



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

POLIMORFISMOS EN EL GEN MMP-2 COMO FACTOR PRONÓSTICO
EN EL CÁNCER DE PULMÓN EN LA POBLACIÓN ECUATORIANA



AUTOR

Alexander Javier Yépez Montoya

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

POLIMORFISMOS EN EL GEN MMP-2 COMO FACTOR PRONÓSTICO EN
EL CÁNCER DE PULMÓN EN LA POBLACIÓN ECUATORIANA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesora Guía
Ph.D. Alina Aguirre Quevedo

Autor
Alexander Javier Yépez Montoya

Año
2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Alina Aguirre Quevedo
Doctora en Ciencias Biológicas
C.I. 1756594600

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación

María Gabriela Granja Bastidas

Master en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina: especialidad en
Patología Molecular

C.I. 1712995149

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Alexander Javier Yépez Montoya

1720942315

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme dado la sabiduría y fuerzas durante mi vida universitaria. Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por haberme brindado la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación en sus instalaciones.

Agradezco también a mi directora científica y docente guía científico, Alina Aguirre, por su apoyo incondicional y su conocimiento brindado durante el desarrollo del proyecto de investigación.

DEDICATORIA

A mis padres, Mauricio y Edith por su amor incondicional a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Jonathan y Bryan por sus consejos y aliento en la realización de mis sueños.

A mi abuelita Amparo y a mis tíos Pablo y Jenny por su confianza depositada en mí para la consecución de este título.

A Melissa por todo el amor y ánimo que me ha brindado a lo largo de mi vida universitaria.

RESUMEN

El cáncer de pulmón es una enfermedad generada por la neoformación de las células que conforman las diferentes estructuras pulmonares. Las metaloproteasas (MMPs) son blancos terapéuticos en esta patología, debido a su actividad proteolítica que permite la degradación de componentes esenciales en las barreras tisulares favoreciendo la generación de diferentes estados patológicos, entre ellos el cáncer, siendo de gran relevancia en este sentido las colagenasas (MMP-2 y MMP-9). MMP-2 es una enzima capaz de degradar proteolíticamente el colágeno tipo IV presente en la matriz extracelular permitiendo la migración de las células tumorales. Estudios previos han demostrado que los polimorfismos en la región promotora del gen MMP-2 implican un mal pronóstico para los pacientes con cáncer de pulmón. El presente estudio se centró en la identificación en individuos de la población ecuatoriana el polimorfismo MMP-2 -1306 C/T (rs243865) debido a su asociación con el cáncer pulmonar. Se recolectaron y procesaron 71 muestras de pacientes con cáncer de pulmón y 77 muestras de individuos sanos (controles). La determinación genotípica de casos y controles se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación tipo Sanger. El polimorfismo rs243865 se identificó únicamente en un paciente con cáncer pulmonar y 28 individuos control. Además, se identificaron nuevos polimorfismos en las posiciones 55477786, 55477824, 55477842, 55477846, 55477865, 55477881 y 55477883 en la región promotora del gen MMP-2. La prueba estadística de Fisher señaló que no existe una asociación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre la presencia del polimorfismo rs243865 y el género en los controles. Sin embargo, se obtuvo una significancia estadística ($p > 0.05$) entre el tipo histológico del cáncer de pulmón y el consumo de tabaco. El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostró que el tipo histológico de cáncer de pulmón influye en el tiempo de supervivencia de los pacientes. Finalmente, se puede concluir que el polimorfismo rs243865 en el promotor del gen MMP-2 no constituye un factor pronóstico para los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón en la población ecuatoriana. No obstante,

los genotipos CT y TT podrían ejercer un papel protector para el desarrollo de este tipo de neoplasia maligna.

ABSTRACT

Lung cancer is a disease generated by the neoformation of the cells that make up the different lung structures. Metalloproteases (MMPs) are therapeutic targets in this pathology, due of its proteolytic activity that allows the degradation of essential components in tissue barriers favoring the generation of different pathological conditions, among them cancer, being of great relevance in this sense the collagenases (MMP-2 and MMP-9). MMP-2 is an enzyme capable of proteolytically degrading collagen type IV present in the extracellular matrix allowing the migration of tumor cells. Previous studies have shown that polymorphisms in the promoter region of the MMP-2 gene imply a poor prognosis for patients with lung cancer. The present study focused on the identification in individuals of the ecuadorian population of the MMP-2 -1306 C/T (rs243865) polymorphism owing of its association with lung cancer. Were collected and processed 71 samples from patients with lung cancer and 77 samples from healthy individuals (controls). The genotypic determination of cases and controls were performed by the polymerase chain reaction and Sanger-type sequencing. The rs243865 polymorphism was identified only in one patient with lung cancer and 28 control subjects. Besides, new polymorphisms were identified at positions 55477786, 55477824, 55477842, 55477846, 55477865, 55477881 and 55477883 of the promoter region of the MMP-2 gene. Fisher's statistical test indicated that there is no statistically significant association ($p > 0,05$) between the presence of rs243865 polymorphism and gender in controls. However, a statistical significance ($p > 0,05$) was obtained between the histological type of lung cancer and tobacco consumption. Kaplan-Meier survival analysis showed that the histological type of lung cancer influences the survival time of patients. Finally, it can be concluded that the rs243865 polymorphism in the promoter of the MMP-2 gene is not a prognostic factor for patients diagnosed with lung cancer in the ecuadorian population. In spite of, CT and TT genotypes could play a protective role in the development of this malignant neoplasm.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del Problema	4
1.3 Objetivos	6
1.3.1 Objetivo General	6
1.3.2 Objetivos Específicos	7
1.4 Justificación	7
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	9
2.1 Tipos histológicos del cáncer de pulmón	9
2.2 Factores de riesgo	11
2.3 Características de la matriz extracelular (MEC)	12
2.4 Metaloproteasas (MMPs) y cáncer	13
2.4.1 Influencia de las MMPs en el potencial invasivo de las células cancerosas	14
2.4.2 Papel de las MMPs en la proliferación de células cancerosas	14
2.4.3 Implicación de las MMPs en la apoptosis celular	15
2.4.4 Papel de las MMPs en los procesos de angiogénesis y vasculogénesis tumoral	15
2.4.5 Rol de las MMPs en la adhesión y transición en el cáncer	16
2.5 Polimorfismos en MMPs	16
2.6 MMP-2 (Gelatinasa-A)	17
2.7 Factor de transcripción SP1	19
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL ..	21
4. CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA	22
4.1 Recolección de las muestras	22

4.2 Microcortes de los bloques de parafina con tejido tumoral fijado con formalina.....	23
4.3. Desparafinación del tejido tumoral.....	24
4.4 Extracción de ADN genómico a partir de tejido tumoral (Cáncer de Pulmón).....	24
4.5 Extracción del ADN genómico a partir de sangre periférica ...	25
4.6 Cuantificación de ADN genómico	26
4.7 Determinación de genotípica	26
4.7.1 Amplificación del fragmento del gen MMP-2 que contiene el polimorfismo rs243865.....	26
4.7.2 Purificación del producto de PCR mediante <i>Ampure</i>	28
4.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa para secuenciación	29
4.7.4 Purificación del producto de la PCR de secuencia mediante <i>Cleanseq</i> y secuenciación de ADN tipo Sanger	30
5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5.1 Historias clínicas y encuestas biomédicas.....	32
5.1.1 Distribución por edad y género	32
5.2 Hábitos tóxicos.....	34
5.3 Clasificación histológica de las muestras	35
5.4 Prueba estadística de Fisher y Chi cuadrado de Pearson (consumo de tabaco y clasificación histológica)	37
5.5 Análisis de supervivencia mediante el método Kaplan-Meier.	39
5.6 Determinación genotípica	43
5.6.1 Amplificación de los fragmentos específicos del gen MMP-2 que contiene el polimorfismo rs243865	43
5.6.2 Secuenciación de ADN tipo Sanger y electroforesis capilar	43
5.6.3 Prueba de Fisher y Chi-cuadrado de Pearson (Genotipos)	47
5.6.4 Distribución y frecuencias genotípicas de polimorfismos no reportados en el promotor del gen MMP-2	51

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	54
6.1 Conclusiones	54
6.2 Recomendaciones	54
REFERENCIAS.....	56
ANEXOS	69

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

El cáncer de pulmón es un proceso sumamente complejo y parcialmente conocido. Se ha observado que factores tanto ambientales como genéticos desempeñan un papel primordial en la predisposición para presentar este tipo de neoplasia maligna. Entre los principales tipos histológicos de esta enfermedad se encuentran: carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células no pequeñas, carcinoma de células grandes, carcinoma epidermoide y adenocarcinoma (Barros y Pérez, 2012). Las investigaciones en este tipo de patología se han centrado fundamentalmente en el estudio de genes que codifican para proteínas involucradas en procesos de reparación del ADN, apoptosis y ciclo celular (Liu et al., 2011).

Las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) integran una familia de endopeptidasas dependientes de zinc. Dichas moléculas se encuentran relacionadas con numerosos procesos fisiológicos y patológicos. En la actualidad conforman 5 grandes grupos: estromelisininas (MMP-3, MMP-10 y MMP-11), colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), MMPs de membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 y MMP-25) y matrilisininas (MMP-7 y MMP-26). De manera conjunta, estas enzimas están encargadas de la degradación y la remodelación de las barreras tisulares (Decock et al., 2008; Tacheva et al., 2015).

Numerosos estudios señalan que las MMPs, debido a su actividad proteolítica están implicadas en la progresión tumoral. Además, regulan procesos de inflamación, invasión, crecimiento celular, angiogénesis y supervivencia del tumor. La metástasis y el potencial invasivo del tumor están íntimamente correlacionados con la expresión de estas enzimas en diferentes tipos de carcinomas (cáncer de laringe, cáncer cervical, carcinoma de mama, de próstata y de pulmón) (Schveigert et al., 2013). La sobreexpresión de MMP-2, MMP-9 y

MMP-3 se ha comprobado en múltiples tipos de neoplasias malignas entre ellas las de pulmón, ovario y esófago. También se las ha asociado con la progresión tumoral y la reducción sustancial de la supervivencia de los pacientes. Concretamente se ha encontrado que la sobreexpresión de los genes que codifican para la MMP-2 y la MMP-9 se relacionan con un tipo histológico específico de cáncer de pulmón (González et al., 2012).

Estudios realizados con animales *knock-out*, concluyen de manera contundente que estas MMPs poseen propiedades protumorales (González et al., 2012). Los polimorfismos localizados en regiones promotoras de las MMPs pueden originar cambios significativos en los niveles de expresión de estas proteínas influyendo en la predisposición y el pronóstico de la enfermedad. Por tal motivo, varias investigaciones se han centrado en la identificación de polimorfismos en los genes que codifican para las MMPs 2, 3 y 9 debido a su potencial influencia en el desarrollo y progresión del cáncer de pulmón (McColgan y Sharma, 2009; Peng et al., 2010).

Una investigación realizada en la población china demostró que el polimorfismo MMP-9 -1562 C/T está relacionado con la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón de células no-pequeñas (CPCNP) (Jin et al., 2009). Por otra parte, un meta-análisis basado en modelos matemáticos realizado en las secuencias génicas de las MMPs señala que los polimorfismos MMP-2 -735 C/T, y MMP-2 -1306 C/T constituyen un factor de riesgo en la población asiática para desarrollar cáncer pulmonar (Li et al., 2015).

El polimorfismo MMP-2 -1306 C/T se encuentra en la región promotora de dicho gen provocando una menor actividad del mismo. Los resultados obtenidos en un estudio en la población china, sugieren que esta mutación está relacionada con el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, siendo los portadores del genotipo CC los que poseen mayor riesgo para padecer la enfermedad si se asocia con agentes cancerígenos como la nicotina (Yu et al., 2002). Un estudio realizado en una población española reveló que el polimorfismo MMP-2 -735 C/T no denota

una asociación estadísticamente significativa con la disminución del riesgo de desarrollar cáncer de pulmonar. Sin embargo, el genotipo MMP-2 -735 T/T se encuentra relacionado con la reducción significativa de la supervivencia de los pacientes con CPCNP (González et al., 2012).

Entre las técnicas más utilizadas para el diagnóstico se encuentran la citología de expectoración, biopsia de tejido pulmonar y estudios radiológicos para el CPCNP. La citología de expectoración se basa en la recolección de esputo (secreciones bronquiales) mediante una broncoscopia o procesos de expectoración espontáneos e inducidos (inhalación de una solución salina), posteriormente se realiza un estudio microscópico para determinar la presencia de células anormales que indiquen un posible cáncer pulmonar. (Mazzei et al., 2012). La biopsia de tejido pulmonar consiste en la extracción del tejido por medio de una punción (aguja), este procedimiento se puede realizar a través de la tráquea o mediante una cirugía (Amorín, 2013). La tomografía helicoidal contrastada y tomografía computarizada helicoidal se basan en la generación de una imagen bidimensional a partir de una estructura tridimensional la cual es proyectada. Los rayos X atraviesan al paciente y el haz de los rayos resultantes son captados por un receptor del equipo, los mismos que son procesados en un ordenador que genera una imagen en el monitor del cuadrante analizado (Ramírez et al., 2008).

El cáncer de pulmón puede ser tratado por medio de intervenciones quirúrgicas, radioterapia y quimioterapia. La extirpación del tumor es realizada por un cirujano torácico el cual puede abordar de tres maneras el proceso quirúrgico. Una neumonectomía que consiste en la extracción total del pulmón afectado. La lobectomía permite eliminar el lóbulo en el que se encuentra ubicado el tumor. La segmentectomía es empleada cuando el tumor es pequeño y se enfoca en la extirpación del carcinoma con una mínima porción del pulmón (Saa et al., 1999; Villegas et al., 2005). La radioterapia es una tecnología que permite la eliminación de las células cancerosas debido a la exposición con radiación ionizante dirigida específicamente a la zona tumoral. Este tratamiento puede

aplicarse como terapia paliativa o curativa (Rodríguez y Rodríguez, 2010). La quimioterapia se suministra por vía oral o intravenosa diversos fármacos que permiten la eliminación de las células cancerosas, previo al inicio del tratamiento es necesario realizar análisis de sangre y orina en los pacientes para establecer la cantidad de leucocitos y glóbulos rojos. La administración de la terapia se realiza mediante ciclos de descanso e ingesta de los medicamentos, es importante realizar conteo de glóbulos rojos y leucocitos en los ciclos de descanso para precautelar la salud de los pacientes (Villegas et al., 2005).

1.2 Planteamiento del Problema

A nivel mundial el cáncer de pulmón es una de las principales neoplasias malignas, debido a sus altas tasas de incidencia y mortalidad. Según datos y estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los tumores malignos de pulmón, estómago, mama, hígado y colon son los que mayor número de muertes provocan anualmente en todo el mundo. Uno de los principales factores de riesgo es el consumo de tabaco ya que alrededor del 70% de las defunciones a nivel mundial por cáncer pulmonar se relacionan con este hábito tóxico. En 2012 las neoplasias malignas diagnosticadas con mayor frecuencia en el sexo masculino fueron los carcinomas de pulmón, hígado, próstata, estómago y colon. Mientras que en el sexo femenino los tumores de mama, cuello uterino, pulmón, estómago y colon fueron los de mayor incidencia. En el año 2012, 1'590.000 personas fallecieron a causa del cáncer de pulmón, por lo tanto, este dato indica que alrededor del 88% de los pacientes diagnosticados fallecen (OMS, 2015; Stewart y Wild, 2014).

En el Ecuador, de acuerdo con los datos proporcionados por el Registro Nacional de Tumores del Hospital de la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer (SOLCA) Núcleo Quito, en el año 2012, debido al cáncer pulmonar se reportaron 753 muertes de las cuales 321 pacientes correspondían al sexo femenino y 432 pacientes del sexo masculino. Por otra parte, esta neoplasia maligna a nivel nacional se ubica como la tercera causa de muerte (Cueva et al., 2014). El

carcinoma pulmonar es la cuarta y sexta causa de muerte por tumores malignos en el sexo masculino y femenino respectivamente, siendo el adenocarcinoma el tipo histológico registrado con mayor frecuencia (Cueva y Yépez, 2014). Los factores ambientales y genéticos son determinantes en la predisposición y desarrollo del cáncer pulmonar. A nivel nacional esta patología se ubicará en los próximos años como la primera causa de muerte por neoplasias malignas (Paz-y-Miño et al., 2010).

Allemani et al. (2015) señalan que la tasa de supervivencia del cáncer de pulmón e hígado es sustancialmente inferior en comparación con otros tipos de carcinomas. Estos porcentajes se ven reflejados en distintas regiones del mundo (Tailandia y Mongolia del 7 al 8 %, América del Norte del 15 al 19 % y Europa 20 %). Estas alarmantes cifras se deben en gran medida a que los pacientes son diagnosticados en estadios avanzados de la enfermedad. Generalmente, las personas que presentan un estadio clínico III o IV de esta neoplasia maligna, acuden en busca de apoyo médico de forma tardía cuando aparecen los signos de esta afección, lo cual dificulta una evaluación precisa de dicha condición en estadios más tempranos (Chen et al., 2014).

En el Ecuador se ha podido corroborar que existe una mayor incidencia de la enfermedad en aquellas personas que consumen tabaco; adicionalmente se observa una baja proporción de pacientes diagnosticados en estadio I o II, lo cual evidencia la necesidad de métodos de diagnóstico rápidos y oportunos que faciliten las intervenciones terapéuticas en el cáncer pulmonar (Cueva y Yépez, 2014).

La citología de expectoración, biopsia de tejido pulmonar y radiografía de tórax como métodos de diagnóstico para el cáncer pulmonar no contribuyen a la disminución de la mortalidad, debido a la baja tasa de detección de los tumores malignos en las fases iniciales de la enfermedad (Arrieta et al., 2013). Métodos de tamizaje como la tomografía helicoidal contrastada no son muy recomendables, debido al riesgo que implica la exposición prolongada a la

radiación (Mahadevia et al., 2003). Por otra parte, se puede conseguir una imagen que abarque todo el tórax con la menor exposición posible a la radiación gracias a la tomografía computarizada helicoidal de baja dosis (TCBD). Esta técnica es empleada en la localización de nódulos pequeños que aparecen en el CPCNP. Las lesiones se pueden identificar en las fases iniciales de la enfermedad siendo uno de los métodos de tamizaje más efectivos en cuanto a la reducción de la mortalidad se refiere (van Klaveren et al., 2009). Sin embargo, su alto costo y la necesidad de personal altamente calificado son limitantes para implementar dicho método como una medida de salud pública en países en vías de desarrollo (Arrieta et al., 2013).

