

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---



FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO -1306 C/T EN EL PROMOTOR DE  
LA MMP2 Y SU RELACIÓN CON FPI.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ROMAN ALEJANDRO GARCÍA RAMÍREZ.

TUTOR: BIÓLOGO. MARCO ANTONIO CHECA CARATACHEA.

2008





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Datos del alumno. Apellido paterno:	García
Apellido materno:	Ramírez
Nombre(s):	Román Alejandro
Teléfono:	50965504
Universidad:	Universidad nacional Autónoma de México.
Facultad:	Facultad de Ciencias.
Carrera:	Biología.
Número de cuenta:	301583284
Datos del tutor Grado:	Biólogo
Nombre (s):	Marco Antonio
Apellido paterno:	Checa
Apellido materno:	Caratachea
Datos del sinodal 1 Grado:	Dra.
Nombre (s):	Annie
Apellido paterno:	Pardo
Apellido materno:	Semo
Datos del sinodal 2 Grado:	M. en C.
Nombre(s):	María de los Remedios Josefina
Apellido paterno:	Ramírez
Apellido materno:	Rangel

<p>Datos del sinodal 3</p> <p>Grado:</p> <p>Nombre(s):</p> <p>Apellido paterno:</p> <p>Apellido materno:</p>	<p>M. en C.</p> <p>María Isabel</p> <p>De la Cruz</p> <p>Laína</p>
<p>Datos del sinodal 4</p> <p>Grado:</p> <p>Nombre(s):</p> <p>Apellido paterno:</p> <p>Apellido materno:</p>	<p>M. en C.</p> <p>Magali</p> <p>Espinosa</p> <p>Castilla</p>
<p>Datos del trabajo escrito:</p> <p>Título:</p> <p>N° de páginas:</p> <p>Año:</p>	<p>Análisis del polimorfismo -1306 C/T en el promotor de la MMP- 2 y su relación con la FPI.</p> <p>41 pág.</p> <p>2008</p>

# ***Índice.***

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Fibrosis Pulmonar.....	1
1.2 Matriz extracelular.....	4
1.3 Metaloproteasas de matriz (MMPs) .....	6
1.4 Regulación de MMPs.....	9
1.5 MMP2.....	13
1.6 MMP2 y MMP9 en FPI.....	14
1.7 SNPs.....	16
1.8 Estudios de asociación genética.....	19
1.9 Relación del polimorfismo -1306 C→T con otras enfermedades.....	20
<b>2 .Objetivo general.....</b>	<b>23</b>
<b>3 Material y Métodos.....</b>	<b>24</b>
3.1 Extracción de DNA.....	24
3.2 PCR-RFLP.....	24
<b>4. Resultados.....</b>	<b>28</b>
<b>5. Discusión y Conclusiones.....</b>	<b>32</b>
<b>6. Abreviaturas.....</b>	<b>37</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>38</b>

## **Análisis del polimorfismo -1306 C/T en el promotor de la MMP- 2 y su relación con la FPI.**

### ***Introducción.***

#### **Fibrosis Pulmonar.**

La fibrosis pulmonar es la ruta común final de un grupo diverso de desórdenes pulmonares conocidos como enfermedades pulmonares intersticiales (ILD, por sus siglas en inglés interstitial lung diseases). A pesar de que las ILD son diferentes en las características que presentan, éstas son agrupadas en conjunto debido a que comparten muchas características clínicas, radiográficas y fisiológica. Algunas de éstas son de etiología conocida, por ejemplo la exposición a partículas orgánicas (neumonitis por hipersensibilidad), inorgánicas (asbestosis), inducidas por fármacos, o asociadas a enfermedades colágeno- vasculares (la esclerosis sistémica y la artritis reumatoide).

Sin embargo, alrededor del 40-50% de las ILD son de etiología desconocida, por lo que son clasificadas como neumonías intersticiales idiopáticas (IIP) (10). La IIP más común y por mucho la mas agresiva de las ILD, es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la cual representa un desorden pulmonar crónico, progresivo y usualmente letal. En este sentido es importante enfatizar que mientras la mayoría de los pacientes con ILD presentan un comportamiento clínico heterogéneo, y pueden tender a mejorar, o evolucionar a fibrosis, la FPI siempre progresa hacia la destrucción del parénquima pulmonar (32). En relación a la serie de eventos patogénicos, generalmente se está de acuerdo en que las ILD parten de un daño inicial, el cual resulta en el desarrollo de una respuesta inflamatoria, que si no es resuelta, es seguida por una proliferación /activación de fibroblastos y finalmente por una acumulación exagerada de proteínas de matriz extracelular.

De acuerdo a este punto de vista, se ha hipotetizado que la inflamación opera para la mayoría de las ILD, pero no para la FPI, ya que en ésta, la fibrosis aparenta ser un proceso patológico independiente de la inflamación (32).

En este contexto, se ha propuesto que hay dos rutas (al menos) para el desarrollo de fibrosis pulmonar difusa. Una de éstas es la “ruta inflamatoria”, la cuál está representada por casi todas las enfermedades pulmonares intersticiales no asociadas a FPI, donde hay una fase temprana y claramente distinguible de alveolitis y una fase tardía fibrótica. La segunda es la “Ruta Epitelial / Fibroblástica”, representada por la FPI (15).

Se ha propuesto que la FPI es desde los estadios tempranos, una enfermedad epitelial/fibroblástica, es decir, un desorden fibroproliferativo precedido por una activación celular epitelio/alveolar que induce la migración / proliferación de fibroblastos, siendo éstos aparentemente los primeros sitios de la lesión y reparación, llamados focos de fibroblastos, en donde a su vez se observa una diferenciación en el fenotipo fibroblasto a miofibroblasto. Los procesos característicos de la FPI se pueden observar en la Fig. 1.

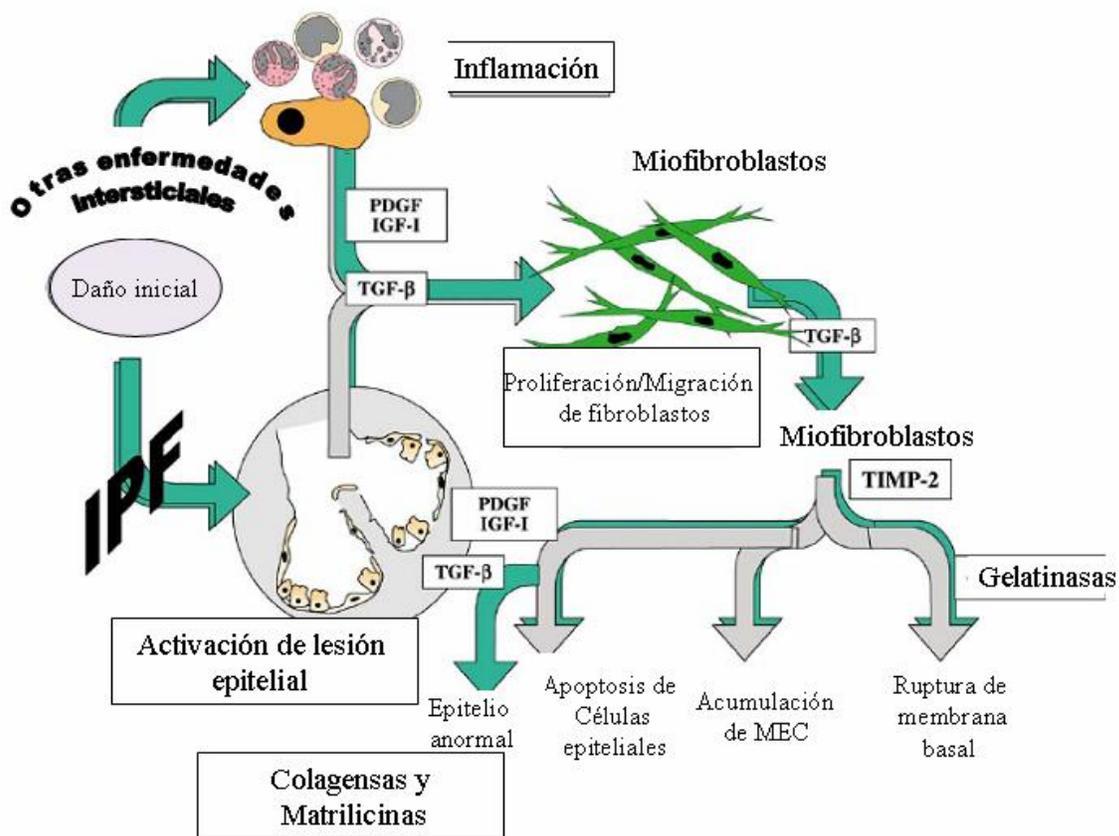


Fig. 1 Esquema hipotético de las dos rutas que pueden inducir fibrosis pulmonar idiopática.

Una vez que los fibroblastos han migrado y proliferado dentro del microambiente pulmonar dañado, así como adquirido un fenotipo de miofibroblastos, gradualmente cambian sus principales funciones a síntesis de proteínas y contractibilidad.

Los mecanismos involucrados en la diferenciación de miofibroblastos, así como el origen de sus células progenitoras en pulmones fibróticos no son claros aún, sin embargo varias citocinas han sido implicadas. Por ejemplo, al TGF-beta 1 (transforming growth factor-beta1) se le ha relacionado en la patogénesis de la fibrosis, no sólo por su capacidad de acelerar la acumulación de moléculas de matriz extracelular (MEC), sino también por su capacidad de promover la diferenciación a miofibroblastos, sobreexpresando alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) en fibroblastos, ya sea *in vivo* o *in Vitro* (5). Además de ser un marcador de diferenciación de miofibroblastos, el alfa-SMA es importante en el mecanismo de contracción celular, el cuál está probablemente involucrado en el decremento característico de la distensibilidad observada en pacientes con fibrosis pulmonar.

Uno de los papeles principales de los miofibroblastos en el proceso de cicatrización, debido a su fenotipo contráctil, es el de reducir el área de la superficie desnuda en el tejido dañado, acercando uno a otro los márgenes de las microheridas.

Por otro lado, los miofibroblastos de pulmones con FPI inducen apoptosis del epitelio alveolar, y al menos en parte, el fallo en la reepitelialización aparenta ser provocado por este mecanismo (22 y 24) (15).

Los miofibroblastos pueden también provocar la ruptura de la membrana basal y propiciar la apoptosis celular del epitelio alveolar, perpetuando el daño y evitando una reepitelialización apropiada. El resultado final es la acumulación excesiva de matriz extracelular con una destrucción de unidades capilo-alveolares y la formación de espacios fibróticos quísticos o una panalización llevando a la destrucción la arquitectura del parénquima pulmonar (20).

Una marcada ruptura en la integridad del epitelio alveolar con la presencia de diversos fenotipos celulares alterados es una característica distintiva de los pulmones con FPI (15). Los fenotipos morfológicos comunes incluyen: células cuboidales (hiperplasia de neumocitos tipo II), células epiteliales reactivas elongadas y grandes (posibles células transitorias entre los neumocitos tipo I y II) y células epiteliales tipo bronquiales Fig. 2 (15).

