

“Genotipificación y expresión fenotípica del polimorfismo de la metaloproteinasa de matriz extracelular 9 (MMP9 -1562 C/T) y su inhibidor tisular endógeno (TIMP1 372 T/C): Asociación en lesión y falla cardíaca en pacientes sépticos”.

César Gustavo Bermúdez Mejía

Trabajo de Grado para Optar el título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas

Director

Diego Torres Dueñas

Msc, PhD en Farmacología

Codirectoras

Clara Ines Vargas Castellanos

Msc en Genética

Silvia Milena Becerra Bayona

PhD en Biomateriales

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Maestría en Ciencias Básicas

Bucaramanga

2018

Dedicatoria

“Para mis padres y a todas las personas que me acompañaron en este camino”.

Agradecimientos

A Dios por darme salud y tranquilidad para dar cada paso con firmeza. A mi familia por su paciencia, apoyo incondicional y sus palabras de ánimo para nunca desfallecer en este camino lleno de dificultades y alegrías.

A la Universidad Autónoma de Bucaramanga UNAB, Universidad Industrial de Santander UIS y COLCIENCIAS por permitirme realizar mi proyecto de Investigación y darme las herramientas adecuadas para mi formación.

A cada uno de los tutores, profesores, estudiantes, compañeros, amigos y evaluadores que con sus recomendaciones y consejos me ayudaron a mejorar cada día en mi formación y proyecto de investigación.

Finalmente agradezco a la Dra. María Eugenia Cárdenas y el Dr. Sergio Eduardo Serrano Gómez, por su dedicación y asesoría para poder lograr la culminación del proyecto de investigación y mi formación.

Tabla de contenido

	Pág.
1. Identificación y planteamiento del problema	17
2. Pregunta de investigación.....	21
3. Justificación.....	22
4. Marco conceptual	26
4.1 Sepsis	26
4.1.1 Epidemiología	28
4.1.2 Fisiopatología.....	29
4.1.3 Diagnóstico y tratamiento	33
4.2 Disfunción cardíaca en sepsis	34
4.2.1 Biomarcadores de disfunción miocárdica inducida por sepsis	37
4.2.2 NT-proBNP	37
4.2.3 Troponina I.....	38
4.3 Metaloproteinasas de matriz	38
4.3.1 Metaloproteinasa de matriz extracelular 9	40
4.3.2 Polimorfismo MMP9 -1562 C/T.....	41
4.3.3 Inhibidor tisular TIMP1	42
4.3.4 Polimorfismo TIMP1 372 T/C.....	42
4.4 Estudio de genética de poblaciones en salud	44

5. Objetivos	46
5.1 Objetivo general	46
5.2 Objetivos específicos.....	46
6. Materiales y métodos	47
6.1 Tipo de estudio.....	47
6.2 Población de estudio	47
6.3 Variables de estudio	49
6.4 Muestras biológicas	52
6.5 Detección de los polimorfismos del gen TIMP1 y MMP9	53
6.5.1 Extracción de ADN.....	53
6.5.2 Amplificación y detección del SNP MMP9 -1562 C/T	54
6.5.3 Detección del polimorfismo SNP TIMP1 372 T/C.....	56
6.6 Determinación de la concentración de MMP9 y TIMP1 en plasma	58
6.7 Cuantificación de biomarcadores cardíacos.....	58
6.8 Análisis estadístico.....	59
6.8.2 Determinación del modelo de herencia para análisis de asociación	60
6.8.3 Frecuencias de los genotipos y de los alelos.....	60
6.8.4 Análisis de genética poblacional.....	61
6.8.5 Relación de los polimorfismos con los niveles plasmáticos de MMP9 y TIMP1	61
6.8.6 Asociación de los polimorfismos con falla cardíaca y lesión cardiaca.....	62

6.9 Condiciones éticas	63
7. Resultados	65
7.1 Características de la población con sepsis	65
7.2 Determinación del modelo de herencia para los análisis de asociación.	67
7.3 Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos (MMP9 -1562 C/T; TIMP1 372 T/C) y su asociación en sepsis.	69
7.4 análisis de genética poblacional.....	71
7.5 Relación de los niveles plasmáticos de mmp9 y timp1, con su respectivo polimorfismo.	72
7.6 Asociación de los polimorfismos con disfunción cardíaca y lesión cardíaca.....	74
8. Discusión.....	77
9. Conclusiones	84
10. Recomendaciones.....	85
11. Divulgación	86
12. Referencias.....	87

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Parámetros para determinar el puntaje de severidad SOFA.....	27
Tabla 2 Clasificación de las metaloproteinasas, según el sustrato degradado.	39
Tabla 3. Variables analizadas.....	49
Tabla 4. Cebadores y enzimas usadas para la detección de los SNPs estudiados.....	55
Tabla 5. Caracterización de la población de estudio.....	66
Tabla 6. Modelos de herencia para el SNP MMP -1562 C/T.	68
Tabla 7 Modelos de herencia para el SNP TIMP1 372 T/C en mujeres.	68
Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas del SNP MMP9 -1562 C/T.....	70
Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP TIMP1 372 T/C	70
Tabla 10. Prevalencia de genotipos del SNP MMP9 -1562 C/T en pacientes con sepsis por cuartiles de niveles plasmáticos de MMP9.	73
Tabla 11. Prevalencia de genotipos del SNP TIMP1 372 T/C en pacientes con sepsis por cuartiles de niveles plasmáticos de TIMP1.....	74
Tabla 12. Biomarcadores en falla cardíaca y lesión cardíaca en sepsis.	75
Tabla 13. Asociaciónn del SNP MMP9-1562 C/T con falla cardíaca y lesión cardíaca subclínica aguda.	76
Tabla 14. Asociación del SNP TIMP1 372 T/C con falla cardíaca y lesión cardíaca subclínica aguda.	76

Lista de Apéndices

(Ver apéndices adjuntos en el CD y pueden visualizarlos en la Base de Datos de la Biblioteca UIS)

Apéndice A. Flujograma de diagnóstico clínico en sepsis

Apéndice B. Flujograma de selección de población de estudio

Apéndice C. Autorización del director del grupo de investigación MINEN

Apéndice D. Protocolo de extracción de ADN

Apéndice E. Validación de la detección de los polimorfismos

Apéndice F. Amplificación y detección del SNP MMP9 -1562 C/T

Apéndice G. Ampliación y detección del SNP TIMP1 372 T/C

Apéndice H. Asociación de los modelos de herencia de los SNPs

Apéndice I. Análisis de genética de poblaciones

Apéndice J. SNPs estudiados con niveles plasmáticos de MMP9 y TIMP1

Apéndice K. Certificado de divulgación evento nacional

Apéndice L. Certificado de divulgación evento internacional

Glosario

ALELO: formas alternativas de un gen en un locus dado.

BIOMARCADOR: es un agente bioquímico o de cualquier naturaleza, que indica un estado biológico que ocurre a nivel celular o molecular y está asociado con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad.

CHOQUE SÉPTICO: subcategoría de la sepsis en la que las alteraciones orgánicas y del metabolismo celular son lo suficientemente profundas como para aumentar considerablemente la mortalidad.

DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO: es la tendencia de los alelos en dos loci separados, pero ligados, de encontrarse y segregarse juntos.

EQUILIBRIO DE HARDY WEINBERG: explica como las frecuencias alélicas en una generación se pueden usar para calcular las proporciones genotípicas de la siguiente generación de una población, que se aparee al azar en donde no hay selección, mutación o migración.

ENZIMA DE RESTRICCIÓN: endonucleasa que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar en un punto en concreto.

EXON: parte del gen que codifica para una parte de la proteína

FALLA CARDÍACA AGUDA: anormalidad funcional o estructural del corazón, que ocasiona una disminución del gasto cardíaco, que se puede detectar por síntomas clínicos y biomarcadores bioquímicos como el Péptido Natriurético NT terminal.

FENOTIPO: conjunto de caracteres visibles o cuantificables que un gen presenta como resultado de la interacción con el medio externo.

GENOTIPO: pareja de alelos observados en un locus determinado, heredados de padre y madre de manera independiente.

HAPLOTIPO: constitución genética de los individuos con respecto a un miembro de un par de alelos o conjuntos de genes que están estrechamente relacionados y tienden a ser heredados en bloque.

INHIBIDOR TISULAR DE MATRIZ EXTRACELULAR: proteína de membrana que realiza inhibición endógena, principalmente de la MMP9.

CEBADOR: secuencias de oligonucleótidos cortas, que son complementarias a las secuencias de ADN y que permite su respectiva amplificación.

INTERLEUCINAS: proteínas secretadas por leucocitos que intervienen en el sistema inmune.

LESIÓN CARDÍACA AGUDA: daño de las fibras del músculo cardíaco por una fuerza externa, la cual se puede detectar subclínicamente por medio de la medición de Troponina I.

MATRIZ EXTRACELULAR: porción acelular de un tejido, producido y secretado por las células. Su función principal es dar soporte estructural y nutricional a las células circundantes.

METALOPROTEINASA: enzima de tipo proteasa dependiente de zinc, cuya función principal es mantener el equilibrio de los componentes de la matriz extracelular.

METALOPROTEINASA 9: proteasa con comportamiento de zimógeno, que degrada principalmente gelatina del componente de matriz extracelular por medio del dominio hemopexina.

Péptido Natriurético Cerebral N- terminal: el péptido natriurético cerebral contiene 32 aminoácidos, tiene estructura circular. Es sintetizado como una prohormona, que puede ser descompuesta en una molécula activa (BNP) e inactiva (NT-proBNP), las cuales son secretadas por los cardiomiocitos en los ventrículos en respuesta al estiramiento causado por el aumento del volumen de sangre ventricular.

POLIMORFISMO: variantes de una secuencia de ADN particular, con una frecuencia en la población >1%, que pueden generar o no cambios en la expresión y función de sus proteínas.

POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN: método para identificar la presencia de un polimorfismo por medio del uso de enzimas de restricción, que permiten identificar los cambios simples de nucleótidos al estudiar los patrones de fragmentos de ADN obtenidos por medio de electroforesis.

POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO SENCILLO: variación de un único nucleótido en una secuencia genética, en relación con el gen silvestre.

PROMOTOR: regiones del ADN que permiten el inicio de la transcripción de un gen particular, y se encuentran cerca de los sitios de inicio de transcripción.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: método *in vitro* que tiene como objetivo producir grandes cantidades de fragmentos específicos de ADN, por medio de iniciadores que flanquean un sitio específico.

SEPSIS: proceso de reacción inmune exacerbado, inducido por un agente infeccioso donde se evidencia una disfunción orgánica que puede ocasionar la muerte.

TROPONINA: es un complejo de tres proteínas reguladoras (troponina C, troponina I y troponina T) que forma parte integral de la contracción en el músculo cardíaco.

RESUMEN

TITULO: GENOTIPIFICACIÓN Y EXPRESIÓN FENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO DE LA METALOPROTEINASA DE MATRIZ EXTRACELULAR 9 (MMP9 -1562 C/T) Y SU INHIBIDOR TISULAR ENDÓGENO (TIMP1 372 T/C): ASOCIACIÓN EN LESIÓN Y FALLA CARDÍACA EN PACIENTES SÉPTICOS*.

AUTORES: BERMÚDEZ MEJÍA César Gustavo**, TORRES DUEÑAS Diego, VARGAS CASTELLANOS Clara ines, BECERRA BAYONA Silvia Milena.

PALABRAS CLAVES: Falla cardíaca, lesión, MMP9, polimorfismo de nucleótido sencillo SNP, sepsis, TIMP1.

DESCRIPCIÓN

El presente estudio tiene como objetivo determinar si el SNP MMP9 -1562 C/T y el SNP TIMP1 372 T/C), presentan asociación con disfunción cardiovascular secundaria a sepsis. Se diseñó un estudio de cohorte transversal analítico, donde se estudiaron 270 pacientes con sepsis y 270 sin sepsis-infectados según el consenso Sepsis-3, procedentes de la ciudad de Bucaramanga. Se realizó la respectiva genotipificación de los polimorfismos por medio de RFLP y los individuos con sepsis se clasificaron en categorías utilizando biomarcadores cardíacos (Troponina I y NT-proBNP), con los respectivos puntos de corte, para lesión y disfunción cardíaca aguda subclínica. Se realizó un análisis bivariado (Chi² y test de Wilcoxon) en sepsis, se determinó la relación de los polimorfismos con su expresión fenotípica con los niveles plasmáticos de MMP9 y TIMP1 (Kruskall Wallis, Chi² tendencia) y la asociación de los SNPs con lesión y falla cardíaca por medio de una regresión logística; se usó el software RSTUDIO, Arlequín y la plataforma SNPstats. El alelo polimórfico T del SNP MMP9 tuvo una frecuencia del (7,3%) y la presencia del alelo C polimórfico del SNP TIMP1 presento una frecuencia del (34,3%). Los polimorfismos no se asociaron con la expresión de su fenotipo ($p = > 0,05$), además el SNP MMP9 no se asoció con lesión miocárdica ($p = 0,5$), ni con falla cardíaca ($p = 0,4$), el SNP TIMP1 presento un ($p = > 0,1$) en relación con los dos desenlaces, estratificándolos por género. Con lo anterior se infiere que los alelos polimórficos no tienen un efecto en la presencia de altos niveles plasmáticos de MMP9 y TIMP1 y ninguno de los SNPs fueron asociados en lesión o falla cardíaca desenlaces que ocasionan una disfunción cardiovascular secundaria a sepsis en la población estudiada.

*Trabajo de grado

** Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básica Biomédicas. Directora de trabajo de grado Diego Torres Dueñas. Msc y PhD en farmacología. Codirectoras de trabajo de grado Clara Ines Vargas Castellanos. Msc en genética y Silvia Becerra Bayona PhD en biomateriales.

ABSTRACT

TITLE: GENOTYPING AND PHENOTYPIC EXPRESSION OF THE MMP9 -1562 C/T (MATRIX METALLOPROTEINASE 9) AND TIMP1 372 T/C (ENDOGENOUS TISSUE INHIBITOR 1) POLYMORPHISMS: ASSOCIATION WITH INJURY AND HEART FAILURE IN SEPTIC PATIENTS*.

AUTHORES: BERMÚDEZ MEJÍA César Gustavo**, TORRES DUEÑAS Diego, VARGAS CASTELLANOS Clara ines, BECERRA BAYONA Silvia Milena.

KEY WORDS: Heart failure, injury, MMP9, single nucleotide polymorphism SNP, sepsis, TIMP1.

DESCRIPTION

The objective of this study is to determine whether the SNP MMP9 -1562 C / T and the SNP TIMP1 372 T / C) are associated with cardiovascular dysfunction secondary to sepsis. A cross-sectional analytic cohort study was designed, in which 270 patients with sepsis and 270 without sepsis-infected were studied according to the Sepsis-3 consensus, from the city of Bucaramanga. The respective genotyping of the polymorphisms was performed by means of RFLP and individuals with sepsis were classified into categories using cardiac biomarkers (Troponin I and NT-proBNP), with the respective cut-off points, for acute subclinical cardiac injury and dysfunction. A bivariate analysis (Chi2 and Wilcoxon test) was performed in sepsis, the relationship of the polymorphisms with their phenotypic expression was determined with the plasma levels of MMP9 and TIMP1 (Kruskall Wallis, Chi2 trend) and the association of the SNPs with injury and heart failure through logistic regression; the software RSTUDIO, Harlequin and the platform SNPstats were used. The polymorphic allele T of the SNP MMP9 had a frequency of (7.3%) and the presence of the polymorphic C allele of the SNP TIMP1 presented a frequency of (34.3%). The polymorphisms were not associated with the expression of their phenotype ($p \Rightarrow 0.05$), in addition the SNP MMP9 was not associated with myocardial injury ($p = 0.5$), nor with heart failure ($p = 0.4$), the SNP TIMP1 presented a ($p \Rightarrow 0.1$) in relation to the two outcomes, stratifying them by gender. With the above it is inferred that the polymorphic alleles have no effect in the presence of high plasma levels of MMP9 and TIMP1 and none of the SNPs were associated in injury or heart failure outcomes that cause cardiovascular dysfunction secondary to sepsis in the population studied.

*Bachelor thesis

** Health Faculty. Biomedical Sciences Master. Project Director, Diego Torres Dueñas Msc y PhD in Pharmacology. Project Co-directors Clara Ines Vargas Castellanos. Msc en genetic y Silvia Becerra Bayona PhD in biomaterials.

1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, pese a los distintos avances que se han alcanzado en el manejo clínico, y del mayor entendimiento de la fisiopatología de la sepsis, la mortalidad en los pacientes se mantiene elevada (46% en sepsis y 82% en choque séptico) (Zanon et al., 2008); incluso, sigue teniendo impacto en la salud pública global ya que se presentan anualmente 18.000.000 de casos nuevos de sepsis por año en el mundo (Esteban et al., 2007; Lagu et al., 2012). En Colombia, se ha reportado una mortalidad cercana al 38% que aumenta al presentarse choque séptico (Rodríguez et al., 2011).

La sepsis es un proceso de reacción inmune excesivo, inducido por un agente infeccioso, que puede ocasionar la muerte por la disfunción orgánica que se presenta, afectando principalmente órganos como, los pulmones y el corazón (Kim & Hong, 2016). Los pacientes con disfunción cardíaca secundaria a sepsis tienen una mortalidad significativamente mayor (70%) en comparación con los pacientes sépticos sin deterioro cardiovascular (Zanotti Cavazzoni et al., 2010).

Por tal razón, se hace necesario encontrar un predictor de fase temprana de falla o lesión cardíaca de tipo aguda en el síndrome séptico para disminuir sus altas tasas de mortalidad, esto se lograra al encontrar una prueba de tamizaje para detectar biomarcadores genéticos como los polimorfismos, que permita identificar un evento de mal pronóstico, de respuesta aguda en la

sepsis como lo es la disfunción cardiovascular en pacientes infectados, para que los clínicos generen un tratamiento diferencial y disminuir las secuelas, mejorando el pronóstico.