La remoción del tumor maligno mediante procedimientos quirúrgicos se aplica como tratamiento principalmente en pacientes diagnosticados en fases I y II con CPCNP, debido a que existe una alta tasa de mortalidad postoperatoria en estadios avanzados de la enfermedad, adicionalmente, el proceso de recuperación varía según la salud y cantidad del tumor extirpado (Tanoue y Detterbeck, 2009; Villar et al., 2016). Por otra parte, la radioterapia y quimioterapia son métodos ampliamente utilizados para combatir el cáncer pulmonar. Sin embargo, estas terapias provocan la destrucción de las células “sanas” y efectos secundarios (cansancio corporal, esofagitis, irritación en la piel, vómito, neurotoxicidad, pérdida de cabello y problemas respiratorios) provocando malestar y dolor en los pacientes (Villar et al., 2016; Villegas et al., 2005).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Identificar los polimorfismos en el gen que codifica para la metaloproteasa MMP-2 y su relación con parámetros clínicos patológicos.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Identificar polimorfismos en el gen que codifica para la metaloproteasa MMP-2.
- Analizar la relación entre estos polimorfismos y la incidencia, el pronóstico y la supervivencia en los diferentes tipos histológicos del cáncer de pulmón.

1.4 Justificación

Factores epidemiológicos, moleculares y genéticos del cáncer de pulmón son esenciales en el pronóstico, desarrollo y supervivencia de los pacientes. El creciente número de casos a nivel mundial y sintomatología característica de esta enfermedad dificulta el diagnóstico y tratamiento de manera oportuna (Amorín, 2013). El análisis de blancos terapéuticos como la MMP-2 aportará con posibles soluciones en esta patología ya que dicha proteasa está involucrada en procesos de invasión y migración de las células tumorales.

Actualmente, el desarrollo tecnológico, los conocimientos moleculares y evidencias epidemiológicas buscan desarrollar medicamentos que generen un mejor efecto en los blancos terapéuticos acorde a la variabilidad y predisposición genética de los pacientes, ya que la eficacia, distribución y metabolismo de los fármacos están íntimamente relacionados con los factores genéticos (Crommelin et al., 2013). Por lo tanto, la identificación de polimorfismos en el gen que codifica para la metaloproteasa MMP-2 en el cáncer de pulmón en la población ecuatoriana, suministrará información esencial para el pronóstico, incidencia y supervivencia de los pacientes, con diferentes tipos histológicos característicos de esta enfermedad. Además, se podrá establecer la relación entre la presencia de polimorfismos con los diferentes tipos histológicos de este tipo de carcinoma. Por otra parte, dado que el método de identificación de polimorfismos es relativamente sencillo, se podrán implementar procedimientos de diagnóstico menos invasivos que la biopsia de tejido pulmonar o broncoscopia empleada en

la citología de expectoración y costosos como la tomografía computarizada helicoidal de baja dosis.

Adicionalmente, el resultado obtenido en el presente proyecto de investigación permitirá el desarrollo de intervenciones terapéuticas futuras más efectivas en correspondencia con el tipo histológico y en estadios tempranos de la enfermedad, puesto que tratamientos convencionales como la radioterapia y quimioterapia pueden ejercer una serie de efectos adversos en la salud de los pacientes (toxicidad hemática, digestiva, cardíaca, vesical, renal, gonadal, pulmonar, dermatológica y neurológica) con cáncer de pulmón, debido al amplio espectro de los fármacos y radiaciones empleadas durante el tratamiento (Ferreiro et al., 2003).

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Tipos histológicos del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es una neoplasia maligna producida por una neoformación de las células epiteliales, esta abarca estructuras pulmonares como: mucosa, bronquios y bronquiolos, es decir que son tumores primarios ubicados en los tejidos bronco-pulmonares (Barros y Pérez, 2012). La clasificación histológica del cáncer de pulmón se puede observar en la Figura 1.

El carcinoma microcítico o de células pequeñas es una neoplasia maligna con un amplio potencial invasivo y de rápido desarrollo. Este tipo histológico abarca aproximadamente el 15% de todos los carcinomas pulmonares. Las células malignas dentro de esta clasificación histológica son de un tamaño pequeño y presentan una desmesurada actividad mitótica. Además, los nódulos provocan una necrosis de los tejidos debido a procesos de coagulación. Generalmente, los tumores suelen localizarse en zonas centrales del tórax especialmente en el mediastino (Gómez, 2010; Gullón, 1999).

El carcinoma de células grandes es un tumor maligno ampliamente indiferenciado lo cual dificulta su clasificación. Muchos autores cuestionan la existencia de este tipo histológico ya que comúnmente suele presentar características morfológicas similares al carcinoma escamoso u adenocarcinoma (Gullón, 1999).

El carcinoma escamoso o epidermoide se presenta especialmente en las células que conforman el epitelio de revestimiento. Generalmente esta neoplasia maligna se encuentra en los bronquios principales o lobares. Este carcinoma representa el 30% de todos los casos de cáncer de pulmón y se relaciona de forma muy marcada con el consumo de tabaco. De todos los tipos histológicos es el que más se relaciona con un buen pronóstico. Las células suelen presentar

puentes intracelulares y exhibir atipias que influyen en la generación de queratina (Ginsberg et al., 2007; Gullón, 1999).

El adenocarcinoma es una neoplasia maligna de tipo epitelial glandular, principalmente se localiza en las células broncoalveolares, las cuales presentan un desarrollo sólido, acinar o papilar. Esta patología engloba el 50% de todos los casos de cáncer de pulmón y se presenta con mayor frecuencia en los pacientes no fumadores. Su clasificación es complicada debido a la heterogeneidad de los tumores, sin embargo, se caracteriza por la generación de estructuras glandulares o tubulares. Las células tumorales crecen lentamente en este tipo histológico, pero pueden metastatizar en fases tempranas de la enfermedad (Ginsberg et al., 2007; Gómez, 2010; Gullón, 1999).

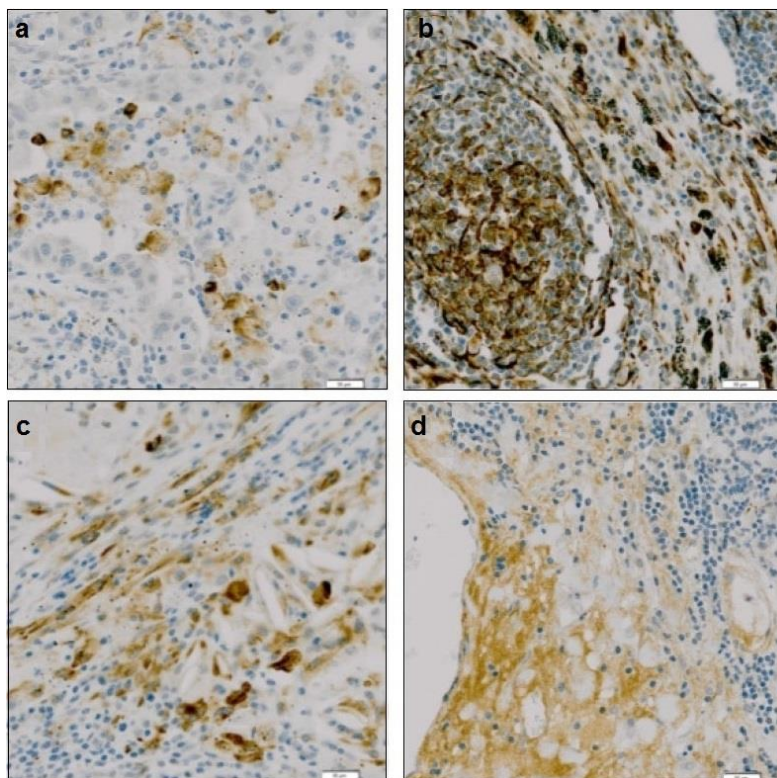


Figura 1. Tipos histológicos del cáncer pulmonar.

Adaptado de Dho et al. (2016).

- a) Carcinoma de células escamosas.
- b) Adenocarcinoma.
- c) Carcinoma de células grandes.
- d) Carcinoma de células pequeñas.

2.2 Factores de riesgo

El cáncer de pulmón está asociado a ciertos factores de riesgo ya sean estos extrínsecos o intrínsecos. Dentro de los extrínsecos se encuentran el tabaquismo, la dieta, la ocupación laboral, la exposición a la contaminación ambiental y a productos químicos.

En el año 1951 se realizaron los primeros estudios en los cuales se confirmó la fuerte relación existente entre el cáncer pulmonar y el consumo de tabaco, en una investigación en la cual participaron 40,000 individuos del sexo masculino (Doll et al., 1994). Por otra parte, se ha identificado que determinados compuestos de la dieta pueden ejercer efectos nocivos o protectores “según sea el caso” en el desarrollo del cáncer de pulmón. Estudios realizados en ratones señalan que existe un aumento en el proceso metastásico cuando la dieta es alta en grasas (Doll et al., 1994; Yan y DeMars, 2014).

En lo que respecta a la ocupación laboral, a nivel mundial en el año 2000 se estimó que el 10 % y el 5 % de muertes por cáncer de pulmón en el sexo masculino y femenino respectivamente se debieron a la exposición a carcinógenos tales como: el cromo, el asbesto, el esmog proveniente del diésel, el sílice, el arsénico, el cadmio, el níquel y el berilio en el puesto de trabajo (Consonni et al., 2010). Las fuentes de contaminación química como las emisiones industriales, de vehículos o de plantas de energía se asocian con el cáncer pulmonar, por lo tanto, se debe tomar en consideración la importante relación que existe entre esta patología y la contaminación atmosférica en las zonas urbanas (Barros y Pérez, 2012).

En lo que respecta a los factores intrínsecos, el historial familiar de cáncer, el sexo, la edad y los antecedentes personales han sido relacionados con polimorfismos y la susceptibilidad genética para el desarrollo del cáncer pulmonar (Raimondi et al., 2005).

2.3 Características de la matriz extracelular (MEC)

Todas las células, tejidos y órganos animales se encuentran envueltos por una red tridimensional altamente compleja denominada matriz extracelular. La MEC está involucrada en múltiples procesos fisiológicos tales como: actividad inmune, tamiz biofísico de protección, angiogénesis, recuperación tisular, nutrición, distribución de fibras nerviosas y nervios, entre otras. Por otra parte, las modificaciones en la MEC pueden estar mediadas por mecanismos epigenéticos que son activados en la célula por el avance de fuerzas mecánicas hacia la membrana basal y a su vez, dicha señal se transmite al sistema de tensegridad desencadenando la respuesta. Las modificaciones en la MEC originan pérdida de las funciones fisiológicas mencionadas anteriormente, sobre todo, en la actividad inmunológica contra agentes tumorales, tóxicos e infecciosos (Naranjo et al., 2009).

La MEC se encuentra conformada esencialmente por 3 grandes grupos de moléculas: proteínas estructurales, de adhesión y proteoglicanos. Todas estas moléculas llevan a cabo actividades de manera conjunta como un complejo funcional altamente especializado. La conformación tridimensional de la matriz extracelular está constituida por fibras elásticas y el colágeno, mientras que la interacción de célula a célula y/o matriz es mediada por las moléculas de adhesión (glucoproteínas) que actúan como sustrato intracelular. Finalmente, para mantener el equilibrio ácido básico e hidroelectrico en la matriz intervienen los proteoglicanos y glucosaminoglicanos (Murphy y Nagase, 2008; Silvera y Barrios, 2002). En la Figura 2 se puede observar la estructura y componentes de la matriz extracelular.

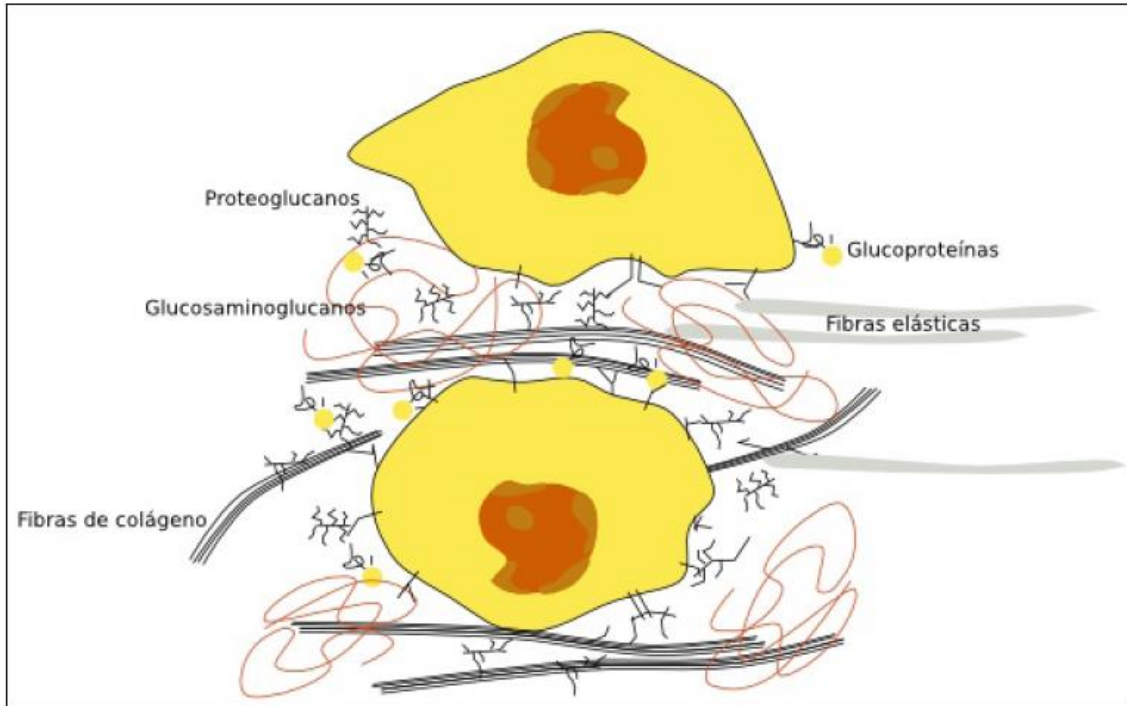


Figura 2. Esquema de la matriz extracelular.

Adaptado de Megías et al. (2014).

2.4 Metaloproteasas (MMPs) y cáncer

Las metaloproteasas de la matriz extracelular son un linaje de enzimas con una extensa actividad sobre los componentes de la matriz extracelular, estas endopeptidasas dependientes de zinc están involucradas en el mantenimiento, la formación y la remodelación de la MEC (Matrisian, 1992). Las MMPs alteran los componentes de la MEC (proteínas estructurales, de adhesión, glucosaminoglicanos y proteoglicanos) y además, procesan proteolíticamente moléculas de adhesión, receptores y factores de crecimiento (Murphy y Nagase, 2008). Esta familia de proteasas actúa de manera conjunta en distintos procesos fisiológicos y patológicos, y se ha observado que la acción de una de estas enzimas puede afectar directamente la actividad de la otra (Fingleton, 2006). Estudios previos han demostrado la implicación de las MMPs en las distintas etapas (migración, invasión, metástasis y angiogénesis) de la progresión tumoral (Gialeli et al., 2011) (Figura 3). Algunas de las aproximaciones terapéuticas en distintos tipos de cáncer se han centrado en el desarrollo de inhibidores para las

metaloproteasas, no obstante, su efecto se ha visto limitado debido al amplio espectro de los inhibidores empleados y la dosis efectiva de los mismos (Shay et al., 2015).

2.4.1 Influencia de las MMPs en el potencial invasivo de las células cancerosas

Las MMPs son de suma importancia en la migración de las células tumorales ya que debido a su actividad proteolítica pueden degradar las distintas barreras físicas de la MEC permitiendo la dispersión de los tumores malignos a través de los vasos sanguíneos. La formación de invadopodias (estructuras abundantes en actina) son esenciales para impulsar el proceso de invasión a nivel celular, además, de la contribución de varias desintegrinas (ADAMs), MMPs secretadas (MMP-2 Y MMP-9) y transmembrana (MMP-14) que conjuntamente desempeñan un papel fundamental en la degradación de distintas estructuras de la MEC permitiendo la progresión de las células cancerosas (Gialeli et al., 2011; Weaver, 2006) Por otra parte, se ha observado que la sobreexpresión de MMPs puede incrementar el potencial invasivo del tumor. A su vez, la expresión de los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs) reduce sustancialmente el potencial invasivo de las células tumorales, sin embargo, la capacidad de metástasis no depende únicamente de la actividad invasiva de los tumores malignos (Fingleton, 2006).

2.4.2 Papel de las MMPs en la proliferación de células cancerosas

La acción proteolítica de ADAMs y MMPs es esencial en el proceso de proliferación de las células cancerosas ya que puede regular la secreción de diversos receptores celulares como el factor de *insulin like growth factor* (IGF) y factores de crecimiento como el *epidermal growth factor receptor* (EGFR) que cuando se sobreexpresan influyen en la progresión tumoral. La regulación de las distintas señales de proliferación tumoral por parte de las ADAMs y MMPs potencia el proceso de proliferación celular en el cáncer. Adicionalmente, los

mucopolisacáridos podrían activar diversas MMPs y estas a su vez, generarían una mayor secreción de factores de crecimiento activos aumentando así la probabilidad de éxito en diversas fases de la proliferación de las células tumorales en el organismo (Gialeli et al., 2011; Maretzky et al., 2005; Nakamura et al., 2005).

2.4.3 Implicación de las MMPs en la apoptosis celular

La escisión del ligando Fas (inductor de la muerte celular) debido a la actividad proteolítica de ADAMs y MMPs implica una señal antiapoptótica para las células tumorales proporcionándoles quimiorresistencia y resistencia a experimentar la muerte celular programada. Por otra parte, se puede anular a las células *natural killer* (NK) debido a la separación proteolítica mediada por ADAMs de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH I) que se encuentran asociadas con las células tumorales (Gialeli et al., 2011; Kirkin et al., 2007; Strand et al., 2004).

2.4.4 Papel de las MMPs en los procesos de angiogénesis y vasculogénesis tumoral

Los procesos de expansión y migración en el cáncer dependen de forma directa de la capacidad de las células cancerosas para formar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Inicialmente, las colagenasas deben degradar estructuras de la MEC y posteriormente, favorecer la generación de agentes angiogénicos. La secreción de los factores de crecimiento (*basic fibroblast growth factor* (FGFb) y *vascular endothelial growth factor* (VEGF)) permite una mayor vasculogénesis del tumor ya que la actividad de la MMP-9 provoca un aumento sustancial en la concentración de dichos factores en el organismo. Por otra parte, las MMPs no se encargan únicamente de promover los procesos angiogénicos, sino también de regular la vasculogénesis y angiogénesis del tumor modulando la accesibilidad a los distintos sustratos empleados durante dichos procesos (Gialeli et al., 2011; Rundhaug, 2003).

2.4.5 Rol de las MMPs en la adhesión y transición en el cáncer

El procesamiento proteolítico de la laminina-5 y el colágeno IV impulsa la movilización de las células tumorales debido, a las intervenciones de las ADAMs y MMPs en las interacciones entre las células y en los procesos fisiológicos que implican a la MEC. Las transiciones morfológicas en el epitelio mesenquimal se han asociado con la sobreexpresión de múltiples MMPs. Durante este proceso existe una disminución en las interacciones intracelulares, una reducción sustancial de la adhesión entre células y una pérdida notable en la polaridad de dicho sistema, potenciando la migración de las células tumorales. Por otra parte, el aumento de la forma activa de MMP-2 debido a la presencia de hialuronano fomenta la progresión tumoral (Gialeli et al., 2011; Polyak y Weinberg, 2009).