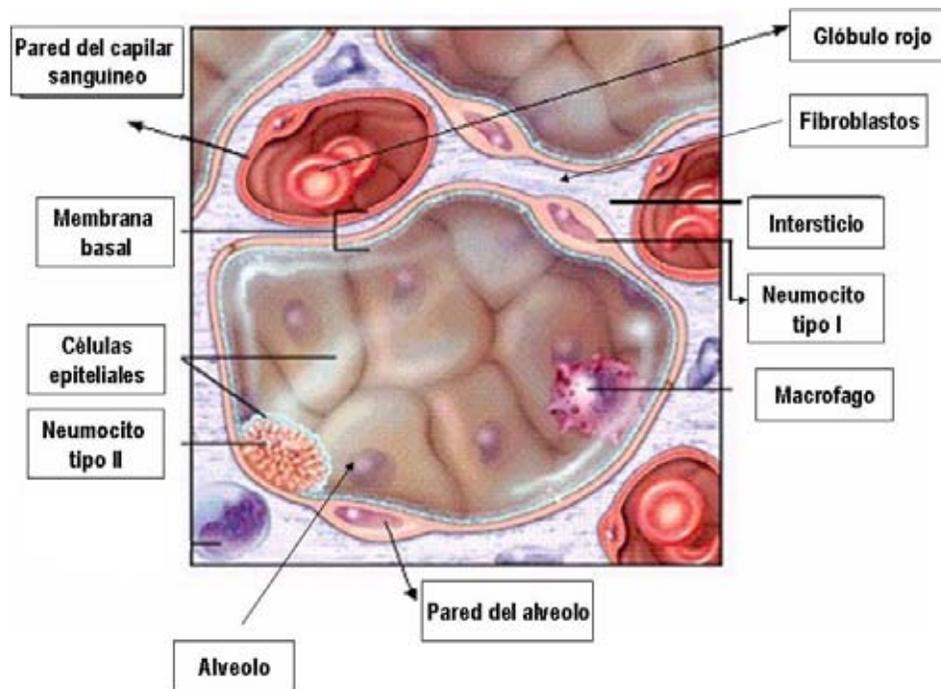


Fig. 2 Unidad capilo-alveolar

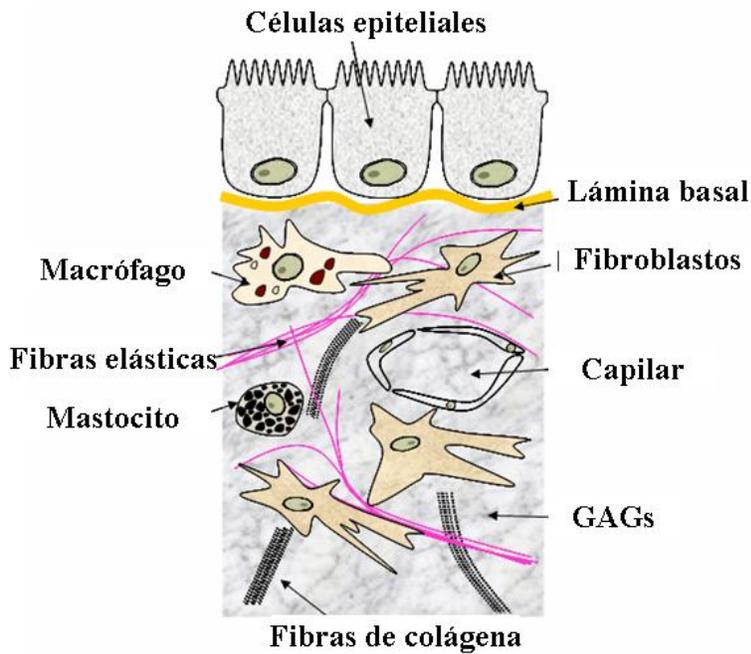
### Matriz extracelular. (MEC)

La MEC está conformada por una gran variedad de moléculas, que interactúan entre sí, generando una estructura tridimensional a la cuál las células se adhieren ya sea por receptores específicos o ligandos. Las macromoléculas que constituyen la MEC constituyen, entre otras, a la familia de las colágenas, que son las responsables de la resistencia mecánica de los tejidos conjuntivos, la elastina que le confiere cualidades de flexibilidad y elasticidad, proteínas de adhesión como fibronectinas y lamininas y los proteoglicanos que son esenciales en el proceso de adhesividad.

La matriz extracelular es una estructura dinámica que juega un papel importante en la arquitectura pulmonar, así como en su homeostasis, manteniendo y proporcionando el andamiaje necesario para la regulación del comportamiento celular. La MEC en el parénquima pulmonar abarca numerosas moléculas, incluyendo colágenas (principalmente tipo I y III), elastinas, proteoglicanos y fibronectina, como podemos observar en la Fig. 3. Las estructuras especializadas de la MEC, como las membranas basales epiteliales y endoteliales, contribuyen con otras proteínas, incluyendo lamininas, entactinas y colágenas tipo IV. El recambio fuertemente controlado de la MEC es crítico para el mantenimiento de la morfostasis pulmonar.

La matriz extracelular (MEC) desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad estructural de los organismos multicelulares, en la forma de su cuerpo y de sus órganos de forma que este material estructural está lejos de ser una sustancia de soporte inerte como se pensaba en el pasado y, por el contrario, ahora sabemos que la matriz desempeña un papel activo y complejo en la regulación de procesos básicos de las células que tienen contacto con ella. Así por ejemplo, la MEC ejerce una función moduladora del crecimiento, migración, proliferación y diferenciación celular, así como en la muerte celular programada, entre otros. Muchas de estas funciones se realizan directamente a través de receptores a las moléculas de matriz tales como las integrinas.

Hallazgos recientes muestran que la MEC sirve además como un sitio de almacenamiento para factores de crecimiento polipeptídicos. Dos categorías de factores de crecimiento se almacenan en la MEC; factores que se asocian con el heparán- sulfato extracelular, tales como las familias de los factores de crecimiento de fibroblastos y factores que se unen a proteínas de la MEC, entre los que destacan el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), por sus siglas en inglés.



**Fig. 3 Estructura de la matriz extracelular.**

En condiciones fisiológicas normales, existe un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz, lo cual ocurre de una manera fuertemente programada y equilibrada. Por el contrario, una remodelación desequilibrada de ésta, se ha asociado con diferentes procesos patológicos.

Actualmente, se conoce que la artritis reumatoide, la cirrosis hepática, la fibrosis pulmonar, la invasividad de algunos cánceres, el daño pulmonar agudo y la arteroesclerosis, entre otros, representan condiciones patológicas en las cuáles existen alteraciones tanto celulares como de diferentes moléculas de la MEC (8).

Los mecanismos moleculares, detrás de esta remodelación anormal, están pobremente comprendidos, pero la pérdida de un cambio regulado, involucra, al menos en parte, dos familias de proteínas: las metaloproteasas de matriz (MMPs) y a los Inhibidores Tisulares de MMPs (TIMPs).

Los TIMPs son una familia de cuatro proteínas secretadas (TIMP-1 a TIMP-4) que inhiben selectivamente a las MMPs. Interesantemente los TIMPs, además de tener una acción

inhibitoria en común de las MMPs, difieren en sus patrones de expresión y otras de sus propiedades como son la asociación con MMPs latentes (zimógenos), la activación del crecimiento celular, la activación de la supervivencia celular y apoptosis. El balance entre las MMPs y los TIMPs es un determinante crítico para la integridad y función de la matriz extracelular (ECM) (2).

### **Metaloproteasas de matriz (MMPs).**

Las MMPs comprenden una gran familia de enzimas extracelulares que comparten características estructurales comunes, particularmente aquellas regiones involucradas en la regulación de actividades proteolíticas. Las MMPs o matrixinas, son un subgrupo de una super familia más grande de metaloproteasas, las cuales también incluyen astacinas, metaloproteasa con motivos de desintegrina (ADAM) y metaloproteasa con motivos de desintegrina tipo trombospondina (ADAMTS) proteinasas, entre otras (15). Las MMPs constituyen 23 diferentes endopeptidasas codificadas por 24 genes incluyendo los duplicados de los genes de la MMP23.

La mayoría de las MMPs son secretadas al espacio extracelular y algunas de ellas son expresadas como enzimas de superficie celular. No obstante, diversos estudios han demostrado que algunas MMPs, como la MMP1, MMP2, y la MMP11, pueden ser encontradas al interior de la célula y actuar con proteínas intracelulares (13).

Las MMPs han sido clasificadas de acuerdo a sus características estructurales y funcionales en 6 diferentes subgrupos que poseen miembros relacionados con la especificidad a un sustrato, algo distinto, pero generalmente traslapado: colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, matrilisininas, las MMPs tipo membrana (MT-MMPs) y otras MMPs. Actualmente, un nuevo sistema de clasificación ha sido propuesto basado en la estructura de las MMPs, más que en su especificidad por un sustrato, encontrando a las MMPs arquetípicas, matrilisininas, gelatinasas, y MMPs activadas por furina (Fig. 4) (14).

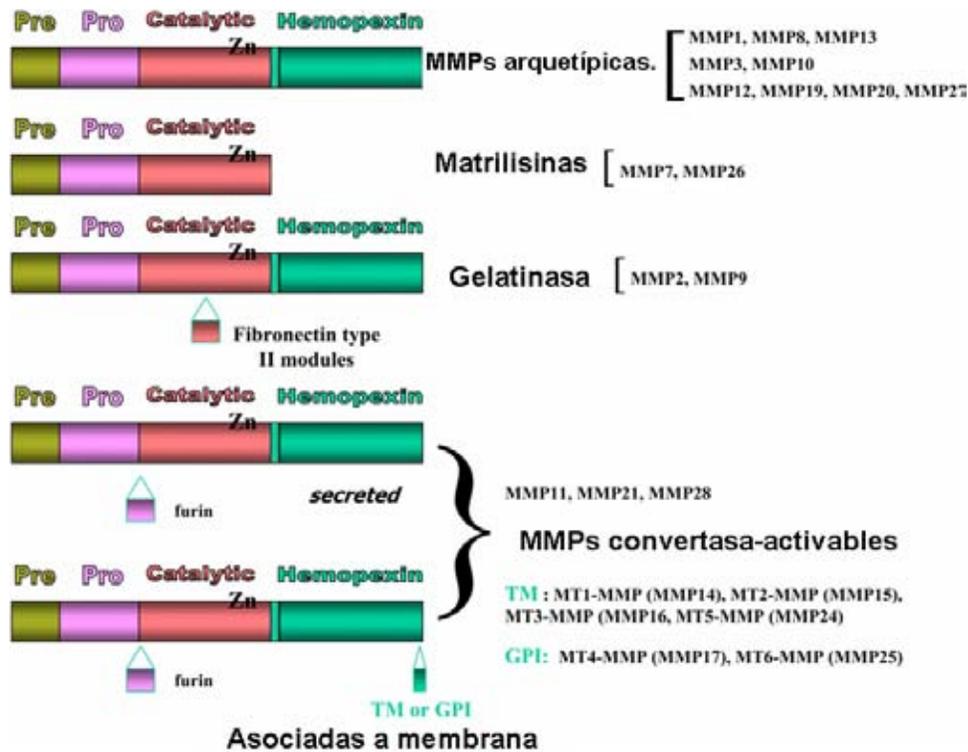


Fig. 4 Clasificación estructural de metaloproteasas de matriz. Tomada de Pardo *et al.* 2006.

