



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DE LA HEPARINA EN LAS GELATINASAS Y SUS INHIBIDORES, SOBRE
LA PERMEABILIDAD VASCULAR DURANTE LA PRESERVACIÓN PULMONAR
EN CONEJOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. ALQUICIRA MIRELES JESÚS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ LUIS ARREOLA RAMÍREZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA SANDRA CABRERA BENITEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/486/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión virtual del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **30 de marzo de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **ALQUICIRA MIRELES JESÚS** con número de cuenta **303238502** con la tesis titulada **“EFECTO DE LA HEPARINA EN LAS GELATINASAS Y SUS INHIBIDORES, SOBRE LA PERMEABILIDAD VASCULAR DURANTE LA PRESERVACIÓN PULMONAR EN CONEJOS”**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ LUIS ARREOLA RAMÍREZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. VÍCTOR MANUEL RUÍZ LÓPEZ
Vocal: DRA. PATRICIA SEGURA MEDINA
Secretario: DRA. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL
Suplente: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
Suplente: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de agosto de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca con el número de CVU 704526

A los miembros del Comité Tutor, la Dra. María Sandra Cabrera Benítez y la Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal, así como al Dr. José Luis Arreola Ramírez tutor principal de este proyecto de investigación.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Con las personas que estoy y estaré eternamente agradecido son sin duda alguna mis padres María Briseida Mireles y Vicente Alquicira, los cuales me han dado su apoyo incondicional de muchas maneras, lo que me ha permitido alcanzar varias de mis metas establecidas, además que sin sus enseñanzas no sería la persona que soy. Así mismo, agradezco a mi familia más cercana por esas palabras de aliento que en muchas ocasiones son necesarias para no perdernos en la desesperación y angustia por alguna dificultad que estemos pasando.

También a todas las personas que integran el Departamento de Hiperreactividad Bronquial del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, la Dra. Patricia Segura, Dra. Betina Sommer, Dra. Verónica Carbajal, el Dr. Jaime Chávez y la asistencia técnica de Antonia Rodríguez, por su convivencia, amistad, ayuda y consejos.

Así mismo, me gustaría dar las gracias a cada uno de los miembros que conformaron mi jurado la Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal, Dra. Patricia Segura Medina, el Dr. Víctor Manuel Ruiz López, Dr. Rene de Jesús Cárdenas Vázquez y Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, por las observaciones las cuales enriquecieron en gran medida el desarrollo de este trabajo, y su tiempo ya que dadas las circunstancias de salud por las cuales pasamos a nivel mundial este 2020, siempre pude contar con una respuesta y retroalimentación por parte de ellos lo que me da un ejemplo a seguir sobre la vocación que debe tener uno hacia la enseñanza.

Y finalmente me gustaría agradecer muy en especial a el Dr. Mario H. Vargas y el Dr. José Luis Arreola, pues mucho del conocimiento que puedo decir que poseo aunado a las formas de trabajar y desarrollarme en este ámbito de la ciencia, se los debo a ellos mostrándome como siempre buscar la mejor manera de obtener un resultado satisfactorio para alguna contrariedad que se presente, junto con la humildad de uno mismo, pues esta es la base de la verdadera grandeza.

1. ÍNDICE

1.1. Índice de figuras

1.2. Índice de tablas

1.3. Abreviaturas

2. Resumen	1
2.1. Abstract	3
3. Introducción	
3.1. Trasplantes.....	5
3.2. Falla primaria del injerto.....	6
3.2.1. Isquemia reperfusión.....	7
3.3. Matriz extracelular.....	9
3.4. Metaloproteinasas.....	11
3.5. Inhibidores tisulares de metaloproteinasas.....	16
3.6. Heparina.....	18
3.7. ONO-4817.....	20
4. Planteamiento del problema	21
5. Hipótesis	22
6. Objetivos	22
7. Metodología	
7.1. Animales de estudio.....	23
7.2. Procedimiento quirúrgico.....	23
7.3. Lavado y preservación pulmonar.....	24
7.4. Pulmón aislado y perfundido.....	25
7.5. Permeabilidad vascular.....	25
7.6. Cuantificación de proteínas.....	28
7.7. Zimografía en gel.....	28
7.8. Cuantificación de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas.....	29
8. Análisis estadístico	29
9. Resultados	30
10. Discusión	36
11. Conclusiones	39
12. Referencias bibliográficas	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de trasplantes y tipo de procedimiento de los últimos años.....	5
Figura 2. Facetas del proceso de trasplante pulmonar	7
Figura 3. Organización de la matriz extracelular	11
Figura 4. Mecanismo del <i>switch de cisteína</i>	12
Figura 5. Estructura de las subfamilias de MMPs	13
Figura 6. Inhibición endógena de MMPs por TIMPs	16
Figura 7. Implicaciones de los proteoglicanos en reacciones inflamatorias.....	19
Figura 8. Procedimiento quirúrgico	24
Figura 9. Lavado y preservación de los pulmones	25
Figura 10. Bloque cardiopulmonar en el equipo de pulmón aislado y perfundido.....	26
Figura 11. Representación del método para el registro del mKf,c	27
Figura 12. Mediciones del coeficiente de filtración de los pulmones	30
Figura 13. Actividad de las gelatinasas a diferentes concentraciones de heparina..	32
Figura 14. Actividad relativa de las gelatinasas para cada uno de los grupos	33
Figura 15. Cuantificación de los inhibidores tisulares de metaloproteinasa.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grados de gravedad de la falla primaria del injerto pulmonar.....	8
Tabla 2. Clasificación de las metaloproteinasas.....	15
Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos.....	34

