes a los cortes proteolíticos. Sin embargo, la MEC miocárdica también contiene componentes en cantidades bajas los que conectan componentes individuales, comunican con miocitos, modulan el transporte y la organización de la MEC, influenciando la señalización tisular. Además contiene varios tipos de colágeno (tipo IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XV, XVIII y otros) (Pelouch V, y cols., 1993) (Schacherer C, y cols., 1999) y un gran rango de glicoproteínas, glicosaminoglicanos (heparan sulfato y sulfato condroitino), proteínas microfibrilares (fibrilina y fibulina), laminina, fibronectina, elastina, integrinas, tenascinas y otros (Weber KT, y cols., 1995) (Ros RS, y cols., 2001).

En algunos casos las células que en condiciones normales permanecen inmóviles se deben transformar rápidamente en móviles. Por ejemplo, una herida cutánea se cierra por la migración rápida de los

queratinocitos circundantes hacia la zona lesionada. Esta transición hacia un estado móvil requiere la desadhesión de las células de la matriz extracelular, por inhibición de las interacciones entre las células y la matriz, y por destrucción de los componentes de la matriz. Una clase de factores de desadhesión comprende péptidos pequeños denominados *desintegrinas*, que contienen la secuencia RGD fijadora de integrinas presente en numerosas proteínas de la MEC. Al unirse las integrinas de la superficie celular, las desintegrinas inhiben la fijación de las células con los componentes de la matriz, por competencia por el sitio. Las desintegrinas presentes en los venenos de serpiente, que interfiere en la agregación plaquetaria, son en parte responsables de las propiedades anticoagulantes de los venenos. En contraste con las desintegrinas del veneno de las serpientes, la segunda clase de factores de desadhesión contiene dos tipos de proteasas, el fibrinógeno y las metaloproteasas específicas de la matriz (MMP) (Lodish H, y cols., 2003).

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, etc.), la presencia de niveles elevados de algunas MMP se ha asociado a la destrucción tisular en una amplia variedad de procesos patológicos como aterosclerosis, diseminación de metástasis tumorales, artritis, formación de aneurismas, etc (Shapiro SD, y cols., 1998). Estudios *“in vitro”* han demostrado que las MMPs son capaces de degradar una porción de proteínas de tejido conectivo, indicando que estas enzimas pueden jugar un papel importante en la destrucción del tejido conectivo y en la asociación con varios procesos patológicos. En estudios *“ex vivo”* se muestran que la expresión de las MMPs pueden ser detectadas en tejidos dañados usando RNA y técnicas de análisis de proteínas como la hibridación *in situ*, PCR transcriptasa reversa, inmunohistoquímica y zimografía. Se ha reportado incremento en los niveles de ciertas MMPs en plasma y suero de pacientes con angina inestable e infarto agudo al miocardio, cáncer, artritis reumatoide, osteoartritis, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, enfermedad de riñón policística y aneurisma aórtica abdominal. Estudios transgénicos y modelos de animales knock-out han demostrado *“in vivo”* que la MMP-3 puede promover tumorigénesis. Por otro lado, se han identificado un gran número de variantes de los genes de las MMPs en el humano y se han encontrado asociadas con la susceptibilidad o la progresión de la aterosclerosis, aneurismas y cáncer (Shu Ye, y cols., 2000).

El primer reporte de las MMPs data de 1962, cuando Gross y Lapiere, mientras intentaban establecer como un renacuajo perdía su cola durante la metamorfosis, descubrieron el primer miembro de esta

familia (MMP-1) (*Van Lint Philippe, y cols., 2007*). Por su parte un grupo de investigadores de Estocolmo encontró que diversas líneas celulares tumorales malignas producían grandes cantidades de otra enzima de este tipo, que estaba íntimamente ligada a la producción de metástasis. Desde entonces, varias investigaciones han demostrado que las MMPs están involucradas en el desarrollo y la progresión de diversas enfermedades (*McDonnell S, y cols., 1999*). La familia fue expandida gradualmente; siendo el último miembro descubierto la MMP-28. 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 matriz extracelular (MEC), teniendo influencia en muchos procesos importantes, como la proliferación celular, la diferenciación, la migración, y muerte celular, o bien la interacción célula-célula. No es sorprendente saber que las MMPs juegan un papel crucial en los procesos fisiológicos, por ejemplo, la morfogénesis de huesos, el ciclo menstrual y el desarrollo de muchas condiciones patológicas, tales como aterosclerosis, invasión de cáncer, artritis. La historia se ha hecho aún más compleja por el incremento de numerosos estudios relevantes, indicando que la influencia de las MMPs es constante tanto en lo fisiológico como en los procesos patológicos (*Sane DC, y cols., 2003*).

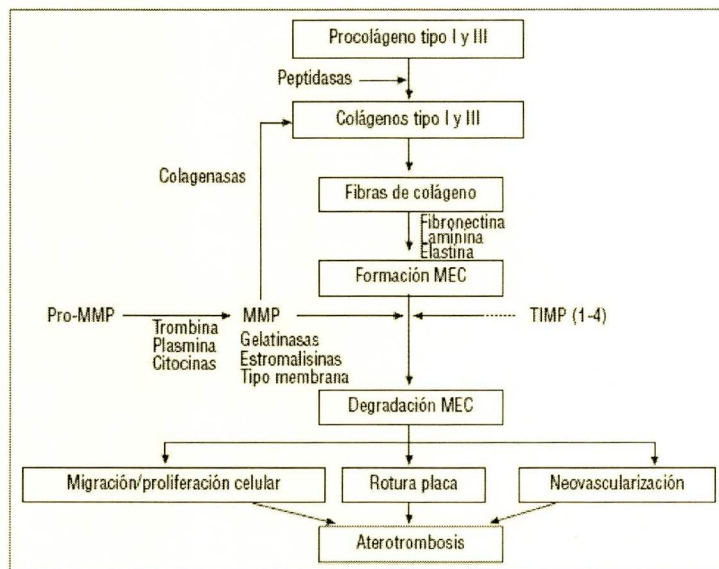


Figura 8. Síntesis y degradación de la matriz extracelular (MEC) en aterosclerosis: balance metaloproteasas (MMP) /inhibidores de las metaloproteasas (TIMP) (*Tomado de, Sane DC; 2003*).

En la pared arterial predominan los colágenos tipo I y III, así como los macrófagos y las células musculares lisas, que son los tipos celulares que gobiernan el remodelado de la MEC. Otras proteínas que contribuyen a la síntesis de MEC son la fibronectina, la laminina, la elastina y los proteoglicanos. El balance entre síntesis y degradación de la MEC está regulado por el equilibrio entre las proteasas que favorecen la degradación (MMP) y sus inhibidores (TIMP) (figura 3) (*Sane DC, y cols., 2003*).

Las MMPs pueden influenciar en el resultado de la inflamación. (*Van Lint Philippe, y cols., 2007*). Particularmente en el infarto agudo del miocardio, en una fase isquémica aguda; se activan las MMPs resultando en el deterioro de la MEC y el sitio de la isquemia; también hay un cambio en la concentración de los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs). Más tarde las concentraciones de inhibidores de las MMPs son bajas y desde aquí la degradación de los componentes de la MEC continúa. Continuamente la síntesis de MEC y los sitios distales del área infartada llevan a fibrosis y falla diastólica. La remodelación estructural del tejido después del infarto al miocardio lleva al desarrollo de la hipertrofia y al estiramiento de los tejidos. Estos procesos son acompañados por el desarrollo de fibrosis en las partes no infartadas del corazón y la dilatación de las partes no infartadas. Resultando en falla cardíaca (*Tyagi SC, y cols., 1996*) (*Tyagi SC, y cols., 1998*).

8. FAMILIA DE LAS METALOPROTEASAS

8.1. Estructura y función

Las Metaloproteasas (MMPs) también llamadas matrixinas, contienen zinc en su sitio activo, requieren calcio como agente estabilizador (de ahí el prefijo “*metalo-*”), y constituyen una familia de 25 miembros (*Amälinei, y cols., 2007*), que se clasifican en cinco subfamilias: colagenasas, gelatinasas, estromelinasas, matrilinasas, metaloproteasas de membrana (MT-MMP) y otras MMP (*Overall, 2002*).

Además de estos cinco grupos, algunas metaloproteasas se clasifican como “otras” por la falta de información que aún se tiene sobre ellas (*Butler GS & Overall CM., 2009*).

- Colagenasas: pueden degradar moléculas de colágena fibrilar de los tipos I, II, III y X. Incluyen: MMP-1, MMP-8, y MMP-13.
- Gelatinasas: degradan gelatinas (colágenas desnaturalizadas), lamininas, fibronectina y elastina, y colágena tipo IV de las membranas basales. En este grupo se ubican: MMP-2 y MMP-9.
- Estromelinasas: activas ante un amplio espectro de componentes de la MEC, entre ellos proteoglicanos, lamininas, fibronectina, vitronectina y algunos tipos de colágenas desnaturalizadas. Se incluyen: MMP-3, MMP-10, MMP-11 y MMP-12.
- Matrilinasas: degradan colágena de tipo IV y proteoglicanos. Comprende a la MMP-7.
- Metaloproteasas membranales (MT-MMPs, por sus siglas en inglés para *membrane type metalloproteinases*): al igual que las estromelinasas degradan varios componentes de la MEC y pueden activar a otras MMPs (*Ross MH, y cols., 2009*)(*Mora JR, y cols., 2006*).

Todas ellas difieren en su estructura y especificidad de sustrato, pero su acción combinada es capaz de conducir a la degradación prácticamente de la totalidad de los componentes macromoleculares de la MEC. Este hecho, junto con su capacidad de actuar a pH fisiológico, convierte a estas enzimas en candidatos que participan en la destrucción tisular.

En un primer momento, las 25 diferentes MMPs codificadas por sus respectivos genes, se clasificaron en función de la especificidad del sustrato (colagenasas, gelatinasas, estromelinasas y matrilinasas) (*Sternlicht, M. D., 2001*)(*Harper, E., 1971*) pero actualmente la clasificación se hace en función de su estructura (Tabla 2).

Tabla 2. MMPs y sus sustratos.

MMP (tipo)	Denominación	Sustrato MEC	Sustrato no MEC
Colagenasas			
MMP-1	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			
MMP-3	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 b ₁ , 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 (Páramo JA, 2005).

La estructura básica de las MMPs presenta una serie de dominios: un péptido señal, un propéptido y un dominio catalítico carboxiterminal que une zinc. Sobre esta estructura básica aparecen diversas variantes: un dominio tipo hemopexina que media la especificidad del sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos, o un dominio transmembrana en el caso de las MMP asociadas a la membrana plasmática (MT-MMP, *membrane type MMP*) (Sternlicht, M. D., 2001).

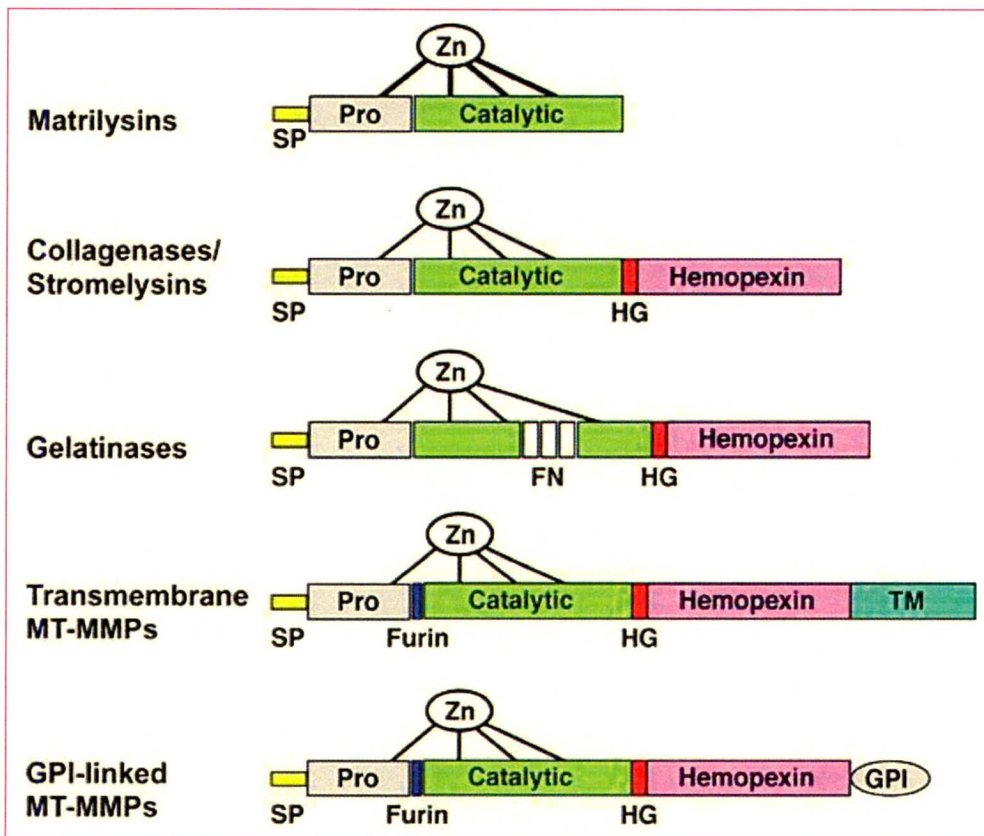


Figura 9. Dominio estructural general para cada grupo de MMPs. Estos dominios poseen un péptido señal (SP), un prodominio (Pro), un dominio catalítico con el sitio activo de unión a zinc (Zn), un dominio de bisagra (hinge domain - HG), un dominio hemopexina y para algunas un dominio transmembranal o de anclaje (GPI), un sitio de escisión por furina entre el Pro y el dominio catalítico. Las gelatinasas poseen además repeticiones similares a fibronectina de tipo II (fibronectin-like type II repeats - FN) (Brauer PR., 2006).

Así, en la clasificación se distinguen ocho grupos estructurales: cinco de MMP secretadas y tres MT-MMP. Muchos de los eventos señalizadores extracelulares ocurren en o cerca de la membrana celular y se regulan por hidrólisis pericelular. Las MT-MMP se unen covalentemente a la membrana celular, y las MMP secretadas pueden localizarse en la membrana celular uniéndose a las integrinas, a CD44, o mediante interacciones con proteoglicanos heparán sulfato y colágeno tipo IV, asociados a la superficie celular (*Mochizuki S, 2007*).

De los 25 homólogos de las MMP identificados en vertebrados, 22 de ellos corresponden a humanos. Cada MMP posee una secuencia señalizadora N-terminal o *predominio*, un propeptido o *prodominio* que mantiene al enzima latente hasta que se elimina por proteólisis, y un *dominio catalítico* que contiene la región conservada de unión al Zn^{2+} . El dominio catalítico indica la especificidad del sitio de rotura, mediante huecos de especificidad que se unen a residuos de aminoácidos adyacentes. Con excepción de la MMP7 (matrilisina), MMP26 (endometasa/matrilisina 2) y MMP23, las restantes MMP poseen un dominio hemopexina conectado con el dominio catalítico por una bisagra o región de unión H. Las MMP7 y MMP26 carecen de estos dominios, mientras que la MMP23 posee, en lugar del dominio hemopexina, un dominio rico en cisteína/prolina y otro dominio del tipo del receptor de la IL-1. El dominio hemopexina, cuando está presente, ejerce influencia sobre la unión al TIMP, a ciertos sustratos y a algunas actividades proteolíticas. La actividad colagenolítica requiere la unión y orientación de la fibrilla de colágeno, el desenrollamiento local de su estructura helicoidal triple y la rotura secuencial de la cadena, porque la hendidura catalítica es demasiado estrecha para acomodarse a la hélice triple completa. La región bisagra es variable en longitud y composición entre las varias MMP y ejerce influencia también en la especificidad del sustrato. Las MMP2 y MMP9 (gelatinasas A y B), se distinguen por la inserción de tres repeticiones ricas en cisteína en el dominio catalítico. Estos insertos se parecen a las repeticiones de unión al colágeno tipo II de la fibronectina y se requieren para unirse y romper colágeno y elastina. Por último, las MMP tipo membrana (MT-MMP), tienen un dominio transmembranal sencillo, un corto dominio C-terminal citoplasmático (MMP 14, 15, 16 y 24) y una región C-terminal hidrofóbica glicofosfatidilinositol (GPI), que actúa como señal de anclaje a la membrana. Estos dominios juegan un papel esencial en la localización de diversos eventos proteolíticos en regiones específicas de la superficie celular (*Edwards, D. R, y cols., 2008*).

La familia *ADAM* (*desintegrina y metaloproteinasa*) comprende proteínas multifuncionales de membrana, similares a las metaloproteinasas del veneno de serpientes. En su estructura muestran una organización de dominios compleja que consiste en una secuencia señalizadora, dominio metaloproteinasa, dominio tipo desintegrina, región rica en cisteína, dominio tipo receptor del factor de crecimiento epidérmico, región transmembranal y dominio citoplasmático (*Mochizuki S, 2007*)(*Edwards, D. R, y cols., 2008*).

Se han descrito ya 25 ADAM en tejidos humanos y en un principio se asociaron a la espermatogénesis, unión y fusión del espermatozoide al huevo. Más tarde se implicaron en la neurogénesis, modulación de la migración y adhesión de las células tumorales, activación de vías señalizadoras y liberación de las citoquinas y factores de crecimiento unidos a membrana. Algunas ADAM se sobreexpresan en tumores malignos de origen diverso y su actividad se puede bloquear por inhibidores endógenos y sintéticos de las proteinasas (MMPI). Las ADAMTS, son proteasas relacionadas con ADAM que contienen varias repeticiones de trombospondina tipo I (TS) en su región C-terminal, pero carecen del dominio transmembranal presente en ADAM. Se han identificado 18 ADAMTS en tejidos humanos y se ha detectado que ejercen funciones específicas en procesos normales y patológicos (*Cascales Angosto M, 2009*).

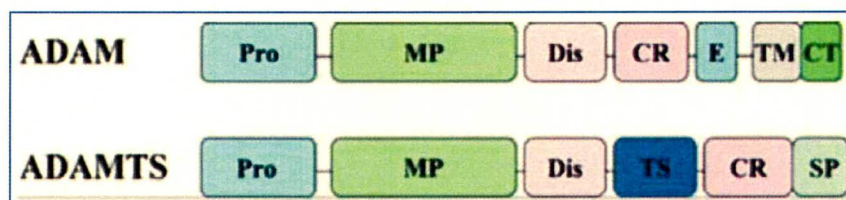


Figura 10. Estructura de ADAM y ADAMTS. Los miembros de la familia de genes ADAM se clasifican como subgrupos de miembros anclados (ADAM) y de tipo secretados (ADAMTS). CR, dominio rico en cisteína; CT, dominio citosólico; Dis, dominio desintegrina; E, dominio tipo factor de crecimiento epidérmico; MP, dominio metaloproteinasa; Pro, dominio propéptido; SP, dominio espaciador; TM, dominio transmembrana; TS, dominio trombospondina (*Cascales Angosto M, 2009*).

Las *proteínas convertasas* son una familia de serina proteasas implicadas en el procesamiento endoproteolítico de la vía secretora. Entre sus sustratos están precursores de factores de crecimiento, neuropéptidos, hormonas peptídicas y otras proteasas. Las convertasas son también importantes en el procesamiento de las glucoproteínas de la envuelta de muchos retrovirus, entre ellas la del HIV. (*Steiner, D. F., 1998*).

Además, la actividad proteolítica de ADAM puede ser regulada por señalización celular mediante las vías PKC y MAPK. ADAM funciona como molécula de adhesión que se une a integrinas o sindecanos por su dominio desintegrina y su dominio rico en cisteína, que ayuda a la célula a digerir los sustratos. ADAM regula indirectamente las señales de proliferación celular a través de las integrinas. (Mochizuki, S. 2007). Al igual que las MMP, las ADAM pueden romper moléculas de la MEC. No obstante, existen aún muchas preguntas sin resolver respecto a la regulación y función de las ADAM.

8.2. Regulación de la actividad de las metaloproteasas

Las MMPs están presentes en el intersticio del miocardio normalmente en su forma inactiva y pueden ser activadas a minutos de la isquemia por radicales libres, citocinas e hipoxia. La actividad proteolítica de las MMP se regula a tres niveles: transcripción, activación de proenzima e inactivación (Overall, C. y cols., 2002)(Folgueras A.R, y cols., 2004)(López-Otín, C, 2008). Otros mecanismos se encuentran también implicados: estabilidad del mRNA, eficiencia traduccional, compartimentación y secreción enzimática, reclutamiento en la membrana celular, selección de sustrato, su liberación, oligomerización, incorporación, internalización celular y finalmente autólisis. Estos mecanismos operan coordinadamente para asegurar que la expresión y actividad de las MMP se circunscriban a aquellos sitios y condiciones en los que es necesaria su actividad (Edwards, D. R, y cols., 2008)(López-Otín, C, 2008).

8.2.1. Transcripción

La transcripción se regula de manera independiente y cada célula muestra un fenotipo proteolítico en respuesta a los estímulos. Existen varios mecanismos mediante los que las células regulan la transcripción de las MMPs: regulación por citoquinas, señalización y factores nucleares y polimorfismos de un sólo nucleótido (Huang, S. C, y cols., 2009).

8.2.1.1. Regulación por citoquinas.

Muchas MMPs no se expresan en condiciones normales, pero su transcripción puede ser inducida por citocinas y factores de crecimiento, que son liberados por el estroma y por las células infiltradas del sistema inmune. Las citocinas proinflamatorias como la IL-1 y 6, TGF- β y TNF- α y factores como el EGF o el PDGF estimulan la síntesis de MMPs (Folgueras AR, y cols., 2004)(Uría JA, y cols., 1998). Los corticosteroides, la heparina y la IL-4 inhiben la expresión de los genes de las MMPs (Jugdutt BI, y cols., 2003).

Algunos factores como el factor transformante de crecimiento beta ($TGF\beta$) o los retinoides, funcionan como reguladores de la transcripción de las MMPs en células normales y tumorales (Puentes, X. S, y cols., 2005). Las citocinas como el $TNF-\alpha$ y la $IL-1\beta$ pueden regular y activar MMPs que son inicialmente responsables de la degradación del colágeno y subsecuentemente de la matriz. Estudios en cultivos de fibroblastos cardiacos presentaron que $IL-1\beta$ disminuyó la expresión de RNAm de procolágeno $\alpha 1$ y $\alpha 2$ e incrementó los niveles en proteína de MMP-13, MMP-2 y MMP-9. El $TNF-\alpha$ puede incrementar la expresión del RNAm para la pro-MMP-3. Dos activadores de MMPs se ha demostrado que están presentes en miocitos y son regulados en infarto al miocardio. En ratones transgénicos se sobre expresa TNF , el cual con el tiempo desarrolla cardiomiopatía dilatada, su miocardio demuestra incremento de la actividad de MMP por zimografía. Interesantemente el corazón expresa altos niveles de proteína de MMP-2 y MMP-9 también tiene mayor cantidad de depósitos de colágeno y afectada la función diastólica. El tratamiento anti- TNF con vectores de expresión adenovirales y el receptor soluble $TNF-\alpha$ p55 atenúa la expresión de MMP-2 y MMP-9, disminuyendo la síntesis de colágeno y corrige la disfunción diastólica del ventrículo izquierdo (Min Nian, y cols., 2004).

8.2.1.2. Regulación por transducción de señales y factores nucleares.

Las vías de transducción de señales que median la activación transcripcional de las MMPs son también diversas. Hay que citar las vías de la p38 quinasa activada por mitógenos (MAPK, ERK1 y ERK2), que estimulan o inhiben la expresión de las MMPs dependiendo del tipo celular. Sin embargo, muchas señales extracelulares y vías de transducción de señales convergen en el factor de transcripción AP-1 y su sitio de unión se encuentra en la región promotora de la mayor parte de los genes de MMPs. AP1 consiste en miembros de la familia FOS y JUN, que proporcionan un mecanismo general para la *trans*-activación de la expresión de las MMPs. Otros factores nucleares controlan la expresión de las MMPs; como los ETS, que se unen a sitios PEA3 presentes en los promotores de los genes de MMPs; el factor nuclear kappa β ($NF\kappa\beta$), que induce la expresión de las MMP-1, 3, 9, 13 y 14; los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT), que median los efectos de los interferones (IFN) sobre la expresión de los genes *MMPs*; el factor 4 de las células T (TCF4) y la proteína de dedo de zinc asociada a CAS (CIZ), que activa la expresión de las MMP-1, 3 y 7; la proteína p53, que modula la transcripción de MMP-1, 2 y 13; y el factor A1 de unión al núcleo (CBFA1), que forma parte de la cascada reguladora que controla la expresión de las MMPs en células normales y tumorales. Se han identificado también, en los promotores

de varios genes de MMPs, elementos reguladores negativos, tales como el elemento inhibidor del TGF β (TIE) o el elemento rico en AG (AGRE) (Puente, X. S, y cols., 2005)(Nakamoto, T., 2000).

8.3. Activación de las pro-MMP

8.3.1. Bases estructurales de la activación.

Las MMP al igual que otras proteasas se sintetizan como zimógenos inactivos en estado latente, debido a que el prodominio enmascara el sitio activo al prevenir la hidratación del ión Zn²⁺ en dicho sitio, y está mantenido por el SH (grupo sulfhidrilo) de una cisteína desapareada cercana al extremo C-terminal del dominio propéptido. Este grupo SH actúa como cuarto ligando para el ión Zn²⁺ del sitio activo y la activación que este “interruptor” cisteína Zn²⁺ se abre por eliminación proteolítica del dominio propéptido o por perturbación ectópica de la interacción cisteína Zn²⁺. Una vez desplazado, el grupo SH se reemplaza por una molécula de agua y el enlace peptídico puede entonces romperse. El sitio para la rotura del proMMP-2 por la MT1-MMP que inicia la activación, se encuentra en un bucle expuesto en la superficie, dentro del prodominio, que es probable que esté también presente en otras MMPs y que funcione como “cebo” para activar proteasas como las plasmina, chimasa y triptasa. Después de la rotura inicial, la estructura del prodominio se despliega parcialmente, y expone sitios adicionales para posteriores roturas por enzimas activos como la MMP-3, o por rotura autolítica en *trans*. La unión a un ligando o a un sustrato puede también conducir a la separación del propéptido y a la activación de la proteasa. El requerimiento de una segunda MMP para llevar a cabo la rotura final de activación en la fenilalanina o tirosina en posición 80 u 81, respectivamente, ha sido un avance conceptual en la investigación de las MMP. Diferencias en el sitio activo, subsitio S12 y secuencias del propéptido de la MMP generan especificidad para activar las proteasas. La MMP-1, es el mejor ejemplo de MMP que requiere la rotura por MMP-3 para su activación. Esto no puede ser debido a una reacción autocatalítica, ya que el hueco poco profundo del subsitio S12 de MMP-1, no puede acomodar el grueso de las cadenas laterales tales como la fenilalanina aminoterminal de la enzima activa procesada correctamente. Otras MMP, como la MMP-2, poseen un hueco profundo que puede acomodar a la Tir 81, de manera que la activación pueda completarse de forma autocatalítica en *trans* por otra MMP-2 activa, que ha de estar anclada en la superficie celular (López-Otín, C. 2002).

8.3.2. Compartimentos activadores.

Varias MMP, las MT-MMP y las MMP-3, ejercen un importante papel activador sobre otras proMMP, que lo ejercen ellas mismas una vez que han sido activadas por otras proteasas, como las serina proteasas furina y plasmima. Así que, en casi todos los casos el proceso de activación de las MMPs requiere la presencia de otras proteasas, que actúen directa o indirectamente en los circuitos proteolíticos. La activación de las MMP tiene lugar a veces en el espacio inmediato pericelular, en sitios con elevada afinidad para los respectivos precursores enzimáticos, como ocurre en la activación de proMMP2 por las MT1-MMP y MT2-MMP. Sin embargo, la unión de MMPs a las moléculas de la matriz unidas a la superficie celular puede proteger de la activación proteolítica, como ocurre cuando se une el proMMP-2 al colágeno unido a la integrina. El mecanismo de activación del proMMP-2, mediado por las MT-MMP es muy complejo e implica la formación de un agrupamiento multiproteico en la superficie celular que incluye la presencia de TIMP-2, que une el dominio C-terminal de la hemopexina del proMMP-2 a la molécula de MT1-MMP. Las integrinas pueden también formar parte de este complejo y estar implicadas en la activación pericelular de las MMP específicas. Al contrario que estos mecanismos extracelulares o pericelulares de activación de los proMMP, un subgrupo de estas proteasas, entre las que se incluyen las MT-MMP, MMP-11, MMP-23 y MMP-28, se activan dentro de la célula por proproteína convertasa del tipo furina, aunque la furina puede ser también efectiva en la activación de la MT-MMP en la superficie celular (López-Otín C, 2002).

8.4. Inhibición de las metaloproteasas

8.4.1. Inhibidores tisulares de las Metaloproteasas (TIMP).

Los inhibidores naturales específicos de la MMP son los TIMPs (inhibidores tisulares de metaloproteasas), que se unen a ellas de forma irreversible y el nivel neto de la actividad proteolítica dependerá de las concentraciones relativas de MMPs activas y sus inhibidores. Además, los TIMP poseen propiedades reguladoras del crecimiento celular. Hasta el momento se han identificado cuatro inhibidores en mamíferos: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. A pesar de tener cierta similitud estructural entre ellos, existen diferencias entre la especificidad de los diversos TIMP. Así, TIMP-1 resulta particularmente importante en la regulación de la actividad de MMP-9, y TIMP-2 para el control de la actividad de MMP-2 (Loftus IM, y cols., 2002). TIMP-3, a diferencia de TIMP-1 y TIMP-2, puede inducir apoptosis de las células musculares lisas vasculares y, de esta forma, estar implicado en la patogenia de la aterosclerosis (Baker AH, y cols., 1998).

Por otro lado, la inhibición de las MMPs en el campo de las enfermedades vasculares, la mayoría de las publicaciones relacionadas con la inhibición de estas se ha limitado a investigar su efecto sobre la hiperplasia intimal y el desarrollo de aneurismas. Los métodos posibles de inhibición son:

- Incrementar los niveles de TIMP mediante la administración exógena de TIMP recombinante o por estimulación de su producción local a través de terapia génica.
- Administración de inhibidores sintéticos.
- Reducción de la producción de MMP (*George SJ, y cols., 1998*)(*Linjnen HR, y cols., 1999*) (*Rouis M, y cols., 1999*).

La actividad de las metaloproteasas también esta regulada por la activación de los zimógenos precursores, la inhibición por los inhibidores endógenos y por los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs). Así el balance entre MMPs y TIMPs son críticos para la eventual remodelación de la MEC en el tejido. Existen algunos inhibidores sintéticos de las MMPs, entre ellos se han investigado los péptidos batimastat y marimastat. El batimastat es un inhibidor de amplio espectro de las MMPs que ha mostrado resultados prometedores en la limitación del crecimiento de aneurismas en modelos experimentales (*Bigatel DA, y cols., 1999*), aunque su empleo a largo plazo se ve limitado por su falta de biodisponibilidad vía oral. El marimastat, de segunda generación, sí es activo por vía oral. Sin embargo, posee un 30% de efectos secundarios a nivel musculoesquelético, aunque se ha estudiado en modelos experimentales humanos de hiperplasia intimal y aneurismas, con resultados alentadores (*Porter KE, y cols., 1998*)(*Treharne GD, y cols., 1999*). Los genes que se estudiaron en este proyecto, pudieran estar implicados directamente con todos estos procesos fisiológicos y patológicos, por lo que hay un gran interés en conocer el papel que desempeñan estos inhibidores de metaloproteasas en padecimientos como el infarto al miocardio.

8.4.1.1 .Descripción de TIMPs.

Los TIMPs consisten en 184-194 aminoácidos, son inhibidores de metaloproteasas. Estos están subdivididos en subdominios amino terminal y carboxilo terminal. Cada dominio contiene tres enlaces disulfuro conservados y dominios amino terminal plegados como una unidad independiente con la actividad inhibitoria de la MMP. Todos los inhibidores TIMPs han sido hasta ahora probados con las MMPs, pero TIMP-1 es un inhibidor pobre para MT1-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP y MMP-19. Se ha demostrado que TIMP-3 inhibe a ADAMs (una desintegrasa y metaloproteasa) (ADAM-10, -12 y -17) y

ADAMTS (una desintegrina y metaloproteasa con motivo trombospondina) (ADAMTS-1, -4 y -5). TIMP-1 inhibe a ADAM-10 (*Leco KJ, y cols., 2001*).

