



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO -165 G/T (rs1003349) EN EL GEN
MMP-14 EN INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN ECUATORIANA

AUTOR

ARIANA SOLANGE JIJÓN VERGARA

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO -165 G/T (rs1003349) EN EL
GEN MMP-14 EN INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN ECUATORIANA

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

Profesor Guía
PhD. Alina Aguirre Quevedo

Autora
Ariana Solange Jijón Vergara

Año
2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO -165 G/T (rs1003349) EN EL *GEN MMP-14* EN INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN ECUATORIANA, a través de reuniones periódicas con el estudiante ARIANA SOLANGE JIJÓN VERGARA, en el semestre 2018-10, 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
CI: 1756594600

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Alina Aguirre Quevedo
Doctora en Ciencias Biológicas (PhD)
CI: 1756594600

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO -165 G/T (rs1003349) EN EL GEN *MMP-14* EN INDIVIDUOS DE LA POBLACIÓN ECUATORIANA, de ARIANA SOLANGE JIJÓN VERGARA, en el 2018-10 dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Andrea Paola Cordero Arroyo
Máster en células madre y Medicina Regenerativa
CI: 1714669825

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.”

Ariana Solange Jijón Vergara

CI: 1721395042

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por confiar en mí siempre, por enseñarme todos los días a ser mejor persona, una mujer fuerte y de grandes ideales.

A mi Mamá Carmita quien me enseñó grandes valores que me han ayudado para culminar mi carrera con éxito.

A mis tíos, quienes han sido incondicionales en todas las etapas de mi vida.

A la Dra. Alina Aguirre, por ser mi guía y apoyo absoluto en la etapa más importante de mi vida universitaria, por darme la oportunidad de trabajar junto con ella y por nutrirme con sus valiosos conocimientos.

A la MSc. Gabriela Granja, por todos sus conocimientos compartidos y por enseñarme que si disfrutas lo que haces siempre serás feliz.

DEDICATORIA

Como siempre, a mi madre, mi gran fortaleza y mi motor. Gracias por acompañarme en mis desveladas.

A mi mamá Carmita, la recuerdo siempre con una sonrisa en el rostro.

A mi hermana, Ivanova, por ser mi motivación diaria y por lograr en mí una sonrisa en los momentos más complicados.

A estas tres mujeres dedico este trabajo, porque todo lo que soy, se lo debo a ellas. Porque cada momento de incertidumbre, fueron la clave exacta para encontrar la fuerza para seguir y no desfallecer en estos 5 años. Y sé que así seguirá siendo siempre.

Para ustedes mi trabajo.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y las enfermedades pulmonares crónicas son las que más defunciones provocan mundialmente. Por esta razón, se realizan varias investigaciones enfocadas en el estudio de las alteraciones genéticas que se presentan en estas patologías. Dentro de estas investigaciones, las metaloproteinasas de matriz (MMPs) han despertado un gran interés, ya que cumplen un papel fundamental en varios procesos patológicos. Las MMP-14 son metaloproteinasas que forman parte de las membranas basales, participan en eventos proteolíticos y pueden activar a otras proMMPs. Varios estudios han determinado que la presencia de ciertos polimorfismos localizados en el promotor del *gen MMP-14* puede influir en la expresión de la metaloproteinasa. Estos cambios en la expresión pueden relacionarse con el desarrollo de las patologías mencionadas. Entre los polimorfismos estudiados se encuentra el -165G/T. El objetivo del estudio fue determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo mencionado en la población ecuatoriana y comparar nuestros resultados con los obtenidos para otras poblaciones. Con este fin, se analizó el ADN extraído a partir de sangre periférica de 103 individuos sanos. El análisis genotípico se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación tipo Sanger. Los análisis de las secuencias obtenidas se realizaron con el software Geneious. Se realizó un análisis del equilibrio Hardy-Weinberg, y se determinó que la población se encontraba en equilibrio. El genotipo (G/T) fue el más frecuente en la población en estudio con un 58,25 %, seguido por el genotipo (T/T) y finalmente el genotipo (G/G) este último con la menor frecuencia, por lo que se concluyó que en la población estudiada el homocigoto raro es el genotipo (G/G). Se sugiere que estas diferencias en la distribución genotípica pueden deberse a las diferencias étnicas entre las poblaciones o por variaciones genéticas en la población ecuatoriana causadas por endogamia. Por los resultados obtenidos y la bibliografía consultada se sugiere que el genotipo (G/T) puede tener un papel protector en el desarrollo de algunas patologías. Se recomienda hacer el mismo estudio en pacientes con las

patologías de interés y comparar los niveles de expresión de MMP-14 en dependencia del genotipo.

Palabras clave

MMP-14, polimorfismos, frecuencias genotípicas, enfermedades cardiovasculares, cáncer.

Abstract

Cardiovascular diseases, cancer and chronic lung diseases are the leading death causes worldwide. For this reason, several investigations currently are being carried out focus on the study of genetic alterations that occur during the development of these pathologies. During these investigations, matrix metalloproteinases (MMPs) have aroused great interest, since they play a fundamental role in various pathological processes. MMP-14 is a metalloproteinase that is part of the basal membranes, participates in proteolytic events and can activate other proMMPs. Several studies have established that the presence of certain polymorphisms located in the promoter of the MMP-14 gene can influence the expression of this metalloproteinase. These changes in expression could be related to the development of the aforementioned pathologies. Among the studied polymorphisms stands -165G/T. The aim of the study was to determine the genotypic and allelic frequencies of this polymorphism in the Ecuadorian population and compare our results with those obtained from other populations. To accomplish this, we analyzed DNA extracted from peripheral blood of 103 healthy individuals. The genotypic analysis was carried out by polymerase chain reaction and Sanger type sequencing. The bioinformatics analyses of the sequences obtained were performed with the Geneious software. Analysis of the Hardy-Weinberg equilibrium was additionally carried out, and it confirmed that the population was in genetic equilibrium. Genotype (G/T) was found to be the most frequent in the studied population, exhibiting a 58.25 % prevalence, followed by genotype (T/T) and genotype (G/G), the latter showing the lowest frequency. It was therefore concluded that genotype (G/G) is the rarest homozygote in the study population. It is proposed that these differences in genotypic distribution may be due to ethnic differences between populations or genetic variations in the Ecuadorian population caused by inbreeding. Based on the obtained results and an extended search of relative bibliography, it is suggested that (G/T) genotype may have a protective role in the development of some relevant pathologies. We propose that a similar study be performed in patients with

pathologies of interest and to investigate the expression levels of MMP-14 depending on the genotype.

Keywords

MMP-14, polymorphisms, genotypic frequencies, cardiovascular diseases, cancer.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	6
1.3 Justificación	9
1.4 Objetivos	12
1.4.1 General	12
1.4.2 Objetivos Específicos.....	12
2. Marco teórico	13
2.1 Enfermedades cardiovasculares.....	13
2.1.1 Cardiopatía isquémica	13
2.1.2 Infarto agudo de miocardio (IAM)	14
2.1.3 Factores de riesgo para desarrollar cuadros isquémicos agudos.....	15
2.2 Cáncer	15
2.2.1 Angiogénesis	17
2.2.2 Metástasis.....	18
2.2.3 Bases moleculares del cáncer	18
2.2.4 Factores de riesgo	18
2.3 Enfermedades pulmonares crónicas	19
2.4 Matriz extracelular (MEC)	19
2.5 Matriz Extracelular y su relación con el infarto agudo de miocardio.....	21
2.6 Metaloproteinasas de matriz (MMPs)	21
2.7 Metaloproteinasas y su relación con el cáncer	25
2.7.1 Influencia de las metaloproteinasas en la invasión de las células cancerígenas	25
2.7.2 Función de las metaloproteinasas en la angiogénesis y vasculogénesis tumoral	27
2.7.3 Metaloproteinasas y su relación con la apoptosis celular	28

2.8 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).....	29
2.8.1 Polimorfismos en las metaloproteinasas.....	30
2.8.2 Polimorfismos en MMP-14 y su relación con el cáncer.....	31
2.8.3 Polimorfismos en MMP-14 y su relación con las enfermedades cardiovasculares.....	34
2.8.4 Polimorfismos en MMP-14 y su relación con EPOC	35
3.Diseño del plan experimental	35
4.Procedimiento	36
4.1 Recolección de las muestras	36
4.2 Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica	37
4.3 Cuantificación de ADN genómico	39
4.4 Determinación genotípica	39
4.4.1 Amplificación del fragmento del <i>gen mmp-14</i> que contiene el polimorfismo rs1003349 (MMP-14 -165G/T)	39
4.4.1.1 Diseño y análisis de cebadores	39
4.4.1.2 Optimización de las condiciones para la PCR.....	40
4.4.1.3 Comprobación de la presencia del amplicón de interés	42
4.5 Purificación del producto de la PCR mediante CLEANSEQ y secuenciación de ADN tipo Sanger.....	42
4.6 Análisis estadístico	44
5.Resultados y Discusión.....	44
5.1 Optimización de la PCR para el fragmento del <i>gen MMP-14</i> que contiene el polimorfismo -165 G/T.....	46
5.1.1 Verificación de cebadores reconstituidos.....	46
5.1.2 Optimización de la temperatura de hibridación del sistema de PCR.....	49
5.1.3 Ensayo de adyuvantes para el sistema de PCR.....	51
5.1.4 Optimización del volumen final de reacción.....	52
5.1.5 Análisis de sensibilidad analítica del sistema de PCR.....	53
5.1.6 Amplificación del fragmento del <i>gen MMP14</i> para la detección del polimorfismo rs1003349 (MMP14 -165G/T) en las muestras.....	54

5.2 Identificación de genotipos por secuenciación tipo Sanger.....	55
5.2.1 Análisis de las frecuencias genotípicas	59
5.3 Relación entre los genotipos encontrados y el desarrollo de enfermedades.	66
6.Conclusiones y Recomendaciones.....	69
6.1 Conclusiones	69
6.2 Recomendaciones	69
REFERENCIAS.....	70

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son enzimas que constituyen una familia de endopeptidasas que dependen del zinc. Estas moléculas cumplen un papel fundamental en varios procesos fisiológicos y patológicos, entre los más importantes están: el crecimiento celular, la inflamación, la angiogénesis, la carcinogénesis (etapas tempranas), la invasión y el desarrollo de metástasis tumoral (Coronato, Laguens, & Girolamo, 2012). Se clasifican principalmente en cinco grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilinas y metaloproteinasas asociadas a membrana denominadas MT-MMP (Coronato, Laguens, & Girolamo, 2012).

Las MT-MMP son parte de las membranas basales y tienen una gran relevancia en los eventos proteolíticos, además de que pueden activar a otras proMMPs. Se pueden dividir en dos tipos: las proteínas transmembrana, MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MMP-24 y las proteínas que poseen glicofosfatidilinositol, entre las que podemos mencionar a MMP-17 y MMP-25 (Coronato, Laguens, & Girolamo, 2012).

Estas moléculas están involucradas en una serie de procesos clave a nivel celular por lo cual han despertado un gran interés en la comunidad científica en los últimos años. Todas las metaloproteinasas conocidas hasta el momento tienen una relación directa o indirecta con el desarrollo de algunas enfermedades, no obstante, ciertas MMPs tienen un papel más relevante que otras, este es el caso de la MT1-MMP o MMP-14 (Angosto & Álvarez-Gómez, 2010). Esta enzima tiene la capacidad de degradar algunos componentes de la matriz extracelular y procesa ciertas proteínas que se encuentran en el entorno pericelular, además es un activador específico de la proMMP-2 (Zhai et al., 2005).

La metaloproteinasa 14 es considerada una enzima clave en el desarrollo de varias enfermedades de relevancia como: enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades pulmonares crónicas (Zhai et al., 2005).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de alteraciones a nivel de corazón y vasos sanguíneos que comprometen su fisiología. La cardiopatía isquémica es la enfermedad cardiovascular que más discapacidad y fallecimientos causa. Esta patología se debe a que el flujo sanguíneo que va hacia el corazón disminuye por un bloqueo en las arterias encargadas de llevar la sangre al mismo, este bloqueo puede ser parcial o completo y puede resultar en un infarto agudo de miocardio (Díaz, 2011, pp.14).

Algunas investigaciones han podido dilucidar varios datos acerca del origen genético de las enfermedades cardiovasculares. Se ha analizado el funcionamiento de varios genes y los cambios en sus secuencias nucleotídicas, para estudiar el origen de las enfermedades cardiovasculares heredadas (Kathiresan & Srivastava, 2012). Asimismo, se ha venido estudiando la función de algunas proteínas que participan en procesos fisiológicos relevantes. En otras palabras, se están estudiando los mecanismos moleculares involucrados en el ataque cardíaco y los momentos que le suceden (Spinale et al., 2010).

Por otra parte, el cáncer es una patología que comprende varias enfermedades que se basan en el crecimiento de células anormales, las cuales se caracterizan por dividirse y diseminarse de una manera descontrolada y rápida (Puente & Velasco, 2017). Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial y entre la lista de los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de decesos se encuentran el cáncer de pulmón y el de mama.

Estas neoplasias malignas involucran procesos moleculares de alta complejidad, no obstante, se conoce que existen varios factores de riesgo que aumentan la probabilidad de que una persona padezca este tipo de patologías. Actualmente se ha dilucidado que además de los factores ambientales, ciertos factores genéticos influyen en que una persona esté predispuesta a desarrollar cáncer.

Las investigaciones recientes se están enfocando en el estudio de las alteraciones genéticas y otras anomalías moleculares que se presentan en el proceso del desarrollo tumoral. El análisis se ha centrado en el estudio de ciertos genes que codifican para proteínas que se encuentran involucradas en procesos claves, tales como: división celular, detección y reparación del daño del ADN, apoptosis, vías transductoras de señales y moléculas de adhesión celular (Sánchez & Rosell, 2005, pp. 47).

Estudios previos demuestran que casi todos los carcinomas invasivos tienen una alta expresión de la MMP-14, entre ellos el cáncer cervical, el cáncer de mama, el carcinoma hepatocelular, y el cáncer de pulmón (Zhai et al., 2005). La MMP-14 tiene actividad sobre el sistema del complemento lo cual facilita el proceso de metástasis, por lo que se ha propuesto a esta enzima como una posible diana para el diseño de fármacos dirigidos a neoplasias malignas con capacidad metastásica (Rozanov, Savinov, Golubkov, Tomlinson, & Strongin, 2006).

Varios estudios han determinado que la presencia de ciertos polimorfismos localizados en el promotor del *gen MMP-14* pueden influir en la unión de factores de transcripción afectando así la expresión de la metaloproteinasa (Tee et al., 2012). Estos cambios en la expresión pueden relacionarse con el desarrollo de varias patologías; entre ellas algunos tipos de cáncer como el de

pulmón y el carcinoma hepatocelular. En un estudio previo se observó que los genotipos para los polimorfismos MMP14 +6767 G/A y +7096 C/C implican un menor riesgo para desarrollar el carcinoma hepatocelular; estos resultados sugieren que la presencia de estas variantes polimórficas pueden afectar la expresión de MMP-14 (Chen et al., 2011). Una investigación enfocada en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), ha demostrado que los polimorfismos que se encuentran en la región promotora del gen que codifica para la MMP-14: -165 G/T y -72 G/A traen como consecuencia la sobreexpresión de la MMP-14 e incrementan su actividad lo que podría resultar en la degradación de la matriz pulmonar (Saitoh et al., 2005, pp. 621-626).

En un estudio previo se investigó la asociación entre los polimorfismos ubicados en el promotor del gen que codifica para MMP-14 y el desarrollo de cáncer oral, y se pudo evidenciar que los individuos que presentaban el polimorfismo -165 G/T (rs1003349) tenían un mayor riesgo para desarrollar la enfermedad (Weng, Chen, Lin, Chung, & Yang, 2012).

Otro estudio realizado en Taiwán sugiere una asociación entre los polimorfismos localizados en el gen que codifica para la metaloproteinasa de matriz MMP-14 y el cáncer de pulmón de células no pequeñas. En este estudio se analizó el polimorfismo -165 G/T y se pudo observar una diferencia significativa en la distribución de las frecuencias del genotipo -165 G/T entre los pacientes con cáncer pulmonar y los individuos sanos. Además, según los análisis estadísticos realizados en el estudio se pudo determinar que existe una mayor asociación entre el cáncer pulmonar y el genotipo -165 T/T en comparación con los genotipos GG/GT (Lee, Cheng, Chen, Shih, & Chen, 2011).

En un estudio realizado en la Universidad de Carolina del Sur investigaron las consecuencias de la sobreexpresión de MMP-14 en un cuadro de infarto agudo de miocardio. Se pudo determinar que la expresión de MMP-14 fue alta en el momento que ocurre el infarto y después de haber sucedido. Se comprobó que los individuos que presentaron una expresión más alta de MMP-14 mostraron una menor supervivencia (Spinale et al., 2010). Los investigadores aducen que este resultado se debe a que esta enzima participa en varios procesos dentro de la remodelación cardíaca que se da en respuesta a la lesión que sufre el corazón tras experimentar un infarto. La actividad proteolítica de MMP-14 impide una adecuada remodelación de los ventrículos. Por esta razón, el gen que codifica para la MMP-14 constituye una posible diana terapéutica. Disminuyendo su expresión se podría conseguir una menor actividad proteolítica y por ende una remodelación más eficiente del miocardio (Spinale et al., 2010).

Varios estudios acerca de la biología molecular de las enfermedades cardiovasculares han permitido conocer la fisiopatología de las mismas, permitiendo establecer las bases moleculares de procesos inflamatorios que son los precursores de varias enfermedades como la aterosclerosis (Poutriel, Pestana, Medina, & Pérez, 2011). En China se realizó un estudio en el que se observó una asociación positiva entre el polimorfismo + 7096 T/C ubicado en el *gen MMP-14* y la formación de una placa carotídea vulnerable, ya que disminuye el riesgo de su formación, impidiendo que se desarrollen patologías posteriores que se dan a consecuencia de la ruptura de esta placa (C Li et al., 2014).

El presente trabajo experimental propone estudiar el polimorfismo -165 G/T (rs1003349), ubicado en el promotor del gen que codifica para MMP-14, ya que se ha determinado que su presencia influye en la expresión de MMP-14. Es por esta razón que este polimorfismo ha sido relacionado con el desarrollo de

varias patologías entre ellas algunos tipos de cáncer. Además de esto, se ha podido determinar que la sobreexpresión de MMP-14 puede promover el desarrollo de otras enfermedades como: enfermedades cardiovasculares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), Parkinson, enfermedad degenerativa de disco lumbar, osteoporosis, entre otras.

1.2 Planteamiento del problema

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades no transmisibles (ENT) son la causa principal de la mayoría de defunciones a nivel mundial. La lista de ENT está liderada por: las enfermedades cardiovasculares, los accidentes cerebrovasculares, el cáncer, la diabetes y las enfermedades pulmonares crónicas.

Las enfermedades cardiovasculares, como la cardiopatía isquémica y la insuficiencia cardíaca, se encuentran entre las enfermedades que más muertes causan en el mundo como se puede observar en la figura 1. Aproximadamente 17 millones de individuos fallecen cada año a causa de estas patologías (Ferrera & Silva, 2017).



Figura 1. Cuadro de las diez causas principales de defunción en el mundo.

Adaptado de: (Coulter, 2012).

En Europa las enfermedades cardiovasculares son la razón más frecuente de hospitalizaciones y de muerte, en conjunto con la enfermedad cerebrovascular provocan más del 50 % de los fallecimientos (Fernández & García, 2017). En el Ecuador una investigación realizada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2014, demostró que un poco más de un tercio de la población que se encuentra entre los 10 años de edad, ya puede tener indicios de enfermedades cardiovasculares, y aproximadamente 717 529 individuos entre los 10 y 59 años ya presentan problemas de hipertensión. En el 2011 se reportaron 4 381

muertes por enfermedades cardiovasculares, y esta cifra ha aumentado considerablemente en los últimos años (Ferrera & Silva, 2017).

Por otro lado, el cáncer es otra de las principales enfermedades que causa más muertes en el mundo. Según la OMS el cáncer es la segunda causa de fallecimientos y en el 2015 se registraron 8,8 millones de muertes a causa de esta patología. Se ha podido determinar que son cinco los tipos de cáncer que poseen los índices más altos de mortalidad, liderando la lista el cáncer de pulmón, seguido por el cáncer hepático, el cáncer colorrectal, el cáncer gástrico y el cáncer de mama (OMS, 2017).

La OMS ha declarado al cáncer de pulmón como un problema global, en el 2015 se registraron 1,69 millones de defunciones aproximadamente, y se estima que esta cifra aumente (OMS, 2017). La mortalidad se acerca mucho a la incidencia debido a la letalidad del cáncer pulmonar (Moctezuma & Patiño, 2009). De acuerdo con los datos de la OMS de los pacientes diagnosticados con esta neoplasia, el 88 % fallecen (Cueva, 2015).