Para ser clasificadas como una MMP, ésta debe tener al menos dos motivos conservados, el pro-dominio y el dominio catalítico. El pro-dominio de una MMP típica es de alrededor de 80aa. Todas las MMPs, contienen la secuencia consenso PRCXXPD, con excepción de la MMP21 y de las CA-MMP. El dominio catalítico contiene un sitio activo,  $Zn^{2+}$ , que une tres histidinas conservadas en la secuencia HEXXHXXGXXHS/TXXXXXXM, la cual contiene también una metionina conservada en el sitio carboxilo del sitio de unión del zinc. En el estado inactivo, el residuo de cisteína conservada en el pro-dominio provee la coordinación del cuarto sitio para el ion zinc catalítico, donde la ruptura del enlace es necesaria para la actividad enzimática. Además de las dos regiones conservadas, las MMPs tienen una variedad de dominios especializados que contribuyen en la especificidad de sustrato y el reconocimiento en la interacción con otras proteínas o moléculas. Con excepción de la matrilisina, CA-MMP, y la endometasa/matrilisina-2, las MMPs tienen una región visagra, la cual es generalmente rica en prolina, así como un dominio carboxilo terminal tipo hemopexina.

Las dos gelatinasas (MMP2, A y MMP9, B) tienen dominios de unión a gelatina, y las CA-MMP tienen un nuevo motivo de arreglo de cisteína y un dominio plegado tipo C2 inmunoglobulina (16). Así, en la figura 5 podemos observar la clasificación estructural, donde se distinguen ocho grupos: cinco grupos de MMP secretadas y tres de MMP asociadas a la membrana (MT-MMP por *membrane type MMP*).

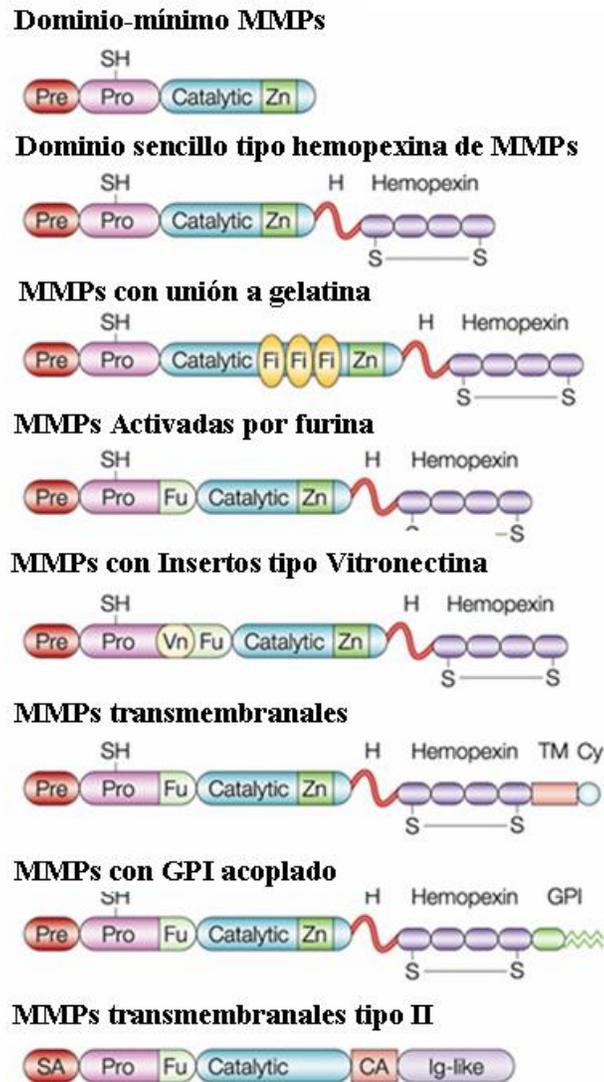


Fig. 5 Clasificación estructural de metaloproteasas de matriz (tomada de Egeblad M, 2002)

## Regulación de MMPs

Existen al menos cuatro tipos de mecanismos que pueden influenciar la regulación de las MMPs: expresión génica, compartimentalización, activación enzimática e inactivación. Sin embargo, aparentemente para la mayoría de las MMPs el paso clave, es la regulación transcripcional, dado que muchos genes de las MMPs son expresados sólo cuando se activan mecanismos de remodelación fisiológica o patológica. Una excepción es la MMP2 la cual está altamente expresada en tejidos quiescentes aparentemente en niveles significativos y es por eso que otros niveles de regulación, como la activación y la inhibición de la enzima pueden ser mas importantes **(28)**.

Cada MMP está generalmente descrita como si tuviera una especificidad al sustrato limitada, sin embargo enzimas individuales pueden actuar en muchas proteínas diferentes y el espectro de sustratos entre muchas enzimas incluso es en realidad poco similar. Por ejemplo, la gelatinasa A, gelatinasa B, estromelina 1, estromelina 2, matrilisina, la metaloelastasa y la colagenasa 3, cada una puede degradar colágena no fibrilar, componentes de la membrana basal, fibronectina y muchas más **(16)**.

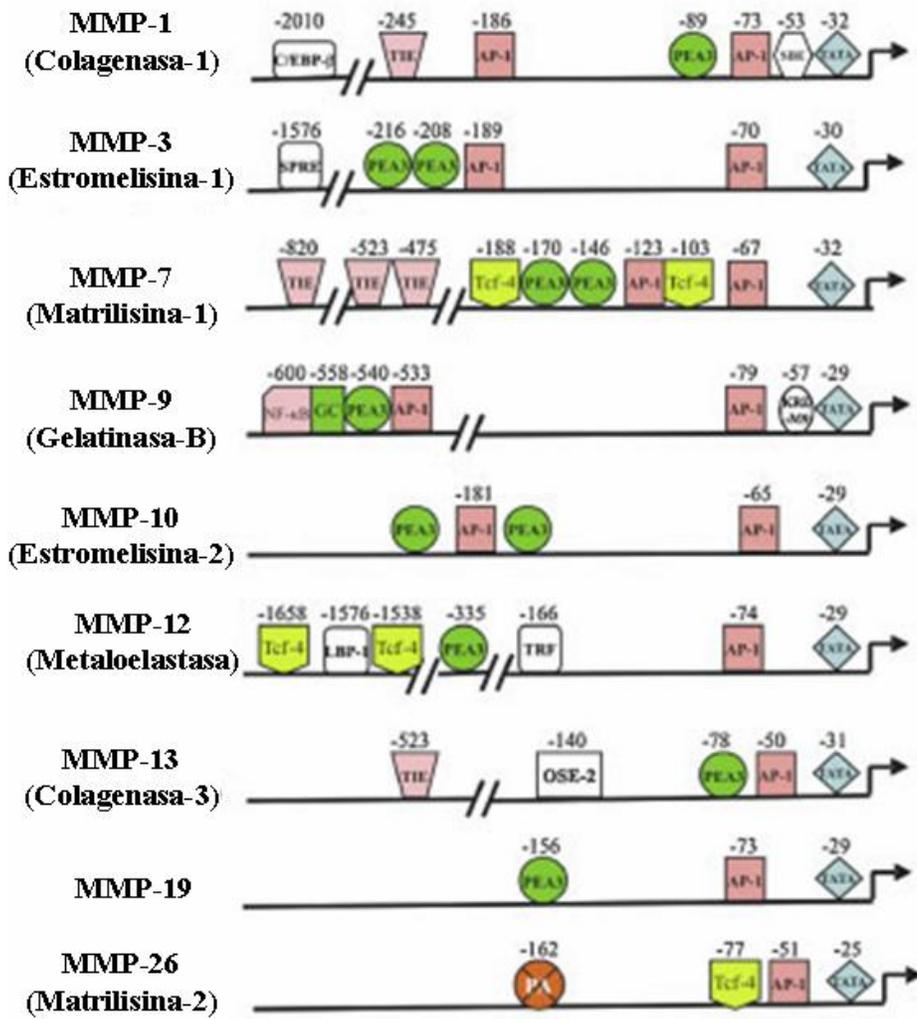
La expresión de genes de MMPs está regulada en gran medida a nivel transcripcional, por lo que sus promotores , presentan diversos elementos *cis* que permiten que la regulación sea llevada a cabo por variados conjuntos de activadores *trans*, incluyendo ciertos factores de transcripción como lo son : AP-1, PEA3, Sp1,  $\beta$ - catenina/Tcf-4 y el NF- $\kappa$ B. Muchos de los promotores de MMPs son increíblemente semejantes y, de hecho, comparten algunos elementos *cis*, lo cuál es consistente con observaciones en donde algunas MMPs son co-reguladas en su expresión. En contraste, la composición de los promotores funcionalmente relacionados, como lo son las gelatinasas (MMP2 y MMP9) las colagenasas (MMP1/MMP8) es completamente distinta.

En base a la composición de los elementos *cis*, los promotores de las MMPs pueden ser agrupados en tres categorías: El primer grupo, que comprende a la mayoría de los promotores de las MMPs, contiene una caja TATA aproximadamente a -30 pb y un sitio de unión AP-1 aproximadamente a -70pb. Los promotores de las MMPs de el segundo grupo (MMP8,-11, y -21) también contienen una caja TATA, pero carecen de un sitio AP-1

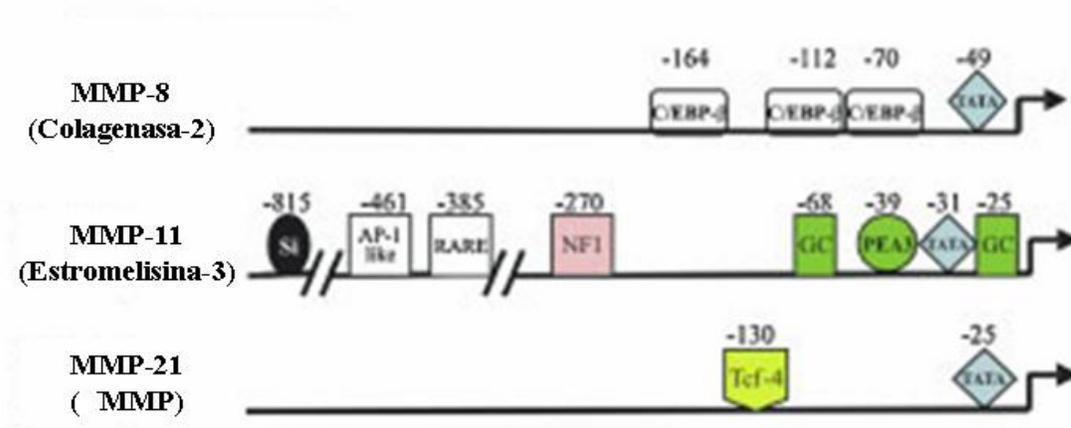
proximal. La regulación de estos promotores es relativamente sencilla y distinta con respecto al primer grupo de promotores. El último grupo de promotores (incluyendo MMP-1, MMP-2 y MMP-28) no poseen una caja TATA, de ahí que, la transcripción en estos promotores comienza en múltiples sitios. Además la expresión de las MMPs en este último grupo está determinada principalmente por la familia ubiquitinada Sp1 de los factores de transcripción que se unen a una caja GC cercana. La mayor parte de la expresión de estas MMPs es “constitutiva”, como en el caso del promotor de la MMP2 humana, el cuál contiene ciertos elementos regulatorios *cis*, donde la expresión de esta enzima está sujeta, al parecer, a la regulación por factores de transcripción con una inducción en pequeña proporción por factores de crecimiento o citocinas, tal y como se puede observar en la Fig. 6.