8.4.1.2. Mecanismos de inhibición de TIMPs y sus variantes.

El mecanismo de inhibición de TIMP se ha dilucidado basándose en la cristalografía del complejo TIMP-MMP (*Gomis-Ruñth FX, y cols., 1997*)(*Fernandez-Catalan C, y cols., 1998*). La forma general de la molécula TIMP es “wedge-like” (de cuña), con cuatro residuos en el extremo amino terminal, que son Cys1-Thr-Cys-Val4 y los residuos Glu67-Ser-Val-Cys70 (residuos que están en TIMP-1) que están unidos por un puente disulfuro de una cadena contigua que activa el sitio de las MMPs. La región ocupa el 75% de la interacción proteína-proteína en caso del complejo del dominio catalítico de MMP-3 y TIMP-1.

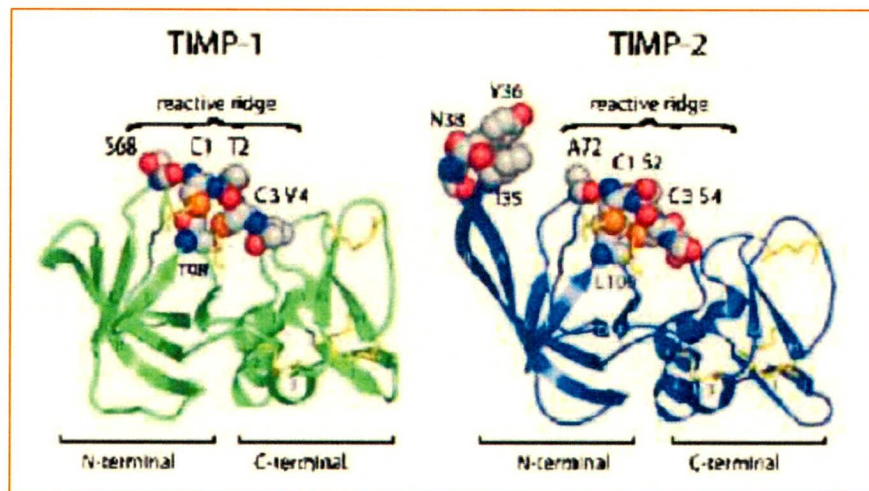


Figura 11. Estructura tridimensional de TIMP-1 y TIMP-2 (*Tomado de Hideaki Nagase, 2006*).

La mutación de la posición 2 (Thr en TIMP-1) afecta la afinidad de los TIMPs a las MMPs y la sustitución de una glicina esencialmente inactiva a TIMP-1 para la inhibición de la MMP (*Meng Q, y cols., 1999*). Adicionalmente la doble y triple mutación de las posiciones Val4 y Ser68 generan la inhibición entre MMP-1, -2 y -3 (*Wei S, y cols., 2003*). La mayor diferencia entre TIMP-1 y TIMP-2 es que TIMP-2 tiene un gran loop AB. Por último contiene Ile35, Tyr36 y Asn38 que se ajustan a una cavidad especial en la superficie de la molécula MT1-MMP y de estos, la Tyr36 juega un papel importante en la interacción con MT1-MMP (*Williamson RA, y cols., 2001*). TIMP-1 es un pobre

inhibidor de MT1-MMP, MMP-19 y ADAM17, pero gana la reactividad de las tres metaloproteasas mediante la sustitución de Thr98 con Leu, sólo con la modificación del loop AB (Lee MH, y cols., 2004). TIMP-2 no inhibe ADAM-17 pero puede ser convertido a un inhibidor funcional por la sustitución del loop AB con la de TIMP-3, en combinación con las mutaciones S2T/A70S/V71L. TIMP-4 es un inhibidor débil de ADAM17 por la truncación del dominio carboxilo terminal que incrementa la reactividad. La sustitución con TIMP-3 loop AB mejora significativamente la actividad inhibitoria con una κ_i sub nanomolar (Lee MH, y cols., 2005).

La carbamilación del grupo amino terminal (Higashi S, y cols., 1999) o una adición de Ala en el amino terminal (Wingfield PT, y cols., 1999) inactiva los TIMPs con respecto a la inhibición de la MMP. Sin embargo, estudios recientes de Wei y cols., (Wei S, y cols., 2005) muestran que la adición de Ala al amino terminal de TIMP-3 no altera significativamente la capacidad de inhibir a ADAM-17, aunque se deteriora la inhibición de las MMPs. La mutación de Thr2 de TIMP-3 a Gly también inactiva la inhibición de la MMP, pero mantiene la actividad inhibitoria de ADAM17. Estos estudios sugieren que el mecanismo de TIMP-3 para inhibir ADAMs puede ser diferente al de las MMPs.

Basados en varios estudios, un gran número de inhibidores de MMPs han sido diseñados y sintetizados y algunos fueron clínicamente probados para el tratamiento de pacientes con cáncer o artritis, pero mostraron poca eficacia hasta el momento (Baker AH, y cols., 2002). La falla de estos ensayos clínicos puede deberse parcialmente debido a nuestro limitado conocimiento de la función de las MMPs y sus inhibidores los TIMPs en la biología, patología y la falta de inhibidores selectivos.

8.4.1.3. Otros inhibidores endógenos de las MMPs.

Existen varias proteínas endógenas también inhibitorias de las MMPs, y algunas contienen dominios que son homólogos a los dominios inhibidores de TIMPs. RECK (proteína rica en cisteína, que induce la reversión con motivos Kazal), es un inhibidor de las MMPs de la superficie celular y un regulador clave de la integridad de la MEC y de la angiogénesis. Este es también el caso del TFPI2 (del inglés, *tissue-factor pathway-inhibitor-2*), una serina proteasa que puede funcionar como inhibidora de las MMPs. De igual manera los inhibidores de las MMPs pueden estar escondidos en los dominios NC1 (canstatina) del colágeno tipo IV o en el dominio de unión a la laminina de la agrina, los cuales son similares en su estructura a los TIMPs (Handsley, M. M. 2005).

Las MMPs se encuentran reguladas, a nivel transcripcional y post-transcripcional (estabilización del mRNA, glicosilaciones), y su transcripción se induce en respuesta a las citocinas, factores de crecimiento,

agentes químicos, estrés oxidativo y estrés físico, oncogenes e interacciones con la MEC. Con estas herramientas se ejerce una estricta regulación de las MMPs restringiéndose su acción a determinados procesos fisiológicos, como el desarrollo embrionario, reproducción y remodelación tisular. Por el contrario, muchos estados patológicos, se asocian a una desregulación de las MMPs (*López-Otín, y cols., 2008*).

IB. ESTADO DEL ARTE

Actualmente existen diversos estudios de MMPs aunque la mayoría están enfocados en cáncer, también hay estudios asociados con enfermedad cardiovascular pero muy pocos están dirigidos específicamente con infarto al miocardio.

✓ En una revisión realizada por Hopps E (2015), menciona que existe un patrón de alteración de MMPs/TIMPs que están asociados con aterosclerosis y el riesgo a enfermedad cardiovascular. En particular los niveles en plasma de la MMP-9 y el TIMP-1 están asociados con las causas de mortalidad cardiovascular. Aunque en la literatura existen evidencias de una mejora en la relación MMP-/TIMP en proporción a la dieta y ejercicio. Esta revisión sugiere como una terapia farmacológica dirigida, que al contrastar el perfil de MMP se podría atenuar el proceso aterosclerótico y reducir la morbilidad y mortalidad cardiovascular (*Hopps E, 2015*).

✓ Recientemente se estudio la asociación entre los genotipos y haplotipos de MMP-1 G-1607 GG, MMP-12 A82G y la MMP-12 A1082G, con el pronóstico de enfermedad arterial coronaria (CAD). Este estudio se realizó en población Africana y concluyeron que el haplotipo GG-A de MMP-1G-1607GG, puede predecir futuros eventos clínicos en pacientes y se sugiere la importancia de éste en la predicción del pronóstico de CAD (*Jguirim-Souissia I, y cols., 2011*).

Sini y colaboradores (2014) encontraron en su estudio una asociación no reconocida de MMP-9 con la disfunción de HDL y su propiedad proinflamatoria indicando una conexión molecular que puede potenciar el riesgo de enfermedad cardiovascular en sujetos con disfunción de HDL (*Sini S, y cols., 2014*).

✓ Wu y colaboradores (2013), estudiaron el papel que pudiera tener la MMP-9 en la inflamación, la degradación de matriz en aterosclerosis y ruptura de la placa. Donde el alelo T del polimorfismo rs3918242 se ha reportado con una alta actividad en el promotor y se ha asociado a la enfermedad arterial coronaria (CAD). Éste estudio lo realizaron en población Han de China con CAD y concluyeron que la MMP-9 se encuentra elevada en suero y también asociaron al polimorfismo rs3918242 en el desarrollo de la enfermedad, influenciando la expresión de MMP-9 (*Wu H, y cols., 2013*).

✓ Morris D y colaboradores (2013), investigaron varios SNPs de MMP1, MMP3, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, TIMP1 y TIMP3. Pero fue el rs3025058 de la MMP3 ubicado en la región promotora el que aparentemente modera el factor de riesgo para el aneurisma aórtico abdominal en una población Australiana (*Morris DR, y cols, 2013*).

✓ Con respecto a los inhibidores de las MMPs, se estudio a TIMP3 el cual se regula a la baja en enfermedades inflamatorias y metabólicas, como la DM2 y aterosclerosis; para este estudio se generaron nuevos modelos de ratón donde se sobre expresaba a *Timp3* en placas ateroscleróticas, resultando en la reducción de señales de estrés oxidativo, evidenciando la disminución de peroxidación lipídica, la carbonilación de proteínas y la nitración de ateromas (*Viviana Casagrande, y cols., 2012*).

1. FACTOR MODIFICANTE DE LA REGULACIÓN

1.1. Regulación por polimorfismos de un sólo nucleótido (rSNP)

La mayoría de las enfermedades comunes tiene un origen multifactorial, es decir, surgen como resultado de la interacción de múltiples variantes genéticas y diversos factores ambientales, razón por la cual no siguen patrones hereditarios mendelianos y se les denomina enfermedades "complejas". (*Botstein D, y cols., 2003*). Aún en el caso de trastornos infecciosos, se ha documentado la contribución genética del individuo en la evolución natural del padecimiento (*Frodsham AJ, 2004*). En los estudios de asociación, el marcador es prevalente en pacientes contra los que no están enfermos y esta es considerada evidencia de asociación entre la enfermedad y el marcador. Aunque hay muchas limitantes en los estudios de asociación tal vez son el mejor mapeo de enfermedades complejas poligénicas. Sin embargo, este tipo de estudios requieren un gran número de pacientes y un grupo control adecuado para lograr al menos el 80% del poder de detección.

Los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) es la forma más simple de la variación de DNA entre individuos. Estos simples cambios pueden ser de tipo transición o transversión y ellos ocurren a lo largo del genoma con una frecuencia de alrededor de 1 en 1,000 pb. Se estima que más de tres millones de SNPs han sido encontrados hasta ahora. Estos SNPs pueden ser los responsables de la diversidad entre individuos, la evolución del genoma, los rasgos más comunes familiares como el cabello rizado, diferencias interindividuales en la respuesta a fármacos y enfermedades comunes y complejas como la diabetes, obesidad, hipertensión y desórdenes psiquiátricos. Los SNPs pueden cambiar la codificación de aminoácidos (no sinónimos) produciendo enfermedad, por lo tanto, pueden ser sujetos a selección natural; también pueden ser silenciosos (sinónimos), donde no hay un cambio en la codificación de aminoácidos y no tienen efecto en la función del gen y fenotipo, o simplemente ocurren en regiones no codificantes. Estos SNPs pueden influenciar la actividad del promotor, el efecto en la traducción de proteínas y producir enfermedades (*Barkur S, 2009*). Casi todas las enfermedades de origen monogénico (mendeliano) se deben a mutaciones que modifican la secuencia y la función de una proteína (*Botstein D, y cols., 2003*).

La proporción del genoma que codifica a proteínas representa sólo 1.5%; sin embargo, se ha calculado que alrededor de 5% del genoma es funcionalmente importante dado que su secuencia está conservada debido a una fuerte selección (*Cooper GM, 2003*). Esto sugiere que una fracción considerable del genoma (3.5%) está integrada por elementos funcionales no codificantes, muchos de los cuales pueden intervenir en la regulación de la expresión genética (*Cooper GM, 2003*)(*Drake JA, y cols., 2006*).

La variación fenotípica como resultado de la variación de la regulación de la expresión genética se propuso desde mediados de la década de 1970. (*King MC, 1975*). El estudio de la expresión genética a escala genómica ha sido un avance crucial para establecer que la variación de la expresión genética entre una persona y otra es un fenómeno común y que se vincula con un fenotipo (*Sandberg R, y cols., 2000*)(*Steinmetz LM, y cols., 2002*). Los SNPs reguladores (rSNP) se encuentran en los promotores de los genes que sintetizan proteínas y afectan los niveles de expresión génica (*Sadee W, 2009*).

La expresión génica es un fenómeno biológico de vital importancia para el crecimiento, diferenciación, apoptosis y desarrollo de cada una de las células y de los organismos en un determinado espacio y tiempo (*Ogbourne S, 1998*).

La regulación de la expresión genética se refiere a los mecanismos celulares que controlan el perfil espacio temporal del producto funcional de un gen. La regulación puede actuar a nivel de la transcripción (mecanismos de regulación transcripcional) o de manera postranscripcional; aludiendo a los SNPs reguladores. La intensidad de la transcripción de un gen que codifica a una proteína depende, al menos, de la unión de factores de transcripción activados a regiones reguladoras en la molécula de ADN y del reclutamiento del complejo activo de la polimerasa II de ARN, que en conjunto determinan la frecuencia de síntesis del ARNm correspondiente (*Woychik NA, 2002*)(*Kadonaga JT, 2004*). Los factores de transcripción son proteínas que al unirse a sitios específicos del ADN, los denominados elementos de respuesta (ER), pueden interactuar con otros factores transcripcionales o con cofactores para formar un complejo de proteínas y DNA que permiten la iniciación de la transcripción del gen. Los ER son secuencias de ADN de aproximadamente 4 a 15 pares de bases (pb) de longitud cuya secuencia casi siempre presenta algunas variaciones. Diferentes familias de factores transcripcionales reconocen distintos ER. Los cambios sutiles en la secuencia de un ER pueden inducir cambios en la afinidad con la que se une el factor transcripcional correspondiente y modificar así los niveles de transcripción (figura 12). En los vertebrados, los ER pueden encontrarse en tres tipos de regiones reguladoras conocidas. Los que componen al promotor suelen localizarse dentro de las primeras 1 000 pb en la región 5' del inicio de la transcripción; otros pueden situarse a grandes distancias de dicho sitio (hasta 100 kb 5' o 3' del gen) en estructuras conocidas como *enhancers* (o potenciadores), que pueden incrementar la frecuencia de inicio desde el promotor con el que se relacionan, así como en los *silencers* (o silenciadores), que pueden reducir o suprimir la transcripción (*Levine M, 2003*). Las mutaciones en los ER de cualquiera de estos tres tipos de regiones reguladoras en el genoma (rSNP) pueden modificar la transcripción e influir en el fenotipo del individuo.

IC. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO

1. FACTOR MODIFICANTE DE LA REGULACIÓN

El ADN genómico se encuentra unido con proteínas y forma un complejo nucleoproteínico llamado cromatina. Las regiones del genoma que están organizadas de manera compacta (heterocromatina) están apagadas desde el punto de vista transcripcional. En contraste, las regiones transcripcionalmente activas del genoma presentan una organización más relajada (eucromatina). La organización del ADN genómico en cromatina es fundamental en la regulación de la expresión genética. La modulación diferencial de la compactación del ADN genera diferentes fenotipos heredables, sin cambio alguno en la secuencia del gen blanco de esta modulación, lo cual se conoce como epigenética. Los factores que afectan la transcripción también pueden catalogarse como factores en *cis*, como aquellos que ejercen su efecto en la misma cadena de ADN y cerca del gen en cuestión. Los elementos de respuesta (y sus variantes polimórficas) afectan la transcripción en *cis*. Por otro lado, los efectos en *trans* surgen de un gen o factor adicional. Los efectos en *trans* pueden originarse por factores no genéticos, como estímulos ambientales (drogas, patógenos, enfermedades) o bien variaciones genéticas en otros genes que afectan la expresión del gen en cuestión (Buckland PR, 2006) (Pastinen T, y cols., 2006).

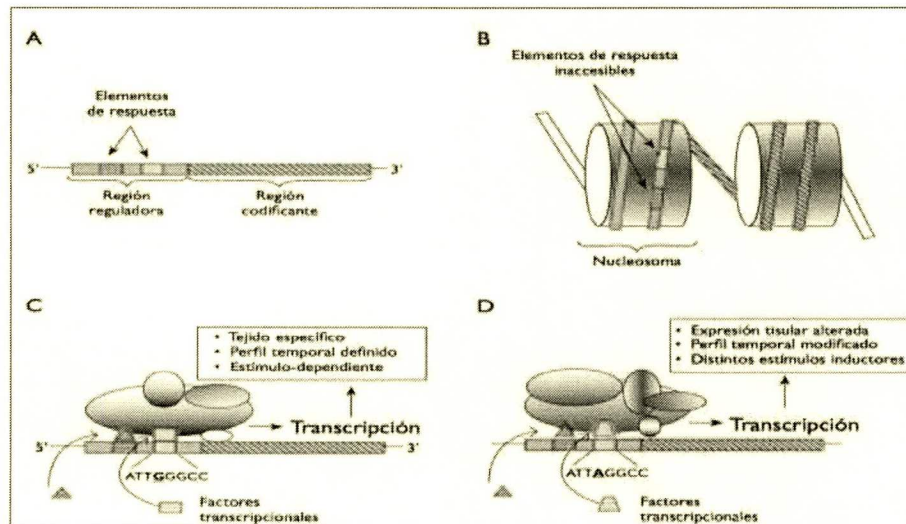


Figura 12. Importancia de los polimorfismos de un sólo nucleótido en regiones reguladoras (rSNPs).

A) Estructura básica de un gen a nivel de secuencia de ADN; un gen posee una región reguladora que contiene elementos de respuesta reconocidos por factores de transcripción y una región codificante que tiene la información necesaria para sintetizar una proteína, para que un gen se exprese en una célula determinada, ésta debe poseer los factores de transcripción adecuados; además, los elementos de respuesta deben estar expuestos para que puedan reconocerlos los factores transcripcionales. B). La estructura de la cromatina puede impedir el acceso de factores de transcripción a sus elementos de

respuesta. C). El desplazamiento de los nucleosomas expone los elementos de respuesta y permite la agrupación de la maquinaria transcripcional y la expresión del gen. D) Las mutaciones en los elementos de respuesta pueden modificar la expresión del gen y afectar el fenotipo del organismo (*Hernández-Romano J, y cols., 2009*).

En resumen, la expresión génica entre un individuo y otro pueden modificar el fenotipo en enfermedades complejas. Los SNPs reguladores encontrados en estas regiones pueden modificar, destruir o crear sitios de unión y reconocimiento para factores de transcripción, alterando de esta manera los niveles de expresión génica y llevando a una sobre expresión de los mismos. Estudios compartivos en gemelos idénticos y hermanos sugieren que la variación genética es uno de los factores asociados con la susceptibilidad para muchas enfermedades comunes. La diversidad en la población es también asociada con estas variaciones. Los SNPs son considerados la forma más predominante de segregación y variación a nivel molecular.

2. POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA METALOPROTEASA

2.1. Polimorfismos en el promotor del gen de la MMP-1

2.1.1. *Nombres alternativos del gen MMP-1:* colagenasa intersticial, colagenasa-1, colagenasa fibroblástica, CLG1. Se localiza a lo largo del brazo del cromosoma 11 en la región 11q22.3, su tamaño es de 8 244 pb y contiene 9 intrones y 10 exones (Pardo A, 2005).

2.1.2. *Función:* La MMP-1 degrada colágena fibrilar formando gelatina, susceptible a la acción de otras MMPs. Una gran variedad de moléculas son también sustrato para esta colagenasa, confiriéndole un rol esencial en el remodelado de la MEC; actúa sobre el agregano, versicano, caseína y tenascina-C. Además, puede romper enlaces en moléculas que no pertenecen a la MEC con la consiguiente activación o inactivación de éstas. Un ejemplo es la regulación del factor de crecimiento similar a insulina (IGF) al escindir a la proteína de unión a IGF (Pardo A, 2005). Debido a sus funciones, un aumento de la actividad de la MMP-1 se ha asociado a hipertrofia cardíaca (Miura S, y cols., 2003), patologías articulares (Vincenti MP, 2002) y cáncer (Nishioka Y, y cols., 2003).

2.1.3. *Regulación:* Entre los factores que estimulan la transcripción del gen de la MMP-1 se encuentran los ésteres de forbol por medio de un sitio de unión a AP-1 (Vincenti MP, 2002). Diversas citocinas son también inductores de la MMP-1: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento fibroblástico (FGF)-1,-2,-7, y -9, el factor de crecimiento de hepatocitos, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, los interferones- β y - γ , el factor de crecimiento transformante α (TGF- α) y las interleucinas -1, -2, -4, -5, -6, -8 y -10 (Woessner JF, 2000). Por otra parte, la transcripción de MMP-1 se disminuye por algunos derivados de la vitamina A y el TGF- β a través de un elemento inhibitorio de TGF- β (TIE) cuya mutación produce un aumento significativo de la transcripción de MMP-1 (White LA, y cols., 2000). Por último, para que la activación de la procolagenasa MMP-1 se lleve a cabo de manera completa, se requiere de la conjunción de la actividad de dos proteinasas: el activador de plasminógeno tipo urocinasa y la MMP-3 (estromelisin-1) (Suzuki K, y cols., 1990). La actividad de la MMP-1 se inhibe directamente al formar un complejo con el TIMP-1 (Woessner JF, y cols., 2000).

2.1.4. *Polimorfismo de estudio:* El polimorfismo a estudiar en este gen es el -1607 que resulta de una inserción/ deleción de una guanósina. Un alelo tiene una sola guanósina (1G) y el otro alelo tiene dos guanósinas (2G) en el sitio polimórfico. Ensayos en los promotores identificaron que este es un

polimorfismo funcional (*Shu Ye., 2000*). Como se mencionó anteriormente, ciertos mediadores inflamatorios inducen un aumento en la expresión de MMP-1. Además de la inflamación, existe la posibilidad de que este incremento se deba a factores genéticos. En un promotor de *MMP-1* en la posición -1607 pb, la inserción de una guanina adicional crea un sitio de unión para el factor de transcripción Ets, 5'-GGA-3', incrementando significativamente su tasa de transcripción (*Rutter JL, y cols., 1998*); este polimorfismo se ha relacionado con ciertos tipos de cáncer (*Nishioka Y, y cols., 2003*).

Pearce y colaboradores, analizaron el efecto del haplotipo que involucra a los polimorfismos 519A>G y -340T>C del gen de la MMP-1 sobre el riesgo de infarto agudo al miocardio (IAM) en una población británica y en una población sueca. Se encontró que en relación al haplotipo A-519 / T-340, los haplotipos A-519 / C-340 y G-519 / T-340 tenían un efecto protector (odds ratio=0.70 [0.57 a 0.86]; P=0.0007) y en contraste, el haplotipo G-519 / C-340 aumentaba el riesgo de IAM (odds ratio=1.94 [1.15 a 3.28]; P=0.013) (*McDonnell S, y cols., 1999*).

2.2. Polimorfismo en el promotor del gen de la MMP-2

2.2.1. *Nombres alternativos de la MMP-2*: gelatinasa A. Este gen se localiza en el brazo del cromosoma 16 en la región 16q13-q21, su tamaño es de 27 516 pb y contiene 11 intrones y 12 exones.

2.2.2. *Función*: Este gen se codifica para una proteína de 62 kDa que está involucrada en la degradación de colágeno IV y se encuentra en la mayor parte del tejido conectivo (*Price SJ, y cols., 2001*). En el corazón se encuentra en las capas endocárdica y subendocárdica siendo así una de las MMPs más prevalentes en los tejidos cardiacos. Se le halla en la circulación coronaria. Por otra parte, durante la agregación plaquetaria mediada por metaloproteasas, se libera un pico de MMP-2 de las plaquetas mismas en cuestión de segundos. Debido a esto, en la reperusión que sigue a un periodo de isquemia, la liberación aguda de MMP-2 agrava la disfunción mecánica del corazón (*Cheung PY, y cols., 2000*). Se ha observado que cadenas pesadas de miosina son sustrato para la MMP-2 y que los productos de degradación se encuentran en corazones de cardiomiópatas (*Rouet-Benzineb P, y cols., 1998*) revelando la actividad de la enzima. También ha sido descrita su participación en procesos ateroscleróticos por permitir la migración de células de músculo liso y por facilitar la ruptura de la placa de ateroma.

2.2.3. *Regulación*: La región promotora del gen MMP-2 posee sitios de unión para los factores de transcripción AP-2, p53 y Sp1 (*Qin H, y cols., 1999*)(*Kadonaga JT, 1987*)(*Turner J, y cols., 1999*) siendo

todos reguladores de la producción de la enzima. Por tanto, cualquier modificación de estas regiones es susceptible de cambiar la tasa de transcripción de la MMP-2 (*Price SJ, y cols., 2001*). Estudios en el polimorfismo -1306 C/T, han mostrado que se interrumpe un sitio promotor tipo Sp-1 (caja CCACC), mostrando una sorprendente baja de actividad del promotor con el alelo T (*Vasku A, y cols., 2004*).

2.2.4. Polimorfismo de estudio: Price y colaboradores identificaron 15 variantes en la secuencia del gen MMP-2, donde todas son sustituciones de una sola base; se contaron siete transversiones y ocho transiciones. De los polimorfismos, seis se localizaron en el promotor, seis en la región codificante, uno en el 5'-UTR, uno en el 3'-UTR y uno en una secuencia de intervención (o intrón). La mayoría de estas variantes no causa modificaciones en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, la transición G→A en posición -1646 provoca la sustitución de una glicina por una serina (G456S). Otra de las variantes encontradas fue la transición C→T en la posición -1306, donde el alelo -1306C resulta en una mayor actividad del promotor de MMP-2. A pesar de esto, la menor actividad promotora del alelo -1306T podría estar relacionada con patologías que involucran la regulación de la MEC, como el desarrollo de la EAC. Sin embargo, otros estudios realizados hasta ahora no han logrado demostrar esta asociación entre el SNP -1306 C/T y la EAC o el IAM en las poblaciones francesa, alemana (*Lamblin N, y cols., 2002*), estadounidense (*Armstrong C, y cols., 2007*) o turca (*Alp E, y cols., 2011*). En lo que concierne al polimorfismo -790 T/G, Vasku y colaboradores encontraron una asociación entre el genotipo TT y la angina de pecho en la población Checa contrariamente al reporte de Alp y colaboradores, en donde no se halló dicha relación en la población turca (*Vasku A, y cols., 2003*). La sustitución -735 C/T destruye un elemento de unión a Sp1, alterando la transcripción de MMP-233. En el estudio de Alp y cols., el genotipo -735TT fue casi significativamente ($p=0.054$) menos frecuente en controles que en pacientes con IAM y resultó en tres veces el riesgo de desarrollar un IAM. De los polimorfismos mencionados, este mismo estudio demostró que el haplotipo A-1575/C-1306/G-790/C-735 está asociado a pacientes con EAC y antecedentes de IAM; este haplotipo deriva en seis veces el riesgo de desarrollar EAC en relación con el haplotipo GCTC que es el más común. En el estudio de Alp y colaboradores, no hubo asociación entre los polimorfismos -1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G del gen de MMP-2 y la EAC. Otro estudio realizado por Delgado-Enciso refiere que el genotipo CC del polimorfismo MMP-2-1306 aumenta el riesgo de IAM en la población mexicana (*Delgado-Enciso I, y cols., 2009*).

2.3. Polimorfismo en el promotor del gen de la MMP-3

2.3.1. *Nombres alternativos de la MMP-3:* estromelina humana fibroblástica; estromelina 1; STMY 1; STR1, transina, progelatinasa. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 en la región 11q22.2-22.3, su tamaño es de 7 815 pb y contiene 9 intrones y 10 exones (Ye S, y cols., 1995).

2.3.2. *Función:* La MMP-3 es una proteasa íntimamente relacionada con la colagenasa MMP1 y tiene un amplio rango de especificidades para el sustrato. Se produce principalmente en el tejido conectivo y puede degradar proteoglicanos, fibronectina, laminina, colágena tipo IV, pero no la de tipo I. Es capaz de activar otras MMP's, entre ellas colagenasas y gelatinasas (Woessner JF Jr., 1991). Por hibridación *in situ* de mRNA se demostró la presencia de MMP-3 en las placas ateroscleróticas coronarias, sobre todo en las zonas más susceptibles de ruptura (Henney AM, y cols., 1991). También se ha observado que la MMP3 promueve el inicio de la formación tumoral en el cáncer de mama (Sternlicht MD, y cols., 1999).

2.3.3. *Regulación:* La expresión de estromelina se regula principalmente en el punto de su transcripción por estímulos que actúan en su región promotora, entre ellos factores de crecimiento y citocinas. Los niveles de RNAm son inducidos por IL-1 β y suprimidos por ácido retinoico y dexametasona (Buttice G, y cols., 1991)(Quinones S, y cols., 1989). El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimulan la transcripción de la transina por medio de factores que reconocen a la secuencia TGAGTCA ubicada en el promotor del gen de la MMP-3. El PDGF lo hace a través de la proteína C-FOS y el EGF a través del factor de transcripción JUN/AP-1 (Kerr LD, y cols., 1988). La estromelina I activa a la MMP-7 (Imai K, y cols., 1995) y ambas interactúan durante la remodelación tisular (Lu PC, y cols., 1999).

2.3.4. *Polimorfismo de estudio:* Uno de los polimorfismos más estudiados para el gen de la STMY1 se encuentra en su secuencia promotora, en la posición -1612, donde uno de los alelos contiene una serie de seis adeninas (6A) y otro, una serie de cinco (5A). Ye y cols., (1995), hallaron que el polimorfismo 5A/6A parece jugar un papel importante en la expresión de STMY1, donde el alelo 5A resulta en una actividad dos veces mayor que el 6A. A raíz de esto varios estudios han demostrado que esta deleción/inserción tiene un rol notable en el desencadenamiento del IAM (Liu PY, y cols., 2003) y en la extensión de la aterosclerosis coronaria (Beyzade S, y cols., 2003).

Humphries y colaboradores (2002) reportaron la relación entre el tabaquismo, el genotipo de la MMP-3 y el riesgo de EAC en un estudio prospectivo de hombres sanos de mediana edad. Encontraron que el tabaquismo en curso doblaba el riesgo de padecer EAC y examinaron si este riesgo era modificado por el genotipo de la MMP-3. Hallaron que en varones no fumadores, aquellos con el genotipo 5A/6A tenían 1.37 veces el riesgo de presentar EAC en relación al grupo 5A/5A y de igual manera, el riesgo relativo fue de 3.02 en el grupo con el genotipo 6A/6A. En los fumadores, al compararlos con el grupo 5A/5A no fumador, el tabaquismo incrementó el riesgo de EAC a 1.91 veces en el grupo 5A/6A, a 4.01 veces en el grupo 6A/6A y a 3.81 veces en el grupo 5A/5A (*Humphries SE, y cols., 2002*).

Liu y colaboradores (2005) mostraron que la serie de cinco adeninas ya sea como genotipo homocigoto (5A/5A) o heterocigoto (5A/6A) es más frecuente en pacientes con antecedentes de IAM (frecuencia de 59.2% en pacientes con eventos cardiacos posteriores al IAM índice y de 41.3% en pacientes sin eventos cardiacos posteriores) que en individuos sanos (27.4%). Así, concluyeron que este polimorfismo tiene un fuerte impacto en el pronóstico de pacientes que han sufrido de un IAM prematuro y más aún en los pacientes fumadores (*Liu PY, y cols., 2005*). Apoyando el trabajo de Humphries, Liu y colaboradores encontraron una asociación entre el consumo de tabaco, el alelo 5A y el pronóstico de enfermedad coronaria, tras dejar el hábito de fumar. Efectivamente el mayor beneficio tras dejar de fumar fue para el grupo de pacientes con el genotipo 5A (*Liu PY, y cols., 2005*). Además, se ha atribuido al alelo 5A un mayor riesgo de IAM a edades tempranas (*Liu PY, y cols., 2003*).

En otro estudio de casos y controles conducido en China por Zhou y colaboradores (2004) también se encontró que el alelo 5A está asociado con el IAM. Igualmente, hallaron una relación entre el polimorfismo -376C/G y el IAM con una mayor frecuencia del alelo -376G en los casos, que en los controles (*Zhou X, y cols., 2004*), aunque ésta es moderada y no se ha encontrado en otros estudios (*Beyzade S, y cols., 2003*). Sin embargo, este estudio reveló para los dos polimorfismos que tanto el genotipo dominante (6A/6A o CC) como el aditivo (5A/5A o GG) están asociados a procesos involucrados en el SICA. Ya que este último resultado puede parecer un tanto contradictorio, se debe considerar que el alelo 6A, por ser transcripcionalmente menos activo, promueve la acumulación de matriz en la pared arterial, es decir el desarrollo del ateroma, mientras que el alelo 5A, que aumenta la transcripción, suscita la inestabilidad de la placa aterosclerótica (*Beyzade S, y cols., 2003*)(*Terashima M, y cols., 1999*).