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza	mKf,c	Coficiente de filtración capilar modificado
BCA	Ácido bicinconínico	MMPs	Metaloproteinasas de matriz
CS-PG	Sulfato de condroitina	MMP-2	Metaloproteinasas de matriz 2
e.e	Error estándar de la media	MMP-9	Metaloproteinasas de matriz 9
FPI	Falla primaria del injerto	Pa	Presión arterial
FiO₂	Fracción inspirada de oxígeno	Pc	Presión capilar
GAG	Glicosaminoglicanos	PaO₂	Presión parcial de oxígeno arterial
HS	Heparán sulfato	PEEP	<i>Presión positiva espiratoria final</i>
HSPG	Proteoglicano de heparán sulfato	Pv	Presión venosa
IMMPs	Inhibidores de metaloproteinasas	PAI-2	Inhibidor del activador del plasminógeno-2
I/R	Isquemia-reperfusión	RAGE	Receptor para productos finales de glicación avanzada
ISHLT	Sociedad Internacional de Trasplante de Corazón y Pulmón	TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
JNKs	Quinasas c-Jun N-terminal	TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
MEC	Matriz extracelular	VSMC	Células musculares lisas vasculares

RESUMEN

Los trasplantes han sido uno de los avances más significativos en medicina desde la segunda mitad del siglo XX y siguen siendo en muchos casos el único tratamiento efectivo en la insuficiencia de órganos terminales. En la última década ha habido un aumento significativo en el número de trasplantes, receptores en línea de espera y centros de ejecución. Sin embargo, debido a la escasez de órganos disponibles, existe una necesidad extrema de optimizar su uso, por lo tanto, un paso crucial en el proceso de trasplante radica en la preservación de órganos, cuyo objetivo principal es mantener la función de los tejidos durante el almacenamiento (24h o menos) para que el injerto funcione en reperfusión.

A pesar de su éxito, del 10 al 30% de los trasplantes pulmonares desarrollan la falla primaria del injerto (FPI), una complicación vascular multifactorial caracterizada por la presencia de edema pulmonar e hipoxemia severa en las primeras 72h posteriores al trasplante. Es por eso que la intervención temprana durante etapas como la preservación, es esencial para atenuar el daño causado por la isquemia-reperfusión (I/R), identificada como el principal factor causal de FPI.

El daño pulmonar por I/R se caracteriza por edema alveolar y es una complicación importante del período postoperatorio temprano en el trasplante de pulmón. La actividad de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9) se regulan al alza durante la preservación pulmonar. Debido a que esta regulación positiva puede conducir a modificaciones de la matriz extracelular (MEC) y favorecer un incremento de la permeabilidad vascular, en este trabajo evaluamos el papel de las gelatinasas en la I/R pulmonar.

Se utilizaron conejos de Nueva Zelanda para evaluar el coeficiente de filtración capilar modificado (mKf,c , en $ml \cdot min^{-1} \cdot cmH_2O^{-1} \cdot g^{-1}$) en la preparación pulmonar perfundida aislada. El mKf,c se midió inmediatamente después de obtener el bloque cardiopulmonar (grupo control, $n=6$) o después de 24h de preservación en solución salina a $4^{\circ}C$ (grupo 24h, $n=6$) o con un inhibidor de gelatinasa a una concentración de $1\mu M$ (grupo ONO-4817, $n=6$) o 5000UI de heparina (que regula la actividad de gelatinasa, grupo Heparina, $n=6$). Después de las mediciones de mKf,c , los pulmones se homogeneizaron y los tipos y contenido de gelatinasas se cuantificaron por zimografía en gel. Nuestros resultados mostraron que el

proceso de preservación aumentó en gran medida el mKf,c (de 3.67 ± 0.37 en el grupo control a 20.48 ± 0.52 en el grupo 24h, $\text{media} \pm \text{e.e.}$, $p \leq 0.01$). Este incremento en mKf,c se redujo significativamente en ONO-4817 (4.65 ± 0.50 , $p \leq 0.01$) y heparina (5.71 ± 0.54 , $p \leq 0.05$).