La presencia de sitios de unión a AP-1 en la mayoría de los promotores de las MMPs responsabiliza a estos genes de los cambios en la actividad y / o cantidad de los activadores *trans* correspondientes, ya sea solos o en cooperación con PEA3. De hecho una gran variedad de citocinas y factores de crecimiento, incluyendo interleucinas, interferones, EGF, KGF, NGF, HGF, bFGF, VEGF, PDGF, TNF  $-\alpha$  y TGF- $\beta$  activan la señalización celular culminando en la activación de factores *trans* de los promotores de las MMPs (27).

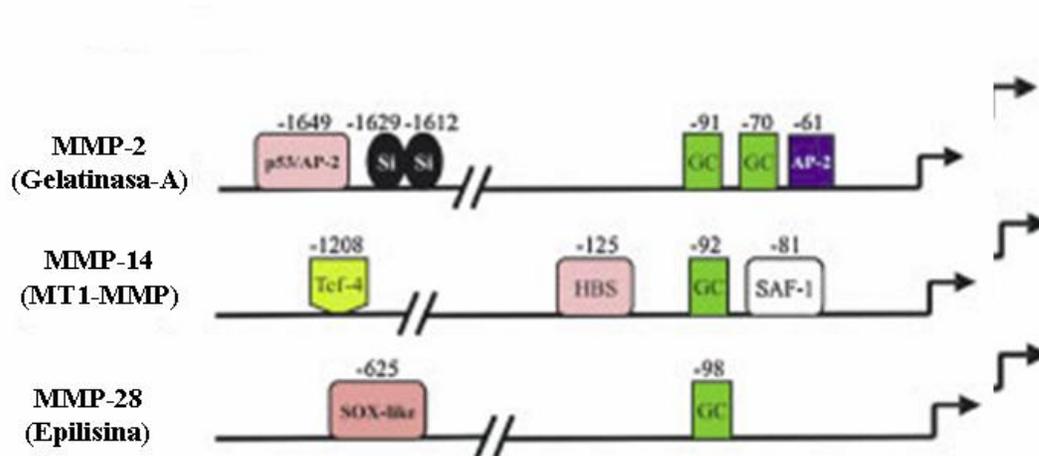
## Promotores del grupo 1



## Promotores del grupo 2



## Promotores del grupo 3



**Fig. 6 Elementos cis en los promotores de MMPs humanas (Tomado de Boyd *et al.* 2006).** AP1 proteína activadora 1m, AP-2 proteína activadora 2; SP-1- sitio de unión; KRE-M9, factor responsable de diferenciación de queratinocitos-1; NF1, factor nuclear 1; NF-kB factor nuclear NF-kB; p53/AP-2 sitio obligatorio compuesto; PA señal de poliadenilación; PEA3, reforzador A del polioma que une la proteína-3; RARE ácido retinoico; Si secuencia silenciadora; TATA, caja TATA; TIE, TGF-β elemento inhibitorio; SAF-1, suero amiloide A que activa al factor-1.

Las regiones promotoras de genes inducibles de la MMP1, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12 y MMP13 muestran una conservación marcada de los elementos regulatorios y su expresión es inducida por factores de crecimiento, citocinas y otros factores ambientales, como lo es el contacto con la MEC.

En la expresión elevada de las MMP2 y MMP11 las regiones promotoras, que no contienen elementos *cis* conservados, han sido observadas en enfermedades, indicando un traslapamiento de mecanismos en la regulación de la expresión de estos genes (23).

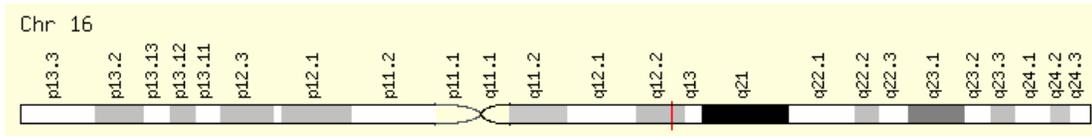
En algunos casos se presentan polimorfismos en la región promotora del gen y, esto regula la expresión génica alterando la interacción que se da entre los factores de transcripción y los elementos *cis* presentes en dicho promotor. En varios promotores de MMPs han sido reportado polimorfismos funcionales que derivan de inserciones o sustituciones de nucleótidos sencillos (SNP).

Por ahora, es bien sabido que la expresión de los genes de MMP está principalmente regulada a nivel transcripcional, sin embargo, evidencias recientes (Yan *et al.*, 2007), sugieren que los mecanismos post-transcripcionales también están involucrados en el control de la expresión de las MMPs, en respuesta a ciertas señales (27). Además de la regulación transcripcional, la actividad de algunas MMPs, como por ejemplo la MMP2, también está regulada por factores endógenos, que incluyen a la familia de las anti-proteasas, conocidos como los Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas (TIMPs) (30).

Estudios recientes, sugieren que profundos cambios en la expresión y localización de MMPs y TIMPs, tienen lugar en el microambiente de la FPI. En general, estos estudios demuestran una sobreexpresión de la colagenasa-1 (MMP-1) y ambas gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), así como, la de los cuatro TIMPs. De manera particular, TIMP-2 está predominantemente expresada en miofibroblastos dentro de los focos fibróticos.

## **MMP2**

El gen de la MMP-2 se encuentra en la región 16q13. Dicho gen presenta 17 kb de longitud con 13 exones que varían en tamaño desde los 110 a las 901 bp y 12 intrones que presentan un rango de 175 a 4350 pb (Fig. 7). La alineación de los intrones mostró que los intrones 1-4 y 8-12 del gen de la MMP-2 coincidían con la localización de los intrones en los genes de la MMP-1 y la MMP-3, lo cuál indica una estrecha relación estructural de estos genes de metaloproteasas (23).



**Fig. 7 Localización cromosómica de la MMP2. Tomada de [www.genecards.org](http://www.genecards.org)**

La MMP2 (gelatinasa A) tiene una actividad colagenolítica tipo IV, como se observa en la Tabla 1 y está constitutivamente expresada por las células de tejido conectivo, incluyendo células endoteliales, osteoblastos, fibroblastos y miofibroblastos. La activación de la pro-MMP-2 que está dada por uniones a membrana, localizada en una región restringida de la superficie celular; asegura su actividad proteolítica, sobretodo contra los componentes de la membrana basal potenciando la remodelación de la MEC y generando muchas moléculas activas molecularmente incluyendo laminina, fibronectina y proteína 3 quimiopoyente monolito (17).

MMP	Sustratos de matriz	Otros.	Pro-MMP activadas.
MMP2 gelatinasa A	Colágena I/II/IV/V/VII/XI, gelatina, elastina, laminina, fibronectina, agregano, tenascina, decorina, vitronectina, osteonectina, etc.	Pro-TGF- $\beta$ , Pro-IL-1 $\beta$ , pro- TNF- $\alpha$ , MCP-3, SDF-1, IGFBP-3-5-FGF-R1, adrenomedulina, endotelina- 1, Kiss-1/metastina, $\alpha$ - antiquimotripsina, $\alpha$ - macroglobulina, $\alpha$ - inhibidor de proteinasa	Pro-MMP-1, Pro-MMP-2, Pro-MMP13.

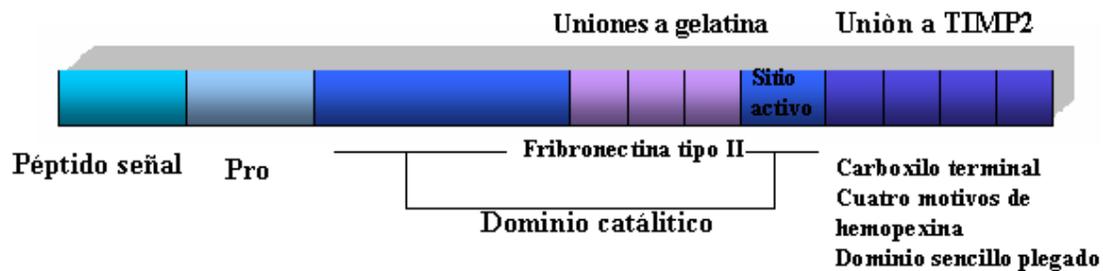
**Tabla 1. Sustratos de la MMP2 y Pro-MMP activadas por esta. Tomada y modificada de Pardo *et al.*, 2006.**

### MMP2 y MMP9 en FPI.

Las gelatinasas (MMP2 y MMP9) son el subgrupo de las MMPs mas ampliamente estudiadas en enfermedades pulmonares intersticiales humanas y en modelos de fibrosis

pulmonar experimentales, probablemente debido a la facilidad y gran sensibilidad en revelar la actividad gelatinolítica a través de zimogramas de gelatina. Ambas gelatinasas contienen repeticiones de fibronectina tipo II dentro de sus dominios catalíticos, que resulta en una mayor afinidad de unión por la gelatina y elastina.

## MMP2( Gelatinasa A)



**Fig. 8 Estructura de la MMP2 (tomada de Morgunova et al., Science 1999).**

Las gelatinasas A y B, dos miembros de la familia de las MMPs que son producidas por diferentes tipos de células pulmonares que han sido localizadas, entre otras superficies celulares, en fibroblastos/ miofibroblastos subepiteliales y ocasionalmente en áreas de membranas basales alveolares desnudas, mostrando que degradan diferentes componentes de la membrana basal, principalmente colágena tipo IV. Estos hallazgos sugieren que los miofibroblastos juegan un rol en la degradación de la membrana basal facilitando la migración a los espacios alveolares, contribuyendo al fallo en la correcta reepitelialización (13).

Es de importancia mencionar que a partir de los microarreglos de oligonucleotidos, se ha encontrado que la expresión del gen de la MMP2 se encuentra fuertemente regulada de forma positiva en tejidos de FPI y su forma activa esta generalmente incrementada en los fluidos de lavados bronquiolo-alveolares (BAL). Además, la MMP2 y MMP9 se encuentran generalmente sobrerreguladas en modelos experimentales de fibrosis pulmonar y se sospecha está implicada en la ruptura de la membrana basal (13).

La membrana basal es una estructura especializada de la MEC que incluye colágeno tipo IV, laminina, entactina, fibronectina, y heparán condroitín sulfato proteoglicano. Ésta juega un papel dinámico en mantener la integración y diferenciación del epitelio alveolar, y su ruptura es importante en la patogénesis de la Fibrosis Pulmonar

La membrana degradada también puede contribuir al fallo en la reparación ordenada de las células epiteliales alveolares tipo I dañadas.