Sin embargo, establecer estos predictores ha sido difícil de lograr debido a la heterogeneidad que existe en el cuadro clínico de los pacientes sépticos (Christaki & Giamarellos-Bourboulis, 2014), que se ve influenciado por factores que afectan la severidad de este síndrome (Uhle, Chousterman, Grützmann, Brenner, & Weber, 2016) como son endógenos (estado inmunológico del paciente, presencia de polimorfismos genéticos y metabolismo) y exógenos (agente etiológico, sitio de infección y presencia de comorbilidades).

Por consiguiente, en la población con sepsis, se deben investigar biomarcadores en genes que expresen proteínas que intervengan en la fisiopatología de la sepsis; como la detección de variantes polimórficas sencillas, que modifiquen la expresión fenotípica, que participen en mecanismos fisiopatológicos transcendentales, como la respuesta inmune, alteraciones de la coagulación y en la disfunción multiorgánica (Angus & van der Poll, 2013).

A su vez, en la fisiopatología de la sepsis se alteran mecanismos genéticos, moleculares y metabólicos, que son altamente complejos. En este contexto, algunas enzimas como las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), intervienen en esta fisiopatología ya que facilitan i) la degradación de distintos sustratos biológicos (como el colágeno, elastina y troponina I, entre otros), que a nivel cardíaco, derivan en una hipertrofia ventricular y dilatación

del corazón (Yabluchanskiy et al., 2014), ii) la remodelación de la matriz extracelular (MEC) (Elkington, White, Addington-Hall, Higgs, & Edmonds, 2005), iii) el procesamiento de interleucinas y iv) el reclutamiento de leucocitos.

De las 32 metaloproteinasas conocidas, se estudió la metaloproteinasa 9 (MMP9) que tiene como sustrato biológico la gelatina y el colágeno que componen la estructura del corazón, del mismo modo interviene en distintos mecanismos fisiopatológicos como la degradación del endotelio vascular, inhibición de la fuga de calcio, inhibición de la agregación plaquetaria, entre otras. Encontramos que la MMP9 es regulada no solo por el inhibidor tisular 1 (TIMP1), sino también por distintos mecanismos a nivel transcripcional y post-transcripcional.

Por consiguiente, el funcionamiento inadecuado de algunas de estas dos moléculas podría incidir en el cuadro clínico del paciente con sepsis, ya que un aumento de estas proteínas puede degradar distintos sustratos. En este sentido, la expresión fenotípica de TIMP1 y MMP9 puede ser modificada por variantes genéticas, como polimorfismos, mutaciones y patrones de metilación. Sin embargo, los resultados reportados en la literatura no han sido concluyentes, y en algunos casos son contradictorios, porque no es claro el impacto de los polimorfismo en su expresión fenotípica (Bojic et al., 2015; Lorente et al., 2014; Niño et al., 2017; Wang, Zhang, Zhao, Dong, & Li, 2014). Específicamente, los SNPs MMP9 -1562 T/C y TIMP1 372 C/T, que se han asociado con sepsis y mortalidad secundaria a sepsis según el consenso 2001 (Collazos et al., 2015; Lorente et al., 2013; Martin et al., 2014)

Por tal razón, se decide que es importante conocer la distribución alélica y genotípica de estas variantes en una muestra poblacional colombiana, para determinar posibles factores de predisposición o protección en este síndrome. Principalmente, en cuadros que comprometen la expectativa de vida de los pacientes, como la lesión y falla cardíaca secundaria a sepsis.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre los polimorfismos SNP MMP9 -1562 C/T y SNP TIMP1 372 T/C con los niveles plasmáticos de MMP9 /TIMP1 y disfunción cardiovascular secundaria a sepsis en una muestra de población de la ciudad de Bucaramanga?

3. JUSTIFICACIÓN

El actual tratamiento clínico de la sepsis está encaminado a aumentar la sobrevida de los pacientes por medio del manejo de signos clínicos como la hipovolemia (Gotts & Matthay, 2016), en base a las herramientas actuales para predecir la severidad y su diagnóstico, como son las escalas APACHE II “Acute Physiology and Chronic Health Evaluation” y SOFA “Sequential Organ Failure Assessment Score” (Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, 1985; Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, 1996).

Estas escalas no permiten a los clínicos predecir fácilmente y de forma veraz el desenlace de disfunción cardiovascular secundaria sepsis, ya que no existen biomarcadores que puedan predecir un mal pronóstico desde la infección. Por tal razón y utilizando elementos del método de clasificación PIRO “Predisposition, Infection, Response and Organ Failure” (Opal, 2005), se inició el estudio de la genética de una enfermedad multifactorial como la sepsis, para detectar biomarcadores no modificables con la presencia de la sepsis que definan un diagnóstico temprano de un desenlace de alta mortalidad como la disfunción cardiovascular secundaria sepsis, para su posterior tratamiento.

Cabe resaltar que para detectar un SNP como un posible biomarcador, los genes investigados en este estudio MMP9 y TIMP1 deben estar implicados como un sustrato biológico en la fisiopatología de la disfunción cardiovascular secundaria a la sepsis, ya que directamente pueden

afectar la expresión de su producto y por consiguiente, la actividad de tales proteínas como son las MMPs, específicamente MMP9 y TIMP1 que en altas concentraciones plasmáticas exacerbaban el efecto proinflamatorio originado por el proceso infeccioso, y aumenta la degradación de diversos sustratos como proteínas contráctiles a nivel cardíaco, incluyendo a las gelatinasas (Devine, Bicer, Reiser, Velten, & Wold, 2015).

De igual manera, el encontrar un biomarcador genético que se presente antes de que el síndrome se desarrolle y que sea intrínseco al huésped, no siendo afectado por factores externos, como lo es la detección de polimorfismos del sistema de las MMPs antes mencionados, dará al sistema de salud la posibilidad de implementar tamizaje preventivo en poblaciones con elevados factores de riesgo (infecciones), para tomar alternativas de manejo de tratamiento temprano, atención oportuna y personalizada.

Como es conocido, la sepsis es una enfermedad poco investigada en nuestro país y en Latinoamérica, por diferentes variables como la dificultad de incluir en los estudios a pacientes en estado crítico. Por consiguiente, investigar en este campo es una oportunidad para dar un aporte a la comunidad científica y clínica con el fin de encontrar biomarcadores genéticos en población colombiana que se asocien con disfunción cardiovascular secundaria a sepsis, para así disminuir la brecha de estudios entre países desarrollados y en desarrollo.

Dada la importancia de la interacción entre la MMP9 y TIMP1, se vio necesario revisar en la literatura el papel de los SNPs del gen TIMP1 con su impacto en falla cardíaca y lesión miocárdica en pacientes sépticos. Encontrando al polimorfismo TIMP1 372 T/C, como un biomarcador candidato. Lorente et al, encontraron que la presencia del alelo C polimórfico se relaciona con niveles bajos de TIMP1 (523 ng/mL) en plasma y sobrevida del 76,3%; sin embargo, en los pacientes con alelo T, se presentan niveles elevados en plasma de TIMP1 (639 ng/mL y sobrevida del 68,3%, $p=0,004$) (Lorente et al., 2013). Dando a entender que el alelo polimórfico tiene un papel protector en el desenlace de muerte en pacientes con sepsis.

En el estudio del SNP MMP9 -1562 C/T en sepsis se encuentra literatura variada. Este SNP se ha visto asociado a mayor expresión de MMP9 *in vitro* con el alelo polimórfico T (B. Zhang et al., n.d.), al igual que en plasma en los pacientes con síndrome metabólico y alteraciones cardiovasculares (Yadav et al., 2014; B. Zhang et al., n.d.), pero esta relación no es clara en pacientes sépticos. Martin et al, realizaron un estudio multicéntrico en 19 UCI de España y encontraron que no existía asociación entre la presencia del polimorfismo de la MMP9 -1562 C/T y el desarrollo de sepsis ($p=0,6$), (Casos, C= 162 (90%) T= 18 (10%) vs Controles, C= 159 (88,3) T= 11,7) (Martin et al., 2014). Así mismo, en el trabajo realizado por Collazos et al, reportan que la presencia del alelo polimórfico T del SNP MMP9 -1562 C/T se relaciona con mayor concentración de MMP9 a nivel plasmático ($p=0,04$) en sepsis grave (CC= 547,5 ng/mL CT= 641,4 ng/mL) (Collazos et al., 2015); sin embargo, estos estudios no fueron concluyentes

porque el tamaño de la muestra era menor a 90 pacientes, y no incluyeron pacientes con choque séptico.

En consecuencia, este trabajo dará un soporte para el avance de esta temática, debido a que se propone investigar si los polimorfismos MMP9 -1562 C/T y TIMP1 372 T/C tienen un papel protector o de riesgo en los pacientes que presenten disfunción cardíaca o lesión cardíaca aguda subclínica, en una población del Nororiente Colombiano que presenta sepsis o choque séptico, lo cual podrá contribuir a aumentar la sobrevida de los pacientes con sepsis en un largo plazo.

4. MARCO CONCEPTUAL

4.1 SEPSIS

Según el III consenso de sepsis realizado en el año 2016 (Sepsis-3), la sepsis se define como una “disfunción orgánica causada por una respuesta inmune exacerbada en respuesta a un proceso infeccioso, que supone una amenaza para la supervivencia del individuo” (Singer et al., 2016), dando a entender que la sepsis no es solo un proceso de reacción inmune excesivo inducido por un patógeno, sino que presenta efectos inflamatorios, acompañados de alteraciones en la coagulación, a nivel cardiovascular, neuronal, hormonal, energético y metabólico (van der Poll & Opal, 2008).

Adicionalmente, Sepsis-3 reemplazó al Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) en la identificación de los pacientes con sepsis, ya que estos criterios resultan inespecíficos por la variedad de causas que generan estos síntomas (Bone et al., 1992). Por lo cual, el actual consenso recomienda categorizar a un paciente con sepsis si presenta un puntaje de SOFA mayor de 2 (Tabla 1) y a su vez, se establece como choque séptico cuando se presentan anomalías celulares y de los metabolismos subyacentes, que son lo suficiente profundas como para aumentar sustancialmente la mortalidad, siendo ésta superior al 40% (Abraham, 2016). En el apéndice A, se incluye un flujograma que facilita al clínico la categorización y entendimiento de la sepsis a partir del consenso del 2016.

Tabla 1. Parámetros para determinar el puntaje de severidad SOFA

Puntaje SOFA					
Sistema	0	1	2	3	4
Respiratorio PO ₂	>400	< 400	< 300	< 200	< 100
Renal Creatinina mg/dL	<1,2	1,2-1,9	1-.3,4	3,5-4,9	>5
Hepático Bilirrubina mg/dL	<1,2	1,2-1,9	2-5,9	6-11,9	>12
Cardiovascular PAM mmHg	No hipotensión	<70	Dopamina <5	Dopamina > 5	Dopamina >15
Hematológicos Plaquetas cel. /mm ³	>150.00	<150.00	<100.000	<50.000	<20.000
Neurológicos Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6

Modificado de Vicent et al (Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, 1996).

4.1.1 Epidemiología La sepsis se considera un problema de salud pública a nivel mundial, ya que se presentan anualmente 18.000.000 de casos nuevos de sepsis por año en el mundo, según el Centro de Control y Prevención de enfermedades CDC; teniendo una incidencia en Estados Unidos de 300 casos de sepsis grave por cada 100.000 habitantes, con un costo anual de aproximadamente 17 billones en el tratamiento de individuos con sepsis (Mayr, Yende, & Angus, 2014). Aproximadamente la mitad de estos casos ocurren fuera de la Unidad de Cuidados Intensivos UCI, una cuarta parte de los pacientes fallecen durante su hospitalización (Stephen G. Baum, 2016); en este país 250.000 personas mueren al año si presentan sepsis y aumenta la mortalidad, acercándose al 60%, si presenta choque séptico en países desarrollados (Gaiieski, Edwards, Kalian, & Carr, 2009).

Aunque en la última década se ha disminuido la brecha que existe entre la prevalencia del síndrome en países desarrollados y en vía de desarrollo (Dagher, Saadeldine, Bachir, Zebian, & Chebl, 2015), este evento sigue siendo una causal de alta mortalidad en países como Colombia. No obstante, en nuestro país no existen datos precisos de la prevalencia de este síndrome. Sin embargo León et al, resaltan cifras importantes, que sugieren una mortalidad a los 28 días en pacientes sépticos graves cercana al 21,9% y en choque séptico del 46,6%(A. L. León et al., 2013).

Además, en estudios realizados por Ortiz et al, encontraron que, de los individuos con sepsis, el 51% la presentaron por origen extrahospitalario y el 44% al estar internados en UCI. (Jaramillo-

Bustamante, Marín-Agudelo, Fernández-Laverde, & Bareño-Silva, 2012). Así mismo, en una investigación realizada por Pertuz-Mesa et al, encontraron que los principales microorganismos causales son bacterias Gram negativas en un 76%, y que los focos infecciosos más comunes son: el abdominal (30%), seguido del tracto urinario (22%) (Yolima Pertuz-Meza, Celenny Perez-Quintero, 2016), datos que difieren de los presentados por la CDC, en los cuales se encuentra como sitios de infección más frecuente: pulmón (35%), tracto urinario (25%), intestino (11%) y piel (11%).

4.1.2 Fisiopatología La sepsis esta dado inicialmente por la infección causada por un patógeno en el huésped, por medio de la interacción del agente etiológico y de sus patrones asociados a patógenos (PAMP), como el Liposacárido (LPS) en bacterias Gram negativas, el ácido lipoteicoico (LPT) en bacterias Gram positivas o el ergosterol en levaduras (Schmidt, Pedersen, Qiao, & Zähringer, 2011), con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que son expresados en la superficie de células del huésped que actúan en el sistema inmune. Estos PRRs, pueden ser: receptores de tipo Toll, receptores de Lectina tipo C, receptores inducibles de tipo 1 y receptores de oligomerización de unión a nucleótidos.

La interacción entre los PAMPs y PRRs, permite activar las células inmunes (neutrófilos, monocitos y linfocitos), para poder iniciar un efecto proinflamatorio (Selders, Fetz, Radic, & Bowlin, 2017), el cual puede llevar a una reacción inflamatoria excesiva, y ocasionar el colapso cardiovascular y la disfunción de múltiples órganos, que podrían llevar a una mortalidad

temprana. Este efecto proinflamatorio se ocasiona principalmente por la translocación del factor nuclear NF-KB al núcleo para activar genes específicos que codifican citoquinas cruciales para la inducción de la inflamación, como el factor de necrosis tumoral alfa $TNF\alpha$ (induce la secreción de otras citoquinas), interleucinas como $IL1\beta$ (estimula la síntesis de óxido nítrico), $IL12$ (permite la producción de células Natural Killer (NK)), $IL6$ (modula la hematopoyesis) e $IL8$ (interviene en la quimiotaxis) (Wiersinga, Leopold, Cranendonk, & van der Poll, 2014).

Las células inmunes (como leucocitos) y células parenquimatosas (epiteliales y endoteliales) están implicadas en la respuesta inmune temprana en contra de patógenos, mediante la liberación de mediadores proinflamatorios, principalmente $TNF\alpha$, con las siguientes funciones: i) estimular la secreción de otras interleucinas, ii) inducir mayor producción de polimorfonucleares, iii) generar activación del sistema de complemento y la cascada de la coagulación e iv) incrementar la permeabilidad vascular. Estas múltiples acciones se caracterizan por producir una lesión celular que da lugar a la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) de órganos, y por consiguiente, a su disfunción (Ito, 2014).

Esta activación genera alteraciones en la coagulación que pueden llegar a ocasionar coagulación intravascular diseminada CID, como consecuencia de la activación de la vía extrínseca de la coagulación y es dado por el factor tisular FT que es producido por distintas células lesionadas por el daño colateral del sistema inmune, activando el factor VII de la coagulación para finalmente obtener fibrina. Cabe resaltar que por cada célula afectada, la concentración de los

complejos de fibrina es directamente proporcional en su disminución, lo cual produce un desequilibrio de la homeostasia primaria y secundaria, permitiendo estimulación de la fibrinólisis por medio de la plasmina, lo cual genera prolongación de los tiempos de coagulación, por el desgaste de las proteínas que interactúan en la coagulación (Okamoto, Tamura, & Sawatsubashi, 2016).

Es necesario tener en cuenta que la gravedad del cuadro clínico depende de los factores de virulencia del invasor y de los niveles de mediadores inflamatorios como el $TNF\alpha$, que se genera en respuesta del sistema inmune innato por células como los macrófagos (Lever & Sheer, 2010). Esta respuesta se da para defender al huésped del patógeno; sin embargo, se genera un daño colateral por medio de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres como el óxido nítrico (NO) que afectan el metabolismo celular, y por consiguiente, las funciones del organismo (Zapata Ospina, 2011).

Esto genera una migración celular hacia la fuente de infección, en donde ocurre: i) un aumento de moléculas de adhesión y quimiocinas, ii) la inducción de un efecto pro-coagulante acompañado por fibrinógeno, y iii) la activación plaquetaria (Saracco et al., 2011). A su vez, estos aspectos del sistema inmune y de la coagulación desencadenan: i) una alteración metabólica mitocondrial por el gasto energético, ii) disfunción endotelial que genera permeabilidad vascular, iii) alteración en la microcirculación por trombosis microvascular, iv) hipotensión, y en parte, v) disfunción multiorgánica, por la disminución de los niveles de

oxígeno en el tejido (lesión renal, depresión miocárdica, disfunción hepática, encefalopatía, lesión pulmonar, entre otros) (Sagy, Al-Qaqaa, & Kim, 2013).