En Ecuador, según la Sociedad de Lucha Contra el Cáncer del Ecuador (SOLCA) Núcleo Quito, en el año 2012 se registraron 753 muertes, 432 casos en hombre y 321 en mujeres (Cueva, 2015). El cáncer de pulmón se encuentra en el tercer lugar como causa de muerte después del cáncer de próstata y estómago en el país (Cueva, 2015). Es importante mencionar, que según datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) el Ecuador es uno de los países que reporta más casos de cáncer anualmente a nivel de América Latina. En las mujeres ecuatorianas el cáncer más frecuente es el cáncer de mama con una incidencia del 35,4 %, seguido del cáncer de piel (Veliz, 2015).

Por otra parte, las enfermedades pulmonares crónicas entre ellas la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o EPOC, forma parte de las 5 enfermedades no transmisibles que más defunciones causan mundialmente. En el 2015 se reportaron 3,2 millones de decesos a causa de esta enfermedad (OMS, 2017). Se estima que para el 2020 la EPOC se convierta en la tercera causa de muerte en el mundo. En el Ecuador el número de individuos que padecen esta enfermedad ha ido aumentando considerablemente, se cree que esto se debe a factores ambientales y a los riesgos ocupacionales (Pesantes, Puma, & Sacta, 2010). En el país, según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), la EPOC es la tercera causa de mortalidad debido a la exacerbación de la enfermedad. El tratamiento de la EPOC es muy complicado y los resultados finales no son positivos (Molina, 2015, pp. 6-7).

1.3 Justificación

En el Ecuador cada vez se registran más muertes a causa de enfermedades cardiovasculares, además cuando se presentan estas patologías pueden ocasionar ciertas lesiones, que disminuyen la capacidad laboral de los individuos. A causa de todos los inconvenientes que provocan las mismas se hace necesaria la búsqueda de nuevos métodos de diagnóstico temprano y tratamientos. El acceso a nuevas técnicas de diagnóstico y terapéuticas puede ser la solución para varios desafíos médicos que se presentan hoy en día en relación con diferentes cuadros clínicos. Por ejemplo, en el caso del infarto agudo de miocardio (IAM) una detección precoz de la patología subyacente puede disminuir la tasa de mortalidad, debido a que un diagnóstico en estadios tempranos da la oportunidad a los médicos especialistas a tomar medidas de prevención con los pacientes que se encuentren propensos a desarrollarlo (Gagliardi et al., 2017, pp. 16-17). Se conoce que más del 70 % de los pacientes que padecen de un IAM mueren antes de llegar al hospital, para estos individuos el tratamiento preventivo no llegó nunca. Actualmente, el examen más frecuente para su diagnóstico es el electrocardiograma, sin embargo, en muchos de los casos puede fallar o puede considerarse un

método tardío, es decir, el paciente no llega a tiempo para realizarse el examen (Gagliardi et al., 2017, pp. 16-17).

Otro problema que enfrenta la salud en el Ecuador es la gran cantidad de pacientes con cáncer, la cual se ha incrementado de una manera rápida en los últimos años, convirtiendo a esta enfermedad en una de las principales causas de muerte. En el Ecuador, el cáncer pulmonar, ocupa el tercer lugar en la lista de los tipos de cáncer que más defunciones causan. Sin embargo, en algunas provincias como Pichincha, Guayas y Manabí el porcentaje de muertes a causa de esta patología ha aumentado, llegando hasta el 32,8 %. Según los estudios realizados, se estima que la tendencia aumentará en pocos años, lo que va a convertir al cáncer pulmonar como la principal causa de muerte por neoplasia (Paz-y-Miño et al., 2010).

Para el diagnóstico del cáncer pulmonar se emplean varias técnicas como las pruebas de imagen que incluyen la tomografía por emisión de positrones (PET) con la fusión de la tomografía computarizada, también está la radiografía de tórax y la citología del esputo, entre los más relevantes. En cuanto a las técnicas de detección precoz, se destaca la tomografía helicoidal de baja dosis (Kajatt, 2013). Por otra parte, aún se usan métodos convencionales para la confirmación del diagnóstico de esta patología, entre los más usados están la broncoscopia y la biopsia percutánea por aspiración (Kajatt, 2013).

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) en el 2016 se registraron 641 muertes a causa del cáncer de mama, el 99,5 % de decesos fueron mujeres. El Ministerio de Salud Pública y empresas privadas han realizado numerosas campañas para informar a la población acerca de la importancia de la detección precoz, debido a que es muy tratable cuando es detectado en etapas iniciales. Sin embargo, aún no es posible disminuir la tasa

de mortalidad del cáncer de mama ya que no se cuenta con técnicas que permitan una detección eficaz de la enfermedad. En muchos de los casos depende del individuo, que mediante un autoexamen pueden detectar alguna anomalía en su cuerpo, no obstante, en la mayoría de los casos este recurso fracasa. Actualmente los exámenes preventivos para esta enfermedad son las mamografías. Así mismo, sucede con otro tipo de cáncer como el cérvicouterino, cuya detección consiste en una prueba de Papanicolaou en la mayoría de casos. Esta prueba no es adecuada para un tratamiento precoz ya que tiene una sensibilidad del 50 % aproximadamente y puede producir varios falsos negativos (Terrazas et al., 2015, pp. 56-61).

Como se mencionó, existen varias técnicas de análisis para la detección y el diagnóstico de diferentes tipos de cáncer entre ellos: el cáncer de pulmón, mama, cérvicouterino, entre otros. No obstante, ninguna técnica ha demostrado reducir la mortalidad de estas neoplasias. La única opción para aumentar la supervivencia de los pacientes es la detección temprana que puede disminuir potencialmente la mortalidad (Rossi A, 2005). Existe una alta posibilidad de curación si el cáncer se detecta en un estadio temprano y se trata oportunamente (Moctezuma & Patiño, 2009). Esto es posible tanto en el cáncer pulmonar que es el que más muertes causa, como en otros tipos de cáncer que también tienen una alta tasa de mortalidad.

Las enfermedades pulmonares crónicas se han convertido en una de las causas principales de muerte en la población ecuatoriana y al igual que las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, la detección temprana de estas puede prolongar la vida del paciente o indicar si el individuo puede ser propenso a desarrollarla. Por todo lo mencionado anteriormente se concluye que es necesario conocer el origen de estas patologías y cómo se comportan a nivel genético y molecular. El conocimiento de la función que desempeña cada una de las metaloproteinasas y el papel que juegan los polimorfismos en los

genes que las codifican, puede sentar bases para el diagnóstico precoz y el pronóstico de las patologías que más muertes causan en el país y a nivel mundial, entre ellas: las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y las enfermedades pulmonares crónicas. Particularmente, la metaloproteinasa MMP-14 en la que se centra este estudio tiene una gran relevancia por la relación entre sus niveles de expresión y las características clínico-patológicas de los pacientes, por lo que la expresión de esta enzima puede estar relacionada con el pronóstico de los mismos. El estudio se propone determinar la frecuencia del polimorfismo -165 G/T (rs1003349) ubicado en el promotor del gen que codifica para MMP-14 en la población ecuatoriana y comparar las frecuencias genotípicas y alélicas con otras poblaciones estudiadas. Según los resultados de varias investigaciones previas se ha demostrado que la presencia de este polimorfismo en el *gen MMP-14* implica un factor de riesgo para padecer estas enfermedades.

El presente estudio se realiza con el fin de que, en futuras investigaciones se puedan establecer nuevas alternativas de diagnóstico molecular que permitan detectar en estadios tempranos las enfermedades previamente mencionadas.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Determinar la frecuencia del polimorfismo -165 G/T (rs1003349) en el promotor del gen que codifica para la metaloproteinasa-14 (MMP-14) en la población ecuatoriana y realizar un análisis comparativo con otras poblaciones.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar la PCR para la amplificación del segmento génico que incluye el polimorfismo -165 G/T (rs1003349) en el promotor del gen que codifica para la metaloproteinasa-14 (MMP-14).
- Determinar la frecuencia del polimorfismo -165 G/T (rs1003349) en individuos de la población ecuatoriana.
- Comparar la frecuencia determinada con la reportada en otras poblaciones.

2. Marco teórico

2.1 Enfermedades cardiovasculares

2.1.1 Cardiopatía isquémica

La cardiopatía isquémica se presenta cuando se da una disminución en el aporte de oxígeno al miocardio. Una de las causas para que se desarrolle es la aterosclerosis, patología causada fundamentalmente por tres factores: disfunción endotelial, inflamación y trombosis (Boo, 2010).

La aterosclerosis se caracteriza por ser una enfermedad progresiva, ya que conforme pasa el tiempo las arterias se van estrechando a causa de la formación de las placas de ateroma. Al darse esta oclusión se interrumpe el paso del flujo sanguíneo causando principalmente dos problemas: insuficiencia arterial crónica (angina de pecho) o disminución total de la circulación a causa de una trombosis (infarto del miocardio) (Boo, 2010).

Las placas de ateroma también denominadas placas vulnerables, están compuestas por dos partes: el núcleo lipídico (colesterol) y la membrana fibrosa (células de musculo liso y colágeno). Cuando estas placas tienen un mayor

contenido lipídico y su membrana fibrosa es delgada son más vulnerables, por lo que pueden romperse ocasionando cuadros isquémicos agudos (Boo, 2010). Además, se ha descrito que no solo el contenido de estas placas puede influenciar en su fragilidad. Los procesos inflamatorios que se dan, dependiendo de su intensidad pueden provocar que la vulnerabilidad de la placa aumente, lo que resulta en la ruptura de la misma (Boo, 2010).

Cuando la placa de ateroma contiene una membrana fibrosa gruesa tiene menos probabilidad de sufrir una fractura, es decir son más estables, lo que disminuye la posibilidad de provocar un cuadro isquémico agudo. No obstante, al ser menos vulnerables estas placas pueden causar una oclusión desencadenando una angina de pecho (Boo, 2010).

2.1.2 Infarto agudo de miocardio (IAM)

Este cuadro se presenta como resultado de la aterosclerosis, cuando se rompen las placas de ateroma se genera un trombo que impide abruptamente el flujo sanguíneo (Muñoz, Carvajal, & Rodríguez, 2016).

Después de un IAM, el ventrículo izquierdo queda con fragmentos infartados y no infartados, los cuales van a sufrir cambios en su estructura (forma, tamaño y grosor). A este proceso se le conoce como remodelación ventricular postinfarto y se da como respuesta del organismo al daño causado por un infarto (Senior et al., 2012, pp. 6-8).

Este proceso también involucra la remodelación de la matriz extracelular (MEC) con el fin de reestablecer la fuerza mecánica y restaurar la resistencia a la distensión de los segmentos infartados y no infartados del ventrículo. Varias investigaciones se han centrado en buscar nuevas técnicas para proteger a la

MEC, especialmente en la zona donde se encuentra más fragmentos infartados, con el fin de reducir la mortalidad y discapacidad que sufren los individuos tras un IAM (Senior et al., 2012, pp. 6-8).

2.1.3 Factores de riesgo para desarrollar cuadros isquémicos agudos

Los factores ambientales tienen una fuerte relación con el desarrollo de un IAM. Para un individuo los factores de riesgo son: consumo de alcohol, drogas, comida rica en grasa, sedentarismo, antecedentes familiares de problemas cardíacos, estrés, entre otros. También se conoce que existen algunos factores genéticos que están relacionados con estas enfermedades cardíacas y que, varios genes están involucrados (Fernández-Ortiz, Jiménez-Candil, Bodí, & Barrabés, 2012).

2.2 Cáncer

El cáncer comprende un conjunto de enfermedades que se basan en el crecimiento de células anormales, las cuales se dividen y diseminan de una manera descontrolada y rápida (Puente & Velasco, 2017), (Figura 2). Normalmente, las células están sujetas a señales que regulan su comportamiento, les indican cuando deben dividirse, diferenciarse o morir. Pero las células cancerígenas evaden estas señales, desarrollando un grado de autonomía lo que resulta en un crecimiento descontrolado (Hejmadi, 2010).

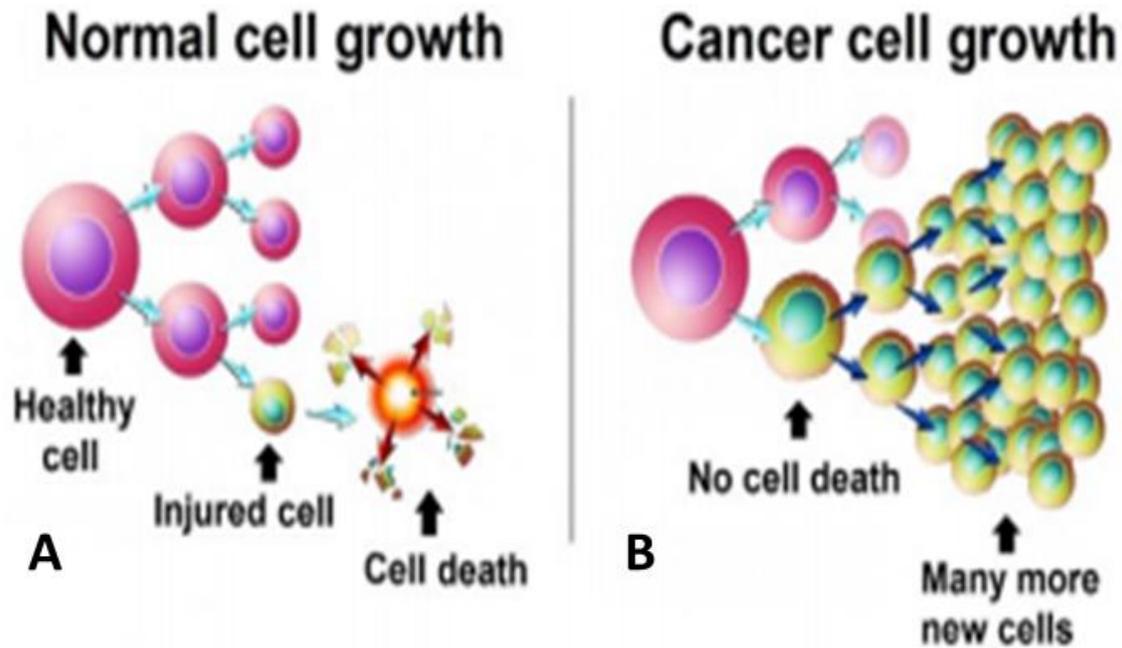


Figura 2. Crecimiento de células normales y células cancerígenas.

Adaptado de: (Shead, Corrigan, & Hanisch, 2016).

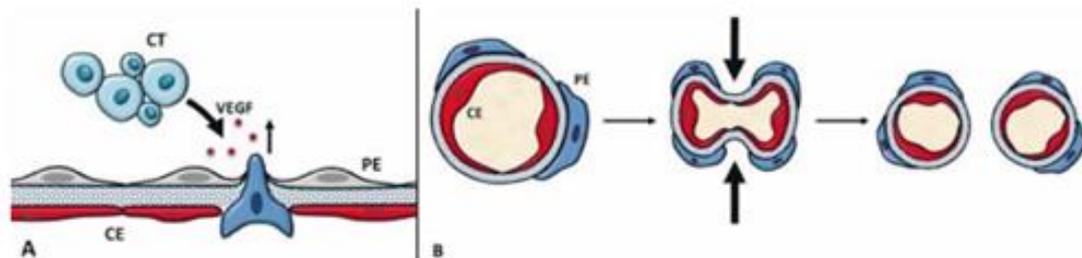
a) En el crecimiento celular normal, las células se dividen cuando es necesario y si en la división una célula resulta dañada, esta muere.

b) En un crecimiento celular anormal, las células dañadas se dividen más rápido y de forma descontrolada, debido a una serie de capacidades adquiridas como consecuencia de cambios en su ADN.

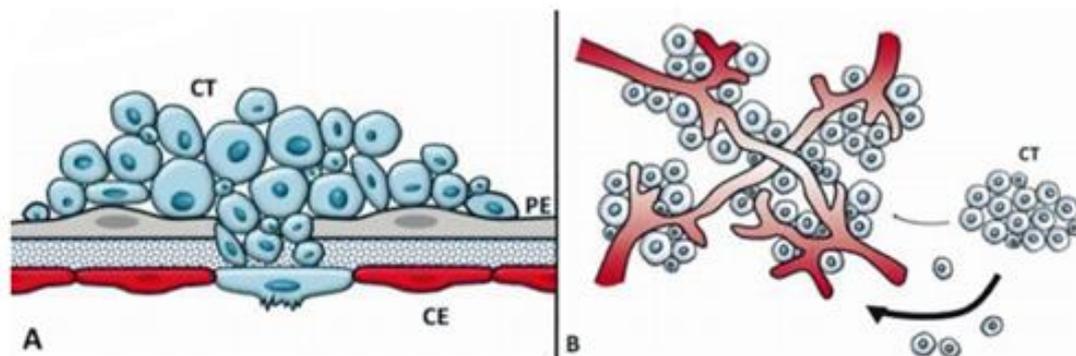
El cáncer se presenta cuando los mecanismos de regulación celular se alteran debido a daños genéticos, por esta razón se considera al cáncer como una enfermedad genética (Ryan & Bernstein, 2012, pp. 1513-1514). Las variaciones que se presentan en el ADN impulsan el desarrollo del cáncer y pueden ser heredadas si las alteraciones se encuentran en las células germinales. No obstante, los cambios genéticos que promueven el cáncer también pueden ser adquiridos a lo largo de la vida debido a diferentes factores como: errores al momento de la división celular, exposición a sustancias químicas, radiación y hábitos de vida como el consumo de tabaco (Ryan & Bernstein, 2012, pp. 1513-1514).

2.2.1 Angiogénesis

Se denomina angiogénesis al proceso donde se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes (Roa, 2014). Este proceso es fundamental para el desarrollo tumoral, particularmente cuando se trata de tumores sólidos (figura 3). La generación de nuevos vasos sanguíneos posibilita el crecimiento del tumor, ya que ayuda a suministrar los nutrientes y oxígeno necesarios, además de permitir la eliminación de residuos. Es por esto que la angiogénesis contribuye a los procesos de invasión o metástasis (Roa, 2014).



1. Métodos conocidos de formación de vasos sanguíneos en tejidos normales y tumores, la formación de vasos puede ocurrir por ramificación (1A) o por un proceso de separación del vaso conocido como intususcepción (1B). Células tumorales (CT); pericito (PE); célula endotelial (CE)



2. Métodos conocidos de formación de vasos sanguíneos en tumores, donde las células tumorales pueden adoptar forma de células endoteliales, proceso llamado mimetismo (2A) o bien las células tumorales pueden crecer hacia vasos pre-existentes, proceso llamado coopción (2B). Células tumorales (CT); pericito (PE); célula endotelial (CE)

Figura 3. Métodos de formación de vasos sanguíneos en células normales y células tumorales.

Tomado de: (Roa, 2014).

2.2.2 Metástasis

En el proceso de metástasis las células cancerígenas migran desde el sitio donde se originaron hacia otros tejidos y usan al sistema vascular para lograrlo. Una vez que las células cancerígenas llegan a otros órganos, se deben acoplar al nuevo ambiente para lograr sobrevivir y conseguir su colonización. Todos los pasos que involucran el proceso de metástasis se llevan a cabo gracias a características fenotípicas específicas que poseen las células tumorales, en conjunto con la interacción entre el microambiente y el sistema inmune del organismo (Turajlic & Swanton, 2016, pp. 169-174).

A pesar de los avances en los tratamientos contra el cáncer, cuando la enfermedad llega a un cuadro de metástasis, la enfermedad es incurable.

2.2.3 Bases moleculares del cáncer

La patogénesis del cáncer está dada por la acumulación de múltiples anomalías moleculares durante un largo período de tiempo. Las alteraciones que se presentan pueden ser provocadas por diferentes eventos que se dan a nivel molecular tales como: silenciamiento de genes a través de un proceso de metilación, cambios en la secuencia de ADN, amplificación o delección de un segmento del ADN y ganancias o pérdidas cromosómicas completas (Massion & Carbone, 2003).

2.2.4 Factores de riesgo

La Organización Mundial de la Salud ha informado que los factores de riesgo para desarrollar cáncer son similares a los factores de riesgo para desarrollar otras patologías como: enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades pulmonares crónicas. Estos factores se relacionan con los hábitos de vida de los individuos: consumo de alcohol, tabaco, drogas, dieta basada en grasas y azúcares, sedentarismo y obesidad. Además, otros

agentes físicos, químicos y biológicos también pueden generar el desarrollo de esta enfermedad como: la luz UV, sustancias químicas (formaldehído, aflatoxinas, etc), contaminantes de alimentos y virus.

2.3 Enfermedades pulmonares crónicas

Dentro de las enfermedades pulmonares crónicas, la más relevante por el número de individuos que la padecen es la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

La EPOC es una patología que se manifiesta con dificultad para respirar y, se caracteriza por ser una enfermedad progresiva debido a la acción de agentes inflamatorios que actúan de forma anómala. El factor principal que la desencadena es el humo del tabaco, aunque existen otras partículas que están en el ambiente a causa de la contaminación que también afecta a los individuos, pero en menor medida. A pesar de esto, solo el 25 % de fumadores activos llegan a padecer la enfermedad, por lo que se piensa que algunos factores genéticos influyen en el desarrollo de la EPOC (Guerra, Jiménez, & Sánchez, s.f)

2.4 Matriz extracelular (MEC)

En los organismos multicelulares, las células que conforman los tejidos poseen una estructura que las rodea, la cual es semejante a una red con una organización compleja. Esta estructura se denomina matriz extracelular y está constituida por macromoléculas extracelulares que están conectadas entre sí (Figura 4). El colágeno es la proteína más abundante en la MEC (Rovensky, 2011, pp. 7-12).