De la misma forma, en fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, se ha encontrado, actividad de la gelatinasa B y la disrupción de la membrana basal epitelial alveolar **(13)**.

Los activadores fisiológicos principales de la pro-MMP2 (pro-gelatinasa A), son miembros de la familia MT-MMP, y en MT1-MMP este proceso involucra la acción del TIMP-2 en la formación del complejo trimolecular de MT1-MMP/TIMP-2/pro-MMP2. TIMP-3 puede sustituir a TIMP-2, no así TIMP-1 en el proceso de activación de la pro-MMP2 via MT1-MMP.

En la FPI, la MMP2 es encontrada en células epiteliales bronquiales basales y alveolares y en focos de fibroblastos. De forma interesante, las MT1-MT2-MT3-y la MT5-MMPs, los activadores de la pro-MMP2 están expresados mayormente por diferentes células epiteliales en lugares similares, ésto es considerado un componente activador en la remodelación aberrante del microambiente del pulmón. Como ya se mencionó, la MMP2 en su forma activa puede provocar la ruptura de la membranas basales lo cual parece ser un evento importante en la patogénesis de la FPI que incrementa la invasión de fibroblastos dentro de los espacios alveolares. Además, la ruptura de la membrana basal, puede también contribuir al fallo de la reparación ordenada de las células epiteliales tipo I alveolares dañadas, afectando la reepitelialización normal; incluso puede tener un papel letal adicional por la inducción de apoptosis epitelial. De hecho, la integridad de la membrana basal es necesaria para suprimir la muerte celular programada como ha sido demostrado en epitelio de mamíferos y otros tejidos **(14)**.

**SNPs.**

Las enfermedades en las cuales el rol de la MMP2 ha sido demostrado son caracterizadas por variaciones en la susceptibilidad individual que implica el papel de factores genéticos. Es por esto que la atención ha sido enfocada en la rápida elucidación de nuevas clases de marcadores genéticos denominados polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP's). Algunos de estos polimorfismos de promotores tienen alelos específicos que afectan la regulación de la transcripción del gen y están asociados con el desarrollo y la progresión de diversas enfermedades (17).

Los polimorfismos son distinguidos terminológicamente de las mutaciones por un criterio de frecuencia. Las diferentes formas de los polimorfismos (llamados "alelos") son más frecuentes en las poblaciones con respecto a las mutaciones, esto es, en una frecuencia mayor al 1 %. La gran mayoría de los SNP's tiene dos alelos, representados por un cambio de una base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en el alelo principal o el silvestre y el alelo raro o mutante, basado en su frecuencia observada en poblaciones. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto u homocigoto para el alelo menos frecuente (3). Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, pueden ser sinónimos o proporcionar ventajas a los individuos aunque también puede contribuir a causar enfermedades (7).

Hasta la fecha, han sido catalogados en la base de datos pública de SNP's (dbSNP) más de 9 millones de variantes en la secuencia de ADN. Se ha demostrado que los SNP's se presentan aproximadamente en 1 de cada 200 pares de bases en el genoma humano. Basados en este dato se esperaría que existieran aproximadamente 6 millones de SNP's en el genoma humano, y de éstos, muchos ya han sido descritos en la dbSNP. Los SNP's pueden estar presentes en regiones codificantes y pueden provocar un cambio en un aminoácido, a este tipo de SNP's se les conoce como "no sinónimos". Debido a que este tipo de SNP's afectan la función de la proteína, muchos investigadores han centrado su atención en estudios de asociación genética en este tipo de variaciones.

Existen variaciones funcionales que pueden causar alguna enfermedad o susceptibilidad a ésta, y pueden estar localizados en la región promotora del gen influenciando la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción), en intrones (modulando la estabilidad de la proteína), en sitios de “splicing” o en regiones intragénicas.

Un nivel adicional de variabilidad genética lo constituyen los haplotipos, los cuáles están compuestos por un conjunto de SNP’s a lo largo de un mismo cromosoma y que son heredados como una unidad. Prácticamente, cada individuo tendrá dos haplotipos para un fragmento dado del genoma, representados por los cromosomas paterno y materno debido a que los alelos en los haplotipos son asignados a un cromosoma. Estos haplotipos son de gran utilidad, ya que nos proporcionan información acerca de la recombinación, intercambio físico del ADN durante la meiosis.

A diferencia de otro tipo de marcadores como los marcadores microsatelitales, los SNP’s presentan una tasa menor de mutación, por lo que son de gran ayuda en estudios de genética de poblaciones para tratar de explicar fenómenos biológicos como la evolución de la raza humana.

Los estudios de asociación se han convertido en el centro de atención de muchos estudios para identificar genes que estén relacionados con distintas enfermedades. A partir de esto han surgido dos tipos de pruebas para el estudio de genes candidatos: pruebas directas y pruebas indirectas.

En un estudio de prueba directa, el supuesto SNP responsable de una enfermedad es genotipificado directamente. El reto de este tipo de estudios es predecir o determinar *a priori* cuáles SNP’s son los responsables del fenotipo de interés. Con frecuencia se sospecha de un SNP si este es uno no sinónimo (ns SNP), es decir, si el SNP cambia el aminoácido en la proteína del gen de interés.

Por otra parte los estudios indirectos de asociación genética difieren de las pruebas directas en el hecho de que el estudio de los SNP’s no son probados directamente, es decir, este

tipo de estudios se basan en un estudio de ligamiento genético en el cuál utiliza “marcadores neutrales” y no hace predicciones sobre la localización del gen responsable de la enfermedad en estudio. Los estudios de asociación indirecta son más frecuentes en estudios de casos- control (3).

El diseño de casos y controles llegó a ser ampliamente reconocido como una aproximación eficiente y científicamente sólida en estudios a principios de los 50’s relacionando el cáncer pulmonar y el hábito de fumar.

A partir de las pruebas indirectas dos estrategias han sido utilizadas para identificar los genes y los polimorfismos que están implicados en el desarrollo de ciertas enfermedades: el análisis de ligamiento y estudios de asociación de genes candidatos.

El análisis de ligamiento requiere el reclutamiento de familias afectadas, mientras que el estudio de genes candidatos es probado por estudios de asociación de sujetos no relacionados (1).

### **Estudios de asociación genética.**

En este tipo de análisis se buscan polimorfismos individuales de genes implicados en la patogénesis de la enfermedad, y así se determina si existe algún tipo de relación con ésta. Para esto, se debe de identificar primero genes candidatos que se cree o se sabe son importantes en la patogénesis de una condición. Para que los genes lleguen a ser candidatos debe existir un extenso estudio de la enfermedad y/ o comparar sus niveles de expresión génica en tejidos normales y enfermos (a través de microarreglos de ARN mensajero o PCR en tiempo real). El próximo paso es el de identificar los diferentes polimorfismos sobre el gen que pudieran estar afectando su función. Por último se debe examinar si los polimorfismos elegidos ocurren más frecuentemente en individuos que tienen la enfermedad, con respecto a una población control, o si este tipo de variación predice el desarrollo de la enfermedad en un estudio de cohorte.

Una de las ventajas de este tipo de estudios de asociación es que los sujetos de estudio son individuos no relacionados, por lo tanto, no se requieren datos fenotípicos y genotípicos de múltiples generaciones. Por otro lado, cabe mencionar, que una limitante es la asociación positiva que puede no presentarse siempre debido a un papel causante del polimorfismo en la patogénesis de la enfermedad. Por ejemplo, las asociaciones de falsos- positivos pueden ocurrir si un diferente grupo étnico (con diferente frecuencia del polimorfismo) está representado en exceso en el grupo de casos y controles (3).

Debido a la eficiencia y al tiempo requerido para completar un estudio de casos y controles en relación a un estudio completo de cohortes, los estudios de casos y controles han proveído pruebas iniciales y han sido, si no la mayor, la fuente de evidencia para muchas de las relaciones establecidas entre exposición- enfermedad. Ya que pueden proveer evidencia para los estimados de un riesgo relativo y atribuible y en algunas ocasiones el riesgo relativo.

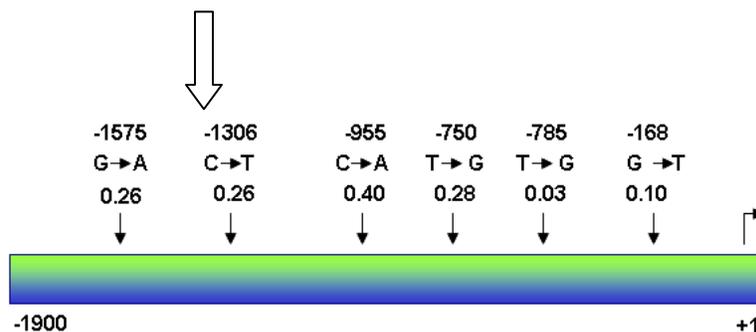
Los estudios de casos y control están generalmente limitados a una enfermedad curable, pero son menos restringidos por la rareza de la enfermedad, mientras que los estudios de cohortes (que incluyen cohortes completas, casos- control anidados o estudios de caso-control) pueden dilucidar diversas enfermedades terminales. El objetivo de estudio con casos- controles de una sola enfermedad como una entidad, permite aumentar el tiempo y los recursos destinados a la recopilación y documentación de la información de la enfermedad (por ejemplo, la patología, el progreso y la histología), proporcionando una base de información más rica para el estudio trayendo consigo beneficios como la reducción potencial en errores de clasificación, así como un análisis más profundo (1).

### **Relación del polimorfismo -1306 C→T con otras enfermedades.**

Hasta el año 2000 (Price, *et al.* 2000), se habían identificado, un total de 15 nuevas variantes en la secuencia del gen de la MMP-2. Todas estas variantes fueron polimorfismos de nucleótidos sencillos (SNP's), entre las que destacan 7 transversiones y 8 transiciones, distribuidas a través de todo el gen; 6 de ellas en el promotor que se pueden observar en la

Fig.9 y adicionalmente una en la región 5<sup>1</sup> UTR, 6 en la región codificante, una en una región intrónica y otra más en la región 3<sup>1</sup>-UTR (17).

Recientemente, se reportó un SNP en el promotor de la MMP-2 localizado a -1306 pares de bases, con respecto al inicio de la transcripción. Este SNP consiste en la sustitución de una citosina (C) por una timina (T), esta sustitución rompe un sitio promotor tipo Sp1 (caja CCACC) mostrando una actividad más baja del promotor el alelo T con respecto al alelo C. Lo anterior debido a la ruptura del sitio Sp1, el cuál es un factor de transcripción expresado ubiquitinadamente que se une a elementos ricos en GC/GT y regula una variedad de genes. La caja CCACC ha mostrado ser esencial para la unión Sp1 y la función del promotor en diversos genes, activando invariablemente la transcripción. El polimorfismo de la MMP2 -1306 C→T que suprime la unión Sp1 tiene el potencial de afectar el nivel y la especificidad de la transcripción del gen (26).