Una de las moléculas que interactúan en la fisiopatología de la sepsis, es el óxido nítrico (ON), que es un radical libre sintetizado por una variedad de células (polimorfonucleares, plaquetas, macrófagos, entre otras), que son inducidas por LPS y citoquinas proinflamatorias. ON, regula el tono vascular al disminuir los niveles de calcio (Ca_2^+) a nivel intracelular, evitando la activación del complejo miosina/actina, que interviene en la contracción del corazón (Kenyon & Sandrock, 2009). Otra molécula relevante en la fisiopatología de la sepsis son las MMPs, que están involucradas en la respuesta a daño celular y la inflamación, que son activadas por gran variedad de citoquinas con el fin de generar reparación celular. Estas enzimas pueden ocasionar un incremento en la permeabilidad vascular por la degradación del colágeno de la membrana basal vascular, facilitando la migración de células inflamatorias y alteraciones del endotelio vascular. Así mismo, las MMPs y las TIMPs han sido implicadas en el sistema de coagulación/fibrinólisis y en la función plaquetaria en la sepsis (Lorente et al., 2014).

Otro mecanismo en la fisiopatología de la sepsis es la permeabilidad vascular, debido a la acumulación del parénquima y líquido intersticial que afecta la función de los órganos, que generan mayor necesidad de oxígeno tisular y lesionan su microvasculatura, esta fuga vascular produce un edema tisular, en parte ocasionado molecularmente por la ruptura de VE-cadherina

por mediadores inflamatorios como las MMPs, que generan ruptura del endotelio vascular (Flemming et al., 2015).

Adicionalmente, cabe resaltar que en el curso natural de la sepsis se observa inicialmente un patrón proinflamatorio, y en algunos pacientes en la parte final, se presenta un efecto de inmunosupresión caracterizado por una elevación de IL10. En esta última fase intervienen tanto el sistema inmune adaptativo como el innato y se distingue por: i) apoptosis de células T, células B y dendríticas, ii) agotamiento de células inmunes, iii) expresión de población de células T reguladoras, iv) reprogramación de células presentadoras de antígenos y v) la presencia de neutrófilos inmaduros sin funciones efectoras a nivel sanguíneo (Markwart et al., 2014; van der Poll & Opal, 2008).

4.1.3 Diagnóstico y tratamiento El cuadro clínico de los pacientes varía dependiendo no solo del sistema afectado y su respectivo daño, sino también del agente etiológico y la cantidad circulante del patógeno. Por ejemplo, es de peor pronóstico una infección intra-abdominal que una a nivel del tracto urinario, por la elevada cantidad microbiana que estaría presente en el tracto intestinal (Uhle et al., 2016). Así mismo, el cuadro clínico también se ve afectado por los niveles de mediadores de inflamación debido a que los pacientes los expresan de forma diferente por las diversas variantes genéticas que presentan, los que a su vez, pueden tener un efecto protector o de riesgo (Uhle et al., 2016).

Los síntomas más comunes de la sepsis son: alteraciones de la temperatura, disminución de la frecuencia cardíaca, hiperventilación, desorientación, biomarcadores elevados de infección (leucocitosis, procalcitonina PCT, Proteína C reactiva), alteración hemodinámica, entre otros (Martín-Ramirez, Domínguez-Borgua, & Vázquez-Flores, 2014).

El tratamiento general en la sepsis se basa inicialmente en proporcionar restauración cardiopulmonar (líquidos intravenosos, vasopresores, terapia e oxígeno, ventilación mecánica, según sea necesario) y se mitigan las amenazas inmediatas de infección no controlada (Hotchkiss, Richard S and Karl, 2002) . Particularmente, los microorganismos se aíslan y cultivan con el fin de seleccionar el tratamiento más adecuado y disminuir el avance de la infección, no obstante, los métodos de cultivo presentan una limitante de tiempo, y en algunos de los casos, la identificación de los microorganismos es difícil (Phua et al., 2013). Por consiguiente, los clínicos inician inmediatamente con terapia antimicrobiana empírica, y el paciente es trasladado a UCI, para centrarse en el seguimiento y vigilancia de la función de órganos (Rhodes et al., 2017).

4.2 DISFUNCIÓN CARDÍACA EN SEPSIS

La disfunción cardíaca se ha definido en numerosas investigaciones clínicas como una disminución reversible de la fracción de eyección de ambos ventrículos, con dilatación ventricular y menor respuesta a la reanimación con líquidos y catecolamina (Antonucci et al.,

2014). Cabe resaltar que el corazón es el órgano más afectado en la sepsis ya que ocurre depresión miocárdica y deterioro del músculo cardíaco (Aneman & Vieillard-Baron, 2016), y según estudios en modelos animales, la disfunción cardíaca en sepsis se asocia por un efecto proinflamatorio, alteración de la energía a nivel metabólico y atenuación de la señalización adrenérgica (Room, Lauderdale, & Goldberg, 2015).

La depresión cardíaca es ocasionada en parte por la lesión o muerte de cardiomiocitos, por toxinas, DAMP, trampas extracelulares de neutrófilos (NET) y factores depresores del miocardio como: IL1, IL6, TNF α , LPS, MMP9 y componentes de la vía del complemento (Lv & Wang, 2016). Un desencadenante son las citoquinas; por ejemplo, en un estudio realizado por Kurnar et al, se concluyó que la combinación de TNF α e IL1 β es cardiodepresivo (Kumar et al., 1996), ya que al administrar TNF α recombinante a modelos animales se provoca fiebre, acidosis láctica, cambios hemodinámicos e incluso la muerte (Kumar et al., 1996). Por lo tanto, varios factores podrían influenciar en el inicio de la disfunción miocárdica inducida por la sepsis a través de la activación de citoquinas y liberación de ON.

Se ha demostrado que el ON puede alterar la respiración mitocondrial (Kingdom et al., 2017), al suprimir tanto el ácido graso, como la oxidación de la glucosa, generando agotamiento del ATP (Larche et al., 2006). En consecuencia, al ser el corazón un órgano rico en mitocondrias que no solo están involucradas en la provisión de energía sino también en la regulación del Ca $^{2+}$ intracelular, asociada con la contracción cardíaca, su desregulación contribuye a la disfunción del

miocardio y aumenta los niveles totales de Ca_2^+ del retículo sarcoplásmico y la sensibilidad del miofilamento cardíaco al Ca_2^+ (Merx & Weber, 2007). Un desequilibrio de tal molécula ocasiona disfunción cardíaca en respuesta contra la sepsis.

Uno de los mediadores depresores miocárdicos estudiado en sepsis es la MMP9. Se ha demostrado que en la aorta de ratas bajo infusión de LPS, el aumento de los niveles de MMP9 y TIMP1 se correlaciona con la pérdida del tono vascular, efecto que se revierte parcialmente tras la administración de inhibidores exógenos de las MMPs (M M Lalu, Cena, Chowdhury, Lam, & Schulz, 2006). De igual forma, la MMP9 se ha visto asociada a nivel cardíaco en la arritmia ventricular en ensayos *in vivo*; específicamente, al inhibir esta enzima se previene la fuga de Ca_2^+ del retículo sarcoplásmico, lo cual disminuye la contractilidad del corazón (Prathipati, Metreveli, Nandi, Tyagi, & Mishra, 2016; Wagner et al., 2006).

De igual forma, MMP9 está involucrado en el proceso de miocarditis por un aumento de infiltrados inmunes a nivel cardíaco (Gutierrez et al., 2008). Sin embargo, no fue sino hasta el año 2003 que Lalu y colaboradores estudiaron la posible relación entre lo mencionado anteriormente y las MMPs (Manoj M. Lalu, Gao, & Schulz, 2003). Lalu et al, encontraron que el LPS induce disfunción cardíaca asociada a menor actividad de MMP2 y liberación de MMP9 en corazones de murinos, observando que los inhibidores preservan la función mecánica cardíaca durante el choque séptico. No obstante, en disfunción cardiovascular en sepsis, la mayoría de los estudios se han realizado en modelos animales y su fisiopatología no está clara.

Cabe resaltar que el miocardio normal posee varias proteínas de MEC, incluidas colágeno, lamininas y fibronectina, las cuales juegan un papel en el rendimiento fisiológico del corazón. El colágeno, la proteína de la MEC más abundante, forma una red compleja para proporcionar estructura tridimensional y resistencia a la tracción de las fibras del músculo cardíaco. Por lo tanto, las colagenasas como la MMP9 que se almacenan en los neutrófilos pueden degradar tales componentes generando infiltrados en el miocardio e inestabilidad del parénquima del corazón.

4.2.1 Biomarcadores de disfunción miocárdica inducida por sepsis Se ha demostrado que los niveles plasmáticos de BNP y NT-proBNP están elevados en pacientes sépticos (Altmann et al., 2010), y que se asociaron con depresión miocárdica y mayor mortalidad de pacientes con sepsis (Turner et al., 2011). Estos hallazgos sugieren que los niveles plasmáticos de BNP y NT-proBNP representan marcadores confiables para la identificación de disfunción miocárdica inducida por sepsis (SIMD) (Lv & Wang, 2016). También se ha demostrado que los niveles plasmáticos de troponina I se comportan como un marcador sensible y específico de SIMD. Aunque los mecanismos subyacentes a la liberación de troponina I durante la sepsis aún no están claros, se encontraron concentraciones plasmáticas aumentadas de troponina I en pacientes sépticos, y se asociaron exclusivamente con disfunción del ventrículo izquierdo y con lesión cardíaca (Altmann et al., 2010).

4.2.2 NT-proBNP El propéptido natriurético cerebral N-terminal (NT-proBNP) circula a nivel sanguíneo como un subproducto de la parahormona BNP. Es liberado principalmente por células

miocárdicas localizadas en los ventrículos, estimuladas por el aumento de la presión o del volumen aurícula-ventricular, que conlleva a un estiramiento de la pared cardíaca (Ozcan et al., 2017). Esta sobrecarga en las paredes del corazón induce la liberación de los pre-propéptidos y al mismo tiempo se inicia la transcripción de genes asociados con BNP (Booth et al., 2014). Su incremento anómalo se encuentra asociado a falla cardíaca, debido a la distensión de las paredes cardíacas; por tal razón, mayores niveles de este marcador se relacionan con aumento del gasto cardíaco y un posible predictor de mortalidad en sepsis.

4.2.3 Troponina I Es una subunidad del complejo de troponina que hace parte de las miofibrillas que generan la contracción cardíaca, compuesto por tres subunidades (troponina C, troponina T y troponina I). Cada componente tiene una función para permitir la contracción cardíaca, la subunidad I es específica para el músculo cardíaco e inhibe la interacción entre la miosina con la actina mediado por el Ca_2^+ . Su medición facilita identificar una enfermedad cardíaca de tipo agudo y la estratificación de lesión en el miocardio (Rahman & Broadley, 2014).

4.3 METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

Las MMPs son proteasas dependientes de zinc, que tienen como función principal la degradación de la MEC del tejido conectivo, pero en la actualidad también se considera como una molécula que interviene en procesos de lesión tisular e inflamación (Birkedal-Hansen, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, 1993). En la mayoría son extracelulares y se

secretan como proenzimas, activadas por mediadores inflamatorios como la citoquina TNF α (Bradham et al., 2002).

Las MMPs tienen regiones conservadas como: i) la región propéptido, que dirige la proteína hacia el retículo endoplasmático, ii) el sitio catalítico para generar proteólisis, y iii) la región tipo hemopexina, donde ocurre la unión a su sustrato y su inhibición (Page-McCaw, Ewald, & Werb, 2007). Las MMPs presentan una estructura general que puede variar en los sitios ya mencionados; por ejemplo, en el dominio catalítico, en el dominio hemopexina o en el dominio transmembrana, si lo presenta (Nagase, Visse, & Murphy, 2006); además, contienen extremos amino-terminal y carboxi-terminal, que interaccionan con los inhibidores tisulares TIMPs. La literatura ha mencionado al menos 32 tipos de MMPs, sin embargo, solo 16 con importancia clínica las cuales pueden ser clasificadas según la tabla 2, dependiendo del sustrato que degraden.

Tabla 2 Clasificación de las metaloproteinasas, según el sustrato degradado.

Clasificación	Metaloproteinasas
Gelatinasas	MMP9 y MMP2
Colagenasas	MMP1, MMP8 y MMP13
Estromielimasas	MMP3, MMP10 y MMP11
Matrilisinas	MMP7 y MMP26
Metaloproteinasas de membrana	MMP14, MMP15, MMP16, MMP24, MMP17 y MMP25

Las MMPs permiten no solo el equilibrio de la matrix extracelular en diversos tejidos (Caley, Martins, & O'Toole, 2015), sino también regulan la liberación de citoquinas y factores de crecimiento (Braundmeier & Nowak, 2006), además interviene en los procesos de angiogénesis y quimiotaxis. Por lo cual, las MMPs intervienen en diversas patologías, tales como: artritis reumatoide (Burrage, 2006), enfermedad periodontal (Sapna, Gokul, & Bagri-Manjrekar, 2014), cáncer (Gialeli, Theocharis, & Karamanos, 2011), sepsis (Serrano-Gomez et al., n.d.), insuficiencia cardíaca (Spinale & Villarreal, 2014), arterioesclerosis (Vacek et al., 2015), entre otros.

4.3.1 Metaloproteinasa de matriz extracelular 9 La MMP9 degrada directamente las proteínas de la MEC como gelatina y colágeno así como también otras moléculas como plasminógeno (Ugarte-Berzal, Vandooren, Bailón, Opdenakker, & García-Pardo, 2016). Así mismo, activa citoquinas y quimiocinas para regular la remodelación tisular en un amplio espectro de procesos fisiológicos y fisiopatológicos como la inflamación y la fibrosis (Sachwani et al., 2016; Yabluchanskiy et al., 2014).

La MMP9 es secretada por una gran cantidad de tipos celulares, incluidos polimorfonucleares, macrófagos y fibroblastos. Por ejemplo, los neutrófilos producen múltiples proteasas, tales como serina proteasas (elastasa, catepsina G y proteinasa 3), MMPs (MMP8 y MMP9) y activador del plasminógeno uroquinasa (uPA) (Tschesche, Zölzer, Triebel, & Bartsch, 2001). Todas las proteasas liberadas de los neutrófilos promueven la activación de MMP9, además es sintetizada

durante la diferenciación de granulocitos en la médula ósea. En humanos, la MMP9 en neutrófilos está unida covalentemente a la lipocalina, que la protege de la degradación proteolítica (Di Carlo, 2013).

De otra parte, la MMP9 es una proteína clasificada como gelatinasa, denominada gelatinasa B, que presenta un peso molecular de 92 kDa; sin embargo, al ser un zimógeno y al estar activa presenta un peso molecular de aproximadamente 88 kDa (Dollery, McEwan, & Henney, 1995). Su estructura principal está compuesta por un dominio NH₂-terminal, un dominio catalítico con dos sitios de zinc, cinco iones de Ca²⁺ y fibronectina tipo II, un dominio de enlace y un dominio de tipo hemopexina COOH-terminal (Nagase H, Ogata Y, Suzuki K, Enghild JJ, 1991; Nagase et al., 2006).

La regulación de la MMP9 puede darse por cuatro razones, como: I) bloqueo de la transcripción, lo cual disminuye la concentración de ARNm, II) homeostasis de sus activadores como el TNF α , III) la unión de TIMP1 en el sitio catalítico a través de sus dominios COOH-terminales (Pereda et al., 2000) y IV) interacción en el aparato de Golgi, lo cual no permite su secreción (Roderfeld et al., 2007).

4.3.2 Polimorfismo MMP9 -1562 C/T La región -1562 del gen de MMP9, ubicado en el cromosoma 20 de la región promotora (20q13.12), que se ha reportado como un sitio de unión de factores de transcripción que aumentan la expresión del gen., En esta posición, se ha indicado la

presencia del SNP rs3918242 (MMP9 -1562 C/T), que se genera al sustituir un nucleótido de citosina (C) por uno de timina (T). Cuando se presenta el alelo C, la tasa de transcripción disminuye debido a que se inhibe la unión de los factores de transcripción; por lo tanto, la presencia del alelo polimórfico T genera mayor expresión de MMP9 a nivel sanguíneo (Opstad, Arnesen, Pettersen, & Seljeflot, 2014; Yadav et al., 2014). Este polimorfismo se ha asociado tanto con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ateroesclerosis y disfunción endotelial), como con alteraciones en la migración celular y el sistema inmunológico, que podrían cambiar el desenlace en la sepsis (Chen et al., 2013; B. Zhang et al., n.d.; Z. Zhang et al., 2015).

4.3.3 Inhibidor tisular TIMP1 Es una proteína que contiene dos dominios (N-terminal y C-terminal) conformados por enlaces disulfuro. El inhibidor TIMP1 es similar en un 40% de su estructura a las proteínas que conforman la familia de los TIMPs (TIMP1, TIMP2, TIMP3 y TIMP4). Este inhibidor es un receptor encargado de regular los niveles de metaloproteinasas conocidas como: i) colagenasas, ii) gelatinasas y iii) proteoglicanasas, por medio de distintos mecanismos: I) a nivel transcripción, II) evitando la proteólisis de la MMPs para su activación, III) degradación al ser secretadas las MMPs y principalmente IV) por el bloqueo de la degradación del sustrato al unirse al dominio hemopexina (Brew, K., & Nagase, 2010).

4.3.4 Polimorfismo TIMP1 372 T/C El gen que codifica TIMP1 fue descrito por Andrew Docherty et al, en el año de 1985. Está localizado en el brazo corto del cromosoma X (Xp11.3-

p11.23) y posee seis exones, dentro del gen de la Sinapsina I (SYN 1) (Krex et al., 2003). Al expresarse el inhibidor TIMP1 se regula la producción de diferentes metaloproteinasas relacionadas con los mecanismos de migración celular, respuesta inmune, angiogénesis, fibrosis y alteración de la coagulación (Lorente et al., 2013; M. J. W. Meijer et al., 2007; Powell, 2006).

El gen de TIMP1 puede presentar diferentes polimorfismos, siendo uno de ellos el polimorfismo rs 4898 (TIMP1 372 T/C), localizado en el exón 5 (Krex et al., 2003). Particularmente el polimorfismo en mención, en la enfermedad intestinal inflamatoria, los individuos hombres que no portan el polimorfismo (presentan el alelo T), tienen una mayor susceptibilidad a expresar bajos niveles de TIMP1 en el tejido inflamado, que podría provocar un aumento de MMPs, y ocasionar: i) deterioro de la barrera intestinal, y ii) aumento en la migración celular. Por tanto, este polimorfismo podría tener un rol protector en las personas que presenten esta enfermedad, ya que las mujeres con este genotipo fueron menos propensas al desarrollo de fístulas durante el seguimiento (41,4% vs 68,3%, $p = 0,025$) (M. J. Meijer et al., 2009; M. J. W. Meijer et al., 2007).