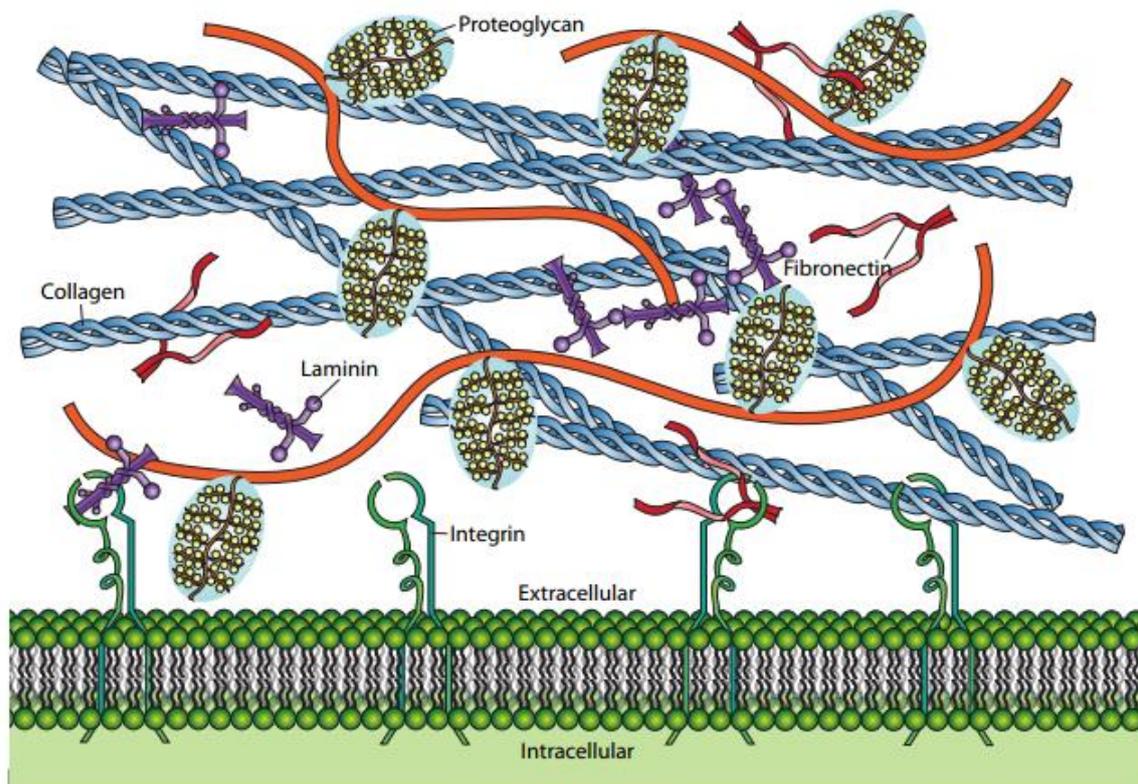


Figura 4. Matriz extracelular y sus componentes

Adaptado de: (Wong, 2009, pp. 198-216)

Los componentes de la matriz extracelular incluyen: colágeno, proteoglicanos, fibronectina y laminina. Se puede observar las integrinas, glicoproteínas que participan mayoritariamente en la unión de las células con la matriz extracelular.

La matriz extracelular se comporta como una estructura mecánica que permite la estabilización de una estructura tisular; además tiene un papel importante en numerosos procesos celulares. Está involucrada en procesos que determinan la migración, proliferación, supervivencia y el metabolismo de las células que se encuentran involucradas en las interacciones adhesivas con la matriz (Rovensky, 2011, pp. 7-12).

Procesos como la embriogénesis y la regeneración tisular dependen en gran medida de la matriz extracelular, incluso ciertas moléculas que integran la MEC participan en procesos de inflamación aguda y crónica en los tejidos. Algunas

enfermedades como la artritis reumatoide, el asma, y el cáncer entre otras tienen una fuerte relación con el funcionamiento de las moléculas de la matriz extracelular. Es por esta razón que inclusive el proceso de metástasis está vinculado con las interacciones adhesivas de las células del tejido involucrado y la matriz extracelular (Rovensky, 2011, pp. 7-12).

2.5 Matriz Extracelular y su relación con el infarto agudo de miocardio

En la zona afectada por un IAM, la MEC sufre algunos cambios importantes. El colágeno disminuye entre un 40 y 80 % y como consecuencia, se da un remodelado ventricular adverso, inflamación e irregularidades en el funcionamiento del corazón. Para lograr una restauración de las funciones, es necesario reestablecer la integridad de los tejidos y para esto, es indispensable mantener en buenas condiciones a los capilares y a la matriz extracelular. Es por esta razón, que varias de las técnicas de trasplante de células para la regeneración tisular del miocardio han fracasado, debido a que no existe una retención celular óptima. Con estos antecedentes, en la actualidad se buscan nuevas técnicas de regeneración de la MEC ya que después de un infarto, esta se encuentra muy afectada (Saavedra-Torres, Garzón, & Zúñiga-Cerón, 2017, pp. 44-46). Es necesario conocer cómo interactúan los componentes de la MEC y sus proteínas para entender cómo se da el mecanismo de regeneración antes, durante y después de un ataque cardíaco (Saavedra-Torres, Garzón, & Zúñiga-Cerón, 2017, pp. 44-46).

2.6 Metaloproteinasas de matriz (MMPs)

Las metaloproteinasas de matriz son enzimas que pertenecen a la familia de las endopeptidasas dependientes del zinc (Gialeli, Theocharis, & Karamanos, 2010, pp. 16-27). Estas enzimas son sintetizadas como zimógenos y una vez activadas se regulan a través de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) (Oblander et al., 2005, pp. 255–269). Fueron descubiertas en 1962 cuando se estudiaba la degradación del colágeno, inicialmente los estudios

realizados mostraron que están encargadas de la escisión y reconstrucción del tejido conectivo (Zitka et al., 2010).

No obstante, en los últimos años se ha descubierto que las MMPs participan en varios procesos fundamentales como en la organogénesis, la cicatrización, y en condiciones patológicas como la inflamación, enfermedades autoinmunes y carcinogénesis (Coronato, Laguens, & Girolamo, 2012). Actualmente se ha determinado que en enfermedades como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple presentan elevados niveles de MMPs (Coronato, Laguens, & Girolamo, 2012).

Las metaloproteinasas se han clasificado principalmente por sus diversos sustratos específicos, (tabla 1) (Zitka et al., 2010). Se clasifican principalmente en cinco grupos según el reconocimiento del sustrato y el mecanismo de escisión: las colagenasas, MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18; las gelatinasas, MMP-2, MMP-9; las estromalinas, MMP-3, MMP-10, MMP-11; las matrilisinas, MMP-7, MMP-26; y las metaloproteasas asociadas a membrana denominadas MT-MMP (Coronato, Laguens, & Girolamo, 2012). La estructura de los diferentes grupos se puede observar en la figura 5.

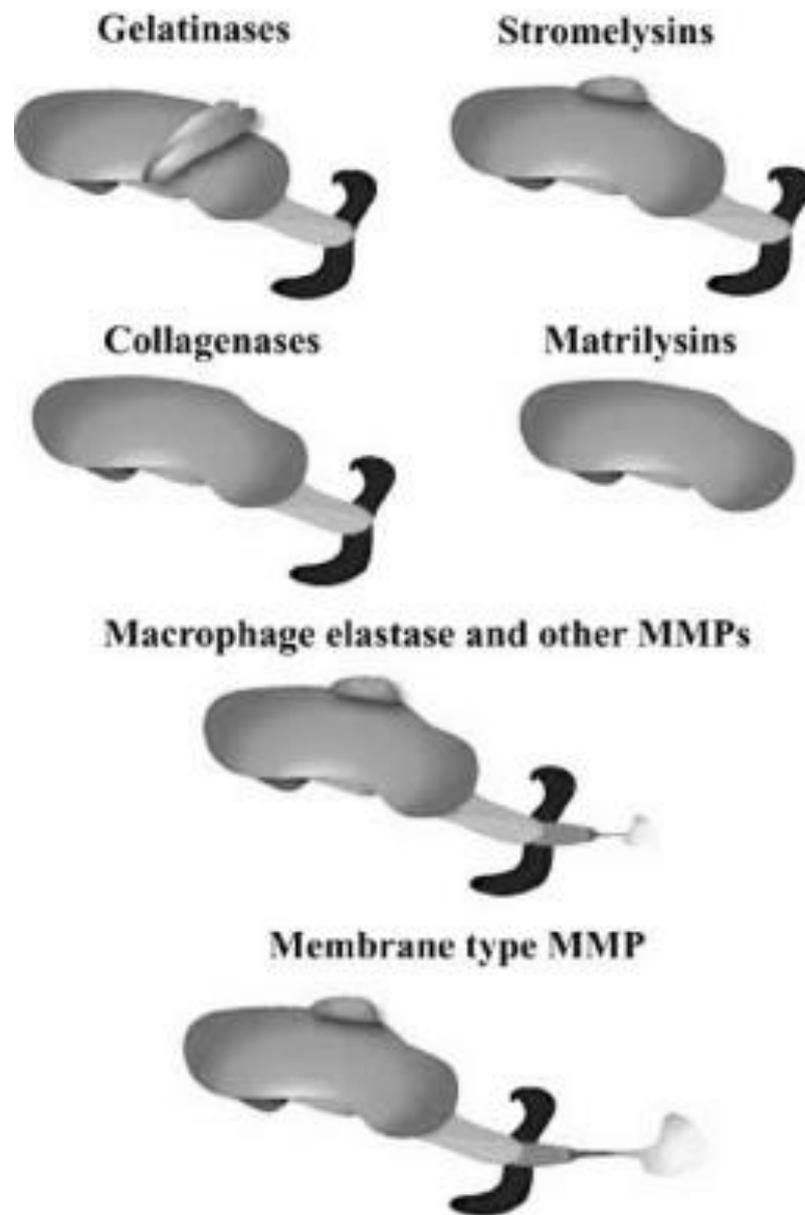


Figura 5. Características estructurales específicas de ciertos grupos de MMPs.

Adaptado de: (Zitka et al., 2010).

En la tabla 1 se detalla la clasificación de las metaloproteinasas, se asignan números desde MMP-1 a MMP-28. En la tabla 1 se encuentran las metaloproteinasas identificadas en los últimos años, cabe destacar que algunas de estas enzimas aún no están identificadas siguiendo este sistema de clasificación (Zitka et al., 2010).

Tabla 1.

Clasificación actual de las metaloproteinasas.

MMP	METALOPROTEINASA	kDa	Clasificación EC	Sustratos
MMP-1	Colagenasas (tipo I)	43	EC3.4.24.7	Colágeno (I,II,III,VIII,X)
MMP-2	Gelatinasa A	72	EC3.4.24.24	Colágeno (I,IV,V,VII,X,XI, XIV)
	Gelatinasa tipo IV	66		
	Colagenasa			
MMP-3	Estromelisina	46	EC3.4.24.17	Colágeno (III,IV,V,IX)
	Proteoglicanasa			
MMP-7	Matrilisinas	20	EC3.4.24.23	Colágeno (IV,X)
MMP-8	<i>Neutrophil</i> colagenasa	58	EC3.4.24.34	Colágeno (I,II,III,V, VII, VIII, X)
MMP-9	Gelatinasa B	92	EC3.4.24.35	Colágeno (IV, V,VII, X, XIV)
MMP-10	Estromelisina -2	46	EC3.4.2.22	Colágeno (III, V)
MMP-11	Estromelisina -3	44	<i>No match</i>	<i>Unknown</i>
MMP-12	Macrófago metaloelastasa	45	EC3.4.24.65	Colágeno IV
MMP-13	Colagenasa -3	55	<i>No match</i>	Colágeno (I, II, III, IV, IX, X, XIV)
MMP-14	MT1-MMP	54	<i>No match</i>	Colágeno (I,III) MMP-2
MMP-15	MT2-MMP	61	<i>No match</i>	<i>Fibronectin</i>
MMP-16	MT3-MMP	55	<i>No match</i>	Colágeno (III) MMP-2
MMP-17	MT4-MMP	54	<i>No match</i>	<i>Unknown</i>
MMP-18	Colagenasa -4		<i>No match</i>	Colágeno (I, II, III, VIII, X)
MMP-19	RAS1-1		<i>No match</i>	<i>Gelatin</i>
MMP-20	<i>Enamelysin</i>		<i>No match</i>	<i>Amelogrencin</i>
MMP-21			<i>No match</i>	<i>Unknown</i>
MMP-22			<i>No match</i>	<i>Unknown</i>
MMP-23			<i>No match</i>	<i>Unknown</i>
MMP-24	MT5-MMP		<i>No match</i>	<i>Unknown</i>

MMP-25	MT6-MMP		<i>No match</i>	Pro-Gelatinasa A
MMP-26	<i>Matrilysin-2</i>		<i>No match</i>	<i>Gelatin</i>
MMP-28	<i>Epilysin</i>		<i>No match</i>	Caseína

Adaptado de: (Zitka et al., 2010)

2.7 Metaloproteinasas y su relación con el cáncer

Las metaloproteinasas juegan un papel muy importante en procesos que comprenden diferentes fases de la progresión tumoral como: la metástasis, invasión, adhesión celular, migración y angiogénesis. Tienen implicación en procesos como la degradación de las proteínas de la MEC y las interacciones tanto célula-célula como célula-MEC (Gialeli, Theocharis, & Karamanos, 2010, pp. 16-27).

Investigaciones previas muestran que en diferentes tipos de tumores se presenta una elevada expresión de las MMPs, lo cual confirma el postulado de que estas enzimas están involucradas en las diversas etapas del progreso tumoral. Específicamente, se conoce que las MMPs pueden promover o inhibir el progreso del cáncer. Su función específica está influenciada por un conjunto de factores tales como: la etapa en la que se encuentre la enfermedad o el desarrollo tumoral, el lugar donde se ubique el tumor, la localización de las enzimas y del sustrato en la MEC (Gialeli, Theocharis, & Karamanos, 2010, pp. 16-27).

2.7.1 Influencia de las metaloproteinasas en la invasión de las células cancerígenas

Se ha podido comprobar que la acción proteolítica de estas moléculas es indispensable para que las células cancerígenas puedan degradar todas las barreras físicas y permitir la expansión local (Gialeli, Theocharis, & Karamanos, 2010, pp. 16-27).

También participan en los procesos de intravasación de vasos sanguíneos en lugares cercanos, extravasación e invasión en lugares distintos. Existen varias MMPs que están involucradas en la degradación de la matriz extracelular, esto facilita la invasión (Gialeli, Theocharis, & Karamanos, 2010, pp. 16-27).

Las MMPs además de su función más conocida, de degradar las barreras físicas y aumentar la angiogénesis, tienen otras funciones. Pueden liberar factores de crecimiento tanto en la superficie celular como en la MEC y generan productos de escisión que se caracterizan por potenciar el crecimiento y la invasión de los tumores (Reunanen & Kähäri, 2013). La invasión de células cancerígenas depende de una interacción entre las células tumorales, las células del estroma y las células inflamatorias. Algunos estudios plantean que todos estos tipos celulares producen diferentes tipos de MMPs que promueven el proceso invasivo (Reunanen & Kähäri, 2013).

Existe una correlación entre la expresión de ciertas MMPs y los procesos de invasión y de progresión tumoral, este es el caso de la MMP-2 la cual regula directamente la adhesión de las células cancerígenas y la degradación de los componentes de la MEC, facilitando de esta forma la migración de las células cancerígenas (Hofmann, Houben, Bröcker, & Becker, 2005, pp. 308-311). Estudios demuestran que las MMPs trabajan en conjunto, es así como, proMMP-2 es sustrato de MMP-14, lo que resulta en la activación proteolítica de MMP-2. Este evento sucede en la superficie celular potenciando la degradación de la MEC. La expresión de MMP-2 y MMP-14 se encuentra incrementada durante el proceso metastásico y su sobreexpresión se ha observado tanto en el tumor como en las células del estroma, (Figura 6) (Hofmann, Houben, Bröcker, & Becker, 2005, pp. 308-311).

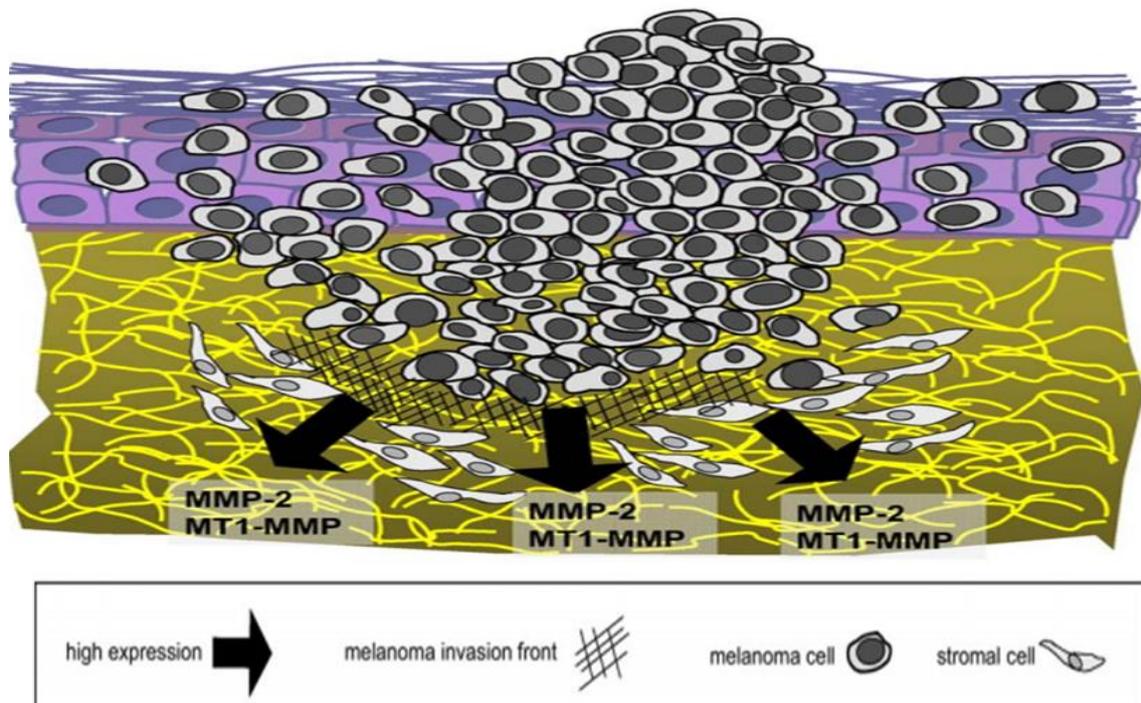


Figura 6. Expresión de MMP-2 y MMP-14 en el proceso metastásico

Adaptado de: (Hofmann, Houben, Bröcker, & Becker, 2005, pp. 308-311).

En las células tumorales y en las células del estroma ubicadas en el frente invasivo del tumor, se presenta la sobreexpresión de MMP-2 Y MT1-MMP O MMP-14.

2.7.2 Función de las metaloproteinasas en la angiogénesis y vasculogénesis tumoral

Cuando se trata de la formación de venas, capilares y vasos las MMPs pueden actuar como reguladores positivos y negativos dependiendo del momento en que se dé su expresión durante los procesos de angiogénesis y vasculogénesis. Para que las células cancerígenas puedan migrar se hace necesaria la generación de nuevos vasos sanguíneos y existen metaloproteinasas que están directamente relacionadas con la formación de estas estructuras, como por ejemplo MMP-2, MMP-14 y MMP-9. Específicamente la MMP-9 degrada ciertas moléculas de la MEC para generar nuevos compuestos que participan en la angiogénesis, de esta manera,

aumenta la biodisponibilidad de factores como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) que son necesarios para la generación de nuevos vasos sanguíneos que alimenten la estructura tumoral (Gialeli, Theocharis, & Karamanos, 2010, pp. 16-27).

Las MMPs no solo promueven la generación de vasos sanguíneos, también participan en procesos que inhiben la angiogénesis mediante la formación de ciertas moléculas que impiden que se desarrolle el proceso, es por esto que se dice que las MMPs son necesarias para el equilibrio angiogénico (Gialeli, Theocharis, & Karamanos, 2010, pp. 16-27).