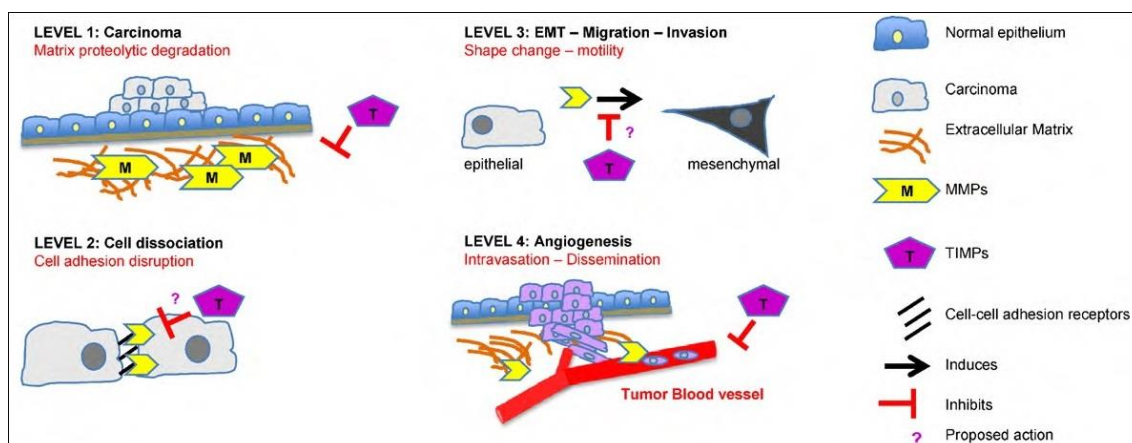


Figura 3. Papel de las MMPs en las distintas etapas de la progresión tumoral. Tomado de Bourbouli y Stetler (2010).

2.5 Polimorfismos en MMPs

Los polimorfismos (SNP) son variaciones genéticas que se encuentran en más del 1 % de la población. Estos cambios en el ADN en su mayoría no generan efectos adversos, pero son útiles para identificar características intrínsecas en distintas poblaciones. No obstante, estos SNPs pueden ubicarse en regiones codificantes o reguladoras generando modificaciones en los niveles de expresión del gen afectado. Se ha observado que los polimorfismos en las regiones

promotoras de las MMPs alteran los niveles de expresión de estas proteasas impidiendo o favoreciendo el avance o el grado de riesgo para diferentes patologías, entre ellas el cáncer (Fingleton, 2006).

La identificación de polimorfismos en el cáncer de pulmón se ha centrado en el reconocimiento de variaciones genéticas que podrían suponer un factor de riesgo para el desarrollo de esta neoplasia maligna. La determinación de dichos biomarcadores suministra información esencial para identificar factores de riesgo y permitir el desarrollo de tratamientos y sistemas de detección mucho más eficientes en el cáncer pulmonar. Numerosas investigaciones han determinado que los polimorfismos en diversos genes influyen en el potencial invasivo de las células cancerosas (Marshall y Christiani, 2013).

2.6 MMP-2 (Gelatinasa-A)

En lo que respecta a la gelatinasa-A (MMP-2) su importancia está dada por el hecho de que puede unirse y degradar el colágeno y la elastina, debido a que posee en su dominio catalítico tres dominios ricos en cisteína. La expresión de esta proteína se encuentra regulada por moléculas tales como: agentes tumorales, citoquinas, factores de crecimiento y oncogenes (Morgunova et al., 1999; Sternlicht y Werb, 2001). La gelatinasa A es una enzima de 72 kDa que se encuentra distribuida principalmente en las células endoteliales y fibroblastos, además, ha sido localizada en células tumorales malignas (Birbian et al., 2014; Urbina, 2005). En la Figura 4 se puede observar la estructura básica de las gelatinasas.

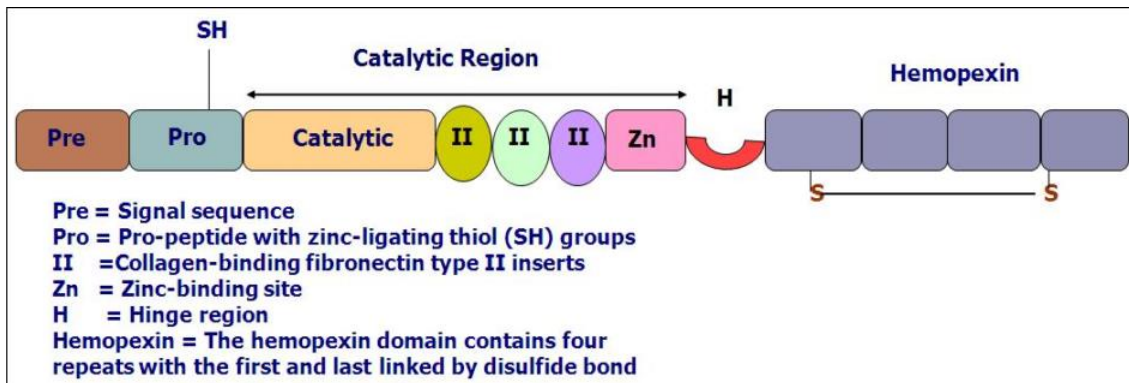


Figura 4. Esquema de la estructura básica de las gelatinasas.

Tomado de Chaudhary et al. (2010).

El gen MMP-2 se encuentra ubicado en el brazo q del cromosoma 16, algunos de los polimorfismos más importantes que se han identificado, se encuentran ubicados en la región promotora del mismo. En la Figura 5 se muestra una representación gráfica de la ubicación del gen MMP-2.

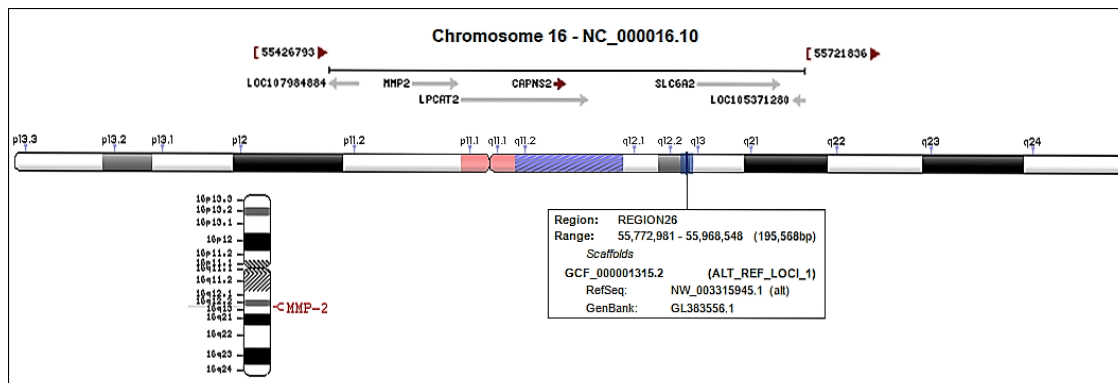


Figura 5. Mapa del cromosoma 16 del *Homo sapiens* y ubicación del gen MMP-2 en el mismo.

Adaptado NCBI (2016).

Una investigación en cáncer de pulmón en la población china demostró que los individuos con el genotipo CC para el polimorfismo MMP-2 -1306 C/T (rs243865) presentaban una mayor expresión de la enzima en relación con los genotipos CT y TT respectivamente (Yu et al., 2002). Por otra parte, en el cáncer de esófago en una población china se identificó la asociación entre los polimorfismos MMP-2 -735 C/T y -1306 C/T y el riesgo para presentar la patología en los individuos

analizados. En este estudio, el genotipo CC para ambos SNPs implicó una mayor expresión génica en contraste con los genotipos CT y TT respectivamente (Yu et al., 2004). Finalmente, Zhang et al. (2013) mediante un meta-análisis establecieron que los polimorfismos MMP-2 -1306 C/T Y MMP-3 -1171 5A/6A representan un factor de riesgo en distintos tipos de cáncer, sin embargo, se detectó una variación en la distribución de los distintos genotipos según el origen étnico de los individuos estudiados.

2.7 Factor de transcripción SP1

La regulación de la expresión génica en los organismos eucariotes está modulada por factores de transcripción los cuales actúan de manera selectiva en la región promotora de los genes, ya que este tipo de moléculas se enlazan a determinadas secuencias en el ADN regulando los procesos de transcripción y síntesis del ARN de una manera sistémica. Si bien no se conoce con exactitud los mecanismos que regulan la transcripción, una serie de análisis sugieren que la especificidad tisular en dicho proceso está modulada por este tipo de biomoléculas debido a su unión específica al ADN (Briggs et al., 1886).

Dentro de la familia de los factores transcripcionales denominados dedos de zinc Cys_2His_2 se encuentra Sp1. Esta biomolécula se une de manera selectiva en la región promotora de los genes cuya secuencia es rica en GC generando modificaciones post transcripcionales (sumoilación, fosforilación, glicosilación, ubiquitinación y acetilación), además está implicada en la expresión de varios genes esenciales en procesos del ciclo celular como: crecimiento, apoptosis, metabolismo y diferenciación (Infantino et al., 2011; Kaczynski et al., 2003).

Un estudio en glioma demostró la influencia de la expresión de MMP-2 sobre el potencial invasivo de este tumor cancerígeno. Se observó que los reguladores transcripcionales que trabajan en cis como (Sp1) son esenciales en la regulación de los niveles de expresión de MMP-2, permitiendo así la invasión por parte de las células de glioma, de modo que, Sp1 juega un papel vital en la expresión

constitutiva de esta enzima. Teniendo en cuenta estas premisas, las estrategias terapéuticas para esta enfermedad podrían centrarse en la modulación de la expresión del gen MMP-2 (Qin et al., 1999).

Una investigación en cáncer de mama demostró que el compuesto Indol-3-carbinol (I3C) posee propiedades antitumorales y su actividad se centra en la MMP-2. Los resultados del estudio demuestran una inhibición de la transcripción del gen de esta gelatinasa, debido a que el I3C impide la unión del factor transcripcional Sp1 al promotor del gen influyendo así en su transcripción. Estos resultados muestran que la capacidad de invasión y migración de las células cancerosas puede afectarse gracias a la acción de fármacos dirigidos hacia una MMP específica. (Hung y Chang, 2009).

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

El diseño experimental de la presente investigación se puede observar en la Figura 6.

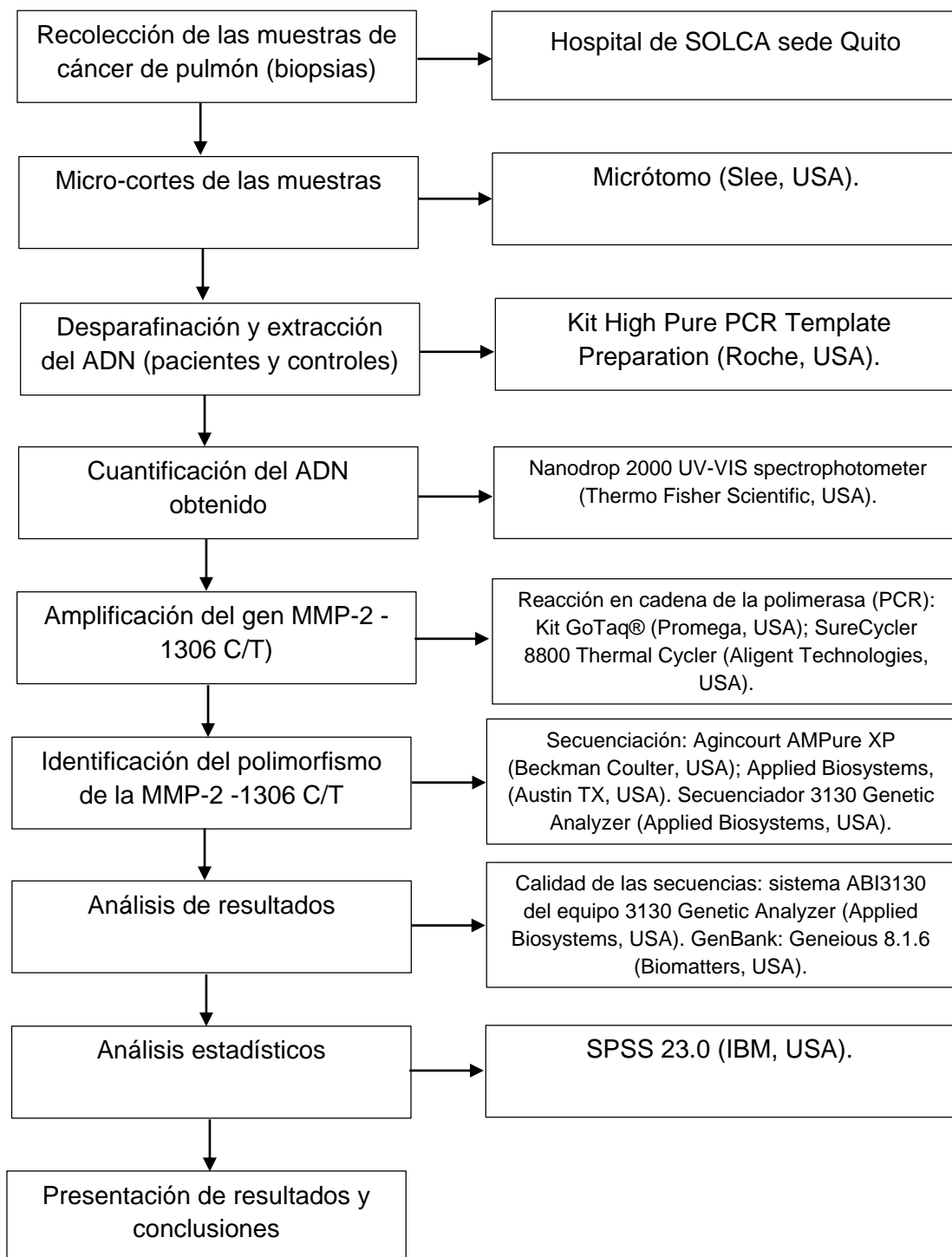


Figura 6. Esquema del diseño experimental realizado en el presente estudio.

4. CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA

4.1 Recolección de las muestras

El presente estudio se llevó a cabo bajo la dirección científica de la Dra. Alina Aguirre, Ph.D, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas (IIB) como parte del proyecto “Polimorfismos en genes de metaloproteasas como factores pronóstico en el cáncer de pulmón en la población ecuatoriana” aprobado por el Comité de Ética y Bioética para la investigación de la Universidad de Las Américas (CEBE). Para llevar a cabo esta investigación, se recopilaron 71 muestras de tejido tumoral (cáncer de pulmón) fijadas en formalina y embebidas en parafina de pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar en el hospital de la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer del Ecuador (SOLCA) núcleo Quito. Como controles se emplearon 77 muestras de ADN obtenidas de sangre periférica de individuos sanos, disponibles en el banco de muestras del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas. Las muestras fueron seleccionadas siguiendo los siguientes criterios de exclusión e inclusión (Tabla 1).

Tabla 1.

Criterios de exclusión e inclusión para la selección de las muestras patológicas y los controles.

Criterios	Muestras patológicas	Controles
Inclusión	<p>Pacientes con cáncer de pulmón histológicamente diagnosticado por estudio de biopsia.</p> <p>Consentimiento informado por escrito para participar en el estudio del paciente o su representante legal.</p> <p>Disponibilidad de los datos clínico patológicos de los pacientes.</p>	<p>Personas no diagnosticadas con cáncer de pulmón.</p> <p>Consentimiento informado por escrito para participar en el estudio de la persona o su representante legal.</p> <p>Disponibilidad de los datos clínico patológicos de las personas.</p>
Exclusión	<p>Tumores pulmonares sin diagnóstico confirmado.</p> <p>Historia previa de otras neoplasias.</p> <p>Pacientes que hayan recibido algún tratamiento para el cáncer previo a la cirugía.</p>	<p>Personas diagnosticadas con cáncer de pulmón.</p> <p>Historia previa de otras neoplasias.</p>

4.2 Microcortes de los bloques de parafina con tejido tumoral fijado con formalina

Los cortes histológicos correspondientes a cada muestra y teñidos con hetoxilina-eosina fueron evaluados al microscopio óptico por un patólogo que señaló en cada uno la zona correspondiente al tumor. Para el procesamiento de las muestras embebidas en parafina, la zona tumoral en cada bloque se cortó empleando un micrótopo (Slee, USA), mediante el cual se realizaron 7 micro-

cortes de 5 a 8 μm de grosor. Posteriormente, los micro-cortes fueron depositados en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL y almacenados a -20°C .

4.3. Desparafinación del tejido tumoral

El termo bloque *Accublock™ Digital Dry Bath* (Labnet, USA) se precalentó a 65°C . En tubos eppendorf estériles de 1,5 mL se colocaron 3 micro-cortes del tejido tumoral a los que se les añadió 1 mL de xilol ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$) y se mezcló con vórtex por 1 min. Seguidamente, las muestras se incubaron durante 5 min en el termo bloque a 65°C . Una vez culminada la incubación se centrifugó a 12000 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante retirándolo con la ayuda de una pipeta de 1000 μL sin tocar el pellet formado en la base del tubo. Se repitió el lavado con xilol. A continuación, se agregó 1 mL de etanol al 100% y se mezcló con vórtex por 1 min. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 3 min y se procedió a descartar el sobrenadante con una pipeta de 1000 μL sin tocar el pellet formado en la base del tubo. Se repitió el lavado con etanol al 100%. Finalmente, se añadió 20 μL de agua MiliQ estéril.

4.4 Extracción de ADN genómico a partir de tejido tumoral (Cáncer de Pulmón)

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo diseñado por el kit *High Pure PCR Template Preparation* (Roche, USA). En primera instancia se realizó la digestión enzimática. Se vertieron 200 μL del buffer de lisis de tejido (*Tissue Lysis Buffer*) del kit y 40 μL de proteinasa K reconstituida a cada una de las muestras previamente sometidas al proceso de desparafinación, se mezclaron brevemente con vórtex y fueron incubadas a 37°C en el termo bloque toda la noche.

Posteriormente se realizó la lisis celular y precipitación del ADN. Se añadieron 20 μL de proteinasa K reconstituida y se incubaron las muestras a 55°C por 2 horas. A continuación, se agregaron 200 μL de *Binding Buffer* se mezclaron con

vórtex por 1 min y se incubaron a 70°C por 10 min en el termo bloque. Una vez culminado el proceso de incubación se vertieron 100 µL de isopropanol (C₃H₈O), se mezcló mediante vórtex por 1 min y se transfirió todo el líquido a una columna de purificación con su respectivo tubo colector para centrifugarse a 8000 g durante 1 min. El termo bloque fue precalentado con el *Elution Buffer* a 70°C. Sucesivamente, se procedió a los lavados y elución del ADN. Se descartó el tubo colector y se colocó la columna de purificación en uno nuevo. Se añadieron 500 µL de *Wash Buffer* y se centrifugó a 8000 g por 1 min. Nuevamente se descartó el tubo colector y se introdujo la columna de purificación en nuevo tubo colector. Se repitió el procedimiento de lavado, con la diferencia que se descartó el líquido que contenía el tubo colector para ser rehusado. Se centrifugó a máxima velocidad durante 10 s para retirar los remanentes del *Wash Buffer*. Finalmente, se introdujo la columna de purificación en un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL se añadieron 30 µL de *Elution Buffer* precalentado a 70°C y se centrifugó a 8000 g por 1 min. Las muestras de ADN genómico fueron almacenadas a -20°C.