Según el análisis por género realizado en el estudio de Zhou en China, se encontró que la asociación entre los polimorfismos 5A/6A y -376C/G y el IAM sólo se observa en hombres (*Zhou X, y cols., 2004*); en contraste, un estudio japonés mostró una asociación entre el alelo 6A y un mayor riesgo de presentar IAM

en mujeres (*Yamada Y, y cols., 2002*). Adicionalmente, Zhou y cols., analizaron la asociación de haplotipo con el IAM añadiendo a la investigación el polimorfismo Glu45Lys.

El haplotipo -1612 5A, -376G, 45Lys se asocia con un mayor riesgo para presentar IAM a comparación de los haplotipos más comunes (6A-C-Glu en la población estudiada). Por último, concluyeron que en la población de estudio, tanto el haplotipo -1612 5A, -376G, 45Lys como los alelos -1612 5A y -376G de manera independiente se asocian a un mayor riesgo de IAM (*Zhou X, y cols., 2004*).

Otro grupo de investigadores japoneses, al estudiar el polimorfismo 1G/2G del gen de la MMP-1 ya mencionada y el 5A/6A del gen de la MMP-3 encontró una asociación entre el haplotipo 1G-5A y el riesgo de IAM, reforzando los resultados ya expuestos (*Nojiri T, y cols., 2003*).

2.4. Polimorfismo en el promotor del gen de la MMP-7

2.4.1. Nombres alternativos de la MMP-7: Matrilisina, matrinalina, metaloproteinasa-1 putativa, metaloendopeptidasa uterina 1 (PUMP-1) (*Mora JR, y cols., 2006*). Es localizado en el brazo largo del cromosoma 11 en la región 11q21-q22, su tamaño es de 10 240 pb y contiene 5 intrones y 6 exones (*Jormsjö Sofia, y cols., 2001*).

2.4.2. Función: Entre las metaloproteasas de matriz, la MMP-7 es de las más pequeñas (*Quantin B, y cols., 1989*) y no presenta dominio tipo hemopexina. La MMP-7 tiene una gran variedad de sustratos, entre ellos, elastina, proteoglicanos fibronectina, y colágenas IV a X (*Jormsjö Sofia, y cols., 2001*). Esta MMP es capaz de activar a los zimógenos de MMP-1,-2,-8 y -9 y su ausencia disminuye la síntesis de pro-MMP-13 a través de la acumulación de pro-MMP-8 (*Dozier S, y cols., 2006*). Se ha sugerido que esta enzima puede tener un papel importante en la EAC ya que se expresa en macrófagos de los sitios de ruptura potencial en las lesiones ateroscleróticas (*Halpert I, y cols., 1996*).

2.4.3. Regulación: En procesos patológicos, principalmente oncológicos, la MMP-7 se regula a la alta por los factores AP-1 y STAT-3 en presencia de catecolaminas (*Shi M, y cols., 2010*). Además, esta matrilisina puede ser activada por la MMP-3 (*Kukačka J, y cols., 2005*).

2.4.4. Polimorfismo de estudio: Jormsjö y colaboradores (2001), identificaron dos polimorfismos en la región promotora de la MMP-7 que tienen influencia sobre el diámetro arterial coronario en presencia de hipercolesterolemia, siendo así un factor de riesgo para el SICA. Encontraron que en pacientes

hipercolesterolémicos, el alelo G en posición -181 daba un diámetro luminal más pequeño que los homocigotos para el alelo A. De la misma forma, aquellos que presentaron el alelo T en lugar del C en posición -153 también tenían diámetros arteriales reducidos a nivel coronario. Ambos polimorfismos se asocian con una mayor actividad transcripcional basal *in vitro*, únicamente cuando hay hipercolesterolemia. Esto parece relacionarse con la posible acumulación de macrófagos derivados de monocitos que se presenta al haber altos niveles de colesterol en sangre ya que estas células son productoras de MMP-7 y, por tanto, reflejarían los efectos de los polimorfismos descritos. Sin embargo, no se puede llegar a una conclusión definitiva hasta que se lleven a cabo estudios con cohortes más grandes (Jormsjö Sofia, y cols., 2001).

2.5. Polimorfismo en el promotor del gen de la MMP-9

2.5.1. *Nombres alternativos de la MMP-9:* gelatinasa B, gelatinasa del macrófago, gelatinasa del neutrófilo, colagenasa tipo IV, colagenasa tipo V (Mora JR, y cols., 2006). Es localizado en el brazo largo del cromosoma 20 en la región 20q11-q13, su tamaño es de 7 654 pb y contiene 12 intrones y 13 exones.

2.5.2. *Función:* La MMP-9 es capaz de degradar gelatina, colágena de tipo IV (Newby AC., 2005), entactina, agregcano, elastina y fibronectina (Kukačka J, y cols., 2005).

2.5.3. *Regulación:* La MMP-9 se estimula por el TNF- α a través de la vía de señalización Raf/MEK/ERK (Genersch E, y cols., 2000)(Ueda L, y cols., 2001). En cambio, el TGF- β suprime la inducción que tiene el TNF- α sobre la secreción de MMP-9 en monocitos (Vaday GG, y cols., 2001).

2.5.4. *Polimorfismo de estudio:* Se ha observado una sobreexpresión de MMP-9 en placas de aterosclerosis y su implicación en la ruptura de éstas (Brown DL, y cols., 1995). Además, se ha descrito que altos niveles de esta enzima se relacionan con arteriosclerosis (Noji Y, y cols., 2001) y otras patologías cardiovasculares, entre ellas la hipertensión sistólica, rigidez aórtica (Yasmin, y cols., 2005) y EAC (Tayebjee MH, y cols., 2005)(Marx N, y cols., 2003). Así, esta metaloproteasa juega un papel crucial en la remodelación vascular y la aterogénesis.

Un polimorfismo en la región promotora de *MMP-9* en posición -1592 se ha relacionado con patologías cardiovasculares causadas por aterosclerosis coronaria. Se trata de una transición de una sola base entre citosina (C) y timidina (T) donde el alelo T produce una mayor actividad en el promotor que el alelo C ya

que este último parece permitir la unión preferencial de una proteína represora (*Zhang B, y cols., 1999*). Con respecto a este polimorfismo Blankenberg y cols., encontraron que el alelo -1562T en pacientes con enfermedad cardiovascular preexistente se reflejaba en niveles plasmáticos de MMP-9 aumentados. Esta misma elevación en la concentración de MMP-9 se asoció a una menor supervivencia de los pacientes y a dos veces el riesgo de muerte relacionada con problemas cardiovasculares (*Blankenberg S, y cols., 2003*). Zhi y colaboradores (2010), tras estudiar este mismo polimorfismo en una población china llegaron a varias conclusiones: no se observaron efectos del polimorfismo en el riesgo de desarrollar EAC, en cambio, el alelo T se asoció con 2.53 veces más riesgo de desarrollar EAC en pacientes diabéticos ($P = 0.018$), en los casos ya diagnosticados con EAC el polimorfismo se relacionó con un mayor riesgo de IAM ($P = 0.048$). Así, en la población que estudiaron, los genotipos -1562 CT/TT pueden favorecer la EAC en pacientes diabéticos y el IAM en pacientes con EAC. Adicionalmente, este equipo estudió los polimorfismos R279Q, P574R y R668Q ubicados en distintos exones de *MMP-9* describiendo que sus variantes pueden tener, en conjunto, un efecto protector sobre el desarrollo de la EAC, principalmente al tener los alelos 279R, 574R y 668Q (*Zhi H, y cols., 2010*). En una población iraní se mostró que los pacientes con el alelo T en posición -1562 tienen mayor riesgo de desarrollar EAC de manera temprana (*Saedi M, y cols., 2012*).

2.6. Polimorfismo en el promotor del gen de la MMP-12

2.6.1. Nombres alternativos de la MMP-12: elastasa de macrófagos, metaloelastasa. Se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 en la región 11q22.3, su tamaño es de 12 249pb y contiene 9 intrones y 10 exones.

2.6.2. Función: La MMP-12 es una metaloproteínasa elastolítica secretada por macrófagos activados (*Shapiro SD, y cols., 1993*)(*Belaouaj A, y cols., 1995*). Además de la elastina, ésta MMP toma también como sustratos a la fibronectina, laminina, vitronectina, colágena IV y al heparán sulfato (*Chandler S, y cols., 1996*)(*Gronski TJ Jr, y cols., 1997*). Al ir degradando los componentes de la ECM, la MMP-12 permite la diapédesis de los macrófagos durante la inflamación y con esto, la consiguiente remodelación tisular. Cabe mencionar que los macrófagos espumosos en los bordes del centro lipídico acelular y las áreas fibrosas de las placas ateroscleróticas también expresan el gen de esta metaloelastasa (*Halpert I, y cols., 1996*)(*Rajavashisth TB, y cols., 1999*).

2.6.3. *Regulación:* Souissi y cols., mostraron que la IL-1 β , molécula que se encuentra en grandes cantidades en lesiones ateroscleróticas, aumenta la expresión de MMP-12 en macrófagos humanos derivados de monocitos. En este mismo estudio expusieron que en presencia del agonista específico GW647 del receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR- α), expresado en macrófagos, la transcripción de MMP-12 se regula a la baja a pesar de la presencia de IL-1 β (Souissi JJ, y cols., 2008).

2.6.4. *Polimorfismo de estudio:* Jormsjö S y colaboradores (2000) estudiaron un polimorfismo en la región promotora del gen de la MMP-12 en 367 pacientes a quienes se les había realizado una angiografía coronaria transluminal percutánea (PTCA) con implantación de stent. El polimorfismo en cuestión es una sustitución de adenosina (A) a guanosina (G) en la posición -82, donde el alelo A facilita la unión del factor de transcripción AP-1 y tiene, por lo tanto, una mayor actividad transcripcional *in vitro* en monocitos/macrófagos. Encontraron que el alelo A, está asociado con un menor diámetro luminal de las arterias coronarias en pacientes con diabetes y EAC (que requiere PTCA con implantación de stent) (Jormsjö S, y cols., 2000) influyendo en un pronóstico malo.

3. Estudios de asociación en otras poblaciones.

Se han realizado diversos estudios en otras poblaciones, como lo fue en la población caucásica donde se estudio en particular la MMP3 5A/6A en pacientes con >50% de estenosis arterial y presentaron un incremento en la frecuencia del genotipo 6A6A, mientras que el genotipo 5A5A incremento el riesgo de infarto al miocardio entre los pacientes que tenían >50% de estenosis (*Beyzade S, y cols., 2003*). En Japoneses con enfermedad arterial coronaria estudiaron este mismo gen de la MMP3 y el alelo 6A fue un factor de riesgo para esta enfermedad en mujeres (*Hirashiki A, y cols., 2003*). Por otro lado un estudio en Koreanos con enfermedad arterial coronaria se encontró asociado el alelo 5A y con angina inestable (*Kim JS, y cols., 2002*).

La alta actividad del alelo 5A sugiere la predisposición de los pacientes con la ruptura de placa, hay reportes donde asocian al infarto al miocardio en pacientes Chinos (*Liu PY, y cols., 2003*). En contraste en un estudio en Japoneses se encontró una asociación entre el alelo 6A y el infarto al miocardio, aunque esto fue en mujeres (*Yamada Y, y cols., 2002*). Similarmente, un reciente estudio mostró que la concentración en suero de MMP3 está influenciada por el genotipo 6A que se asocia con infarto al miocardio, particularmente entre hombres (*Samnegard A, y cols., 2005*). El alelo 5A se asocio con infarto al miocardio tanto en Taiwaneses como en Británicos fumadores. Una combinación del genotipo MMP3 y MMP9 representa un mayor riesgo para una complicación de la placa coronaria, con la combinación de la alta actividad de ambos alelos (*Pollanen PJ, y cols., 2005*). La combinación del genotipo MMP3 6A6A y el genotipo MMP1 2G2G fue un factor de riesgo independiente para la estenosis arterial (*Ghilardi G, y cols., 2002*).

4. JUSTIFICACIÓN

El infarto agudo al miocardio ocupa entre el primer y segundo lugar de las principales causas de muerte a nivel mundial. En México donde este padecimiento causa alrededor de 70 mil muertes al año y es la primera causa de mortalidad. Este padecimiento es de origen multifactorial. Las MMPs son proteínas relevantes en la patogénesis del IAM ya que se ha visto que degradan la matriz extracelular debilitando las arterias. Se ha sugerido que algunos polimorfismos ubicados en los genes que codifican las MMPs están relacionados con los niveles de expresión de estas moléculas. El estudio de estos polimorfismos puede contribuir a identificar individuos susceptibles para padecer IAM. A futuro será muy importante para definir su papel para el desarrollo de este padecimiento en nuestra población y así en un futuro permitir mejores y más dirigidos tratamientos.

5. HIPÓTESIS

Si las metaloproteasas de matriz contribuyen al debilitamiento de la placa aterosclerótica provocando una aterotrombosis y como consecuencia el infarto del miocardio, y además sus genes presentan diversos sitios polimórficos que regulan su producción, entonces algunos de sus alelos podrían diferenciar a los pacientes con infarto de los individuos control y funcionar así como marcadores de susceptibilidad o resistencia.

5. HIPÓTESIS

Si las metaloproteasas de matriz contribuyen al debilitamiento de la placa aterosclerótica provocando una aterotrombosis y como consecuencia el infarto del miocardio, y además sus genes presentan diversos sitios polimórficos que regulan su producción, entonces algunos de sus alelos podrían diferenciar a los pacientes con infarto de los individuos control y funcionar así como marcadores de susceptibilidad o resistencia.

II. OBJETIVOS

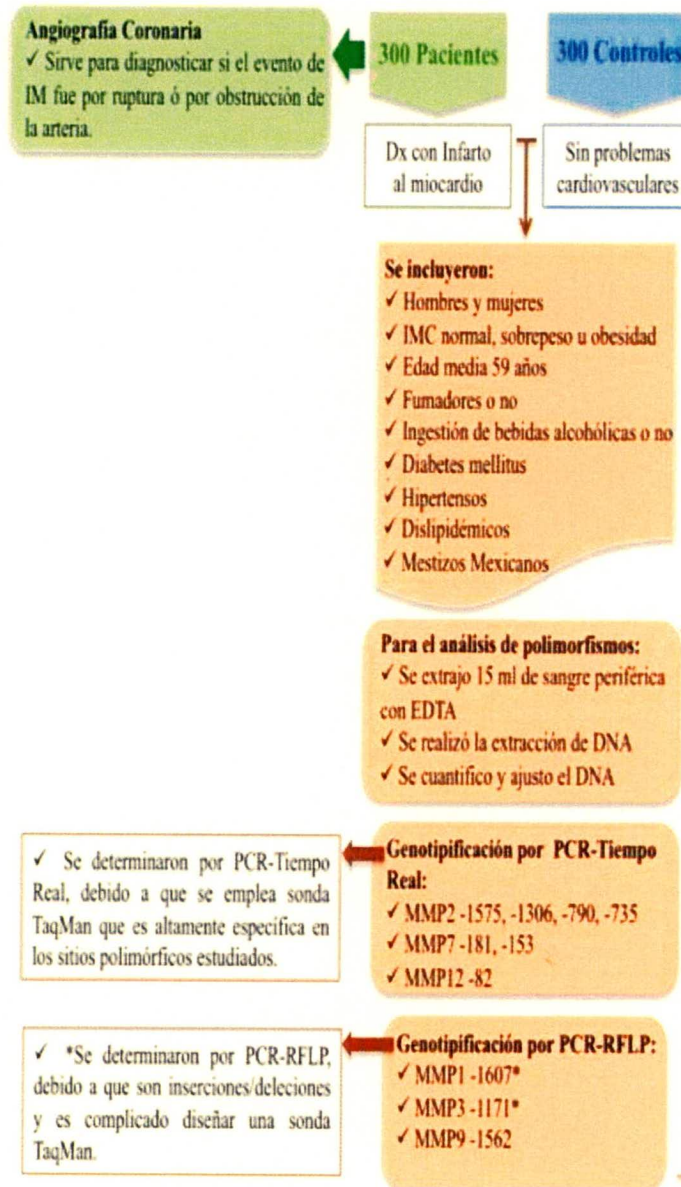
II. OBJETIVOS**II.A. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la posible asociación de algunos polimorfismos específicos en los genes de las metaloproteasas en la susceptibilidad o protección al desarrollo del infarto agudo al miocardio en la población mexicana.

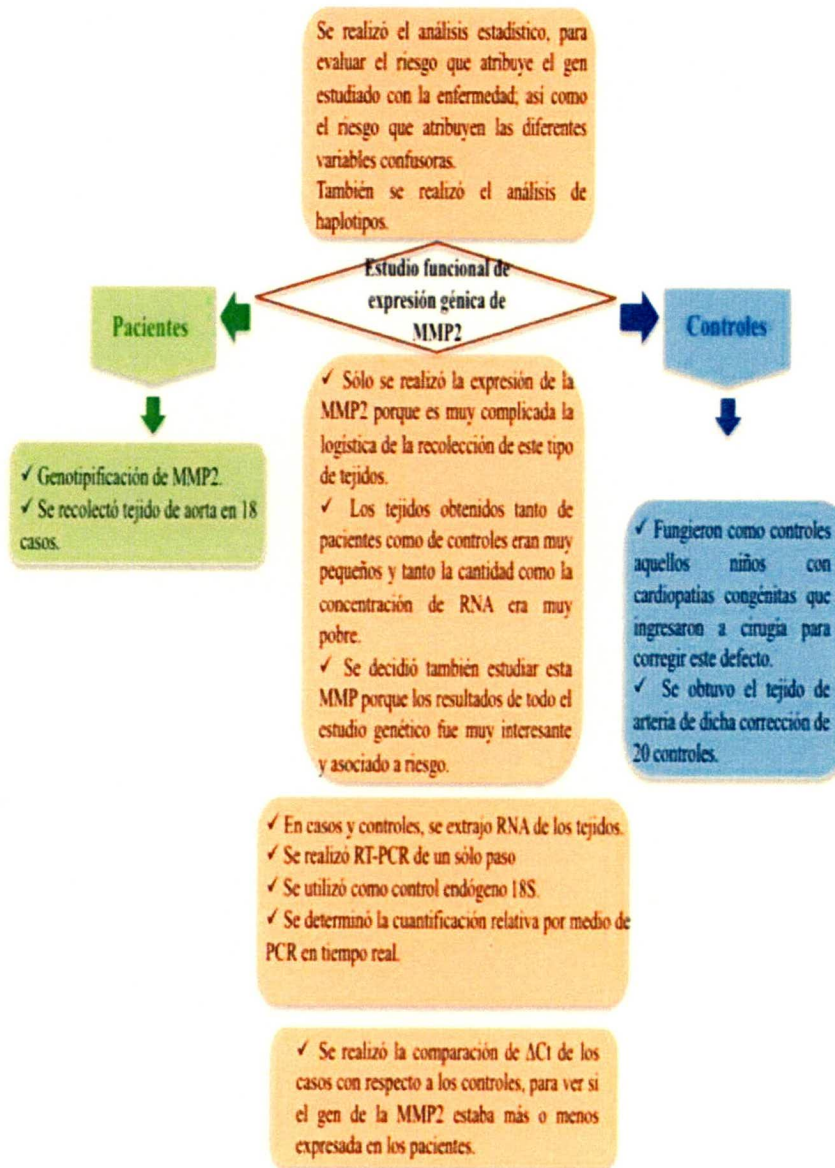
II.B. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar las frecuencias genotípicas de los sitios polimórficos en los promotores de los genes que codifican para las metaloproteasas 1, 2, 3, 7, 9 y 12 y compararlas entre los grupos de estudio. Un grupo de pacientes mexicanos con infarto al miocardio y un grupo control sin antecedentes familiares ni clínicos de infarto al miocardio, pareados por edad y sexo.
2. Obtener los haplotipos con el programa Haploview versión 4.1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, Estados Unidos).
3. Realizar el estudio de las variables confusoras con el método de regresión logística múltiple, utilizando el programa SPSS.
4. Analizar con ayuda de la clínica y de estudios de cinecoronariografía si el evento de infarto al miocardio de los pacientes fue por ruptura de la placa aterosclerótica o por obstrucción de la arteria.
5. Realizar ensayos de expresión génica en tejido arterial coronario de pacientes infartados para los genes de las MMPs que se observen asociados a IAM.

**III. ESTRATEGIA
EXPERIMENTAL**



Continuación...



IV. METODOLOGIA

IV. METODOLOGIA

1. Diseño de estudio

- Tipo de estudio:
Estudio de casos y controles.
Estudio prospectivo, observacional, transversal, comparativo y analítico.

2. Sujetos de estudio

El estudio incluyó 300 pacientes mestizo Mexicanos con infarto al miocardio que ingresaron al Departamento de Urgencias y Unidad Coronaria del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez con diagnóstico de infarto del miocardio. El tamaño de muestra fue calculado con el programa QUANTO software (<http://hydra.usc.edu/GxE/>). 251 hombres y 49 mujeres, en un promedio de edad de 59.01 ± 11.21 años. El infarto al miocardio se definió por los síntomas de angina con elevación del segmento ST de 1 mm o más (o el desarrollo de una nueva onda Q) en dos o más electrocardiogramas continuos y/o superar los límites de creatinina fosfoquinasa en suero (CPK) isoenzima MB (valores normales = 0.6-6.3 ng/mL) en al menos una sola muestra.

También se incluyó un grupo control de 300 individuos sanos no relacionados entre sí (139 hombres y 161 mujeres, con un promedio de edad de 59.66 ± 5.91 años) sin síntomas o diagnóstico previo de problemas cardiovasculares y enfermedad sistémica. El score de calcio fue determinado por tomografía multi-detector computalizada en todos los individuos control para detectar aterosclerosis subclínica. En estos individuos el valor del score de calcio fue de cero.

2.1. Puntaje de calcio y valor pronóstico

Si bien la presencia de calcio en las arterias coronarias es patognómico de la enfermedad aterosclerosa, en muchos de los casos la presencia de una lesión no se traduce en estenosis significativa. En cambio se ha observado una relación directa entre el grado de calcificación de las arterias y la aparición de eventos cardiovasculares en un futuro. En un estudio realizado en individuos asintomáticos se observó una tasa de eventos anualizados de 0.1% /año con puntaje de calcio de 0, de 2.1%/año en sujetos con puntaje de 1 a 99, y de 4.1 y 4.8%/año con puntaje de 100 a 400 y > 400, respectivamente, para eventos coronarios agudos. Esta relación se ha observado en forma consistente en múltiples ensayos que han valorado diferentes grupos etarios y étnicos en diferentes escenarios clínicos, como se recopiló en el cosenso de expertos de la ACC/AHA para la evaluación de calcio coronario. También se ha demostrado su valor

pronóstico agregado a distintas escalas de riesgo tardicionales como la Framingham, en la cual reclasifica el riesgo intermedio de dicha escala hacia un mayor o menor riesgo según el puntaje de calcio.

No sólo el puntaje de calcio es factor pronóstico, de igual manera el grado de estenosis de las lesiones coronarias por angiotomografía de coronarias se ha asociado con la aparición de eventos cardiovasculares.

El papel que juega hoy en día el puntaje de calcio se centra en dos áreas principales: 1) conocer el riesgo de eventos cardiovasculares en pacientes asintomáticos con el fin de implementar terapias de reducción de riesgo en pacientes sintomáticos que puedan necesitar estudios adicionales o procedimientos invasivos (*Marco Antonio Martínez Ríos, y cols., 2012*).

2.2. Criterios de Inclusión:

1. Hombres y mujeres.
2. Pacientes con diagnóstico de infarto al miocardio.
3. Se incluyeron tanto a pacientes como a controles con:
 - a. Índice de masa corporal normal o sobrepeso, calculado por peso/talla²
 - b. Edad media de 59 años
 - c. Fumadores
 - d. Ingestión de bebidas alcohólicas
 - e. Diabetes mellitus tipo 2
 - f. Hipertensos
 - g. Dislipidémicos
 - h. Mestizos Mexicanos
4. Se incluyeron pacientes con angiografía coronaria.
5. Se incluyeron controles con score de calcio.

2.3. Criterios de exclusión:

1. Parentesco entre todos los individuos.
2. Dolor torácico que nos sea por diagnóstico de infarto al miocardio.
3. Pacientes con enfermedades cerebro vasculares.
4. Retinopatía diabética hemorrágica.

2.4. *Requerimiento adicional para ambos grupos (pacientes y controles):*

- A todos los individuos se les invitó a participar en el presente estudio y se obtuvo un consentimiento informado voluntario.
- El estudio fue de riesgo mínimo ya que solo incluyó la venopunción antecubital para la obtención de 15 ml de sangre periférica.
- El presente proyecto cumplió los requisitos del comité institucional de ética e investigación de nuestro Instituto.

3. Estudio genético

3.1. Extracción de DNA

Se tomaron 15 ml de sangre periférica de cada individuo (casos y controles) en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. A partir de esta muestra se extrajo el DNA genómico por medio de un método no enzimático (*Debomoy K y cols 1991*).

3.1.1. Cuantificación de DNA

La cuantificación del DNA se realizó con el equipo automatizado nanoDrop (ND-1000 spectrophotometer), la longitud de onda con la que se leerá el DNA es de 280 nm. El DNA se ajusto a 100 ng/μl para las determinaciones por RFLPs y para las determinaciones por sondas TaqMan, se ajusto a 10 ng/μl.

3.2. PCR en tiempo real

A partir de DNA genómico, se estudiaron los siguientes sitios polimórficos utilizando sondas Taqman sintetizadas por la compañía Applied Biosystem y se empleó la aplicación de discriminación alélica:

- Metaloproteasa 2: - 1306, -1575, -790, -735
- Metaloproteasa 7: -181, -153
- Metaloproteasa 12: -82

3.3. PCR – RFLPs

A partir de DNA genómico, se estudiaron los siguientes sitios polimórficos. Se usaron primers específicos para cada una de las posiciones (ver anexo).

- Metaloproteasa 1: -1607
- Metaloproteasa 3: -1612
- Metaloproteasa 9: -1562

3.4. Extracción de RNA de tejidos de pacientes

- Se recolectaron 18 tejidos de pacientes con IM.
- A partir de tejido de arteria aorta que se obtuvo de los pacientes sometidos a cirugía, se extrajo el RNA por medio del kit de extracción PureLink micro-to-midi Total RNA Purification System (Invitrogen).

3.5. Extracción de RNA de tejidos de controles

- Se recolectaron 20 tejidos de arteria que se desechaban en la cirugía de corrección de pacientes con cardiopatías congénitas.
- Estos tejidos se recolectaron con el fin de utilizarlas como controles.
- Las cardiopatías que se corrigieron en estos niños son diversas, tales como: cardiopatía interventricular, cardiopatía intraauricular, tetralogía de Falot, origen anómalo de la arteria, etc.
- Se extrajo el RNA por medio del kit de extracción PureLink micro-to-midi Total RNA Purification System (Invitrogen).

3.6. Expresión génica de MMP2

- A partir del RNA de tejido de aorta y del tejido de controles, se realizó la RT-PCR de un sólo paso con la MasterAmp High Fidelity RT-PCR Kit (Epicentre Biotechnologies).
- Se utilizó como control el gen endógeno 18S.
- Después se determinó la cuantificación relativa para la expresión génica por medio de PCR en tiempo real (7900 Applied Biosystems).

4. Cinecoronariografía

Se introdujo un cateter especial a las arterias coronarias para inyectar medio de contraste dentro de ellas; de esta forma podemos ver el interior de las arterias y saber si presentan algún grado de obstrucción. Dicho estudio se realizó en todos los pacientes con IM.

5. Análisis estadístico

- Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos que fueron analizadas se obtuvieron por conteo directo. En cada grupo de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de chi-cuadrada (X^2). Las diferencias entre grupos se determinaron usando la prueba de X^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, USA). Cuando el número comparado en alguna celda fue menor a 5, se utilizó la prueba Exacta de Fisher. El valor de p fue corregido (pC) multiplicando su valor por el número de comparaciones realizadas en cada locus, con nivel de significancia establecido como $pC < 0.05$. El riesgo relativo con intervalo de confianza del 95% (IC) fue evaluado como razón de momios (RM) utilizando el método de Woolf.
- La hipótesis de herencia fue probada de acuerdo a cuatro modelos: co-dominante, dominante, recesivo y heterocigoto.
- El análisis de regresión logística se usó el bi-variable para estimar el riesgo de infarto al miocardio entre pacientes y controles contra los polimorfismos de las MMPs.
- El análisis de regresión logística múltiple fue realizado para determinar la relación entre los factores de riesgo, el genotipo y el infarto al miocardio.
- Las variables con una significancia de menos de 0.10 en el análisis univariado fueron incluidas en el modelo de regresión logística múltiple.
- Los cálculos estadísticos fueron realizados usando el software SPSS, versión 15.
- Se obtuvieron los haplotipos con el programa Haploview versión 4.1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, Estados Unidos). En dicho programa se ingresan los diplotipos obtenidos de cada polimorfismo de los individuos con infarto al miocardio y de los individuos controles. Haploview v4.1 realiza varias mediciones de desequilibrio de ligamiento (DL) que utiliza para crear una representación gráfica, también conocida como mapa de haplotipos. El DL hace referencia a una situación en que una combinación particular de alelos en dos loci próximos segregan ligados más frecuentemente que lo esperado, dada la frecuencia de cada alelo (*Sudbery P., 2004*). Al seleccionar los grupos de marcadores (polimorfismos) el programa genera posibles haplotipos y su frecuencia en la población de estudio (*Barrett JC., 2005*).

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

1. Polimorfismos estudiados de la MMP-1, 2, 3, 7, 9 y 12.

En la tabla número 3 se muestran todos los SNPs estudiados en los genes de las MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9 y MMP12 así como la referencia del SNP, la posición del cromosoma, la región que fue estudiada (todos región promotora de cada uno de los genes) y se muestra el cambio de base de cada uno de los polimorfismos.

Tabla 3. Polimorfismos estudiados en la MMP1, 2, 3, 7, 9 y 12.

SNP	Referencia del SNP	Posición Ch (pb)	Región	Alelo Menor/mayor
MMP1 -1607	1799750	102670496	Promotor	1G/2G
MMP2 -1575	rs243866	54069038	promotor	A/G
MMP2 -1306	rs243865	54069307	promotor	C/T
MMP2 -790	rs243864	54069823	promotor	G/T
MMP2 -735	rs2285053	54069878	promotor	C/T
MMP3 -1612	rs3025058	102715948	Promotor	5A/6A
MMP7-153	rs11568819	102401633	promotor	T/C
MMP7 -181	rs11568818	102401661	promotor	G/A
MMP9 -1562	rs3018242	44635976	Promotor	T/C
MMP12 -82	rs2276109	102745791	promotor	G/A

1.1. Características de las muestras de estudio

Las características clínicas y demográficas que se presentan en la tabla número 4. Donde se observó que la distribución de edad entre los pacientes y los individuos control fue similar. En cuanto a sexo, el género masculino prevaleció en los pacientes más que en los controles ($p < 0.05$). El índice de masa corporal fue similar en ambos grupos de pacientes y controles ($p < 0.05$). Los fumadores fueron 75% más frecuentes en los pacientes, que en los controles ($p < 0.05$). El alcoholismo tiende a prevalecer más en los controles con un 54.6% que en los pacientes con un 46.3% aunque no fue estadísticamente significativo. La Diabetes mellitus tipo 2 fue más frecuente en los pacientes con el 46.3% (< 0.05). La frecuencia de la hipertensión arterial fue del 78.6% en los pacientes ($p < 0.05$). La frecuencia de dislipidemia fue de 72.6% en los pacientes y del 68.6% en los controles, no fue estadísticamente significativa.

En el grupo de pacientes el 34.4% tenían un vaso dañado y el 65.7% dos o tres vasos dañados. Por otro lado, el 6.6% de los pacientes tuvieron calcificación coronaria.

Tabla 4. Distribución de factores de riesgo cardiovascular en pacientes con infarto al miocardio y sujetos control.