Aunque, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de gelatinasas, se observó una tendencia de disminución para MMP-9, con relación a el grado de daño evaluado mediante el mKf,c. Las gelatinasas parecen tener un papel importante en la promoción de la lesión pulmonar por I/R, lo que sugiere que el uso de heparina o inhibidores de gelatinasas durante el período isquémico puede mejorar la preservación pulmonar.

ABSTRACT

Transplants have been one of the most significant advances in medicine since the second half of the 20th century and remain in many cases the only effective treatment for end-organ failure. In the past decade, there has been a significant increase in the number of transplants, waiting line receivers, and execution centers. However, due to the shortage of available organs, there is an extreme need to optimize their use, therefore, a crucial step in the transplant process lies in the preservation of organs, whose main objective is to maintain tissue function during storage (24h or less) permitting that the graft functions in reperfusion.

Despite its success, 10 to 30% of lung transplants develop primary graft failure (PGF), a multifactorial vascular complication characterized by the presence of pulmonary edema and severe hypoxemia in the first 72h post-transplant. That is why early intervention during stages such as preservation is essential to mitigate the damage caused by ischemia-reperfusion (I/R), identified as the main causal factor of PGF.

Lung damage from I/R is characterized by alveolar edema and is a major complication of the early postoperative period in lung transplantation. The activity of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) are upregulated during lung preservation. Because this positive regulation can lead to modifications of the extracellular matrix (ECM) and favor an increase in vascular permeability, in this work we evaluate the role of gelatinases in pulmonary I/R.

New Zealand rabbits were used to evaluate the modified capillary filtration coefficient (mKf_c , in $ml \cdot min^{-1} \cdot cmH_2O^{-1} \cdot g^{-1}$) in the isolated perfused lung preparation. The mKf_c was measured immediately after after obtaining the cardiopulmonary block (control group, $n=6$) or after 24h of preservation in saline at $4^\circ C$ (24h group, $n=6$) or with a gelatinase inhibitor at a concentration $1\mu M$ (ONO-4817 group, $n=6$) or 5000UI of heparin (regulating gelatinase activity, Heparin group, $n=6$). After mKf_c measurements, the lungs were homogenized and the types and content of gelatinases were quantified by gel zymography. Our results showed that the preservation process greatly increased the mKf_c (from 3.67 ± 0.37 in the control group to 20.48 ± 0.52 in the 24h group, $mean \pm SE$, $p \leq 0.01$). This increase in mKf_c was significantly reduced in ONO-4817 (4.65 ± 0.50 , $p \leq 0.01$) and heparin (5.71 ± 0.54 , $p \leq 0.05$).

Although, no significant differences were found in the content of gelatinases, a decrease trend was observed for MMP-9, in relation to the degree of damage evaluated by the mKf,c. Gelatinases appear to play an important role in promoting lung injury by I/R, suggesting that the use of heparin or gelatinase inhibitors during the ischemic period may improve lung preservation.

INTRODUCCIÓN

Trasplantes

La preservación de los órganos ha sido de gran importancia desde que los trasplantes se convirtieron en una actividad clínica global, siendo uno de los avances más significativos en medicina a partir de la segunda mitad del siglo XX y continúan siendo en muchos casos el único tratamiento disponible efectivo, esto para solo un puñado de pacientes con un tratamiento globalmente aceptado hacia la insuficiencia de órganos terminales. Durante la última década ha habido un aumento significativo en el número de trasplantes (**Figura 1**) (1), receptores en línea de espera y centros de ejecución, impulsados por muchos factores, incluidos los cambios demográficos de donantes, la necesidad de utilizar todos los órganos disponibles para trasplante y poder cumplir la creciente necesidad clínica (2, 3).