4.5 Extracción del ADN genómico a partir de sangre periférica

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo diseñado por el kit *High Pure PCR Template Preparation* (Roche, USA). El *Elution Buffer* se precalentó a 70°C en el termo bloque *Accublock™ Digital Dry Bath* (Labnet, USA). En primera instancia, se vertieron 200 µL de sangre total y el *Binding Buffer* con 40 µL de proteinasa K (reconstituida) en tubos eppendorf estériles de 1,5 mL, se mezcló con vórtex y se incubó a 70°C por 10 minutos. Una vez culminado el proceso de incubación se añadieron 100 µL de isopropanol (C₃H₈O), se mezcló mediante vórtex y se transfirió todo el líquido a una columna de purificación con su respectivo tubo colector para centrifugarse a 8000 g por 1 min. Se descartó el tubo colector y se colocó la columna de purificación en uno nuevo. Se añadieron 500 µL de *Inhibitor Removal Buffer* y se centrifugó a 8000 g por 1 min. Sucesivamente, se añadieron 500 µL de *Wash Buffer* y se centrifugó a 8000 g por 1 min. Nuevamente se descartó el tubo colector y se introdujo la columna de purificación en nuevo tubo colector. Se repitió el procedimiento de lavado, con la

diferencia que se descartó el líquido que contenía el tubo colector para ser reusado. Seguidamente, se centrifugó a máxima velocidad durante 10 s para retirar los remanentes del *Wash Buffer*. Finalmente, se introdujo la columna de purificación en un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL se añadieron 200 μ L de *Elution Buffer* precalentado a 70°C y se centrifugó a 8000 g por 1 min. Las muestras de ADN genómico fueron almacenadas a -20°C.

4.6 Cuantificación de ADN genómico

Para establecer la pureza y concentración de ADN genómico obtenido de cada una de las muestras se empleó el equipo *Nanodrop 2000 UV-VIS spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, USA). Para ello se utilizaron 2 μ L de ADN de cada una de las muestras para determinar la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ADN genómico obtenido se estableció mediante la relación de las absorbancias de 260/280 nm, valores entre 0,8-1 se considera como un grado alto de pureza.

4.7 Determinación de genotípica

4.7.1 Amplificación del fragmento del gen MMP-2 que contiene el polimorfismo rs243865.

Se utilizaron cebadores específicos reportados en la literatura por Yu et al. (2002) para la amplificación del polimorfismo rs243865 (MMP2-1306 C/T). La secuencia de nucleótidos de los cebadores se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2.

Cebadores específicos empleados en la amplificación del gen MMP-2 del polimorfismo rs243865.

Cebadores	Secuencias	Amplicón
MMP2-1306 FW	5'CTGACCCCCAGTCCTATCTGCC3'	295 pb
MMP2-1306 RV	5'TGTTGGGAACGCCTGACTTCAG3'	

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron diluciones del ADN de las muestras a una concentración de 20 ng/ μ L. La *Master Mix* se ajustó a un volumen de reacción de 20 μ L. Se emplearon 10,88 μ L Agua Milli-Q, 4 μ L de 5X *Green Go Taq*® *Reaction Buffer* (Promega, USA), 0,4 μ L de deoxinucleótidos trifosfato (10 mM), 1,2 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0,4 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido 100%) 0,4 μ L de *Platinum™ TAQ DNA Polymerase* (5 U/ μ L), (Invitrogen, USA), 0,4 μ L del cebador MMP2-1306-FW 5' CTGACCCCCAGTCCTATCTGCC 3' (10 μ M), 0,4 μ L del cebador MMP2-1306-RV 5' TGTTGGGAACGCCTGACTTCAG 3' (10 μ M) y 2 μ L de ADN genómico (20 ng/ μ L) de cada una de las muestras. El termociclador *SureCycler 8800* (Aligent Technologies, USA) fue el equipo empleado en la amplificación del gen de interés. Las condiciones de PCR optimizadas se especifican en la Tabla 3.

Tabla 3.

Condiciones de PCR empleada en la amplificación del gen MMP-2 del polimorfismo rs243865.

Etapas	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Ciclos
Denaturación inicial	15	95	1
Denaturación final	0,5	95	
Hibridación	1	64	40
Elongación Inicial	2	72	
Elongación final	7	72	1

Por otra parte, la comprobación del amplicón de 295 pb del gen MMP-2 se llevó a cabo mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%. El agar liofilizado se diluyó en el buffer Tris-borato 1X (TBE) mediante el uso de un microondas. Seguidamente, por cada 20 mL de solución preparada se le agregó 1 μ L de bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron cargados en los respectivos pocillos del gel que se encontraba en el interior de la cámara de electroforesis, el mismo que estaba embebido en TBE 1X y se empleó un marcador de peso molecular de 100 pb para comprobar la talla del fragmento de interés. La migración de los amplicones obtenidos se realizó por medio de un campo eléctrico de 100 V durante 35 minutos. Finalmente, en el transiluminador de luz *UV ImageQuant 300* se visualizó el resultado del gel.

4.7.2 Purificación del producto de PCR mediante *Ampure*

El método de purificación empleando el kit *Agencourt AMPure XP* se basa en la separación de los amplicones obtenidos en la técnica de PCR mediante la unión selectiva de los fragmentos de ADN a perlas magnéticas, ya que el compuesto contiene un tampón especial y gránulos paramagnéticos en una fase sólida lo que facilita la separación de los reactivos remanentes (polimerasa, buffers, cebadores, sales y dNTPs) empleados en la PCR (BeckmanCoulter, 2009).

Una vez corroborada la presencia del fragmento del gen MMP-2 del polimorfismo rs243865 en el gel de agarosa al 2% se realizó un protocolo de purificación de dichos amplicones para retirar remanentes o contaminantes en la PCR realizada previamente. En primera instancia se balanceó el compuesto *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter, USA) a temperatura ambiente y se homogenizó por medio de vórtex durante 3 min. A continuación, se agregaron 15 μ L de *AMPure* por cada 10 μ L del producto de PCR de cada una de las muestras, se mezcló con vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, los tubos se colocaron en una placa magnética y se dejaron incubar durante 5 minutos hasta que se visualizó la formación de un anillo y el líquido en el interior de los tubos se tornó totalmente claro. Con una micropipeta el líquido fue absorbido y

descartado en papel absorbente, durante el proceso se tuvo mucho cuidado en no tocar el anillo formado por la interacción de las perlas de la placa magnética y el ADN. Seguidamente, se realizaron 2 lavados con etanol al 100%, para ello se agregaron 200 μL del alcohol y se incubó durante 30 segundos. El etanol fue retirado de las muestras por medio de la inversión de la placa magnética sobre papel absorbente. Los residuos del alcohol fueron separados con una micropipeta. Por otra parte, la placa magnética con las muestras se colocó en la incubadora a una temperatura de 37°C por 15 minutos para favorecer la evaporación de los remanentes del etanol. Una vez culminada la incubación los tubos se retiraron de la placa magnética y se colocaron en una gradilla, se adicionaron 30 μL de Agua Milli-Q y se mezcló con vórtex por 1 minuto. A continuación, los tubos se introdujeron en la placa magnética para ser incubados durante 30 segundos a temperatura ambiente. Finalmente, el líquido en el interior de los tubos se tornó transparente y se lo trasvasó a nuevos tubos eppendorf estériles ya que contenía el ADN purificado de los fragmentos de interés.

4.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa para secuenciación

Una vez purificados los fragmentos de ADN de interés se realizó la PCR de secuencia por medio del kit *BigDye Terminator mix v3.1 Cycle Sequencing*. Este protocolo se basa en marcar con fluorocromos específicos a los nucleótidos del ADN molde de doble o simple cadena (AppliedBiosystems, 2010).

La PCR de secuenciación se ajustó a un volumen de reacción de 6 μL y se realizó en oscuridad. La *Master Mix* contenía 0,9 μL de 5x *BigDye Terminator Sequencing Buffer*, 0,5 μL de *BigDye Terminator mix v3.1* (Applied Biosystems, USA), 1,6 μL del cebador MMP2-1306-FW 5' CTGACCCCCAGTCCTATCTGCC 3' (1 μM) o del cebador MMP2-1306-RV 5' TGTTGGGAACGCCTGACTTCAG 3' (10 μM) y 3 μL del producto del proceso de purificación. Las condiciones de PCR se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4.

Condiciones de la PCR de secuencia.

Etapas	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Ciclos
Denaturación inicial	3	96	1
Denaturación final	0,1	96	
Hibridación	0,05	50,5	25
Elongación	4	60	

4.7.4 Purificación del producto de la PCR de secuencia mediante *Cleanseq* y secuenciación de ADN tipo Sanger

El método de secuenciación tipo Sanger mediante electroforesis capilar se sustenta en la técnica de PCR ya que se emplean cebadores específicos para flanquear una región de interés. El proceso de replicación del ADN se detiene con la adición de dideoxinucleótidos (ddNTPs) que se encuentran marcados con isótopos radioactivos o con fluorocromos de manera específica para cada una de las bases nitrogenadas. Posteriormente, se separan los fragmentos de ADN marcados por medio de una electroforesis de alta resolución. Finalmente, un láser excita a los fluorocromos presentes en el ADN que emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda para cada una de las bases nitrogenadas y un sistema computarizado traduce estas señales lumínicas. (Paz-y-Miño y López, 2014; Shendure y Ji, 2008).

Tras obtener el producto de la PCR de secuencia se empleó el *kit Agencourt® CleanSeq® Dye-Terminator Removal*. Este método de purificación se sustenta bajo el principio de separación por inmovilización reversible en una fase sólida ya que los amplicones de interés se adhieren a las perlas magnéticas y esto facilita la purificación de los fragmentos de ADN de interés de los reactivos remanentes empleados en la PCR de secuencia (BeckmanCoulter, 2006).

Primeramente, se balanceó el compuesto *Agencourt CleanSeq®* (Beckman Coulter, USA) a temperatura ambiente y se homogenizó por medio de vórtex

durante 3 min. Seguidamente, se agregaron 16,2 μL de etanol al 85% y 2 μL del compuesto por cada 6 μL del producto obtenido de la PCR de secuencia, se mezcló con vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos en la placa magnética hasta que se formó el anillo y el líquido se tornó totalmente claro. A continuación, se aspiró el líquido y se descartó en papel absorbente. Se realizaron 2 lavados con etanol al 85%, para ello se agregaron 100 μL del alcohol a cada una de las muestras y se incubó durante 30 segundos. El etanol fue retirado de las muestras por medio de la inversión de la placa magnética sobre papel absorbente. Por otra parte, la placa magnética con las muestras se colocó en la incubadora a una temperatura de 37°C por 15 minutos para favorecer la evaporación de los remanentes del etanol. Una vez culminada la incubación los tubos se retiraron de la placa magnética y se colocaron en una gradilla, se adicionaron 20 μL de Agua Milli-Q y se mezcló con vórtex por 1 minuto. A continuación, los tubos se introdujeron en la placa magnética para ser incubados durante 30 segundos a temperatura ambiente. Finalmente, el líquido en el interior de los tubos se tornó transparente y se lo trasvasó a la placa del secuenciador *Genetic Analyzer 3130* (Applied Biosystems, USA). El líquido contiene los fragmentos de ADN purificados. El análisis genotípico se realizó con el software *Geneious 8.1.6* (Biomatters, USA).

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Historias clínicas y encuestas biomédicas

En el presente estudio se analizaron 71 muestras de tejido tumoral (cáncer de pulmón) fijadas con formalina y embebidas en parafina y 77 muestras de sangre periférica de individuos sanos (controles) a los cuáles se les realizó una encuesta biomédica. Se compiló la información del historial clínico como: edad, sexo, diagnóstico, tiempo de supervivencia, consumo de alcohol y consumo de tabaco. Los datos obtenidos de las historias clínicas y las encuestas biomédicas se recopilaron en una base de datos.

5.1.1 Distribución por edad y género

Se analizaron 71 muestras de pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón. El 56,34% de las muestras correspondían al sexo masculino y el 43,66% al sexo femenino. La distribución por edades se comportó como se describe a continuación. En el sexo masculino el 22,54% de los pacientes presentaban edades comprendidas entre 68-84 años y un porcentaje similar en el rango de 51-67 años, mientras que en el género femenino el 21,13% de los pacientes se encontraban en un rango de edad entre los 51-67 años. La distribución por edad y sexo se resume en la Tabla 5.

Tabla 5.

Distribución por edad y sexo de los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón incluidos en el estudio.

Edad	Hombres	Porcentaje	Mujeres	Porcentaje	Total
17-33	2	2.82	1	1.41	3
34-50	6	8.45	8	11.27	14
51-67	16	22.54	15	21.13	31
68-84	16	22.54	7	9.86	23
Total	40	56.34	31	43.66	71

Los registros de cáncer de pulmón en el Ecuador señalan un mayor número de casos e incidencia de esta patología en el sexo masculino. Sin embargo, se ha observado un incremento en la incidencia de esta neoplasia maligna en el sexo femenino en la ciudad de Quito (Cueva y Yépez, 2014). Varias investigaciones han determinado en diferentes poblaciones una distribución por edad similar a la encontrada en el presente estudio. Paz-y-Miño et al. (2010) señalan que los 68 años es la edad promedio de diagnóstico en los pacientes con cáncer pulmonar en la población ecuatoriana. Sin embargo, en un estudio realizado en una población norteamericana se estableció que la edad media de los pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar fue 59 años en ambos géneros masculino y femenino. (Wahbah et al., 2007). Finalmente, el rango de edad más frecuente en los pacientes con cáncer de pulmón en una investigación realizada en una población china fue 55-64 años (Zou et al., 2014).

Por otra parte, en el estudio se analizaron 77 muestras de personas “sanas” (que se emplearon como controles). El 49,35% de las muestras correspondieron al sexo masculino y el 50,65% al sexo femenino. La distribución por edades reveló que en ambos el 31,17% de los individuos estaba comprendido en el rango de edad entre 17-33 años. La distribución por edad y sexo de los controles se resume en la Tabla 6.

Tabla 6.

Distribución por edad y sexo de los controles.

Edad	Hombres	Porcentaje	Mujeres	Porcentaje	Total
17-33	24	31.17	24	31.17	48
34-50	9	11.69	7	9.09	16
51-67	3	3.90	8	10.39	11
68-84	2	2.60	0	0.00	2
Total	38	49.35	39	50.65	77

5.2 Hábitos tóxicos

Los hábitos de consumo de tabaco y alcohol se estudiaron tanto en los pacientes como en los controles. Los datos se resumen en las tablas 7-8 y en las Figuras 7 y 8 respectivamente. El 53,52% de los individuos con cáncer de pulmón y el 59,74% de los sujetos control no presentaban historial de tabaquismo. Por otra parte, el 61,97% de los pacientes con cáncer pulmonar no consumían alcohol, sin embargo, el 63,64% de los individuos control refirió ingestión ocasional de bebidas alcohólicas.

Tabla 7.

Historial de tabaquismo en pacientes y controles.

Criterio	Consumo de tabaco			
	Casos		Controles	
	N	%	N	%
Actual	25	35.21	8	10.39
Ocasional	5	7.04	12	15.58
Anterior	2	2.82	7	9.09
Pasivo	1	1.41	4	5.19
Nunca	38	53.52	46	59.74

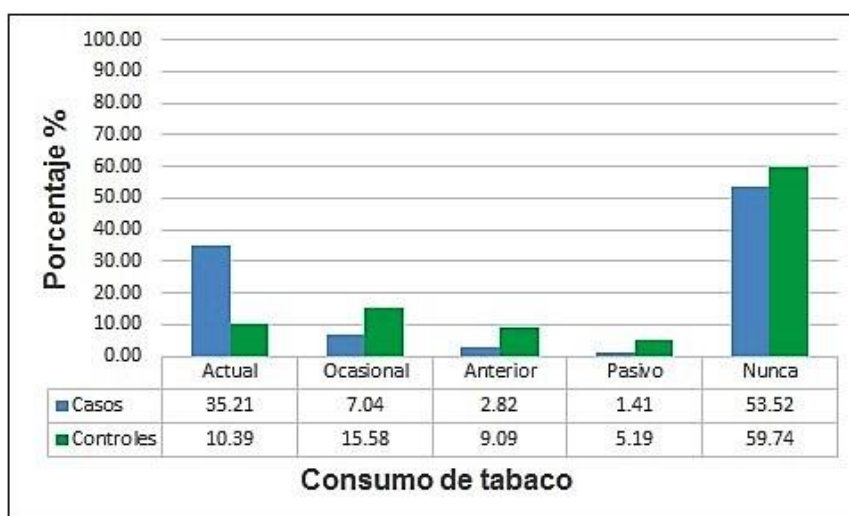


Figura 7. Distribución porcentual de la población de estudio según el consumo de tabaco.

Tabla 8.

Frecuencia de consumo de alcohol en pacientes y controles.

Criterio	Consumo de alcohol			
	Casos		Controles	
	N	%	N	%
Actual	11	15.49	5	6.49
Ocasional	15	21.13	49	63.64
Anterior	1	1.41	1	1.30
Nunca	44	61.97	22	28.57

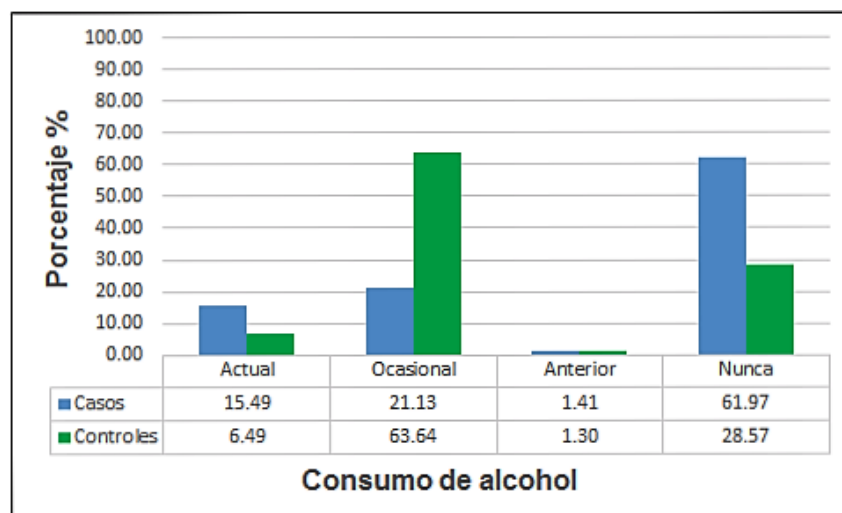


Figura 8. Distribución porcentual de la población estudiada según el consumo de alcohol.