Variable	Pacientes (n= 287)	Controles (n= 299)	Valor de <i>P</i>
Edad	59.01 ± 11.21	59.66 ± 5.91	0.380
Sexo (M/F)	251 / 49	139 / 161	<0.001*
IMC (kg/m ²)	27.17 ± 4.09	28.29 ± 4.18	0.002*
Hábito tábico			
Fumador	225 (75%)	48 (25%)	<0.001*
No fumador	75 (25%)	252 (75%)	
Ingesta de alcohol			
Nunca ingirió	161 (53.6%)	136 (45.3%)	0.054
>= 6g/día	139 (46.3%)	164 (54.6%)	
Diabetes mellitus			
Sí	139 (46.3%)	41 (13.6)	<0.001*
No	161 (53.6%)	259 (86.3%)	
Hipertensión			
Sí	236 (78.6%)	166 (55.3%)	<0.001*
No	64 (21.3%)	134 (44.6%)	
Dislipidemia			
Sí	218 (72.6%)	206 (68.6%)	0.325
No	82 (27.3%)	94 (31.3%)	
Angiografía coronaria			
Un-vaso	103 (34.3%)		
Dos-o-tres vasos	197 (65.7%)		
Calcificaciones coronarias			
	20 (6.6%)		

Las variables fueron expresadas como la media ± desviación estándar (SD). IMC= índice de masa corporal, M/F= masculino/femenino. * Valor de *P* <0.05

1.2. Frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias observadas y esperadas de todos los sitios polimórficos estuvieron en equilibrio de Hardy Weinberg. Se observó una distribución similar de los polimorfismos MMP2-1306 (rs243865), MMP2-790 (rs243864), MMP2-735 (rs2285053), MMP3 -1612 5A/6A (rs 3025058), MMP7-153 (rs11568819), MMP7-181 (rs11568818) y MMP12-82 (rs2276109) en ambos grupos de estudio (Tabla 5); sin embargo, una distribución diferente de los polimorfismos MMP2-1575 (rs243866), MMP1 -1607 1G/2G (rs 1799750) y MMP9 -1562 C/T (rs 3018242) se observaron en pacientes y controles sanos. Los pacientes mostraron un incremento en la frecuencia de MMP2-1575 alelo A y genotipo AA cuando fue comparado contra los controles (pC= 0.001; RM= 1.58; 95% IC= 1.21-2.07 y pC= 0.036; RM= 2.37; 95% IC= 1.13-5.07, respectivamente), al igual que la frecuencia de MMP1 -1607 alelo 1G y genotipo 1G1G cuando fue comparado contra los controles (pC= 0.004; RM= 1.93; 95% IC= 1.23-3.02 y pC= 0.05; RM= 4.89; 95% IC= 0.34-0.90, respectivamente); y para la MMP9 -1562 el alelo C estuvo incrementado en los controles al comparar con los pacientes, contrario al alelo T que estuvo incrementado en los pacientes al comparar con los controles, en ambos casos hubo diferencias estadísticamente significativas (pC= 0.02; RM= 0.43; 95% IC= 0.21-0.87 y pC= 0.02; RM= 2.32; 95% IC= 1.15-4.73, respectivamente). El genotipo CC se mostró incrementado en los controles y el genotipo CT se mostró incrementado en los pacientes. (pC= 0.02; RM= 0.42; 95% IC= 0.20-0.86 y pC= 0.02; RM= 2.40; 95% IC= 1.17-4.97, respectivamente) (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia de alelos y genotipos de MMP-1, 2, 3, 7, 9 y 12.

SNP	Casos (n (%))	Controles (n (%))	RM	95% IC	pC
MMP1 -1607 1G/2G (rs 1799750)	(n= 236)	(n=285)			
Alelos 1G 2G	38 (8) 434 (92)	40 (7) 530 (93)			NS
Genotipos 1G1G 2G2G 1G2G	2 (1) 200 (85) 34 (14)	1 (0.35) 246 (86) 38 (13)			NS
MMP2-1575 A/G (rs243866)	(n= 300)	(n= 300)			
Alelos A G	180 (30) 420 (70)	128 (21.3) 472 (78.7)	1.58 0.63	1.21-2.07 0.48-0.83	0.001* 0.001*
Genotipos AA AG GG	27 (9) 126 (42) 147 (49)	12 (4) 104 (34.7) 184 (61.3)	2.37	1.13-5.07	0.036*
MMP2-1306 C/T (rs243865)	(n= 300)	(n= 300)			
Alelos C T	467 (77.8) 133 (22.2)	477 (79.5) 123 (20.5)			NS
Genotipos CC CT TT	181 (60.3) 105 (35) 14 (4.7)	192 (64) 93 (31) 15 (5)			NS
MMP2-790 G/T (rs243864)	(n= 300)	(n= 300)			
Alelos G T	131 (21.8) 469 (78.2)	116 (19.3) 484 (80.7)			NS
Genotipos GG GT TT	14 (4.7) 103 (34.3) 183 (61)	12 (4) 92 (30.7) 196 (65.3)			NS
MMP2-735 C/T (rs2285053)	(n= 300)	(n= 300)			
Alelos C T	465 (77.5) 135 (22.5)	471 (78.5) 129 (21.5)			NS
Genotipos CC CT TT	184 (61.4) 97 (32.3) 19 (6.3)	187 (62.4) 97 (32.3) 16 (5.3)			NS
MMP3 -1612 5A/6A (rs 3025058)	(n=236)	(n=285)			
Alelos 5A 6A	139 (29) 333 (71)	167 (29) 403 (71)			NS
Genotipos 5A5A 6A6A 5A6A	17 (7) 114 (48) 105 (45)	23 (8) 141 (49) 121 (43)			NS

Continuación de Tabla 5. Frecuencia de alelos y genotipos de MMP-1, 2, 3, 7, 9 y 12.

SNP		Casos (n(%))	Controles (n(%))	RM	95% IC	pC
MMP7-153 C/T (rs11568819)		(n= 300)	(n= 300)			
Alelos	C	580 (96.6)	576 (96)			NS
	T	20 (3.3)	24 (4)			
Genotipos	CC	281 (93.6)	276 (92)			NS
	CT	18 (6)	24 (8)			
	TT	1 (0.3)	0			
MMP7-181 G/A (rs11568818)		(n= 300)	(n= 300)			
Alelos	G	191 (31.8)	180 (30)			NS
	A	409 (68.2)	420 (70)			
Genotipos	GG	30 (10)	27 (9)			NS
	GA	139 (46.3)	147 (49)			
	AA	131 (43.6)	126 (42)			
MMP9 -1562 C/T (rs 3018242)		(n=236)	(n=285)			
Alelos	C	446 (95)	556 (98)	0.43	0.21 – 0.87	0.02*
	T	26 (5)	14 (2)	2.32	1.15 – 4.73	0.02*
Genotipos	CC	210 (1)	271 (95)	0.42	0.20 – 0.86	0.02*
	TT	0	0	0		
	CT	26 (89)	14 (5)	2.40	1.17-4.97	0.02*
MMP12-82 G/A (rs rs2276109)		(n= 300)	(n= 300)			
Alelos	G	27 (4.5)	31 (5.2)			NS
	A	573 (95.5)	569 (94.8)			
Genotipos	GG	1 (0.3)	1 (0.3)			NS
	GA	25 (8.3)	29 (9.6)			
	AA	274 (91.3)	270 (90)			

RM; Razón de Momios, IC; Intervalo de confianza, pC; p corregida, NS; no significativo, * Valor de $P < 0.05$

1.3. Modelos de herencia y variables de riesgo

La hipótesis de herencia para el polimorfismo MMP2-1575 (rs243866) fue probada de acuerdo a cuatro modelos: co-dominante, dominante, recesivo y heterocigoto (Tabla 6). De acuerdo al modelo dominante, los individuos con el genotipo AG+AA tuvieron un riesgo de 1.65 veces más para desarrollar la enfermedad ($p= 0.002$). El modelo dominante fue seleccionado en este estudio basándose en los criterios de información de Akaike (AIC). Con respecto al análisis de interacciones entre el modelo dominante y las co-variables, después de ajustar para conocer los factores de riesgo, se encontró una distribución significativa de género, IMC, tabaquismo, diabetes mellitus e hipertensión para el modelo de herencia. En este análisis los individuos con el genotipo -1575 AA tuvieron un riesgo de 4.23 veces más para desarrollar infarto al miocardio ($p= 0.003$) (Tabla 7). Cuando se analizó la correlación entre el polimorfismo y las diferentes variables clínicas, una asociación entre el polimorfismo MMP12- 82 y el grado de enfermedad arterial coronaria fue observado. Los pacientes con el genotipo MMP12- 82 AG+GG tuvieron un riesgo de 3.72 veces más de tener una significativa oclusión en dos o tres vasos ($p=0.041$) (Tabla 8).

Tabla 6. Modelo de herencia de MMP2-1575.

Modelos de herencia	Genotipo	RM	95% IC	Valor de <i>P</i>
Co-dominante	<i>GG</i>	1.0		
	<i>AG</i>	1.516	1.081-2.127	NS
	<i>AA</i>	2.816	1.379-5.751	NS
Recesivo	<i>AA</i> vs	1.0		
	<i>AG+GG</i>	0.421	0.209-0.848	NS
Dominante	<i>GG</i> vs	1.0		
	<i>AG+AA</i>	1.651	1.194-2.284	0.002*
Hetero adv.	<i>AG</i> vs	1.0		
	<i>GG+AA</i>	0.733	0.527-1.020	NS

RM; Razón de momios, IC; Intervalo de confianza, * Valor de $P < 0.05$

Tabla 7. Correlación entre el polimorfismo de MMP2 -1575 y variables de riesgo.

Variable	RM	95% IC	Valor de P
Genotipos:			
GG	1		
AG	1.196	0.730-1.959	0.477
AA	4.228	1.617-11.054	0.003*
Género	6.039	4.114-8.863	<0.001*
IMC (Kg/m2)	0.934	0.894-0.976	0.002*
Hábito tábico	15.652	10.316-23.749	<0.001*
Diabetes mellitus	5.479	3.3615-8.303	<0.001*
Hipertensión	2.991	2.046-4.372	<0.001*

RM; Razón de momios, IC; Intervalo de confianza, * Valor de $P < 0.05$
Se realizó un modelo de regresión logística.

Table 8. Modelo de herencia del polimorfismo MMP12 -82 en los pacientes con angiografía coronaria.

Modelo de herencia	Genotipo	RM	95% IC	Valor de P
Co-dominante	AA	1.0		
	AG	3.50	0.998-12.378	NS
	GG	1×10^9	0.000-	NS
Recesivo	GG vs	1.0		
	AG+AA	1×10^{-9}	0.000-	NS
Dominante	AA vs	1.0		
	AG+GG	3.72	1.058-13.078	0.041*
Hetero adv	AG vs	1.0		
	AA+GG	0.288	0.081-1.017	NS

RM; Razón de momios, IC; Intervalo de confianza, * Valor de $P < 0.05$

1.4. Haplotipos

Los polimorfismos de la MMP2 (rs243866, rs243865, rs243864 y rs22850553) estuvieron en desequilibrio de ligamiento. El análisis del desequilibrio de ligamiento presentó tres de las siete posibles combinaciones (ACTC, ACTT y ATTC) con importantes diferencias entre los grupos de estudio. Los pacientes con infarto al miocardio incrementaron las frecuencias de los haplotipos “ACTC” y “ACTT” cuando se compararon con los controles sanos ($p= 0.0007$; $RM= 2.88$, $95\% IC= 1.46-5.79$ y $p= 0.002$, $RM= 5.45$, $95\% IC= 1.49-23.63$ respectivamente). Por otro lado, el haplotipo “ATTC” presentó una disminución en la frecuencia en pacientes con infarto al miocardio cuando fueron comparados con los controles sanos ($p= 0.019$, $RM= 0.25$, $95\% IC= 0.05-0.94$) (Tabla 9).

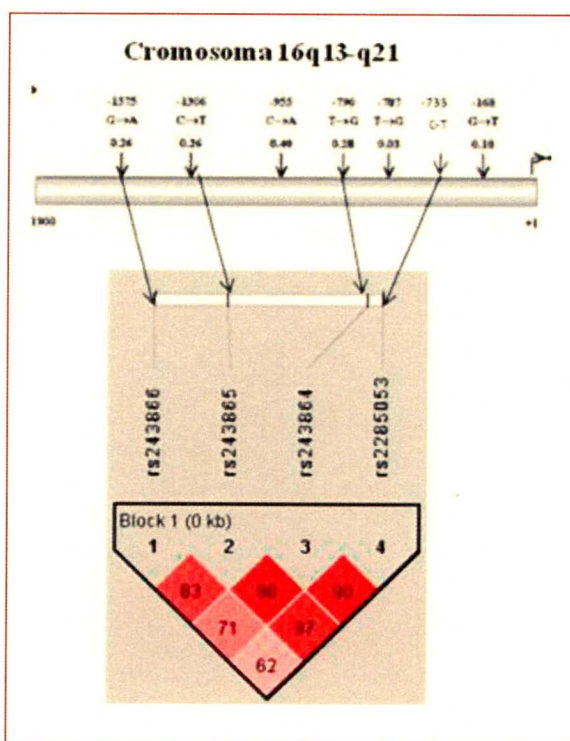


Figura 13. Mapa de haplotipos de MMP2.

El Mapa de haplotipos del gen MMP-2 representa el grupo de pacientes infartados comparado con el grupo de individuos control. Los cuadros de colores dentro del mapa de haplotipos representa las relaciones de desequilibrio de ligamiento en donde, los cuadros color rojo brillante representan una clara evidencia de DL, los cuadros color rojo claro o rosa indican una leve evidencia de DL y los cuadros color

blanco significan que no existe DL. El mapa de haplotipos es una representación gráfica de varias mediciones de desequilibrio de ligamiento (DL). Se observan cuatro diplotipos formados por los polimorfismos: 1 (rs243866), 2 (rs243865), 3 (rs243864) y 4 (2285053), lo que indica que existe una clara evidencia de DL entre los diplotipos 1, 3, 4. En cuanto al diplotipo 2 el DL es poco menor (figura 13).

Los polimorfismos de la MMP7 (rs11568819, rs11568818) y la MMP12 (rs2276109) no estuvieron en desequilibrio de ligamiento. El análisis del desequilibrio de ligamiento no presentó alguna combinación con diferencias importantes entre los grupos de estudio (Tabla 10).

Table 9. Haplotipos del gen MMP2 en pacientes con IM y controles sanos.

Haplotipos (rs243866, 243865, 243864, 2285053)		IM	Controles	RM (95% IC)	Valor de P
<i>GCTC</i>		0.489	0.545		
<i>GCTT</i>		0.192	0.203		
<i>ATGC</i>		0.204	0.166		
<i>ACTC</i>		0.060	0.021	2.88 (1.46-5.79)	0.0007*
<i>ACTT</i>		0.027	0.005	5.45 (1.49-23.63)	0.002*
<i>GCGC</i>		0.009	0.020		
<i>ATTC</i>		0.005	0.020	0.25 (0.05-0.94)	0.019*

IM: Infarto al miocardio, RM: Razón de momios, IC: Intervalo de confianza, * Valor de $P < 0.05$

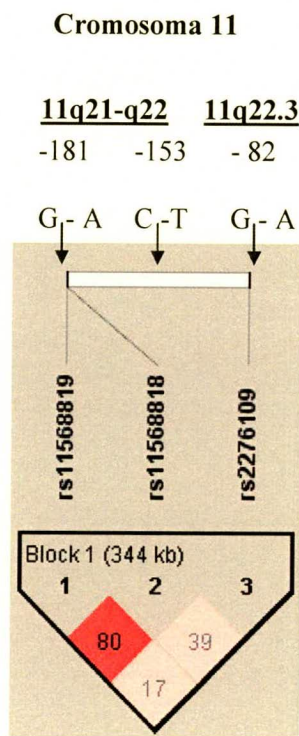


Figura 14. Mapa de haplotipos MMP7 y MMP12.

Al hacer los haplotipos con los tres diplotipos de los genes MMP-7 y MMP12 se forman cinco diferentes combinaciones. Tres de estas combinaciones (CAA, CGA y TGA) sus frecuencias son similares al comparar los pacientes con el grupo control. En cuanto a las otras dos combinaciones, los resultados no fueron estadísticamente significativos. Las combinaciones CGG y CAG se encontraron con una frecuencia menor en los infartados al compararse con el grupo control, estos resultados nos pueden dar un indicio de que estos bloques podrían conferir cierta protección al padecimiento (figura 14).

Table 10. Haplotipos de MMP7 y MMP12 en pacientes con IM y controles sanos.

Haplotipos (rs11568819, rs11568818, rs2276109)	IM	Controles	RM (95% IC)	Valor de <i>P</i>
<i>CAA</i>	0.677	0.655		NS
<i>CGA</i>	0.245	0.270		"
<i>TGA</i>	0.022	0.075		"
<i>CGG</i>	0.023	0.599		"
<i>CAG</i>	0.019	0.102		"

IM: Infarto al miocardio, RM: Razón de momios, IC: Intervalo de confianza, NS: No significativo, * Valor de $P < 0.05$

2. Cinecoronariografías

Con la ayuda de los médicos cardiólogos, se revisaron las cinecoronariografías de los 300 pacientes con infarto al miocardio, donde se pudo apreciar que el evento de todos estos pacientes fue debido a la ruptura de la placa de aterosclerosis con exposición de trombo (figura 15).

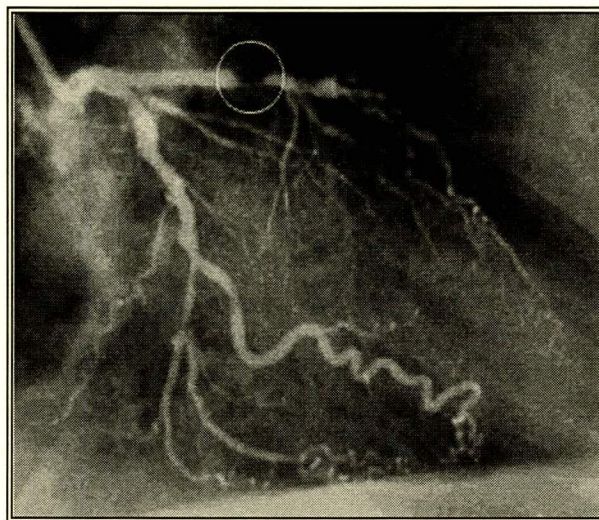


Figura 15. Cinecoronariografía de un paciente infartado.

3. Expresión de MMP2 en arterias coronarias de pacientes con infarto al miocardio

Se realizaron las frecuencias alélicas y génicas de los polimorfismos de la MMP2 en 18 pacientes con infarto al miocardio que fueron sometidos a cirugía y que de ahí se obtuvo el tejido de arteria coronaria para realizar la expresión. Se puede observar que la expresión del gen de la MMP2 estuvo incrementada en los pacientes al compararlos con los individuos control, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas (tabla 11).

4. Cuantificación relativa para expresión génica de la MMP2 usando PCR en tiempo real.

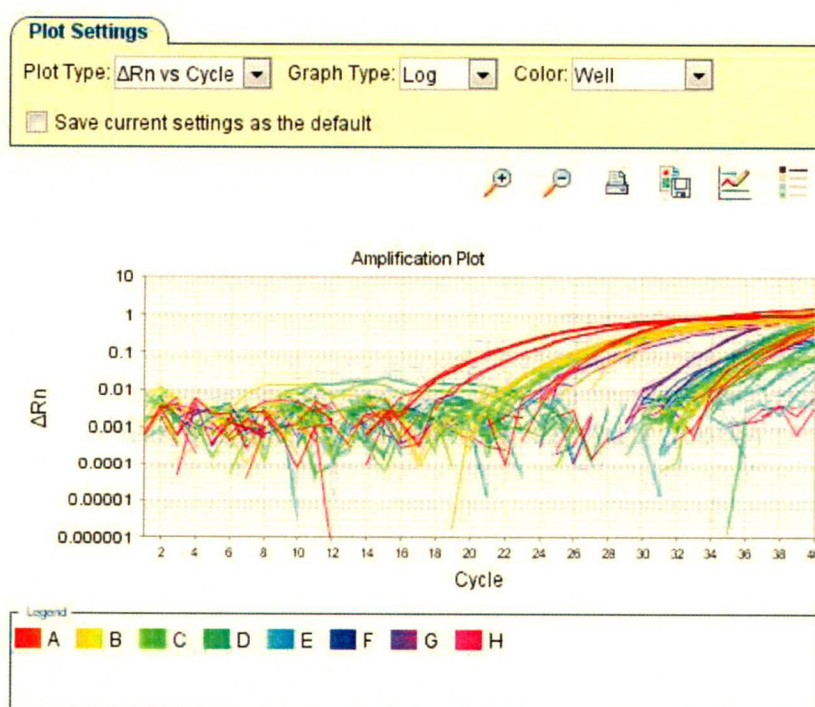
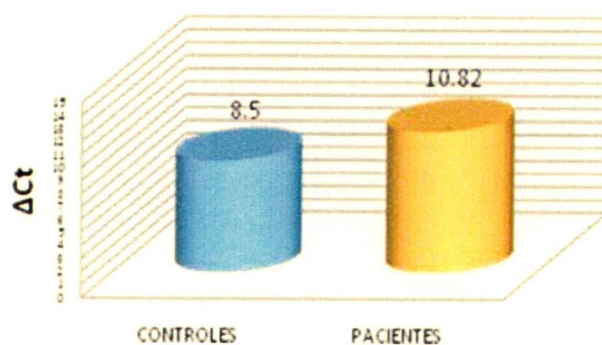


Figura 16. Plot de amplificación del gen MMP2 en pacientes (IM) y controles (niños).

Tabla 11. Método de Ct comparativo entre pacientes infartados y controles niños.

Muestra	MMP2 Promedio Ct	18S Promedio Ct	Δ Ct MMP2 18S	$\Delta\Delta$ Ct Δ Ct Pacientes - Δ Ct Control	Veces de diferencia en MMP2 relativa a los controles	Valor de P
Controles niños	31.877	23.373	8.504	0.00	1	NS
Pacientes Infartados	35.28	24.46	10.82	2.316	4.97	NS

**Gráfica 3.** Expresión del gen de la MMP2 en muestras de pacientes y controles.

Al comparar los Δ Ct de la muestra experimental (pacientes infartados) con respecto a la muestra control (niños control) la expresión del gen de la MMP2 en los controles fue de 8.5 y en los pacientes fue de 10.32. Lo que quiere decir que el gen de la MMP2 en los pacientes está sobreexpresado 2.3 veces más, en comparación con los controles (tabla 16) (Gráfica 3). De todas las metaloproteasas estudiadas solamente se realizó la expresión para el gen de la MMP2.

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

La actividad de las MMPs puede contribuir a la patogénesis de la aterosclerosis, facilitando la migración de las células de músculo liso vascular a través de la lámina elástica interna dentro del espacio intimal, donde proliferan y contribuyen a la formación de la placa. (Mtaïrag el M, y cols., 2002)(Davies MJ, 1985). Algunos estudios de asociación amplios del genoma (GWAS) se han realizado en enfermedad cardiovascular; sin embargo los genes de las MMPs no se han reportado que se asocian con estas enfermedades en este tipo de estudios. (Ndiaye NC, y cols., 2011)(Preuss M, y cols., 2010). Considerando que la mayoría de los GWAS se han realizado en poblaciones Caucásicas y Europeas, estos resultados no necesariamente nos proveen información acerca de la población Mexicana; por ejemplo, los Europeos están muy relacionados (Rosenberg NA, y cols., 2010) y su genoma ha sufrido menos eventos de recombinación que los Mexicanos. Los estudios genéticos de los Mexicanos, en el modelo dihíbrido presentan una proporción del 56% y 44% de genes indios y blancos respectivamente, mientras que en el modelo trihíbrido presentan una proporción de 3%, 56% y 41% de genes negros, indios y blancos respectivamente (Lisker R, y cols., 1988)(Lisker R, y cols., 1996). Por otro lado, los estudios de genes candidatos de los SNPs de las MMPs aparentan ser factores de riesgo para la aterosclerosis en la enfermedad arterial coronaria (Pöllänen PJ, y cols., 2001)(Abilleira S, y cols., 2006). De los siete polimorfismos que se estudiaron de los genes de las MMPs en pacientes Mexicanos con infarto al miocardio; en sólo uno de estos polimorfismos (MMP2 -1575 A/G (rs243866) tuvo una distribución diferente cuando se compararon los pacientes con los individuos control. La frecuencia incrementada del alelo A y del genotipo AA de este polimorfismo apoya el rol de un marcador de susceptibilidad genética para el infarto al miocardio en nuestra población. Se ha reportado que los niveles de MMP2 en plasma están incrementados en enfermedades cardiovasculares (Hojo Y, y cols., 2001)(Kai H, y cols., 1998) y en las placas de aterosclerosis de las arterias coronarias. En estudios previos, Harendza y cols., (Harendza S, y cols., 2003) determinaron la distribución del SNP dentro de 1665 pb de la región 5' del gen de la MMP2. Ellos detectaron un cambio de G/A en -1575 pb en 5' al sitio de unión del receptor de estrógenos. En las células receptor de estrógenos positivas MCF-7, el alelo -1575G funciona como un potenciador, mientras que el alelo -1575A presenta una reducción en la actividad transcripcional. Price y colaboradores (Price SJ, y cols., 2001) reportaron que el polimorfismo -1575 no fue funcional cuando se probó con otras células de estrógenos receptor-negativo, incluyendo células HEK93 (riñón embriónico), células RAW264.7 (macrófagos) y células A10 (epitelio tubular). Esto sugiere que el efecto funcional del polimorfismo -1575 varía dependiendo el tipo celular. Por otro lado, varios grupos han intentado definir

los elementos de regulación transcripcional que provee la célula o tejido específico de la síntesis de MMP2. La unión de sitios para factores de transcripción AP-2, Sp1, Sp3 y RE-1 se han reportado en el promotor del gen de la MMP2 (*Harendza S, y cols., 2003*)(*Quin H, y cols., 1999*). Esto sugiere que la variante -1575A puede estar en desequilibrio de ligamiento con otras regiones localizadas en el promotor de este gen que afectan su regulación transcripcional y finalmente el nivel de esta proteína. Por otro lado, es importante considerar que la actividad de la MMP2 es influenciada no sólo por el nivel de expresión de la MMP sino también por los activadores de MMP y sus inhibidores. El papel del polimorfismo de -1575 G/A como un marcador de susceptibilidad para varias enfermedades es controversial, con resultados positivos y negativos en la literatura internacional. Una asociación fue observada en cáncer colorrectal (*XuE, y cols., 2007*) y falla cardíaca sistólica, (*HuaY, y cols., 2009*) mientras que fue asociada en periodontitis, (*Holla LI, y cols., 2005*) retinopatía diabética, (*Beránek M, y cols., 2008*) psoriasis (*Vasku V, y cols., 2009*) y enfermedad coronaria triple vascular (*Vasku V, y cols., 2004*). Actualmente no hay estudios reportados de correlación entre el polimorfismo de la MMP2- 1575 A/G y marcadores inflamatorios. Este punto debería ser considerado en un futuro para establecer el papel funcional de este polimorfismo y su posible efecto de la fisiopatogénesis en la aterosclerosis. Recientemente, Alp y colaboradores (2011) investigaron la relación entre los genotipos de los haplotipos de -1575 G/A, -1306 C/T, -790 T/G y -735 C/T de los polimorfismos del gen de la MMP2 con una historia de enfermedad arterial coronaria con o sin infarto al miocardio en una población Turca (*Alp E, y cols., 2011*). En este estudio no hubo asociaciones significativas entre los polimorfismos -1575 G/A, -1306 C/T y -790 T/G y la enfermedad arterial coronaria; sin embargo, la frecuencia del genotipo -735 TT fue significativamente menor en los controles más que en los pacientes con infarto al miocardio cuando se compararon con el genotipo CC. Los diferentes resultados obtenidos en este estudio pueden ser debido a las diferencias étnicas o a los diferentes métodos de determinación que utilizaron.

Los polimorfismos de las MMPs se han estudiado en pacientes con infarto al miocardio en varias poblaciones, pero Delgado Enciso y cols., estudiaron el polimorfismo de la MMP2 -1306 en pacientes mexicanos con infarto al miocardio y reportaron que el genotipo CC incrementaba el riesgo a desarrollar infarto al miocardio en este grupo étnico (*Delgado-Enciso I, y cols., 2009*). En este estudio se analizó el mismo polimorfismo, sin embargo, no hubo asociación. La principal diferencia entre ambos estudios es el número de pacientes incluidos, las técnicas usadas para las determinaciones y el número de polimorfismos analizados. La asociación de Delgado y el polimorfismo -1306 con infarto al miocardio, no se corroboró en el estudio de población Caucásica (*Horne BD, y cols., 2007*), estos resultados van de

acuerdo con los que reportó en este trabajo. Cuando se consideraron las características clínicas y los polimorfismos, de acuerdo al modelo dominante hubo una asociación del polimorfismo MMP12 -82 con la extensión de enfermedad arterial coronaria. Los pacientes con el genotipo AG + GG presentaron 3.72 veces más riesgo en la enfermedad arterial coronario con 2 o 3 vasos dañados, comparados con los pacientes con el genotipo AA. El polimorfismo de la MMP12 -82 esta localizado en el sitio de unión al factor de transcripción de la proteína activadora 1 (AP-1). Estudios *in vitro* han detectado una baja afinidad de unión del polimorfismo con el alelo G, produciendo baja actividad en el promotor de la MMP12 (*Jormsjö S, y cols., 2000*). Este polimorfismo fue estudiado en 367 pacientes con enfermedad arterial coronaria y el alelo G, el cual presentó baja actividad transcripcional *in vitro*, fue asociado con un gran diámetro luminal en pacientes con diabetes sometidos a angioplastia con implantación de stent. Esto va de acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, en el cual se detectó una asociación del genotipo AG + GG con el incremento de riesgo de tener oclusión en dos o tres vasos. En el análisis de haplotipos, se detectaron dos haplotipos (ACTC y ACTT) con las frecuencias incrementadas en pacientes y un haplotipo (ATTC) con las frecuencias disminuidas. Como se pudo observar, la principal diferencia entre el haplotipo de riesgo y de protección es el alelo C en la posición -1306 en los haplotipos de riesgo. Como se comentó anteriormente, este polimorfismo fue asociado con infarto al miocardio en otro grupo de pacientes Mexicanos con infarto al miocardio.

Con respecto a los genes que se determinaron por la metodología de RFLPs, la distribución de los polimorfismos en los genes *MMP1-1607 1G/2G* (rs1799750) y *MMP3 -1612 5A/6A* fue similar en ambos grupos. Sin embargo, encontramos distribución diferente en el polimorfismo del gen de *MMP9 -1562* (rs3918242) al compararse con los controles sanos. El incremento en la frecuencia del alelo T y genotipo CT de este polimorfismo respalda su rol como marcador de susceptibilidad genética para infarto al miocardio (MI) en esta población. De hecho, se han reportado niveles aumentados de MMP9 en placas ateroscleróticas en arterias coronarias (*Pasterkamp y cols., 2000*). Los sitios polimórficos fueron seleccionados en base a estudios previos de asociación en enfermedades cardiovasculares y a su importante participación a nivel funcional. En el caso de *MMP-1 1G y 2G* se trata de una diferente inserción de un nucleótido de guanina. Este sitio polimorfismo se localiza en la posición -1607 del sitio de inicio de la transcripción en el gen. La actividad transcripcional del alelo 2G es 20 veces más fuerte que el alelo 1G. Por lo tanto, individuos portadores del alelo 2G sobre-expresan MMP1, lo cual puede conducir a disminuir el colágeno. Este mecanismo es conocido para inducir la aterosclerosis (*Ye, 2000*).

El polimorfismo del gen de la MMP9 es debido a un cambio de una sola base (C/T) en la posición -1562 en la región promotora. En este caso el alelo *T* es asociado con enfermedad arterial coronaria (EAC), ya que potencializa la expresión del gen.

Román-García y cols. evaluaron tres polimorfismos del gen de *MMP-1* (rs11292517, rs1144393 y rs514921) en 261 pacientes de género masculino con IM. Estos autores no encontraron asociación con el padecimiento (*Roman-García y cols., 2009*). Estos datos concuerdan con nuestros resultados, ya que también encontramos que el mismo gen (aunque una variante diferente) no se asoció con la enfermedad.

En otro reporte, Sakowicz y cols. analizaron 17 polimorfismos en 15 genes candidatos. Entre ellos, los polimorfismos de *MMP-3 -1612 5A/6A* (rs3025058) y *MMP-9 -1562 (rs3918242)* en una cohorte de 271 pacientes con MI y 141 controles sanos en población caucásica blanca (*Sakowicz y cols., 2013*). Estos autores reportaron que el polimorfismo de *MMP-3 -1612 5A/6A* (rs3025058) se asoció con estenosis avanzada en los vasos arteriales, mientras que el polimorfismo de *MMP-9 -1562 (rs3918242)* fue asociado con hipertensión y alto riesgo de MI. En nuestros resultados no encontramos asociación del polimorfismo de *MMP-3 -1612 5A/6A* (rs3025058) con la enfermedad. Sin embargo, para el polimorfismo de *MMP-9 -1562 (rs3918242)* hay congruencia con nuestros datos, ya que cuando realizamos el análisis de regresión logística con factores de riesgo cardiovasculares los genotipos *CT + TT* del polimorfismo *MMP-9 -1562 (rs3918242)* fueron asociados al padecimiento.