2.7.3 Metaloproteinasas y su relación con la apoptosis celular

Evadir la muerte celular programada es otra alternativa que toman las células cancerígenas para promover su crecimiento. La función de las metaloproteinasas interfiere con ciertos mecanismos y también pueden provocar una escisión de los receptores que producen señales proapoptóticas. Incluso, se han empleado algunas metaloproteinasas como marcadores para verificar la resistencia a la quimioterapia en pacientes con cáncer de pulmón (Kessenbrock, Plaks, & Werb, 2010). El receptor FAS conocido como antígeno 1 de la apoptosis es inactivado por la actividad proteolítica de las MMPs provocando una resistencia a la apoptosis de las células cancerígenas y promueve la apoptosis de las células vecinas (normales). Además esta actividad proteolítica influye en el complejo mayor de histocompatibilidad suprimiendo a las células NK (Gialeli, Theocharis, & Karamanos, 2010, pp. 16-27).

2.8 Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

Los polimorfismos son variaciones que se pueden presentar en las secuencias genómicas en lugares específicos y actualmente se conoce que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) están implicados en el desarrollo de algunas patologías (Ramírez-Bello, Vargas-Alarcón, Tovilla-Zárate, & Fragoso, 2013).

Existe una clasificación para los SNP según su importancia funcional y su localización: rSNP ubicados en el promotor, srSNP ubicados en los ARNm primarios y secundarios y por último los SNP codificantes (cSNP), (Figura 7). Estas variaciones pueden afectar la cantidad y la actividad de la proteína codificada. Los efectos específicos de los diferentes tipos de SNPs se resumen en la figura 8 (Ramírez-Bello, Vargas-Alarcón, Tovilla-Zárate, & Fragoso, 2013).

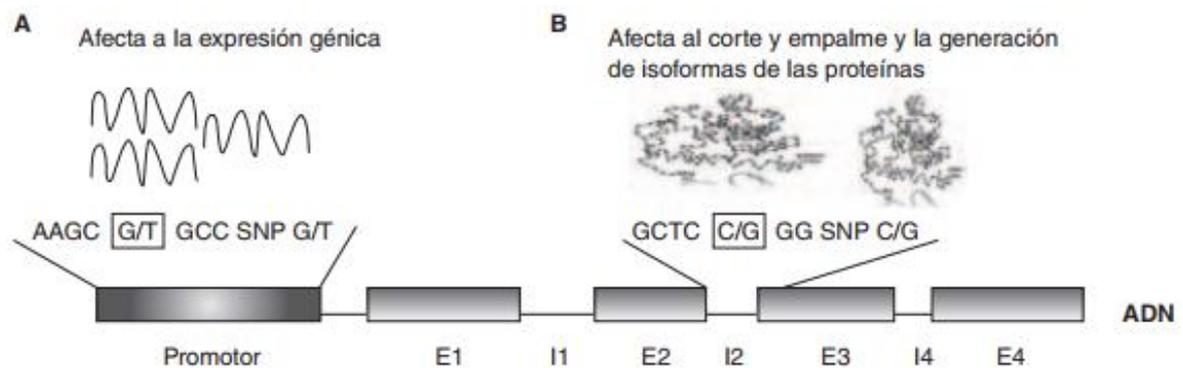


Figura 7. Ubicación de los polimorfismos.

Adaptado de: (Ramírez-Bello, Vargas-Alarcón, Tovilla-Zárate, & Fragoso, 2013)

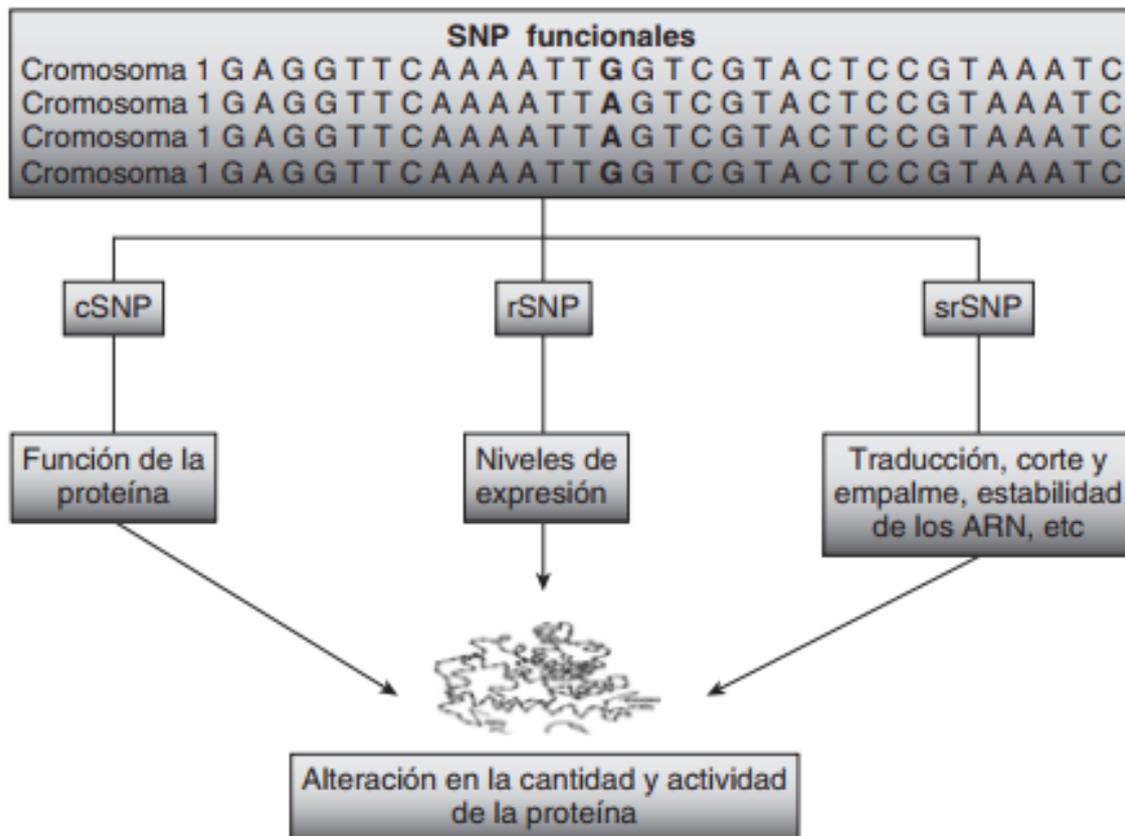


Figura 8. Clasificación de los SNP funcionales.

Adaptado de: (Ramírez-Bello, Vargas-Alarcón, Tovilla-Zárate, & Fragoso, 2013)

2.8.1 Polimorfismos en las metaloproteinasas

En los últimos años se han realizado algunos estudios que muestran como la presencia de diferentes polimorfismos que se encuentran en la región promotora del gen pueden inducir a variaciones en la expresión de la proteína resultante. Por esta razón se sugiere que existe una íntima relación entre los SNPs funcionales en los genes que codifican para las metaloproteinasas y el desarrollo de algunas patologías, entre ellas el cáncer (Martin et al., 2014).

Se han estudiado numerosos polimorfismos en diferentes metaloproteinasas, por ejemplo, el SNP (-1306C/T) encontrado en el promotor del gen que codifica

para MMP-2 y el (-1562C/T) en el promotor del *gen MMP-9* están asociados con el desarrollo de cáncer gástrico, el SNP (-181A/G) en el promotor del *gen MMP-7* se relaciona con el cáncer de corazón (Kubben et al., 2006, pp. 744-751). Los SNPs (+6767 G/A) y (+7096 C/C) en la MMP-14 se encuentran directamente relacionados con el desarrollo del carcinoma hepatocelular (Chen et al., 2011), también se conoce que los SNPs (-165 G/T) y (-72 G/A) ubicados en el promotor del gen que codifica para MMP-14 influyen en el desarrollo del cáncer pulmonar (Saitoh et al., 2005, pp. 621-626). Los ejemplos citados son una muestra pequeña de todos los polimorfismos estudiados, se debe tomar en cuenta que no solo están relacionados con el cáncer, sino también con otras patologías como la sepsis, displasias esqueléticas, enfermedades cardíacas, artritis, enfermedades neuronales, entre otras (Malemud, 2006).

2.8.2 Polimorfismos en MMP-14 y su relación con el cáncer

Las metaloproteinasas de membrana (MT1-MMP o MMP-14) son colagenasas que forman parte de las membranas basales, se encuentran ancladas a la superficie de la célula mediante un segmento que incluye a la membrana y en algunos casos se unen mediante un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Oblander et al., 2005, pp. 255–269).

La MMP14 es la enzima más estudiada dentro del grupo de las metaloproteinasas de membrana, ya que tiene una gran relevancia en la degradación de la matriz extracelular. Posee una potente actividad proteolítica, además es una enzima necesaria para la activación de otras proMMPs en la superficie celular, como es el caso de la proMMP-2 (Ingvarsen et al., 2013). Incluso, se conocen también que esta enzima, concretamente en el pulmón, juega un papel esencial en el desarrollo postnatal del septo alveolar (Ingvarsen et al., 2013). En la figura 9 se puede observar la estructura del *gen MMP-14* y la región donde se encuentra el polimorfismo estudiado.

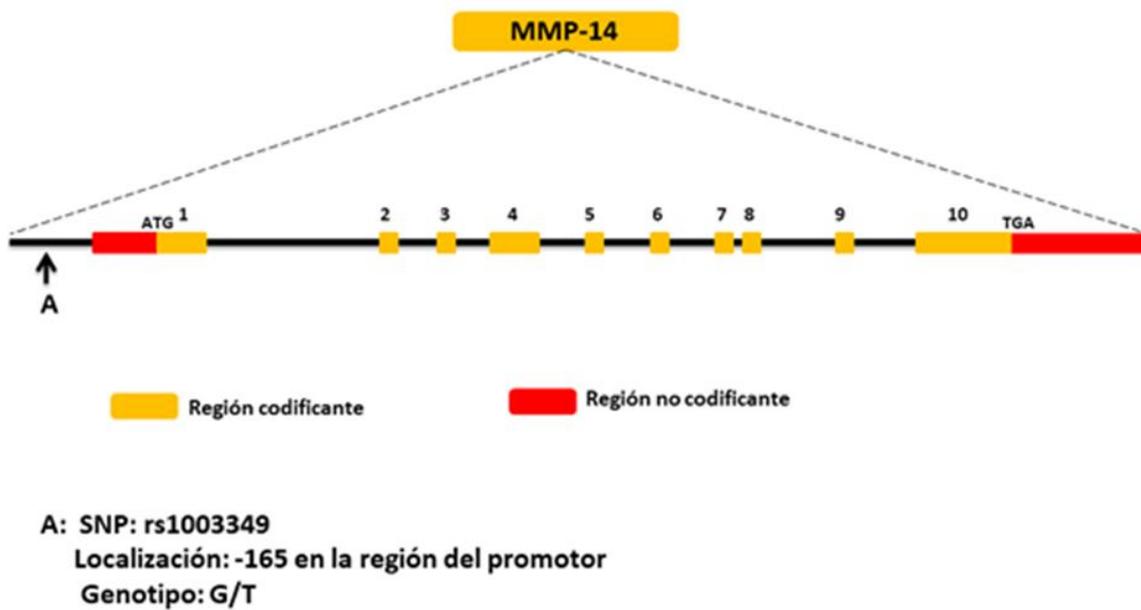


Figura 9. Estructura del *gen MMP-14*.

Se muestra los exones pintados de color amarillo y numerado del 1 al 10. El codón de inicio (ATG) y el codón de parada (TGA) se muestran en los exones 1 y 10, respectivamente.

a) muestra la posición del polimorfismo -165 G/T (rs1003349) ubicado en el promotor del gen.

Tanto MMP-14 como MMP-2 se encuentran íntimamente relacionadas con los procesos cancerígenos. Se conoce que están sobreexpresadas en diferentes tipos de cáncer, debido a que las dos enzimas participan en diferentes etapas de la patología. Es por esta razón, que se ha postulado que las MMP-14 cumplen un papel fundamental en la progresión del cáncer mediante la degradación directa de colágeno y la activación de otras metaloproteinasas (Ingvarsen et al., 2013).

Basados en este enfoque, en los últimos años varios grupos de investigación en todo el mundo se han centrado en el estudio de la expresión de esta enzima en pacientes con cáncer y en personas sanas, para analizar el papel que juega la expresión diferencial en la patología. En personas que padecen de cáncer se ha encontrado sobreexpresión de la MMP14. Varios factores pueden

influir en las diferencias de expresión de estas enzimas uno de ellos, es la presencia de polimorfismos en los genes que las codifican.

Los polimorfismos localizados en la región promotora del gen influyen notablemente en los niveles de expresión, lo cual está relacionado íntimamente con el desarrollo de ciertas patologías, entre ellas el cáncer.

El polimorfismo -165 G/T ubicado en el promotor del gen que codifica para MMP-14 puede afectar a su actividad transcripcional. En pacientes con diferentes tipos de cáncer como el carcinoma hepatocelular, el genotipo -165 G/T es muy frecuente por lo cual se asocia al desarrollo patológico de esta enfermedad (Chen et al., 2011). Este polimorfismo también está relacionado con otros tipos de cáncer como el cáncer oral, cervical, estomacal, y pulmonar, entre otros.

Es importante mencionar que la relación que se ha dado entre el polimorfismo -165 G/T ubicado en el promotor del *gen MMP-14* y enfermedades pulmonares entre ellas el cáncer, se ha concluido, fundamentalmente, a partir de estudios realizados en poblaciones asiáticas. Es por ello que varios autores sugieren realizar el mismo estudio en otras poblaciones ya que el papel funcional del genotipo -165 G/T aún no está totalmente esclarecido, y existe la posibilidad de encontrar diferencias dependiendo del grupo étnico estudiado (Saitoh et al., 2005, pp. 621-626).

Por ejemplo, en un estudio realizado en Taiwán sobre la relación entre los polimorfismos y el desarrollo de neoplasia cervical, se observó que el polimorfismo (+7096 A/C/G/T) ubicado en el *gen MMP-14*, mostraba una diferencia significativa en la distribución entre el grupo de pacientes y el grupo

control, sin embargo, esta diferencia no se observó en el caso de (-165 G/T). Además se demostró que otros polimorfismos como (C/C +7096) influyen más en el desarrollo de la enfermedad, y que el genotipo G/T presenta un menor riesgo de desarrollar la enfermedad, en comparación con el genotipo homocigoto G/G (Tee et al., 2012, pp. 932-938).

2.8.3 Polimorfismos en MMP-14 y su relación con las enfermedades cardiovasculares

En el progreso de enfermedades como la aterosclerosis los genes que codifican para las diferentes metaloproteinasas regulan la acción de la MEC y esta influye en la formación de las placas de ateroma, inclusive se conoce que algunas MMPs tienen una mayor actividad en ciertas regiones de las placas, contribuyendo a la ruptura de las mismas. Se ha reportado que algunos polimorfismos ubicados en los genes que codifican para las MMPs están relacionados con estas enfermedades entre ellos están: -1306 C/T MMP-2; -181 A/G MMP-7; -1562 C/ T MMP-9. En MMP-14 aún no se ha estudiado si la presencia de algún polimorfismo influye en la expresión de la misma, sin embargo, se ha estudiado el factor de transcripción SAF-1 y se ha detectado que cuando este se sobreexpresa actúa directamente en la región promotora del *gen MMP-14* aumentando considerablemente su expresión (Pérez-Hernández et al, 2013, pp. 655-664).

La expresión del gen y la actividad enzimática son directamente proporcionales por lo que MMP-14 puede participar más activamente en los procesos fisiológicos, además de activar otras enzimas como la MMP-2 que también está involucrada en la aterosclerosis. Estas evidencias resaltan la importancia de estudiar los polimorfismos ubicados en la región promotora del gen para verificar cómo influyen estos en la expresión de MMP-14 (Pérez-Hernández et al, 2013, pp. 655-664).

2.8.4 Polimorfismos en MMP-14 y su relación con EPOC

Ciertos polimorfismos en el *gen MMP-14* se han relacionado con la EPOC principalmente los que se encuentran en la región promotora. Se ha demostrado que el polimorfismo -165 G/T ubicado en el *gen MMP-14* influye de una manera muy relevante en el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Las variaciones en los niveles de expresión que provoca la presencia de este polimorfismo desencadenan una serie de cambios que aceleran la degradación de la matriz de las células pulmonares (Saitoh et al., 2005, pp. 621-626). El proceso de degradación de la MEC, favorece al desarrollo de esta patología.

3. Diseño del plan experimental

El diseño experimental de la presente investigación se puede observar en la figura 10.

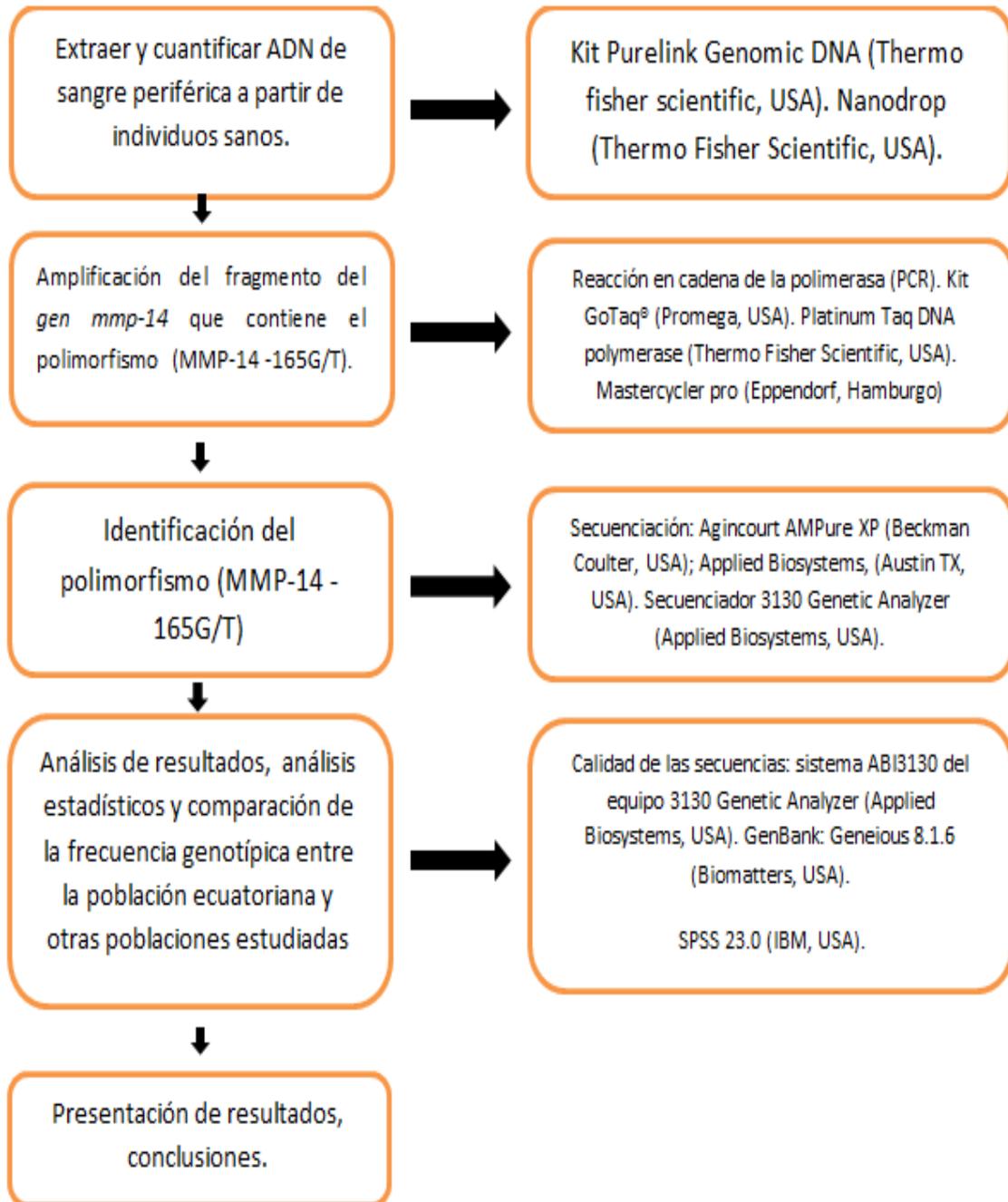


Figura 10. Esquema del diseño experimental

4. Procedimiento

4.1 Recolección de las muestras

Se recopilaron 103 muestras de ADN extraídos a partir de sangre periférica de individuos que no presentan ninguna patología. Todos los individuos que donaron sangre para el estudio, firmaron un consentimiento informado, el cual fue previamente aprobado por el comité de bioética de la “Universidad de las Américas” UDLA. Las muestras se eligieron en base a los criterios de exclusión e inclusión que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2.

Criterios de exclusión e inclusión para la selección de las muestras.

CRITERIOS	Muestras
Inclusión	Individuos no diagnosticados con alguna patología (enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades pulmonares crónicas)
	Consentimiento informado por escrito para participar en el proyecto por parte del individuo o su representante legal.
	Acceso a los datos clínico-patológicos de los individuos.
Exclusión	Individuos diagnosticados con alguna patología (enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades pulmonares crónicas)

4.2 Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica

Para la extracción de ADN a partir de sangre periférica se usó el kit *Purelink Genomic DNA (Thermo fisher scientific, USA)* y se siguió el protocolo descrito por el kit.