Por otra parte, se ha encontrado que los pacientes con sepsis (que presentan el alelo C del polimorfismo TIMP1 372 T/C,) tienen una mayor sobrevida. Específicamente, estos pacientes tienen elevados niveles de TIMP1 en plasma, posiblemente por el rol MMP9/TIMP1, que podrían afectar directamente los procesos inflamatorios y de coagulación, por la posible actividad proteolítica (Lorente et al., 2013).

4.4 ESTUDIO DE GENÉTICA DE POBLACIONES EN SALUD

La Genética de poblaciones, es una herramienta útil que le da pertinencia al estudio de SNPs en asociación al desarrollo de una enfermedad mendeliana o multifactorial (Vizmanos, 2014). Tal estudio consiste en analizar y describir la variabilidad existente en la composición genética de los diferentes grupos humanos comparados por las frecuencias genéticas o alélicas (Ralethford JH, 2012). Además, se interesa por conocer las causas determinantes de dicha variabilidad, a través del análisis de los procesos como mutaciones, miscegenación, flujo genético y deriva genética, que operan sobre la estructura genética de una población a lo largo de las generaciones, que originan el equilibrio genético (Hartl DL, 2000) .

Diversidad de estudios usan esta área de la genética para realizar estudios sobre susceptibilidad a enfermedades multifactoriales. En la actualidad se presentan estudios de análisis de SNPs con asociación de desenlaces en población colombiana, estudiando distintas enfermedades como: hipertensión arterial esencial, síndrome metabólico, accidente cerebrovascular, pre-eclampsia y sepsis, entre otros (F. J. León et al., 2012; Mora-Garcia, Ruiz-Diaz, Gomez-Camargo, & Gomez-Alegria, 2017; Páez et al., 2013; Rugeles, Montoya-ruiz, Bedoya, & Velilla, 2016; Velásquez Pereira, Leydi Carolina; Vargas Castellanos, Clara Ines; Silva Sieger, 2016).

Existen aspectos que influyen en las asociaciones genéticas y que surgen con frecuencia, los cuales se definen como:

Polimorfismo de nucleótido sencillo: Variante de nucleótido sencillo en una región determinada de un gen, que tiene una prevalencia mayor al 1% de la población.

Flujo genético: Es el proceso de transferencia de genes de una población a otra e implica la dispersión de nuevas variantes genéticas entre poblaciones diferentes.

Deriva genética: Consiste en cambios en las frecuencias génicas debidos a que los genes de una generación dada no constituyen una muestra representativa de los genes de la generación anterior.

Enfermedad mendeliana: Desenlace patológico ocasionado por un defecto monogénico.

Enfermedad multifactorial: Desenlace patológico desencadenado por la combinación de múltiples factores ambientales y mutaciones en varios genes, generalmente de diferentes cromosomas.

Estructura genética: Es la distribución de la variación genética, (frecuencias génicas o alélicas) dentro y entre poblaciones. Se mide por la diferenciación genética y se ve afectada por la interacción entre las fuerzas evolutivas.

Miscegenación: Mezcla de tres troncos raciales en una población.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la asociación de los polimorfismos SNP MMP9 -1562 C/T y SNP TIMP1 372 T/C con los niveles plasmáticos de MMP9/TIMP1 y con disfunción cardiovascular secundaria a sepsis en una muestra de población colombiana.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Genotipicar los SNP MMP9 -1562 C/T y SNP TIMP1 372 T/C utilizando la técnica de restricción enzimática RFLP.
2. Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos MMP9 -1562 C/T y TIMP1 372 T/C y su asociación en sepsis.
3. Identificar la relación fenotípica entre los SNP MMP9 -1562 C/T, SNP TIMP1 372 T/C con la concentración plasmática de MMP9 y TIMP1 en pacientes sépticos.
4. Clasificar la población con sepsis o choque séptico que presenten lesión o falla cardíaca aguda subclínica por medio de la cuantificación de biomarcadores bioquímicos: Troponina I y NT-ProBNP, respectivamente.
5. Analizar la asociación entre los polimorfismos SNP MMP9 -1562 C/T y SNP TIMP1 372 T/C con falla cardíaca subclínica de tipo agudo en pacientes sépticos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Esta investigación es clasificada como un estudio de corte transversal analítico-anidada en una cohorte, la población fue captada durante los años 2008-2013 en dos proyectos de investigación denominados G-SEPSIS y MACDYS, financiados por Colciencias y dirigidos por el grupo de investigación Mediadores Inflamatorios y Enfermedad (MINEN) de la Universidad Autónoma de Bucaramanga UNAB. La población se reclasificó en dos grupos, i) 270 con presencia de sepsis, según el consenso Sepsis-3 (Ver tabla 1) y ii) 270 individuos sin criterios de sepsis según el consenso de Sepsis-3, pero con sospecha de presentar un proceso infeccioso. Cabe resaltar que en el seguimiento de 28 días los individuos de este grupo no presentaron sepsis.

6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio se seleccionó a partir de una cohorte de 664 individuos (G-SEPSIS y MACDYS), que fueron captados en distintos centros hospitalarios del área metropolitana de Bucaramanga: Hospital Universitario de Santander HUS, Clínica los Comuneros, Clínica Chicamocha y Fundación Oftalmológica de Santander FOSCAL. Cada participante o un familiar cercano autorizó. el uso y almacenamiento de las muestras biológicas para investigaciones futuras.

De los 664 individuos se escogieron 270 pacientes con sepsis y 270 individuos infectados sin sepsis. La selección de la muestra fue de tipo no probabilístico, como lo muestra el apéndice B. Para el cálculo del tamaño de muestra se tuvo en cuenta la prevalencia de disfunción cardíaca en sepsis (41,5%) (Romero-Bermejo, Ruiz-Bailen, Gil-Cebrian, & Huertos-Ranchal, 2011) y el porcentaje de presentación del alelo de menor frecuencia, que correspondía al alelo T del SNP MMP9 -1562 C/T(5,4%) (J.M. Rodríguez-Pérez, n.d.). Esta validación se realizó por estimación de una proporción poblacional con un intervalo de confianza del 95%, obteniendo un poder estadístico del 95,3% por medio del software EPIDAT 4.2.

Como criterios de inclusión se consideraron: i) ser mayor de 18 años, ii) presentar sepsis sin importar la severidad, (SOFA >2) iii) estar internado en cuidados intensivos o urgencias del centro médico, iv) que las muestras almacenadas en el biobanco de la UNAB, presentaran un volumen suficiente para los ensayos y con la calidad biológica adecuada. Fueron excluidos i) pacientes gestantes, ii) pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas como enfermedades autoinmunes y cáncer, iii) pacientes inmunosuprimidos (uso de agentes inmunosupresores, o síndrome de inmunodeficiencia adquirida), iv) aquellos que cursaban con el diagnóstico de sepsis o choque séptico por más de 72 horas y iv) pacientes con una condición cardíaca subyacente.

6.3 VARIABLES DE ESTUDIO

Se usó la base de datos de la cohorte de pacientes sépticos (G-SEPSIS y MACDYS) bajo la custodia del grupo de investigación MINEN y contando con la autorización del director del grupo de investigación (apéndice C). Se usó el puntaje de las escalas (SOFA), las características epidemiológicas y clínicas como: sexo, raza, edad, foco infeccioso, presión arterial media, servicio de ingreso y mortalidad a los 28 días de seguimiento. En la tabla 3 observamos en detalle las variables utilizadas durante el estudio y el uso científico de cada una.

Tabla 3. Variables analizadas.

Nombre de Variable	Definición Operacional	Tipo de variable	Uso
Sexo	Variable biológica que divide los individuos en Femenino o Masculino, según el repositorio de la historia clínica	Cualitativa nominal dicotómica	Conocer la distribución del género, para implicaciones genéticas y clínicas
Edad	Tiempo en años de vida cumplidos	Cuantitativa discreta	Mediana de edad en presencia de sepsis y para los respectivos análisis estadísticos
Raza	Grupo étnico por el cual sienta	Cualitativa nominal	Implicaciones en el

Nombre de Variable	Definición Operacional	Tipo de variable	Uso
	pertenencia el individuo de estudio	policotómica	análisis genético
Tipo de infección	Focos infecciosos: 1) Infección del tracto Urinario, 2) Infección intrabdominal, 3) Infección de tejidos blandos, 4) infección del tracto respiratorio	Cualitativa nominal policotómica	Para conocer implicaciones epidemiológicas
Mortalidad	Establecer si durante el seguimiento de 28 días fallece el paciente o no	Cualitativa nominal dicotómica	Conocer el porcentaje de mortalidad en la población
Escala SOFA	Puntaje establecido para determinar la severidad y diagnóstico en pacientes con estado crítico (Vincent et al, 1996). Esta escala se determinó evaluando: funciones que al empeorar se aumenta el porcentaje de mortalidad, capacidad respiratoria, coagulación,	Categorica	Determinar la presencia de sepsis según el consenso Sepsis-3

Nombre de Variable	Definición Operacional	Tipo de variable	Uso
	funcionamiento hepático, hemodinámico, sistema nervioso central y renal		
MMP9	Cuantificación de la expresión fenotípica de los niveles de metaloproteinasa 9 en plasma	Cuantitativa continua	Determinar la asociación de los SNPs con su expresión fenotípica, objetivo 3
TIMP1	Cuantificación de la expresión fenotípica de los niveles de TIMP1 en plasma	Cuantitativa continua	Determinar la asociación de los SNPs con su expresión fenotípica, objetivo 3
SNP MMP9 -1562 T/C	Genotipo del polimorfismo clasificado teniendo en cuenta del alelo mutado: 1) CC, 2) TT, 3) TC	Cualitativa nominal policotómica	Establecer el objetivo 1 y 2 del estudio
SNP TIMP1 372 C/T	Genotipo del polimorfismo clasificado teniendo en cuenta del alelo mutado: 1) CC, 2)	Cualitativa nominal policotómica	Establecer el objetivo 1 y 2 del estudio

Nombre de Variable	Definición Operacional	Tipo de variable	Uso
	TT, 3) CT		
Presencia de lesión miocárdica aguda y falla cardíaca subclínica, por medio de puntos de cortes de biomarcadores cardíacos	Clasificación mediante la guía del Colegio Americano de Cardiología, cuantificado por medio de los biomarcadores bioquímicos Troponina I y NT-ProBNP 1) Presencia: > 0,1 ng/mL o > 300 pg/mL 2) Ausencia: <0,1 ng/mL o <300 pg/mL	Cualitativa nominal dicotómica	Establecer el objetivo 4 y 5 de la investigación

6.4 MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras que se usaron en el estudio fueron tomadas de una cohorte de pacientes con sepsis obtenidas por el grupo de investigación MINEN durante sus investigaciones previas, cabe resaltar que los individuos o su familiar más cercano por medio de la firma del consentimiento informado aceptaron su respectivo almacenamiento y el uso del material biológico para investigaciones futuras (suero, plasma y ADN). Las muestras se transportaron manteniendo la cadena de frío al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Bucaramanga UNAB. El material biológico fue almacenado en el

biobanco de la UNAB en viales previamente identificados por seriales a -80 °C con su respectiva cadena de custodia. Las muestras se procesaron en los laboratorios de esta universidad.

6.5 DETECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN TIMP1 Y MMP9

Los dos polimorfismos se detectaron por la técnica RFLP “*Restriction Fragment Length Polymorphism*”, que consiste en la detección del SNP al usar enzimas de restricción que generan fragmentos de diferente tamaño de ADN dependiendo de la presencia del polimorfismo, y visualizados por medio de electroforesis en gel de agarosa. Cabe resaltar que los ensayos se realizaron en cabina de bioseguridad teniendo en cuenta los respectivos protocolos de asepsia y bioseguridad del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de UNAB. Además, para cada ensayo se usó un control positivo (muestras con genotipo confirmado, detectado por repetición), con el fin de garantizar que las condiciones de reacción fueran las adecuadas, y un control negativo, para garantizar que no hubo contaminación de reactivos o contaminación cruzada. Así mismo, para aumentar la validez del estudio y disminuir los sesgos, más del 50% de las muestras se reprocesaron para validar el genotipo, por una de las siguientes razones: i) bandas débiles, ii) bandas no concordantes con la escalera alélica, iii) no concordancia con el control positivo y iv) contaminación del control negativo.

6.5.1 Extracción de ADN Se realizó a partir de 200 µL de sangre periférica obtenida en tubo vacutainer con EDTA, por medio del kit *DNA blood QIAamp*, siguiendo las recomendaciones del

fabricante (QIAGEN®) y el protocolo establecido por el laboratorio de Genética y Biología Molecular UNAB. Se verificó la calidad del ADN por medio de visualización en gel de agarosa al 1%, usando 5 µL del material extraído y realizando electroforesis con un voltaje continuo de 110 voltios por 50 minutos (Protocolo detallado en el apéndice D).

6.5.2 Amplificación y detección del SNP MMP9 -1562 C/T Se realizó amplificación de la región promotora que contiene la posición del SNP MMP9 -1562 C/T (rs3918242) utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir del ADN de cada individuo, extraído según el protocolo establecido. Los cebadores usados fueron validados por medio de la plataforma Blast, AutoDimer y se realizó PCR *in silico* en el Genome Browser UCSC, para asegurar que los iniciadores estuvieran en la posición adecuada del SNP a estudiar y su respectivo genoma (apéndice E). Las secuencias de los iniciadores son las siguientes: forward 5'-GCC-TGG-CAC-ATA-GTA-GGC-CC-3' y reverse 5'-CTT-CCT-AGC-CAG-CCG-GCA-TC-3', producidos por la casa comercial Bionner (®) (Tabla 4). Este ensayo está basado en el desarrollo por Feng, et al 2016 (Martin et al., 2014) (Ver apéndice F, para ver detalles del protocolo validado y estandarizado).

Tabla 4. Cebadores y enzimas usadas para la detección de los SNPs estudiados.

Polimorfismo	Cebadores	Enzima	Resultados de Restricción		
MMP9 -1562 C/T	F 5' GCC-TGG-TGG-CAC-ATA- GTA-GGC-CAG-3' R 5' CTT-CCT-AGC-CAG-CCG- GCA-TC-3'	SphI 5' GCATG↓C 3' 3' C↑GTACG 5'	CC (480pb)	CT (435pb, 247pb y 188pb)	TT (247pb y 188pb)
TIMP1 372 T/C	F 5' GCA-CAT-CAC-TAC-CTG- CAG-TCT-3' R 5' GAA-ACA-AGC-CCA-CGA- TTT-AG-3'	BssSαI C↓ACGAG 3' 3' GTGCT↑C 5'	TT (175pb)	TC (175pb,155pb y 20pb)	CC (155pb y 20pb)

F: Forward, R: Reverse.

Se utilizó una concentración de 0,2 μM de cada cebador en un volumen final de 25 μL de mezcla de máster mix (Thermo Scientific®). Las condiciones para realizar la amplificación usando el termociclador MJ Research PTC-100 fueron: 1 minuto de desnaturalización inicial a 95 °C; 30 ciclos para su amplificación (94 °C por 30 segundos para la fase de desnaturalización, 58 °C por 30 segundos para la fase de alineamiento y 72 °C por 30 segundos, para la fase de extensión) y se finaliza con 10 minutos, a 72 °C. La amplificación se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% al detectar una banda de 435 pb. El tiempo de corrida fue de 50 minutos con un voltaje de 110 V, usando una escalera de 100 pb (Promega®).

Para la detección del SNP MMP9 -1562 C/T, se realizó restricción enzimática con la endonucleasa SphI (Thermo Scientific®) a una concentración de 2 unidades en 10 µL de amplicón, la mezcla resultante se incubó por 17 horas a 37°C (Feng et al., 2016). Los fragmentos resultantes se separaron en gel de agarosa al 2%, se visualizaron en el fotodocumentador Gel DocTM XR (Biorad®), por medio del software ImagenLab Versión 15.2.1 de Biorad®. Los individuos heterocigotos para el alelo polimórfico (CT) evidenciaron tres fragmentos (435 pb, 247 pb, 188 pb); los homocigotos para el alelo polimórfico (TT) presentaron dos fragmentos (247 pb, 188 pb), tal restricción fue verificada por medio de la plataforma NEBcutter (apéndice E). El control de calidad del ensayo consistió en verificar muestras al azar por otro operador, para validar los resultados. Para evitar sesgos, se realizó repetición de la genotipificación por lo menos del 50% de las muestras.

6.5.3 Detección del polimorfismo SNP TIMP1 372 T/C Se realizó PCR convencional del exón que contiene la posición del SNP TIMP1 372. Se usó el cebador forward 5'-GCA-CAT-CAC-TAC-CTG-CAG-TCT-3' y el cebador reverse 5'-GAA-ACA-AGC-CCA-CGA-TTT-AG-3' (Bionner) a una concentración de 0,4 µM en un volumen final de 25 µL de mezcla de máster mix (Thermo Scientific®) verificados con la plataforma Blast, software AutoDimer y se realizó PCR *in silico* en el Genome Browser UCSC (Tabla 4) (apéndice E).

Las condiciones de la PCR al usar el termociclador MJ Research PTC-100 fueron las siguientes: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94 °C; 30 ciclos constituidos por (94 °C por 30 segundos

de desnaturalización, 55 °C por 30 segundos para la fase de alineamiento y 72 °C por 30 segundos, para la fase de extensión), seguido de 5 minutos, a 72 °C (Majsterek I, Markiewicz L, Przybylowska K, Gacek M, Kurowska AK, Kaminska A, Szaflik J, 2011). La amplificación se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% detectando una banda de 175 pb al correr por 50 minutos con un voltaje de 110 V, y usando la escalera de ADN de 50 pb (Promega®). Los detalles del protocolo procesamiento y la validación se encuentran en el apéndice G.