5.3 Clasificación histológica de las muestras

Los 71 casos analizados se estratificaron de acuerdo a su clasificación histológica. El tipo histológico con mayor frecuencia fue el adenocarcinoma en el 60,56% de pacientes, mientras que el carcinoma de células grandes fue el tipo histológico que se presentó con menor frecuencia, solo en un 4,23% de los pacientes incluidos en el estudio. La clasificación histológica de los pacientes se puede apreciar en la Tabla 9 y la Figura 9.

Tabla 9.

Clasificación histológica de los pacientes incluidos en el estudio.

Tipo histológico	N	%
Carcinoma escamoso	20	28.17
Adenocarcinoma	43	60.56
Carcinoma de células pequeñas	5	7.04
Carcinoma de células grandes	3	4.23

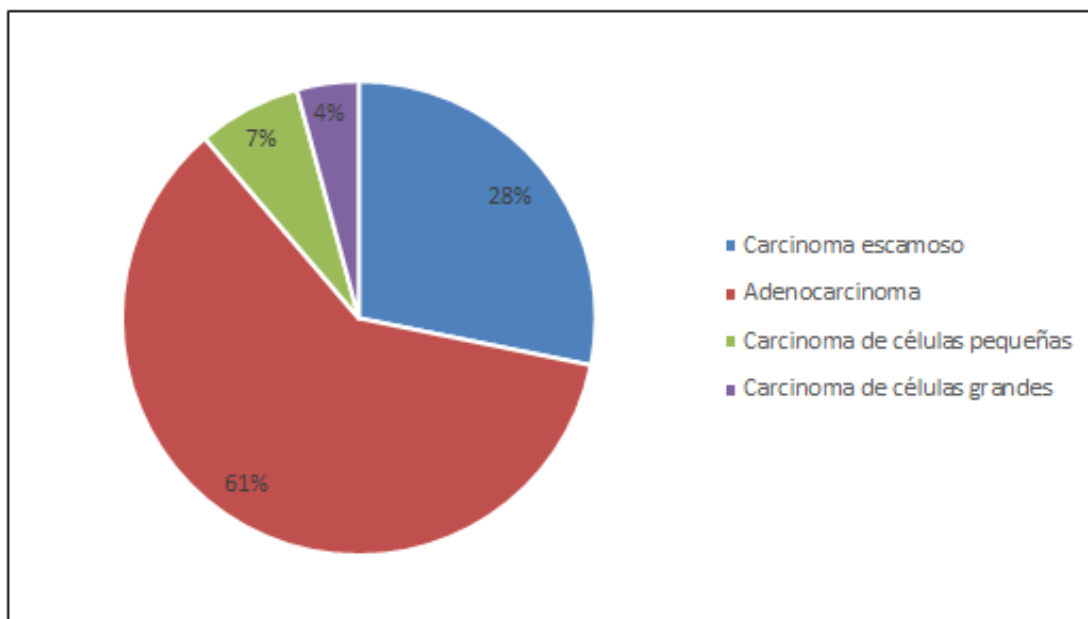


Figura 9. Distribución de tipos histológicos del cáncer de pulmón.

Los resultados obtenidos concuerdan con varios estudios que han establecido que el adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente en distintas regiones del mundo. Un estudio epidemiológico realizado entre los años 1986-2010 en la ciudad de Quito determinó que el tipo histológico de cáncer de pulmón más frecuente fue el adenocarcinoma (Cueva y Yépez, 2014). Adicionalmente, el adenocarcinoma es el que se encuentra mayormente distribuido en distintas poblaciones, 91% en la ecuatoriana (Paz-y-Miño et al., 2010) en la china con el 65,79% (Zou et al., 2014) y 52% en asiáticos (Lu et al., 2016). Por otra parte, las frecuencias de tipo histológico observadas en varias regiones del mundo ubican primero al adenocarcinoma, seguido del carcinoma escamoso, el carcinoma de

células pequeñas y el carcinoma de células grandes (Huang et al., 2015; Meza et al., 2015; Zou et al., 2014).

Varios aspectos pueden influir en la incidencia del cáncer de pulmón y su clasificación histológica. El cambio en la fabricación de cigarrillos puede ser un detonante en el aumento de la incidencia de diversos tipos histológicos. La generación de cigarrillos con filtro contiene mayor concentración de nitrosaminas (relacionados con el adenocarcinoma) y menores cantidades de nicotina y alquitrán. Sin embargo, se ha observado un mayor consumo de estos productos ya que se aumenta el nivel de absorción del humo debido a que se genera un bloqueo en los poros de ventilación en el filtro del cigarrillo, facilitando el ingreso y distribución de los agentes carcinogénicos en los pulmones (Wahbah et al., 2007). La edad, el género y diversas enfermedades respiratorias se han asociado con un mayor riesgo para desarrollar un tipo histológico específico de cáncer pulmonar (Huang et al., 2015).

5.4 Prueba estadística de Fisher y Chi cuadrado de Pearson (consumo de tabaco y clasificación histológica)

Los análisis estadísticos (χ^2 y prueba exacta de Fisher) se aplicaron a los pacientes con cáncer pulmonar, con la finalidad de determinar si existe una relación estadísticamente significativa entre los tipos histológicos de la enfermedad y el consumo de tabaco. En la Tabla 10, se resume la distribución de los distintos tipos histológicos de acuerdo con el consumo de tabaco. El análisis arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para la relación entre la clasificación histológica y el consumo de tabaco, ya que el valor p de la prueba exacta de Fisher fue 0,007 con un IC del 95%. Por lo tanto, existe una asociación estadísticamente significativa entre el tipo histológico y el hábito tóxico analizado. Los resultados se pueden visualizar en la Tabla 11.

Tabla 10.

Estratificación de los tipos histológicos del cáncer de pulmón de acuerdo con el consumo de tabaco.

Clasificación	Consumo de tabaco					Total
	Actual	Ocasional	Anterior	Pasivo	Nunca	
Carcinoma de células escamosas	12	2	0	0	6	20
Adenocarcinoma	9	2	1	1	30	43
Carcinoma de células pequeñas	3	0	1	0	1	5
Carcinoma de células grandes	1	1	0	0	1	3
Total	25	5	2	1	38	71

Tabla 11.

Prueba de Fisher y Chi-cuadrado de los tipos histológicos del cáncer de pulmón de acuerdo con el consumo de tabaco.

Prueba estadística	Valor	gl	Valor p
Chi-cuadrado de Pearson	22,794	12	0,091
Prueba exacta de Fisher	23,611		0,007

El carcinoma escamoso y carcinoma de células pequeñas presentan una fuerte asociación con el tabaquismo en comparación con el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes en distintas poblaciones (Fukumoto et al., 2015; Lee y Forey, 2013; Lee et al., 2012; Yun et al., 2015). Estas asociaciones podrían deberse a diversos factores de riesgo para desarrollar los distintos tipos histológicos.

En el cigarrillo se han identificado alrededor de 20 compuestos carcinogénicos (butanona, óxido de etileno, hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales,

nitrosaminas y compuestos radioactivos) que actúan a nivel pulmonar. Estos agentes tóxicos ingresan en las vías respiratorias mediante el humo del cigarrillo y se distribuyen en el tejido pulmonar aumentando así sustancialmente, el riesgo para padecer este tipo de neoplasia maligna (Fukumoto et al., 2015).

Según Meza et al. (2015) aunque el consumo de tabaco está asociado a distintos tipos histológicos del cáncer pulmonar, existe una cierta predisposición para desarrollar ciertos tipos histológicos (carcinoma de escamoso y de células pequeñas) con el tabaquismo. Sin embargo, es necesario realizar estudios en los que se determine la influencia de las dosis de tabaco y su relación con los tipos histológicos y otros factores de riesgo habituales en el cáncer de pulmón.

Si bien es cierto que varios factores de riesgo (contaminación del aire, consumo de tabaco, exposición al radón, cromo y arsénico) están asociados con el cáncer pulmón, el tabaquismo se ubica como el principal agente para el desarrollo del carcinoma escamoso. No obstante, muchos de los pacientes diagnosticados con distintos tipos histológicos nunca han fumado por lo que esta patología también podría estar relacionada con otros factores ambientales y/o genéticos (Huang et al., 2015; Raimondi et al., 2005).

5.5 Análisis de supervivencia mediante el método Kaplan-Meier

Se aplicó el método de las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para determinar si el tipo histológico que presentó cada uno de los pacientes con cáncer de pulmón influye en el tiempo de supervivencia de los mismos. En la Tabla 12, se observa el número de eventos (muerte del paciente) y el número de censurados (pacientes vivos en el periodo de estudio o pérdida de seguimiento). Se obtuvo una significancia estadística del 0,036 con IC del 95 %, este resultado se puede visualizar en la Tabla 13. Teniendo en cuenta estos resultados se puede concluir que el tipo histológico de cáncer de pulmón influye en el tiempo de supervivencia de los pacientes. En la Tabla 14 y Figura 10, se muestran los meses de supervivencia de los pacientes según su clasificación histológica. El

tiempo de supervivencia promedio es de 2,4 meses en el carcinoma de células pequeñas, 11,3 meses en carcinoma de células escamosas, 15,9 meses en carcinoma de células grandes y 16,6 meses en adenocarcinoma.

Tabla 12.

Resumen de procesamiento de datos por el método Kaplan-Meier.

Clasificación	N total	N de eventos	Censurado	
			N	%
Carcinoma de células escamosas	20	16	4	20,00
Adenocarcinoma	43	39	4	9,30
Carcinoma de células pequeñas	5	5	0	0,00
Carcinoma de células grandes	3	2	1	33,30
Global	71	62	9	12,70

Tabla 13.

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de clasificación.

Prueba estadística	Chi-cuadrado	gl	Valor P
Log Rank (Mantel-Cox)	8,563	3	0,036

Tabla 14.

Media del tiempo de supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón de acuerdo a su clasificación histológica.

Clasificación	Media			
	Estimación	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Carcinoma de células escamosas	11,34	5,13	1,29	21,38
Adenocarcinoma	16,64	4,89	7,06	26,26
Carcinoma de células pequeñas	2,44	0,66	1,14	3,74
Carcinoma de células grandes	15,89	7,85	0,50	31,29
Global	15,63	3,86	8,07	23,20

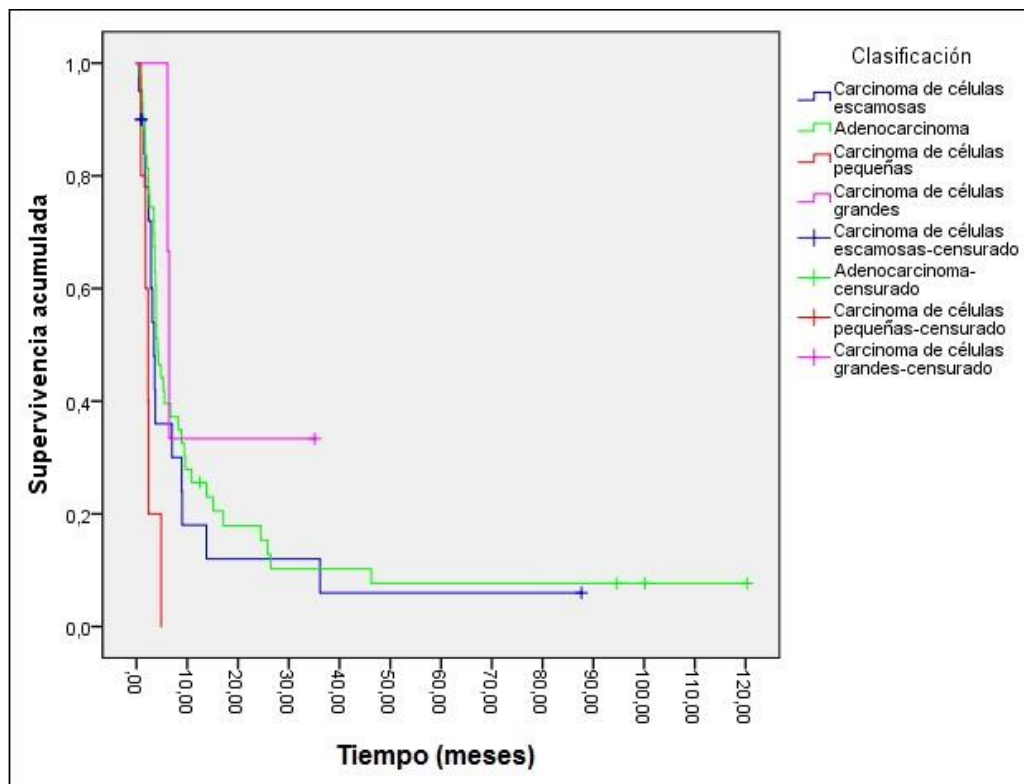


Figura 10. Curvas de supervivencia en función de la clasificación histológica de los pacientes con cáncer pulmonar.

Los pacientes con carcinoma de células pequeñas presentaron una expectativa de vida promedio de 2,4 meses siendo el tipo histológico más agresivo, mientras que el adenocarcinoma presentó una expectativa de supervivencia promedio de 16,6 meses, ubicándose como el tipo histológico menos agresivo. Shajarehpoor et al. (2016) determinaron que los genotipos (CC, CT y TT) para el polimorfismo rs243865 no presentaron una asociación estadísticamente significativa con diferentes factores clínico patológicos analizados en relación con el riesgo de padecer cáncer de próstata. Asimismo, Eftekhary et al. (2015) no observaron una asociación entre el SNP MMP-2 -1306 C/T y los datos clínico patológicos de los pacientes con carcinoma epidermoide esofágico incluidos en su estudio. Rollin et al. (2007) por su parte, demostraron que no existe una asociación significativa entre el tiempo de supervivencia de los pacientes con CPCNP y el polimorfismo MMP-2 -1306 C/T. Sin embargo, Cetin et al. (2011) determinaron que existe una asociación entre el tiempo de supervivencia y el tipo histológico de cáncer de pulmón en la población norteamericana. Los pacientes con carcinoma de células grandes presentaron un tiempo de supervivencia menor (12,8%) que los pacientes con adenocarcinoma (29,1%). Estos investigadores demostraron además que otros aspectos como el grupo étnico, el grado del tumor y la edad influyen en el pronóstico del cáncer de pulmón en de los diferentes tipos histológicos analizados.

Un estudio en una población marroquí determinó que existe una asociación estadísticamente significativa entre la supervivencia de los pacientes (mujeres) con cáncer pulmonar y el adenocarcinoma (Zakkouri et al., 2015) . Estos índices de mortalidad pueden deberse al estadio clínico del tumor maligno en el momento del diagnóstico. Según Cueva y Yépez (2014) entre los años 1986-2010 en la ciudad de Quito, se pudo observar un bajo número de pacientes diagnosticados en las primeras fases (I y II) de la enfermedad por lo tanto un bajísimo porcentaje de los pacientes tendría un buen pronóstico. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Meza et al. (2015) y Zakkouri et al. (2015). Estos investigadores observaron un alto porcentaje de tumores en las

fases III y IV para los distintos tipos histológicos en individuos de las poblaciones marroquí y norteamericana respectivamente.

5.6 Determinación genotípica

5.6.1 Amplificación de los fragmentos específicos del gen MMP-2 que contiene el polimorfismo rs243865

Mediante la técnica de PCR se amplificó un fragmento de 295 pb de la región promotora del gen MMP-2, que contenía el polimorfismo rs243865. Las concentraciones de los reactivos y las condiciones empleadas para la amplificación se han descrito previamente en el apartado de Metodología. El resultado obtenido en la amplificación por PCR se puede observar en la Figura 11.

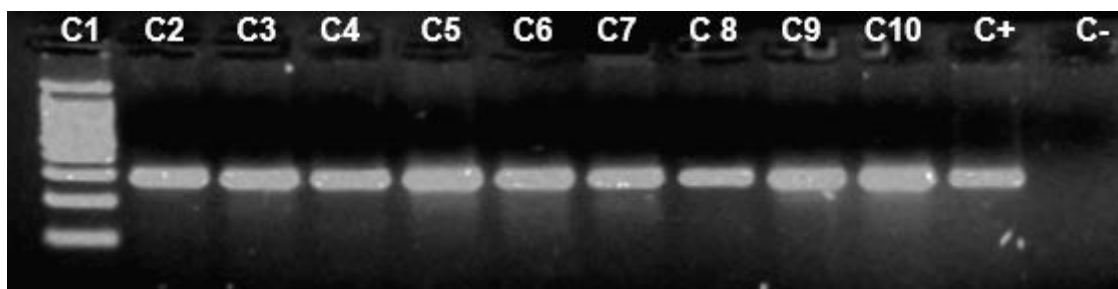


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplicones del fragmento de 295 pb del promotor del gen MMP-2.

- Carril C1: marcador de peso molecular de 100 pb.
- Carriles C2-C6: amplicones de 295 pb de muestras de pacientes con cáncer de pulmón.
- Carriles C7-C10: amplicones de 295 pb de controles.
- Carriles C⁺ y C⁻: control positivo (muestras de sangre) y control negativo (reacción sin ADN).

5.6.2 Secuenciación de ADN tipo Sanger y electroforesis capilar

5.6.2.1 Análisis del polimorfismo MMP-2 -1306 C/T (rs243865)

En los 71 casos de pacientes con cáncer de pulmón estudiados solo un paciente se encontró el polimorfismo MMP-2 -1306 C/T, tal y como se puede apreciar en

el electroferograma de la Figura 12, en la cual se muestra la secuencia de amplicón del fragmento del gen MMP-2 en el paciente heterocigoto (CT). Sin embargo, se pudo evidenciar la presencia de nuevos polimorfismos en la región promotora del gen MMP-2 en las muestras a partir de diferentes pacientes en las posiciones: 55477786, 55477824, 55477842, 55477846, 55477865, 55477881 y 55477883. Los resultados del electroferograma se pueden visualizar en la Figura 13.

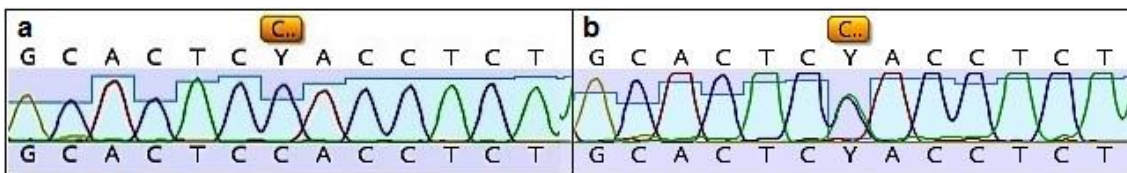


Figura 12. Identificación del polimorfismo C1306T del gen MMP-2 (rs243865) en los pacientes con cáncer de pulmón mediante secuenciación tipo Sanger y electroforesis capilar.

- Electroferograma de individuos homocigotos (CC).
- Electroferograma de individuo heterocigoto (CT).