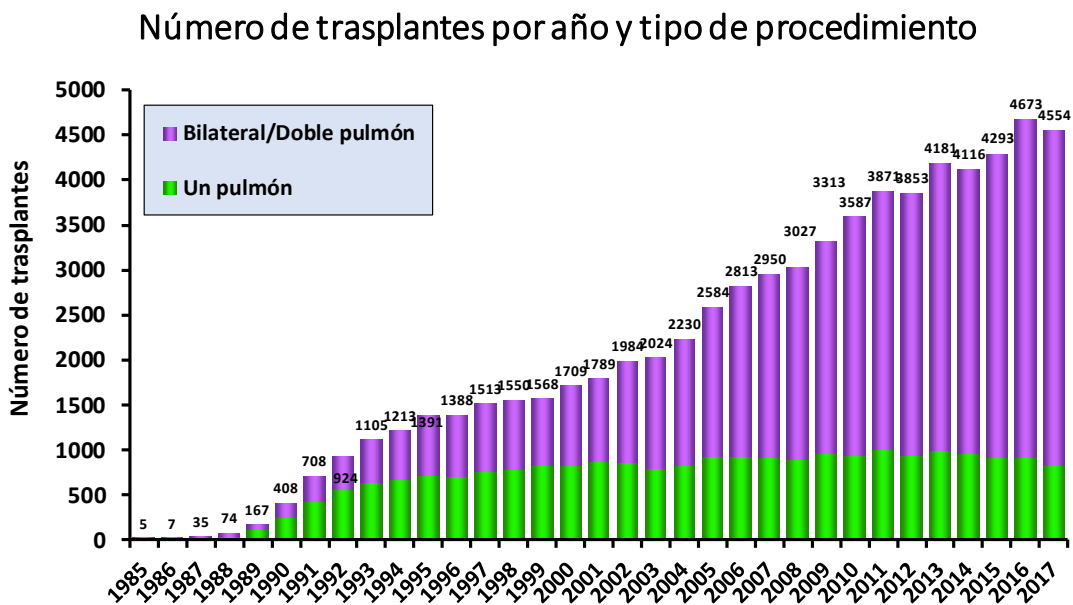


Figura 1. Número de trasplantes y tipo de procedimiento de los últimos años que se informa por parte de la Sociedad Internacional para el Trasplante de Corazón y Pulmón (ISHLT). Modificado de Khush (1).

Sin embargo, en vista de la creciente escasez de órganos donantes, los criterios de aceptación para la recuperación del injerto se han ampliado, y los órganos que se habrían descartado en el pasado, se utilizan cada vez más en la rutina actual, teniendo una extrema

necesidad de mejorar el uso de los mismos, por lo tanto, un paso crucial en el proceso de trasplante radica en su preservación, cuyo objetivo principal es mantener el tejido y la función orgánica durante el almacenamiento (24h o menos) de modo que el injerto funcione en la reperfusión (4). El método básico para la preservación de órganos implica el enjuague vascular con una solución de preservación específicamente diseñada para soportar la hipotermia y el posterior almacenamiento estático. La simplicidad, rentabilidad y facilidad de transporte hacen de esta técnica el método más utilizado para la preservación de los órganos (5).

El trasplante de un órgano entre donador y receptor implica siempre un período más o menos largo de isquemia, tiempo que transcurre desde el pinzamiento de los vasos sanguíneos del órgano en el donador hasta, la revascularización de este una vez implantado en el receptor. La privación de sangre, es decir, oxígeno y metabolitos a un órgano siempre tiene unos resultados negativos en el funcionamiento posterior del mismo, lo que se conoce como I/R. A pesar de todas las mejoras recientes en el tratamiento del donante y los protocolos de recolección, la isquemia asociada a la preservación y lesión por reperfusión prevalecen como factores pertinentes después de la activación del órgano injertado en los niveles celular, molecular y epigenético (5).

Falla primaria del injerto

Los pulmones son extremadamente susceptibles a las lesiones y, a pesar de los avances en el tratamiento quirúrgico y la inmunosupresión, los resultados del trasplante de pulmón son los peores de cualquier trasplante de órganos sólidos, debido a la lesión por I/R caracterizada por inflamación, daño alveolar y permeabilidad vascular. Actualmente no hay agentes terapéuticos utilizados clínicamente para prevenir específicamente la lesión I/R, y las estrategias de tratamiento se limitan a la atención de apoyo, mientras que los principales esfuerzos de investigación se han dirigido a: 1) preservar mejor los pulmones de los donantes, 2) expandir el conjunto de pulmones de los donantes, 3) reacondicionar los pulmones de donantes marginales mediante perfusión pulmonar *ex vivo* y 4) desarrollar métodos para prevenir o tratar las lesiones por I/R (6).

Isquemia reperfusión

El daño por I/R es el resultado de una interacción compleja entre las diversas fuerzas mecánicas que actúan sobre las estructuras pulmonares, tales como las células epiteliales, células endoteliales, MEC y las vías aéreas periféricas, siendo una de las principales complicaciones en el periodo post-operatorio (7). Bajo la isquemia-reperfusión subyace la activación de una respuesta inflamatoria que puede estar desencadenada por diversas causas relacionadas con el donante y con la preservación (**Figura 2**) (8), provocando en el pulmón la FPI o edema post-reperfusión, un síndrome que generalmente aparece dentro de las 72h posteriores al trasplante.