La detección del SNP TIMP1 372 T/C, se llevó a cabo por medio de la enzima BssSαI (New England Biolabs®) a una concentración de 1 unidad por 10 µL de amplicón y se incubó por 17 horas a 37 °C. Finalmente, los fragmentos resultantes se separaron y visualizaron en gel de agarosa al 3% usando el fotodocumentador Gel Doc™ XR (Biorad) y su software ImagenLab 15.2.1, para el análisis respectivo de las bandas. En los individuos heterocigotos (TC) se evidenciaron tres fragmentos (175 pb, 155 pb, 20pb) y en los homocigotos para el alelo polimórfico (CC) dos fragmentos (155 pb y 20 pb), verificados por la plataforma NEBcutter (apéndice E); cabe resaltar que el fragmento de 20 pb no es observable por la porosidad del gel. (3% de acrilamida, permite mínimo 40 pb). Los ensayos se verificaron por otro operador con experiencia operativa como control de calidad; se repitieron por lo menos el 50% de las muestras donde el resultado del genotipo no era claro (bandeo inespecífico).

6.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MMP9 Y TIMP1 EN PLASMA

Los niveles de las proteínas MMP9 y TIMP1 en plasma se determinaron por medio del inmunoensayo ELISA mediante el uso de anticuerpos marcados con una enzima, para permitir la reacción antígeno-anticuerpo y revelada mediante la adición de un substrato que activa la enzima y origina un color cuantificable. Se usó el kit Quantikine (R&D Systems®) para cuantificar la proteína MMP9 y su inhibidor TIMP1. Las muestras fueron diluidas según las indicaciones del fabricante para conservar la linealidad de la prueba, además se usaron los respectivos estándares de concentración y proteína recombinante (MMP9 y TIMP1) como control positivo. Su medición se realizó en un lector de microplacas RT-2100C (Powy®) a una longitud de onda de 450 nm por duplicado.

6.7 CUANTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES CARDÍACOS

Los biomarcadores Troponina I y propéptido natriurético cerebral N-terminal (NT-ProBNP) fueron cuantificadas a partir de suero por un laboratorio clínico externo que cumple con las normas técnicas y de calidad. La técnica de electro-quimioluminiscencia fue realizada en un equipo COBAS 6000 (Roche®). Esta técnica se fundamenta en la emisión de radiación electromagnética producida por una reacción química generada por emisión de descargas eléctricas. Los siguientes valores se tomaron como referencia: < 0,016 ng/mL para Troponina I y < 35.000 pg/mL para NT-ProBNP.

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software STATA14® y el software R STUDIO tomando un valor de p significativo como $< 0,05$. Además, la base de datos se registró por duplicado y se validó en el software Epiinfo. Así mismo, se usó el software de genética de poblaciones Alerquin 3.5 y la plataforma SNPstats para los análisis correspondientes. En los análisis donde está implicado el SNP TIMP1 372 T/C, el cual está ubicado en el cromosoma X se realizó éste dividiendo la población por género (hombre y mujeres), ya que los hombres solo tienen un cromosoma X y por tanto solo tendrían un alelo C o un alelo T, se consideran hemicigotos.

6.8.1 Caracterización de la población Se realizó un análisis de normalidad de los datos de las variables continuas, por medio del comando (test. shapiro) y (qqnorm) en R STUDIO. Las variables estudiadas presentaron distribución no normal, por lo cual se usaron medidas de tendencia central como la mediana y el rango intercuartil.

En el caso de las variables categóricas se presentaron los datos por medio de proporciones (%). Para comparar las variables categóricas se usó el estadístico chi cuadrado y para las variables continuas se realizó la prueba Wilcoxon Mann Whitney en el software R STUDIO.

6.8.2 Determinación del modelo de herencia para análisis de asociación La distribución genotípica se comparó entre los pacientes con sepsis y en individuos infectados sin sepsis, por medio de una regresión logística demostrado con valor de p y OR(IC95% , teniendo en cuenta los modelos de herencia: i) modelo dominante, determina si la presencia de un alelo polimórfico es suficiente para genera riesgo a un evento (se comparan homocigotos y heterocigotos con alelo polimorfico homocigotos con el alelo silvestre), ii) modelo recesivo, determina que se requieren dos copias del alelo polimórfico para generar algún riesgo al evento de estudio (homocigoto con alelo polimorfico vs heterocigoto alelo polimórfico y homocigoto con alelo silvestre) y iii) modelo codominante (se comparan los heterocigotos con homocigotos por separado). A partir de este análisis se determinó el mejor modelo para realizar los análisis de asociación. Se aclara que para el SNP TIMP1 372 T/C solo se realiza tal análisis en mujeres ya que los hombres solo presentan un alelo por la ubicación en el cromosoma X del gen TIMP1. Cabe resaltar que se eligió un modelo de herencia para cada polimorfismo estudiado con lesión y falla cardíaca; sin embargo, en el apéndice H se muestran todos los análisis con los tres modelos de herencias.

6.8.3 Frecuencias de los genotipos y de los alelos Se determinó, a través de las frecuencias del SNP MMP9 -1562 el porcentaje de los genotipos: CC, homocigoto para el alelo silvestre; TT, homocigoto para el alelo polimórfico; TC, genotipo heterocigoto y los respectivos porcentajes del alelo T (menos frecuente) y alelo C. Para el SNP TIMP1 372 T/C los porcentajes de las frecuencias de los genotipos fueron definidos en: TT, homocigoto para el alelo silvestre, CC, homocigoto para el alelo polimórfico; CT, genotipo heterocigoto y los respectivos porcentajes

del alelo C (menos frecuente) y alelo T. Tales frecuencias fueron comparadas en los pacientes con sepsis y los individuos infectados sin sepsis por medio de un chi cuadrado.

6.8.4 Análisis de genética poblacional Se calcularon las respectivas frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos, se estudió si se encontraban en equilibrio de Hardy Weinberg en la población de estudio por medio del software Alerquin 3.5, por cada polimorfismo y grupo de estudio. De igual forma, se determinó la frecuencia de los haplotipos por la plataforma SNPstats, se revisaron los artículos científicos donde se determinaba la estructura genética en la población estudiada y se analizaba el desequilibrio de ligamiento por medio de la plataforma SNPstats.

6.8.5 Relación de los polimorfismos con los niveles plasmáticos de MMP9 y TIMP1 Los genotipos de los SNPs (MMP9 -1562 C/T y TIMP1 372 T/C) se compararon con los niveles plasmáticos de MMP9 y TIMP1, respectivamente por medio de la prueba no paramétrica (Kruskall Wallis) y el post hoc respectivo, para conocer si las variantes de los genes estudiados en los grupos de pacientes sépticos afectaban los niveles plasmáticos de MMP9 y TIMP1, según la presencia del polimorfismo. Además, se realizó un análisis con la prueba de chi cuadrado para tendencias que se utilizó para comparar las prevalencias de genotipos SNP MMP9 -1562 C/T y SNP TIMP1 372 T/C entre los cuartiles de los valores de MMP9 y TIMP1, para definir si el SNP tiene un impacto con el fenotipo (altos niveles plasmáticos) de los individuos.

6.8.6 Asociación de los polimorfismos con falla cardíaca y lesión cardíaca Se clasificó a los 270 pacientes con sepsis, en ausencia o presencia de lesión cardíaca y falla cardíaca de tipo aguda por medio de los respectivos puntos de corte de NT-proBNP y Troponina I, en los siguientes cuatro grupos: Casos, i) presencia de lesión cardíaca (Troponina I \geq 0,1 ng/mL), n=79 y ii) presencia de falla cardíaca (NT-proBNP \geq 300 ng/mL), n= 191; Controles, i) ausencia de lesión miocárdica (Troponina I < 0,1 ng/mL), n= 223 y ii) ausencia de falla cardíaca (NT-proBNP < 300 ng/mL) n= 47, con base en la Guía del Colegio Americano de Cardiología. Además, se hizo una descriptivo de tales poblaciones con estas variables: MMP9, TIMP1, NT-proBNP y troponina I.

Despues se realizó un análisis bivariado y regresión logística entre el modelo de herencia dominante del SNP MMP9 -1562 C/T con el respectivo desenlace de estudio, obteniendo el estadístico de asociación OR. Para el SNP TIMP1 372 T/C en mujeres, se realizó el análisis a partir del modelo de herencia codominante con lo grupos ya mencionados, sin embargo para los hombres se comparó la presencia del alelo C y del alelo T con los desenlaces respectivos. Tales modelos se determinaron, por medio de un análisis de modelo de herencia mendeliano dominante, recesivo y codominante. Determinando el ideal de acuerdo al valor de $p > 0,05$ (apéndice H).

6.9 CONDICIONES ÉTICAS

El presente estudio se ajusta a los principios científicos y éticos de acuerdo con la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia. Este estudio es clasificado de riesgo mínimo ya que no se realizaron intervenciones directas sobre los pacientes. Se tomaron los datos de la base de datos de la cohorte (G-SEPSIS y MACDYS) la cual fue autorizada por el director del proyecto de investigación y líder del grupo de investigación MINEN-UNAB, esta base de datos fue diligenciada a partir de las encuestas, datos clínicos y paraclínicos de la historia clínica de los individuos y están codificados para proteger la identidad de los pacientes.

Los pacientes o su familiar más cercano dieron autorización en el consentimiento informado del manejo de los datos para estudios futuros, al igual que el uso y almacenamiento del material biológico. Lo anterior ha sido aprobado por el comité de ética de la Universidad Autónoma de Bucaramanga (Actas 0056/2009 y 0066/2015), Universidad Industrial de Santander UIS (Acta 0012/2014) (Acta 0029/2017) y las distintas entidades hospitalarias que hicieron parte del estudio.

Durante la ejecución de todo el protocolo se tuvo en cuenta las normas éticas y científicas establecidas para toda investigación, en donde se promueve y se protege la vida, salud, integridad, e intimidad de todos los individuos. No se afectó el principio de autonomía, ya que es

un estudio anidado que usó datos secundarios y los eventos a evaluar ya fueron desarrollados, además no se modificó en su momento la toma de decisiones por parte de los pacientes involucrados. De igual manera, en ningún momento se afectó el principio de maleficencia y beneficencia, dado que es un estudio secundario de tipo observacional analítico de una cohorte, en donde no se produjo daño hacia los individuos de estudio y el beneficio para este tipo de pacientes es indirecto y derivado de las ventajas potenciales que podrían resultar de obtenerse nuevo conocimiento que favorecería en un diagnóstico temprano a los pacientes con sepsis. Cabe resaltar que el principio de justicia se respetó ya que los individuos no se expusieron a ninguna situación de riesgo y menos se sacó ventaja de una situación de vulnerabilidad. Todo lo anterior fue basado con la declaración de Helsinki y el reporte de Belmont, además se considera la ley 1581 del 2012 para el adecuado tratamiento de la información obtenida de los pacientes.

Finalmente, todos los ensayos fueron realizados bajo el lineamiento del manual de bioseguridad de la Organización Mundial de la Salud, además se siguió el proceso de desecho de material biológico y bioseguridad establecido por el Laboratorio de Genética y Biología Molecular UNAB donde se realizaron los ensayos, con fin de no afectar al ambiente o individuos que estén en el entorno.

7. RESULTADOS

Se caracterizó la población con el fin de conocer que características clínicas y demográficas presentan, lo cual pretende dar un contexto general de la población estudiada y cómo se comportan las variables a estudiar a nivel plasmático (MMP9, TIMP1, Troponina I y NT-proBNP), para poder justificar los estudios de variantes genéticas. Luego se realizó extracción de ADN, se amplificó y genotipificó, de allí se determinaron frecuencias y posteriormente se definieron los modelos de herencia, para evaluar la posible asociación de los SNPs con sepsis. A continuación, con el modelo de herencia óptimo se analizó la asociación de los polimorfismos SNP MMP9-1562 C/T y TIMP 372 T/C en eventos como la disfunción cardiovascular secundaria a sepsis. Cabe resaltar que de igual manera se realizaron los análisis de los SNPs en disfunción cardiovascular secundaria a sepsis con todos los modelos de herencia (apéndice H).

7.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN CON SEPSIS

270 pacientes sépticos fueron incluidos, el 53,7% (n = 145) presentaban sepsis y el 46,3% (n=125) choque séptico, con edades comprendidas entre 48 a 75 años y con mediana de 61 años, se destaca que el 50% eran mujeres y el 94,1% (n=254) se sentían pertenecer a raza mestiza. Los pacientes incluidos se capturaron del servicio de urgencias el 71,4% (n=193), del área de hospitalización el 22,9% (n=62) y de sala de cirugía el 5,7% (n=15). En la población estudiada se determinó como foco infeccioso más frecuente el tracto urinario 39,3% (n=106), seguido de

infección del tracto respiratorio 28% (n=76), infección de tejidos blandos 16,4% (n=44), infección intraabdominal 12,2% (33) y otros menos frecuentes 4,1% (11).

El grupo de infectados sin sepsis presentó un puntaje de SOFA < 2, lo cual concuerda con el consenso de Sepsis-3, con edades comprendidas entre 43 a 71 años y con mediana de 57 años, es importante mencionar que el 52% eran hombres y el 48% mujeres. En la tabla No.5, se muestran las diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de MMP9, TIMP1 y NT-proBNP; en particular, los niveles plasmáticos de MMP9 estaban más elevados en el grupo de infectados sin sepsis vs el grupo de sepsis ($p < 0,001$); por el contrario, los niveles plasmáticos de TIMP1 presentaron un comportamiento inverso ($p < 0,001$). El grupo de pacientes infectados sin sepsis, presentaron niveles normales de NT-proBNP y Troponina I, lo cual descarta presencia de falla cardíaca y lesión miocárdica aguda a nivel bioquímico.

Tabla 5. Caracterización de la población de estudio.

Variables	Sepsis (n=270)	Infectados, sin sepsis (n=270)	Valor p
NT-proBNP(pg/mL) *	2099(590-8937)	329,2(153,2-867)	< 0,001
Troponina I (ng/mL)	0,1(0,1-0,4)	0,1(0,1-0,1)	0,52
MMP9 (ng/mL) **	588,6(220,1-1298)	195,5(120-299,6)	< 0,001
TIMP1 (ng/mL) **	306(170,5-679,2)	847(115,8-1169)	< 0,001

**Péptido Natriurético N-terminal, ** Niveles plasmáticos de Metaloproteinasa 9 y del Inhibidor Tisular 1. Se presentan los resultados con mediana y rango intercuartil. Se realizaron los test Chi cuadrado y Mann-Whitney Wilcoxon.

7.2 DETERMINACIÓN DEL MODELO DE HERENCIA PARA LOS ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN.

Se realiza un análisis con los modelos de herencia y el desenlace sepsis, para determinar el modelo más adecuado para presentar los resultados de asociación de los SNPs estudiados con lesión miocárdica y falla cardíaca aguda en 270 pacientes con sepsis y 270 individuos infectados sin sepsis. Además, para determinar si los SNPs tiene un impacto inicial en la sepsis y definir si impacta a un síntoma de este síndrome como la disfunción cardiovascular.

Para el SNP MMP9 -1562 C/T no se obtuvo un modelo de herencia óptimo, por lo tanto, se eligió el modelo dominante como el más adecuado por la baja frecuencia del alelo T (0,4%) en los pacientes con sepsis (Ver tabla 6). Para el SNP TIMP1 372 T/C en mujeres se obtuvo al modelo de herencia codominante como el más adecuado, con un $p=0,005$. En los hombres por la ubicación del gen TIMP1 en el cromosoma X, se realizaron los análisis teniendo en cuenta el alelo C y alelo T, por lo cual no se tuvo en cuenta los modelos de herencia (Ver tabla 7). Solo se encontraron valores significativos al hacer los análisis del SNP TIMP1 372 T/C con sepsis, el genotipo TC en el modelo codominante con valor de OR 1,48 (1,28-1,81) y en el modelo dominante TC-CC con OR 1,60 (1,37-1,96).

Tabla 6. Modelos de herencia para el SNP MMP -1562 C/T.

Modelo	Genotipo	Sepsis (n, %) n=270	Infectados, sin sepsis (n, %) n=270	OR (IC 95%)	Valor p
Codominante	CC	232 (85,9)	223 (82,6)	1	0,3
	CT	37 (13,7)	43 (15,9)	1,21(0,75-1,95)	
	TT	1 (0,4)	4 (1,5)	0,50 (0,46-3,3)	
Dominante	CC	232 (85,9)	223 (82,6)	1	0,3
	CT-TT	38 (14,1)	47 (17,4)	1,29 (0,81-2,05)	
Recesivo	CC-CT	269 (99,6)	266 (98,5)	1	0,2
	TT	1 (0,4)	4 (1,5)	0,50 (0,46-3,3)	

Tabla 7 Modelos de herencia para el SNP TIMP1 372 T/C en mujeres.

Modelo	Genotipo	Sepsis (n, %) n=135	Infectados, sin sepsis n, %) n=129	OR (IC 95%)	Valor p
Codominante	TT	51 (37,8)	65 (50,3)	1	0,005
	TC	72 (53,3)	44 (34,2)	1,48 (1,28-1,81)	
	CC	12 (8,9)	20 (15,5)	1,31 (0,59-2,92)	
Dominante	TT	51 (37,7)	65 (50,3)	1	0,03
	TC-CC	84 (62,3)	64 (49,7)	1,60 (1,37-1,96)	
Recesivo	TT-TC	123 (91,1)	109 (84,5)	1	0,09
	CC	12 (8,9)	20 (15,5)	1,88 (0,88-4,02)	

7.3 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS (MMP9 -1562 C/T /TIMP1 372 T/C) Y SU ASOCIACIÓN EN SEPSIS.