También, Quintao y cols. reportaron un estudio de casos y controles en donde examinaron nueve polimorfismos en el gen de *MMP-1* en 438 controles sanos y 411 pacientes con EAC de la población Han en China. Ellos revelaron una débil asociación entre el polimorfismo rs1799750 y CAD (*Quintao y cols., 2014*). En cambio en nuestros datos, no encontramos asociación con el mismo sitio polimórfico. Estas discrepancias pueden ser relacionadas con las diferencias genéticas de la población de estudio o en la selección de los pacientes y controles sanos.

Por otro lado, Swelam y cols. Estudiaron la asociación de polimorfismos en los genes de *MMP3* y *MMP9* in población Egipcia y reportaron la asociación del polimorfismo *MMP-3 -1612 5A/6A* (rs3025058) y de los genotipos *CT + TT MMP-9 -1562 (rs3918242)* con riesgo al desarrollo de MI. En nuestro trabajo, analizamos los mismos sitios polimórficos. Sin embargo, solo detectamos asociación con los genotipos

CT + TT del polimorfismo *MMP-9 -1562 (rs3918242)*. La principal diferencia en ambos estudio es el número de pacientes incluidos y el número de polimorfismos analizados. En el reporte de Sewelam y cols. Incluyeron solo 40 pacientes con respecto al nuestro con 236 pacientes analizados. Nosotros estudiamos tres polimorfismos en diferentes genes de MMPd, mientras que Swelam y cols. analizaron dos polimorfismos (Swelam y cols., 2013). La asociación del polimorfismo del gen de *MMP-1* no ha sido corroborada en poblaciones caucásicas con un mayor tamaño de muestra, pero solo el polimorfismo del gen de *MMP-9 -1562 (rs3918242)* fue asociada con MI (Horne y cols., 2007), este resultado es congruente con nuestros datos. Recientemente, Nie y cols. encontraron que el alelo *T* del polimorfismo del gen de *MMP-9 -1562 (rs3918242)* se asoció con incremento de 1.5 veces mas de riesgo a desarrollar enfermedad cerebro vascular en población China (Nie y cols., 2014). Este dato es importante ya que también es congruente con nuestros resultados.

La principal fortaleza de nuestro trabajo ha sido la medición del calcio coronario en los grupos estudiados, empleando tomografía computarizada. Este es un método específico para evaluar el score de calcio y poder diagnosticar individuos aparentemente sanos (aterosclerosis subclínica). En este punto, solo fueron seleccionados individuos controles que presentaron score de calcio de cero (CAC=0). Los pacientes con MI fueron seleccionados si el diagnóstico fue por ruptura de placa aterosclerótica, esto debido a la importancia de las MMPs en el proceso de la degradación de matrix extracelular de la placa coronaria, que también involucra el debilitamiento de la misma. Estas fortalezas deberán de considerarse al momento de comparar este estudio del resto de las investigaciones en el campo.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

Los datos clínico demográficos confirmaron que la frecuencia de pacientes infartados se da principalmente en varones, así como en aquellas personas con hábitos tábicos. La Diabetes Mellitus y la hipertensión, siguen siendo un factor de riesgo para la enfermedad.

Los datos mostraron que el polimorfismo MMP2 -1575 (rs243866) A/G podría tener un papel importante en el riesgo a desarrollar infarto al miocardio en la población Mexicana. En este mismo gen también se distinguieron dos haplotipos de riesgo “ACTC” y “ACTT” y un haplotipo protector “ATTC” para infarto al miocardio.

El polimorfismo de la MMP12 -82 fue asociado con el número de vasos dañados, cuando se analizó la correlación entre el polimorfismo y las diferentes variables clínicas, el grado de enfermedad arterial coronaria fue observado. Los pacientes con el genotipo AG+GG tuvieron un riesgo de 3.72 veces más de tener una significativa oclusión en dos o tres vasos.

También se mostró la asociación del polimorfismo -1562 (rs3918242) ubicado en la región promotora del gen de la MMP-9 con riesgo al desarrollo de la enfermedad en la nuestra población. Estos resultados representan datos preliminares debido al tamaño de muestra y finalmente se requieren estudios adicionales en otras poblaciones con mayor tamaño de muestra, con el fin de definir el verdadero papel en la genética de estos polimorfismos en el MI.

Los polimorfismos MMP2-1306 (rs243865), MMP2-790 (rs243864), MMP2-735 (rs2285053), MMP3 -1612 5A/6A (rs 3025058), MMP7-153 (rs11568819) y MMP7-181 (rs11568818), no se encontraron asociados a infarto al miocardio en mexicanos.

Con respecto al análisis de expresión del gen de la MMP2 en arterias de pacientes infartados, hubo un pequeño incremento en su expresión pero no fue significativa.

Todas las muestras recolectadas para este estudio fueron de pacientes infartados a los cuales se les realizó cinecoronariografía y el diagnóstico de infarto se dio por ruptura de la placa.

Los estudios adicionales en otras poblaciones pueden ayudar a definir el papel verdadero de estos marcadores como factores de riesgo para el desarrollo de infarto al miocardio.

**VIII. REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

1. Abilleira S, Bevan S, Markus HS: The role of genetics variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis. *J Med Genet*, 2006; 43: 897-901.
2. Allaire E, Forough R, Clowes M, Starcher B, Clowes AW. Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *Journal Clinical Investigation* 1998; 102: 1413-20.
3. Almeida Gómez J, Álvarez Toledo O. Fisiopatología de los síndromes coronarios agudos. *Rev Cubana Med*, 2006; 45 (3).
4. Alp E, Menevse S, Tulmac M, Yilmaz A, Yalcin R, Cengel A. The role of matrix metalloproteinase-2 promoter polymorphisms in coronary artery disease and myocardial infarction. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011; 15: 193-202.
5. Alp E, Menevse S, Tulmac M, Yilmaz A, Yalcin R, Cengel A: The role of matrix metalloproteinase-2 promoter polymorphisms in coronary artery disease and myocardial infarction. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2011; 15: 193- 202.
6. Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol*. 2007;48:323-34
7. Antman E, Bassand JP, Klein W, et al. Myocardial infarction redefined a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2001; 1: 37 (3):973.
8. Arai K, Saavedra L. Definición de infarto al miocardio... ¿cuánto ha cambiado?, ¿cuánto nos afecta?. *Avances cardiol*, 2008; 28 (1): 9-12.
9. Aranda Fraustro A. Anatomía Cardiovascular. Capítulo 1. Tratado de Cardiología, Intersistemas, Primera edición. México. 2012.
10. Armstrong C, Abilleira S, Sitzer M, Markus HS, Bevan S. Polymorphisms in MMP family and TIMP genes and carotid artery intima-media thickness. *Stroke* 2007; 38: 2895-2899.
11. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; 115:3719–27.
12. 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. *Journal Clinical Investigation* 1998; 101: 1478-87.
13. Barkur S. Shastry. SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype. *Methods in Molecular Biology* 2009; 578: 3-22.

14. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005. 21: 263-265.
15. Belaouaj A, Shipley JM, Kobayashi DK, Zimonjic DB, Popescu N, Silverman GA, y cols., Human macrophage metalloelastase: genomic organization, chromosomal location, gene linkage, and tissue-specific expression. *J Biol Chem*. 1995; 270: 14568-14575.
16. Bennet MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of rat of vascular smooth muscle cells is regulated by p53-dependent and -independent pathways. *Circ Res*, 1995; 77 (2): 266-73.
17. Beránek M, Kolar P, Tschoplova S, Kankova K, Vasku A: Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis*, 2008; 14: 1114-1121.
18. Beyzade S, Zhang S, Wong YK, Day IN, Eriksson P, Ye S. 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.
19. Beyzade S, Zhang S, Wong YK, Day IN, y cols., Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction. *Journal American College Cardiology*. 2003; 41: 2130-7.
20. Bigatel DA, Elmore JR, Carey DJ, Cizmeci-Smith G, Franklin DP, Youkey JR. The matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 limits expansion of experimental abdominal aortic aneurysms. *Journal Vascular Surgery* 1999; 29: 130-9.
21. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, y cols., Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003; 107: 1579-1585.
22. Bohórquez-Sierra J.C. Metaloproteinasas de matriz: su implicación en las enfermedades vasculares periféricas. *Angiología* 2006; 58 (4): 269-277
23. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003; 33(Suppl): 228-237.
24. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003; 33(Suppl): 228-237.
25. Brauer PR. MMPs--role in cardiovascular development and disease. *Front Biosci* 2006; 11: 447-478.

26. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, y cols., Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation* 1995; 91: 2125-2131.
27. Buckland PR. The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762:17-28.
28. Butler GS, Overall CM. Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new "intracellular" substrates revealed by degradomics. *Biochemistry* 2009; 48: 10830-10845.
29. Buttice G, Quinones S, Kurkinen M. The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of the human stromelysin gene. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 3723-3731.
30. Cascales Angosto M, Álvarez Gómez JA. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An. R. Acad. Nac. Farm*, 2010; 76 (1): 59-84.
31. Chandler S, Cossins J, Lury J, Wells G. Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumour necrosis factor-alpha fusion protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 228: 421-429.
32. Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* 2000; 101: 1833-1839.
33. Cooper GM, Sidow A. Genomic regulatory regions: insights from comparative sequence analysis. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:604-610.
34. Corti R, Fuster V, Badimon JJ Pathogenetic concepts of acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 7S-14S.
35. Davies MJ, Thomas AC: Plaque fissuring-the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J*, 1985; 53: 363-373.
36. Debomoy K. Lahiri, John I. Nurnberger. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research.* 1991; 19: 5444.
37. Delgado-Enciso I, Gonzalez-Hernandez NA, Baltazar- Rodriguez LM, Millan-Guerrero RO, Newton-Sanchez O, Bayardo-Noriega A, Aleman-Mireles A, Enriquez-Maldonado IG, Anaya-Carrillo MJ, Rojas-Martinez A, Ortiz- Lopez R: Association of matrix metalloproteinase-2 gene promoter polymorphism with myocardial infarction susceptibility in a Mexican population. *J Genet*, 2009; 88: 249-252.

38. Delgado-Enciso I, Gonzalez-Hernandez NA, Baltazar-Rodriguez LM, Millan-Guerrero RO, Newton-Sánchez O, Bayardo-Noriega A, y cols., Association of matrix metalloproteinase-2 gene promoter polymorphism with myocardial infarction susceptibility in a Mexican population. *J Genet* 2009; 88: 249-252.
39. Dozier S, Escobar GP, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-7 activates MMP-8 but not MMP-13. *Med Chem* 2006; 2: 523-526.
40. Drake JA, Bird C, Nemes J, Thomas DJ, Newton-Cheh C, Reymond A, y cols., Conserved noncoding sequences are selectively constrained and not mutation cold spots. *Nat Genet* 2006; 38:223–227.
41. Edwards, D. R., Handsley, M. M. & Pennington, C. J. The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 2008. 29: 258-289.
42. Edwards, D. R., Handsley, M. M. & Pennington, C. J. The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* 2008; 29: 258-289.
43. Fernandez-Catalan C, Bode W, Huber R, Turk D, Calvete JJ, Lichte A, y cols., Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase a receptor. *EMBO J* 1998; 17: 5238– 48.
44. Folgueras, A. R., Pendas, A. M., Sanchez, L. M. & López-Otín, C. Metalloproteinases in cancer: from new function to improved inhibition strategies. *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48: 411-424.
45. Frodsham AJ, Hill AV. Genetics of infectious diseases. *Hum Mol Genet* 2004;13:R187-194.
46. Gandur Silvia, Carlos B, Riesgos de Infarto (Enfermedades coronarias), Minirevisión, 2004.
47. García-Moll X, Kaski JC. Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 1999; 52: 990-1003.
48. Genersch E, Hayess K, Neuenfeld Y, Haller H. Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of Ras-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci* 2000; 113: 4319-4330.
49. George SJ, Johnson JL, Angellini A, Newby AC, Baker AH. Adenovirus-mediated gene transfer of the human TIMP-1 gene inhibits smooth muscle cell migration and neointimal formation in human saphenous vein. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 867-77.
50. Ghilardi G, y cols., Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-3 gene promoter polymorphisms are associated with carotid artery stenosis. *Stroke.* 2002; 33: 2408-12.
51. Glaxiola E. Detección y tratamiento de la placa vulnerable. *Arch Cardiol Mex*, 2007; 77 (S4): 178-84.

52. Gomis-Ru" th FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, y cols., Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature (Lond)* 1997; 389: 77–81.
53. Gronski TJ Jr, Martin RL, Kobayashi DK, Walsh BC, Holman MC, Huber M, y cols., Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J Biol Chem.* 1997; 272: 12189-12194.
54. Halpert I, Sires UI, Roby JD, Potter-Perigo S, Wight TN, Shapiro SD, y cols., Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 9748-9753.
55. Halpert I, Sires UI, Roby JD, Potter-Perigo S, Wight TN, Shapiro SD, y cols., Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 9748-9753.
56. Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation*, 2000; 102: 118-22.
57. Handsley, M. M. & Edwards, D. R. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer.* 2005; 115: 849-860.
58. Harendza S, Lovett DH, Panzer U, Lukacs Z, Kuhn P, Stahl RA: Linked common polymorphisms in the gelatin- ase a promoter are associated with diminished transcrip- tional response to estrogen and genetic fitness. *J Biol Chem*, 2003; 278: 20490-20499.
59. Harper, E. & Bloch, K. J. The zymogen of tadpole collagenase. *Biochemistry.* 1971; 10: 3055-3041.
60. HARRISON. Principios de Medicina Interna 17^a edición. Parte 9. Enfermedades del aparato cardiovascular. Sección 2. Diagnóstico de trastornos cardiovasculares.
61. Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, y cols., Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8154-8158.
62. Hideaki Nagase, Robert Visse, Gillian Murphy. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 2006; 69:562 – 573.
63. Higashi S, Miyazaki K. Reactive site-modified tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits the cell-mediated activation of progelatinase A. *J Biol Chem* 1999; 274: 10497–504.

64. Hirashiki A, Yamada Y, y cols., Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in low-or high-risk subjects defined by conventional risk factors. *Journal American College Cardiology*. 2003; 42: 1429-37.
65. Hojo Y, Ikeda U, Ueno S, Arakawa H, Shimada K: Expression of matrix metalloproteinases in patients with acute myocardial infarction. *Jpn Circ J*, 2001; 65: 71-75.
66. Holla LI, Fassmann A, Vasku A, Goldbergova M, Beranek M, Znojil V, Vanek J, Vacha J: Genetic variations in the human gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) promoter are not associated with susceptibility to, and severity of, chronic periodontitis. *J Periodontol*, 2005; 76: 1056-1060.
67. Horne BD, Camp NJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, et al. Multiple-polymorphism associations of 7 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor metalloproteinase genes with myocardial infarction and angiographic coronary artery disease. *Am Heart J*, 2007; 154: 751-758.
68. Horne BD, Camp NJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, Kolek MJ, Nicholas ZP, Anderson JL: Multiple-polymorphism associations of 7 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor metalloproteinase genes with myocardial infarction and angiographic coronary artery disease. *Am Heart J*, 2007; 154: 751-758.
69. Huang, S. C., Sheu, B. C., Chang, W. C., Chaeg, C. Y., Wang, P. H. & Lin, S. Extracellular matrix proteases – Cytokine regulation role in cancer and pregnancy. *Front. Biosci*. 2009; 14: 1571-1588.
70. HuaY, SongL, WuN, LuX, MengX, GuD, YangY: Polymorphisms of MMP-2 gene are associated with systolic heart failure risk in Han Chinese. *Am J Med Sci*, 2009; 337: 344-348.
71. Humphries SE, Martin S, Cooper J, Miller G. Interaction between smoking and the stromelysin-1 (MMP3) gene 5A/6A promoter polymorphism and risk of coronary heart disease in healthy men. *Ann Hum Genet* 2002; 66: 343-352.
72. Imai K, Yokohama Y, Nakanishi I, Ohuchi E, Fujii Y, Nakai N, y cols., Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem* 1995; 270:6691-6697.
73. Imen Jguirim-Souissia, Awatef Jelassia, Afef Slimania, Faouzi Addadb, Majed Hassineb, Khaldoun Ben Hamdab, Mohamed Najaha, Faouzi Maatoukb, Mustapha Rouisc and Mohamed Naceur Slimanea. Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 gene

- polymorphisms and the outcome of coronary artery disease. *Coronary Artery Disease* 2011, 22:388–393.
74. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2008.
75. Ip JH, Fuster V, Badimon L, et al. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol*, 1990; 15: 1667-87.
76. Jesús Hernández-Romano, Jesús Martínez-Barnetche, Verónica Valverde-Garduño. Polimorfismos reguladores y su participación en la patogenia de enfermedades complejas en la era posgenómica. *Salud Publica Mex* 2009; 51 supl 3: S455-S462.
77. Jormsjö S, Ye S, Moritz J, Walter DH, Dimmeler S, Zeiher AM, Henney A, Hamsten A, Eriksson P: Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease. *Circ Res*, 2000; 86: 998-1003.
78. Jormsjö S, Ye S, Moritz J, Walter DH, Dimmeler S, Zeiher AM, y cols., Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease. *Circ Res*. 2000; 86: 998-1003.
79. Jormsjö Sofia y cols., Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-7 promoter activity is associated with coronary artery luminal dimensions among hypercholesterolemic patients. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* 2001; 21: 1834-39.
80. Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* 2003; 108: 1395-403.
81. Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 1987; 51: 1079-1090.
82. Kadonaga JT. Regulation of DNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* 2004;116:247-257.
83. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T: Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 1998; 32: 368-372.
84. Kerr LD, Holt JT, Matrisian LM. Growth factors regulate transin gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways. *Science* 1988; 242: 1424-1427.
85. Kim JS, y cols., The roles of stromelysin-1 and the gelatinase B gene polymorphism in stable angina. *Yonsei Medical Journal*. 2002; 43: 473-81.

86. King MC, Wilson AC. Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* 1975; 188:107-116.
87. Kukačka J, Průša R, Kotaška K, Pelouch V. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005; 149: 225-236.
88. Lamblin N, Bauters C, Hermant X, Lablanche JM, Helbecque N, Amouyel P. Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 43-48.
89. Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, Gowing KLM, Poole AR. Wakeham A y cols., Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 2001; 108: 817-29.
90. Lee MH, Rapti M, Knauper V, Murphy G. Threonine 98, the pivotal residue of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in metalloproteinase recognition. *J Biol Chem* 2004; 279: 17562-9.
91. Lee MH, Rapti M, Murphy G. Total conversion of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) for specific metalloproteinase targeting: fine-tuning TIMP-4 for optimal inhibition of tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *J Biol Chem* 2005; 280: 15967-75.
92. Levine M, Tjian R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 2003; 424:147-151.
93. Li Z, Li L, Zielke HR, et al. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 1996; 148: 121-8.
94. Linjnen HR, Collen SD. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 impairs arterial neointima formation after vascular injury in mice. *Circulation Research* 1999; 85: 1186-91.
95. Lisker R, Perez-Briceno R, Granados J, Babinsky V: Gene frequencies and admixture estimates in the State of Puebla, Mexico. *Am J Phys Anthropol*, 1988; 76: 331-335.
96. Lisker R, Ramírez E, Babinsky V: Genetic structure of autochthonous populations of Meso-America: Mexico. *Hum Biol*, 1996; 6: 395-404.
97. Liu PY, Chen JH, Li YH, Wu HL, Shi GY. Synergistic effect of stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) promoter 5A/6A polymorphism with smoking on the onset of young acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2003; 90: 132-139.
98. Liu PY, Chen JH, Li YH, y cols., Synergistic effect of stromelysin-1 (matrix metalloproteinase 3) promoter 5A/6A polymorphism with smoking on the onset of young acute myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2003; 90: 132-9.

99. Liu PY, Li YH, Tsai WC, Tsai LM, Chao TH, Wu HL, y cols., Stromelysin-1 promoter 5A/6A polymorphism is an independent genetic prognostic risk factor and interacts with smoking cessation after index premature myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1998-2005.
100. Lodish H, y cols., 2003. *Biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana. Madrid España. 157. Cuarta edición.
101. Loftus IM, Thompson MM, The role of matrix metalloproteinases in vascular disease. *Vascular Medicin*. 2002; 7: 117-33.
102. López-Otín, C. & Bond, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem*. 2008; 283: 31433-31437.
103. López-Otín, C. & Bond, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem*. 2008; 283: 31433-31437.
104. López-Otín, C. & Matrisian, L. Emerging roles of proteases in tumor progression. *Nature Rev. Cancer*. 2007; 7: 800-808.
105. López-Otín, C. & Overall, C. M. Protease degradomics a new challenge for proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2002; 3: 509-519.
106. Lu PC, Ye H, Maeda M, Azar DT. Immunolocalization and gene expression of matrilysin during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 20-27.
107. Maisch B. Ventricular remodeling. *Cardiology*. 1996. 87, 2-20.
108. Malpartida F, Vivancos R, Urbano C, et al. Inflamación y placa inestable. *Arch Cardiol Mex*. 2007; 77 (S4): 16-22.
109. Marco Antonio Martínez Ríos, y cols., 2012. *Tratado de Cardiología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"*. Ed. Intersistemas. México D.F. 1-3, 17-18, 187-188, 361-367. Primera edición.
110. Martínez Sánchez C, Juárez Herrera U. Síndromes isquémicos coronarios agudos. Capítulo 18. *Tratado de Cardiología*, Intersistemas, Primera edición. México. 2012.
111. Marx N, Froehlich J, Siam L, y cols., Antidiabetic PPAR gamma-activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 283-288.
112. Massó Rojas FA. Fisiología Cardiocirculatoria. Capítulo 2. *Tratado de Cardiología*, Intersistemas, Primera edición. México. 2012.
113. McDonnell S, Morgan M, Lynch C. Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes. *Biochem Soc Trans* 1999; 27: 734-40.

114. McDonnell S, Morgan M, Lynch C. Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes. *Biochem Soc Trans* 1999; 27: 734-40.
115. Meng Q, Malinovskii V, Huang W, Hu YJ, Chung L, Nagase H, y cols., Residue 2 of TIMP-1 is a major determinant of affinity and specificity for matrix metalloproteinases but effects of substitutions do not correlate with those of the corresponding P1' residue of substrate. *J Biol Chem* 1999; 274: 10184-9.
116. Michele Cavalera, Marta Fabrizi, Marta L. Hribal, Giuseppe Pugliese, Paolo Gentileschi, Orazio Schillaci, Ottavia Porzio, Davide Lauro, Paolo Sbraccia, Renato Lauro, Massimo Federici. Overexpression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 in Macrophages Reduces Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:74-81.
117. Min Nian, Paul Lee, Neelam Khaper, Peter Liu. Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circ Res* 2004; 94:1543-1553.
118. Miura S, Ohno I, Suzuki J, Suzuki K, Okada S, Okuyama A, y cols., Inhibition of matrix metalloproteinases prevents cardiac hypertrophy induced by beta-adrenergic stimulation in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42: 174-181.
119. Mochizuki, S. & Okada, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.* 2007. 98: 621-628.
120. Mora JR, Manzur AJ, Ramírez T, Silva-Herzog D. Papel de las metaloproteinasas de la matriz en la degradación del tejido pulpar: Una revisión literaria. *Rev Cient Odontol* 2006; 1: 20-26.
121. Mora JR, Manzur AJ, Ramírez T, Silva-Herzog D. Papel de las metaloproteinasas de la matriz en la degradación del tejido pulpar: Una revisión literaria. *Rev Cient Odontol* 2006; 1: 20-26.
122. Mora JR, Manzur AJ, Ramírez T, Silva-Herzog D. Papel de las metaloproteinasas de la matriz en la degradación del tejido pulpar: Una revisión literaria. *Rev Cient Odontol.* 2006;1:20-26.
123. Mtairag el M, Houard X, Rais S, Pasquier C, Oudghri M, Jacob MP, Meilhac O, Michael JB: Pharmacological potentiation of natriuretic peptide limits polymorphonuclear neutrophil-vascular cell interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002; 22: 1824-1831.
124. Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part 1. *Circulation*, 2003; 108 (14): 1664-72.
125. Nakamoto, T., Yamagata, T., Sakai, T., y cols., CIZ, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20: 1649-1658.

126. Ndiaye NC, Azimi Nehzad M, El Shamieh S, Stathopoulou MG, Visvikis-Siest S: Cardiovascular diseases and genome-wide association studies. *Clin Chim Acta*, 2011; 412: 1697-701.
127. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*. 2005; 85: 1-31.
128. Nie SW, Wang XF and Tang ZC. Correlations between MMP-2/MMP-9 promoter polymorphisms and ischemic stroke. *Int J Clin Exp Med.*, 2014; 7: 400-404.
129. Nishioka Y, Sagae S, Nishikawa A, Ishioka S, Kudo R. A relationship between matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphism and cervical cancer progression. *Cancer Lett* 2003; 200: 49-55.
130. Nishioka Y, Sagae S, Nishikawa A, Ishioka S, Kudo R. A relationship between matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphism and cervical cancer progression. *Cancer Lett* 2003; 200: 49-55.
131. Noji Y, Kajinami K, Kawashiri MA, y cols., Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in premature coronary atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 380-384.
132. Nojiri T, Morita H, Imai Y, Maemura K, Ohno M, Ogasawara K, y cols., Genetic variations of matrix metalloproteinase-1 and -3 promoter regions and their associations with susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Int J Cardiol* 2003; 92: 181-186.
133. Ogbourne S, Antalis TM. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J*. 1998; 331:1-14.
134. Overall, C. M. & Lopez-Otin, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. *Nature Rev. Cancer*. 2002; 2: 657-672.
135. Overall, C. M. & Lopez-Otin, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era. *Nature Rev. Cancer*. 2002; 2: 657-672.
136. Paginas electrónicas www.revespcardiol.org
137. Pardo A, Selman M. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 283-288.
138. Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, de Kleijn DP, et al. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis*, 2000; 150: 245-253.

139. Pastinen T, Ge B, Hudson TJ. Influence of human genome polymorphism on gene expression. *Hum Mol Genet* 2006; 15: R9-16.
140. Pelouch V, Jirmar R. Biochemical characteristics of cardiac collagen and its role in ventricular remodelling following infarction. 1993. *Physiology Research*. 42, 283-292.
141. Peter Libby. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; 104: 365-372.
142. Pöllänen PJ, Karhunen PJ, Mikkelsen J, Laippala P, Perola M, Penttilä A, Mattila KM, Koivula T, Lehtimäki T: Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene: an autopsy study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001; 21: 1446-1450.
143. Pollanen PJ, y cols., Matrix metalloproteinase 3 and 9 gene promoter polymorphisms: joint action of two loci as a risk factor for coronary artery complicated plaques. *Atherosclerosis*. 2005; 180: 73-8.
144. Porter KE, Loftus IM, Peterson M, Bell PR, London NJ, Thompson MM. Marimastat inhibits neointimal thickening in a model of human vein graft stenosis. *Br J Surg* 1998; 85: 1373-7.
145. Prentice Hall. Madrid. 2004. 67, 279-293.
146. Preuss M, König IR, Thompson JR, Erdmann J, Absher D, Assimes TL, Blankenberg S, Boerwinkle E, Chen L, Cupples LA, Hall AS, Halperin E, Hengstenberg C, Holm H, Laaksonen R, Li M, März W, McPherson R, Musunuru K, Nelson CP, Burnett MS, Epstein SE, O'Donnell CJ, Quertermous T, Rader DJ, Roberts R, Schillert A, Stefansson K, Stewart AF, Thorleifsson G, Voight BF, Wells GA, Ziegler A, Kathiresan S, Reilly MP, Samani NJ, Schunkert H; CARDIoGRAM Consortium. Design of the Coronary ARtery Disease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis (CARDIoGRAM) Study: A Genome-wide association meta-analysis involving more than 22 000 cases and 60 000 controls. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010; 3: 475-483.
147. Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene. *J Biol Chem* 2001; 276: 7549-7558.
148. Price SJ, Greaves DR, Watkins H: Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metallo- proteinase-2 gene. *J Biol Chem*, 2001; 276: 7549-7558.
149. Puente, X. S., Sánchez, L. M., Gutiérrez-Fernández, A., Velasco, G. & López-Otín, C. A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem. Soc. Trans.* 2005; 33: 331-334.

150. Qin H, Sun Y, Benveniste EN. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astroglioma cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 29130-29137.
151. Qintao C, Yan L, Changhong D, Xiaoliang G, et al. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase-1 and coronary artery disease susceptibility: a case-control study in a Han Chinese population. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2014; 18: 826-831.
152. Quantin B, Murphy G, Breathnach R. Pump-1 cDNA codes for a protein with characteristics similar to those of classical collagenase family members. *Biochemistry* 1989; 28: 5327-5334.
153. Qin H, Sun Y, Benveniste EN: The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astroglioma cells. *J Biol Chem*, 1999; 274: 29130-29137.
154. Quinones S, Saus J, Otani Y, Harris ED Jr, Kurkinen M. Transcriptional regulation of human stromelysin. *J Biol Chem* 1989; 264: 8339-8344.
155. Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Meisel S, Xu XO, Chai NN, y cols., Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation*. 1999; 99: 3103-3109.
156. Rizo-Rivera EO, Ramírez Gómez JL, Gómez-García YC. Enfoque actual sobre la fisiopatología del síndrome coronario agudo. *Rev Cub Med*, 2009; 48: 71-87.
157. Roberto Corti, Randolph Hutter, Juan Jose Badimon, Valentin Fuster. Evolving Concepts in the Triad of Atherosclerosis, Inflammation and Thrombosis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2004; 17(1), 35–44.
158. 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.
159. Ros RS, Borg TK. Integrins and the myocardium. *Circulation Research*. 2001. 88, 1112-1119.
160. Rosenberg NA, Huang L, Jewett EM, Szpiech ZA, Jankovic I, Boehnke M: Genome-wide association studies in diverse populations. *Nat Rev Genet*, 2010; 11: 356- 366.
161. Ross MH, Pawlina W. 2009. Tejido conjuntivo. En: *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 160-197. 5a. Edición

162. Rouet-Benzineb P, Perennec J, Delcourt A, Frano-Montoya ML, Dreyfus P, Dorent R, y cols., Cardiac gelatinase expression and involvement in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1998; 98: I-626.
163. Rouis M, Adamy C, Duverger N, Lesnik P, Horellou P, Moreau M, y cols., Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999; 100: 533-40.
164. Rutter JL, Mitchell TI, Butticiè G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, y cols., A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Research* 1998; 58: 5321-5325.
165. S. Sini, D. Deepa, S. Harikrishnan, N. Jayakumari. Evidence for an exclusive association of matrix metalloproteinase-9 with dysfunctional high-density lipoprotein: A novel finding. *Atherosclerosis*, 2014; 236:162e168.
166. Sadee W. Measuring cis-acting regulatory variants genome-wide: new insights into expression genetics and disease susceptibility. *Genome Med.* 2009; 1:116.
167. Saedi M, Vaisi-Raygani A, Khaghani S, Sharifabrizi A, Rezaie M, Pasalar P, y cols., Matrix metalloproteinase-9 functional promoter polymorphism 1562C>T increased risk of early-onset coronary artery disease. *Mol Biol Rep.* 2012; 39: 555-562.
168. Sakowicz A, Fendler W, Lelonek M, Sakowicz B, et al. Genetic polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients under 45 years of age. *Biochem Genet*, 2013; 51: 230-242.
169. Samnegard A, Silveira A, Lundman P, Boquist S, Odeberg J, Hulthe J, McPheat W, Tornvall P, y cols., Serum matrix metalloproteinase-3 concentration is influenced by MMP-3 -1612 5A/6A promoter genotype and associated with myocardial infarction. *Journal of Internal Medicine* 2005; 258: 411-419.
170. Samnegard A, Silveira A, Lundman P, y cols., Serum matrix metalloproteinase-3 concentration is influenced by MMP-3 -1612 5A6A promoter genotype and associated with myocardial infarction. *J Int Med.* 2005; 258: 411-19.
171. Sandberg R, Yasuda R, Pankratz DG, Carter TA, Del Rio JA, Wodicka L, y cols., Regional and strain-specific gene expression mapping in the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11038-11043.
172. Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovascular Research.* 2003;59:812-23.