**Fig. 9** Diversos polimorfismos encontrados a la fecha en el promotor de la MMP2. (Tomado de Price *et al.*, 2000)

La asociación entre el polimorfismo -1306 C→T y la susceptibilidad a cáncer humano ha sido investigada en diversos estudios. Ha sido demostrado que el alelo -1306 C está asociado con un incremento en el riesgo de diversos cánceres, incluyendo de pulmón, de

mama, gástrico, oral y colorectal (30). A la fecha, se ha comprobado la asociación que presenta el polimorfismo -1306 C→T con diversas enfermedades (Tabla 2 y 3).

Enfermedad	OR	IC 95%	Población de estudio.	n (Casos-Controles)
HNSCC (Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello)	1.97	1.23 - 3.15	Tailandesa.	239 y 250
Cáncer de colon.	1.959	1.05-3.63	China	126, 126
Cáncer de pulmón	2.12 1.57	1.64- 2.72 1.27-1.95	China.	770 y 777
Cáncer de mama.	2.15	1.13-4.11	Mexicana.	90 y 96
Cáncer de mama.	0.46	0.34-0.63	Mujeres Chinas	462 y 509
Carcinoma esofagico de Células escamosas	6.53	1.16-9.63	Thai China	527 y 777
GCA (adenocarcinoma gástrico de cardías)	3.36	2.34-4.97		356 y 789
Riesgo de metastasis del cáncer durante el diagnóstico.	Sin asociación	0.36-2.20	China	275 y 318
Cáncer de vejiga	Sin asociación		Caucasica	560 y 560

Tabla 2. Asociación del SNP -1306 C→T y su relación con diversas enfermedades

Enfermedades	Frecuencias génicas.					
	Control			Pacientes		
	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T
Adenocarcinoma de gástrico de cardias. (Miao et al., 2003)	0.69	0.29	0.02	0.86	0.12	0
Cáncer de colón (Xu et al., 2004)	0.73	0.25	0.016	0.84	0.15	0.008
Fibrosis Pulmonar Idiopática (2008)	0.62	0.32	0.005	0.77	0.22	0.001
Cáncer de mama (Zhou et al., 2004)	0.68	0.30	0.012	0.82	0.17	0.004
Cáncer de pulmón (Zhou et al., 2005)	0.69	0.28	0.0023	0.82	0.16	0.0014
Cáncer de esofago (Yu et al., 2004)	0.68	0.28	0.0023	0.77	0.21	0.001
Cáncer de mama (Roehe et al., 2006)	0.66	0.32	0.02	0.7	0.24	0.06
Cáncer de pulmón (Rollin et al., 2006)	0.67	0.32	0.001	0.67	0.31	0.002
Cáncer de mama (Delgado-Enciso et al., 2008)	0.52	0.43	0.004	0.7	0.28	0.002
Enfermedades coronarias (Vaškú A. et al., 2004)	0.53	0.42	0.005	0.6	0.35	0.005

Tabla 3. Frecuencias genotípicas en pacientes y controles obtenidas a partir de estudios realizados en el polimorfismo -1306 C/ T del promotor de la MMP2 en diversas enfermedades.

***Objetivo general.***

Determinar la relación del polimorfismo (SNP) -1306 C → T con el desarrollo de la Fibrosis Pulmonar Idiopática (FPI).

## ***Metodología.***

### ***Extracción de ADN***

La extracción de ADN, obtenida previamente en el laboratorio, fue realizada con ayuda del kit BDtract GENOMIC ADN, (Maxim Biotech, Inc.), empleado para aislar rápida y eficientemente ADN genómico de peso molecular alto a partir de sangre total, cultivos celulares, bacterias y tejidos. Este kit no requiere de fenol, cloroformo y de otros compuestos orgánicos para la extracción. El ADN se encuentra libre de ARN, proteínas y enzimas de degradación. Este método es seguro, rápido y simple para la preparación de ADN a partir de diferentes muestras.

### ***Población de estudio.***

A partir del ADN genómico previamente extraído de las muestras de sangre periférica se genotipificaron 268 sujetos control y 133 pacientes con diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Los sujetos fueron todos mestizos mexicanos obtenidos del INER (Instituto de Enfermedades Respiratorias)

A partir de estas muestras se llevó a cabo la identificación del polimorfismo presente en la región -1306 de la MMP-2 por medio de la técnica de PCR- RFLP.

### ***PCR-RFLP.***

Esta técnica radica en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR. En biología molecular, el término **polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción** o **RFLP** (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas, (debido a su variación que presentan entre individuos) y cortadas por las enzimas de restricción, también llamadas endonucleasas.

Para digerir ADN con una enzima de restricción dada, el ADN es mezclado con una enzima en un buffer que es apropiado para llevar a cabo una actividad óptima de la enzima. La mezcla es incubada por un periodo de tiempo (de una hora a toda la noche, dependiendo de la muestra). La capacidad de la enzima de digerir el ADN es comprobado en un gel de electroforesis. Si dos productos de PCR presentan una variación de la secuencia nucleotídica, en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, generarán distintos patrones de fragmentos.

El SNP del promotor de la MMP-2 fue determinado por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR- RFLP).

La región promotora de MMP-2 se amplificó por PCR utilizando iniciadores que flanquean la región promotora (269 pb) que contiene el sitio polimórfico de la metaloproteasa.

Los oligonucleótidos de PCR empleados para amplificar un fragmento de **269** pb para el SNP de la región -1306(G →T), fueron:

#### *OLIGONUCLEÓTIDOS*

Sentido: 5' cttcctaggctggtcctt 3,  
Antisentido: 5' ctgagacctgaagagctaaagaggt 3'

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 15 µl, que contenía [5 ng / µl. ] de ADN, 50mM de MgCl<sub>2</sub>, 25mM Buffer 10X Taq ADN polymerase, 2 mM de dNTPs, 1.5 mM de cada primer y 2.5 U de enzima *Taq* ADN polymerase (Invitrogen, CA).

Reactivos	Cantidades
MgCl <sub>2</sub>	1 µl.
Buffer 10 X	2.5 µl.
dNTP's	2.5 µl.
Primer sense	2.5 µl.
Primer antisense	2.5 µl.
H <sub>2</sub> O	13.75 µl.
Taq Invitro	0.25 µl.
<b>Volumen Total.</b>	<b>25 µl.</b>

Se le agregó a cada reacción 2 µl. de ADN [5 ηg / µl. ]

Las condiciones de PCR fueron.

94° C	94° C	64° C	72° C	72° C
2 minutos	30 segundos	30 segundos	45 segundos	7 minutos


  
**40 ciclos**

El ciclaje fue realizado en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA).

Los productos de la PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2 % y posteriormente fueron digeridos con una enzima de restricción específica (*BfaI*) la cual reconoce al alelo T.

Bfa I

### Secuencia de reconocimiento.

...CTAG...

...GATC...

### Posterior al corte.

...C↓TAG...

...GAT↓C...

Los amplicones fueron digeridos con la endonucleasa de restricción adecuada. La endonucleasa de restricción usada fue *BfaI* (-1306 C→T). Una alícuota de 15- $\mu$ l del producto de PCR fue digerida a 37 °C durante toda la noche en una reacción de 20- $\mu$ l, que contenía:

Muestra	15 $\mu$ l.
Enzima Bfa	1.5 $\mu$ l.
Buffer reactivo	2 $\mu$ l.
H <sub>2</sub> O	1.5 $\mu$ l.
<b>Volumen Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l.</b>

Posterior a la digestión, los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

## Resultados.

Para poder identificar la secuencia específica de nucleótidos (SNPs) en la región -1306 del promotor de la MMP2, se empleó la técnica de RFLP que utiliza enzimas de restricción (también llamada endonucleasa), que reconocen sitios específicos, en este caso la enzima *Bfa I*, reconoció el sitio Sp1 del promotor cortándolo y permitiendo así observar la variación de los genotipos (homocigos C/C o T/T y heterocigos C/T) entre los individuos estudiados, facilitando así el análisis estadístico de los datos para determinar el riesgo relativo de padecer FPI.

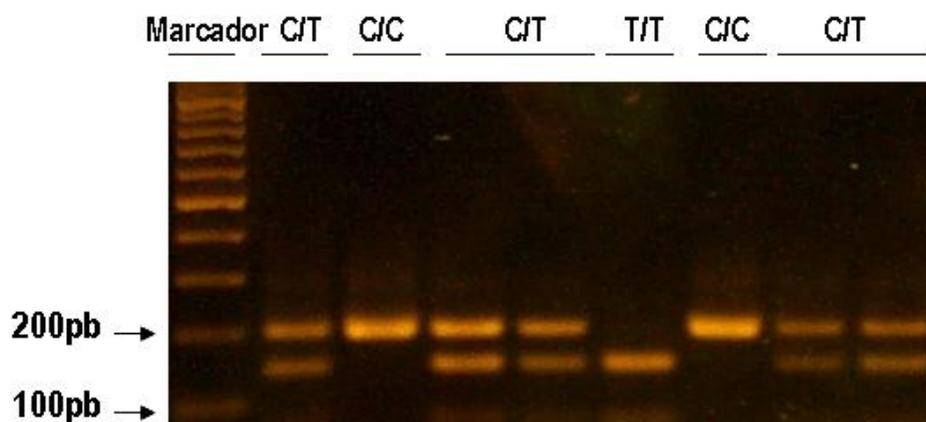


Fig. 10 Gel de agarosa al 2%, mostrando los genotipos C/C, C/T, T/T de la MMP2 para el polimorfismo de la región -1306 C→T

El gel se interpretó de la siguiente manera: para el Genotipo C/C, se obtuvo un producto integro de 195 pb (homocigoto), el genotipo T/T es el fragmento totalmente digerido (homocigoto) obteniendo dos productos uno de 31 pb, que no se aprecia en la foto, debido a su bajo peso molecular y otro de 164 pb; finalmente el genotipo C/T produce el producto integro de 195 pb más el producto de la digestión (heterocigoto) que son dos productos uno de 164 pb y otro de 31 pb (Fig. 10).

Los datos de la genotipificación son presentados en la tabla 2. Las frecuencias de los tres genotipos para la región -1306 de la MMP2 entre controles no fueron diferentes de aquellos valores esperados a partir del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p=.9688$ ). Sin embargo las frecuencias genotípicas fueron diferentes entre cada uno de nuestros pacientes

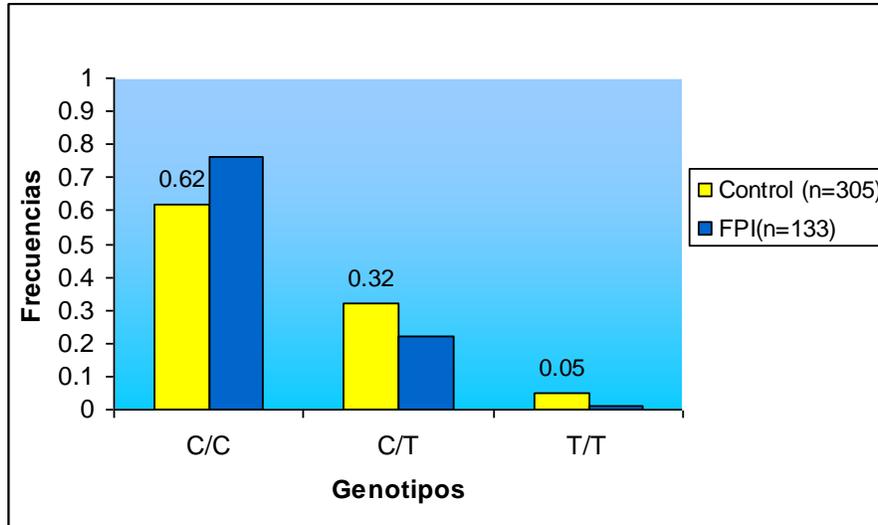
( $p=0.0085$ ), con el genotipo -1306 C/C sobreexpresado. El análisis estadístico mostró que los genotipos -1306C/C presentaban un riesgo dos veces más elevado de desarrollar FPI (OR, 1.99 95% CI, del 1.22-3.31), comparado con aquellos que no lo presentaban.