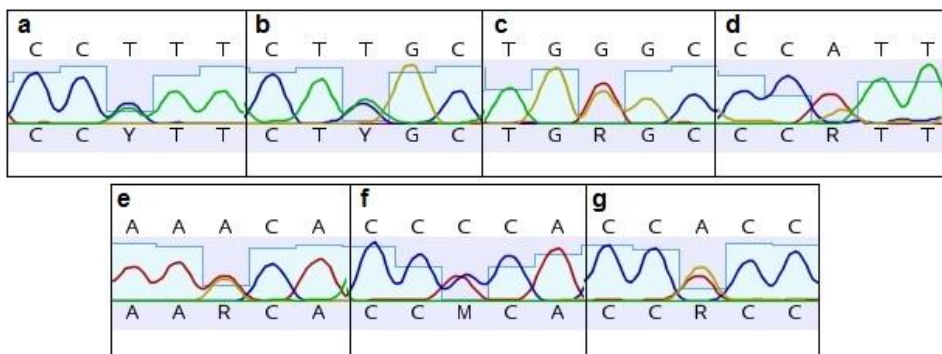


Figura 13. Identificación de nuevos polimorfismos en el promotor del gen MMP-2 en los pacientes con cáncer de pulmón mediante secuenciación tipo Sanger y electroforesis capilar.

- Electroferograma del polimorfismo 55477786 (TC).
- Electroferograma del polimorfismo 55477824 (TC).
- Electroferograma del polimorfismo 55477842 (GA).
- Electroferograma del polimorfismo 55477846 (AG).
- Electroferograma del polimorfismo 55477865 (AG).
- Electroferograma del polimorfismo 55477881 (CA).
- Electroferograma del polimorfismo 55477883 (AG).

En lo que respecta a los controles se analizaron 77 muestras de las cuales 28 individuos presentaban el polimorfismo -1306 C/T en el promotor del gen MMP-2. En la Figura 14, se muestra el electroferograma de los individuos homocigotos normales (CC) representados en el panel A, (se puede observar un pico de coloración azul en la posición -1306 correspondiente a la base nitrogenada citosina). Los individuos heterocigotos (CT) están representados en el panel B, (se observan dos picos de coloración azul y verde que representan a las bases nitrogenadas citosina y timina respectivamente). Finalmente, los individuos homocigotos mutantes (TT) se muestran en el panel C, (la base nitrogenada timina está representada con un pico de coloración verde).

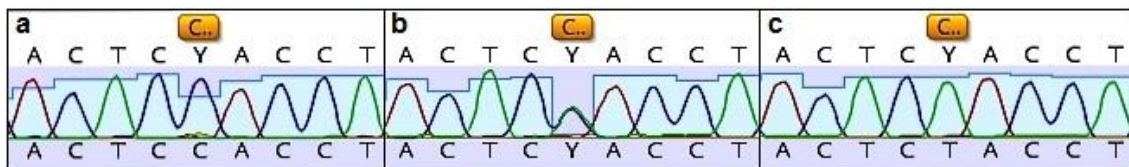


Figura 14. Identificación del polimorfismo -1306 C/T del gen MMP-2 en los individuos control mediante secuenciación tipo Sanger y electroforesis capilar.

- Electroferograma de individuos homocigotos (CC).
- Electroferograma de individuos heterocigotos (CT).
- Electroferograma de individuos homocigotos (TT).

5.6.2.2 Distribución y frecuencias genotípicas del polimorfismo c1306t del gen MMP-2 (rs243865)

Las frecuencias genotípicas y distribuciones obtenidas para el polimorfismo -1306 C/T en el promotor del gen MMP-2 para los casos y controles se pueden observar en la Tabla 15 y Figura 15 respectivamente. En los pacientes la frecuencia genotípica del homocigoto dominante (C/C) corresponde al 98,59% de muestras y 1,41% para el heterocigoto (C/T). Sin embargo, en los controles se determinó una frecuencia genotípica del homocigoto dominante "normales" (C/C) del 63,64%, para los heterocigotos (C/T) del 32,47% y un 3,90% para los homocigotos recesivos "mutantes" (T/T). Por lo tanto, se observa una notable

diferencia en la distribución genotípica del SNP entre pacientes con cáncer pulmonar e individuos control. Estas distribuciones varían ampliamente en investigaciones previas realizadas en numerosas patologías alrededor del mundo. Las evidencias apuntan a que las diferencias étnicas entre las poblaciones estudiadas podrían ser la causa más probable de esta notable variabilidad. Li et al. (2015) realizaron un meta-análisis basado en un modelo de libre enfoque y regresión lineal en cáncer de pulmón para diferentes polimorfismos en las MMPs. Los resultados obtenidos demuestran que la distribución alélica de T en el SNP MMP-2 -1306 C/T varía según los grupos étnicos (asiáticos y caucásicos) en el grupo control del estudio. El grupo control caucásico presentó una baja distribución alélica T en comparación con los individuos control asiáticos. No obstante, dicho polimorfismo representa un factor de riesgo para padecer cáncer pulmonar solo en la población asiática estudiada. Adicionalmente, Kawal et al. (2016) determinaron que las frecuencias genotípicas (CC, CT y TT) fueron similares en el grupo de pacientes con oligodendroglioma e individuos control para el SNP rs243865. Los autores señalan que estos resultados pueden deberse a variaciones étnicas y al tamaño de la muestra empleada en el estudio.

Tabla 15.

Frecuencias genotípicas para el polimorfismo C1306T del promotor del gen MMP-2.

Genotipo	Casos (SNP rs243865)			Controles (SNP rs243865)		
	C1306T	Frecuencia	%	C1306T	Frecuencia	%
Homocigoto dominante	C/C	70	98.59	C/C	49	63.64
Heterocigoto	C/T	1	1.41	C/T	25	32.47
Homocigoto recesivo	TT	0	0.00	T/T	3	3.90

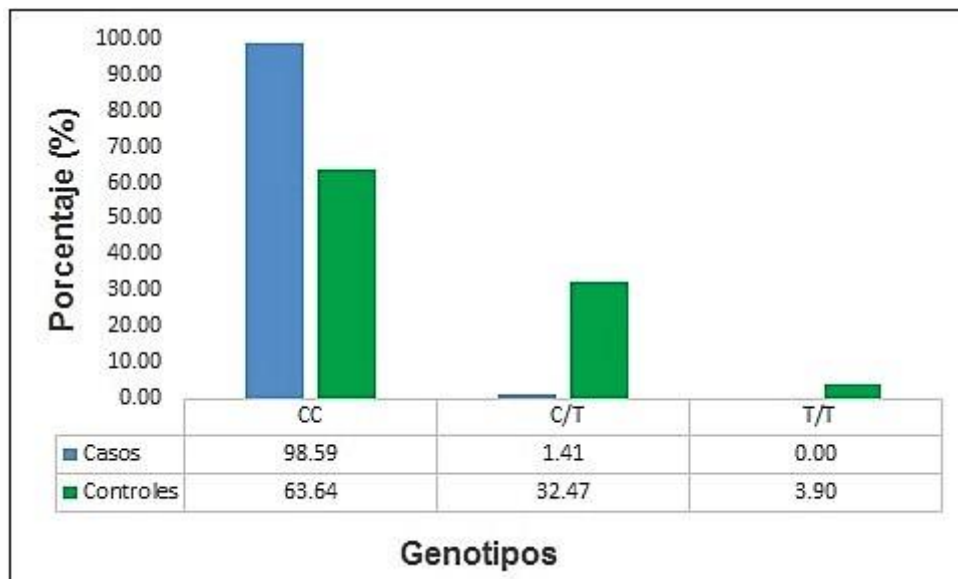


Figura 15. Distribución genotípica del polimorfismo -1306 C/T del gen MMP-2 en casos y controles.

5.6.3 Prueba de Fisher y Chi-cuadrado de Pearson (Genotipos)

El análisis estadístico se aplicó a los individuos controles, con la finalidad de determinar si existe una relación estadísticamente significativa entre la presencia del polimorfismo MMP-2 -1306 C/T y el género. En la Tabla 16, se resume la distribución de los distintos genotipos en función del género para cada uno de los individuos control. No se obtuvo un resultado estadísticamente significativo ($p < 0,05$) ya que el valor p obtenido de la prueba exacta de Fisher fue de 0,654 con un IC del 95%. Por lo tanto, no existe una asociación entre la presencia del polimorfismo de acuerdo al género, ya que dicha distribución se debe al azar. El resultado se puede visualizar en la Tabla 17. La prueba de Fisher y chi-cuadrado no se aplicaron a los nuevos polimorfismos y al polimorfismo rs243865 encontrados en los pacientes con cáncer de pulmón debido a la baja frecuencia en la que se presentaron en muestra.

Tabla 16.

Estratificación de los genotipos del polimorfismo MMP-2 -1306 C/T de acuerdo al género en la población control.

Presencia/Ausencia	Género		Total
	Masculino	Femenino	
Homocigoto dominante (C/C)	26	23	49
Heterocigoto (C/T)	11	14	25
Homocigoto recesivo (T/T)	1	2	3
Total	38	39	77

Tabla 17.

Prueba de Fisher y Chi-cuadrado del polimorfismo MMP-2 -1306 C/T y el género en la población control.

Prueba estadística	Valor	gl	Valor p
Chi-cuadrado de Pearson	0,864	2	0,654
Prueba exacta de Fisher	0,950		0,654

Estos resultados demuestran que no existe una asociación entre el SNP rs243865 y el riesgo para desarrollar cáncer de pulmón, debido a que el polimorfismo se encontró en un solo paciente dentro de la población estudiada. A una conclusión similar han arribado otros autores en estudios similares abordando distintos tipos de cáncer y otras patologías. Un meta-análisis para determinar el riesgo de metástasis en diferentes tipos de cáncer (melanoma, gástrico, cuello/cabeza y mama) en poblaciones asiáticas y europeas, señala que no existe una asociación significativa entre la presencia del polimorfismo -1306 C/T en el promotor del gen MMP-2 y el riesgo de metástasis. (Liu et al., 2012). También, varios estudios han establecido que no existe una relación estadísticamente significativa entre el polimorfismo MMP-2 -1306 C/T y el riesgo de desarrollar diferentes tipos de cáncer, como en el estudio realizado en cáncer de próstata en individuos iraníes (Shajarehpoor et al., 2016), en la investigación en adenoma pituitario realizada en individuos control y pacientes en una población de Lituania (Glebauskiene et al., 2016), en cáncer de pulmón de

células no pequeñas (CPCNP) en la población francesa (Rollin et al., 2007), en carcinoma epidermoide esofágico en controles y pacientes en individuos iraníes (Eftekhary et al., 2015), en pacientes con oligodendroglioma de una población del norte de la India (Kawal et al., 2016) y en el riesgo de padecer cáncer de próstata en individuos turcos (Yaykasli et al., 2014). Por otra parte, en las investigaciones de Shajarehpoor et al. (2016) y Glebauskiene et al. (2016) mencionadas anteriormente, el genotipo CC del MMP-2 -1306 C/T presentó una mayor frecuencia genotípica en los pacientes en relación con la población control estudiada. Singh et al. (2016) observaron que en la población india el alelo T del SNP rs243865 está mayormente distribuido en los individuos control en comparación con los pacientes con cáncer uterino. Mientras que los genotipos (CC y CT) se encontraron distribuidos de manera equitativa entre los pacientes con cáncer de próstata y los individuos control (Yaykasli et al., 2014).

Es probable que, el polimorfismo MMP-2 -1306 C/T pueda ejercer un efecto protector en la población ecuatoriana estudiada para el desarrollo de cáncer pulmonar. Esta hipótesis se sustenta con varios elementos: en primer lugar, la baja frecuencia genotípica encontrada para el genotipo heterocigoto CT (1,41%) y la ausencia del genotipo homocigoto recesivo TT (0,00%) en los pacientes con cáncer de pulmón. Sin embargo, se encontró una alta frecuencia de los genotipos (CT (32,47%) y TT (3,90%) en el grupo control. En segundo lugar, no existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del SNP con el riesgo de padecer cáncer pulmonar, lo cual se sustenta con los resultados de investigaciones previas citadas anteriormente. Finalmente, la presencia del alelo T en la posición -1306 de la región promotora del gen MMP-2 influye en la expresión de la enzima, lo cual repercute directamente en el procesamiento de mediadores inflamatorios y en la degradación de componentes de la MEC esenciales para la migración y progresión de las células tumorales malignas, afirmación sustentada por varios estudios que mencionamos a continuación.

Price et al. (2001) realizaron una investigación con el objetivo de determinar variaciones genéticas en el gen MMP-2 y dilucidar en qué medida dichas

variaciones afectan la expresión de este gen. En el estudio se determinó que el polimorfismo MMP-2 -1306 C/T se encuentra ubicado en la secuencia consenso del sitio de unión Sp1 (CCACC) en el promotor del gen MMP-2. Sp1 es un factor transcripcional que juega un papel fundamental en la regulación de los niveles de expresión de esta gelatinasa, puesto que interactúa con el complejo basal de transcripción. El estudio señala que la transición del alelo C a T en la posición -1306 en la región promotora del gen MMP-2 genera una disminución en la expresión debido a la interrupción de la secuencia consenso de unión del factor de transcripción Sp1. Por lo tanto, este mecanismo regulador supondría un punto de control suplementario previo a la activación de la proenzima. La expresión génica de MMP-2 en los individuos que presentan el alelo C fue mayor en comparación con aquellos que presentan el alelo T en distintas estirpes celulares estudiadas.

Yu et al. (2004) y Singh et al. (2016), obtuvieron resultados similares y encontraron que, el genotipo CC para el SNP rs243865 presenta una mayor expresión génica de la MMP-2 en relación con los genotipos (CT y TT) en pacientes con cáncer de esófago de la población china y en pacientes de la India diagnosticados con cáncer uterino respectivamente. Adicionalmente, Tao et al. (2015) llevaron a cabo un meta-análisis en pacientes diagnosticados con cáncer del tracto urinario para diversos polimorfismos en las MMPs. Sus resultados demuestran que el polimorfismo rs243865 no muestra una relación estadísticamente significativa con el riesgo de padecer cáncer de vejiga. Sin embargo, los resultados obtenidos para las poblaciones asiática y caucásica son notablemente diferentes. En la población asiática estudiada existe una reducción sustancial del riesgo de padecer cáncer de vejiga en comparación con la población caucásica analizada para el polimorfismo MMP-2 -1306 C/T, sugiriendo que esta variación puede conferir un efecto protector en individuos asiáticos.

Adicionalmente, Birbian et al. (2014) realizaron un estudio en una población del norte de la India y establecieron que el polimorfismo MMP-2 -1306 C/T podría

proporcionar un efecto protector o disminuir el riesgo de padecer asma. Como se ha señalado anteriormente, el polimorfismo genera una disminución en la expresión de la MMP-2 que impide la degradación de las barreras tisulares y disminuye la respuesta inflamatoria. Por su parte, Singh et al. (2016) determinaron que la presencia del alelo C en el SNP rs243865 en pacientes con cáncer uterino representa un riesgo 3 veces mayor de presentar la patología en comparación con el alelo T. Por lo tanto, la presencia del alelo T podría ejercer un efecto protector en este tipo de cáncer.

Por otra parte, varios estudios han establecido que el genotipo CC del polimorfismo MMP-2 -1306 C/T presenta una relación estadísticamente significativa con el riesgo para desarrollar distintos tipos de cáncer, como en la investigación realizada en cáncer de próstata en individuos norteamericanos (Jacobs et al., 2008), en cáncer de pulmón en una población china (Yu et al., 2002) y en el riesgo de carcinoma oral escamoso en individuos chinos (Lin et al., 2004).

5.6.4 Distribución y frecuencias genotípicas de polimorfismos no reportados en el promotor del gen MMP-2

Las frecuencias genotípicas y distribuciones obtenidas para los polimorfismos 55477786, 55477824, 55477842, 55477846, 55477865, 55477881, 55477883 en el promotor del gen MMP-2 para los casos y controles se pueden observar en la Tabla 18 y la Figura 16 respectivamente. En los pacientes la frecuencia genotípica del homocigoto dominante corresponde al 98,59% de muestras y 1,41% para el heterocigoto. Sin embargo, en los controles se determinó una frecuencia genotípica del homocigoto dominante del 100%.

Tabla 18.

Frecuencias genotípicas de los nuevos polimorfismos en el promotor del gen MMP-2

Frecuencias Genotípicas					
Polimorfismo	Genotipos	N. Casos	% Casos	N. Controles	% Controles
55477786	T/T	70	98.59	77	100.00
	T/C	1	1.41	0	0.00
	C/C	0	0.00	0	0.00
55477824	T/T	70	98.59	77	100.00
	T/C	1	1.41	0	0.00
	C/C	0	0.00	0	0.00
55477842	G/G	70	98.59	77	100.00
	G/A	1	1.41	0	0.00
	A/A	0	0.00	0	0.00
55477846	A/A	70	98.59	77	100.00
	A/G	1	1.41	0	0.00
	G/G	0	0.00	0	0.00
55477865	A/A	70	98.59	77	100.00
	A/G	1	1.41	0	0.00
	G/G	0	0.00	0	0.00
55477881	C/C	70	98.59	77	100.00
	C/A	1	1.41	0	0.00
	A/A	0	0.00	0	0.00
55477883	A/A	70	98.59	77	100.00
	A/G	1	1.41	0	0.00
	G/G	0	0.00	0	0.00

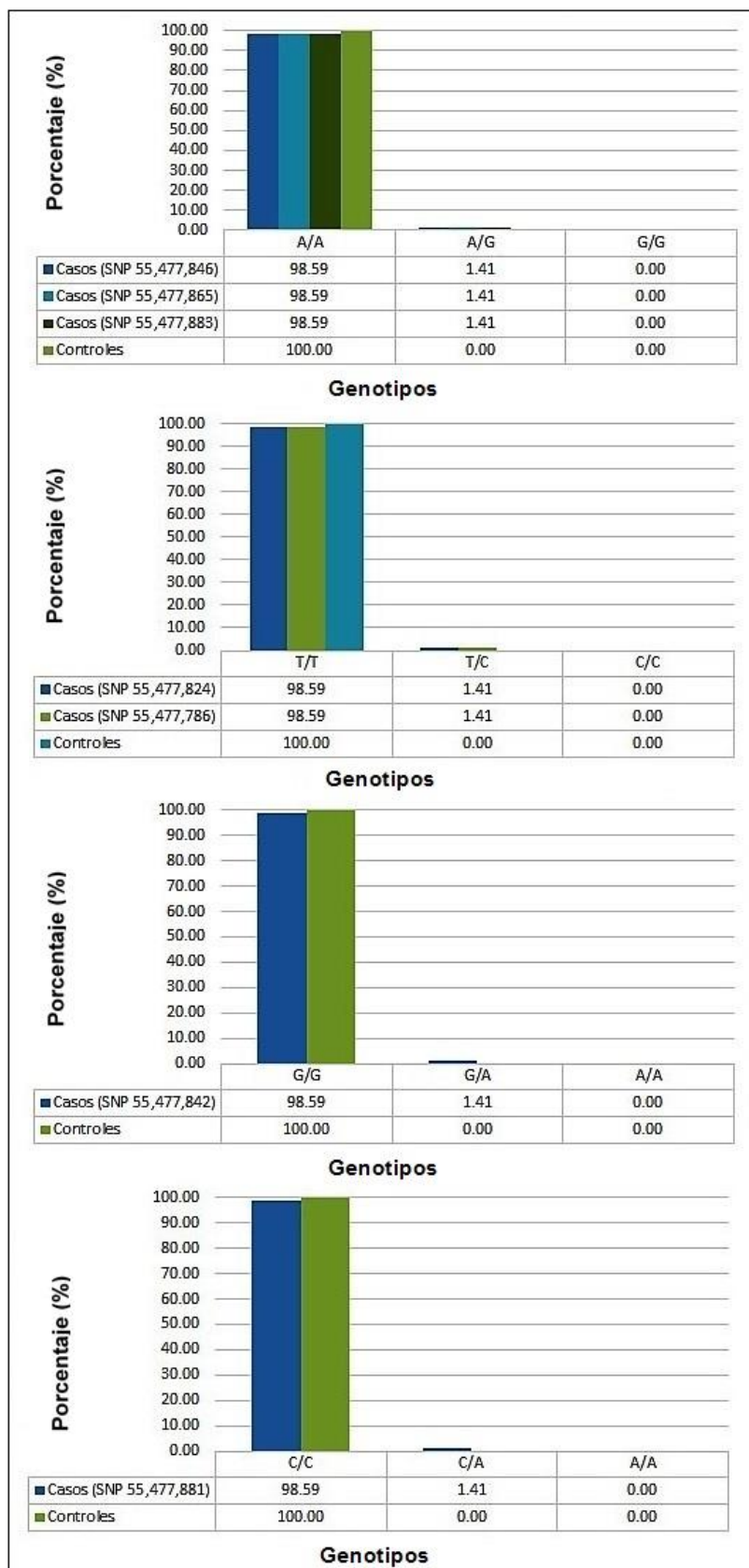


Figura 16. Distribución genotípica de los nuevos polimorfismos en el promotor del gen MMP-2 en casos y controles.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

El polimorfismo SNP rs243865 en el promotor del gen MMP-2 no constituye un factor pronóstico para los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón en la población estudiada.