Inicialmente, se precalentó el termobloque a 55 °C. Se colocaron 200 µL de la muestra de sangre en un tubo eppendorf de 1,5 mL estéril. Se añadieron 20 µL de proteinasa K y 20 µL de ARNasa A, se mezcló rápidamente por vórtex y se incubó durante 2 min a 24 °C (temperatura ambiente). Posteriormente, se adicionaron 200 µL de *PureLink Genomic Lysis / Binding Buffer* y se homogenizó mediante el uso de vórtex. Seguido a esto, se incubó a 55 °C durante 10 min con el objetivo de promover la digestión proteolítica.

Al lisado resultante se añadieron 200 µL de etanol al 100 % y se mezcló por vórtex durante 5 segundos. Después se colocó una columna dentro de un tubo de recolección y se añadieron aproximadamente 640 µL del lisado. Se centrifugó a 10000 x g durante 1 min a 24 °C (temperatura ambiente) y se descartó el tubo de colección con el eluato. La columna se colocó en un nuevo tubo de recolección.

Se continuó con los lavados, añadiendo 500 µL de tampón de lavado 1 en la columna y se centrifugó a 10000 x g durante 1 min a 24 °C (temperatura ambiente). Se desechó el tubo de colección y se colocó la columna en uno nuevo. Se prosiguió con el segundo lavado añadiendo 500 µL de tampón de lavado 2 y se centrifugó a 21130 x g (velocidad máxima) por 3 min, a 24 °C (temperatura ambiente). Se descartó el tubo de colección con el eluato.

A continuación se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL y se añadieron 30 µL de buffer de elución. Se incubó por 1 min a 24 °C (temperatura ambiente), transcurrido este tiempo se centrifugó a 21130 x g (velocidad máxima) durante 1 min. Finalmente el ADN se obtuvo en un tubo eppendorf de 1,5 mL.

4.3 Cuantificación de ADN genómico

Las muestras de ADN obtenidas fueron analizadas mediante el equipo *Nanodrop 2000 UV-VIS spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, USA). Se midió la concentración de las muestras y la calidad de cada una. Para lo cual se usó 2 μ L de ADN y una longitud de onda de 260 nm.

Se analizaron los ratios 260/280 nm para verificar la pureza del ADN obtenido. Cuando la muestra daba un valor entre 1,8-2 se concluía que el ADN tenía una buena pureza, es decir, no había presencia de proteínas u otros contaminantes que tienen una absorbancia cercana a los 280 nm. También se evaluó los ratios 260/230 como una medida secundaria de la pureza del ADN obtenido. Cuando la muestra daba un valor entre 2,0-2,2 indicaba que no había presencia de solventes orgánicos u otros contaminantes que absorben a 230 nm.

4.4 Determinación genotípica

4.4.1 Amplificación del fragmento del *gen mmp-14* que contiene el polimorfismo rs1003349 (MMP-14 -165G/T)

4.4.1.1 Diseño y análisis de cebadores

El diseño de los cebadores que se empleó para el análisis y detección del polimorfismo rs1003349 (MMP-14 -165G/T) por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó con el programa *Primer Blast*. Se fijó como criterio de diseño: cebadores que se encuentren entre -150 pb y +159 pb de la posición del polimorfismo dentro de la región promotora gen. Los cebadores seleccionados y utilizados en el proyecto se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.

Cebadores utilizados para la amplificación de un fragmento del gen MMP14 que contiene el polimorfismo rs1003349 (MMP14 -165G/T).

CEBADOR	secuencia 5'-3'	Tamaño	Inicio	Fin	Tamaño amplicón
Cebador MMP14 F1 / rs1003349-F	AGAATATGCTT ATAGGGACAAA GTC	25 pb.	4772	4796	310 pb.
Cebador MMP14 R1 / rs1003349-R	TCTTCTGCTTA GTCGGCG	18 pb.	5081	5064	310 pb.

4.4.1.2 Optimización de las condiciones para la PCR

Para la optimización de la PCR se realizaron gradientes para todos los componentes de la reacción. Adicionalmente, se realizó un ensayo de adyuvantes, un gradiente de temperatura y una prueba de sensibilidad para la reacción de PCR estandarizada. El volumen final de reacción se ajustó a 20 μ L. Las concentraciones y volúmenes finales de los reactivos de la PCR optimizada se muestran en la tabla 4 y las condiciones finales de amplificación en la tabla 5.

Tabla 4.

Concentraciones y volúmenes finales de reactivos para la amplificación por PCR del fragmento del gen MMP14 para la detección del polimorfismo rs1003349 (MMP14 -165G/T), para muestras de ADN extraído a partir de sangre periférica.

REACTIVOS	Ci	Cf	V(1x)
Agua			13,46 μ L
Buffer	10x	1x	2 μ L
MgCl₂	50 mM	2 mM	0,8 μ L
dNTPs	20 mM	0,2 mM	0,2 μ L
Primer Forward	10 μ M	0,2 μ M	0,4 μ L
Primer Reverse	10 μ M	0,2 μ M	0,4 μ L
Taq Platinum	5 u/ μ L	0,06 u/ μ L	0,24 μ L
DMSO	100 %	2,5 %	0,5 μ L
ADN		20 ng/ μ L	2 μ L
Volumen total			20 μ L

Tabla 5.

Condiciones de amplificación del fragmento del gen MMP14 para la detección del polimorfismo rs1003349 (MMP14 -165G/T), para muestras de ADN extraído a partir de sangre periférica.

PASOS	CICLOS	TIEMPO	TEMPERATURA
Desnaturalización Inicial	1	4 min	94°C
Desnaturalización	30	1 min	94°C
Hibridación	30	1 min	56°C
Elongación	30	1 min	72°C
Elongación final	1	7 min	72°C

4.4.1.3 Comprobación de la presencia del amplicón de interés

Para comprobar la presencia del amplicón de 310 pb del fragmento del *gen MMP-14* para la detección del polimorfismo rs1003349 (MMP14 -165 G/T) se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 %. Se pesó 1 g de agarosa y se colocó en 50 mL de TBE frío. Mediante la plancha de agitación y calentamiento se hirvió la solución. Se esperó aproximadamente 15 min hasta que la solución se enfrió. Trascorrido este tiempo, se colocaron 2 μ L de *Syber Safe* y se mezcló con la ayuda de un agitador magnético. Inmediatamente y evitando que solidifique la solución se dispensó en un molde y se dejó reposar por 20 min.

Cuando el gel se solidificó se colocó en la cámara de electroforesis y se aplicaron en cada pocillo 5 μ L del producto de PCR con 1 μ L de Tampón de Carga. Como marcador de peso molecular se emplearon 5 μ L de ADN Ladder de 100 pb (*Thermo fisher scientific, USA*). Se dejó correr el gel durante 40 min a 100 V.

Para visualizar y analizar los resultados de la electroforesis se empleó el equipo *ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, USA)*.

4.5 Purificación del producto de la PCR mediante CLEANSEQ y secuenciación de ADN tipo Sanger.

La secuenciación tipo Sanger es un método enzimático que se basa en el uso de dideoxinucleótidos (ddNTPs) los cuales interrumpen la síntesis de la cadena de ADN. Estos están marcados por isótopos radioactivos o con un fluoróforo diferente para cada ddNTPs. La región de interés se amplifica por PCR mediante el uso de cebadores específicos. Cada ciclo de amplificación aumenta en forma exponencial la cantidad de fragmentos sintetizados, todos marcados con moléculas fluorescentes, las mismas que generan una luz de

distinto color dependiendo del ddNTP terminal que se haya añadido. Posteriormente, se lleva a cabo la separación de los fragmentos por medio de una electroforesis capilar. Cuando llegan al final del capilar los fragmentos de diferentes tamaños, son excitados mediante un láser para detectar la fluorescencia. Estos fragmentos emiten luz a diferentes longitudes de onda y en base al color que genera el sistema se puede determinar cuál es el nucleótido presente. Finalmente, se tiene un electroferograma en el cual se pueden observar varios picos con colores diferentes que representan cada nucleótido en la secuencia de ADN (Greif, 2012, pp. 3-6).

Tras la obtención del producto de PCR, los amplicones se purificaron mediante el uso del kit *Agencourt® CleanSeq® Dye-Terminator Removal* (Beckman Coulter, USA). Este método consiste en la inmovilización reversible de los fragmentos de ADN en una fase sólida, los amplicones obtenidos se adhirieron a unas perlas magnéticas, facilitando su separación de otros componentes de la PCR.

Para iniciar se equilibró el compuesto *Agencourt CleanSeq®* (Beckman Coulter, USA), a 24 °C (temperatura ambiente) y se agitó durante 3 min en vórtex para conseguir una buena homogenización. A continuación se añadieron 16,2 µL de etanol al 85 % y 2 µL del compuesto *Agencourt CleanSeq®* por cada 6 µL del producto de PCR. Se realizó un vórtex brevemente y se realizó una incubación durante 3 min a 24 °C (temperatura ambiente) en la placa magnética, al culminar este tiempo se observó un anillo y el líquido se mostraba totalmente claro. Posteriormente, se desechó el líquido con cuidado de no tocar el anillo formado. A continuación, se colocaron 100 µL de etanol al 85 % a cada muestra y se incubó por 30 s, al terminar tiempo se desechó el etanol por medio de la inversión de la placa magnética sobre el papel absorbente, sin retirar los tubos de la placa. Se realizó nuevamente el lavado con Etanol al 85 %. Seguidamente, se sometió a la placa magnética a una

incubación de 15 min a 37 °C para eliminar cualquier residuo de etanol. Finalizada la incubación los tubos fueron retirados de la placa magnética y se añadieron 20 µL de Agua Milli-Q y se homogenizó por vórtex durante 1 min. Se ubicaron los tubos nuevamente en la placa magnética y se incubaron durante 30 s a 24 °C (temperatura ambiente). Tras este tiempo, se obtuvo un líquido transparente en el que se encontraban los fragmentos de ADN purificados. Por último, el líquido de cada tubo fue colocado en la placa del secuenciador *Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA)*.

Para el análisis genotípico de cada muestra se utilizó el software Geneious 8.1.6 (*Biomatters, USA*).

4.6 Análisis estadístico

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo -165 G/T. Se analizó el principio de Hardy-Weinberg para determinar si la población se encontraba genéticamente en equilibrio. Para este análisis se usó la hoja de cálculo de Microsoft Excel y se comprobó mediante el software que ofrece OEGE (*Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies Hardy-Weinberg equilibrium calculator including analysis for ascertainment bias*).

5. Resultados y Discusión

Entre las enfermedades que más muertes causan en el mundo se encuentran la cardiopatía isquémica, el cáncer y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Estudios previos han establecido una asociación entre la expresión del *gen MMP-14* y el desarrollo de estos trastornos. Las técnicas actuales de diagnóstico no son lo suficientemente sensibles y específicas lo que dificulta su detección temprana. Como consecuencia, la tasa de mortalidad

sigue aumentando por lo que constituyen un problema de salud, tanto en los países desarrollados como en aquellos en vía de desarrollo.

El presente estudio se centró en la identificación del polimorfismo -165 G/T en el *gen MMP-14*, con el objetivo de determinar la frecuencia genotípica del mismo en la población ecuatoriana, y compararla con las que presentan otras poblaciones que han sido estudiadas. El estudio sienta las bases para futuras investigaciones orientadas a estudiar la relación entre la presencia de este polimorfismo y el riesgo para desarrollar las patologías previamente mencionadas. A continuación se presentan los resultados obtenidos en el estudio y se discuten sus implicaciones.

Las muestras de ADN se obtuvieron a partir de sangre periférica de individuos sanos. El ADN tuvo una buena concentración y pureza, lo cual fue posible verificar mediante el uso del equipo Nanodrop 2000 UV-VIS *spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, USA). Se analizaron los ratios 260/280 nm, los ratios obtenidos para las muestras se encontraba entre 1,8-2, lo cual indicaba que no existían proteínas en la muestras. Asimismo, al analizar los ratios 260/230 nm se obtuvieron valores entre 2,0-2,2 lo cual permitió verificar que no había rastros de solventes orgánicos. Estos factores son muy importantes ya que estudios previos han demostrado que la cantidad y calidad del ADN molde son primordiales para conseguir una buena amplificación por PCR.

Qamar y colaboradores explican que, las impurezas como: residuos de etanol, dodecilsulfato sódico (SDS), proteínas o ARN influyen en la calidad del ADN extraído y, constituyen un gran problema porque pueden ocasionar que la actividad de la polimerasa se inhiba completamente, por lo que la amplificación por PCR no sería posible (Surzycki, 2000).

El proceso de extracción de ADN es una etapa fundamental en varios estudios clínicos que incluyen el análisis de polimorfismos, huellas dactilares de ADN y secuenciación de genes.

5.1 Optimización de la PCR para el fragmento del *gen MMP-14* que contiene el polimorfismo -165 G/T.

5.1.1 Verificación de cebadores reconstituidos

Para la optimización de la PCR se tomó en cuenta la concentración de los reactivos y las condiciones de amplificación. Se resuspendió los cebadores en un volumen adecuado para llegar a una concentración final de 100 μ M, para el cebador Forward se usó un volumen de 1,431 mL y para el cebador Reverse se usó un volumen de 1,573 mL. En la figura 11 se puede observar que la integridad y pureza de los cebadores fue adecuada ya que se puede ver la presencia de una sola banda con una buena intensidad. Sin embargo, se observa una clara diferencia en la concentración entre el cebador forward (Figura 11, carril 4) y el cebador reverse (Figura 11, carril 3).

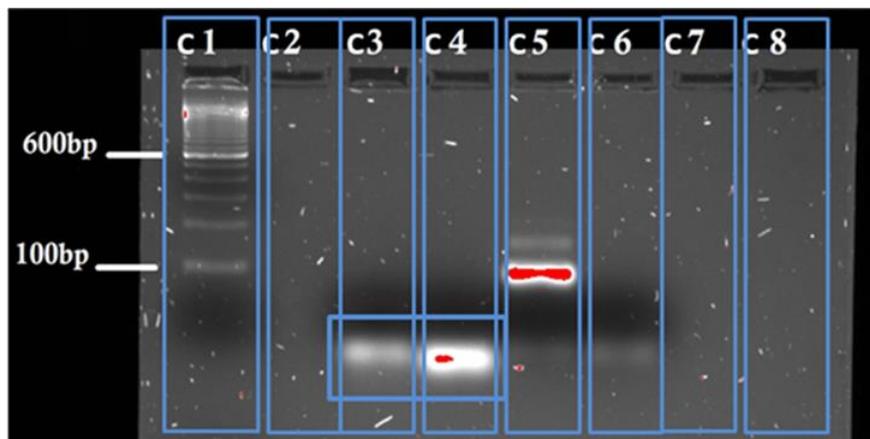


Figura 11. Electroforesis de cebadores MMP-14 P-F, MMP-14 P-R.

Ensayo realizado en un gel de agarosa al 4% teñido con SYBER safe, para la comprobación de la calidad y concentración de los cebadores. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb, Carril 2: vacío, Carril 3: cebador MMP-14 P-R, Carril 4: cebador MMP-14 P-F, Carril 5: cebador MMP-8 P-F, Carril 6: cebador MMP-8 P-R.

Con el objetivo de corroborar el resultado anterior, se realizaron diluciones seriadas de un cebador de concentración conocida (100 μM , 75 μM , 50 μM , 25 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1 μM) además se usó SYBR Gold para teñir el gel y obtener una tinción fluorescente más sensible, ya que se sabe que este reactivo aumenta la fluorescencia al unirse a los ácidos nucleicos, (Figura 12). Se realizó un análisis cuantitativo de los picos de absorbancia de cada una de las diluciones del cebador; empleando el software del equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, USA), (Figura 13). De esta manera determinó que, efectivamente, el cebador forward se encontraba más concentrado que el cebador reverse (Figura 12 y 13), específicamente, el cebador reverse se encontraba a una concentración de 70 μM y el cebador forward tenía una concentración de 120 μM . De esta manera fue posible ajustar la concentración de los cebadores en la reacción de PCR, partiendo de una concentración de 10 μM y llevándola a la concentración usada en la PCR que se detalla en la tabla 4, ya que como menciona (Sint, Raso, & Traugott, 2012, pp. 898–905) la concentración de los cebadores debe ser equilibrada, para que se incremente la capacidad de detección del sistema de PCR y permita que la amplificación de todos los fragmentos de ADN sea uniforme.

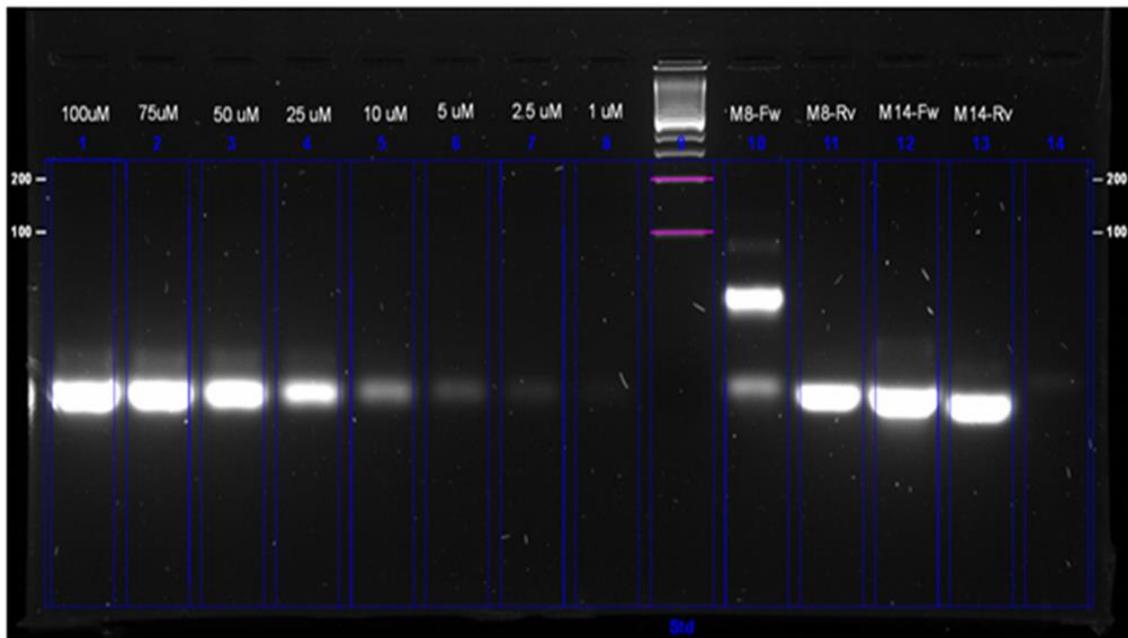


Figura 12. Electroforesis para la comprobación de la concentración de los cebadores MMP-14 P-F, MMP-14 P-R

Ensayo realizado en un gel de agarosa al 4% teñido con SYBER Gold. Carril 1: Patrón de 100 μM , Carril 2: Patrón de 75 μM , Carril 3: Patrón de 50 μM , Carril 4: Patrón de 25 μM , Carril 5: Patrón de 10 μM , Carril 6: Patrón de 5 μM , Carril 7: Patrón de 2.5 μM , Carril 8: Patrón de 1 μM , Carril 9: Marcador de Peso molecular, Carril 10: cebador forward para MMP-8, Carril 11: cebador reverse para MMP-8, Carril 12: cebador forward para MMP-14, Carril 13: cebador reverse para MMP-14

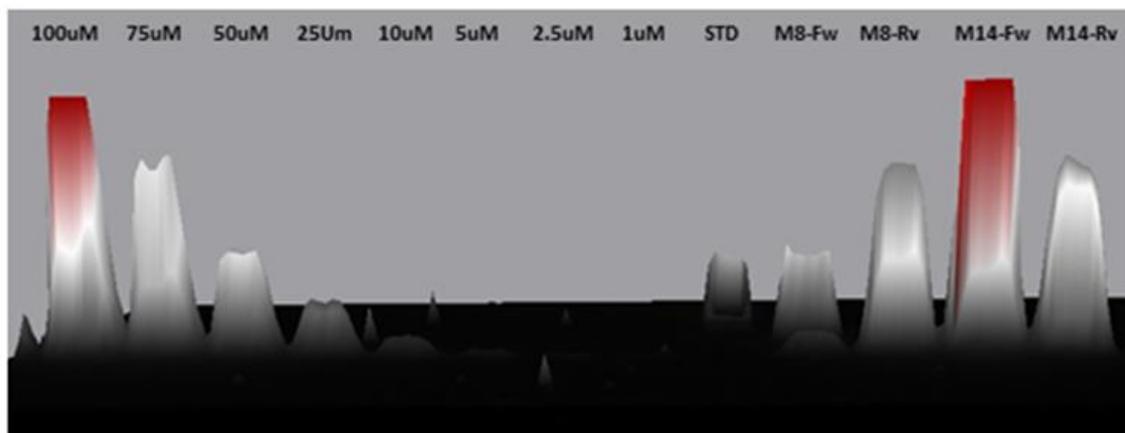


Figura 13. Picos de absorbancia de los cebadores MMP14 P-F, MMP14 P-R

Ensayo realizado mediante el uso del software del equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, USA). Carril 1: Patrón de 100 μM , Carril 2: Patrón de 75 μM , Carril 3: Patrón de 50 μM , Carril 4: Patrón de 25 μM , Carril 5: Patrón de 10 μM , Carril 6: Patrón de 5 μM , Carril 7: Patrón de 2.5 μM , Carril 8: Patrón de 1 μM , Carril 9: Marcador de Peso, Carril 10: cebador forward para MMP-8, Carril 11: cebador reverse para MMP-8, Carril 12: cebador forward para MMP-14, Carril 13: cebador reverse para MMP-14

5.1.2 Optimización de la temperatura de hibridación del sistema de PCR

Se realizó una PCR con las concentraciones que se muestran en la tabla 6 y las condiciones de la tabla 5. Se realizó un gradiente de temperatura de hibridación, para lo cual se analizaron previamente las temperaturas de melting (T_m) de cada cebador. El ADN de los individuos se diluyó a una concentración final de 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y se añadieron a la reacción 5 μL (100 ng totales). El gradiente de temperatura fue: 48 $^{\circ}\text{C}$, 50 $^{\circ}\text{C}$, 52 $^{\circ}\text{C}$, 54 $^{\circ}\text{C}$, 56 $^{\circ}\text{C}$, y cada temperatura se ensayó por duplicado. En la figura 14 se puede apreciar que la temperatura óptima fue de 56 $^{\circ}\text{C}$. La cual permite observar amplicones de mejor intensidad y el resultado es repetible entre los duplicados.