173. Schacherer C, Koops D, Wiemer J, Hartmann A, Weis M, Klepzing H, Zeiher AM, Olbrich HG. Extracellular matrix structure after heart transplantation. 1999. *Int Journal Cardiology*. 68, 115-120.
174. Sewelam NI, Radwan ER, Andraos AW, Ibrahim BE, et al. Association between the polymorphisms of matrix metalloproteinases 9 and 3 genes and risk of myocardial infarction in Egyptian patients. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 2013; 14: 143-148.
175. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem*. 1993; 268: 23824-23829.
176. Shapiro SD. Matriz metalloproteinase degradation of extracelular matriz: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 602-8
177. Shi M, Liu D, Duan H, Han C, Wei B, Qian L, y cols., Catecholamine up-regulates MMP-7 expression by activating AP-1 and STAT3 in gastric cancer. *Mol Cancer*. 2010; 9: 269.
178. Shin-ichi Aso, Hiroshi Imura, Yukio Sekiguchi, Toromi Iwashita, Ryosuke Hirano, Uichi Ikeda, Kazufumi Okamoto. Incidence and mortality of acute myocardial infarction a population-based study including patients with out-hospital cardiac arrest. *Int Heart J* 2011; 52: 197-202.
179. Shu Ye. Polumorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biology* 2000; 19: 623-629
180. Shu Ye. Polumorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biology* 2000; 19: 623-629.
181. Souissi IJ, Billiet L, Cuaz-Pérolin C, Slimane MN, Rouis M. Matrix metalloproteinase-12 gene regulation by a PPAR alpha agonist in human monocyte-derived macrophages. *Exp Cell Res*. 2008; 314: 3405-3414.
182. Stary HC, Chandlr AB, Glagov S, et al. A definition of enicial, fatty streak, and intermédiaire lesion of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis. American Heart Associations. Special Report. *Arterioscler Thromb*, 1994; 14:840-56.
183. Steiner, D. F. The proprotein convertases. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 1998. 2: 31-39.
184. Steinmetz LM, Sinha H, Richards DR, Spiegelman JI, Oefner PJ, McCusker JH,y cols., Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature* 2002; 416: 326-330.

185. Sternlicht MD, Lochter A, Sympton CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, y cols., The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell* 1999; 98:137-146.
186. Sternlicht, M. D. & Werb, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001; 17: 463-516.
187. Sudbery P. *Genética Molecular Humana*. 2ª Edición. Editorial Pearson.
188. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 1990; 29: 10261-10270
189. Tayebjee MH, Lip GY, Tan KT, y cols., Plasma matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and CD40 ligand levels in patients with stable coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2005; 96: 339.345.
190. Terashima M, Akita H, Kanazawa K, Inoue N, Yamada S, Ito K, y cols., Stromelysin promoter 5A/6A polymorphism is associated with acute myocardial infarction. *Circulation.* 1999; 99: 2717-2719.
191. The Task Force on Heart Failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis of heart failure. *Eur Heart J.* 1995; 16: 741-51.
192. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2007; 50 (22): 2173-95.
193. Treharne GD, Boyle JR, Goodal S, Loftus IM, Bell PR, Thoompson MM. Marimastat inhibits elastin degradation and matrix metalloproteinase-2 activity in a model of aneurysm disease. *Br J Surg* 1999; 86: 1053-8.
194. Tuñón J, Hernández-Presa M, Ortego M, et al. Aterogénesis y complicación de la placa. *J Cardiovasc Risk Fact*, 2000; 9 (2): 77-89.
195. Turner J, Crossley M. Mammalian Krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 236-240.
196. Tyagi SC, Campbell SE, Reddy HK, Tjahja E, Voelker DJ. Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, non infarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Molecular Cellular Biochemical.* 1998; 155, 13-21.
197. Tyagi SC, Kumar S, Voelker DJ, Reddy HK, Janicki JS, Curtis JJ. Differential gene expression of cellular matrix components in dilated cardiomyopathy. 1996. *Journal Cellular Biochemical.* 63, 185-198.
198. Tyagi SC. Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover. 1997. *Molecular Cellular Biochemical.* 168, 1-2.

199. Ueda L, Matsushima K. Stimulation of plasminogen activator activity and matrix metalloproteinases of human dental pulp-derived cells by tumor necrosis factor-alpha. *J Endod* 2001; 27: 175-179.
200. Uría JA, Jiménez MG, Balbín M, Freije JM, López-Otín C. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1998; 273: 9769-9777.
201. Vaday GG, Schor H, Rahat MA, Lahat N, Lider O. Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 613-621.
202. Van Lint Philippe, Libert Claude. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *Journal of leucocyte biology* 2007; 82: 1-7
203. Van Lint Philippe, Libert Claude. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *Journal of leucocyte biology* 2007; 82: 1-7
204. Vasků A, Goldbergová M, Hollá LI, Spinarová L, Spinar J, Vítovec J, y cols., Two MMP-2 promoter polymorphisms (-790T/G and -735C/T) in chronic heart failure. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1299-1303.
205. Vasku A, y cols., A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G y -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease. *Matrix Biology* 2004; 22: 585-91.
206. Vasku V, Bienertova Vasku J, Slonková V, Kanková K, Vaskú A: Matrix metalloproteinase-2 promoter variability in psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 2009; 301: 467-473.
207. Vasku V, Goldbergová M, Izakovicová Hollá L, Sisková L, Groch L, Beránek M, Tschöplová S, Znojil V, Vácha J: A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease. *Matrix Biol*, 2004; 22: 585-591.
208. 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* 2002; 4: 157-164.
209. Viviana Casagrande, Rossella Menghini, Stefano Menini, Arianna Marino, Valentina Marchetti,

210. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. 1995. *Journal Molecular Cellular Cardiol.* 26, 279-292.
211. Wei S, Chen Y, Chung L, Nagase H, Brew K. Protein engineering of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) inhibitory domain. In search of selective matrix metalloproteinase inhibitors. *J Biol Chem* 2003; 278: 9831–4.
212. Wei S, Kashiwagi M, Kota S, Xie Z, Nagase H, Brew K. Reactive site mutations in tissue inhibitor of metalloproteinases-3 disrupt inhibition of matrix metalloproteinases but not TNF-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 2005; 280: 32877–82.
213. White LA, Mitchel TI, Brinckerhoff CE. Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1490: 259-268.
214. Williamson RA, Hutton M, Vogt G, Rapti M, Knauper V, Carr MD, y cols., Tyrosine 36 plays a critical role in the interaction of the AB loop of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 with matrix metalloproteinase-14. *J Biol Chem* 2001; 276:32966–70.
215. Wingfield PT, Sax JK, Stahl SJ, Kaufman J, Palmer I, Chung V, y cols., Biophysical and functional characterization of full-length, recombinant human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) produced in *Escherichia coli* - Comparison of wild type and amino-terminal alanine appended variant with implications for the mechanism of TIMP functions. *J Biol Chem* 1999; 274:21362 – 8.
216. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145-2154.
217. Woessner JF, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and TIMPs. Oxford University Press. 1a. edición, New York, E.U.A., 2000.
218. Wood KM, Cadogan MD, Ramshaw AL, et al. The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis. *Histopatology*, 1993; 23-437-44.
219. Woychik NA, Hampsey M. The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell* 2002; 108:453-463.
220. Wu H, Bai X, Chen D, Cao H, Qin L. Association of Genetic Polymorphisms in Matrix Metalloproteinase-9 and Coronary Artery Disease in the Chinese Han Population: A Case–Control Study. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 2013; 17(9):707-712.

221. XuE,XiaX,LüB,XingX,HuangQ,MaY,WangW, Lai M: Association of matrix metalloproteinase-2 and -9 promoter polymorphisms with colorectal cancer in Chinese. *Mol Carcinog*, 2007; 46: 924-929.
222. Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, y cols., Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002 12; 347: 1916-1923.
223. Yamada Y, Izawa H, y cols., Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *New England Journal Medicine*. 2002; 347: 1916-23.
224. Yasmin, McEniery CM, Wallace S, y cols., Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 372-378.
225. Ye S, Watts GF, Mandalia S, Humphries SE, Henney AM. Preliminary report: genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br Heart J* 1995; 73: 209-215.
226. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol*, 2000; 19: 623-629.
227. Ye S., Watts, GF., Mandalia, S., Humphries, S. E., Henney, A.M. Genetic variation in the human stromelysin promoter is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Br. Heart J*. 1995; 73: 209-215.
228. Yoshico M, Robert Francis J, R Preston M. Inflammation and the development of atherosclerosis-effects of lipid lowering therapy. *J Atheroscler and Thrombosis*, 2011; 18: 351-358.
229. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, y cols., Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1999; 99: 1788-1794.
230. Zhi H, Wang H, Ren L, Shi Z, Peng H, Cui L, y cols., Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 and risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Mol Biol Rep*. 2010; 37: 13-20.
231. Zhou X, Huang J, Chen J, Su S, Chen R, Gu D. Haplotype analysis of the matrix metalloproteinase 3 gene and myocardial infarction in a Chinese Han population. The Beijing atherosclerosis study. *Thromb Haemost* 2004; 92: 867-873.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

232. Zhou X, Huang J, Chen J, Su S, Chen R, Gu D. Haplotype analysis of the matrix metalloproteinase 3 gene and myocardial infarction in a Chinese Han population. The Beijing atherosclerosis study. *Thromb Haemost* 2004; 92: 867-873.

IX. ANEXOS

ANEXO 1. Artículos

Original Article

The Matrix Metalloproteinase 2 -1575 gene Polymorphism is Associated with the Risk of Developing Myocardial Infarction in Mexican Patients

Nonanzit Pérez-Hernández^{1,2}, Gilberto Vargas-Alarcón¹, Nancy Martínez-Rodríguez¹, Marco Antonio Martínez-Ríos³, Marco Antonio Peña-Duque³, Aurora de la Peña-Díaz^{1,4}, Benjamín Valente-Acosta¹, Carlos Posadas-Romero⁵, Aida Medina⁵ and José Manuel Rodríguez-Pérez¹

¹Department of Molecular Biology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

²Postgrad in Genomics Sciences, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Mexico City, Mexico

³Interventional Cardiology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

⁴Department of Pharmacology, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

⁵Department of Endocrinology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

Aim: Was to evaluate the role of seven matrix metalloproteinase (MMP) polymorphisms in the genetic susceptibility to develop myocardial infarction in Mexican individuals.

Methods: Seven polymorphisms in the MMP genes were genotyped by 5' exonuclease TaqMan genotyping assays in 300 patients with myocardial infarction and 300 healthy unrelated controls.

Results: A similar distribution of *MMP2-1306* (rs243865), *MMP2-790* (rs243864), *MMP2-735* (rs22850553), *MMP7-153* (rs11568819), *MMP7-181* (rs11568818), and *MMP12-82* (rs2276109) polymorphisms was observed in both studied groups. On the other hand, patients showed increased frequencies of *MMP2-1575* A allele and *AA* genotype when compared to controls ($pC=0.001$; $OR=1.58$ and $pC=0.036$; $OR=2.37$, respectively). According to the dominant model, individuals with *AG+AA* genotypes had a 1.65-fold increased risk of developing the disease ($p=0.002$). After adjusting for known risk factors, we found a significant contribution of gender, BMI, smoking habit, diabetes mellitus, and hypertension to the inheritance model. In this analysis, individuals with the *-1575 AA* genotype had a 4.23-fold increased risk of developing MI ($p=0.003$). On the other hand, an association of the *MMP12-82* polymorphism with the extent of coronary artery disease (CAD) was observed. In our study, it was possible to distinguish two risk haplotypes and one protective haplotype for this disease in the *MMP2* gene.

Conclusions: The results suggest that the *MMP2-1575* (rs243866) gene polymorphism could be involved in the risk of developing myocardial infarction in Mexican individuals.

J Atheroscler Thromb, 2012; 19:718-727.

Key words; Matrix metalloproteinase, Extracellular matrix, Polymorphisms, Haplotypes, Myocardial infarction

Introduction

Coronary artery disease (CAD) and one of its

Address for correspondence: José Manuel Rodríguez-Pérez, Department of Molecular Biology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan 14080, Mexico City, Mexico

E-mail: josemanuel_rodriguezperez@yahoo.com.mx;

Received: September 15, 2011

Accepted for publication: February 16, 2012

manifestations, myocardial infarction (MI), is a major cause of death worldwide. It is well known that the inflammatory processes, coupled to dyslipidemia, advanced glycation, and infectious agents, play an important role in the progression of atherosclerosis plaque^{1, 2}. The transition of a stable coronary atherosclerotic lesion into a ruptured plaque, with subsequent thrombus formation, results in the clinical manifestation of MI³⁻⁵. Remodeling of the extracellular matrix in the arterial wall occurs during all stages

of CAD, including compensatory remodeling, plaque development, and plaque instability. There is evidence to indicate that disturbances in arterial extracellular matrix remodeling play a key role in the atherosclerotic process. Aberrant extracellular matrix remodeling is a feature of several major cardiovascular diseases and it is thought that dysregulation of matrix metalloproteinases (MMPs) enzymatic activity may be involved in the underlying etiology of these inflammatory diseases. MMPs are a family of Zn^{2+} -dependent endopeptidases capable of cleaving components of the extracellular matrix^{6,7}. Increased expression of several MMPs and the presence of MMP activity has been observed in diseased human arteries and in association with arterial morphological changes in experimental models of atherosclerosis⁸. MMP activity may contribute to the pathogenesis of atherosclerosis by facilitating the migration of vascular smooth muscle cells through the internal elastic lamina into the intima of the vessel wall, where they proliferate and contribute to plaque formation⁹.

In the last decade, several studies have focused on the role of genetic predisposition in the development of this disease. Several polymorphisms of genes that encode MMPs molecules have been studied in MI¹⁰⁻¹³. The results, however, have been inconsistent, with positive and negative associations^{10,11}.

Aim

The aim of the present study was to establish the role of MMP gene polymorphisms in the risk of developing MI in a well-characterized clinical cohort of Mexican Mestizo patients.

Methods

Patients and Controls

The study included 300 Mexican Mestizo patients with MI (251 men and 49 women, mean age 59.01 ± 11.21 years). MI was defined by angina symptoms with ST-segment elevation of 1 mm or more (or development of a new Q wave) in two or more contiguous electrocardiograph leads and/or three times the upper limit of serum creatine phosphokinase (CPK) MB isoenzyme (normal value = 0.6-6.3 ng/mL) in at least one single sample.

A group of 300 healthy unrelated individuals (139 men and 161 women, mean age 59.66 ± 5.91 years) with neither symptoms nor a previous diagnosis of cardiovascular problems and systemic disease was studied as the control group. Calcium score was determined by multi-detector computed tomography in all

control individuals in order to detect subclinical atherosclerosis. The values were zero in these individuals.

For patients and controls who met the inclusion criteria, anthropometric measures and traditional risk factors were recorded. Individuals were considered to have diabetes mellitus type 2 if they had been previously diagnosed, if they were receiving hypoglycemic treatment and/or insulin, or if they had a fasting glucose level of >126 mg/dL on 2 or more occasions. Individuals were considered to have hypertension if they had been previously diagnosed or were receiving previously prescribed antihypertensive therapy. Dyslipidemia was defined as total cholesterol ≥ 200 mg/dL and/or low-density lipoprotein cholesterol ≥ 130 mg/dL and/or triglycerides ≥ 150 mg/dL. Patients were considered to be active smokers if they smoked 5 or more cigarettes a day or had suspended this habit for less than a year. Patients were considered to be active alcohol drinkers if they drank more than 6 g alcohol daily. Body mass index was calculated by a standard formula (weight in kg/height in m^2).

Selective coronary angiography was performed using femoral access in all patients. The extent of CAD was estimated based on the number of stenotic coronary arteries, classified as one-vessel disease or two- or three-vessel disease. Involvement of two vessels meant significant stenosis in two coronary vessels or a narrowing of 50% or more in the left main trunk and involvement of three vessels meant significant stenosis in three coronary vessels. Involvement of one vessel was considered hemodynamically significant with more than a 50% reduction in the diameter of an important vessel (left anterior descending, circumflex or right coronary).

All subjects included (patients and controls) in the study were ethnically matched, and we considered as Mexican Mestizos only those individuals whose ancestors had been born in Mexico for three generations, including their own. A Mexican Mestizo is defined as someone born in Mexico, who is a descendant of the original autochthonous inhabitants of the region and of individuals, mainly Spaniards, of Caucasian and/or African origin, who came to America during the sixteenth century.

The study complied with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the institutional ethics committee, and informed consent was obtained from each participant.

DNA Extraction

Genomic DNA from whole blood containing EDTA was isolated by standard techniques¹⁴.

Table 1. MMP sequence variants

SNP name	Reference SNP	Ch position (pb)	Gene region	Minor/Major allele
<i>MMP2-1575</i>	rs243866	54069038		promoter <i>A/G</i>
<i>MMP2-1306</i>	rs243865	54069307		promoter <i>C/T</i>
<i>MMP2-790</i>	rs243864	54069823		promoter <i>G/T</i>
<i>MMP2-735</i>	rs2285053	54069878		promoter <i>C/T</i>
<i>MMP7-153</i>	rs11568819	102401633		promoter <i>T/C</i>
<i>MMP7-181</i>	rs11568818	102401661		promoter <i>G/A</i>
<i>MMP12-82</i>	rs2276109	102745791		promoter <i>G/A</i>

Genotyping of MMP2, MMP7 and MMP12

The *MMP2-1575* (rs243866), *MMP2-1306* (rs243865), *MMP2-790* (rs243864), *MMP2-735* (rs2285053), *MMP7-153* (rs11568819), *MMP7-181* (rs11568818), *MMP12-82* (rs2276109) single nucleotide polymorphisms were genotyped using 5' exonuclease TaqMan genotyping assays on an ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR system, according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Table 1).

Statistical Analysis

Allele and genotype frequencies of the studied polymorphisms were obtained by direct counting. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated using the Chi-square test. We used descriptive statistics with the mean \pm SD and median with minimum and maximum values in accordance with their distribution. Student's *t*-test or the Mann-Whitney test was performed to compare differences between continuous variables according to their distribution. Significant differences between categorical variables were evaluated using the Chi-square and Fisher's exact test for frequencies lower than 5. The *p*-values were corrected (*p*C) according to the number of specificities tested and the number of comparisons performed, and they were considered statistically significant if their values were < 0.05 . Inheritance hypothesis was tested according to four models: co-dominant, dominant, recessive, and heterozygous advantages. Logistic regression analysis was used bi-variably to estimate the risk of myocardial infarction between patients and controls against the MMP polymorphisms. In addition, logistic regression analysis was performed to estimate the risk of the patients having two or three-vessel disease against the MMP polymorphisms. It included the odds ratio with a confidence interval of 95% (95% CI). Multiple logistic regression analysis was performed to determine the relationship among risk factors, genotype, and MI. Variables with a significance of less than 0.10 in univariate analysis were included

in the multiple logistic regression model. Statistical calculations were performed using SPSS software, version 15.

Pairwise linkage disequilibrium (LD, *D'*) estimations between polymorphisms and haplotype reconstruction were performed with Haploview version 4:1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, USA).

Results

Characteristics of the Study Sample

The demographic and clinical characteristics are shown in Table 2. Similar age distribution was observed between patients and healthy controls; however, as expected, the body mass index, smoking habit, alcohol consumption, type 2 diabetes mellitus, hypertension and dyslipidemia were higher in patients than in healthy controls. In the patient group, 34.4% showed involvement in one vessel and 65.7% in two or three vessels. On the other hand, 6.6% of patients presented with coronary calcification.

Allele and Genotype Frequencies

Observed and expected frequencies of all polymorphic sites were in Hardy-Weinberg equilibrium. A similar distribution of *MMP2-1306* (rs243865), *MMP2-790* (rs243864), *MMP2-735* (rs2285053), *MMP7-153* (rs11568819), *MMP7-181* (rs11568818), and *MMP12-82* (rs2276109) polymorphisms was observed in both studied groups; however, a different distribution of *MMP2-1575* (rs243866) gene polymorphism was observed in patients and healthy controls. Patients showed increased frequencies of *-1575 A* allele and *AA* genotype when compared to controls (*p*C=0.001; OR=1.58; 95% CI=1.21-2.07 and *p*C=0.036; OR=2.37; 95% CI=1.13-5.07, respectively) (Table 3). Inheritance hypothesis for this polymorphism was tested according to four models: co-dominant, dominant, recessive, and heterozygous advantage (Table 4). According to the dominant

Table 2. Cardiovascular risk factor distribution in MI patients and healthy controls

Variable	Patients (n=300)	Controls (n=300)	p value
Age	59.01 ± 11.21	59.66 ± 5.91	0.380
Sex (M/F)	251/49	139/161	<0.001*
BMI (kg/m ²)	27.17 ± 4.09	28.29 ± 4.18	0.002*
Smoking habits			
Smokers	225 (75%)	48 (25%)	<0.001*
Non-smokers	75 (25%)	252 (75%)	
Use of alcohol			
Never use	161 (53.6%)	136 (45.3%)	0.054
≥ 6 g/day use	139 (46.3%)	164 (54.6%)	
Diabetes mellitus			
Yes	139 (46.3%)	41 (13.6)	<0.001*
No	161 (53.6%)	259 (86.3%)	
Hypertension			
Yes	236 (78.6%)	166 (55.3%)	<0.001*
No	64 (21.3%)	134 (44.6%)	
Dyslipidemia			
Yes	218 (72.6%)	206 (68.6%)	0.325
No	82 (27.3%)	94 (31.3%)	
Coronary angiography			
One vessel	103 (34.3%)		
Two or three vessels	197 (65.7%)		
Coronary calcifications	20 (6.6%)		

The variables are expressed as the mean ± standard deviation (SD). BMI = body mass index, M/F = male/female.

* $p < 0.05$

model, individuals with *AG+AA* genotypes had a 1.65-fold increased risk of developing the disease ($p=0.002$). The dominant model was selected in this study based on Akaike information criteria (AIC). In respect to the analysis of the interactions between the dominant model and covariates, after adjusting for known risk factors, we found a significant contribution of gender, BMI, smoking habit, diabetes mellitus, and hypertension to the inheritance model. In this analysis, individuals with the *-1575 AA* genotype had a 4.23-fold increased risk of developing MI ($p=0.003$) (Table 5). When we analyzed the correlation between the polymorphisms and different clinical variables, an association between the *MMP12-82* polymorphism and the extent of CAD was observed. Patients with the *MMP-12 -82 AG+GG* genotypes had a 3.72-fold increased risk of have significant occlusion in two or three vessels ($p=0.041$) (Table 6).

The *MMP-2* polymorphisms (rs243866, rs243865, rs243864, and rs22850553) were in linkage disequilibrium. The analysis of linkage disequilibrium showed three out of seven different possible allele combinations (*ACTC*, *ACTT*, and *ATTC*) with important differences between the studied groups. Patients with MI

showed increased frequencies of "*ACTC*" and "*ACTT*" haplotypes when compared to healthy controls ($p=0.0007$; OR = 2.88, 95% CI = 1.46-5.79 and $p=0.002$, OR = 5.45, 95% CI = 1.49-23.63, respectively). On the other hand, the "*ATTC*" haplotype showed a decreased frequency in patients with MI when compared to healthy controls ($p=0.019$, OR = 0.25, 95% CI = 0.05-0.94) (Table 7).

Discussion

MMP activity may contribute to the pathogenesis of atherosclerosis by facilitating the migration of vascular smooth muscle cells through the internal elastic lamina into the intimal space, where they proliferate and contribute to plaque formation¹⁵⁻¹⁷. Some genome-wide association studies (GWAS) have been performed in cardiovascular diseases; however, the MMP genes were not reported to be associated with these diseases in these studies¹⁸⁻²⁰. Considering that the majority of these GWAS have been performed in Caucasian or European populations, these results do not necessarily provide information about the Mexican population; for example, Europeans are closely

Table 3. Allele and genotype frequencies of MMP-2 polymorphisms in MI patients and healthy controls

		Cases (n=300) (n (%))	Controls (n=300) (n (%))	OR	95% CI	pC
<i>MMP2-1575 A/G</i> (rs243866)						
Alleles	A	180 (30)	128 (21.3)	1.58	1.21-2.07	0.001*
	G	420 (70)	472 (78.7)	0.63	0.48-0.83	0.001*
Genotypes	AA	27 (9)	12 (4)	2.37	1.13-5.07	0.036*
	AG	126 (42)	104 (34.7)			
	GG	147 (49)	184 (61.3)			
<i>MMP2-1306 C/T</i> (rs243865)						
Alleles	C	467 (77.8)	477 (79.5)			
	T	133 (22.2)	123 (20.5)			
Genotypes	CC	181 (60.3)	192 (64)			NS
	CT	105 (35)	93 (31)			
	TT	14 (4.7)	15 (5)			
<i>MMP2-790 G/T</i> (rs243864)						
Alleles	G	131 (21.8)	116 (19.3)			
	T	469 (78.2)	484 (80.7)			
Genotypes	GG	14 (4.7)	12 (4)			NS
	GT	103 (34.3)	92 (30.7)			
	TT	183 (61)	196 (65.3)			
<i>MMP2-735 C/T</i> (rs2285053)						
Alleles	C	465 (77.5)	471 (78.5)			
	T	135 (22.5)	129 (21.5)			
Genotypes	CC	184 (61.4)	187 (62.4)			NS
	CT	97 (32.3)	97 (32.3)			
	TT	19 (6.3)	16 (5.3)			

OR = odds ratio, CI = confidence interval, pC = p corrected, NS = not significant

* $p < 0.05$

related²¹⁾ and their genome has undergone fewer recombination events than Mexicans. Genetic studies of Mexicans have shown that the proportion of Indian and White genes is 56% and 44%, respectively, in the dihybrid model and 3%, 56% and 41% from Blacks, Indian and White in the trihybrid model²²⁻²⁴⁾. Genetic heterogeneity is a well-recognized reason for the failure to replicate genetic association findings. On the other hand, candidate gene studies suggest that SNPs of MMPs appeared to be genetic risk factors for atherosclerosis or coronary artery disease^{25, 26)}. In the present work, we studied seven polymorphisms of the MMP genes in Mexican patients with MI. In only one of these polymorphisms (*MMP2-1575 A/G* (rs243866)), a different distribution was observed in patients when compared to healthy controls. The increased frequency of the *A* allele and *AA* genotype of this polymorphism supports its role as a genetic susceptibility marker for MI in this population. Increased plasma levels of MMP2 in cardiovascular diseases^{27, 28)} and in atherosclerotic plaques of coronary arteries have been

reported²⁹⁾. In a previous study, Harendza *et al.*³⁰⁾ determined the SNP distribution within 1665 bp of the 5'-flanking region of the MMP2 gene. They detected a G-A transition at -1575 bp immediately 5' to the half-palindromic potential estrogen receptor binding site. In estrogen receptor-positive MCF-7 cells, the -1575G allele functioned as an enhancer, whereas the -1575A allele showed reduced transcriptional activity. In this study, a specific region in the gene was analyzed in a specific type of cells; however, in another study, Price *et al.*³¹⁾ reported that the -1575 polymorphism was not functional when tested within the background of other estrogen receptor-negative cells, including HEK293 (embryonic kidney), RAW264.7 (macrophages), and A10 (tubular epithelium) cells. This suggests that the functional effect of the -1575 polymorphism varies depending on cell type. On the other hand, several groups have attempted to define the transcriptional regulatory elements that provide the cellular or tissue-specific levels of MMP2 synthesis. Binding sites for transcription

Table 4. Polymorphism risk analysis as function of the inheritance model in MI patients and healthy controls considering the *MMP2-1575* polymorphism

Inheritance Model	Genotype	OR	95% CI	<i>p</i> value
Co-dominant	<i>GG</i>	1.0		
	<i>AG</i>	1.516	1.081-2.127	NS
	<i>AA</i>	2.816	1.379-5.751	NS
Recessive	<i>AA</i> vs	1.0		
	<i>AG</i> + <i>GG</i>	0.421	0.209-0.848	NS
Dominant	<i>GG</i> vs	1.0		
	<i>AG</i> + <i>AA</i>	1.651	1.194-2.284	0.002*
Hetero adv.	<i>AG</i> vs	1.0		
	<i>GG</i> + <i>AA</i>	0.733	0.527-1.020	NS

OR=odds ratio, CI=confidence interval, * $p < 0.05$

Sample output of association models for binary response. Four inheritance models are fitted, which correspond to different parameters or groups of genotypes. Akaike's Information Criterion (AIC) was used to select the best model for a specific SNP. The inheritance model with the least AIC is dominant. To select the best inheritance model, we applied Akaike's information criterion to choose the model with the most likelihood.

Table 5. Risk assessment in the *MMP2-1575* polymorphism using the dominant inheritance model between patients and healthy controls

Variable	OR	95% CI	<i>p</i> value
Genotypes:			
<i>GG</i>	1		
<i>AG</i>	1.196	0.730-1.959	0.477
<i>AA</i>	4.228	1.617-11.054	0.003*
Gender	6.039	4.114-8.863	<0.001*
BMI (kg/m ²)	0.934	0.894-0.976	0.002*
Smoking habit	15.652	10.316-23.749	<0.001*
Diabetes mellitus	5.479	3.3615-8.303	<0.001*
Hypertension	2.991	2.046-4.372	<0.001*

OR=odds ratio, CI=confidence interval, * $p < 0.05$

factors AP-2, Sp1, Sp3, and RE-1 have been reported in the promoter of the *MMP2* gene^{30, 32}). This suggests that the *-1575 A* variant may be in linkage disequilibrium with other regulatory regions in the promoter of this gene that affects its transcriptional regulation and finally protein levels. On the other hand, it is important to consider that the activity of *MMP-2* is influenced not only by the level of *MMP* expression but also by *MMP* activators and inhibitors. The role of the *-1575 G/A* polymorphism as a susceptibility marker for several diseases is controversial, with positive and negative results reported in the international literature. An association was observed in colorectal cancer³³) and systolic heart failure³⁴), whereas no association was reported in periodontitis³⁵), diabetic retinopathy³⁶), psoriasis³⁷), and coronary triple-vessel dis-

case³⁸). At the present time, no studies have reported a correlation between the *MMP-1575 A/G* polymorphism and inflammatory markers. This point should be considered in the future in order to establish the functional role of this polymorphism and its possible effect in the physiopathogenesis of atherosclerosis. Recently, Alp *et al.* investigated the relationship between genotypes or haplotypes of *-1575 G/A*, *-1306 C/T*, *-790 T/G*, and *-735 C/T* promoter polymorphisms of the *MMP-2* gene and coronary artery disease with or without myocardial infarction history in a Turkish population¹¹). In that study, no significant associations were found between *-1575 G/A*, *-1306 C/T*, and *-790 T/G* polymorphisms and CAD; however, the frequency of the *-735 TT* genotype was significantly lower in the controls than in the patients with MI

Table 6. Polymorphism risk analysis as function of the inheritance model of MMP12-82 in MI patients depending of the extent of CAD (one vessel vs. two or three vessels)

Inheritance Model	Genotype	OR	95% CI	<i>p</i> value
Co-dominant	<i>AA</i>	1.0		
	<i>AG</i>	3.50	0.998-12.378	NS
	<i>GG</i>	ND	ND	---
Recessive	<i>GG</i> vs	1.0		
	<i>AG+AA</i>	ND	ND	---
Dominant	<i>AA</i> vs	1.0		
	<i>AG+GG</i>	3.72	1.058-13.078	0.041*
Hetero adv	<i>AG</i> vs	1.0		
	<i>AA+GG</i>	0.288	0.081-1.017	NS

OR=odds ratio, CI=confidence interval, **p*<0.05, ND=No determined

Sample output of association models for binary response. Four inheritance models are fitted, which correspond to different parameters or groups of genotypes. Akaike's Information Criterion (AIC) was used to select the best model for a specific SNP. The inheritance model with the least AIC is dominant. To select the best inheritance model, we applied Akaike's information criterion to choose the model with the most likelihood.

Table 7. MMP2 haplotype frequencies in MI patients and healthy controls

Haplotypes	Frequencies		OR (95% CI)	<i>p</i> value
	MI	Controls		
(rs243866, 243865, 243864, 2285053)				
<i>GCTC</i>	0.489	0.545		
<i>GCTT</i>	0.192	0.203		
<i>ATGC</i>	0.204	0.166		
<i>ACTC</i>	0.060	0.021	2.88 (1.46-5.79)	0.0007*
<i>ACTT</i>	0.027	0.005	5.45 (1.49-23.63)	0.002*
<i>GCGC</i>	0.009	0.020		
<i>ATTC</i>	0.005	0.020	0.25 (0.05-0.94)	0.019*

MI=Myocardial infarction, OR=odds ratio, CI=confidence interval, **p*<0.05

The order of polymorphisms in the haplotypes is according to their positions on the chromosome.

when compared with the *CC* genotype. The different results obtained in that study could be due to ethnic differences or the different methods used in the determinations.

Polymorphisms of the MMPs have been studied in patients with MI in several populations, including Mexicans; however, the results have been contradictory, with positive and negative associations. Delgado-Enciso *et al.* studied the *MMP-2 -1306* polymorphism in Mexican patients with MI and reported that the *CC* genotype increased the risk of developing MI in this ethnic group¹⁰. In our study we analyzed this polymorphism; however, we did not detect an association. The principal difference in both studies is the number of patients included in the studies, the tech-

niques used in the determinations and the number of polymorphisms analyzed. In the report of Delgado-Enciso *et al.*, only 98 patients were included as compared to the 300 patients analyzed in our study. We determined seven polymorphisms in different MMP genes using TaqMan assays whereas Delgado-Enciso *et al.* determined only one SNP by PCR-RFLP. The association of the *-1306* polymorphism with MI was not corroborated in a large study of a Caucasian population³⁹; this result agrees with our report.