El carcinoma de células pequeñas es el tipo histológico más agresivo con un tiempo de supervivencia de 2,4 meses.

El tabaquismo presenta una asociación estadísticamente significativa con los diferentes tipos histológicos del cáncer de pulmón.

Las distribuciones genotípicas para el polimorfismo estudiado difieren de las reportadas en la literatura y esta diferencia puede estar dada por el origen étnico de la población ecuatoriana estudiada.

Los genotipos CT y TT del SNP rs243865 podrían ejercer un papel protector en el cáncer de pulmón.

6.2 Recomendaciones

Analizar la relación entre la presencia del polimorfismo estudiado y cambios a nivel de la expresión génica de la metaloproteasa MMP-2.

Estudiar otros polimorfismos en la región promotora del gen MMP-2 que complementen nuestros hallazgos.

Investigar el papel protector de los polimorfismos en los genes de las MMPs en otras patologías que afectan el tracto respiratorio.

Estudiar polimorfismos en los genes que codifican para otras MMPs que permitan establecer en conjunto, su potencial como herramientas de tamizaje molecular en el diagnóstico temprano del cáncer de pulmón.

Aumentar el número de pacientes en el estudio para obtener resultados estadísticos más potentes.

Se recomienda que las muestras de tejido fijadas en formalina y embebidas en parafina no excedan los 2 o 3 años de conservación debido, a la posible degradación del ADN que dificulta la obtención de los amplicones de interés.

REFERENCIAS

- Allemani, C., Weir, H., Carreira, H., Harewood, R., Spika, D., Wang, X., et al. (2015). Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). Recuperado el 21 de mayo de 2016 de [http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736\(14\)62038-9.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lancet/PIIS0140-6736(14)62038-9.pdf)
- Amorín, E. (2013). Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas. Recuperado el 15 de mayo de 2016 de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342013000100017&script=sci_arttext
- AppliedBiosystems. (2010). BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Recuperado el 21 de septiembre de 2016 de https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_081527.pdf
- Arrieta, O., Guzmán, E., Alba, L., Acosta, A., Alatorre, J., Meza, J., et al. (2013). National consensus of diagnosis and treatment of lung cancer non-small cell. Recuperado el 22 de mayo de 2016 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2013/nns131a.pdf>
- Barros, J. y Pérez, M. (2012). Radón y cáncer de pulmón. Recuperado el 12 de mayo de 2016 de <http://site.ebrary.com/lib/udlasp/docDetail.action?docID=11013569>
- BeckmanCoulter. (2006). Agencourt® Cleanseq®Dye-Terminator Removal. Recuperado el 25 de septiembre de 2016 de <http://www.beckman.com/getattachment/c78b9ef3-dd37-40a5-8a34-117da9a3bcd5/Agencourt%20CleanSEQ%20Dye%20-%20Terminator%20Removal>
- BeckmanCoulter. (2009). Agencourt® AmpureE® XP PCR Purification. Recuperado el 20 de septiembre de 2016 de <http://www.beckman.com/nucleic-acid-sample-prep/purification-clean-up/pcr-purification>

- Birbian, N., Singh, J. y Kumar, S. (2014). Highly Protective Association of MMP-2 -1306C/T Promoter Polymorphism With Asthma in a North Indian Population: A Pilot Study. Recuperado el 15 de agosto de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4021242/pdf/air-6-234.pdf>
- Bourbouli, D. y Stetler, W. (2010). Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. Recuperado el 3 de agosto de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20470890>
- Briggs, M., Kadonaga, J., Bell, S. y Tjian, R. (1986). Purification and Biochemical Characterization Of the Promoter-Specific Transcription Factor, Sp1. Recuperado el 4 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3529394>
- Cetin, K., Ettinger, D., Hei, Y. y Malley, C. (2011). Survival by histologic subtype in stage IV nonsmall cell lung cancer based on data from the Surveillance, Epidemiology and End Results Program. Recuperado el 9 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21607015>
- Consonni, D., De Matteis, S., Lubin, J., Wacholder, S., Tucker, M., Pesatori, A., et al. (2010). Lung cancer and occupation in a population-based case-control study. Recuperado el 7 de junio de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20047975>
- Crommelin, D., Sindelar, R. y Meibohm, B. (2013). Pharmaceutical Biotechnology. Recuperado el 27 de mayo de 2016 de http://web.xidian.edu.cn/yqxia/files/20140227_103205.pdf
- Cueva, P., Delgado, C. y Muñoz, R. (2014). Cáncer de Pulmón. Recuperado el 20 de mayo de 2016 de <http://www.solcaquito.org.ec/index.php/publicaciones/suplementos-medicos/cancer-de-pulmon>
- Cueva, P. y Yépez, J. (2014). Cancer Epidemiology in Quito and other Ecuadorian Regions. National Cancer Registry (NCR), SOLCA. Recuperado el 20 de mayo de 2016 de https://issuu.com/solcaquito/docs/epidemiologia_de_cancer_en_quito_20

- Chaudhary, A., Singh, M., Bharti, A., Asotra, K., Sundaram, S. y Mehrotra, R. (2010). Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. Recuperado el 19 de agosto de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2846899/pdf/1423-0127-17-10.pdf>
- Chen, X., Foy, M., Kimmel, M. y Gorlova, O. (2014). Modeling the natural history and detection of lung cancer based on smoking behavior. Recuperado el 21 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24705368>
- Decock, J., Paridaens, R. y Ye, S. (2008). Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases in lung, breast and colorectal cancer. Recuperado el 13 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177467>
- Dho, S., Lee, K., Jeong, D., Kim, C., Chung, K., Kim, J., et al. (2016). GPR171 expression enhances proliferation and metastasis of lung cancer cells. Recuperado el 13 de junio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4884959/pdf/oncotarget-07-7856.pdf>
- Doll, R., Peto, R., Wheatley, K., Gray, R. y Sutherland, I. (1994). Mortality in relation to smoking. Recuperado el 6 de junio de 2016 de <http://www.bmj.com/content/309/6959/901>
- Eftekhary, H., Ziaee, A., Yazdanbod, M., Shahpanah, M., Setayeshgar, A. y Nassiri, M. (2015). The influence of matrix metalloproteinase-2, -9, and -12 promoter polymorphisms on Iranian patients with oesophageal squamous cell carcinoma. Recuperado el 3 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26557778>
- Ferreiro, J., García, J., Barceló, R. y Rubio, I. (2003). Quimioterapia: efectos secundarios. Recuperado el 28 de mayo de 2016 de http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=36483&id_seccion=2218&id_ejemplar=3763&id_revista=136

- Fingleton, B. (2006). Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. Recuperado el 2 de julio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16146745>
- Fukumoto, K., Ito, H., Matsuo, K., Tanaka, H., Yokoi, K., Tajima, K., et al. (2015). Cigarette smoke inhalation and risk of lung cancer: a case-control study in a large Japanese population. Recuperado el 27 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24911999>
- Gialeli, C., Theocharis, A. y Karamanos, N. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. Recuperado el 4 de julio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21087457>
- Ginsberg, M., Grewal, R. y Heelan, R. (2007). Lung Cancer. Recuperado el 4 de junio de 2016 de [http://www.radiologic.theclinics.com/article/S0033-8389\(06\)00098-4/pdf](http://www.radiologic.theclinics.com/article/S0033-8389(06)00098-4/pdf)
- Glebauskiene, B., Liutkeviciene, R., Vilkeviciute, A., Kriauciuniene, L., Bernotas, G., Tamasauskas, A., et al. (2016). Role of MMP-2 (-1306 C/T) Polymorphism in Pituitary Adenoma. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2839697>
- Gómez, J. (2010). Anatomía patológica y patología molecular del cáncer de pulmón. Recuperado el 2 de junio de 2016 de <http://www.neumologiaysalud.es/descargas/volumen3/vol3-n1-5.pdf>
- González, P., Pascual, T., Garcia, A., Fernandez, A., Lopez, M. y Tardon, A. (2012). Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival. Recuperado el 14 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22455335>
- Gullón, J. (1999). Cancer de pulmón histología, diagnóstico, estadiaje y supervivencia en la sección de neumología del Hospital Universitario de Canarias. Recuperado el 2 de junio de 2016 de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=870>
- Huang, J., Jian, Z., Ndi, O., Ku, W., Ko, P., Lung, C., et al. (2015). The effects of pulmonary diseases on histologic types of lung cancer in both sexes: a population-based study in Taiwan. Recuperado el 20 de octubre de 2016

de

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4630937/pdf/12885_2015_Article_1847.pdf

- Hung, W. y Chang, H. (2009). Indole-3-carbinol Inhibits Sp1-Induced Matrix Metalloproteinase-2 Expression To Attenuate Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. Recuperado el 15 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061309>
- Infantino, V., Convertini, P., Iacobazzi, F., Pisano, I., Scarcia, P. y Iacobazzi, V. (2011). Identification of a novel Sp1 splice variant as a strong transcriptional activator. Recuperado el 5 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798247>
- Jacobs, E., Hsing, A., Bain, E., Stevens, V., Wang, Y., Chen, J., et al. (2008). Polymorphisms in angiogenesis-related genes and prostate cancer. Recuperado el 5 de diciembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18398039>
- Jin, G., Miao, R., Hu, Z., Xu, L., Huang, X., Chen, Y., et al. (2009). Putative functional polymorphisms of MMP9 predict survival of NSCLC in a Chinese population. Recuperado el 14 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19132754>
- Kaczynski, J., Cook, T. y Urrutia, R. (2003). Sp1- and Krüppel-like transcription factors. Recuperado el 7 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620113>
- Kawal, P., Chandra, A., Rajkumar, Dhole, T. y Ojha, B. (2016). Correlations of polymorphisms in matrix metalloproteinase-1, -2, and -7 promoters to susceptibility to malignant gliomas. Recuperado el 16 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27057223>
- Kirkin, V., Cahuzac, N., Guardiola, F., Huault, S., Luckerath, K., Friedmann, E., et al. (2007). The Fas ligand intracellular domain is released by ADAM10 and SPPL2a cleavage in T-cells. Recuperado el 25 de julio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17557115>
- Lee, P. y Forey, B. (2013). Indirectly estimated absolute lung cancer mortality rates by smoking status and histological type based on a systematic

- review. Recuperado el 29 de octubre de 2016 de <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/13/189>
- Lee, P., Forey, B. y Coombs, K. (2012). Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence in the 1900s relating smoking to lung cancer. Recuperado el 28 de octubre de 2016 de <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/12/385>
- Li, H., Liang, X., Qin, X., Cai, S. y Yu, S. (2015). Association of matrix metalloproteinase family gene polymorphisms with lung cancer risk: logistic regression and generalized odds of published data. Recuperado el 14 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26198673>
- Lin, S., Lo, S., Liu, C., Chung, M., Huang, J. y Chang, K. (2004). Functional genotype in matrix metalloproteinases-2 promoter is a risk factor for oral carcinogenesis. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15250832>
- Liu, D., Guo, H., Li, Y., Xu, X., Yang, K. y Bai, Y. (2012). Association between Polymorphisms in the Promoter Regions of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Risk of Cancer Metastasis: A Meta-Analysis. Recuperado el 21 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3279370/pdf/pone.0031251.pdf>
- Liu, L., Wu, J., Wu, C., Wang, Y., Zhong, R., Zhang, X., et al. (2011). A functional polymorphism (-1607 1G-->2G) in the matrix metalloproteinase-1 promoter is associated with development and progression of lung cancer. Recuperado el 12 de mayo de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21523769>
- Lu, F., Li, S., Dong, B., Zhang, S., Lv, C. y Yang, Y. (2016). Identification of lung adenocarcinoma mutation status based on histologic subtype: Retrospective analysis of 269 patients. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26816535>
- Mahadevia, J., Fleisher, L., Frick, K., Eng, J., Goodman, S. y Powe, N. (2003). Lung cancer screening with helical computed tomography in older adult

- smokers: A decision and cost-effectiveness analysis. Recuperado el 22 de mayo de 2016 de <http://dx.doi.org/10.1001/jama.289.3.313>
- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., et al. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. Recuperado el 21 de julio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15958533>
- Marshall, A. y Christiani, D. (2013). Genetic susceptibility to lung cancer-light at the end of the tunnel?. Recuperado el 3 de agosto de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23349013>
- Matrisian, M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. Recuperado el 25 de junio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1445287>
- Mazzei, J., Rocher, A. y Palaoro, L. (2012). Valor del estudio celular del esputo en el seguimiento de las enfermedades inflamatorias de la vía aérea. Recuperado el 15 de mayo de 2016 de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802012000400013
- McColgan, P. y Sharma, P. (2009). Polymorphisms of matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 and susceptibility to lung, breast and colorectal cancer in over 30,000 subjects. Recuperado el 14 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19507256>
- Megías, M., Molist, P. y Pombal, M. (2014). Matriz extracelular. Recuperado el 25 de junio de 2016 de <http://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/atlas-celula-02-matriz-extracelular.pdf>
- Meza, R., Meernik, C., Jeon, J. y Cote, M. (2015). Lung cancer incidence trends by gender, race and histology in the United States, 1973-2010. Recuperado el 20 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25822850>
- Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U., Isupov, M., Lindqvist, Y., Schneider, G., et al. (1999). Structure of Human Pro-Matrix Metalloproteinase-2: Activation Mechanism Revealed. Recuperado el 7 de agosto de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10356396>

- Murphy, G. y Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. Recuperado el 18 de junio de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18619669>
- Nakamura, M., Miyamoto, S., Maeda, H., Ishii, G., Hasebe, T., Chiba, T., et al. (2005). Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. Recuperado el 22 de julio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15964556>
- Naranjo, T., Salvá, R. y Guerrero, F. (2009). La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I). Recuperado el 15 de junio de 2016 de <http://www.patologia.es/volumen42/vol42-num4/pdf%20patologia%2042-4/42-04-02.pdf>
- NCBI. (2016). MMP2 matrix metalloproteinase 2 [Homo sapiens (human)]. Recuperado el 21 de agosto de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4313>
- OMS. (2015). Cáncer. Recuperado el 16 de mayo de 2016 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Paz-y-Miño, C. y López, A. (2014). Genética molecular y citogenética humana: fundamentos, aplicaciones e investigaciones en el Ecuador. Recuperado el 24 de septiembre de 2016 de <http://www.udla.edu.ec/pdf/librogenetica/librogeneticamolecular.pdf>
- Paz-y-Miño, C., López, A., Muñoz, M., Cabrera, A., Castro, B. y Sánchez, M. (2010). Incidence of the L858R and G719S mutations of the epidermal growth factor receptor oncogene in an Ecuadorian population with lung cancer. Recuperado el 20 de mayo de 2016 de [http://www.cancergeneticsjournal.org/article/S0165-4608\(09\)00601-3/pdf](http://www.cancergeneticsjournal.org/article/S0165-4608(09)00601-3/pdf)
- Peng, B., Cao, L., Wang, W., Xian, L., Jiang, D., Zhao, J., et al. (2010). Polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases 1 and 3 and cancer risk: a meta-analysis of 50 case-control studies. Recuperado el 14 de mayo de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843588>
- Polyak, K. y Weinberg, R. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits.