Esto coincide con lo reportado por varios autores que mencionan que la temperatura óptima de hibridación oscila entre los 45 y 65 $^{\circ}\text{C}$ (Castro, Reacción en cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR), s.f).

En la figura 14 se observa que el tamaño del amplicón obtenido corresponde con el tamaño esperado es decir 310 pb.

Tabla 6.

Concentraciones y volúmenes finales de reactivos en la PCR para la amplificación del fragmento del gen MMP14 que contiene el polimorfismo rs1003349 (MMP14 -165G/T).

Reactivos	Ci	Cf	V(1x)
Agua			10,96 μ L
Buffer	10 x	1 x	2 μ L
MgCl₂	50 mM	2 mM	0,8 μ L
dNTPs	20 mM	0,2 mM	0,2 μ L
Primer Forward	10 μ M	0,2 μ M	0,4 μ L
Primer Reverse	10 μ M	0,2 μ M	0,4 μ L
Taq Platinum	5 u/ μ L	0,06 μ M	0,24 μ L
ADN		20 ng/ μ L	5 μ L
Volumen Total			20 μ L

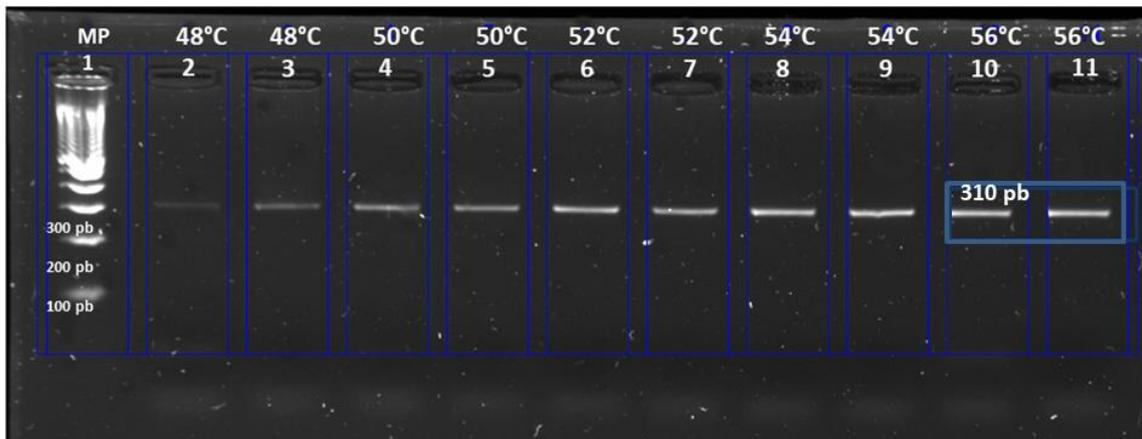


Figura 14. Electroforesis de un gradiente de temperaturas

Ensayo realizado para la amplificación del fragmento del gen MMP14 que contiene el polimorfismo rs1003349 (MMP14 -165G/T), en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb, Carril 2 y Carril 3: temperatura de 48°C, Carril 4 y Carril 5: temperatura de 50°C, Carril 6 y Carril 7: temperatura de 52°C, Carril 8 y Carril 9: temperatura de 54°C, Carril 10 y Carril 11: temperatura de 56°C.

5.1.3 Ensayo de adyuvantes para el sistema de PCR

Para incrementar la especificidad y fidelidad de la PCR se realizó un ensayo con dos adyuvantes: glicerol (5 %) y dimetilsulfóxido (DMSO 2,5 %). Al usar glicerol las bandas fueron muy tenues, lo que indica un efecto de inhibición de la reacción, (figura 15). Este efecto se observa a pesar de que en otros estudios se usa al glicerol como un reactivo estabilizador de la Taq-polimerasa. No obstante, en el estudio realizado por Pulido y colaboradores, concluyeron que, el uso de glicerol disminuyó la sensibilidad del sistema de PCR, actuando como un agente inhibidor, especialmente cuando se emplean bajas concentraciones de ADN (Pulido, Mogollón, Morales, & Rincón, 2006).

En las reacciones a las que se les añadió DMSO se aprecian amplicones más claros y con una mejor concentración, por lo que se concluye que el uso de este adyuvante favorece la reacción de PCR (figura 15). Mas y colaboradores en su estudio destacan que el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) incrementa la sensibilidad y fidelidad del sistema de PCR pues este adyuvante contribuye a la

disminución de la estructura secundaria del ADN (Mas et al., 2001) haciendo más accesible el ADN molde.

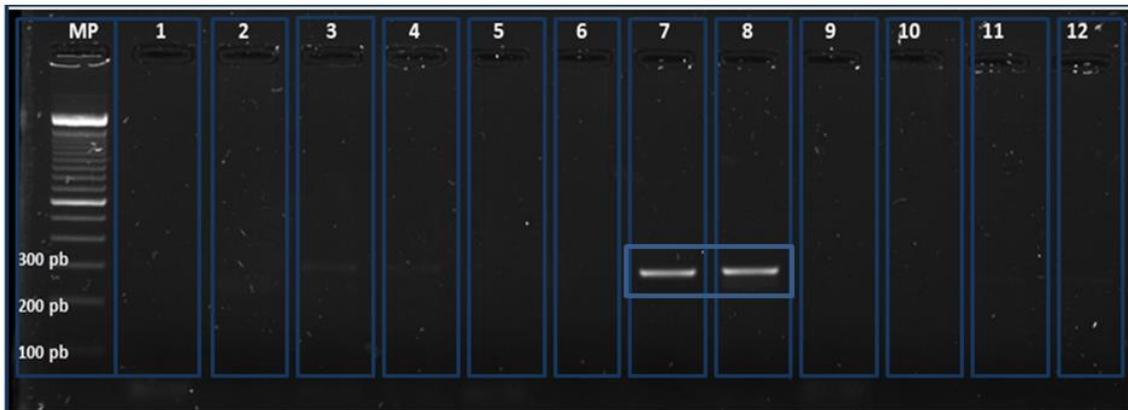


Figura 15. Electroforesis del ensayo de adyuvantes (DMSO y glicerol)

Ensayo realizado para la amplificación del fragmento del gen MMP14 que contiene el polimorfismo rs1003349 (MMP14 -165G/T), en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe. MP: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 1: Control negativo, Carril 2: vacío, Carril 3 y Carril 4: sin adyuvantes, Carril 5: Control Negativo, Carril 6: vacío, Carril 7 y Carril 8: muestras con DMSO al 2,5%, Carril 9: Control negativo, Carril 10: vacío, Carril 11 y Carril 12: muestras con glicerol al 5%.

5.1.4 Optimización del volumen final de reacción

Se ajustó el volumen final de la reacción de PCR a 20 μ L, suficiente para la posterior secuenciación de los amplicones obtenidos (figura 16).

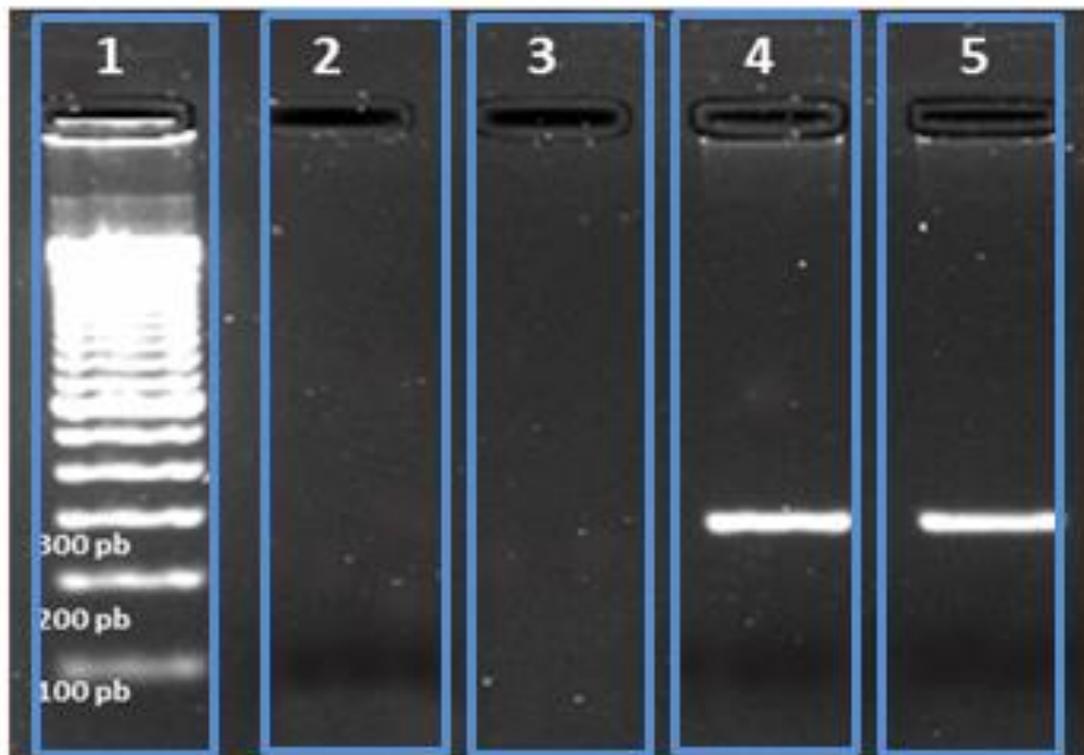


Figura 16. Electroforesis de la optimización del volumen final de reacción

Ensayo para la amplificación del fragmento de 310 pb del gen MMP14 que contiene el polimorfismo rs1003349 (MMP14 -165G/T), en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb, Carril 2: control negativo, Carril 3: vacío Carril 4 y Carril 5: amplicones de la reacción de PCR estandarizada para un volumen de 20 μ L

5.1.5 Análisis de sensibilidad analítica del sistema de PCR

Se realizaron diluciones seriadas 1:10 del ADN, con el fin de conocer cuál es la cantidad mínima de ADN que se necesita para obtener un buen amplicón en el sistema de PCR. Este ensayo es fundamental cuando se está estandarizando una PCR, ya que como menciona (Reyes et al., 2015, pp. 67-74) la sensibilidad del sistema puede cambiar en dependencia de los protocolos que se usen. Se ensayaron concentraciones desde, 20 ng/ μ L hasta los 0,0002 ng/ μ L. Se determinó que el sistema de PCR establecido para la amplificación del fragmento de 310 pb del *gen MMP-14* tiene una sensibilidad analítica que permite amplificar hasta 2 ng/ μ L de ADN. A esta concentración se observó una banda tenue, no obstante, para observar un amplicón óptimo la concentración mínima del ADN debe ser de 20 ng/ μ L, (Figura 17).

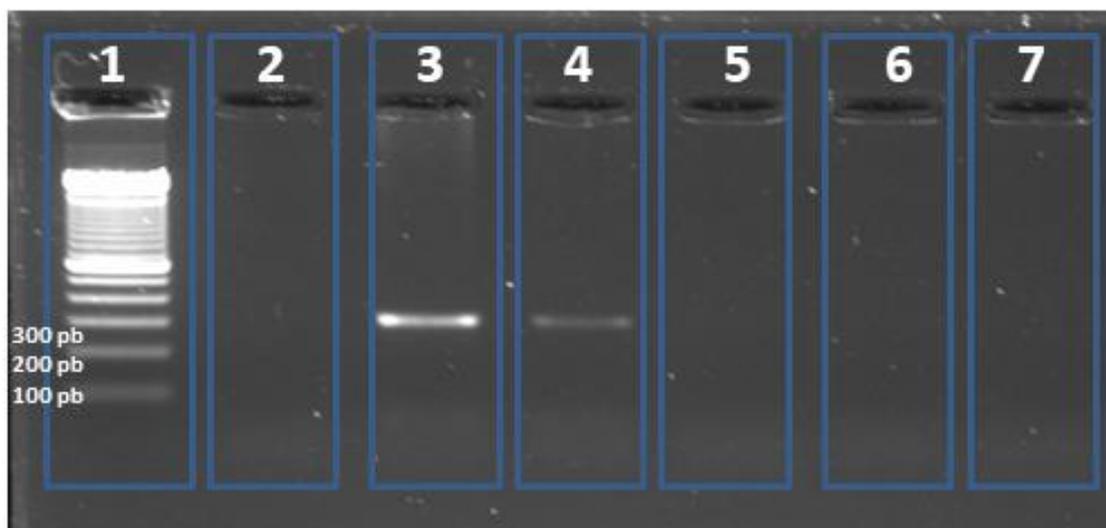


Figura 17. Electroforesis del ensayo de la sensibilidad analítica del sistema de PCR.

Ensayo realizado para la amplificación del fragmento del gen *MMP14* que contiene el polimorfismo rs1003349 (*MMP14* -165G/T), empleando diluciones seriadas de ADN, se usó un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb, Carril 2: vacío, Carril 3: Dilución para 20 ng/μL, Carril 4: Dilución 1/10 (2 ng/μL), Carril 5: Dilución 1/100 (0,02 ng/μL), Carril 6: Dilución 1/1000 (0,002 ng/μL), Carril 7: Dilución 1/10000 (0.0002 ng/μL).

5.1.6 Amplificación del fragmento del *gen MMP14* para la detección del polimorfismo rs1003349 (*MMP14* -165G/T) en las muestras.

Las concentraciones, volúmenes finales de los reactivos y condiciones de amplificación empleadas en el termociclador, se encuentran detalladas en las tablas 4 y 5 en el capítulo de Procedimiento.

El amplicón obtenido reúne las condiciones óptimas para ser empleado posteriormente en la reacción de secuenciación (Figura 18).

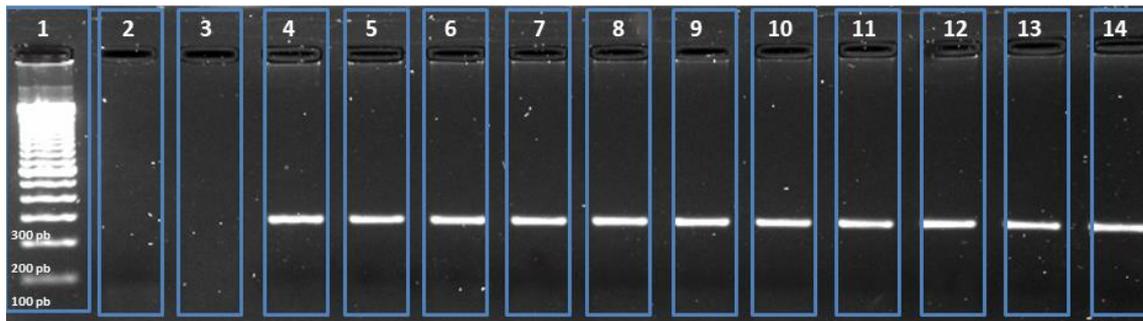


Figura 18. Electroforesis de la reacción de PCR optimizada

Ensayo realizado para la amplificación del segmento génico que incluye el polimorfismo -165 G/T (rs1003349) en el promotor del gen MMP-14, en gel de agarosa al 2%. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb, Carril 2: control negativo, Carril 3: vacío, Carril 4: muestra BSU-055, Carril 5: muestra BSU-074, Carril 6: muestra BSU-075, Carril 7: muestra BSU-045, Carril 8: muestra BSU-058, Carril 9: muestra BSU-076, Carril 10: muestra BSU-065, Carril 11: muestra BSU-068, Carril 12: muestra BSU-063, Carril 13: muestra BSU-067, Carril 14: muestra BSU-072

5.2 Identificación de genotipos por secuenciación tipo Sanger.

Se amplificaron 103 muestras de ADN genómico obtenidas a partir de sangre periférica de individuos sanos (controles). Los amplicones obtenidos se secuenciaron empleando el método de secuenciación tipo Sanger (Greif, 2012, pp. 3-6), este protocolo fue adaptado por los investigadores del Laboratorio de Investigación de la Universidad de las Américas. La secuenciación tipo Sanger es muy recomendada en este tipo de ensayos especialmente para la detección de alteraciones en el genéticas, Bansal y colaboradores usaron este método para confirmar la presencia de nuevos SNP (Bansal et al., 2010, pp. 537-545).

Una vez obtenidas las secuencias se realizó un alineamiento con el uso de la herramienta BLAST del NCBI con el objetivo de comprobar que correspondían al fragmento esperado del *gen MMP-14*. Como se muestra en la figura 19, la secuencia obtenida corresponde con un 100 % de homología al fragmento esperado del *gen MMP-14*.

Con los electroferogramas resultantes de la secuenciación de los amplicones se pudo observar la presencia de las diferentes variantes polimórficas.

Para identificar el genotipo de cada una de las muestras secuenciadas se realizó un alineamiento múltiple empleando el software Geneious (*Biomatters, USA*). Como se observa en la figura 20, el alineamiento muestra la homología de las secuencias obtenidas con la secuencia consenso para el fragmento amplificado del *gen MMP-14* y permite identificar las diferentes variantes polimórficas para el SNP estudiado.

Homo sapiens matrix metalloproteinase 14 (MMP14), RefSeqGene on chromosome 14
 Sequence ID: [NG_046989.1](#) Length: 18068 Number of Matches: 3

Range 1: 4772 to 5081 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous M](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
560 bits(620)	1e-162	310/310(100%)	0/310(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGAAATATGCTTATAGGGACAAAGTCTCCACATCCCGTCCCTGGATCCCCCTACAGCCC			60
Sbjct 4772	AGAAATATGCTTATAGGGACAAAGTCTCCACATCCCGTCCCTGGATCCCCCTACAGCCC			4831
Query 61	CCTGCTGTCCATCGCGGCCTCAACCCCTGCAGATGGCAGCTGCACCACAAAAAGGCAAC			120
Sbjct 4832	CCTGCTGTCCATCGCGGCCTCAACCCCTGCAGATGGCAGCTGCACCACAAAAAGGCAAC			4891
Query 121	TTAGAGGTGTTTTTTTTTTTTTCCITCCAGTCTTGGTTGTAATTGGATTCAGGCTAAA			180
Sbjct 4892	TTAGAGGTGTTTTTTTTTTTTTCCITCCAGTCTTGGTTGTAATTGGATTCAGGCTAAA			4951
Query 181	ACAACCACGTCCCCAACCCAGGAAAGGAGGGGCACTGGGGCGGGGACGGAGGAGGCTGTG			240
Sbjct 4952	ACAACCACGTCCCCAACCCAGGAAAGGAGGGGCACTGGGGCGGGGACGGAGGAGGCTGTG			5011
Query 241	GGAGAGGGGAGGGACCCAGAGGAGAGAGGAGAGGGGAAACCAGACCCAGTTCGCCGACT			300
Sbjct 5012	GGAGAGGGGAGGGACCCAGAGGAGAGAGGAGAGGGGAAACCAGACCCAGTTCGCCGACT			5071
Query 301	AAGCAGAAGA			310
Sbjct 5072	AAGCAGAAGA			5081

Figura 19. Alineamiento de las secuencias obtenidas

Alineamiento realizado con el uso de la herramienta BLAST del NCBI del fragmento del gen MMP-14 obtenido a partir de la amplificación por PCR empleando cebadores específicos y secuenciando por método de Sanger.