Las frecuencias alélicas para el alelo- 1306C y el -1306 T de la MMP2 fueron de 0.78 y 0.22, respectivamente, entre 268 controles y de 0.88 y 0.12, respectivamente, entre 133 pacientes (**Tabla 4**). Las frecuencias de los tres genotipos de la MMP2 en controles fueron C/C con 0.623, C/T 0.32; y T/T, 0.055, lo cual correlaciona perfectamente con la Ley del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p=.96$ ).

Genotipo	Pacientes (n=133)		Controles (n=268)		<i>p</i>	OR (95% IC)	
MMP2 -1306 C/T	n		n				
C/C	102	0.767	167	0.623	<b>0.005</b>	1.99	1.22 - 3.31
C/T	29	0.218	86	0.32	<b>0.05</b>	0.58	0.34 - 0.96
T/T	2	0.0150	15	0.055	<b>0.12</b>	0.28	0.04 - 1.30

**Tabla 4. Frecuencias genotípicas para el polimorfismo de la región- 1306 del promotor de MMP-2 en pacientes con FPI y sujetos control.**

En la siguiente gráfica (Fig. 11) se puede apreciar una mayor frecuencia para el genotipo CC en individuos con FPI, a diferencia de los individuos portadores de los genotipos CT y TT respecto a los controles.



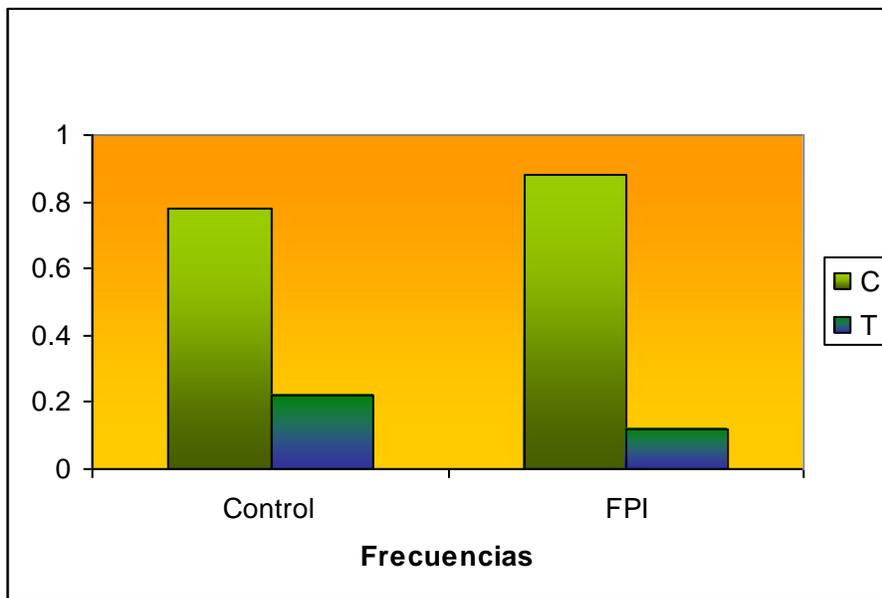
**Fig. 11 Frecuencias genotípicas de pacientes con FPI y control.**

La tabla 5 muestra los valores obtenidos para las frecuencias alélicas (C y T), a partir del programa EpiInfo, apreciándose un aumento en la frecuencia del alelo C en pacientes con FPI con respecto a los controles.

MMP2-1306 C/T		
Allelos		
	C	T
Pacientes	233 (87.59%)	33 (12.41%)
Controles	420 (78.36%)	116 (21.64%)
P value	0.0015443	
OR (95% CI)	0.5128 (0.3374-0.7793)	

**Tabla 5. Frecuencias alélicas para MMP2 en pacientes con FPI y sujetos controles.**

En la siguiente gráfica (Fig.12) se observan frecuencias más altas para el alelo C respecto al alelo T, tanto en controles como en pacientes con FPI.



**Fig. 12 Frecuencias alélicas para sujetos con control y con FPI.**

Finalmente en la tabla 7, se conjuntan la  $X^2$  y  $p$  de los valores observados en genotipos alelos y en equilibrio de Hardy-Weinberg, que me permitió describir el contenido genético de mi población diploide, estableciendo así que, después de una generación, las frecuencias genotípicas de el locus -1306 puede representarse en función de sus frecuencias alélicas de sujetos controles y pacientes con FPI.

	Hardy-Weinberg		Genotipos		Alelos	
	$\chi^2$	$p$ value	$\chi^2$	$p$ value	$\chi^2$	$p$ value
Control	0.777406014	0.3747				
FPI	0.001406021	0.9688	9.531	0.00851863	10.025	0.0015443

**Tabla 7.  $X^2$  en el equilibrio de H-W,  $X^2$  de asociación para los alelos y genotipos del polimorfismo -1306 C/T.**

## *Discusión y Conclusiones.*

Las metaloproteasas de matriz pueden degradar un amplio espectro de proteínas de matriz extracelular dando como resultado un equilibrio en la síntesis, remodelación y destrucción de ésta, sin embargo, la pérdida de dicho equilibrio ha sido asociado a la invasión de cáncer y metástasis, destrucción de cartílago en la artritis, ruptura de la placa aterosclerótica y desarrollo de aneurismos. Estudios diversos han demostrado variaciones en las secuencias en el promotor de diversos genes de MMPs mostrando efectos alelo-específicos en la actividad transcripcional de dichos genes (28).

A partir de microarreglos de oligonucleótidos se ha determinado que la expresión de la MMP2 se encuentra fuertemente regulada de manera positiva en tejidos de la FPI, mostrando un incremento en los tejidos de lavados bronquio alveolares (14). La MMP2 (gelatinasa A) tiene una actividad colagenolítica tipo IV y esta constitutivamente expresada por la mayoría de las células de tejido conectivo que incluyen tanto células endoteliales como osteoblastos, fibroblastos y mioblastos (17). Su activación mediante uniones a membrana de la pro-MMP2 asegura su actividad proteolítica, predominantemente en contra de componentes de la membrana basal, favoreciendo su ruptura (evento importante en la FPI), a través de la invasión de fibroblastos dentro de los espacios alveolares y en los focos fibroblásticos. Así mismo puede contribuir también al fallo de la reparación ordenada de las células epiteliales tipo I alveolares dañadas, afectando la repitelialización normal y produciendo un papel deletéreo adicional por la inducción de apoptosis epitelial (14).

A la fecha, la mayoría de los estudios en MMP2 se han enfocado en demostrar el papel esencial en la invasión por células promotoras durante la angiogénesis tumoral, artritis y aterogénesis, así como la metástasis tumoral donde los niveles de expresión de la MMP2 pueden estar relacionados con el grado tumoral. Las enfermedades en las cuales el papel de la MMP2 ha sido demostrado están caracterizadas por una variación en la susceptibilidad individual (17).

La base de la variación en la susceptibilidad individual puede ser dividida en dos componentes principales, uno genético-molecular y otro ambiental, que se interrelacionan constantemente a lo largo de la vida de cada ser vivo.

La existencia de diferentes variantes en una determinada región del ADN ha llevado a la generación de un nuevo concepto: el polimorfismo de ADN como marcador genético. Bajo este término estaría incluido todo aquel carácter mendeliano que se presenta al menos bajo dos formas alternativas (denominadas cada una de ellas alelo) en una población, con una frecuencia siempre superior al 1%, y cuyo mantenimiento no depende de la mutación recurrente.

Algunos de estos polimorfismos están presentes en regiones promotoras dando como resultado un efecto alelo-específicos en la regulación de la transcripción de genes de MMPs. El polimorfismo de la región -1306 C→T se mantiene como uno de los que han demostrado su capacidad para alterar los niveles de expresión de la MMP-2 y ha sido asociado con el desarrollo de cáncer de colon, estómago, cavidad oral, mama y de pulmón. Sin embargo, los estudios en este tema son pocos y han sido realizados principalmente en poblaciones Chinas (4)

De esta forma, los polimorfismos en los genes de MMPs pueden ser buenos candidatos para elucidar factores genéticos de riesgo presentes en enfermedades cuya patogénesis involucra una degradación y remodelación activa de matriz extracelular (28) es por esto que en el presente estudio, se investigó la posible asociación de el polimorfismo (SNP) -1306 C→T de la MMP-2 con el desarrollo de la FPI en una población mexicana.

El sitio Sp1, entre otros elementos promotores como el sitio AP-2, ha permitido comprobar su importancia en la regulación de la expresión constitutiva de la MMP-2

La presencia del sitio promotor Sp1 en el alelo -1306 C de la MMP-2 puede aumentar la transcripción, la cuál, ha sido corroborada, incluso, en experimentos de transfección transitoria *in vitro*, de manera que la expresión de la MMP-2 es mayor en individuos que portan el genotipo CC, que en aquellos que presentan un genotipo CT o TT. Lo anterior debido a la transición C→T generalmente funcional en la región -1306 del gen de la MMP-

2, destruyendo un sitio promotor tipo Sp1 (caja CCACC), generando una actividad del promotor sorprendentemente más baja con el alelo T.

Los métodos de análisis de ligamiento tradicionales para mapear genes de desordenes mendelianos no han sido tan exitosos en estudios de enfermedades complejas incluyendo enfermedades cardíacas, cáncer y desórdenes artríticos. Es por esto que la atención se ha enfocado en los de marcadores genéticos antes mencionados, SNPs.

Los datos presentados con anterioridad en diversos trabajos muestran que la ausencia de la secuencia consenso Sp1 del alelo -1306 T de la MMP-2 produce un nivel más bajo de proteína de MMP-2 en individuos que portan el genotipo CT o TT a diferencia de aquéllos que llevan el genotipo CC. Debido a que la MMP-2 ha mostrado jugar un papel muy importante en la FPI, si ésta tuviera una expresión reducida, entonces, debería existir a una reducción en el riesgo de presentarla

El análisis estadístico mostró que los sujetos que portaban el genotipo -1306 CC presentaron un riesgo relativo 2 veces más elevado de presentar FPI (OR 1.99, 95 % IC 1.22-3.31,  $p= 0.005$ ), comparado con sujetos portadores de al menos una variante del alelo T, lo que sugiere que el alelo C, podría ser un alelo de riesgo.