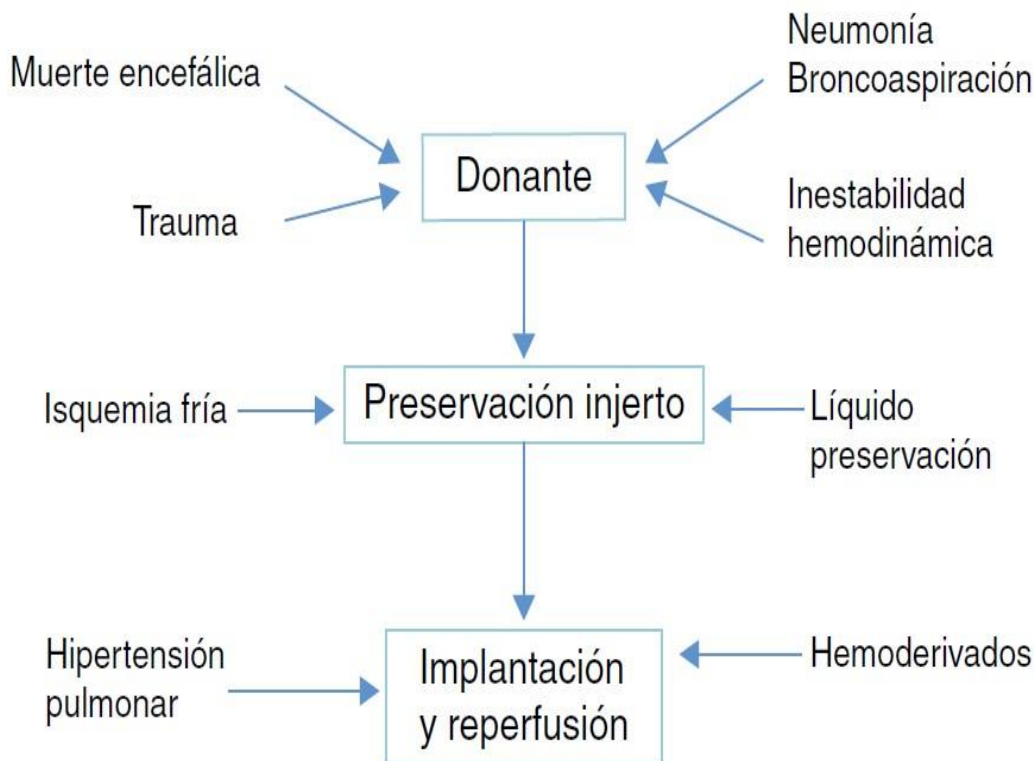


Figura 2. Facetas del proceso de trasplante pulmonar que pueden contribuir al desarrollo de la FPI (8).

La FPI se caracteriza por ser una forma de lesión pulmonar aguda e induce daño en la membrana alveolo capilar con la consecuente generación de edema, estableciéndose como la principal causa de mortalidad posoperatorio con un porcentaje de mortalidad alrededor del 10 al 30%. La ISHLT ha identificado cuatro grados de severidad de FPI, de acuerdo con el valor de la relación entre la PaO₂ y la FiO₂, así como la presencia o ausencia de infiltrados

radiológicos compatibles con edema pulmonar (**Tabla 1**) (8, 9). El mecanismo de lesión pulmonar por I/R es extremadamente complejo y aun no se ha dilucidado en su totalidad, por tal motivo existe una gran cantidad de trabajos de experimentación dedicados a mejorar el conocimiento de este mecanismo (10).

Tabla 1. Grados de gravedad de la falla primaria del injerto pulmonar, según ISHLT.

Grado	PaO ₂ /FiO ₂	Infiltrados radiológicos compatibles con edema pulmonar.
0	>300	ausente
1	>300	presente
2	200-300	presente
3	<200	presente

PaO₂: presión parcial de oxígeno arterial; FiO₂: fracción inspirada en el oxígeno.

Gran parte de las limitaciones para determinar una incidencia precisa de FPI ha sido la variada forma en que se definió el síndrome clínico, con diferencias según el centro y/o el profesional. Los primeros intentos de cuantificar la frecuencia de la lesión temprana por isquemia-reperfusión después del trasplante se complicaron por definiciones heterogéneas y diferentes nombres, que incluyen falla primaria del injerto, lesión o edema por reperfusión, edema o respuesta de reimplantación, lesión por isquemia-reperfusión y disfunción primaria del injerto. Los objetivos principales en determinar el factor de riesgo en la población de pacientes con trasplante de pulmón son, desarrollar estrategias preventivas al igual que modelos predictivos, organizar ensayos clínicos que utilicen diseños de enriquecimiento de pronóstico para maximizar la potencia, identificar elementos potencialmente modificables y áreas de investigación necesarias (11).

La isquemia desencadena múltiples mecanismos celulares superpuestos que resultan en una lesión generalizada de las células epiteliales y endoteliales, la activación del sistema inmune innato y la liberación de citocinas inflamatorias. Estos cambios conducen a edema pulmonar, intercambio de gases, deterioro y disminución de la distensibilidad pulmonar;

fisiológicamente, aumenta la permeabilidad capilar pulmonar, la resistencia vascular pulmonar y la producción de surfactante se ve afectada por la muerte de las células epiteliales alveolares.

Los mediadores del estrés oxidativo y las quimiocinas liberadas por células inmunes innatas durante la I/R actúan sobre células epiteliales alveolares, promoviendo la liberación de quimiocinas adicionales. La activación de las células epiteliales por IL-17 y el TNF- α dan como resultado la producción de CXCL1, una potente quimiocina de neutrófilos. Diferentes marcadores de muerte de células epiteliales y lesión por inflamación se han asociado con la FPI en estudios con animales y humanos, incluido el receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE), colágeno tipo V y la proteína secretora de células de Clara de plasma (12).