La figura No.1 muestra los geles de agarosa con resultados de la genotipificación que se llevó a cabo para los dos polimorfismos utilizando la técnica RFLP, lo cual se relaciona con el objetivo uno de estudio. Los genotipos se determinaron teniendo en cuenta los tamaños de las bandas, para el SNP MMP9 -1562 C/T son: 435pb, 247pb, 188pb) y para el SNP TIMP1 372 T/C corresponden a: 175pb, 59 pb, 20 pb. Para cumplir con el objetivo número dos se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas observadas del SNP MMP9 -1562 C/T, se comparó estas frecuencias entre el grupo de sepsis con el grupo de individuos infectados sin sepsis, no encontrando diferencias significativas ($p > 0,1$), se observan estos datos en la tabla 8.

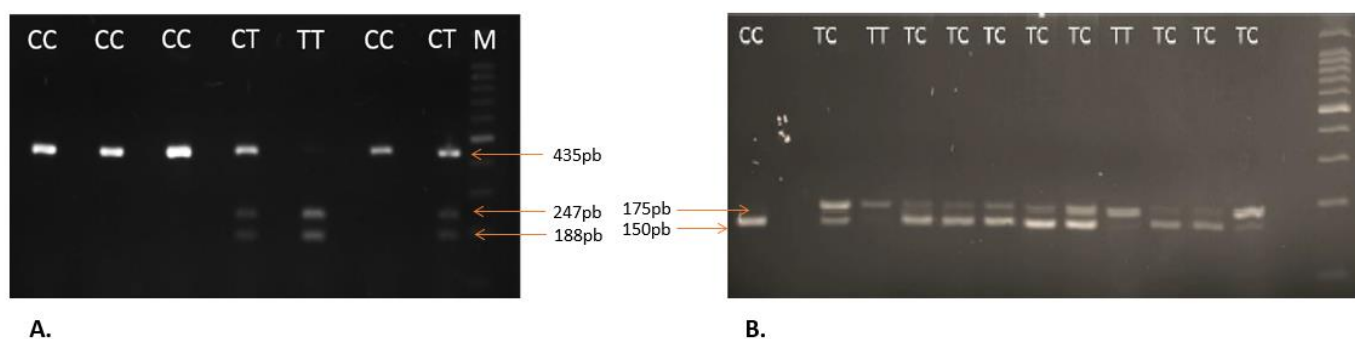


Figura 1. A) Detección del polimorfismo MMP9 -1562 C/T, empleando la enzima de restricción SphI: B) Detección del polimorfismo TIMP1 372 T/C, empleando la enzima de restricción BssSαI.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas observadas del SNP MMP9 -1562 C/T

SNP MMP9 -1562 C/T	Genotipo			Alelos	
	CC	CT	TT	C	T
Sepsis	85,9%	13,7%	0,4%	92,7%	7,3%
Infectados, sin sepsis	82,6%	15,9%	1,5%	90,5%	9,5%
<i>Valor p</i>	0,43	0,32	0,23	0,11	0,43

En la tabla 9 se encuentran las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP TIMP1 372 T/C en mujeres siendo comparado los infectados sin sepsis con el grupo de sepsis, obteniendo al genotipo TC como el más frecuente en sepsis (53,3 % vs 34,2 %, $p < 0,05$). En mujeres el genotipo TT fue más frecuente en las pacientes sin sepsis (50,3 % vs 37,8%, $p < 0,05$). Este comportamiento no se observó en el grupo de los hombres. Datos relacionados con el objetivo número dos del estudio.

Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP TIMP1 372 T/C

SNP TIMP1 372 T/C, mujeres	Genotipo			Alelos	
	TT	CC	TC	T	C
Sepsis	37,8%	8,9%	53,3%	64,8%	35,2%
Infectados, sin sepsis	50,3%	15,5%	34,2%	67,4%	32,6%
<i>Valor p</i>	<0,05	0,12	<0,05	0,23	0,12
SNP TIMP1 372 T/C, hombres	Alelo C	Alelo T	TC	T	C

Sepsis	66,6%	33,4%		66,6%	33,4%
Infectados, sin sepsis	69,5%	30,5%		69,5%	30,5%
<i>Valor p</i>	0,23	0,43		0,23	0,43

7.4 ANÁLISIS DE GENÉTICA POBLACIONAL

Se hicieron otros análisis de genética de poblaciones para evaluar posibles sesgos de falsa asociación. Se calculó las frecuencias de haplotipos entre los dos polimorfismos estudiados, encontrando en la población de estudio 4 posibles haplotipos (apéndice I), observándose el haplotipo CT forma silvestre. Con la mayor frecuencia en los dos grupos (Sépticos e infectados sin sepsis).

El cálculo del desequilibrio de ligamiento (tendencia de dos alelos en dos locis separados de encontrarse juntos para segregarse) fue igual a $D: 0,8$; lo que indica que los genes estudiados se heredan de forma independiente, como era de esperarse por la ubicación en diferentes cromosomas.

Para complementar, se prueba que el polimorfismo en la población estudiada SNP MMP9 -1562 C/T cumple las condiciones del equilibrio de Hardy Weinberg $p = 0,92$ en el grupo de pacientes con sepsis y $p = 0,25$ en el grupo de infectados sin sepsis, (apéndice I) por lo que se considera que con el tamaño de muestra (n) estudiado en una población diploide, con cruces aleatorios, no

hay mutación o deriva genética que este afectado las frecuencias observadas de los polimorfismos.

De otra parte, se realizó el análisis de equilibrio de Hardy Weinberg para el polimorfismo SNP TIMP1 372 T/C, teniendo en cuenta que está ligado al cromosoma X, donde se encontró que la población no cumple tales condiciones en los dos grupos estudiados ($p < 0,05$), lo anterior concuerda con lo esperado ya que los SNPs en el cromosoma X no llegan a un equilibrio en presencia de pocas generaciones.

Al revisar la literatura, se encontró, según León et al, que la población de Bucaramanga no presenta estructura genética, ($F_{st} = 0,0038$), se concluye que no hay sub poblaciones en seis polimorfismos estudiados y no se afecta los resultados de asociación con los desenlaces estudiados (F. J. León et al., 2012).

7.5 RELACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE MMP9 Y TIMP1, CON SU RESPECTIVO POLIMORFISMO

Para cumplir el objetivo número tres, se analizó el impacto del SNP MMP9 -1562 C/T en los niveles plasmáticos de esta proteína en pacientes con sepsis, teniendo en cuenta que el SNP se ubica en la región promotora del gen. En el apéndice J se observa que no se presentó diferencias

significativas entre la presencia o ausencia del alelo T ($p=0,48$) en los niveles plasmáticos, no tiene un impacto en la población con sepsis que presenta altos niveles de MMP9.

Tabla 10. Prevalencia de genotipos del SNP MMP9 -1562 C/T en pacientes con sepsis por cuartiles de niveles plasmáticos de MMP9.

SNP MMP9 -1562 C/T	Cuartil 1, niveles de MMP9 (68)	Cuartil 2, niveles de MMP9 (67)	Cuartil 3, niveles de MMP9 (67)	Cuartil 4, niveles de MMP9 (68)	Valor p
CT-TT (n, %)	9 (11,3)	8 (11,9)	10 (14,9)	10 (14,7)	0,1
CC (n, %)	59 (88,7)	59 (88,1)	57 (85,1)	58 (85,3)	0,2

Por otra parte, se analizó el impacto del SNP TIMP1 372 T/C en los niveles plasmáticos de éste, en el grupo de pacientes con sepsis, estratificando por la variable género debido a la ubicación del SNP en un cromosoma sexual. En el apéndice J se observa que no se encuentran diferencias significativas en los niveles plasmáticos en los tres genotipos respectivos en mujeres y en los correspondientes alelos en los hombres, el polimorfismo no tiene un impacto en la población con sepsis que presenta altos niveles de TIMP1.

Tabla 11. Prevalencia de genotipos del SNP TIMP1 372 T/C en pacientes con sepsis por cuartiles de niveles plasmáticos de TIMP1.

SNP TIMP1 372 T/C	Cuartil 1, niveles de TIMP1	Cuartil 2, niveles de TIMP1	Cuartil 3, niveles de TIMP1	Cuartil 4, niveles de TIMP1	Valor p
Mujeres					
TT (n, %)	13(34,2)	15(37,5)	9(45,1)	14(37,8)	0,3
CC (n, %)	2(5,3)	4(10)	1(5,0)	5(13,5)	0,5
TC (n, %)	23(60,5)	21(52,5)	10(49,9)	18(48,6)	0,6
SNP TIMP1 372 T/C	Cuartil 1, niveles de TIMP1	Cuartil 2, niveles de TIMP1	Cuartil 3, niveles de TIMP1	Cuartil 4, niveles de TIMP1	Valor p
Hombres					
Alelo T (n, %)	26(72,3)	21(61,7)	22(66,6)	21(65,6)	0,1
Alelo C (n, %)	10(27,7)	13(38,23)	11(33,3)	11(34,3)	0,4

7.6 ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS CON DISFUNCIÓN CARDÍACA Y LESIÓN CÁRDICA

Para cumplir el objetivo número cuatro, la población con sepsis se categorizó en dos grupos con presencia o no de falla cardíaca y con lesión cardíaca o sin lesión cardíaca, teniendo en cuenta el punto de corte de NT-proBNP y troponina I, encontrando 79 pacientes con lesión cardíaca y 191 sin lesión cardíaca; de igual manera 223 presentaron falla cardíaca y 47 no presentaron falla cardíaca, en la tabla N. 12 se presenta los niveles plasmáticos de TIMP1 que fue elevado en los

pacientes con presencia de lesión y falla cardíaca ($p < 0,001$), sin embargo los pacientes con niveles $> 0,1$ de troponina I se observa disminución de los niveles de MMP9 ($p = 0,003$).

Por otra parte, se realizó una regresión logística para estudiar la posible asociación de los SNPs estudiados con lesión miocárdica y falla cardíaca en sepsis, categorizada por los niveles de Troponina I y NT-proBNP, por medio de los distintos modelos de herencia, no encontrando asociación entre los genotipos y el respectivo desenlace (apéndice H). En la tabla N. 13 se observa, teniendo en cuenta el modelo codominante que no ocurre asociación del SNP MMP9 - 1562 con lesión y falla cardíaca en pacientes con sepsis. Además, en la tabla N.14 se presenta el SNP TIMP1 372 T/C en el modelo de herencia codominante no asociados con lesión y falla cardíaca en pacientes con sepsis.

Tabla 12. Biomarcadores en falla cardíaca y lesión cardíaca en sepsis.

Falla miocárdica de tipo aguda	Elevado ≥ 300 pg/mL NT-proBNP	Normal < 300 pg/mL NT-proBNP	Valor p
MMP9 (ng/mL)	558,5 (222,90-1075)	716 (303-1178)	0,22
TIMP1 (ng/mL)	336,8 (184,2-635,9)	189 (131,7-323,8)	$<0,001$
Lesión miocárdica aguda	Elevado $\geq 0,1$ ng/mL Troponina I	Normal $< 0,1$ ng/mL Troponina I	Valor p
MMP9 (ng/mL)	328,6 (97,4-628)	766 (362-1165)	$<0,001$
TIMP1 (ng/mL)	388,9(208-786,9)	275,8 (159-503,8)	0,003

Tabla 13. Asociación del SNP MMP9-1562 C/T con falla cardíaca y lesión cardíaca subclínica aguda.

Genotipo	Falla Cardíaca				Lesión Miocárdica			
	Con falla	Sin falla	OR (IC 95%)	Valor p	Con lesión	Sin lesión	OR (IC 95%)	Valor p
CC	193 (86,5)	39 (83)	1	0,4	79 (84)	153 (86,9)	1	0,5
CT-TT	30 (13,5)	8 (17)	1,49 (0,6 - 3,6)		15 (16)	23 (13,1)	0,79 (1,39 - 1,6)	

Tabla 14. Asociación del SNP TIMP1 372 T/C con falla cardíaca y lesión cardíaca subclínica aguda.

SNP TIMP1 372 T/C	Genotipo	Con falla cardíaca	Sin falla cardíaca	OR (IC 95%)	Valor p
<i>Mujeres</i>	TT	47 (40,2)	4 (22,2)	1	0,23
	TC	61 (52,1)	11 (61,1)	2,1 (0,6 - 7,0)	
	CC	9 (7,7)	3 (16,7)	3,9 (0,75 - 5,2)	
<i>Hombres</i>	Alelo	Con falla cardíaca	Sin falla cardíaca	OR (IC 95%)	Valor p
	Alelo T	69 (65,1)	21 (72,4)	1	0,45
	Alelo C	37 (34,9)	8 (27,6)	0,7(0,2 - 1,7)	

8. DISCUSIÓN

El principal hallazgo de la presente investigación fue determinar la no asociación de los polimorfismos estudiados, SNP MMP9 -1562 C/T y SNP TIMP1 372 T/C con la disfunción cardiovascular secundaria a sepsis (DCSS), determinada por el estudio del evento de la falla y lesión cardíaca. Por consiguiente, dada la no asociación a la DCSS se deben evaluar otros desenlaces que se observan en la sepsis que han mostrado una asociación con el SNP TIMP1 372 T/C, como la alteración en la coagulación o permeabilidad vascular (Lorente et al., 2013). Además en el presente estudio el SNP TIMP1 372 T/ C se asoció la presencia de al menos una copia del alelo polimórfico (modelo dominante) como de riesgo en sepsis. Sin embargo, no se encontró relación con la presencia de los alelos polimórficos en los SNPs estudiados con altos niveles plasmáticos de MMP9 y TIMP1 respectivamente.

Se realizó una revisión de la literatura científica encontrando estudios donde presentan las frecuencias genotípicas y alélicas de los dos SNPs estudiados en distintas poblaciones. En relación con el SNP MMP9 -1562 C/T, se encontró que el alelo polimórfico T en la población estudiada presenta menor proporción en relación con el estudio de 1000 genomas (15,52% vs 7,2%). De igual manera se observó en una población mexicana que presentaba infarto agudo de miocardio, un comportamiento similar con las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP MMP9 -1562 C/T en comparación a nuestra población de estudio. Solo el 5% (n = 470) de los

individuos presentaban el alelo polimórfico T del SNP MMP9 -1562 C/T (J.M. Rodríguez-Pérez, n.d.), resultado similar al obtenido en este estudio (7,3%). Por el contrario, en población polaca con accidente cerebro vascular, se encontró un 2,5% el alelo polimórfico T, en el grupo analizado. Lo cual denota la baja frecuencia de tal alelo en esta población europea y una fijación del genotipo CC en nuestra población con una frecuencia del 82,6 % (K. Buraczynska, Kurzepa, Ksiazek, Buraczynska, & Rejdak, 2015; M. Buraczynska, Dragan, Buraczynska, Orłowska-Kowalik, & Ksiazek, 2015).

Asimismo, aunque los estudios que reportan frecuencias alélicas y de genotipo del SNP TIMP1 372 T/C son pocos (Behnes, Bertsch, & Hoffmann, 2013), al comparar las frecuencias obtenidas en la presente investigación con el estudio 1000 Genomas (NCBI, n.d.), por medio de la plataforma “dbSNP”, se puede notar la prevalencia del alelo C polimórfico con frecuencia del 46% en el estudio 1000 genomas y en la población de estudio se encontró en un 33%. Sin embargo, se denota una fijación del alelo T en la población, ya que los individuos con sepsis presentaron el genotipo TC en el 53% y en los individuos infectados sin sepsis el 34,2% presentaron el genotipo TT.

De otra parte, los resultados sugieren que no existe asociación entre el polimorfismo MMP9 -1562 C/T con sepsis, resultado consistente con el trabajo desarrollado por Martín et al. Estos autores realizaron un estudio multicéntrico en 19 UCI de España con 90 pacientes que presentaban sepsis grave y 91 controles (trauma o accidente

cerebral), encontrando que no hay asociación entre la presencia del polimorfismo con el desarrollo y el resultado en la sepsis (Martin et al., 2014).

En el presente estudio, el gen TIMP1 al estar ligado al cromosoma X, se estratifico el análisis según el sexo. En el análisis bivariado se encontró más frecuente al genotipo TC en mujeres con sepsis vs la población infectada, lo contrario ocurrió con el genotipo TT que fue más frecuente en el grupo de mujeres infectadas, lo cual señala el posible papel del genotipo TC-CC como un factor de riesgo, con un OR de 1,48(1,28-1,81), lo cual contradice los datos de Lorente et al.

Lorente, et al observaron que la presencia del alelo T del SNP TIMP1 372 T/C aumenta la mortalidad en pacientes con sepsis grave [OR: 2,09 (1,06 – 4,09)], pero no tuvieron en cuenta la variable género, para tener un impacto general de los polimorfismos en la población. ellos observaron que la presencia del alelo T del SNP TIMP1 372 T/C aumenta la mortalidad en pacientes con sepsis grave [OR: 2,09 (1,06 – 4,09)], pero no tuvieron en cuenta la variable género, para tener un impacto general de los polimorfismos en la población. Sin embargo, cabe resaltar que este estudio no es punto de comparación debido a las diferencias que existen entre los diseños metodológicos y por el consenso usado para la clasificación de sepsis (Lorente et al., 2013).

Emingil et al, encontraron en hombres que presentar el alelo C es un factor de riesgo para desarrollar periodontitis [OR: 1,9 (1,1 - 3,4)], sin formular posibles hipótesis del papel biológico

que tendría el SNP en esta enfermedad (Emingil et al., 2014). En el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal, Meijer et al, reportan que el genotipo TT en mujeres y el alelo T en hombres presentan mayor susceptibilidad en enfermedad intestinal inflamatoria, y que estos hombres tienen bajos niveles plasmáticos de TIMP1 (Krex et al., 2003; M. J. W. Meijer et al., 2007). En este estudio no se determina si el alelo C es un factor de riesgo para desarrollar sepsis en mujeres, ya que en los individuos que tienen dos copias del alelo C, no se aumentó el riesgo de desarrollar sepsis en el modelo de herencia codominante.