Las frecuencias alélicas para el alelo C fueron de 0.783 y para el alelo T 0.216 en controles, comparados con los valores de 0.876 y 0.1241 en pacientes con FPI ( $p$  value 0.0015443). Las distribuciones del genotipo en pacientes fueron de 76.7% (CC), 21.8% (CT) y 1.5 % (TT) y para los controles fueron de 0.62 (CC), 0.32 (CT) y 0.005 (TT). De acuerdo con nuestros datos las frecuencias en este polimorfismo no se desviaron de los valores esperados por el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p = 0.96$  y  $0.37$ , respectivamente), razón por la cual consideramos que en el momento actual no estaría bajo una presión de selección de importancia y, por tanto, no es esperable un cambio en las frecuencias de generaciones futuras.

A pesar de que los pacientes homocigotos TT no funcionaron para demostrar una diferencia con los controles, debido a la rareza de este genotipo, tanto en pacientes como en

controles, la frecuencia del heterocigoto (CT) fue significativamente más baja (0.218 contra 0.32 ;  $\chi^2 = 4.11$ ,  $p= 0.05$ ).

Al comparar las frecuencias alélicas del grupo control del presente trabajo (C=0.78 y T=0.22) con las obtenidas en el estudio de cáncer de mama en una población mexicana (C =0.74 y T =0.26) publicado el año del 2008 por el grupo de trabajo de Delgado-Enciso se encontró una similitud entre estas frecuencias.

Lo cual demuestra que a pesar de que la muestra empleada en ambos estudios, difirió en cantidad y lugar (Colima / D.F.), la similitud en la proporción de las frecuencias alélicas es muy grande, por lo tanto podemos inferir que la proporción en la que se presentan los alelos de dicho polimorfismo en nuestro país se mantienen constantes. Diversos estudios en otras poblaciones han dado lugar a resultados contradictorios, como aquellos reportados por Elander *et al*, 2006, en el cual no fue encontrada ninguna asociación entre los polimorfismos del promotor de la MMP2 y cáncer de colon en una población Sueca. Otro estudio un poco mas reciente llevado a acabo en una población de Brasil no mostró asociación entre el polimorfismo -1306 C→T y cáncer de mama.

A pesar de los datos contradictorios arriba mencionados, podemos observar en la tabla 3 (*véase la introducción*) la semejanza entre los valores de las frecuencias del genotipo -1306 C/C del presente estudio (0.767) y los obtenidos en estudios realizados en diversas enfermedades, donde la frecuencia con mayor cercanía se presenta en el estudio de cáncer de colon realizada por el equipo de Xu *et al*, 2004.

Estos datos sugieren que esta variante génica, la cual influye en la trascripción del gen de la MMP2 es un candidato importante para probar su asociación en un amplio espectro de patologías en las cuales el papel de la MMP2 esta involucrado, incluyendo aterogénesis, invasión tumoral, metástasis y de acuerdo a los resultados obtenidos también en el desarrollo de la FPI.

La información obtenida, aunada a las bibliografía consultada , nos permitirán realizar en un futuro un análisis más profundo de la variabilidad en el promotor del gen de la MMP-2 el cual se espera, podrá ayudarnos a dilucidar y entender de mejor forma la susceptibilidad individual, abriendo puertas a terapias mas personalizadas. Hasta ahora se han encontrado una serie de polimorfismos en el promotor de la MMP-2, los cuáles se han relacionado con múltiples enfermedades, permitiendo llevar a cabo estudios multivariados, incluyendo el desequilibrio por ligamiento. Es por esto que sería interesante continuar con el estudio de más polimorfismos, buscando al mismo tiempo la regulación existente entre ellos, así como con otros promotores de MMPs, ya que como se ha mencionado con anterioridad, cualquier variante genética que se presente naturalmente puede afectar el nivel de expresión del gen y por lo tanto se esperaría un impacto en la progresión o desarrollo de la FPI.

## **Abreviaturas.**

ADAM: Metaloproteasa con motivos de desintegrina.

ADAMTS: Metaloproteasa con motivos de desintegrina tipo tromboispondina.

Alfa-SMA: alfa-actina de musculo liso.

AP-1: proteina activadora 1

AP-2: proteína activadora 2

BAL: lavado bronquio alveolar.

Beta-catenina/Tcf-4

CA-MMP: Metaloproteasa en motivos de arreglo de cisteína.

dbSNP: double strand single nucleotide polymorphism.

ADN: ácido desoxiribonucleico.

FPI- fibrosis pulmonar idiopática.

GAGs: Glucosamino glucanos.

IGF-1: Factor de crecimiento

IIP- neumonías intersticiales idiopáticas.

ILD- por sus siglas en inglés interstitial lung diseases, enfermedades pulmonares intersticiales.

MEC- matriz extracelular.

MMPs- metaloproteasas de matriz.

MT-MMPs- MMPs tipo membrana.

NF-kappa B:

OR: Odd Ratio

pb- pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RFLP: polimorfismo de longitud de fragmento de restricción.

ARN: ácido ribonucleico.

SNP's- polimorfismos de nucleótido sencillo.

TGF- $\beta$ - factor de crecimiento transformante beta.

TGF-Beta: factor de crecimiento transformante beta.

TIMPS- inhibidores Tisulares de Metaloproteasas.

TNF-alfa: factor de necrosis tumoral alfa.

TNF- $\alpha$  - factor de necrosis tumoral alfa.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

## **Bibliografía.**

1. Caporasso N, Rothman N, Wacholder S., Case-control studies of common alleles and environmental factors. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1999;(26):25-30, USA.
2. Chavey C., Mari B., Monthouel M.N, Bonnafous S., Anglard P., Van Obberghen E, Tartare-Deckert S. Matrix Metalloproteinases Are Differentially Expressed in Adipose Tissue during Obesity and Modulate Adipocyte Differentiation *J. Biol. Chem.*, Vol. 278, Issue 14, 11888-11896, 2003 April 4, France.
3. Checa C., Artículo de Revisión Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2007; 20 (3): 213-221
4. Delgado-Enciso I, Cepeda-Lopez FR, Monroy-Guizar EA, Bautista-Lam JR, Andrade-Soto M, Jonguitud-Olguin G, Rodriguez-HeARNdez A, Anaya-Ventura A, Baltazar-Rodriguez LM, Orozco-Ruiz M, Soriano-HeARNdez AD, Rodriguez-Sanchez IP, Lugo-Trampe A, Espinoza-Gomez F, Michel-Peregrina ML., Matrix metalloproteinase-2 promoter polymorphism is associated with breast cancer in a Mexican population. *Gynecol Obstet Invest.* 2008;65(1):68-72. Epub 2007 Sep 13. México.
5. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993 Jul;122(1):103-11.
6. Elander N, Söderkvist P, Fransén K., Matrix metalloproteinase (MMP) -1, -2, -3 and -9 promoter polymorphisms in colorectal cancer, *Anticancer Res.* 2006 Jan-Feb;26(1B):791-5, Suecia.
7. Iniesta R, Guinó E, Moreno V., Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gac Sanit.* 2005 Jul-Aug;19(4):333-41, Barcelona España.
8. Jiménez LP, Merchant H, 2003, *Biología Molecular y Celular*, Pearson Prentice Hall, México.

9. Kader AK, Shao L, Dinney CP, Schabath MB, Wang Y, Liu J, Gu J, Grossman HB, Wu X., Matrix metalloproteinase polymorphisms and bladder cancer risk. *Cancer Res.* 2006 Dec 15;66(24):11644-8, USA.
10. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Apr;157(4 Pt 1):1301-15. USA.
11. Lamblin N, Bauters C, Hermant X, Lablanche JM, Helbecque N, Amouyel P. Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease. Centre Hospitalier Universitaire de Lille, Lille Cedex, France. *JouARNI of the American College of Cardiology*, Volume 40, Issue 1, Pages 43 - 48 N. Lamblin.
12. Miao X, Yu C, Tan W, Xiong P, Liang G, Lu W, Lin D., A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (-1306C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2003 Jul 15;63(14):3987-90, China.
13. Pardo A, Selman M, Kaminski N. Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(6-7):1141-55. Epub 2007 Dec 8, México.
14. Pardo A, Selman M., Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc Am Thorac Soc.* 2006 Jun; 3(4):383-8, México.
15. Pardo A, Selman M., Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci.* 2002 Aug 1;7:d1743-61, México.
16. Parks WC, Shapiro SD., Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res.* 2001;2(1):10-9. Epub 2000 Dec 29, USA.
17. Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2001 Mar 9;276(10):7549-58. Epub 2000 Dec 12, Oxford.
18. Roehle AV, Frazzon AP, Agnes G, Damin AP, Hartman AA, Graudenz MS., Detection of polymorphisms in the promoters of matrix metalloproteinases 2 and 9

- genes in breast cancer in South Brazil: preliminary results. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Mar;102(1):123-4. Epub 2007 Jan 27.
19. Rollin J, Régina S, Vourc'h P, Iochmann S, Bléchet C, Reverdiau P, Gruel Y., Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2007 May;56(2):273-80. Epub 2007 Jan 8. Francia.
  20. Selman M., Pardo A., Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/ Fibroblastic cross- talk disorder. *Respir Res.* 2002, 3:3. Epub 2001 Oct. 11. Review.
  21. Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, y Ando M. Characteristic Elevation of Matrix Metalloproteinase Activity in Idiopathic Interstitial Pneumonias, First Department of InteARNI Medicine. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 162. pp 1949–1956, 2000, Japan.
  22. Uhal BD, Joshi I, True AL, Mundle S, Raza A, Pardo A, Selman M. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol.* 1995 Dec;269(6 Pt 1):L819-28.
  23. Vasků A, Goldbergová M, Izakovicová Hollá L, Sisková L, Groch L, Beránek M, Tschöplová S, Znojil V, Vácha J., A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease. *Matrix Biol.* 2004 Jan;22(7):585-91, República Checa.
  24. Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M, Uhal BD. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am J Physiol.* 1999 Dec;277(6 Pt 1):L1158-64.
  25. Westermarck J, Kähäri VM., Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J.*, 1999 May;13(8):781-92.
  26. Xu E, Lai M, Lv B, Xing X, Huang Q, Xia X., A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Nov 19;324(3):999-1003, China.
  27. Yan C, Boyd DD., Regulation of matrix metalloproteinase gene expression, *J Cell Physiol.* 2007 Apr;211(1):19-26, USA.

28. Ye S,. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000 Dec;19(7):623-9, Reino Unido.
29. Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D., Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res.* 2004 Oct 15;64(20):7622-8, China.
30. Zhou Y, Yu C, Miao X, Tan W, Liang G, Xiong P, Sun T, Lin D., Substantial reduction in risk of breast cancer associated with genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes, *Carcinogenesis.* 2004 Mar; 25(3):399-404. Epub 2003 Nov 6, China.
31. Zhou Y, Yu C, Miao X, Wang Y, Tan W, Sun T, Zhang X, Xiong P, Lin D., Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 and lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis.* 2005 Jun;26(6):1117-21. Epub 2005 Feb 24, China.
32. Selman M, King TE, Pardo A; American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* 2001 Jan 16;134(2):136-51. México.