Matriz extracelular

Las fibras de colágeno se constituyen como un componente de la MEC y se forman por una proteína fibrosa que consta de tres α -cadenas que forman una triple hélice como en una cuerda, que proporciona resistencia a la tracción. A pesar de su amplia diversidad en el tejido conectivo, los tipos I, II, III (fibrilar) y IV, V, VI (no fibrilar) representan los principales tipos de colágeno. La mallas de colágeno tipo IV se encuentra principalmente en la membrana basal y su rotación es un proceso dinámico, necesario para el mantenimiento de la arquitectura normal pulmonar (13).

La MEC es el andamio tridimensional de la pared alveolar, acomodada por membranas basales y una capa delgada de espacio intersticial no celular que se extiende entre el endotelio capilar y epitelio alveolar. La integridad de la pared alveolar es crucial para el mantenimiento adecuado del intercambio de gases entre sangre y aire, también proporciona un marco mecánico, protege contra la sobrecarga de líquidos y permite interacciones entre diferentes células (14).

Durante el ciclo respiratorio, el intersticio sufre tensiones mecánicas variables asociadas con la reducción del volumen alveolar durante la espiración, seguido de una nueva expansión inspiratoria, por lo tanto, la barrera alveolocapilar debe ser lo suficientemente fuerte como

para resistir las tensiones locales del tejido y lo suficientemente delgada como para facilitar el intercambio de gases respiratorios. Ambas funciones están optimizadas por la composición y estructura de la matriz extracelular pulmonar. El intercambio de gases pulmonares depende de manera crítica del estado de hidratación y la delgadez de la capa de tejido intersticial dentro de la membrana alveolocapilar. En el intersticio, el fluido que se mueve libremente dentro de la MEC se equilibra con agua unida químicamente al ácido hialurónico y a los PG.

El equilibrio dinámico entre estas dos fases se establece y mantiene mediante el intercambio de fluidos trasendoteliales y solutos, mediante las salidas de convección hacia el sistema linfático y las propiedades mecánicas e hidrofílicas de los elementos sólidos de la MEC. Los componentes fibrosos en particular el proteoglicano de sulfato de condroitina (CS-PG) y la familia de proteoglicano de heparán sulfato (HSPG) que consisten en un componente de proteína central unido covalentemente a los polisacáridos sulfatados o glicosaminoglicanos (GAG), desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del fluido tisular, además también se constituye principalmente de proteínas fibrosas (colágeno y elastina), glucoproteínas (fibronectina y laminina) y GAG (14, 15).

Los PG fragmentados modifican la respuesta inflamatoria pulmonar y la migración de leucocitos a través de varios mecanismos, que incluyen: 1) la capacidad de los PG solubles o fragmentos de GAG para activar las vías de señalización del receptor tipo Toll y la secreción de mediadores proinflamatorios; 2) unión, secuestro e interacción altamente específicos con citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento; 3) la capacidad de los PG y el hialuronano para facilitar la adhesión así como secuestro de leucocitos; y 4) las interacciones entre PG y MMPs, que alteran la función de estas proteasas. Como podemos ver la MEC juega un papel importante en el comportamiento biomecánico del parénquima pulmonar teniendo funciones importantes en varios procesos fisiopatológicos como la homeostasis del agua, el mantenimiento de la estructura, modulación de la respuesta inflamatoria, comunicación entre otros (13, 16, 17).

La ventilación mecánica con volúmenes corrientes bajos y altos puede inducir la fragmentación de proteoglicanos, lo que puede causar la activación de la cascada inflamatoria, llevando a las características principales de la lesión pulmonar, edema alveolar

y depósito de colágeno. Por lo que es una estructura dinámica, y se requiere un equilibrio entre la síntesis y degradación de sus componentes para la homeostasis. Aunque muchas proteasas pueden escindir moléculas de MEC, es probable que la familia de las MMPs sean los mediadores normales y fisiológicamente relevantes de la degradación de los componentes de MEC (**Figura 3**) (14).