When we considered the clinical features and the polymorphisms, according to the dominant model, an association of the *MMP12-82* polymorphism with the extent of CAD was observed. Patients with the *AG+GG* genotypes showed a 3.72-fold risk of 2-3-vessel

coronary disease compared with patients with the *AA* genotype. The *MMP12-82* polymorphism is located in the activator protein-1 (AP-1) transcription factor binding site. *In vitro* studies have detected the low binding affinity of AP-1 to the *G* allele of this polymorphism, producing lower MMP12 promoter activity⁴⁰. This polymorphism was studied in 367 patients with CAD, and the *G* allele, which shows lower transcriptional activity *in vitro*, was associated with a greater luminal diameter in patients with diabetes undergoing angioplasty with stent implantation⁴⁰. This agrees with our results, in which we detected an association of the *AG+GG* genotypes with the increased risk of having occlusions in two or three vessels.

In our haplotype analysis, we detected two haplotypes (*ACTC* and *ACTT*) with increased frequencies in patients and one haplotype (*ATTC*) with decreased frequency. As can be seen, the principal difference between the risk and protective haplotypes is the presence of the *C* allele in position *-1306* in the risk haplotypes. As commented previously, this polymorphism was associated with MI in another group of Mexican patients with MI.

Conclusion

In summary, our data suggest that the *MMP2-1575 A/G* polymorphism plays an important role in the risk of developing MI. In our study, it was possible to distinguish two risk haplotypes and one protective haplotype for this disease in the MMP2 gene. The *MMP12 -82* polymorphism was associated with the number of injured vessels. Additional studies in other populations could help to define the true role of these markers as risk factors for the development of MI.

Acknowledgements

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for a PhD degree by Nonanzit I. Pérez-Hernández of the Graduate Studies program in Genomics Sciences of the Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

This work was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project number 106012). The authors are grateful to the study participants. Institutional Review Board approval was obtained for all sample collections.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing interests regarding the manuscript.

References

- 1) Libby P: Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002; 420: 868-874
- 2) Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J: Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25: 2054-2061
- 3) Achar SA, Hundu S, Norcross WA: Diagnosis of acute coronary syndrome. *Am Fam Physician*, 2005; 72: 119-126
- 4) Mouco OM, Nicolau JC, Souza Tda R, Maia LN, Ramires JA: Inflammatory markers of atherosclerotic plaque stabilization after acute coronary event-temporal trends. *Arq Bras Cardiol*, 2006; 87: 28-36
- 5) Mälärstig A, Wallentin L, Siegbahn: Genetic variation in the interleukin-6 gene in relation to risk and outcomes in acute coronary syndrome. *Thromb Res*, 2006; 119: 467-473
- 6) Falk E: Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 2006; 47: C7-12
- 7) Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JE, Daemen MJ: Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*, 2001; 89: 201-210
- 8) Newby AC: Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*, 2005; 85: 1-31
- 9) Johnson C, Galis ZS: Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004; 24: 54-60
- 10) Delgado-Enciso I, Gonzalez-Hernandez NA, Baltazar-Rodriguez LM, Millan-Guerrero RO, Newton-Sanchez O, Bayardo-Noriega A, Aleman-Mireles A, Enriquez-Maldonado IG, Anaya-Carrillo MJ, Rojas-Martinez A, Ortiz-Lopez R: Association of matrix metalloproteinase-2 gene promoter polymorphism with myocardial infarction susceptibility in a Mexican population. *J Genet*, 2009; 88: 249-252
- 11) Alp E, Menevse S, Tulmac M, Yilmaz A, Yalcin R, Cengel A: The role of matrix metalloproteinase-2 promoter polymorphisms in coronary artery disease and myocardial infarction. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2011; 15: 193-202
- 12) Terashima M, Akita H, Kanazawa K, Inoue N, Yamada S, Ito K, Matsuda Y, Takai E, Iwai C, Kurogane H, Yoshida Y, Yokoyama M: Stromelysin promoter 5A/6A polymorphism is associated with acute myocardial infarction. *Circulation*, 1999; 99: 2717-2719
- 13) Wang L, Ma YT, Xie X, Yang Yn, Fu ZY, Liu F, Li XM, Chen BD: Association of MMP9 gene -1562 C/T polymorphism with myocardial infarction in Uighur population of Xinjiang. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2011; 28: 180-184
- 14) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988; 16: 1215
- 15) Mtaïrag el M, Houard X, Rais S, Pasquier C, Oudghri M,

- Jacob MP, Meilhac O, Michael JB: Pharmacological potentiation of natriuretic peptide limits polymorphonuclear neutrophil-vascular cell interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002; 22: 1824-1831
- 16) Davies MJ, Thomas AC: Plaque fissuring-the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J*, 1985; 53: 363-373
 - 17) Ravn HB, Falk E: Histopathology of plaque rupture. *Cardiol Clin*, 1999; 17: 263-270
 - 18) Ndiaye NC, Azimi Nehzad M, El Shamieh S, Stathopoulou MG, Visvikis-Siest S: Cardiovascular diseases and genome-wide association studies. *Clin Chim Acta*, 2011; 412: 1697-701
 - 19) Lettre G, Palmer CD, Young T, Ejebe KG, Allayee H, Benjamin EJ, Bennett F, Bowden DW, Chakravarti A, Dreisbach A, Farlow DN, Folsom AR, Fornage M, Forrester T, Fox E, Haiman CA, Hartiala J, Harris TB, Hazen SL, Heckbert SR, Henderson BE, Hirschhorn JN, Keating BJ, Kritchevsky SB, Larkin E, Li M, Rudock ME, McKenzie CA, Meigs JB, Meng YA, Mosley TH, Newman AB, Newton-Cheh CH, Paltoo DN, Papanicolaou GJ, Patterson N, Post WS, Psaty BM, Qasim AN, Qu L, Rader DJ, Redline S, Reilly MP, Reiner AP, Rich SS, Rotter JL, Liu Y, Shrader P, Siscovick DS, Tang WH, Taylor HA, Tracy RP, Vasani RS, Waters KM, Wilks R, Wilson JG, Fabsitz RR, Gabriel SB, Kathiresan S, Boerwinkle E: Genome-wide association study of coronary heart disease and its risk factors in 8,090 African Americans: the NHLBI CARE Project. *PLoS Genet*, 2011; 7: e1001300
 - 20) Preuss M, König IR, Thompson JR, Erdmann J, Absher D, Assimes TL, Blankenberg S, Boerwinkle E, Chen L, Cupples LA, Hall AS, Halperin E, Hengstenberg C, Holm H, Laaksonen R, Li M, März W, McPherson R, Musunuru K, Nelson CP, Burnett MS, Epstein SE, O'Donnell CJ, Quertermous T, Rader DJ, Roberts R, Schillert A, Stefansson K, Stewart AF, Thorleifsson G, Voight BF, Wells GA, Ziegler A, Kathiresan S, Reilly MP, Samani NJ, Schunkert H; CARDIoGRAM Consortium. Design of the Coronary ARtery Disease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis (CARDIoGRAM) Study: A Genome-wide association meta-analysis involving more than 22 000 cases and 60 000 controls. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010; 3: 475-483
 - 21) Rosenberg NA, Huang L, Jewett EM, Szpiech ZA, Jankovic I, Boehnke M: Genome-wide association studies in diverse populations. *Nat Rev Genet*, 2010; 11: 356-366
 - 22) Lisker R, Perez-Briceno R, Granados J, Babinsky V: Gene frequencies and admixture estimates in the State of Puebla, Mexico. *Am J Phys Anthropol*, 1988; 76: 331-335
 - 23) Lisker R, Ramírez E, Pérez G, Díaz R, Siperstein M, Mutchinick O: Genotypes of alcohol-metabolizing enzymes in Mexicans with alcoholic liver cirrhosis. *Arch Med Res*, 1995; 26: S63-S67
 - 24) Lisker R, Ramírez E, Babinsky V: Genetic structure of autochthonous populations of Meso-America: Mexico. *Hum Biol*, 1996; 6: 395-404
 - 25) Pöllänen PJ, Karhunen PJ, Mikkelsen J, Laippala P, Perola M, Penttilä A, Mattila KM, Koivula T, Lehtimäki T: Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene: an autopsy study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001; 21: 1446-1450
 - 26) Abilleira S, Bevan S, Markus HS: The role of genetics variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis. *J Med Genet*, 2006; 43: 897-901
 - 27) Hojo Y, Ikeda U, Ueno S, Arakawa H, Shimada K: Expression of matrix metalloproteinases in patients with acute myocardial infarction. *Jpn Circ J*, 2001; 65: 71-75
 - 28) Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T: Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 1998; 32: 368-372
 - 29) Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, de Kleijn DP, Teepen H, van der Wal AC, Borst C: Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis*, 2000; 150: 245-253
 - 30) Harendza S, Lovett DH, Panzer U, Lukacs Z, Kuhn I, Stahl RA: Linked common polymorphisms in the gelatinase a promoter are associated with diminished transcriptional response to estrogen and genetic fitness. *J Biol Chem*, 2003; 278: 20490-20499
 - 31) Price SJ, Greaves DR, Watkins H: Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene. *J Biol Chem*, 2001; 276: 7549-7558
 - 32) Quin H, Sun Y, Benveniste EN: The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem*, 1999; 274: 29130-29137
 - 33) Xu E, Xia X, Lü B, Xing X, Huang Q, Ma Y, Wang W, Lai M: Association of matrix metalloproteinase-2 and -9 promoter polymorphisms with colorectal cancer in Chinese. *Mol Carcinog*, 2007; 46: 924-929
 - 34) Hua Y, Song L, Wu N, Lu X, Meng X, Gu D, Yang Y: Polymorphisms of MMP-2 gene are associated with systolic heart failure risk in Han Chinese. *Am J Med Sci*, 2009; 337: 344-348
 - 35) Holla LI, Fassmann A, Vasku A, Goldbergova M, Beranek M, Znojil V, Vanek J, Vacha J: Genetic variations in the human gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) promoter are not associated with susceptibility to, and severity of, chronic periodontitis. *J Periodontol*, 2005; 76: 1056-1060
 - 36) Beránek M, Kolar P, Tschoplova S, Kankova K, Vasku A: Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis*, 2008; 14: 1114-1121
 - 37) Vasku V, Bienertova Vasku J, Slonková V, Kanková K, Vaskú A: Matrix metalloproteinase-2 promoter variability in psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 2009; 301: 467-473
 - 38) Vasku V, Goldbergová M, Izakovicová Hollá L, Sisková L, Groch L, Beránek M, Tschöplová S, Znojil V, Vácha J: A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease. *Matrix Biol*, 2004; 22: 585-591

- 39) Horne BD, Camp NJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, Kolek MJ, Nicholas ZP, Anderson JL: Multiple-polymorphism associations of 7 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor metalloproteinase genes with myocardial infarction and angiographic coronary artery disease. *Am Heart J*, 2007; 154: 751-758
- 40) Jormsjö S, Ye S, Moritz J, Walter DH, Dimmeler S, Zeiher AM, Henney A, Hamsten A, Eriksson P: Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease. *Circ Res*, 2000; 86: 998-1003

***MMP-9* (rs3918242) gene polymorphism is associated with myocardial infarction in Mexican patients.**

Short title: MMP polymorphisms in myocardial infarction.

José Manuel Rodríguez-Pérez¹, Gilberto Vargas-Alarcón¹, Rosalinda Posadas-Sánchez², Tania Ximena Zagal-Jiménez¹, Ricardo Ortíz-Alarcón¹, Benjamín Valente-Acosta¹, Carlos Tovilla-Zárate³, Cristina Nostroza-Hernández¹, Oscar Pérez-Méndez¹, Nonanzit Pérez-Hernández^{1, 4*}.

José Manuel Rodríguez-Pérez and Gilberto Vargas-Alarcón contributed equally to this work.

¹ Department of Molecular Biology, and ² Department of Endocrinology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, ZC 14080, Mexico City, Mexico.

³ Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica Multidisciplinaria de Comacalco, ZC 86040, Tabasco, México.

⁴ Graduate School of Genomic Sciences, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, ZC 03100, Mexico City, Mexico.

*Corresponding author: Nonanzit Pérez-Hernández. Department of Molecular Biology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan 14080, Mexico City, Mexico. Tel: (+52-55) 55732911, Ext: 1460, e-mail: unicanona@yahoo.com.mx

ABSTRACT

Several studies have demonstrated that matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in atherosclerotic plaque disruption and lead to myocardial infarction (MI). The aim of the present study was to evaluate the role of the *MMP1* -1607 1G/2G (rs1799750), *MMP3* -1612 5A/6A (rs3025058) and *MMP9* -1562 C/T (rs3918242) polymorphisms in the risk of developing MI in a cohort of Mexican mestizo patients. The genotype analysis was performed using PCR-RFLP technique in a group of 236 patients with MI and 285 healthy controls. A similar distribution of rs1799750, and rs3025058 was observed in both groups; however, the *MMP-9* rs3918242 T allele and CT genotype were associated with risk of developing MI (OR = 2.32, pC = 0.02 and OR = 2.40, pC = 0.02). Multiple logistic analysis was performed between MI patients and controls to estimate risk, and after adjusting for known risk factors, CT + TT genotypes of *MMP-9* rs3918242 were significantly associated with increased risk of developing MI compared to CC genotype (OR = 2.88, P < 0.01). In summary, our results suggest that rs3918242 polymorphism in *MMP9* gene plays an important role in the risk of developing MI.

Key words: Matrix metalloproteinase; Polymorphisms; Myocardial infarction; Atherothrombosis.

INTRODUCTION

Globally, coronary artery disease (CAD) is one of the main mortality causes, in which myocardial infarction (MI) is one of the main clinical presentation of this pathology. The MI is a complex disease involving underlying interaction of genetic and environmental factors. Current evidence indicates that disturbances in arterial extracellular matrix remodeling play a key role in the atherosclerotic process. Metalloproteinases (MMPs) activity may contribute to the pathogenesis of atherosclerosis by facilitating the migration of vascular smooth muscle cells through the internal elastic lamina into the intima of the vessel wall, where they proliferate and contribute to plaque formation (Newby, 2005; Herzog *et al.*, 1998). The MMPs are a family of zinc-dependent endopeptidases responsible for degrading extracellular components (Falk, 2006; Creemers *et al.*, 2001). Each MMP has different substrate specificities (Ratnikov *et al.*, 2014). Previous studies have suggested that MMPs may play a role in the development of many diseases, such as, spontaneous early pregnancy failure (Nissi *et al.*, 2013), solid and hematological malignancies (Chaudhary *et al.*, 2013), and abdominal aortic aneurysms (Duellman *et al.*, 2012). Several polymorphisms in genes that encode MMP molecules have been studied in cardiovascular diseases (Opstad *et al.*, 2014; Chehaibi *et al.*, 2014; Olsen *et al.*, 2014). It is important to notice that association studies results may vary between populations due to interpopulation genetic differences, including differences in allele frequencies and linkage disequilibrium structure (Neale and Sham 2004). The interindividual variation in CAD risk is heritability, indicating that genetic risk factors play a critical role in pathogenesis. Therefore, the aim of the present study was to analyze the association between polymorphisms in *MMP-1*, *MMP-3*, and *MMP-9* genes with MI in Mexican Mestizo population. We also analyzed the relationship between *MMP* gene polymorphisms and cardiovascular risk factors.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

All participants provided written informed consent, and the study complies with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". This report included 236 Mexican mestizo patients with previous history MI (194 men and 42 women). MI was clinically characterized by classic angina symptoms and defined as an elevation of 1 mm or more of the ST-segment, as well as the development of a Q wave in two or more contiguous electrocardiographic records, and/or thrice the upper limit of serum creatine phosphokinase (CPK) MB isoenzyme (normal value = 0.6-6.3 ng/mL) in at least one sample of peripheral blood.

A group of 285 healthy unrelated individuals (134 men and 151 women) that did not have any angina symptoms or a previous diagnosis of cardiovascular or systemic disease (corroborated clinically and by electrocardiography) was used as control group. Coronary calcium score was determined by multidetector computed tomography to detect subclinical atherosclerosis; all control individuals were required to have a value of zero. Anthropometric measures were recorded and through a past medical history information was collected on traditional risk factors in all patients and controls who met

the inclusion criteria. We used clinical criteria to find type 2 diabetes mellitus patients: serum glucose level of 126 mg/dL or higher in two samples, a previous diagnosis or current hypoglycemic treatment and/or insulin. Hypertensive patients were established by a previous diagnosis or an active antihypertensive therapy. Dyslipidemia was correspondingly defined as total cholesterol of 200 mg/dL or higher, low-density lipoprotein cholesterol \geq 130 mg/dL or serum triglycerides of 150 mg/dL or higher. Active smokers were identified by a consumption habit of 5 or more tobacco cigarettes a day, or a cessation of less than a year.

Individuals were considered to be active alcohol drinkers if they drank more than 6 g daily. Body mass index was calculated by a standard formula (weight in kg/ squared height in m²). Selective coronary angiography was performed by femoral access in all patients. The extent of CAD was estimated based on the number of stenotic coronary arteries, classified as one-vessel disease or two- or three-vessel disease. Involvement of two vessels meant significant stenosis in two coronary vessels or a narrowing of 50% or more in the left main trunk and involvement of three vessels meant significant stenosis in three coronary vessels. Involvement of one vessel was considered hemodynamically significant with more than a 50% reduction in the diameter of an important vessels (left anterior descending, circumflex or right coronary).

A Mexican Mestizo is defined as someone born in Mexico, who is descendant of the original autochthonous inhabitants of the region and of individuals, mainly Spaniards, of Caucasian and/or African origin, who came to America during the colonization period. Therefore, all subjects included in the study (patients and controls) were ethnically matched, and was considered as Mexican Mestizo only those individuals who had been born in Mexico for three generations, including their own.

DNA extraction

Genomic DNA from whole blood containing EDTA was isolated by conventional methods (Lahiri and Nurnberger., 1991).

Polymorphism analysis (MMP-1, MMP-3 and MMP-9)

MMP1 -1607 1G/2G (rs1799750), *MMP3* -1612 5A/6A (rs3025058) and *MMP9* -1562 C/T (rs3918242) polymorphisms were determined using the RFLP technique (Table 1).

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies of the examined polymorphisms were obtained by direct counting. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was estimated using the chi-square test. Statistical analysis was carried out with SPSS for Windows. Comparison of numerical variables, between both groups, was performed with Mann Whitney *U* test; data are presented as median, and 25 and 75 percentiles. Categorical variables were analyzed with chi-squared or Fisher test as required, and presented as absolute frequencies and proportions. Statistical significance was set at $P < 0.05$. Multiple logistic analysis was used to test for association of polymorphism with MI adjusted for gender, smoking habits, diabetes mellitus, and hypertension. All *P* values quoted were corrected (pC) by Bonferroni test for multiple comparisons.

RESULTS

Sample characteristics

The clinical and demographic characteristics of the study groups are shown in Table 2. As expected, type 2 diabetes mellitus, hypertension and smoking habits were more frequent in patients than in healthy controls. In the patient group, 6.3% showed no occluded vessels, 32.6% exhibited a one-vessel occlusion, 30.1% a two-vessel occlusion and 30.9% a three-vessel occlusion. Moreover, 9.7% of patients presented coronary calcification.

Allele and genotype frequencies

Allele and genotype frequencies of *MMP1* -1607 1G/2G (rs1799750), *MMP3* -1612 5A/6A (rs3025058), and *MMP9* -1562 C/T (rs3918242) gene polymorphisms in MI patients and healthy controls are shown in Table 3. Observed and expected frequencies of all polymorphic sites were in Hardy-Weinberg equilibrium. A similar distribution of *MMP1* -1607 2G/1G (rs1799750) and *MMP3* -1612 5A/6A (rs3025058) was observed in both groups; however, a different distribution of *MMP9* -1562 C/T (rs3918242) gene polymorphism was observed in patients and healthy controls. MI patients showed increased frequencies of *T* allele and *CT* genotype when compared to healthy controls (OR = 2.32; 95% CI = 1.15-4.73; pC = 0.02 and OR = 2.40; 95% CI = 1.17-4.97; pC = 0.02, respectively). On the other hand, *MMP9* -1562 C/T (rs3918242) *C* allele and *CC* genotype decreased in MI patients when compared to healthy controls (OR= 0.43; 95% CI= 0.21-0.87; pC= 0.02 and OR= 0.42; 95% CI= 0.20-0.86; pC= 0.02, respectively). Multiple logistic analysis was used to estimate the risk between MI patients and controls adjusted by gender, smoking habits, diabetes mellitus, and hypertension. In this analysis, the *MMP9* -1562 (rs3918242) *CT* + *TT* genotypes were significantly associated with risk of developing MI compared to *CC* genotype (OR = 2.88; 95% CI = 1.18-6.99; P < 0.01) (data not shown).

DISCUSSION

The pathophysiology of MI includes the transition of a stable coronary atherosclerotic lesion into a ruptured plaque. After the rupture, a thrombus is formed, which is conducive to and hypoxic lesion the clinical manifestation as MI. MMPs, mainly synthesized by infiltrating cells, degrade the extracellular matrix and contribute to the weakening of the cap and its subsequent rupture (Brown *et al.*, 1995). Remarkably, polymorphisms in *MMP* genes have been studied in several diseases with contradictory results (Zhi *et al.*, 2010; Alp *et al.*, 2009; Alp *et al.*, 2011). Association of these polymorphisms has been observed in CAD (Opstad *et al.*, 2013), and intracerebral hemorrhage (Yang *et al.*, 2014). In the present work, we studied three *MMP* gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with MI. The distribution of both *MMP1* -1607 1G/2G (rs1799750) polymorphism and *MMP3* -1612 5A/6A (rs3025058) polymorphism was similar in both groups. However, we found a different distribution of -1562 (rs3918242) polymorphism in *MMP9* gene compared to healthy controls. The increased frequency of *T* allele and *CT* genotype of this polymorphism supports its role as a genetic susceptibility marker for MI in this population. In fact, increased levels of

MMP9 in atherosclerotic plaques of coronary arteries have been reported (Pasterkamp *et al.*, 2000).

The polymorphic sites were selected based on previous association studies in cardiovascular diseases and their important role at the functional level. *MMP-1* 1G and 2G alleles differ in the insertion of one guanine nucleotide. The polymorphism site is located in the position -1607 relative to the transcriptional start site of the gene. The transcriptional activity of 2G allele is 20 times stronger than that of 1G. Hence, carriers of the former allele will overexpress MMP-1, which can lead to a diminished collection of collagen. This is known to induce atherosclerosis (Ye, 2000).

As for 5A and 6A alleles of *MMP-3* gene, they differ in a single adenine insertion and include either five or six adenine nucleotides at -1612 in the promoter region. Both homozygous and heterozygous carriers of 5A allele have a higher risk of CAD than 6A carriers, since the transcriptional activity of 5A allele is twice as active. (Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2003).

MMP-9 polymorphisms are caused by a single C/T base change at -1562 (promoter region). Unlike C allele, T allele is associated with CAD, since it enhances gene expression (Ye, 2000).

Román-García *et al.* evaluated three *MMP-1* polymorphisms (rs11292517, rs1144393, and rs514921) in 261 male patients with MI. They found no association of MI with *MMP-1* polymorphisms (Roman-García *et al.*, 2009). These results are in agreement with our report, since we also found that the same gene (albeit a different variant) was not associated with the disease.

In another report, Sakowicz *et al.* analyzed seventeen polymorphisms in fifteen candidate genes. Among them, *MMP-3* -1612 5A/6A (rs3025058) and *MMP-9* -1562 (rs3918242) gene polymorphisms were examined in a cohort of 271 patients with MI and 141 healthy controls in a white Caucasian population (Sakowicz *et al.*, 2013). They reported that *MMP-3* -1612 5A/6A (rs3025058) polymorphism was associated with advanced stenosis in arterial vessels, whereas *MMP-9* -1562 (rs3918242) T allele was associated with hypertension and a higher risk of MI. In our report, we did not detect an association of the -1612 5A/6A (rs3025058) polymorphism in *MMP-3* gene with the disease. As for *MMP-9* -1562 (rs3918242) polymorphism, their finding is in line with our results: when a logistic regression analysis was performed to determine the association of cardiovascular risk factors with the CT + TT genotypes of this polymorphic site, we found an association only with *MMP-9* -1562 (rs3918242).

In addition, Quintao *et al.* reported a case-control study, in which they examined nine polymorphisms in *MMP-1* gene in 438 healthy controls and 411 patients with CAD from a Chinese Han population. Their analysis revealed a weak association between the rs1799750 polymorphism and CAD, while we found no association with the same polymorphism (Quintao *et al.*, 2014). This discrepancy may be related to differences in genetic background in the study population or in the selection of patients and healthy controls. Further, Sewelam *et al.* studied the association of *MMP-3* and *MMP-9* gene polymorphisms with MI in Egyptian population and reported the association of the *MMP-3* -1612 5A/6A (rs3025058) and *MMP-9* -1562 (rs3918242) CT + TT genotypes with risk of developing MI. In our study, the same polymorphic sites were analyzed. However, we only detected an association with CT + TT genotypes of *MMP-9* -1562

(rs3918242) polymorphism. The principal difference in both studies is the number of patients included, and the number of polymorphisms analyzed. In their report, Sewelam *et al.* included only 40 patients as compared to the 236 patients analyzed in our study. We examined three polymorphisms in different *MMP* genes, whereas Sewelam *et al.* analyzed only two polymorphisms (Sewelam *et al.*, 2013). The association of *MMP-1 -1607 1G/2G* (rs1799750) and *MMP-3 -1612 5A/6A* (rs3025058) polymorphisms with MI was not corroborated in a large study of a Caucasian population, and only the *MMP-9 -1562* (rs3918242) was associated with MI (Horne *et al.* 2007). This is congruent with our results. Recently Nie *et al.*, found that *MMP-9 -1562* (rs3918242) *T* allele was associated with a 1.5 fold increase of ischemic stroke risk in Chinese population (Nie *et al.*, 2014). Importantly, this finding is in line with our results.

The main strength of this study is the use of a coronary calcium score via computed tomography. This is a specific method to evaluate coronary calcium level, therefore was the test employed to diagnose subclinical atherosclerosis. Indeed, control individuals were selected if they had a coronary artery calcium level of zero (CAC=0). We only selected patients where the MI etiology presented was atherosclerotic plaque disruption. The reason is that the relevance of MMPs lies in the degradation of the extracellular matrix of coronary plaque, including the thinning of the fibrous cap. These study strength must be consider when comparing our findings with similar studies.

Study limitations need to be addressed. This study only included the analysis of one polymorphism of each gene. Also, findings are based on a limited sample size. We thus suggest interpreting them with caution.

In summary, our data suggest the association of functional polymorphism in the promotor region of the *MMP-9* gene with risk of developing MI in the Mexican Mestizo population. Although, this is the largest study done in this population, our data is preliminary due to the sample size. Consequently, additional studies in larger populations will be required, to define the true genetic role of this polymorphisms in MI.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project number 106012). The authors are grateful to the study participants. Institutional Review Board approval was obtained for all sample collections.

REFERENCES

Alp E, Menevse S, Tulmac M, Kan D, et al. (2009). Lack of association between matrix metalloproteinase-9 and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in Turkish population. *DNA Cell Biol* 28: 343-350.

Alp E, Menevse S, Tulmac M, Yilmaz A, et al. (2011). The role of matrix metalloproteinase-2 promoter polymorphisms in coronary artery disease and myocardial infarction. *Genet Test Mol Biomarkers* 15: 193-202.

Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, et al. (1995). Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation* 91: 2125-2131.

Chaudhary AK, Pandya S, Ghosh K and Nadkarni A. (2013). Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and hematological malignancies: an overview. *Mutat Res* 753: 7-23.

Chehaibi K, Hrira MY, Nouria S, Maatouk F, et al. (2014). Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and the risk of ischemic stroke in a Tunisian population. *J Neurol Sci* 342: 107-113.

Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF and Daemen MJ. (2001). Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 89: 201-210.

Duellman T, Warren CL, Peissig P, Wynn M, et al. (2012). Matrix metalloproteinase-9 genotype as a potential genetic marker for abdominal aortic aneurysm. *Circ. Cardiovasc. Genet* 5: 529-537.

Falk E. (2006). Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 47: C7-12.

Fang S, Jin X, Wang R, Li Y, et al. (2005). Polymorphisms in the MMP1 and MMP3 promoter and non-small cell lung carcinoma in North China. *Carcinogenesis* 26: 481-486.

Herzog E, Gu A, Kohmoto T, Burkhoff D, et al. (1998). Early activation of metalloproteinases after experimental myocardial infarction occurs in infarct and non-infarct zones. *Cardiovasc Pathol* 7: 307-12.

Horne BD, Camp NJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, et al. (2007). Multiple-polymorphism associations of 7 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor metalloproteinase genes with myocardial infarction and angiographic coronary artery disease. *Am Heart J* 154: 751-758.

Lahiri DK and Nurnberger JI Jr. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19: 5444.

Liu PY, Chen JH, Li YH, Wu HL, et al. (2003). Synergistic effect of stromelysin-1 (matrix metallo-proteinase-3) promoter 5A/6A polymorphism with smoking on the onset of young acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 90: 132-139.

Liu PY, Li YH, Tsai WC, Tsai LM, et al. (2005). Stromelysin-1 promoter 5A/6A polymorphism is an independent genetic prognostic risk factor and interacts with smoking cessation after index premature myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 3: 1998-2005.

Medley TL, Cole TJ, Dart AM, et al. (2004). Matrix metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1479-1484.

Neale BM and Sham PC. (2004). The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet* 75: 353-362.

Newby AC. (2005). Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 85: 1-31.

Nie SW, Wang XF and Tang ZC. (2014). Correlations between MMP-2/MMP-9 promoter polymorphisms and ischemic stroke. *Int J Clin Exp Med*. 7: 400-404.

Nissi R, Talvensaari-Mattila A, Kotila V, Niinimäki M, et al. (2013). Circulating matrix metalloproteinase MMP-9 and MMP-2/TIMP-2 complex are associated with spontaneous early pregnancy failure. *Reprod Biol Endocrinol* 11: 2.

Olsen V, Rohde LE, Beck-da-Silva L, Santos KG, et al. (2014). QRS widening rates and genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases in a cohort of patients with chronic heart failure. *Can J Cardiol* 30: 345-351.

Opstad TB, Arnesen H, Pettersen AA and Seljeflot I. (2014). The MMP-9 -1562 C/T polymorphism in the presence of metabolic syndrome increases the risk of clinical events in patients with coronary artery disease. *PLoS One* 9: e106816.

Opstad TB, Pettersen AA, Arnesen H and Seljeflot I. (2013). The co-existence of the IL-18+183 A/G and MMP-9 -1562 C/T polymorphisms is associated with clinical events in coronary artery disease patients. *PLoS One*. 8: e74498.

Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, de Kleijn DP, et al. (2000). Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis* 150: 245-253.

Qintao C, Yan L, Changhong D, Xiaoliang G, et al. (2014). Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase-1 and coronary artery disease susceptibility: a case-control study in a Han Chinese population. *Genet Test Mol Biomarkers* 18: 826-831.

Ratnikov BI, Cieplak P, Gramatikoff K, Pierce J, et al. (2014). Basis for substrate recognition and distinction by matrix metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E4148-55.

Román-García P, Coto E, Reguero JR, Cannata-Andía JB, et al. (2009). Matrix metalloproteinase 1 promoter polymorphisms and risk of myocardial infarction: a case-control study in a Spanish population. *Coron Artery Dis* 20: 383-386.

Sakowicz A, Fendler W, Lelonek M, Sakowicz B, et al. 2013. Genetic polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients under 45 years of age. *Biochem Genet* 51: 230-242.

Sewelam NI, Radwan ER, Andraos AW, Ibrahim BE, et al. (2013). Association between the polymorphisms of matrix metalloproteinases 9 and 3 genes and risk of myocardial infarction in Egyptian patients. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 14: 143-148.

Yang J, Lin S, Zhou J, Wu B, et al. (2014). Genetic variations of MMP9 gene and intracerebral hemorrhage outcome: a cohort study in Chinese Han population. *J Neurol Sci* 343: 56-59.

Ye S. (2000). Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol* 19: 623-629.

Zhi H, Wang H, Ren L, Shi Z, et al. (2010). Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 and risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Mol Biol Rep* 37: 13-20.

Table 1. Primer Sequences for *MMP1*, *MMP3* and *MMP9* Polymorphisms.