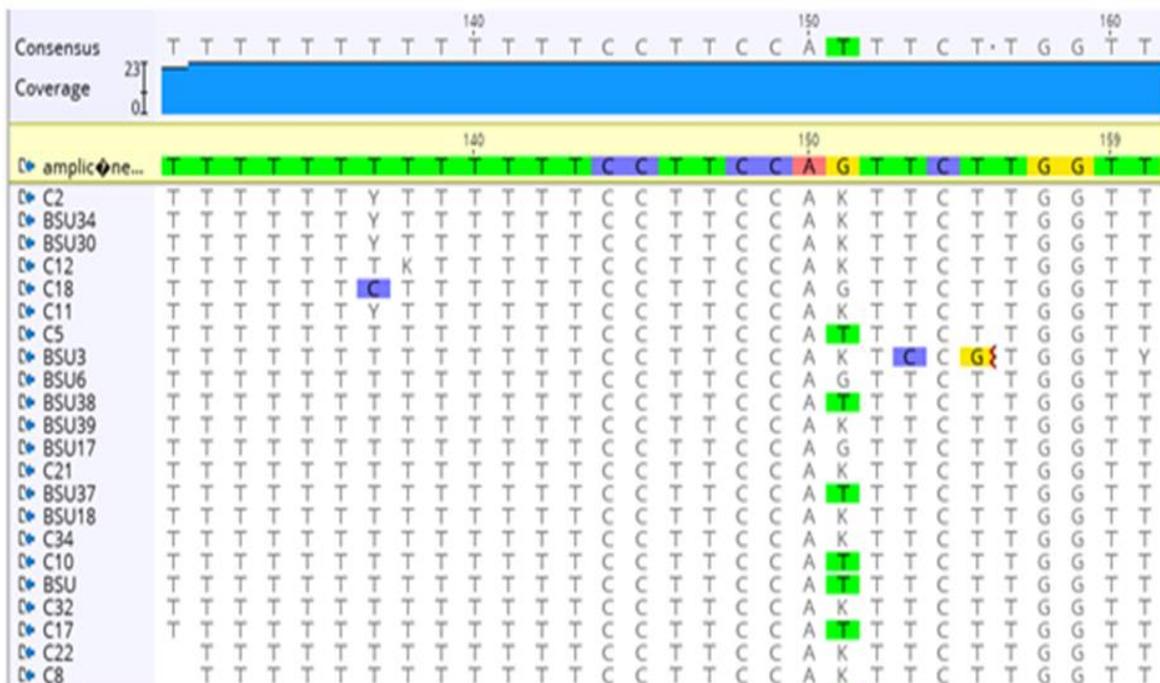


Figura 20. Alineamiento múltiple con el software Geneious,

El alineamiento se realizó entre las secuencias obtenidas y la secuencia consenso reportada, para la identificación de las diferentes variantes polimórficas del SNP estudiado.

A partir de los electroferogramas se pudo determinar el genotipo de cada una de las muestras. Se observó la presencia de los tres genotipos: homocigotos dominantes (T/T), heterocigotos (G/T) y homocigotos recesivos (G/G). En el electroferograma un pico de color amarillo representa una guanina, uno verde representa una timina y cuando se observa la superposición entre un pico verde y uno amarillo indica la presencia del polimorfismo estudiado -165 G/T (rs1003349) (figura 21).

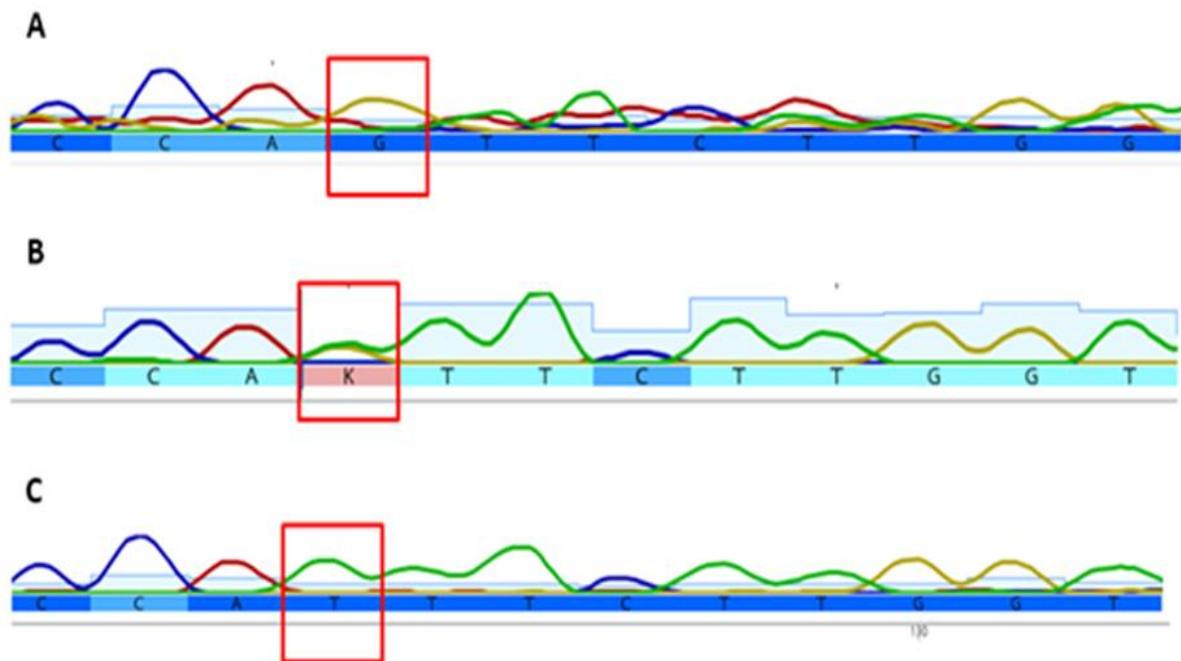


Figura 21. Electroferogramas obtenidos

Electroferogramas correspondientes al fragmento secuenciado que contiene el polimorfismo -165 G/T (rs1003349).

- a) electroferograma de un individuo con genotipo homocigoto (G/G)
- b) electroferograma de un individuo con genotipo heterocigoto (G/T)
- c) electroferograma de un individuo con genotipo homocigoto (T/T)

5.2.1 Análisis de las frecuencias genotípicas

El análisis de las frecuencias genotípicas se llevó a cabo a partir de las 103 muestras secuenciadas. Mediante la lectura de los electroferogramas se pudo determinar que la mayor parte de individuos del grupo estudiado presentan el polimorfismo -165 G/T, con un 58,25 %, seguido por el genotipo (T/T) con un 25,24 %, y finalmente el genotipo (G/G) con un 16,50 %. En la tabla 7 se resumen las frecuencias genotípicas y en la figura 22 se puede apreciar la distribución de los genotipos.

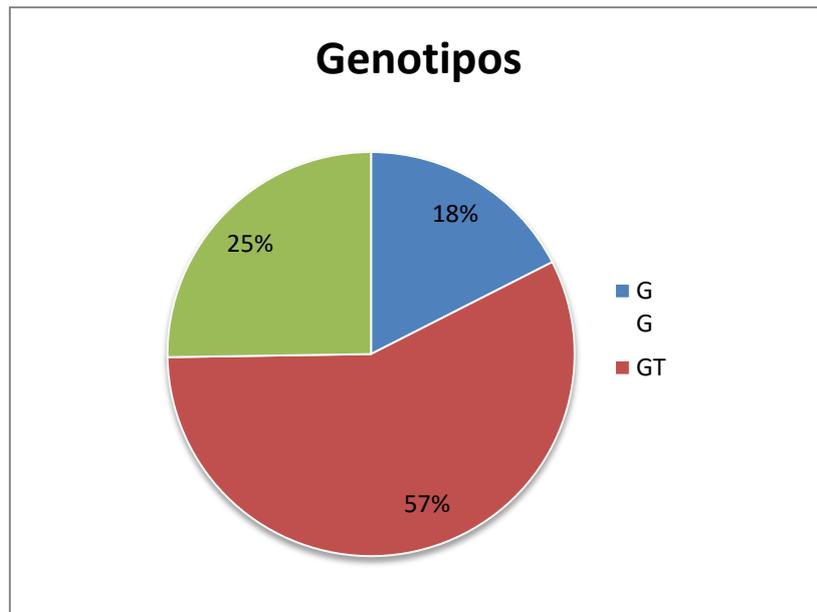


Figura 22. Distribución de los genotipos estudiados.

Tabla 7.

Frecuencias genotípicas de las variantes polimórficas en el grupo de estudio.

SNP	Genotipos	n	Porcentaje
rs1003349	GG	17	16,504
	GT	60	58,252
	TT	26	25,242

Las frecuencias genotípicas determinadas para el polimorfismo -165 G/T (rs1003349) se comportaron de la siguiente manera: para el genotipo G/G 0,165, para el genotipo T/T 0,252 y para el genotipo G/T 0,583. Las frecuencias alélicas calculadas fueron para el alelo G 0,456 y para el alelo T 0,544. Los valores determinados se resumen en la tabla 8.

Tabla 8.

Frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo -165 G/T (rs1003349).

SNP	Genotipos	Frecuencia genotípica	Frecuencia alélica
rs1003349	G/G	0,165	0,456
	G/T	0,583	
	T/T	0,252	0,544

Adicionalmente, se realizó un análisis en base al teorema de Hardy-Weinberg el cual parte de la genética mendeliana para el estudio de poblaciones de individuos diploides. Este teorema postula que las frecuencias alélicas de una población determinada no cambian de generación en generación y que, si las frecuencias de los alelos son (p y q) entonces, la frecuencia genotípica esperada responderá a la ecuación $p^2 + 2pq + q^2$, cuando la población se encuentra en equilibrio. Esto implica que se mantiene la herencia basada en la genética mendeliana. El equilibrio Hardy-Weinberg se mantiene cuando la selección natural, las mutaciones y otros factores como la migración no afectan la genética de una población (Andrews, 2010).

El análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg se llevó a cabo mediante una prueba de X^2 , con 1 grado de libertad y una significancia estadística de 0,05. En la figura 23 se muestran los resultados de la prueba de X^2 , para la cual se obtuvo una $p > 0,05$, lo que indica que la población de estudio se encuentra en equilibrio.

GENOTIPO	ESPERADO	OBSERVADO
Homocigotos comunes	30.45	26
Heterocigotos	51.11	60
Homocigotos raros	21.45	17

$\frac{\text{Observados} - \text{Esperados}^2}{\text{Esperados}}$ (GG)	0,92
$\frac{\text{Observados} - \text{Esperados}^2}{\text{Esperados}}$ (GT)	1,55
$\frac{\text{Observados} - \text{Esperados}^2}{\text{Esperados}}$ (TT)	0,65

RESULTADO

X² = 3.12

(103 muestras contadas)

Figura 23. Prueba de X² para el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Al determinar las frecuencias de una población se puede conocer en qué proporción se encuentra un genotipo o un alelo en un grupo determinado de individuos (Arrunategui, Villegas, & Ocampo, 2013). Según los resultados obtenidos, se muestra que la frecuencia genotípica más alta para el polimorfismo estudiado fue de 58,25 % para el genotipo G/T lo que concuerda con lo reportado en varios estudios previos. En una investigación realizada en Taiwán sobre el papel que tiene el polimorfismo -165 (rs1003349) en el promotor del *gen MMP-14* en el desarrollo de carcinoma hepatocelular, se obtuvieron resultados similares, la mayor frecuencia genotípica correspondió a los individuos G/T con 52,8 % (Chen et al., 2011). De igual manera, en un estudio realizado sobre la relación el polimorfismo mencionado en el promotor del *gen MMP-14* y el desarrollo de EPOC, la mayor frecuencia genotípica correspondió a un 45 % de los individuos con genotipo G/T (Saitoh et al., 2005, pp. 621-626).

No obstante, al analizar las frecuencias genotípicas para el homocigoto silvestre G/G y el homocigoto T/T y compararlas con estudios previos, se puede observar que existe una diferencia notable con las distribuciones genotípicas reportadas en otras poblaciones. En este estudio, el homocigoto raro es el genotipo G/G ya que tiene una frecuencia genotípica de 0,165 y un porcentaje de 16,50 %, y el homocigoto común o silvestre es el genotipo T/T, con una frecuencia genotípica de 0,252 y un porcentaje de 25,24 %. Estos resultados no coinciden con los reportados en varias investigaciones previas. En un estudio realizado en Taiwán, la frecuencia genotípica de G/G se corresponde con el homocigoto silvestre y la frecuencia genotípica de T/T, con el homocigoto raro (Weng, Chen, Lin, Chung, & Yang, 2012). En una investigación realizada en una población asiática, se reportaron los mismos resultados, es decir, el homocigoto raro fue T/T y el homocigoto común G/G (Chen et al., 2011).

Según el valor obtenido para la ley de Hardy-Weinberg la población de estudio se encuentra en equilibrio, sin embargo, teniendo en cuenta las distribuciones genotípicas y alélicas obtenidas cabe la posibilidad de que exista una variación genética.

Varios investigadores han sugerido la necesidad de realizar estudios de este tipo en poblaciones de América Latina, ya que la mayoría de las investigaciones que analizan SNPs en los genes que codifican para las diferentes metaloproteinasas se han realizado en poblaciones asiáticas o caucásicas y se conoce que las variantes polimórficas y sus distribuciones alélicas y genotípicas pueden variar en dependencia del grupo étnico estudiado (Saitoh et al., 2005, pp. 621-626).

La variación genética de una población se puede deber a diferentes causas. Se debe tomar en cuenta que estos cambios genéticos son los que permiten la supervivencia de los individuos pertenecientes a una población específica, además de la influencia que ejerce el medio ambiente donde se desarrolla el individuo. No obstante, estas variaciones pueden ser consideradas tanto una ventaja como una desventaja, dependiendo de la situación.

Existen factores que provocan que la variación genética aumente o se reduzca (Miko & LeJeune, 2014). Los patrones de apareamiento entre los individuos influyen mucho en la variación genética. Normalmente, el apareamiento se da de una manera aleatoria, pero en algunos casos, se da entre individuos que tienen algún tipo de parentesco, es decir, de una manera no aleatoria. Cuando se presenta una situación así, se habla de un cuadro de endogamia, esto sucede cuando dos individuos con genotipos semejantes tienen una alta probabilidad de emparejarse entre ellos. También, se puede presentar el caso de la exogamia, donde se presenta una alta probabilidad de que individuos con un genotipo particular se emparejen (Miko & LeJeune, 2014).

Se conoce que cuando se trata de un cuadro de endogamia las frecuencias genotípicas pueden variar aumentando la frecuencia del homocigoto. Sin embargo, la endogamia no puede alterar las frecuencias alélicas, pues se necesita que otros factores actúen para que estas frecuencias cambien (Escudero, 2014). En este estudio, encontramos variaciones en las frecuencias genotípicas en comparación con otros estudios, sin embargo las frecuencias alélicas coinciden con lo reportado. Tee y colaboradores estudiaron la presencia del polimorfismo -165 (rs1003349) en el *gen MMP-14* y su relación con el desarrollo de cáncer cervical (Tee et al., 2012, pp. 932-938). En su estudio encontraron que la distribución genotípica para la variante G/G es mayor que la frecuencia genotípica para T/T, resultado que difiere al obtenido. Sin embargo, al comparar las frecuencias alélicas los resultados obtenidos en

ambos estudios son similares. Tee y colaboradores reportan una frecuencia para el alelo G de 0,46 y para el alelo T 0,54 lo cual coincide con los resultados de este estudio. De igual manera Saitoh y colaboradores reportan una frecuencia para el alelo T de 0,56 y para el alelo G de 0,44 (Saitoh et al., 2005, pp. 621-626) resultados que se asemejan notablemente a los obtenidos.

Lo datos aportados indican que en la población estudiada se ha dado una posible variación genética en cuanto a las frecuencias genotípicas, pero que a pesar de esto, no se ha producido un cambio en las frecuencias alélicas.

Actualmente, en el país no se han realizado estudios acerca de las distribuciones genotípicas y alélicas para diferentes variantes polimórficas. Sin embargo, en las escasas investigaciones realizadas no se han detectado frecuencias alélicas que no obedezcan a las leyes de la genética mendeliana (Paz-Miño & López, 2014).

Inicialmente, el Ecuador, al igual que muchos países de América Latina se caracterizó por poseer una población genética y fenotípicamente diversa, como consecuencia del entrecruzamiento entre varias etnias. Esto provocó que se produjera un flujo genético alto que resultó en la aparición de nuevas características, que fueron influenciadas por factores ambientales (Paz-Miño & López, 2014).

Nuestro país es reconocido internacionalmente como uno de los países cuya población presenta un alto índice de trastornos genéticos debido a las variantes genéticas generadas. Esta situación se debe a diferentes causas, pero entre las principales se encuentra la consanguinidad, que se refiere a un individuo que comparte un antepasado común con otro, es decir, que descienden de un

mismo ancestro. Por otro lado ha influido el nivel de endogamia. Estos dos factores pueden producir una variación genética en la población, provocando que aumente la homocigocidad (Lardoeyt, Rodríguez, Camacho, & Jijón, 2011).

Los resultados presentados en este estudio y la bibliografía consultada sugieren que los cambios observados en las frecuencias genotípicas podrían deberse al nivel de endogamia y consanguinidad que presenta la población ecuatoriana.

5.3 Relación entre los genotipos encontrados y el desarrollo de enfermedades.

La metaloproteinasa 14 cumple un papel fundamental en la patofisiología de algunas enfermedades, entre ellas, se encuentran las enfermedades que más decesos causan a nivel mundial (cardiovasculares, el cáncer y las pulmonares crónicas). Se ha reportado que en el cáncer de mama y de pulmón, se produce una sobreexpresión de la MMP-14, lo que permite sugerir que la expresión de esta enzima tiene un papel importante en la progresión tumoral (Polette et al., 1996, pp. 29-35). De la misma manera, Pérez y colaboradores mencionan que, la expresión de MMP-14 es elevada en enfermedades cardíacas como la aterosclerosis (Pérez-Hernández et al, 2013, pp. 655-664).

Con este enfoque, resulta significativo estudiar las variaciones genéticas que se pueden presentar en el gen que codifica para MMP-14, ya que la presencia de estas alteraciones en la región promotora influye en la expresión del mismo. En particular, el polimorfismo -165 (rs1003349), ha sido muy estudiado por su posible relación con algunas de las enfermedades descritas previamente.

Tee y colaboradores realizaron un estudio acerca de la presencia del polimorfismo -165 G/T (rs1003349) ubicado en la región promotora del gen *MMP-14* y el desarrollo de cáncer de cuello uterino. En su estudio reportan que, la presencia del genotipo heterocigoto G/T implica una menor probabilidad de desarrollar esa neoplasia, y que los genotipos homocigotos G/G y T/T presentan un mayor riesgo de desarrollar la misma (Tee et al., 2012).

Al comparar estos resultados con los obtenidos se puede apreciar la correspondencia entre ambos estudios, ya que en nuestra población el genotipo encontrado con mayor frecuencia fue el heterocigoto G/T. Estos resultados nos permiten sugerir que este polimorfismo podría tener un papel protector para el desarrollo de estas enfermedades, sin embargo, para corroborar esta hipótesis es necesario comparar las frecuencias genotípicas y alélicas en un grupo de pacientes que presenten estas enfermedades. Además, estudiar cómo influye la presencia de estos genotipos en la expresión del gen, tanto en el grupo de pacientes como en el grupo de individuos sanos.

Saitoh y colaboradores en su estudio realizado en una muestra de la población egipcia, reportaron que la presencia del genotipo T/T presenta una asociación estadísticamente significativa con el desarrollo de EPOC (Saitoh et al., 2005, pp. 621-626). Resultados similares reportaron Chen y colaboradores, quienes en su estudio concluyeron que existe una relación entre la presencia del genotipo T/T y el desarrollo del carcinoma hepatocelular. Por lo tanto este genotipo podría constituir una diana molecular para el diagnóstico de la neoplasia estudiada (Chen et al., 2011).

Es necesario destacar que bajo esta perspectiva, los estudios citados muestran una relación entre la presencia del homocigoto T/T y el desarrollo de varias patologías. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que en estas

investigaciones el homocigoto raro lo constituye el genotipo T/T, lo cual difiere de los hallazgos de nuestra investigación, donde se encontró una menor frecuencia genotípica para el homocigoto G/G por ende, en nuestras condiciones es este el homocigoto raro. Estos resultados, resaltan la necesidad de estudiar los niveles de expresión del *gen MMP-14* para los diferentes genotipos encontrados en nuestra población.

Existen discrepancias en los resultados obtenidos por varios autores que han estudiado previamente el comportamiento de SNPs, en los genes que codifican para las metaloproteinasas.

Krishnaveni y colaboradores realizaron un estudio con el objetivo de corroborar la relación entre el polimorfismo -1562 T/T en el *gen MMP-9* y el desarrollo de cáncer gástrico, ya que este polimorfismo se ha visto relacionado con algunos tipos de cáncer. Estos investigadores realizaron su estudio en una población de la India y concluyeron que en ese grupo el polimorfismo estudiado no tiene una asociación con el desarrollo de cáncer gástrico. Es por esto que, Krishnaveni y colaboradores concluyen que existen diferencias en los resultados dependiendo del grupo étnico que se estudie. Por lo tanto, debemos tener en cuenta que la relación entre las variaciones genéticas y la predisposición para el desarrollo de distintas enfermedades, depende del origen étnico de una población dada y la influencia de los factores ambientales a los que se encuentre expuesta.