En relación al objetivo 3, determinar la relación entre los alelos polimórficos con los niveles plasmáticos que impactan en la disfunción cardiovascular secundaria a sepsis, se tuvo en cuenta el estudio Lorente et al, que indican que la presencia del alelo C del SNP TIMP1 372 T/C se relaciona con elevados niveles plasmáticos de TIMP1 en individuos con sepsis grave (Lorente et al., 2013). No obstante, en la población con sepsis del presente estudio ninguno de los alelos o genotipos presentó diferencias significativas con los niveles plasmáticos de TIMP1 en los individuos con sepsis. Además, el SNP TIMP1 372 T/C no tiene un impacto en los individuos con altos niveles de TIMP1, como el estudio Cheing et al, donde no se asocia el alelo polimórfico C con neumonía adquirida y no se encontró relación con altos o bajos niveles plasmáticos de TIMP1 (Chiang et al., 2013), por lo cual se concluye que otros factores pueden estar afectando tal expresión, como lo son los patrones de metilación e interacciones genéticas con el gen TIMP1.

De otra parte, la presencia del alelo T del SNP MMP9 -1562 C/T en la presente investigación no tiene relación con niveles elevados de MMP9. Aunque, Collazos et al, demostraron que la presencia del alelo T está marginalmente asociada con altos niveles de MMP9 en pacientes con sepsis (n=90) ($p < 0,042$), pero solo estudiaron 90 con sepsis grave (Collazos et al., 2015). Esto nos permite inferir otro factor que se asocia con tal expresión, como pueden ser la presencia de haplotipos en los mismos genes ya que el SNP en mención ha sido descrito por Zhang et al, en arterosclerosis, donde se propone que el alelo silvestre C, regula la expresión del gen MMP9 por la unión a factores de transcripción, y la presencia del alelo T, induce niveles elevados de MMP9 (B. Zhang et al., n.d.).

Cabe aclarar que el estudio de los polimorfismos con disfunción cardiovascular a sepsis se define primero teniendo en cuenta los antecedentes del estudio de niveles plasmáticos y el impacto de ellos en sepsis. Como se presenta en el marco teórico se sugiere la relevancia de la molécula TIMP1 como posible elemento de valor pronóstico en la lesión miocárdica y disfunción cardíaca subclínica. Específicamente, ya que los grupos que presentaron niveles elevados de Troponina I y NT-ProBNP, presentaron elevadas concentraciones de TIMP1, resultados que confirman a los reportados en el estudio de Takawale et al, quienes encontraron que en modelos animales que no expresaban TIMP1, disminuían la fibrosis miocárdica (Takawale et al., 2017).

Estos resultados sugieren que TIMP1 tiene un papel de generación de fibras de colágeno de novo e influencia a proteínas no metaloproteinasas, como proteínas que actúan en la coagulación,

fibras miocárdicas y en el endotelio vascular (Yabluchanskiy et al., 2014). La MMP9 y el TIMP1 a nivel plasmático se presentan como sustrato biológico en el equilibrio de la MEC presente en el endotelio vascular, corazón, tejido blando, entre otros. Por ejemplo, el miocardio se compone de una red dinámica de proteínas y proteoglicanos, que son relevantes para el mantenimiento de la forma, el tamaño y la función ventricular; por lo cual, su integridad estructural se basa en un equilibrio entre la degradación de componentes de la MEC como las colagenasas, lo cual se relaciona con la concentración y la expresión de las enzimas a nivel sanguíneo, esto está impactado directamente con los SNPs (Yabluchanskiy et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, se ha sugerido que el SNP TIMP1 372 T/C tiene un posible papel protector en otras patologías. En el presente estudio se define ver el impacto de polimorfismos en eventos que aumentan la mortalidad en la sepsis por la asociación de los genotipos CT-TT en sepsis, como es la disfunción secundaria. Por consiguiente, se planteó establecer si este polimorfismo estaba involucrado como un factor protector o riesgo en una población con sepsis en los eventos de lesión cardíaca aguda y de falla cardíaca subclínica aguda medida por los niveles de Troponina I y NT-proBNP, al igual que el SNP MMP9 -1562 C/T (Mueller, Gegenhuber, Poelz, & Haltmayer, 2004; Wu, Chen, Dai, Hung, & Hsu, 2015).

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que los SNPs estudiados no presentan relación con las concentraciones de su sustrato, y, por consiguiente, no tienen un efecto de regulación de la MEC por activación inmune ni alteración funcional por daño estructural del

miocardio. Estas hipótesis concuerdan con los estudios de Goldbergova et al, quienes reportaron que los pacientes con falla cardíaca aguda no presentaron asociación con el SNP TIMP1 372 T/C y gasto cardíaco (50,2% vs. 50,2%; $p = >0,05$ (Goldbergova et al., 2012).

Este resultado, se plantea lo siguiente: “Debido a las diferencias encontradas en este y otros estudios, es posible que el factor genético en la sepsis pueda ser relevante junto con otros elementos de mortalidad y gravedad, pero no es un predictor en sí mismo”, esto nos indica que el estudio de un solo SNP en enfermedades multifactoriales tiene poco impacto y se deben analizar modelos predictivos usando varios polimorfismos y otras variables clínicas.

9. CONCLUSIONES

- Fue menos frecuente la presencia del alelo polimórfico SNP MMP9 -1562 CT y SNP TIMP1 372 T/C en comparación al estudio de 1000 genomas y artículos revisados.
- La población cumplió el equilibrio de Hardy Weinberg con respecto al SNP MMP9 -1562 C/T, sin embargo, por la ubicación del gen TIMP1 el SNP 372 T/C no cumple tal equilibrio.
- La presencia del genotipo CC-TC se determinó, en el SNP TIMP1 372 T/C como riesgo en la sepsis, lo que infiere un papel relevante en la fisiopatología de la sepsis como el inhibidor tisular 1.
- En el presente estudio, no se encontró relación entre la presencia de los alelos polimórficos con niveles elevados de TIMP1 y MMP9.
- Los SNPs estudiados no están asociados en la lesión y falla cardíaca aguda subclínica en pacientes con sepsis.

10. RECOMENDACIONES

El diseño metodológico realizado, fue el más adecuado con respecto a la cohorte estudiada, para disminuir los diferentes sesgos de selección y de información. Lo ideal en los estudios de predisposición genética en base a polimorfismos de nucleótido sencillo es realizar estudios de casos y controles para conocer causa y efecto. No obstante, los estudios transversales dan una vista puntal del comportamiento de los polimorfismos y su posible relación con un evento de interés.

El tamaño de muestra usado tiene un poder estadístico cercano al 90%, por lo cual los resultados obtenidos tienen una validez importante y según la literatura revisada es la investigación que ha usado mayor número de individuos (540 en total). Como el papel biológico del polimorfismo TIMP1 372 T/C no es claro, se podrían realizar estudios futuros de expresión del gen y actividad del regulador.

En la actualidad, los patrones de metilación de TIMP1 no han sido estudiados de forma exhaustiva, por lo cual se requiere entender si esta metilación en los genes primero es ocasionada por la exacerbación inmune, y podría afectar la expresión de dicho gen.

Por último, y dada el posible papel de TIMP1 no solo como regulador, se debe implementar investigaciones relacionadas con la activación de esta glicoproteína con otros mecanismos como la fibrosis cardíaca, coagulación y efecto proinflamatorio.

11. DIVULGACIÓN

Los resultados de esta investigación fueron presentados en modalidad poster a nivel nacional e internacional en los siguientes eventos.

- ❖ I Simposio Regional de Enfermedades Infecciosas y Buenas Prácticas Clínicas (apéndice K)
- ❖ V Simposio Internacional de actualización en bacteriología (apéndice L).

REFERENCIAS

- Abraham, E. (2016). New definitions for sepsis and septic shock: Continuing evolution but with much still to be done [Sepsis 3 Editorial]. *Jama*, 315(8), 757–759. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0290>
- Altmann, D. R., Korte, W., Maeder, M. T., Fehr, T., Haager, P., Rickli, H., ... Ammann, P. (2010). Elevated cardiac troponin I in sepsis and septic shock: No evidence for thrombus associated myocardial necrosis. *PLoS ONE*, 5(2), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009017>
- Aneman, A., & Vieillard-Baron, A. (2016). Cardiac dysfunction in sepsis. *Intensive Care Medicine*, 42(12), 2073–2076. <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4503-4>
- Angus, D. C., & van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *New England Journal of Medicine*, 369(9), 840–851. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623>
- Antonucci, E., Fiaccadori, E., Donadello, K., Taccone, F. S., Franchi, F., & Scolletta, S. (2014). Myocardial depression in sepsis: From pathogenesis to clinical manifestations and treatment. *Journal of Critical Care*, 29(4), 500–511. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2014.03.028>
- Behnes, M., Bertsch, T., & Hoffmann, U. (2013). TIMP-1 gene polymorphism: Are genetics able to predict outcome of septic patients? *Critical Care*, 17(4), 1–3. <https://doi.org/10.1186/cc12799>
- Birkedal-Hansen, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, E. J. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4(2), 197–250.
- Bojic, S., Kotur-Stevuljevic, J., Kalezic, N., Stevanovic, P., Jelic-Ivanovic, Z., Bilanovic, D., ... Simic-Ogrizovic, S. (2015). Diagnostic value of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in sepsis-associated acute kidney injury. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 237(2), 103–109. <https://doi.org/10.1620/tjem.237.103>.Correspondence
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., ... Sibbald,

- W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, *101*(6), 1644–1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>
- Booth, R. A., Hill, S. A., Don-Wauchope, A., Santaguida, P. L., Oremus, M., McKelvie, R., ... Raina, P. (2014). Performance of BNP and NT-proBNP for diagnosis of heart failure in primary care patients: A systematic review. *Heart Failure Reviews*, *19*(4), 439–451. <https://doi.org/10.1007/s10741-014-9445-8>
- Bradham, W. S., Gunasinghe, H., Holder, J. R., Multani, M., Killip, D., Anderson, M., ... Spinale, F. G. (2002). Release of matrix metalloproteinases following alcohol septal ablation in hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, *40*(12), 2165–2173. <https://doi.org/S0735109702025950> [pii]
- Braundmeier, A. G., & Nowak, R. A. (2006). Cytokines regulate matrix metalloproteinases in human uterine endometrial fibroblast cells through a mechanism that does not involve increases in extracellular matrix metalloproteinase inducer. *American Journal of Reproductive Immunology*, *56*(3), 201–214. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2006.00418.x>
- Brew, K., & Nagase, H. (2010). NIH Public Access. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1803*(1), 55–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.003>.The
- Buraczynska, K., Kurzepa, J., Ksiazek, A., Buraczynska, M., & Rejdak, K. (2015). Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Gene Polymorphism in Stroke Patients. *NeuroMolecular Medicine*, *17*(4), 385–390. <https://doi.org/10.1007/s12017-015-8367-5>
- Buraczynska, M., Dragan, M., Buraczynska, K., Orłowska-Kowalik, G., & Ksiazek, A. (2015). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) gene polymorphism and cardiovascular comorbidity in type 2 diabetes patients. *Journal of Diabetes and Its Complications*, *29*(6), 829–833. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.05.004>
- Burrage, P. S. (2006). Matrix Metalloproteinases: Role In Arthritis. *Frontiers in Bioscience*, *11*(1), 529. <https://doi.org/10.2741/1817>

- Caley, M. P., Martins, V. L. C., & O'Toole, E. A. (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in Wound Care*, 4(4), 225–234. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0581>
- Chen, L., Shen, Y., Liu, L., Li, X., Wang, T., & Wen, F. (2013). Interleukin-13 -1112 C/T Promoter Polymorphism Confers Risk for COPD: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8(7), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068222>
- Chiang, T. Y., Yu, Y. L., Lin, C. W., Tsao, S. M., Yang, S. F., & Yeh, C. Bin. (2013). The circulating level of MMP-9 and its ratio to TIMP-1 as a predictor of severity in patients with community-acquired pneumonia. *Clinica Chimica Acta*, 424, 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.06.013>
- Christaki, E., & Giamarellos-Bourboulis, E. J. (2014). The beginning of personalized medicine in sepsis: Small steps to a bright future. *Clinical Genetics*, 86(1), 56–61. <https://doi.org/10.1111/cge.12368>
- Collazos, J., Asensi, V., Martin, G., Montes, A. H., Suárez-Zarracina, T., & Valle-Garay, E. (2015). The effect of gender and genetic polymorphisms on matrix metalloprotease (MMP) and tissue inhibitor (TIMP) plasma levels in different infectious and non-infectious conditions. *Clinical and Experimental Immunology*, 182(2), 213–219. <https://doi.org/10.1111/cei.12686>
- Dagher, G. A., Saadeldine, M., Bachir, R., Zebian, D., & Chebl, R. B. (2015). Descriptive analysis of sepsis in a developing country. *International Journal of Emergency Medicine*, 8(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12245-015-0068-1>
- Devine, R. D., Bicer, S., Reiser, P. J., Velten, M., & Wold, L. E. (2015). Metalloproteinase expression is altered in cardiac and skeletal muscle in cancer cachexia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 309(4), H685–H691. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00106.2015>
- Di Carlo, A. (2013). Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and their complex MMP-9/NGAL in sera and urine of patients with kidney tumors. *Oncology Letters*, 5(5), 1677–1681.

<https://doi.org/10.3892/ol.2013.1252>

- Dollery, C. M., McEwan, J. R., & Henney, A. M. (1995). Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*, 77(5), 863–868. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7554139
- Elkington, H., White, P., Addington-Hall, J., Higgs, R., & Edmonds, P. (2005). The healthcare needs of chronic obstructive pulmonary disease patients in the last year of life. *Palliative Medicine*, 19(6), 485–491. <https://doi.org/10.1191/0269216305pm1056oa>
- Emingil, G., Han, B., Gürkan, A., Berdeli, A., Tervahartiala, T., Salo, T., ... Sorsa, T. (2014). Matrix Metalloproteinase (MMP)-8 and Tissue Inhibitor of MMP-1 (TIMP-1) Gene Polymorphisms in Generalized Aggressive Periodontitis: Gingival Crevicular Fluid MMP-8 and TIMP-1 Levels and Outcome of Periodontal Therapy. *Journal of Periodontology*, 85(8), 1070–1080. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130365>
- Esteban, A., Frutos-Vivar, F., Ferguson, N. D., Peñuelas, O., Lorente, J. Á., Gordo, F., ... De Luna, R. R. (2007). Sepsis incidence and outcome: Contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Critical Care Medicine*, 35(5), 1284–1289. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000260960.94300.DE>
- Feng, S., Ye, G., Bai, S., Wei, H., Liao, X., & Li, L. (2016). Matrix Metalloproteinase-9 – 1562C / T Gene Polymorphism Is Associated with Diabetic Nephropathy, 2016.
- Flemming, S., Burkard, N., Renschler, M., Vielmuth, F., Meir, M., Schick, M. A., ... Schlegel, N. (2015). Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis. *Cardiovascular Research*, 107(1), 32–44. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv144>
- Gaieski, D. F., Edwards, J. M., Kalian, M. J., & Carr, B. G. (2009). Benchmarking the Incidence and Mortality of Severe Sepsis in the United States*, 2009(6).
- Gialeli, C., Theocharis, A. D., & Karamanos, N. K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal*, 278(1), 16–27. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x>

- Goldbergova, M. P., Parenica, J., Jarkovsky, J., Kala, P., Poloczek, M., Manousek, J., ... Spinar, J. (2012). The Association Between Levels of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 with Acute Heart Failure and Left Ventricular Dysfunction in Patients with ST Elevation Myocardial Infarction Treated by Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 16(10), 1172–1178. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2012.0120>
- Gotts, J. E., & Matthay, M. A. (2016). Sepsis: pathophysiology and clinical management. *Bmj*, i1585. <https://doi.org/10.1136/bmj.i1585>
- Gutierrez, F. R. S., Lalu, M. M., Mariano, F. S., Milanezi, C. M., Cena, J., Gerlach, R. F., ... Silva, J. S. (2008). Increased Activities of Cardiac Matrix Metalloproteinases Matrix Metalloproteinase (MMP)–2 and MMP-9 Are Associated with Mortality during the Acute Phase of Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 197, 1468–1476. <https://doi.org/10.1086/587487>
- Hartl DL. (2000). *A primer of population genetics* (3rd ed.).
- Hotchkiss, Richard S and Karl, I. E. (2002). The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *Nejm*, 1–13. <https://doi.org/10.1056/NEJMra021333>
- Ito, T. (2014). PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. *Journal of Intensive Care*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40560-014-0065-0>
- J.M. Rodríguez-Pérez. (n.d.). associated with myocardial infarction in Mexican patients, 15(1), 1–11.
- Jaramillo-Bustamante, J. C., Marín-Agudelo, A., Fernández-Laverde, M., & Bareño-Silva, J. (2012). Epidemiology of sepsis in pediatric intensive care units. *Pediatric Critical Care Medicine*, 13(5), 501–508. <https://doi.org/10.1097/PCC.0b013e31823c980f>
- Kenyon, N. J., & Sandrock, C. E. (2009). Bench-to-bedside review : the role of nitric oxide in sepsis, 3(5), 511–521.
- Kim, W. Y., & Hong, S. B. (2016). Sepsis and acute respiratory distress syndrome: Recent update. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 79(2), 53–57. <https://doi.org/10.4046/trd.2016.79.2.53>