Gene	Polymorphisms	Foward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Enzyme	Size	References
MMP1	-1607 1G/2G (rs1799750)	TGACTTTTAAAACATAGTCTATGTTCA	TCTTGATTGATTTGAGATAAGTCATAGC	<i>AluI</i>	2G 269pb 1G 241+28pb 1G/2G 269+241+28pb	Fang et al., 2005.
MMP3	-1612 5A/6A (rs3025058)	GGTTCTCCATTCTTTGATGGGGGAAAGA	CTTCCTGGAATTTACATCACTGCCACCACT	<i>PstI</i> (<i>Tth1111</i>)	6A 129pb 5A 97+32pb 5A/6A 129+97+32pb	Fang et al., 2005.
MMP9	-1562 C/T (rs3918242)	GCCTGGCACATAGTAGGCC	CTTCCTAGCCAGCCGGCATC	<i>PaeI</i> (<i>SphI</i>)	CC 435pb TT 188pb CT 435+247+188pb	Medley et al., 2004.

Table 2. Clinical baseline of the study groups.

Variable	Control group (n=285)			MI patients (n=236)			P value
	P25	Median	P75	P25	Median	P75	
Age (years)	55	58	63	52	59	66	NS
Gender		(n(%))			(n(%))		
Male		134 (47%)			194 (82%)		<0.001
Female		151 (53%)			42 (17.8%)		
BMI (kg/m ²)	26	28	30.5	25	27	29	0.002
Obese (%)							
Yes		71 (24.9%)			37 (15.6%)		0.014
No		214 (75.1%)			199 (84.4%)		
Type 2 diabetes mellitus (%)							
Yes		37 (13%)			102 (43.2%)		<0.001
No		248 (87%)			134 (56.8%)		
Hypertension (%)							
Yes		145 (50.9%)			171 (72.5%)		<0.001
No		140 (49.1%)			65 (27.5%)		
Dyslipidemia (%)							
Yes		197 (69.1%)			150 (63.6%)		NS
No		88 (30.9%)			86 (36.4%)		
Smoking habits (%)							
Yes		47 (16.5%)			160 (67.8%)		<0.001
No		238 (83.5%)			76 (32.2%)		
Use of alcohol (%)							
Yes		144 (50.5%)			85 (36%)		0.001
No		141 (49.5%)			151 (64%)		
Coronary angiography							
No occluded vessels					14 (6.3%)		
One-vessel					77 (32.6%)		
Two-vessel					72 (30.1%)		
Three-vessel					73 (30.9%)		
Coronary calcification							
Yes					23 (9.7%)		
No					213 (90.3%)		

BMI= body mass index

Table 3. Allele (af) and genotype frequencies (gf) of *MMP-1 -1607*, *MMP-3 -1612* and *MMP-9 -1562* polymorphisms in myocardial infarction patients and healthy controls.

Gene		Controls (n= 285)		MI (n= 236)		pC	OR (95%CI)
SNP		n	gf	n	gf		
<i>MMP-1 -1607</i> (rs1799750)	Genotype						
	<i>1G1G</i>	1	0.003	2	0.008	NS	
	<i>1G2G</i>	38	0.133	34	0.144		
	<i>2G2G</i>	246	0.863	200	0.847		
	Allele	n	af	n	af	NS	
	<i>1G</i>	40	0.070	38	0.080		
<i>2G</i>	530	0.929	434	0.919			
<i>MMP-3 -1612</i> (rs3025058)	Genotype	n	gf	n	gf	NS	
	<i>6A6A</i>	141	0.494	114	0.483		
	<i>6A5A</i>	121	0.424	105	0.444		
	<i>5A5A</i>	23	0.080	17	0.072	NS	
	Allele	n	af	n	af		
	<i>6A</i>	403	0.707	333	0.705		
<i>5A</i>	167	0.292	139	0.294			
<i>MMP-9 -1562</i> (rs3918242)	Genotype	n	gf	n	gf	0.02	0.42(0.20-0.86)
	<i>CC</i>	271	0.950	210	0.889		
	<i>CT</i>	14	0.049	26	0.110		
	<i>TT</i>	0	0.000	0	0.000	0.02	2.40 (1.17-4.97)
	Allele	n	gf	n	af	0.02	0.43 (0.21-0.87)
	<i>C</i>	556	0.975	446	0.944		
<i>T</i>	14	0.024	26	0.055			

MI, Myocardial Infarction; SNP, single nucleotide polymorphism; rs, reference SNP; OR, odds ratio; CI, confidence intervals; pC, p-corrected; NS, not significant. Bold numbers indicate significant associations.

ANEXO 2. Técnicas**EXTRACCIÓN DE ADN**

Se tomaron 5ml de sangre periférica en tubos Vacutainer® con EDTA a los individuos incluidos en el estudio con previo consentimiento informado, dichas muestras se centrifugaron a 3000 rpm/10min, posteriormente se adicionó 20ml de TKM-1 + tritón, se mezcló empleando el equipo Orbitron Rotor II durante 8 min y se centrifugó a 3000 rpm/10 min, el sobrenadante se desechó, y el sedimento se aforo a 15ml con TKM-1, nuevamente se centrifugó a 3000rpm/5 min y el sedimento se aforo a 12ml TKM-1, finalmente se centrifugó a 2500rpm/5 min, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 800µl de TKM-II, se mezcló hasta homogenizar; esta mezcla se colocó en un nuevo tubo con 50 µl de SDS al 10% y se incubó a 55°C/10 min, posteriormente se adicionaron 300µl de NaCl y se centrifugó a 1200rpm/ 5 min/12°C; se decantó y al sedimento se le adiciona 900µl de etanol al 70%, mezcla que fue centrifugada a 14000rpm/ 5min/4°C, finalmente se eliminó el etanol, y al sedimento se le adicionaron 150µl de TE, mezcla que se incubó a 65°C/20 min, después de esto el ADN se almacenó en refrigeración.

CUANTIFICACIÓN DE ADN

Una vez extraído el ADN se cuantificó empleando un espectrofotómetro UV (NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000), en el cual se colocó una alícuota de 1.5µ de ADN, las muestras se leyeron a una longitud de onda de 260nm, se obtiene como resultado la concentración y la pureza de la muestra empleando el cociente A260/A280, y con base en la concentración del ADN se prepararon alícuotas con una concentración de 10µg/mL de DNA, la integridad del ADN se verificó en geles de agarosa al 1.5% teñido con 0.5µL de bromuro de etidio, se colocó 1 µL del ADN extraído y 1µL de colorante en cada pocillo y el gel se corrió a 65volts durante 45min, finalmente se observaron las bandas de ADN con luz UV verificando la presencia de una sola banda de ADN.

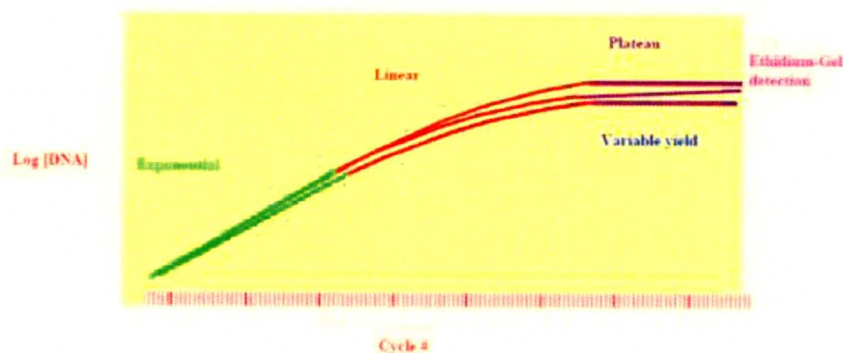
PCR EN TIEMPO REAL

La PCR en tiempo real es rápida, sensible, reproducible y su riesgo de contaminación es poco, ya que la generación del amplicon se puede observar conforme a la amplificación progresa, lo que elimina el análisis post PCR, constituyendo esta característica, la diferencia en términos de definición entre PCR de tiempo real y de punto final en la cual la generación del producto de PCR no se detecta sino hasta que la amplificación se ha llevado a cabo y posteriormente el amplicon es visualizado en un gel de agarosa.

La detección de la reacción en tiempo real se lleva a cabo mediante la medición de fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación y detectada por el sistema óptico del equipo de PCR en tiempo real. La cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado.

Analizando la cinética de amplificación de la reacción de PCR, podemos dividir el proceso de amplificación en tres fases: geométrica, lineal y estacionaria.

- Fase geométrica: Durante esta fase todos los reactivos de la reacción se encuentran en abundancia; en esta etapa la eficiencia de amplificación bajo las condiciones experimentales es muy cercana al 100%, en esta fase de la cinética de amplificación tiene un comportamiento 2^n en donde a partir de una molécula de DNA se generan 2 moléculas de DNA.
- Fase lineal: Los primers, dNTP's y/o enzima comienzan a ser factores limitantes además de la generación de pirofosfato y decaimiento de la actividad enzimática que afectan la eficiencia de amplificación de manera constante, por lo que no es posible llevar a cabo un ensayo cuantitativo en esta parte.
- Fase estacionaria de la reacción de PCR, en este punto se detienen la amplificación, la cantidad de producto obtenida es constante sin importar cuantos ciclos más se prolongue la reacción dados los factores mencionados previamente.



Fases de la reacción de PCR.

-Sondas TaqMan. Principio FRET.

Las características que los agentes detectores o reporteros deben cumplir son: que la fluorescencia generada sea directamente proporcional al número de copias obtenidas en cada ciclo de la PCR y segundo, que esta molécula fluorescente no inhiba la PCR o disminuya la eficiencia de amplificación.

Una sonda taqman es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicon. Tiene una secuencia de 13 a 18 nucleótidos que presenta en el extremo 5' una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un quencher o apagador de tal forma que cuando estas dos moléculas se encuentran unidas por la sonda, toda la fluorescencia emitida por el reportero, es absorbida por el apagador, por lo que la fluorescencia global observada es igual a cero, a este fenómeno se le conoce como de Fluorescent Resonant Energy Transfer (por sus siglas en inglés FRET). Las sondas taqman tienen una T_m mayor que los primers por lo que, durante la etapa de alineación, la primera en unirse a su secuencia específica es la sonda y, posteriormente los primers, de tal forma que cuando la DNA polimerasa se une al extremo 3' del primer e inicia la elongación, en su paso se encuentra con la sonda y la degrada dada su actividad exonucleasa 5' – 3'. Al ser degradada, libera al reportero del apagador lo que suprime el fenómeno FRET y la fluorescencia emitida puede ser determinada por el sistema de detección del ABI Prism 7300. Dado que la fluorescencia emitida es proporcional.

-Preparación de las placas de PCR para discriminación alélica

La discriminación alélica se hizo en el equipo ABI PRISM 7300 de Tiempo Real:

- Para la discriminación alélica se diluyó el DNA tanto de pacientes como de controles a una concentración de 10 ng/ μ l con agua libre de DNAsas.
- En la placa de 96 pozos se colocó 2 μ l del DNA (tanto de pacientes como de controles respectivamente) ocupando sólo 92 pozos, ya que 2 pozos son para controles positivos y los otros 2 para controles negativos.
- Ya que estaba lista la placa con el DNA se agregaron 6 μ l del mix de amplificación el cual contenía los primers específicos para cada SNP de las MMPs a estudiar.

Discriminación alélica con el método Taqman

- Para la discriminación alélica se utilizó un par de primers específicos para analizar la secuencia que flanquea al SNP a estudiar y se empleó una sonda que tiene unidos un fotocromo reportero *reporter* y un fotocromo *quencher*. Cuando ambos fotocromos están unidos a la sonda, el *reporter* no emite señal. Pero, cuando la sonda hibrida con la secuencia de interés (*target*) durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa 3' --> 5' de la Taq polimerasa separa al fotocromo *reporter* del resto de la sonda, permitiendo la emisión de una señal fluorescente. Se monitorea la señal fluorescente *reporter* que se va acumulando en sucesivos ciclos de PCR.
- El láser del equipo de Tiempo Real leerá cada placa con los diferentes SNPs, y los datos escaneados serán proporcionados por el software SDS 2.2 de la compañía Applied Biosystems.

PCR – RFLPs

Se realizó una PCR en punto final para amplificar las muestras de pacientes y controles de las MMP-1, 3 y 9 empleando un termociclador automatizado, (AppliedBiosystems, EE.UU.) con las condiciones descritas a continuación:

Cantidad	Componentes
11µl	Agua
2.5µl	Buffer
4µl	DNTPs
1.5µl	primer forward [20pmol]
1.5µl	primer reverse [20pmol]
1.5µl	MgCl ₂
1µl	DMSO
0.125µl	Taq polimerasa
2µl	ADN

Condiciones de la reacción: 5min a 94°C, 1min a 66°C y 6min a 72°C, por ciclos.

Secuencias de primers para determinación de polimorfismos por RFLPs de MMP1, MMP3 y MMP9.

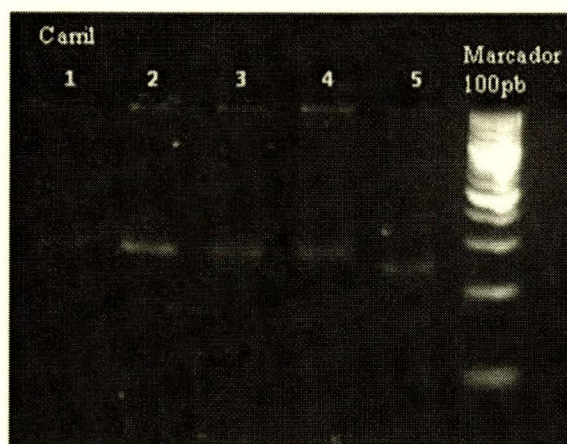
Gen	Polimorfismo	Foward Primer (5'-3') y Reverse Primer (5'-3')	Enzima	Tamaño	Referencia
MMP1	-1607 1G/2G (rs1799750)	TGACITTTAAACATAGTCTATGTTCA TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTCATAGC	<i>AfuI</i>	2G 269pb 1G 241+28pb 1G/2G 269+241+28pb	Fang y cols., 2005.
MMP3	-1612 5A/6A (rs3025058)	GGTTCTCCATTCCTTTGATGGGGGAAAGA CTTCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT	<i>PstI</i> (<i>Tth1111</i>)	6A 129pb 5A 97+32pb 5A/6A 129+97+32pb	Fang y cols., 2005.
MMP9	-1562 C/T (rs3918242)	GCCTGGCACATAGTAGGCC CTTCCTAGCCAGCCGGCATC	<i>PaeI</i> (<i>SphI</i>)	CC 435pb TT 247+188pb CT 435+247+188pb	Medley y cols., 2004.

Una vez comprobada la presencia del amplificado se realizó la digestión enzimática bajo las siguientes condiciones:

Cantidad	Componentes
8µl	Amplificado
1µl	Buffer
1µl	Enzima de restricción

Condiciones de la reacción: 37°C por 16 horas

Análisis por PCR-RFLP del polimorfismo -1607 1G/2G del gen de la MMP-1 en gel de agarosa al 4%.



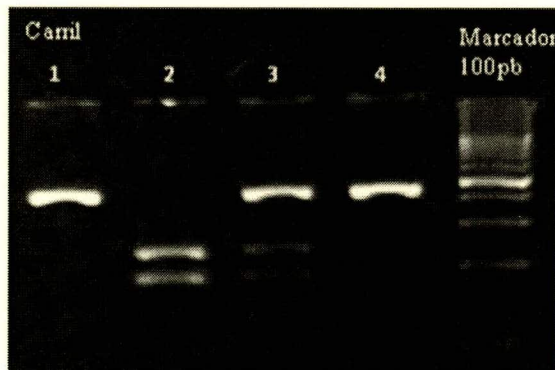
Carril 1, 2, 3, 4: Genotipo 2G, 269 pb
Carril 5: Genotipo 1G, 241+28 pb
Marcador de peso molecular de 100pb.

Análisis por PCR-RFLP del polimorfismo -1612 5A/6A del gen de la MMP-3 en gel de agarosa al 4%.



Carril 1: Genotipo 6A, 129 pb
Carril 2 y 4: Genotipo 6A/5A, 129+97+32 pb
Carril 3: Genotipo 5A, 97+32 pb
Marcador de peso molecular de 100pb.

Análisis por PCR-RFLP del polimorfismo -1562 C/T del gen de la MMP-9 en gel de agarosa al 4%.



Carril 1 y 4: Genotipo CC, 435 pb
Carril 2: Genotipo TT, 247+188 pb
Carril 3: Genotipo CT, 435+247+188 pb
Marcador de peso molecular de 100pb.

Expresión

La expresión génica, tiene la habilidad para detectar y cuantificar el nivel de transcripción de genes específicos y esto ha sido central dentro del área de la investigación.

Dentro de los métodos más ampliamente utilizados para análisis y cuantificación de secuencias de transcritos son: northern blot, hibridación *in situ*, ensayos de protección con RNAsas y RT-PCR cuantitativa. La principal limitante de estos métodos excluyendo la RT-PCR es su baja sensibilidad, el tiempo empleado y múltiple manipulación de las muestras además de ser métodos muy laboriosos. La RT-PCR, es uno de los métodos más sensibles y flexibles actualmente disponibles, y puede ser utilizada para comparar niveles de mRNAs en muestras de distintas poblaciones, para caracterizar patrones de expresión, discriminar entre mRNAs estrechamente relacionados. La especificidad, sensibilidad y reproducibilidad son las características más importantes.

Con respecto a la RT-PCR y su aplicación en ensayos de cuantificación de RNA, existen los métodos semicuantitativos y los cuantitativos.

- Semicuantitativo, en donde varias muestras de distintos intervalos de tiempo de la reacción de RT-PCR son analizadas en dot-blot por densitometría y comparadas entre sí.

- Cuantitativo, se encuentra:

La RT-PCR no competitiva, en la cual a la muestra de RNA antes de la amplificación se le agrega una cantidad conocida de RNA sintético, se llevan a cabo dos reacciones de amplificación de RT-PCR en el mismo tubo las cuales no compiten por secuencia ni primers.

La RT-PCR competitiva, el estándar interno, comparte secuencia y sitio de reconocimiento de primers con la secuencia blanco, dando lugar a un fenómeno de competencia durante la reacción de PCR. Dado que ambas secuencias son virtualmente idénticas, ambos amplicones se generan con la misma eficiencia y pueden ser distinguidos por la incorporación de sitios de restricción enzimática en el estándar añadido. Una serie de tubos que contiene el blanco, son mezclados con diluciones seriales de concentración conocida de estándar interno. A mayor concentración de estándar interno, mayor probabilidad que los primers se unan y amplifiquen esta secuencia en lugar de la secuencia blanco. Una vez efectuada la reacción de RT-PCR, se evalúan los productos de amplificación en un gel de agarosa con bromuro de etidio. Sin embargo hay varios problemas con esta técnica cuyos resultados están lejos de corresponder a una cuantificación absoluta.

La cuantificación absoluta, determina el número exacto de moléculas de ácido nucleico del blanco. Por ejemplo: determinación de carga viral, transgénicos y terapia génica.

En este trabajo se realizó la expresión por medio de la cuantificación relativa, que es la comparación cuantitativa de una secuencia blanco, normalizado con referencia interna y comparada a un calibrador. Es utilizada por ejemplo, para expresión génica y terapia de drogas.

Los resultados se expresan como un cambio en el número de veces que un RNAm se expresa en una muestra con respecto al calibrador. Este cambio puede ser positivo o negativo, ya que el calibrador por definición siempre tiene un valor de 1 o bien de 100%.

Existen dos métodos para hacer cuantificación relativa:

1. Con curva estándar
2. Método Ct comparativo (Delta Ct)

Cualquiera de estos métodos, requiere del blanco para analizar. Uno de ellos es el blanco experimental, mientras que el segundo es un gen de expresión constitutiva (se le conoce también como “housekeeping” o endógeno). Este gen constitutivo debe tener un patrón de expresión constante en las condiciones

experimentales que se estén analizando. Los más comúnmente empleados son gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenada (GAPDH), β -Actina y RNA ribosomal (rRNA) entre otros.

- Eficiencia de amplificación en una reacción de PCR

La eficiencia de amplificación es la tasa a la cual se genera el amplicon, comúnmente se expresa como un valor de porcentaje. Si un amplicón particular duplica su cantidad durante la fase geométrica, de la amplificación, entonces ese ensayo tiene una eficiencia del 100%.

La pendiente de una curva estándar se emplea comúnmente para estimar la eficiencia de amplificación en un experimento de PCR en tiempo real. A partir de la dilución serial de un stock de concentración conocida se realizó la amplificación del gen de la Metaloproteasa específica de matriz -2. Esta curva estándar se presenta gráficamente como la regresión semi logarítmica del valor de Ct promedio de cada dilución contra el logaritmo de la cantidad de RNA que aquí se utilizó.

La pendiente que resultó de esta gráfica es la que se tomó en cuenta para estimar la eficiencia de la amplificación. Un valor de pendiente de -3.32 equivale a reacción con 100% de eficiencia, valores más negativos que éste (ej. -3.9), indican una eficiencia menor al 100% lo que podría deberse a la presencia de un inhibidor. Por otro lado pendientes más positivas (ej. -2.5), pueden atribuirse a la calidad de la muestra o bien a problemas de pipeteo. La estimación precisa de la eficiencia de una reacción de PCR depende de un conjunto de variables: reactivos, preparación experimental, calidad de la muestra, etc.

- Elección del endógeno

Este gen sirve para normalizar entre las muestras analizadas de forma que los resultados obtenidos no sean producto de diferencias en la cantidad inicial de muestra empleada en cada una de ellas. La elección del gen endógeno exige tres criterios a cubrir:

1. Uniformidad de los niveles de expresión del gen endógeno. Este gen se va a emplear de forma análoga a un control de carga, es necesario que sus niveles de expresión sea similar entre las diferentes muestras de estudio. Es muy importante usar la misma cantidad de RNA para la retrotranscripción y de esto tomar el mismo volumen para cada reacción de PCR.
2. Validación de la eficiencia de amplificación del blanco experimental y del gen endógeno, para el empleo del método de Ct comparativo. Para poder usar el método de Ct comparativo es necesario asegurarse de que el gen endógeno y el gen experimental tengan eficiencias de amplificación similares.

3. Al hacer múltiplex. Es necesario que, el nivel de expresión del gen endógeno sea mayor que el del gen blanco. Los primers del gen de control endógeno se coloquen a concentraciones limitantes. Esto asegura que la amplificación del otro blanco menos abundante, no se vea comprometida, por los requerimientos del gen endógeno.

- Cuantificación relativa de Expresión génica: Diseño experimental

En este estudio se eligió utilizar el Método de Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$), porque la ventaja de este método es que no se requieren curvas estándar, lo que implica el ahorro de reactivos y de espacio dentro de la placa de reacción. Se requiere tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Es necesario que el o los blancos junto con el control endógeno tengan eficiencias de amplificación del 100% (± 10).
- Es ideal hacer un proceso de validación antes de empezar a cuantificar muestras reales, esta validación tiene la intención de demostrar que los genes tienen entre sí eficiencias de amplificación semejantes y por lo tanto comparables entre sí.
- Este método es particularmente útil cuando se requiere cuantificar muchos blancos (genes) de forma simultánea y/o cuando se van a analizar muchas muestras.
- Este es el método ideal para validar resultados provenientes de microarreglos de RNA.
- Este método proporciona resultados análogos a los que se obtienen con el método de curva estándar.

1er Paso: Validación

Se debe asegurar que el blanco o los blancos analizados y el endógeno tengan eficiencias de amplificación similares. La validación se hace a partir de una curva estándar que debe cumplir ciertos lineamientos:

- Debe incluir al menos 5 logaritmos de la cantidad de RNA inicial (ej. 100 ng a 10 pg) y en este rango deben encontrarse los niveles de expresión de los genes analizados.
- Se deben usar al menos 3 réplicas de cada punto de la dilución.
- Los blancos y el endógeno deberán ser analizados en tubos separados.
- Los primers y sondas deberán usarse a las concentraciones recomendadas: 900 nM para los primers y 250 nM para las sondas.

La curva estándar para evaluar la amplificación fue con dilución serial que para partir de una muestra de concentración conocida.

Los valores de Ct que se obtienen a partir de la amplificación se grafican para formar una regresión semi logarítmica contra el logaritmo de las cantidades usadas para la construcción de la curva. Por lo tanto para hacer la validación se deben obtener tantas gráficas o regresiones como blancos se estén evaluando.

La regresión debe cumplir dos parámetros:

Valor de pendiente de $-3.32 \pm 10\%$

Índice de correlación (R^2) = 0.99

El valor de la pendiente indica la eficiencia que presenta ese sistema (juego de primers y sonda). El coeficiente de correlación nos indica si el sistema muestra precisión (reproducibilidad).

Para finalizar la validación, los valores de Ct se van a usar para construir una gráfica ΔCt .

$$\Delta Ct = Ct \text{ blanco} - Ct \text{ endógeno}$$

Los valores de ΔCt obtenidos se grafican nuevamente contra los logaritmos de las cantidades de RNA. La pendiente de esta recta puede usarse como un criterio general para aprobar la validación. Este valor debe ser de -0.1 a 0.1, para aprobarla.

El intervalo de concentraciones en la que se cumple esta pendiente indica el rango dinámico de trabajo, es decir, las diferentes concentraciones de la muestra en que se pueden obtener resultados confiables.

2° Paso: Experimento con el método Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$)

Una vez que paso la validación. Los valores de Ct que se obtuvieron se tratan de la siguiente forma: se obtuvo un primer ΔCt al restar los valores de Ct del control endógeno a los del blanco.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{blanco}} - Ct \text{ endógeno}$$

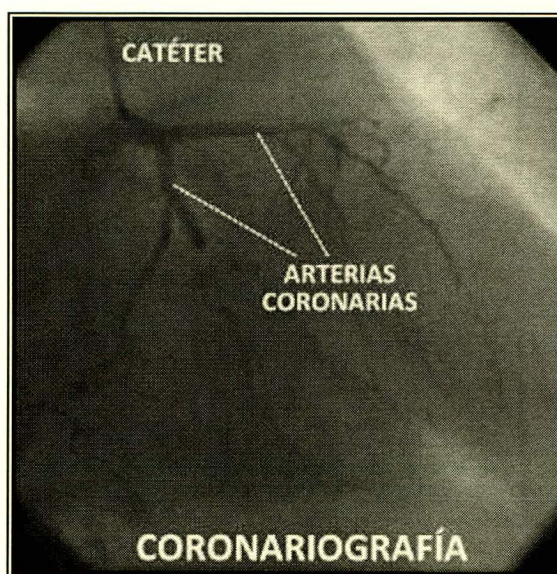
El segundo Δ se obtiene al restar ΔCt del calibrador o muestra de referencia al ΔCt de la muestra tratada

- *Expresión génica en biopsias de arterias coronarias de pacientes con IAM*

- La extracción de RNA se llevó a cabo con TRIZOL por medio del kit de extracción PureLink micro-to-midi Total RNA Purification System. Cat. No. 12183-026 de Invitrogen.
- La RT-PCR se realizó con la MasterAmp High Fidelity RT-PCR Kit. Epicentre Biotechnologies. Cat. No. RF910100.
- Se utilizó como control el gen endógeno 18S.
- Después se determinó la cuantificación relativa para la expresión génica por medio de PCR en tiempo real.

Cinecorobariografía

La cinecoronariografía realizada a cada uno de los pacientes con infarto al miocardio es de gran importancia porque es un procedimiento mínimamente invasivo que se realiza con fines de diagnóstico y tratamiento de patologías tales como obstrucción de las arterias coronarias, enfermedades de las válvulas cardíacas y malformaciones del corazón, congénitas o adquiridas. Es una de las pruebas más eficaces para el diagnóstico de enfermedad coronaria, más de un millón son realizadas en el mundo por año (Harrison).



Consiste en introducir catéteres especiales a las arterias coronarias para inyectar contraste dentro de ellas; de esta forma podemos ver el interior de las arterias, y saber si presentan algún grado de obstrucción. Las puntas de catéteres de forma especial se colocan en la arteria coronaria izquierda y luego en la derecha, lo mismo que cualquier injerto para la revascularización quirúrgica, bajo control fluoroscópico. La inyección manual de un medio de contraste radiográfico permite la opacificación de sus luces, y se registran las imágenes a 15 cuadros por segundo en una imagen radiográfica (*cineangiografía*). Cada arteria coronaria suele visualizarse en varias proyecciones para permitir la valoración del sitio y la gravedad de cualquier estenosis con relación a segmentos de datos "normales" adyacentes. Además de la detección de estenosis de la arteria coronaria, la coronariografía ayuda a valorar la rapidez del flujo coronario, la presión a la que se encuentra la sangre dentro de las cavidades cardíacas (las aurículas y los ventrículos), el chorro del llenado capilar en el miocardio, las vías colaterales que irrigan territorios miocárdicos abastecidos por un vaso ocluido, la presencia de anomalías congénitas de la circulación coronaria.

También se indica coronariografía cuando los resultados de estudios cardiológicos no invasivos son anormales.

Por ejemplo:

- Electrocardiograma. Un registro gráfico de la actividad eléctrica del corazón y la interpretación de sus ondas habitualmente orientan al cardiólogo a sospechar la enfermedad coronaria y a solicitar una coronariografía.
- Ergometría. Es un electrocardiograma de esfuerzo (bicicleta o cinta deslizante) mide el comportamiento del corazón durante el ejercicio. No olvidemos que habitualmente el dolor en el pecho se produce en el esfuerzo y eso explica que frecuentemente el electrocardiograma de reposo no de alteraciones y falle en el diagnóstico.
- Ecocardiograma. Estudia las estructuras y función del corazón. La imagen en movimiento es visualizada y evaluada en un TV donde el médico analiza el espesor de las paredes el tamaño y función. La imagen también muestra la morfología y estructura de las 4 válvulas cardíacas, mostrando si están estrechadas o insuficientes. El Doppler puede evaluar la velocidad del flujo y así medir severidad de la estenosis o insuficiencia.
- Test de Stress Nuclear (Cámara Gamma). Durante la realización de un ejercicio se inyecta una sustancia radioactiva inocua (talio) con especiales propiedades como son emitir radiaciones que se fijan en el corazón y le permiten a una

cámara gamma crear imágenes durante el reposo y ejercicio para descubrir áreas de mala circulación coronaria (*The Task Force on Heart Failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis of heart failure., 1995*).

- *Preparación de un paciente para la coronariografía.*

- Ciertas medicaciones deben ser suspendidas (Sintrom desde 72 horas antes y las medicaciones de la diabetes aún la insulina el día del estudio) pero en general el resto de las medicaciones debe seguir tomándolas el día previo y el del estudio.
- El día del estudio y al día siguiente se le administran antibióticos, previo al cateterismo se le realiza una historia clínica minuciosa averiguando los antecedentes más importantes de la enfermedad y los detalles de la misma examinándose todas las pruebas realizadas hasta el momento.
- Es fundamental manifestarle al equipo médico si se tiene trastornos de la coagulación o si es alérgico al Yodo, pescado (cangrejo y langostinos) ó frutillas. El día del estudio la enfermera y fundamentalmente el médico le explicaran todos los detalles del procedimiento y lo alentaran a preguntar sobre todas las dudas que tenga sobre el mismo.

- *Procedimiento:*

Se lleva a cabo de la siguiente manera. En primer lugar se coloca un suero en el brazo para administrar sedantes u otras medicaciones cardiológicas que fueran necesarias. También se colocan electrodos en el cuerpo para controlar con un electrocardiograma permanente el corazón durante el cateterismo. El médico utiliza habitualmente la zona de la ingle o el brazo o la muñeca para introducir por una arteria el catéter en su camino al corazón. Previo a la introducción del catéter la zona es limpiada con antisépticos, cubierta con sabanas estériles y la zona anestesiada con anestesia local. Si el paciente es muy temeroso o ansioso se le puede dormir fugazmente para que no sienta ninguna molestia. Cuando el catéter alcanza la Aorta Torácica Ascendente y el nacimiento de las coronarias, el médico inyecta la sustancia de contraste iodada opaca a los Rx dentro de las coronarias (angiografía, arteriografía, coronariografía) que le permite visualizar su luz y diagnosticar si tienen obstrucciones y su grado de severidad. Las imágenes obtenidas se graban en un CD o en cine de 35mm, para evaluarlas posteriormente con más detención y además para guardarlas en un archivo.

Una vez obtenidas las imágenes se retira el catéter, se comprime la zona para obtener el cierre por coagulación del orificio creado a la arteria por el catéter, se deja por varias horas al paciente en reposo para evitar sangrado en la zona de introducción del catéter y posteriormente se da el alta (The Task Force on Heart Failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis of heart failure., 1995).

El cateterismo cardiaco consiste en introducir unos catéteres a través de las arterias del cuerpo para llegar al corazón.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 24 de junio de 2015, en la ciudad de México D.F. para obtener el grado de Doctora en Ciencias Genómicas, a la M. en C. Nonanzit Iracema Pérez Hernández.

Dr. Humberto Nicolini Sánchez _____

Dr. Gilberto Vargas Alarcón _____

Dr. Mario César López Camarillo _____

Dra. Elisa Azuara Liceaga _____

Dr. Joaquín Zúñiga Ramos _____

Dr. Julio Granados Arriola _____



Tel. 5658 - 7100