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1 Conclusiones

El genotipo heterocigoto G/T fue el más frecuente en la población en estudio, con un 58,25 %.

El homocigoto G/G es el homocigoto raro en la población estudiada con una frecuencia genotípica de 0,165.

Las frecuencias genotípicas reportadas en esta investigación difieren de estudios previos realizados en otras poblaciones.

El genotipo G/T dada su frecuencia en nuestra población podría ejercer un papel protector para el desarrollo de algunas patologías como (enfermedades cardiovasculares, el cáncer y las enfermedades pulmonares crónicas).

6.2 Recomendaciones

Realizar un estudio similar en pacientes con enfermedades relacionadas con el polimorfismo analizado y comparar las frecuencias genotípicas y alélicas.

Estudiar las diferencias de expresión del *gen MMP-14* en dependencia del genotipo

Analizar cómo influye la expresión del *gen MMP-14* en el desarrollo de las diferentes patologías de interés.

Investigar el papel en conjunto de varios polimorfismos en las metaloproteinasas en el riesgo para el desarrollar enfermedades transmisibles y no trasmisibles.

REFERENCIAS

- Andrews, C. (2010). *The Hardy-Weinberg Principle*. University of Chicago. Chicago: *TheNatureEducation*. Recuperado el 15 de noviembre de 2017 de <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-hardy-weinberg-principle-13235724>
- Angosto, M. C., & Alvarez-Gómez, J. A. (2010). Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer (Vol. 76). An. R. Acad. Nac. Farm. Recuperado el 2 de Junio de 2017 de <http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/view/1076/1082>
- Arrunategui, A., Villegas, A., & Ocampo, L. (2013). Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas del sistema HLA clase i y ii en donantes de una población del suroccidente colombiano. Colombia: Scielo. Recuperado el 5 de Noviembre de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/312309433_Frecuencias_alelicas_genotipicas_y_haplotipicas_del_sistema_HLA_clase_I_y_II_en_donantes_de_una_poblacion_del_suroccidente_colombiano
- Bansal, V., Harismendy, O., Tewhey, R., Murray, S., Schork, N., Topol, E., & Frazer, K. (2010). *Accurate detection and genotyping of SNPs utilizing population sequencing data*. California: *Genome Research*. Recuperado el 23 de Octubre de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847757/>
- Boo, J. F. (2010). Aterosclerosis y sus complicaciones. Progresión y Regresión. México: Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Recuperado el 16 de Julio de 2017 de http://www.facmed.unam.mx/sms/temas/2010/05_may_doc_2k10.pdf
- C Li., XP, Jin., M, Zhy., QL, Chen., F, Wang., XF, Hu., WF, Wang., WL, Li., F, Zhu., Z, Zheng. (2014). *Positive association of MMP 14 gene polymorphism with vulnerable carotid plaque formation in a Han Chinese population*. Taizhou: *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory*

- Investigation*. Recuperado el 9 de mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24472034>
- Castro, A. M. (2012). Reacción en cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) . España: Universidad politécnica de Valencia . Recuperado el 16 de Julio de 2017 de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacción%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>
- Chen, T.-Y., Li, Y.-C., Liu, Y.-F., C.-M. T., Hsieh, Y.-H., Lin, C.-W., . . . Weng., C.-J. (2011). *Role of MMP14 Gene Polymorphisms in Susceptibility and Pathological Development to Hepatocellular Carcinoma*. *Chung Shan Medical University*. Taiwan: *Ann Surgery Oncology*. Recuperado el 2 mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21298348>
- Coronato, s., Laguens, g., & Girolamo, v. d. (2012). Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires. Recuperado el 9 de mayo de 2017 de <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v72n6/v72n6a12.pdf>
- Coulter, S. (2012). *Stop Smoking to Prolong Your Life*. Texas: *Texas Heart Institute*. Recuperado de <https://www.texasheart.org/heart-health/womens-heart-health/straight-talk-newsletter/stop-smoking-to-prolong-your-life/>
- Cueva, P. (2015). Cáncer de pulmón. Recuperado el 5 de Mayo de 2017, de <http://www.solcaquito.org.ec/index.php/publicaciones/suplementosmedicos/cancer-de-pulmon>
- Escudero, J. d. (2014). Frecuencias genotípicas con endogamia. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid. Recuperado el 22 de diciembre de 2017 de https://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/joaquina/BOXES_CCAA/FRECUENCIAS_ENDOGAMIA/frecuencias_con_endogamia.htm

- Fernández, & García. (2017). Factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Recuperado el 10 de diciembre de 2017 de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANA%20SOTO%20GARCIA.pdf>
- Fernández-Ortiz, A., Jiménez-Candil, J., Bodí, V., & Barrabés, J. A. (2012). Actualización en cardiopatía isquémica. España : Revista Española de cardiología . Recuperado el 10 de diciembre de 2017 de <http://www.revespcardiol.org/es/actualizacion-cardiopatia-isquemica/articulo/90093459/>
- Ferrera, J. M., & Silva, M. A. (2017). Posibles factores de riesgo cardiovasculares en pacientes con hipertensión arterial en tres barrios de Esmeraldas, Ecuador. Esmeraldas: Scielo. Recuperado el 5 de diciembre de 2017 de <http://scielo.sld.cu/pdf/amc/v21n3/amc070317.pdf>
- Gagliardi, J. A., Charask, A., Perna, E., D'Imperio, H., Bono, J., Castillo, Y., . . . D, C. (2017). Encuesta Nacional de infarto agudo de miocardio con elevación del ST en la República Argentina (ARGENT-IAM-ST). Argentina: Sociedad Argentina de Cardiología (SAC), Federación Argentina de Cardiología (FAC). Recuperado el 30 de octubre de 2017 de <http://www.fac.org.ar/2/revista/17v46n1/originales/01/argen-iam-st.pdf>
- Gialeli, C., Theocharis, A., & Karamanos, N. (2010). *Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. Department of Chemistry, Laboratory of Biochemistry, University of Patras, Greece.* Grecia: *The FEBS Journal*. Recuperado el 4 de mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21087457>
- Greif, G. (2012). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos. Montevideo: Unidad de Biología Molecular. Instituto Pasteur Montevideo. Recuperado el 10 de octubre de 2017 de http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso_tb_mico_bacterias/metodos_de_secuenciacion_de_acidos_nucleicos.pdf

- Guerra, F., Jiménez, G., & Sánchez, M. (s.f). Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Tratamiento de la fase estable. Neumosur. Recuperado el 23 de mayo de <https://www.neumosur.net/files/EB03-25%20EPOC%20estable.pdf>
- Hejmadi, M. (2010). *Introduction to cancer biology*. CSBL. Recuperado el 17 de mayo de 2017 de https://books.google.com.ec/books?id=dLF3UCIWECYC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Hofmann, U. B., Houben, R., Bröcker, E.-B., & Becker, J. C. (2005). *Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion*. Julius-Maximilians-University, Department of Dermatology, Josef-Schneider-Strasse. Würzburg: ELSEVIER. Recuperado el 15 de mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781317>
- Ingvarsen, S., Porse, A., Erpicum, C., Maertens, L., Jürgensen, H. J., Madsen, D. H., . . . Engelholm, L. H. (2013). *Targeting a Single Function of the Multifunctional Matrix Metalloprotease MT1-MMP*. USA: *Journal of biological chemistry*. Recuperado el 24 de Julio de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23413031>
- Kajatt, E. A. (2013). *Lung cancer: a review of current knowledge, diagnostic methods and therapeutic perspectives*. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Lima: Scielo. Recuperado el 4 de Abril de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23612819>
- Kathiresan, S., & Srivastava, D. (2012). *Genetics of Human Cardiovascular Disease*. Massachusetts: *National Institutes of Health*. Recuperado el 6 de Noviembre de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424232>
- Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). *Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor*. Department of Anatomy and Biomedical Sciences Program, University of California. California: *National Public*

- Access. Recuperado el 23 de Julio de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371345>
- Krishnaveni, Bhayal, A. C., Manjari, S., Vidyasagar, Devi, U., Ramanna, . . . Venkateshwari. (2012). *MMP 9 Gene Promoter Polymorphism in Gastric Cancer*. India: Springer. Recuperado el 23 de Julio de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4577507/>
- Kubben, F., Sier, C., Meijer, M., Berg, M. v., Reijden, J. v., Griffioen, G., . . . Verspaget, H. (2006). *Clinical impact of MMP and TIMP gene polymorphisms in gastric cancer*. Leiden: *British Journal of Cancer*. Recuperado el 6 de Mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16940985>
- Lardoeyt, R., Rodriguez, R., Camacho, A., & Jijón, M. (2011). *Consanguinity and family aggregation in persons with intellectual disability in the Republic of Ecuador*. Cuba: *Revista Cubana de Genética Comunitaria*. Recuperado el 20 de Diciembre de 2017 de <http://bvs.sld.cu/revistas/rcgc/v5n2-3/indice.html>
- Lee, Y.-L., Cheng, W.-E., Chen, S.-C., Shih, C.-M., & Chen, W. (2011). *Association of genetic polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)14 to the susceptibility of non-small cell lung cancer*. *School of Medical Laboratory and Biotechnology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan*. Taiwán: *European Respiratory Journal*. Recuperado el 30 de abril de 2017 de http://erj.ersjournals.com/content/38/Suppl_55/p2795?utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=_European_Respiratory_Journal_TrendMD_0
- Malemud. (2006). *Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview*. *Division of Rheumatic Diseases, Department of Medicine, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland, Ohio, USA*. Ohio: *Bioscience*. Recuperado el 5 de Junio de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368548>

- Martin, G., Asensi, V., Montes, H., Collazos, J., Alvarez, V., Carto, J. A., . . . Valle-Garay, E. (2014). *Role of plasma matrix-metalloproteases (MMPs) and their polymorphisms (SNPs) in sepsis development and outcome in ICU patients*. *Critical Care*, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA. Asturias: *Scientific reports*. Recuperado el 5 de Junio de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4023133/>
- Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., & Rodellar, C. (2001). *Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*. España: Universidad de Zaragoza. Recuperado el 17 de Mayo de 2017 de https://www.redib.org/recursos/Record/oai_articulo1053950-fundamento-reaccion-cadena-polimerasa-pcr
- Massion, P., & Carbone, D. (2003). *The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications*. Nashville: BioMed . Recuperado el 2 de Octubre de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14641911>
- Miko, I., & LeJeune, L. (2014). *Essentials of Genetics*. Cambridge. Recuperado el 5 de Agosto de 2017 de <https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-genetics-8>
- Moctezuma, C., & Patiño, M. (2009). *Cáncer de Pulmón*. México: Anales de radiología México. Recuperado el 19 de Abril de 2017 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/anaradmex/arm-2009/arm091e.pdf>
- Molina, N. D. (2015). *Enfermedad pulmonar obstructiva cronica en pacientes atendidos en el centro de salud de mulalillo periodo enero - junio 2015*. Ambato: Universidad Regional Autónoma de los Andes "UNIANDES" Recuperado el 16 de Mayo de 2017 de <http://dspace.uniandes.edu.ec/handle/123456789/1008>
- Muñoz, Y. C., Carvajal, F. d., & Rodríguez, C. G. (2016). *Acute Myocardial Infarction. An Update of the Clinical Practice Guideline*. Cuba: Hospital General Universitario Dr. Gustavo Aldereguía Lima. Recuperado el 20 de

Noviembre de 2017 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/finlay/fin-2016/fin162j.pdf>

Oblander, S. A., Zhou, Z., Gálvez, B. G., Starcher, B., Shannon, J. M., Durbeej, M., . . . S, S. (2005). *Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation*. Department of Biomedical Engineering, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH, United States. USA : ScienceDirect. Recuperado el 15 de Agosto de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572153>

OMS. (Febrero de 2017). Cáncer. Recuperado el 5 de Mayo de 2017, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Paz-Miño, & López, A. (2014). *Genética Molecular y Citogenética Humana*. Ecuador: YACHAY EP. Recuperado el 18 de Octubre de 2017 de <https://www.udla.edu.ec/pdf/librogenetica/librogeneticamolecular.pdf>

Paz-y-Miño, C., López, A., Muñoz, M. J., Cabrera, A., Castro, B., & Sánchez, M. E. (2010). *Incidence of the L858R and G719S mutations of the epidermal growth factor receptor oncogene in an Ecuadorian population with lung cancer*. Quito: Elsevier. Recuperado el 28 de Octubre de 2017 de 2017 de [http://www.cancergeneticsjournal.org/article/S0165-4608\(09\)00601-3/fulltext](http://www.cancergeneticsjournal.org/article/S0165-4608(09)00601-3/fulltext)

Pérez-Hernández, N., Ibanes-Gutiérrez, C., Vargas-Alarcón, G., Martínez-Rodríguez, N., Monroy-Muñoz, I. E., Valente-Acosta, B., . . . Pérez, J. M. (2013). Participación de las metaloproteinasas de matriz en el síndrome isquémico coronario agudo (SICA). México: Medigraphic. Recuperado el 11 de Noviembre de 2017 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm136j.pdf>

Pesantes, S., Puma, J., & Sacta, B. (2010). Prevalencia y factores de riesgo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en pacientes del hospital

regional vicente corral moscoso cuenca ecuador. . Cuenca: Universidad de Cuenca . Recuperado el 23 de Junio de 2017 de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3743/1/MED33.pdf>

Polette, Nawrocki, Gilles, Sato, Seiki, Tournier, & Birembaut. (1996). *MT-MMP expression and localisation in human lung and breast cancers*. Francia: *International journal of pathology*. Recuperado el 12 de Mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8646366>

Poutriel, K. T., Pestana, E. N., Medina, R. B., & Pérez, A. C. (2011). Placa vulnerable: nuevos horizontes en su diagnóstico y tratamiento. Camagüey: Scielo. Recuperado el 12 de Noviembre de 2017 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552011000500014

Puente, J., & Velasco, G. D. (6 de Marzo de 2017). ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? Recuperado el 1 de Mayo de 2017, de Sociedad Española de oncología médica: <http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>

Pulido, Mogollón, Morales, & Rincón. (2006). Estandarización y aplicación de la técnica de pcr – anidado para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Colombia: REV. MED. VET. ZOOT. Recuperado el 3 de Septiembre de 2017 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remvez/article/view/17798>

Qamar, W., Khan, M. R., & Arafat, A. (2016). *Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method*. Saudi Arabia: ScienceDirect. Recuperado el 20 de Noviembre de 2017 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X16301140>

Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., Tovilla-Zárate, C., & Fragoso, J. M. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN

estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. Departamento de Biología Molecular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. México, D.F. México: Gaceta Médica de México. Recuperado el 7 de Julio de 2017 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm132l.pdf>

Reunanen, & Kähäri. (2013). *Matrix Metalloproteinases in Cancer Cell Invasion. Madame Curie Bioscience Database*. Recuperado el 11 de Septiembre de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6598/>

Reyes, J., Viettri, M., Rivas, A., Lares, M., Herrera, L., Aguilar, C. M., & Ferrer, E. (2015). *Standardization of the PCR Technique for Detection of Leishmania sp. DNA in Canine Blood Samples*. Venezuela : Scielo. Recuperado el 5 de Mayo de 2017 de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5534365>

Roa, I. (2014). *Conceptos Básicos en Angiogénesis Tumoral*. Universidad de Talca, Talca, Chile., Departamento de Ciencias Básicas Biomédicas. Chile: IJMSS. Recuperado el 28 de Febrero de 2017 de http://www.ijmss.org/wp-content/uploads/2015/05/art_4_12.pdf

Rossi A, M. P. (2005). *Screening for lung cancer: New horizons? Italy* : Elsevier. Recuperado el 2 de Enero de 2017 de [http://www.croh-online.com/article/S1040-8428\(05\)00101-0/fulltext](http://www.croh-online.com/article/S1040-8428(05)00101-0/fulltext)

Rovensky. (2011). *Adhesive Interactions in normal and transformed cells*. New York: Springer. Recuperado el 2 de Marzo de 2017 de <http://www.springer.com/us/book/9781617793035>

Rozañov, D., Savinov, A., Golubkov, V., Tomlinson, S., & Strongin, A. (2006). *Interference with the Complement System by Tumor Cell Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase Plays a Significant Role in Promoting Metastasis in Mice*. Department of Microbiology and Immunology . California: aacr. Recuperado el 4 de Abril de 2017 de 2017 de <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/66/12/6258.full.pdf>

- Ryan, R., & Bernstein, B. (2012). *Genetic Events That Shape the Cancer Epigenome. Department of Pathology and Center for Cancer Research , Massachusetts* . Recuperado el 18 de Septiembre de 2017 de <http://science.sciencemag.org/content/336/6088/1513>
- Saavedra-Torres, J. S., Garzón, N. A., & Zúñiga-Cerón, L. F. (2017). La matriz extracelular en el infarto agudo de miocardio. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Recuperado el 10 de Octubre de 2017 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/morfologia/article/viewFile/68072/62742>
- Saitoh, w., Sakamoto, t., Hegab, a. e., Nomur, a., Ishii, y., Morishima, y., . . . Sekizawa, k. (2005). *MMP14 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. Department of Pulmonary Medicine, Institute of Clinical Medicine. Japón: International journal of molecular medicine.* Recuperado el 16 de Abril de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16525718>
- Sánchez, & Rosell. (2005). *Cáncer de Pulmón. Centro Nacional de investigaciones oncológicas. Madrid: Médica Panamericana.* Recuperado el 18 de Mayo de 2017 de <https://www.cnio.es/es/cursos/descargas/cursos/his/libro-cancer-pulmon-eso.pdf>
- Senior, J. M., Saldarriaga, C., Navas, C. M., Lugo, L. H., Ortiz, S. D., & Parra, J. C. (2012). *Cardiac remodeling in patients with myocardial infarction secondary to penetrating heart wound.* Medellín : Scielo. Recuperado el 28 de Octubre de 2017 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482012000100002
- Shead, D., Corrigan, A., & Hanisch, L. (2016). *National Comprehensive Cancer Network.* Recuperado de <https://www.nccn.org/patients/guidelines/lung-nsclc/files/assets/common/downloads/files/nsclc.pdf>

- Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. (2012). *Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success*. Institute of Ecology, University of Innsbruck. Austria: *Methods in Ecology and Evolution*. Recuperado el 4 de Junio de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23549328>
- Spinale, F. G., Mukherjee, R., Zavadzkas, J. A., Koval, C. N., Bouges, S., Stroud, R. E., . . . Sinusas, A. J. (2010). *Cardiac Restricted Overexpression of Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase Causes Adverse Myocardial Remodeling following Myocardial Infarction*. Carolina del Sur : *Journal of Biological Chemistry*. Recuperado el 10 de Noviembre de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20643648>
- Surzycki, S. (2000). *Basic Techniques in Molecular Biology*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Tee, Y.-T., Liu, Y.-F., J. T., Yang, S.-F., Chen, S.-C., Han, C.-P., . . . Liao, C.-L. (2012). *Single-Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes of Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase in Susceptibility and Clinical Significance of Squamous Cell Neoplasia of Uterine Cervix in Taiwan Women*. Institute of Medicine, Chung Shan Medical University, Taichung. Taiwán: SAGEPUB. Recuperado el 20 de Mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22527983>
- Terrazas, S., Ibáñez, C., Lagos, M., Poggi, H., Brañes, J., Barriga, M. I., . . . Ferrecci, C. (2015). Examen de detección de virus papiloma humano en el tamizaje de cáncer cervicouterino en un Servicio de Salud de Santiago, Chile. Chile: Scielo. Recuperado el 10 de Septiembre de 2017 de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872015000100007
- Turajlic, S., & Swanton, C. (2016). *Metastasis as an evolutionary process*. University College London Hospitals and Cancer Institute . Science. Recuperado el 28 de Abril de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27124450>

- Veliz, K. B. (2015). Caracterizacion del cancer de mama en el hospital abel gilbert ponton periodo de diciembre 2013 a diciembre 2014. Guayaquil: UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL. Recuperado el 8 de Junio de 2017 de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/10708/1/CANCER%20DE%20MAMA.pdf>
- Weng, C.-J., Chen, M.-K., Lin, C.-W., Chung, T.-T., & Yang, S.-F. (2012). *Single Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes of MMP-14 are Associated with the Risk and Pathological Development of Oral Cancer*. Taiwan University of Technology, Tainan, Taiwan. *Taiwán: Ann Surg Oncology*. Recuperado el 9 de Mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21512861>
- Wong, V. (2009). *Cells: Molecules and Mechanisms* (Vol. 1). Louisville: Axolotl Academic Publishing Company. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=09CJORzpF7MC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Zhai, Y., Hotary, K., Nan, B., Bosch, X., Muñoz, N., Weiss, S., & Cho, K. (2005). *Expression of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Is Associated with Cervical Carcinoma Progression and Invasion*. University of Michigan, Departments of Pathology . *Míchigan: aacrjournals*. Recuperado el 8 de Mayo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16061633>
- Zitka, O., Kukacka, J., Krizkova, S., Huska, D., Adam, V., Masarik, M., . . . Kizek, R. (2010). *Matrix Metalloproteinases* . Brno: *Current Medicinal Chemistry*. Recuperado el 23 de Marzo de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846107>