- Recuperado el 29 de julio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19262571>
- Price, S., Greaves, D. y Watkins, H. (2001). Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. Recuperado el 2 de diciembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114309>
- Qin, H., Sun, Y. y Benveniste, E. (1999). The Transcription Factors Sp1, Sp3, and AP-2 Are Required for Constitutive Matrix Metalloproteinase-2 Gene Expression in Astrogloma Cells. Recuperado el 11 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10506168>
- Raimondi, S., Boffetta, P., Anttila, S., Brockmoller, J., Butkiewicz, D., Cascorbi, I., et al. (2005). Metabolic gene polymorphisms and lung cancer risk in non-smokers. An update of the GSEC study. Recuperado el 9 de junio de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009381>
- Ramírez, J., Arboleda, C. y McCollough, C. (2008). Tomografía computarizada por rayos X: fundamentos y actualidad. Recuperado el 15 de mayo 2016 de <http://www.scielo.org.co/pdf/rinbi/v2n4/v2n4a08.pdf>
- Rodríguez, M. y Rodríguez, T. (2010). Revisión sistemática rápida sobre radioterapia en cáncer de pulmón. Recuperado el 16 de mayo de 2016 de http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-publicaciones-isciii/fd-documentos/62_Radioterapia_cancer_pulmon.pdf
- Rollin, J., Regina, S., Vourc'h, P., Lochmann, S., Blechet, C., Reverdiau, P., et al. (2007). Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. Recuperado el 5 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17208328>
- Rundhaug, J. (2003). Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and Cancer. Recuperado el 28 de julio de 2016 de <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/9/2/551.full-text.pdf>
- Saa, R., Mederos, O., Cantero, A., Menchaca, J., Barrera, J. y Valdés, J. (1999). Organización y resultados de la cirugía torácica en el Hospital Clínicoquirúrgico Docente "Comandante Manuel Fajardo". Recuperado el

16 de mayo de 2016 de
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74931999000100007

- Schveigert, D., Cicenás, S., Bruzas, S., Samalavicius, N., Gudleviciene, Z. y Didziapetriene, J. (2013). The value of MMP-9 for breast and non-small cell lung cancer patients' survival. Recuperado el 13 de mayo de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23640949>
- Shajarehpoor, S., Tafvizi, F. y Manjili, H. (2016). The association between MMP2 21306 C > T (rs243865) polymorphism and risk of prostate cancer. Recuperado el 2 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27541146>
- Shay, G., Lynch, C. y Fingleton, B. (2015). Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. Recuperado el 7 de julio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25652204>
- Shendure, J. y Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. Recuperado el 24 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846087>
- Silvera, L. y Barrios, C. (2002). La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. Recuperado el 20 de junio de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81701602>
- Singh, N., Hussain, S., Sharma, U., Suri, V., Nijhawan, R., Bharadwaj, M., et al. (2016). The protective role of the -1306C>T functional polymorphism in matrix metalloproteinase-2 gene is associated with cervical cancer: implication of human papillomavirus infection. Recuperado el 27 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26561467>
- Sternlicht, M. y Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Recuperado el 9 de agosto de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11687497>
- Stewart, B. y Wild, C. (2014). World Cancer Report. Recuperado el 16 de mayo de 2016 de <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>

- Strand, S., Vollmer, P., van den Abeelen, L., Gottfried, D., Alla, V., Heid, H., et al. (2004). Cleavage of CD95 by matrix metalloproteinase-7 induces apoptosis resistance in tumour cells. Recuperado el 27 de julio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15077180>
- Tacheva, T., Chelenkova, P., Dimov, D., Petkova, R., Chakarov, S. y Vlaykova, T. (2015). Frequency of the common promoter polymorphism MMP2 -1306 C>T in a population from central Bulgaria. Recuperado el 13 de mayo de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26019651>
- Tanoue, L. y Detterbeck, F. (2009). New TNM classification for non-small-cell lung cancer. Recuperado el 22 de mayo de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19374596>
- Tao, L., Li, Z., Lin, L., Lei, Y., Hongyuan, Y., Hongwei, J., et al. (2015). MMP1, 2, 3, 7, and 9 gene polymorphisms and urinary cancer risk: a meta-analysis. Recuperado el 4 de diciembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26301605>
- Urbina, A. (2005). Comparación de la actividad gelatinásica A y B (MMP-2 y MMP-9) en el líquido sinovial proveniente de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. Recuperado el 17 de agosto de 2016 de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/130887/Comparaci%C3%B3n-de-la-actividad-gelatin%C3%A1sica-A-y-B-%28MMP-2-y-MMP-9%29-en-el-l%C3%ADquido-sinovial-proveniente-de-la-articulaci%C3%B3n-metacarpofal%C3%A1ngica-equina-normal-y-alterada.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- van Klaveren, R., Oudkerk, M., Prokop, M., Scholten, E., Nackaerts, K., Vernhout, R., et al. (2009). Management of Lung Nodules Detected by Volume CT Scanning. Recuperado el 7 de diciembre de 2016 de <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0906085>
- Villar, F., Muguza, I., Belda, J., Molins, L., Rodríguez, P., Sánchez de Cos Escuín, J., et al. (2016). Executive summary of the SEPAR recommendations for the diagnosis and treatment of non-small cell lung

- cancer. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27237592>
- Villegas, A., Fernández, B., García, G. y García, J. (2005). Cáncer de pulmón una guía práctica. Recuperado el 15 de mayo de 2016 de https://www.aecc.es/comunicacion/publicaciones/documents/guia_ca_pulmon.pdf
- Wahbah, M., Boroumand, N., Castro, C., El-Zeky, F. y Eltorkey, M. (2007). Changing trends in the distribution of the histologic types of lung cancer: a review of 4,439 cases. Recuperado el 3 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17349566>
- Weaver, A. (2006). Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. Recuperado el 20 de julio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16830222>
- Yan, L. y DeMars, L. (2014). Effects of a high-fat diet on spontaneous metastasis of Lewis lung carcinoma in plasminogen activator inhibitor-1 deficient and wild-type mice. Recuperado el 7 de junio de 2016 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356654>
- Yaykasli, K., Kayikci, M., Yamak, N., Soguktas, H., Duzenli, S., Arslan, A., et al. (2014). Polymorphisms in MMP-2 and TIMP-2 in Turkish patients with prostate cancer. Recuperado el 27 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25539555>
- Yu, C., Pan, K., Xing, D., Liang, G., Tan, W., Zhang, L., et al. (2002). Correlation between a Single Nucleotide Polymorphism in the Matrix Metalloproteinase-2 Promoter and Risk of Lung Cancer. Recuperado el 15 de mayo de 2016 de <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/62/22/6430.full.pdf>
- Yu, C., Zhou, Y., Miao, X., Xiong, P., Tan, W. y Lin, D. (2004). Functional Haplotypes in the Promoter of Matrix Metalloproteinase-2 Predict Risk of the Occurrence and Metastasis of Esophageal Cancer. Recuperado el 24 de agosto de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492291>
- Yun, Y., Kim, Y., Back, J., Lee, S., Ghang, H., Samet, J., et al. (2015). Hazard Ratio of Smoking on Lung Cancer in Korea According to Histological Type

- and Gender. Recuperado el 30 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26718701>
- Zakkouri, F., Saloua, O., Halima, A., Rachid, R., Hind, M. y Hassan, E. (2015). Smoking, passive smoking and lung cancer cell types among women in Morocco: analysis of epidemiological profiling of 101 cases. Recuperado el 10 de noviembre de 2016 de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4592748/pdf/13104_2015_Article_1503.pdf
- Zhang, C., Li, C., Zhu, M., Zhang, Q., Xie, Z., Niu, G., et al. (2013). Meta-analysis of MMP2, MMP3, and MMP9 promoter polymorphisms and head and neck cancer risk. Recuperado el 28 de agosto de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23637955>
- Zou, X., Lin, D., Chao, A., Wan, X., Feng, Q., Li, J., et al. (2014). Histological subtypes of lung cancer in Chinese women from 2000 to 2012. Recuperado el 5 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26767037>

ANEXOS



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
Comité de Ética y Bioética para la Investigación de la
Universidad de Las Américas (CEBE-UDLA)

Formato de consentimiento informado. Anexo 1

Cod:

Rev:

Hoja:

De:

Anexo 1

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



Comité de Ética y Bioética para la Investigación de la Universidad de Las
Américas (CEBE-UDLA)

I. Hoja de información

Título de la investigación: “Polimorfismos en genes de metaloproteasas como factores pronóstico en el cáncer de pulmón en la población ecuatoriana”.

Fecha: Marzo /2016

Investigador principal: Alina Aguirre Quevedo, PhD

Otros investigadores: Germán Burgos MSc, Eduardo Tejera PhD.

Información general del proyecto

El cáncer de pulmón ha sido uno de las neoplasias más comunes en el mundo durante varias décadas. En el Ecuador, el cáncer de pulmón es la quinta causa de muerte entre los tumores malignos que afectan al sexo masculino y la séptima en el sexo femenino. Los mayores porcentajes de la enfermedad se presentan en tres provincias: Guayas (32,8%), Pichincha (20,7%) y Manabí (7,5%). Se estima que esta tendencia se incrementará en los próximos años y posicionará a esta enfermedad como la causa principal de muerte por neoplasia, de ahí se deriva la importancia de realizar el primer estudio de mutaciones relacionadas con la incidencia, la progresión y la supervivencia para este tipo de tumor en el Ecuador.

Las metaloproteasas (MMPs) han sido estudiadas e implicadas en el desarrollo de células cancerígenas agresivas. Varios estudios han abordado la relación entre los polimorfismos de las MMPs y el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en diferentes grupos étnicos. Otros estudios se han centrado en el papel pronóstico de estos polimorfismos en diferentes tipos de cáncer.

Objetivos del estudio de investigación

El cáncer de pulmón ha sido una de las neoplasias más comunes en el mundo durante varias décadas y se estima que se posicionará como la causa principal de muerte por neoplasia en el futuro próximo. Las metaloproteasas (MMPs), debido a su actividad proteolítica y a la degradación de la estructura de las barreras tisulares se han relacionado con diversas condiciones patológicas entre ellas, el cáncer. Datos recientes resaltan que la presencia elevada de colagenasas (una de las familias de MMPs) está asociada con un incremento en la severidad del cáncer. Clínicamente, las colagenasas deben tenerse en cuenta como blancos terapéuticos potenciales en la terapia del cáncer.

Estudios previos han encontrado asociación entre los polimorfismos de las MMPs y el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en diferentes grupos étnicos y han destacado el papel pronóstico de estos polimorfismos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes nuestra propuesta tiene como objetivo caracterizar la contribución potencial de las variaciones en los genes que

codifican para metaloproteasas a la supervivencia de los pacientes, así como determinar si estas variaciones genéticas podrían explicar las diferencias en la incidencia y pronóstico de los diferentes tipos histológicos de cáncer de pulmón. El estudio que se realizaría por primera vez en el Ecuador pretende establecer biomarcadores útiles para mejorar la efectividad de los tratamientos en el ámbito de esta patología.

Beneficios del proyecto

Durante la ejecución de esta propuesta se identificarán los polimorfismos en genes que codifican para MMPs involucradas en los procesos de invasión y metástasis. Se establecerá la relación entre estos polimorfismos y la incidencia, el pronóstico y la supervivencia en los diferentes tipos histológicos del cáncer de pulmón. Además, se analizará la relación de los polimorfismos identificados con cambios en la expresión de estos genes. Estos resultados permitirán proponer biomarcadores útiles para mejorar la efectividad de los tratamientos en el cáncer de pulmón.

Protocolo de recolección de datos y muestras

Para el desarrollo de este proyecto se usará una muestra sangre tomada por una única punción con una jeringa estéril por parte del equipo de investigación. Las muestras biológicas se almacenarán en el Banco de la UDLA. Por otra parte, se recopilarán datos de los participantes con los que se confeccionará una base de datos.

La participación en el estudio no tendrá costos, tampoco se entregará ningún tipo de retribución.

La duración de la participación en la investigación le tomará aproximadamente 20-30 minutos de su tiempo. Usted responderá una serie de preguntas sobre sus datos clínicos y personales, posteriormente se recolectará la muestra biológica por flebotomía (punción del brazo) para obtener como máximo 5 mL de sangre.

La investigación no presenta ningún riesgo, ni físico ni psicológico para los participantes.

Toda la información de la historia clínica, personal y genética será mantenida bajo estricta confidencialidad y no será revelada bajo ninguna circunstancia. Todos los datos serán llevados en el anonimato asignando un código único para evitar revelar información personal.

En caso de elegir que su muestra de ADN sea conservada después de que concluya este proyecto, es posible que continuemos con nuevos estudios genéticos en el futuro. En ese sentido, nos comprometemos con usted a seguir custodiando la muestra y garantizando la confidencialidad de los datos personales y/o genéticos.

Para aclararle cualquier inquietud usted puede comunicarse directamente con:

Alina Aguirre Quevedo, PhD

Docente Investigador

Teléfono: (593) (2) 3970000 ext 7003, Quito, Ecuador.

Universidad de las Américas (UDLA)

Teléfono fijo: (593) (2) 332 5537

Teléfono móvil: : (593) 98 353 4337

Su participación es voluntaria. Usted tiene derecho a retirarse en cualquier momento que lo crea oportuno, sin necesidad de dar explicaciones, no habrá ningún tipo de consecuencia.



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
Comité de Ética y Bioética para la Investigación de la
Universidad de Las Américas (CEBE-UDLA)

Formato de consentimiento informado. Anexo 1

Cod:

Rev:

Hoja:

De:

II: Certificado de consentimiento

1. Consentimiento

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que Yo participe en el estudio de investigación intitulado: “Polimorfismos en genes de metaloproteasas como factores pronóstico en el cáncer de pulmón en la población ecuatoriana”

El estudio de investigación incluirá: Información clínica y personal. Muestra de sangre.

Yo he leído la información anterior previamente, de la cual tengo una copia. He tenido la oportunidad de hacer preguntas sobre la información y cada pregunta que yo he hecho ha sido respondida para mi satisfacción. He tenido el tiempo suficiente para leer y comprender los riesgos y beneficios de mi participación. Yo consiento voluntariamente participar en esta investigación.

Firma del participante

Fecha

Nombre del investigador que obtiene el consentimiento: -

Firma del investigador

Fecha



Anexo 2

III.- HOJA DE TOMA DE DATOS:

FECHA_____

CODIGO MUESTRA_____

PARTICIPANTE

EDAD_____ SEXO_____ ETNIA_____

LUGAR DE NACIMIENTO_____ COMUNIDAD_____

PROVINCIA_____ CIUDAD_____ CANTON_____

LUGARES DE ORIGEN PARENTAL:

MATERNOS_____

PATERNOS_____

INSTRUCCIÓN_____

OCUPACIÓN_____

CONSUME ALCOHOL: SI () NO ()

FRECUENCIA: ACTUAL () OCASIONAL () ANTERIOR () NUNCA ()

FUMA: SI () NO ()

FRECUENCIA: ACTUAL () OCASIONAL () ANTERIOR () PASIVO ()

NUNCA ()

TIPO DE TABACO: RUBIO () NEGRO () UNIDADES/DIARIAS ()

HISTORIA FAMILIAR DE CÁNCER: NO () DE PULMÓN () OTROS TIPOS
DE CÁNCER_____

ANTECEDENTES MÉDICOS DE

IMPORTANCIA_____

Anexo 3

Código Pu: pacientes con cáncer de pulmón.

Tipo histológico: 1 (carcinoma de células escamosas), 2 (adenocarcinoma), 3 (carcinoma de células pequeñas) y 4 (carcinoma de células grandes).

Estado vital: 0 (censurado) y 1 (fallecido).

Consumo de alcohol: 1 (actual), 2 (ocasional), 3 (anterior) y 4 (nunca).

Consumo de tabaco: 1 (actual), 2 (ocasional), 3 (anterior), 4 (pasivo) y 5 (nunca).

Código	Género	Edad	Tipo histológico	Estado vital	C. alcohol	C. tabaco
Pu6	M	70	1	1	4	1
Pu8	F	49	1	0	4	5
Pu9	F	66	2	1	4	5
Pu10	M	59	1	1	4	1
Pu12	F	56	2	1	4	5
Pu13	M	68	2	1	4	1
Pu14	F	57	2	1	4	5
Pu16	F	66	2	1	4	5
Pu17	F	47	2	0	1	1
Pu18	M	79	1	1	4	1
Pu100	M	67	3	1	2	1
Pu19	M	54	2	1	2	2
Pu20	M	35	2	1	1	1
Pu21	M	73	1	1	1	1
Pu23	M	63	2	1	4	5
Pu26	M	44	2	0	4	5
Pu27	M	64	2	1	1	1
Pu28	F	70	2	1	4	5
Pu29	F	49	2	0	4	5
Pu31	M	58	2	1	1	1
Pu32	M	64	1	1	1	1
Pu33	M	32	2	1	4	5

Pu34	F	53	2	1	4	5
Pu36	M	66	1	0	2	2
Pu37	F	55	2	1	4	5
Pu38	M	65	2	1	4	5
Pu39	M	59	2	1	4	5
Pu40	M	57	1	1	4	1
Pu41	M	65	2	1	4	1
Pu43	F	46	2	1	1	5
Pu44	F	42	1	1	4	1
Pu46	M	65	2	1	4	1
Pu47	F	74	2	1	4	5
Pu48	M	75	1	0	1	1
Pu50	M	62	2	1	4	1
Pu52	M	47	1	1	2	1
Pu56	M	46	2	1	4	3
Pu58	F	46	2	1	3	5
Pu59	F	61	2	1	4	4
Pu60	F	80	1	1	2	5
Pu101	F	61	2	1	4	5
Pu61	F	79	2	1	4	5
Pu62	M	69	2	1	1	2
Pu64	M	81	1	1	2	2
Pu65	F	65	2	1	4	5
Pu66	M	75	4	1	2	1
Pu68	F	40	1	0	4	5
Pu69	M	69	3	1	2	1
Pu70	M	62	3	1	2	5
Pu72	F	29	2	1	2	5
Pu73	M	30	1	1	4	5
Pu74	F	71	2	1	4	5
Pu75	M	68	2	1	4	5

Pu76	M	83	1	1	1	1
Pu77	F	53	4	0	4	5
Pu78	F	60	2	1	4	5
Pu79	M	72	2	1	2	1
Pu80	F	49	2	1	4	5
Pu81	M	63	4	1	2	2
Pu82	F	62	2	1	4	5
Pu84	M	84	3	1	2	1
Pu85	M	78	3	1	2	3
Pu87	F	81	1	1	4	5
Pu88	M	81	2	1	4	5
Pu89	F	54	2	1	4	5
Pu91	F	58	1	1	4	5
Pu92	M	71	1	1	1	1
Pu93	F	73	2	1	4	5
Pu94	F	57	1	1	2	1
Pu95	M	50	2	0	4	5
Pu97	M	38	2	1	4	5

Anexo 4

Código C: individuos control.

Consumo de tabaco: 1 (actual), 2 (ocasional), 3 (anterior), 4 (pasivo) y 5 (nunca).

Consumo de alcohol: 1 (actual), 2 (ocasional), 3 (anterior) y 4 (nunca).

Código	Género	Edad	C. tabaco	C. alcohol
C1	F	48	5	4
C2	F	34	2	2
C3	M	23	5	2
C4	F	22	5	4
C5	M	60	5	2
C6	F	56	5	2
C7	F	25	2	2
C8	M	51	5	2
C9	M	30	1	4
C10	F	34	5	1
C11	F	51	3	2
C12	M	46	5	2
C13	M	25	3	2
C14	M	23	2	2
C15	F	34	1	2
C16	F	53	5	2
C17	M	25	5	2
C18	F	49	2	4
C20	F	39	5	4
C21	F	51	5	4
C22	F	27	5	2
C23	F	23	5	2
C24	M	21	5	2
C25	F	19	2	4
C26	M	20	5	2

C27	F	23	5	2
C28	M	35	5	2
C29	F	51	5	4
C30	F	26	5	2
C31	M	34	5	2
C32	F	51	5	4
C33	F	23	2	2
C34	F	24	5	2
C36	F	55	5	2
C37	F	20	5	2
C38	M	19	5	2
C39	F	18	5	4
C40	F	18	5	4
C41	F	18	5	2
C42	F	18	1	2
C43	M	17	1	1
C45	M	17	5	1
C46	M	18	2	2
C47	F	18	5	2
C48	M	20	5	4
C49	M	18	2	1
C50	M	19	3	4
C51	F	19	2	2
C52	M	24	3	4
C53	F	32	5	4
C54	M	24	1	2
C55	M	23	4	2
C56	F	22	5	2
C57	F	21	5	4
C58	F	21	3	2
C59	M	22	5	2

C60	M	23	2	2
C61	F	21	5	2
C62	M	22	3	3
C63	F	21	1	2
C64	F	27	5	2
C65	M	24	4	2
C66	M	23	5	2
C67	F	52	5	4
C68	M	23	5	2
C69	M	37	1	2
C70	M	40	4	2
C71	M	32	4	2
C72	M	22	5	1
C73	M	36	2	2
C74	M	30	1	4
C75	F	20	5	2
C76	F	57	5	4
C77	M	44	5	4
C78	M	75	1	1
C79	M	66	3	2
C80	M	73	5	4