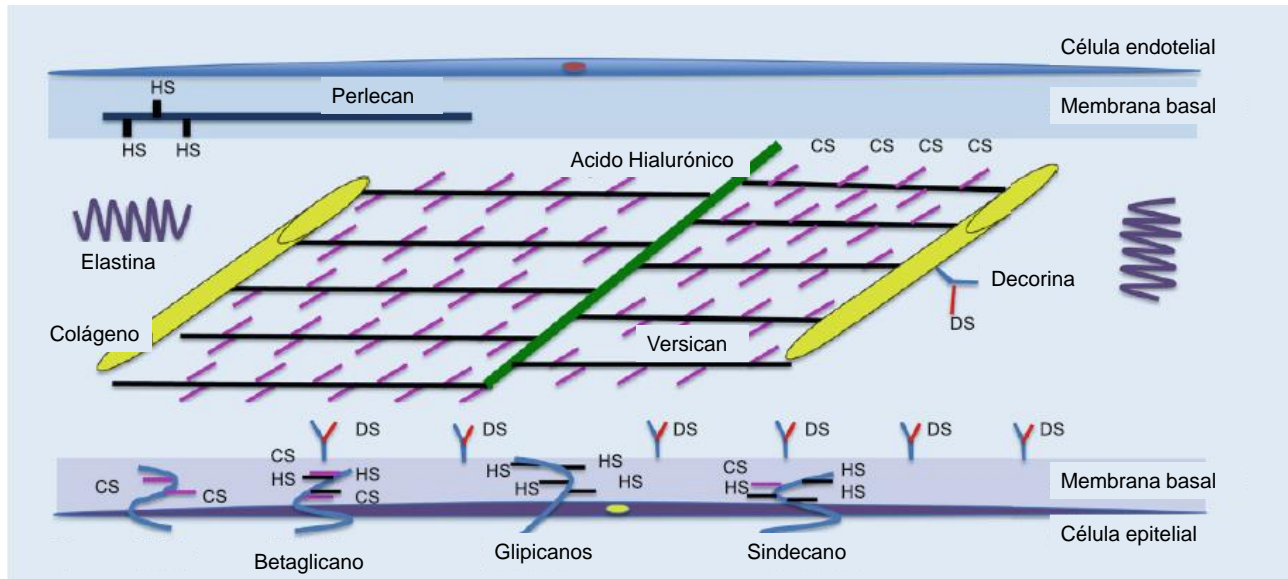


Figura 3. Organización de la matriz extracelular. Los tabiques alveolares están limitados por células endoteliales y epiteliales ancladas en su membrana basal. Los principales componentes acelulares son fibras de colágeno y elastina, glucoproteínas, proteoglicanos (PG) y glucosaminoglicanos (GAG); condroitín sulfato (CS), dermatán sulfato (DS) y heparán sulfato (HS). Modificado de Cruz (14).

Metaloproteinasas

Las MMPs son una familia de endopeptidasas secretadas por células estructurales e inflamatorias, con actividad proteolítica capaz de degradar a los componentes de la MEC y membrana basal pulmonar (18, 19). Desempeñan papeles importantes en múltiples procesos fisiológicos y patológicos, están ampliamente distribuidas en todos los reinos de la vida y probablemente han evolucionado a partir de una proteína de un solo dominio sometida a sucesivas rondas de duplicación y fusión de genes, para generar la arquitectura de dominio múltiple y diversidad funcional (20, 21). La interrupción del equilibrio entre la concentración de las metaloproteinasas activas puede conducir a cambios patológicos asociados con la

rotación no controlada de MEC, remodelación tisular, respuesta inflamatoria, crecimiento celular y migración.

La estructura general de las MMPs en dirección N- a C- terminal, está dada por: un predominio o **péptido señal** que dirige a la proteína para su secreción extracelular; un **prodominio** que contiene una secuencia altamente conservada (PRCXXPD) que incluye un residuo de cisteína que se une al ion Zn^{2+} del dominio catalítico, manteniendo a la enzima en un estado latente hasta el rompimiento del enlace (*switch de cisteína*) (**Figura 4**) (22); un **dominio catalítico** responsable de la actividad proteolítica que posee un motivo con tres histidinas (HEXXHXXGXXH) que en conjunto coordinan la unión del átomo de Zn^{2+} , aunque también se requieren de 2 a 3 iones de Ca^{2+} en el sitio activo; y un **dominio hemopexina** que confiere afinidad por diversos sustratos, el cual está asociado al dominio catalítico mediante un péptido de unión (**región bisagra**) (**Figura 5**).