- Kingdom, U., Kingdom, U., London, F., Health, N., Foundation, S., Kingdom, U., & Kingdom, U. (2017). HHS Public Access, 21(2), 129–139. <https://doi.org/10.5588/ijtld.16.0716.Isoniazid>
- Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Z. J. (1985). *APACHE II: a severity of disease classification system*.
- Krex, D., Röhl, H., König, I. R., Ziegler, A., Schackert, H. K., & Schackert, G. (2003). Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1, -2, and -3 Polymorphisms in a White Population with Intracranial Aneurysms. *Stroke*, 34(12), 2817–2821. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000099966.51485.5F>
- Kumar, A., Thota, V., Dee, L., Olson, J., Uretz, E., & Parrillo, J. E. (1996). Induced by Human Septic Shock Serum, 183(March).
- Lagu, T., Rothberg, M. B., Shieh, M.-S., Pekow, P. S., Steingrub, J. S., & Lindenauer, P. K. (2012). Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Critical Care Medicine*, 40(3), 754–761. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318232db65>
- Lalu, M. M., Cena, J., Chowdhury, R., Lam, A., & Schulz, R. (2006). *Matrix metalloproteinases contribute to endotoxin and interleukin-1 β induced vascular dysfunction*. *British Journal of Pharmacology* (Vol. 149). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706823>
- Lalu, M. M., Gao, C. Q., & Schulz, R. (2003). Matrix metalloproteinase inhibitors attenuate endotoxemia induced cardiac dysfunction: A potential role for MMP-9. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 251(1–2), 61–66. <https://doi.org/10.1023/A:1025417529167>
- Larche, J., Lancel, S., Hassoun, S. M., Favory, R., Decoster, B., Marchetti, P., ... Neviere, R. (2006). Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition Prevents Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction and Mortality. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(2), 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.02.069>
- León, A. L., Hoyos, N. A., Barrera, L. I., Rosa, G. D. La, Dennis, R., Dueñas, C., ... Jaimes, F. A. (2013). Clinical course of sepsis , severe sepsis , and septic shock in a cohort of infected patients from ten Colombian hospitals. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-345>

- León, F. J., Rondón, F., Vargas, C. I., Oróstegui, M., Bautista, L., Serrano, N. C., ... Castillo, A. (2012). Analysis of population genetic structure from Bucaramanga (Colombia) based on gene polymorphisms associated with regulation of blood pressure. *Colombia Médica*, 43(Vargas CI), 154–161. Retrieved from <http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/787/1806%5Cnhttp://www.scielo.org.co/pdf/cm/v43n2/v43n2a08.pdf>
- Lever, E., & Sheer, D. (2010). The role of nuclear organization in cancer. *The Journal of Pathology*, 220(September), 114–125. <https://doi.org/10.1002/path>
- Lorente, L., Martín, M. M., Solé-Violán, J., Blanquer, J., Labarta, L., Díaz, C., ... Páramo, J. A. (2014). Association of sepsis-related mortality with early increase of TIMP-1/MMP-9 ratio. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094318>
- Lorente, L., Martín, M., Plasencia, F., Solé-Violán, J., Blanquer, J., Labarta, L., ... Salido, E. (2013). The 372 T/C genetic polymorphism of TIMP-1 is associated with serum levels of TIMP-1 and survival in patients with severe sepsis. *Critical Care (London, England)*, 17(3), R94. <https://doi.org/10.1186/cc12739>
- Lv, X., & Wang, H. (2016). Pathophysiology of sepsis-induced myocardial dysfunction. *Military Medical Research*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40779-016-0099-9>
- Majsterek I, Markiewicz L, Przybyłowska K, Gacek M, Kurowska AK, Kaminska A, Szaflik J, S. J. (2011). Association of MMP1-1607 1G/2G and TIMP1 372 T/C gene polymorphisms with risk of primary open angle glaucoma in a Polish population. *Med Sci Monit*, 17(7), CR417-R421.
- Markwart, R., Condotta, S. A., Requardt, R. P., Borken, F., Schubert, K., Weigel, C., ... Rubio, I. (2014). Immunosuppression after sepsis: Systemic inflammation and sepsis induce a loss of naïve T-cells but no enduring cell-autonomous defects in T-cell function. *PLoS ONE*, 9(12), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115094>
- Martín-Ramírez, J. F., Domínguez-Borgua, A., & Vázquez-Flores, A. D. (2014). Sepsis. *Medicina Interna Mexico*, 30(2), 159–175.
- Martin, G., Asensi, V., Montes, A. H., Collazos, J., Alvarez, V., Carton, J. A., ... Valle-Garay, E.

- (2014). Role of plasma matrix-metalloproteases (MMPs) and their polymorphisms (SNPs) in sepsis development and outcome in ICU patients. *Scientific Reports*, 4, 5002. <https://doi.org/10.1038/srep05002>
- Mayr, F. B., Yende, S., & Angus, D. C. (2014). Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5(1), 4–11. <https://doi.org/10.4161/viru.27372>
- Meijer, M. J., Mieremet-Ooms, M. A. C., Sier, C. F. M., van Hogeand, R. A., Lamers, C. B. H. W., Hommes, D. W., & Verspaget, H. W. (2009). Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as prognostic indicators for diagnostic and surgical recurrence in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(1), 84–92. <https://doi.org/10.1002/ibd.20581>
- Meijer, M. J. W., Mieremet-Ooms, M. A. C., van Hogeand, R. A., Lamers, C. B. H. W., Hommes, D. W., & Verspaget, H. W. (2007). Role of matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13(21), 2960–2966. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4171149&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Merx, M. W., & Weber, C. D. a-A. 14 D. O.-116/7/793 [Pii] 10. 1161/Circulationaha. 106. 67835. E. T.-2007/08/19. (2007). Sepsis and the heart. *Circulation*, 116(7), 793–802 ST–Sepsis and the heart. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678359>
- Mora-Garcia, G. J., Ruiz-Diaz, M. S., Gomez-Camargo, D. E., & Gomez-Alegria, C. J. (2017). Frequency of common polymorphisms in Caveolin 1 (CAV1) gene in adults with high serum triglycerides from Colombian Caribbean Coast. *Colombia Medica*, 48(4), 167–173. <https://doi.org/10.25100/cm.v48i4.2625>
- Mueller, T., Gegenhuber, A., Poelz, W., & Haltmayer, M. (2004). Head-to-head comparison of the diagnostic utility of BNP and NT-proBNP in symptomatic and asymptomatic structural heart disease. *Clinica Chimica Acta*, 341(1–2), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2003.10.027>
- Nagase H, Ogata Y, Suzuki K, Enghild JJ, S. G. (1991). Substrate specificities and activation

- mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans.*, 19(1986), 715–718.
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3), 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>
- NCBI. (n.d.). www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4898.
- Niño, M. E., Serrano, S. E., Niño, D. C., Mccosham, D. M., Cardenas, M. E., Villareal, V. P., ... Torres-Dueñas, D. (2017). TIMP1 and MMP9 are predictors of mortality in septic patients in the emergency department and intensive care unit unlike MMP9/TIMP1 ratio: Multivariate model. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171191>
- Okamoto, K., Tamura, T., & Sawatsubashi, Y. (2016). Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Journal of Intensive Care*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40560-016-0149-0>
- Opal, S. M. (2005). sepsis, 6(3), 55–60. <https://doi.org/10.1097/01.PCC.0000161580.79526.4C>
- Opstad, T. B., Arnesen, H., Pettersen, A., & Seljeflot, I. (2014). The MMP-9 -1562 C/T polymorphism in the presence of metabolic syndrome increases the risk of clinical events in patients with coronary artery disease. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106816>
- Ozcan, N., Ozcan, A., Kaymak, C., Basar, H., Kotanoglu, M., & Kose, B. (2017). Comparison of prognostic value of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in septic and non-septic intensive care patients. *Arch Med Sci*, 13(2), 418–425. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.54196>
- Páez, M. C., Matsuura, E., Díaz, L. A., Shoenfeld, Y., Serrano, N. C., & Anaya, J. M. (2013). Laminin-1 (LM-111) in preeclampsia and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 46(1), 14–20. <https://doi.org/10.3109/08916934.2012.730586>
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(3), 221–233. <https://doi.org/10.1038/nrm2125>
- Pereda, M. P., Ledda, M. F., Goldberg, V., Chervín, A., Carrizo, G., Molina, H., ... Stalla, G. K.

- (2000). High Levels of Matrix Metalloproteinases Regulate Proliferation and Hormone Secretion in Pituitary Cells ¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(1), 263–269. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.1.6248>
- Phua, J., Ngerng, W. J., See, K. C., Tay, C. K., Kiong, T., Lim, H. F., ... Mukhopadhyay, A. (2013). Characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive severe sepsis. *Critical Care*, 17(5), R202. <https://doi.org/10.1186/cc12896>
- Powell, J. T. (2006). Genes predisposing to rapid aneurysm growth. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1085, 236–241. <https://doi.org/10.1196/annals.1383.042>
- Prathipati, P., Metreveli, N., Nandi, S. S., Tyagi, S. C., & Mishra, P. K. (2016). Ablation of matrix metalloproteinase-9 prevents cardiomyocytes contractile dysfunction in diabetics. *Frontiers in Physiology*, 7(MAR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00093>
- Rahman, A., & Broadley, S. A. (2014). Review article: Elevated troponin: Diagnostic gold or fool's gold? *EMA - Emergency Medicine Australasia*, 26(2), 125–130. <https://doi.org/10.1111/1742-6723.12203>
- Ralethford JH. (2012). *Human Population Genetics*. Wiley.
- Rhodes, A., Evans, L. E., Alhazzani, W., Levy, M. M., Antonelli, M., Ferrer, R., ... Dellinger, R. P. (2017). *Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016*. *Critical Care Medicine* (Vol. 45). <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002255>
- Roderfeld, M., Graf, J., Giese, B., Salguero-Palacios, R., Tschuschner, A., Müller-Newen, G., & Roeb, E. (2007). Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. *Biological Chemistry*, 388(11), 1227–1234. <https://doi.org/10.1515/BC.2007.123>
- Rodríguez, F., Barrera, L., De La Rosa, G., Dennis, R., Dueñas, C., Granados, M., ... Jaimes, F. F. (2011). The epidemiology of sepsis in Colombia: a prospective multicenter cohort study in ten university hospitals. *Critical Care Medicine*, 39(7), 1675–1682. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318218a35e>
- Romero-Bermejo, F. J., Ruiz-Bailen, M., Gil-Cebrian, J., & Huertos-Ranchal, M. J. (2011). Sepsis-induced cardiomyopathy. *Current Cardiology Reviews*, 7(3), 163–183.

<https://doi.org/10.2174/157340311798220494>

- Room, T. B., Lauderdale, F., & Goldberg, I. J. (2015). HHS Public Access, *12*(2), 130–140. <https://doi.org/10.1007/s11897-014-0247-z>. Pathophysiology
- Rugeles, M. T., Montoya-ruiz, C., Bedoya, G., & Velilla, P. A. (2016). Variants in LTA , TNF , IL1B and IL10 genes associated with the clinical course of sepsis. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8860-4>
- Sachwani, G. R., Jaehne, A. K., Jayaprakash, N., Kuzich, M., Onkoba, V., Blyden, D., ... Larson, R. (2016). The association between blood glucose levels and matrix-metalloproteinase-9 in early severe sepsis and septic shock. *Journal of Inflammation*, *13*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12950-016-0122-7>
- Sagy, M., Al-Qaqaa, Y., & Kim, P. (2013). Definitions and pathophysiology of sepsis. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, *43*(10), 260–263. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2013.10.001>
- Sapna, G., Gokul, S., & Bagri-Manjrekar, K. (2014). Matrix metalloproteinases and periodontal diseases. *Oral Diseases*, *20*(6), 538–550. <https://doi.org/10.1111/odi.12159>
- Saracco, P., Vitale, P., Scolfaro, C., Pollio, B., Pagliarino, M., & Timeus, F. (2011). The coagulopathy in sepsis: Significance and implications for treatment. *Pediatric Reports*, *3*(4), 119–121. <https://doi.org/10.4081/pr.2011.e30>
- Schmidt, R. R., Pedersen, C. M., Qiao, Y., & Zähringer, U. (2011). Chemical synthesis of bacterial lipoteichoic acids: An insight on its biological significance. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *9*(7), 2040. <https://doi.org/10.1039/c0ob00794c>
- Selders, G. S., Fetz, A. E., Radic, M. Z., & Bowlin, G. L. (2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative Biomaterials*, *4*(1), 55–68. <https://doi.org/10.1093/rb/rbw041>
- Serrano-Gomez, S., Burgos-Angulo, G., Camila Niño-Vargas, D., Eugenia Niño, M., Eugenia Cárdenas, M., Chacón-Valenzuela, E., ... Torres-Dueñas, D. (n.d.). Predictive Value of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors for Mortality in Septic Patients: A Cohort Study. *Journal of Intensive Care Medicine*, *1*(9).

<https://doi.org/10.1177/0885066617732284>

- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., ... Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*, *315*(8), 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Spinale, F. G., & Villarreal, F. (2014). Targeting matrix metalloproteinases in heart disease: Lessons from endogenous inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, *90*(1), 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.04.011>
- Stephen G. Baum, M. (2016). The Epidemiology of Sepsis. *NEJM Journal Watch*, *2016*(1), NA42165. <https://doi.org/10.1056/nejm-jw.NA42165>
- Takawale, A., Zhang, P., Patel, V. B., Wang, X., Oudit, G., & Kassiri, Z. (2017). Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 Promotes Myocardial Fibrosis by Mediating CD63-Integrin β 1 Interaction. *Hypertension*, *69*(6), 1092–1103. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09045>
- Tschesche, H., Zölzer, V., Triebel, S., & Bartsch, S. (2001). The human neutrophil lipocalin supports the allosteric activation of matrix metalloproteinases. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *268*(7), 1918–1928. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11277914>
- Turner, K. L., Moore, L. J., Todd, S. R., Sucher, J. F., Jones, S. A., McKinley, B. A., ... Moore, F. A. (2011). Identification of cardiac dysfunction in sepsis with B-type natriuretic peptide. *Journal of the American College of Surgeons*, *213*(1), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2011.03.027>
- Ugarte-Berzal, E., Vandooren, J., Bailón, E., Opdenakker, G., & García-Pardo, A. (2016). Inhibition of MMP-9-dependent degradation of gelatin, but not other MMP-9 substrates, by the MMP-9 hemopexin domain blades 1 and 4. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(22), 11751–11760. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708438>
- Uhle, F., Chousterman, B. G., Grützmann, R., Brenner, T., & Weber, G. F. (2016). Pathogenic, immunologic, and clinical aspects of sepsis - Update 2016. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *7210*(September). <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1224971>

- Vacek, T. P., Rehman, S., Neamtu, D., Yu, S., Givimani, S., & Tyagi, S. C. (2015). Vascular Health and Risk Management Dovepress Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. *Vascular Health and Risk Management*, *11*, 173–183. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S68415>
- van der Poll, T., & Opal, S. M. (2008). Host-pathogen interactions in sepsis. *The Lancet Infectious Diseases*, *8*(1), 32–43. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70265-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70265-7)
- Velásquez Pereira, Leydi Carolina; Vargas Castellanos, Clara Ines; Silva Sieger, F. A. (2016). Polymorphisms of the lipoprotein lipase gene as genetic markers for stroke in colombiana population: a case control study. *Colombia Médica (Cali, Colombia)*, *47*(29), 189–195.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, T. L. (1996). The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*, *22*(7), 707–710.
- Vizmanos, J. L. (2014). *Las claves de la genética de las poblaciones*. Elsevier Inc.
- Wagner, D. R., Delagardelle, C., Ernens, I., Rouy, D., Vaillant, M., & Beissel, J. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. *Journal of Cardiac Failure*, *12*(1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2005.08.002>
- Wang, M., Zhang, Q., Zhao, X., Dong, G., & Li, C. (2014). Diagnostic and prognostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 for sepsis in the Emergency Department: An observational study. *Critical Care*, *18*(6), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0634-6>
- Wiersinga, W. J., Leopold, S. J., Cranendonk, D. R., & van der Poll, T. (2014). Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*, *5*(1), 36–44. <https://doi.org/10.4161/viru.25436>
- Wu, J.-R., Chen, I.-C., Dai, Z.-K., Hung, J.-F., & Hsu, J.-H. (2015). Early Elevated B-Type Natriuretic Peptide Levels are Associated with Cardiac Dysfunction and Poor Clinical Outcome in Pediatric Septic Patients. *Acta Cardiol Sin*, *31*, 485–493. <https://doi.org/10.6515/ACS20141201E>
- Yabluchanskiy, A., Ma, Y., Iyer, R. P., Michael, E., Lindsey, M. L., Yarbrough, W. M., ...

- Lindsey, M. L. (2014). Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. *Physiology*, 391–403. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2013>
- Yadav, S. S., Mandal, R. K., Singh, M. K., Verma, A., Dwivedi, P., Sethi, R., ... Khattri, S. (2014). High Serum Level of Matrix Metalloproteinase 9 and Promoter Polymorphism – 1562 C:T as a New Risk Factor for Metabolic Syndrome. *DNA and Cell Biology*, 33(11), 816–822. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2511>
- Yolima Pertuz-Meza, Celenny Perez-Quintero, Y. P.-V. (2016). Epidemiological aspects of sepsis in intensive care units Santa Marta, Colombia. *Duazary*, 13(2), 126–132. <https://doi.org/10.21676/2389783X.1718>
- Zanon, F., Caovilla, J. J., Michel, R. S., Cabeda, E. V., Ceretta, D. F., Luckemeyer, G. D., ... Posenatto, N. (2008). Sepsis in the Intensive Care Unit : Etiologies , Prognostic Factors and Mortality. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 20(2), 128–134. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2008000200003>
- Zanotti Cavazzoni, S. L., Guglielmi, M., Parrillo, J. E., Walker, T., Dellinger, R. P., & Hollenberg, S. M. (2010). Ventricular dilation is associated with improved cardiovascular performance and survival in sepsis. *Chest*, 138(4), 848–855. <https://doi.org/10.1378/chest.09-1086>
- Zapata Ospina, J. P. (2011). Sepsis: La otra cara de la respuesta inmune. *Iatreia*, 24(2), 179–190.
- Zhang, B., Ye, S., Herrmann, S.-M., Eriksson, P., De Maat, M., Evans, A., ... Henney, A. M. (n.d.). Functional Polymorphism in the Regulatory Region of Gelatinase B Gene in Relation to Severity of Coronary Atherosclerosis.
- Zhang, Z., Wu, X., Cai, T., Gao, W., Zhou, X., Zhao, J., ... Liao, L. (2015). Matrix metalloproteinase 9 gene promoter (Rs 3918242) mutation reduces the risk of diabetic microvascular complications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(7), 8023–8033. <https://doi.org/10.3390/ijerph120708023>