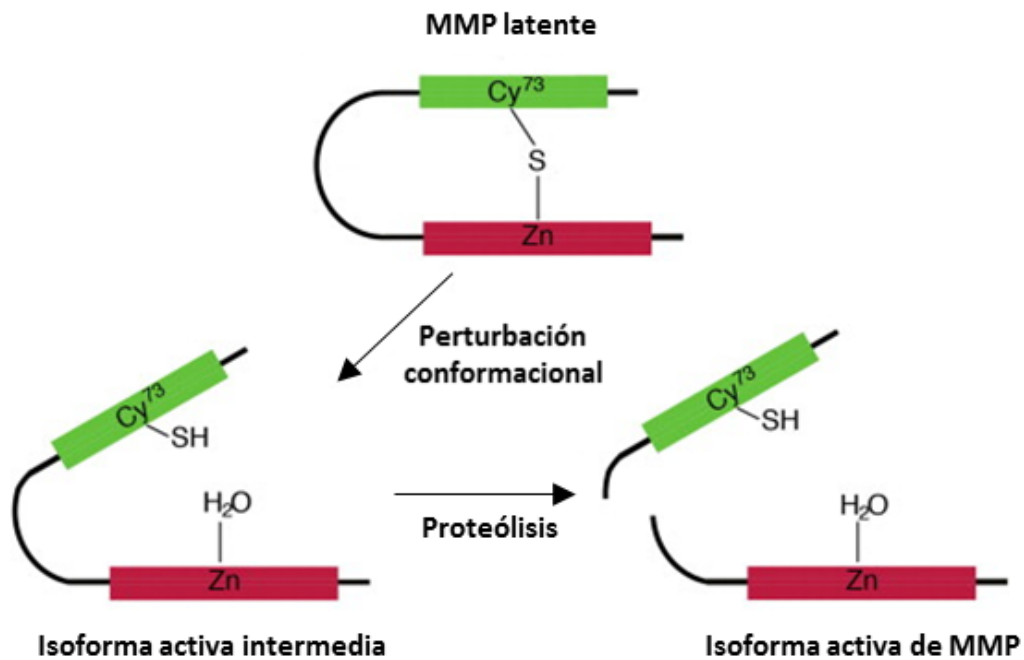


Figura 4. Mecanismo del *switch de cisteína*. Modificado de Jones (22).

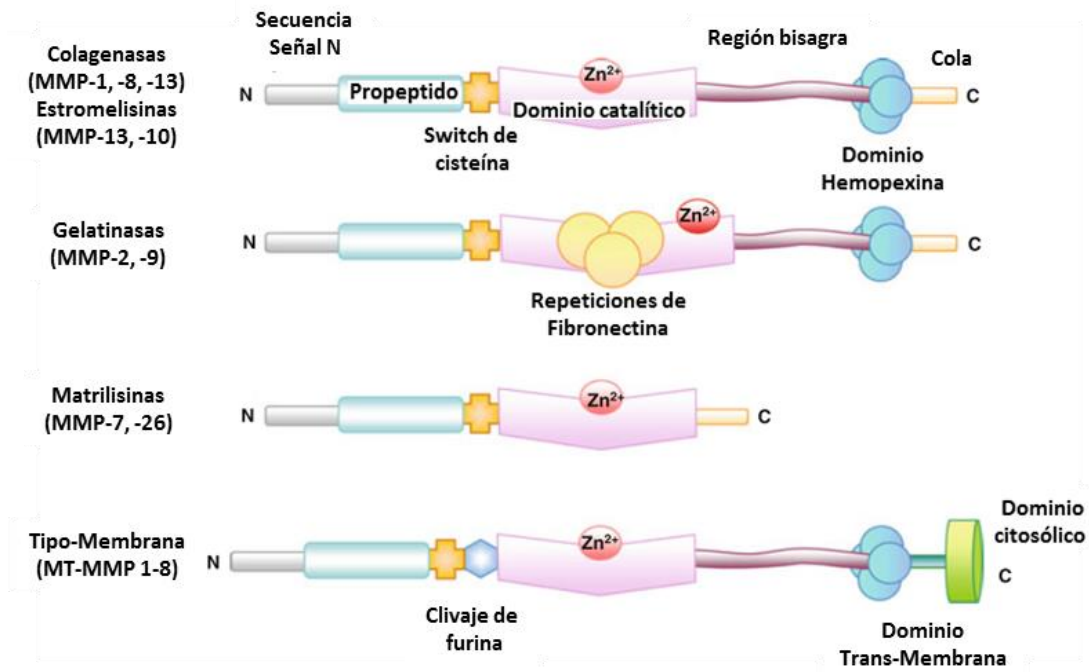


Figura 5. Estructura de las subfamilias de MMPs. Modificado de Benjamin (21).

Las MMPs han sido clasificadas tomando en consideración diversas características. En un principio su clasificación se basaba por su preferencia de sustratos (23), así como en la organización de dominios (24), sin embargo, el descubrimiento de nuevas MMPs así como de nuevos sustratos ha permitido diversas propuestas de clasificación; por ejemplo se dividen en dos grupos basados en su localización celular (secretada o unida a membrana) o en seis grupos clasificados según características individuales determinadas por la estructura y especificidad del sustrato: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, matrilisinas, metaloproteinasas de matriz de tipo membrana (MT-MMP) y otros (**Tabla 2**) (25).

La cuestión de la implicación de las MMPs en la ruptura de la membrana basal y la lesión por I/R se ha abordado en una variedad de órganos. La sobreexpresión de MMP-2 y MMP-9 se han reportado en la lesión por I/R de cerebro y cardíaca. Los estudios *in vivo* realizados en el cerebro han demostrado que las MMPs están implicadas en la apertura de la barrera hematoencefálica (19).

Asimismo, no sólo destruyen componentes de MEC, sino que regulan la liberación de citocinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α y IL1 β , moléculas de adhesión, β 4-integrina y E-cadherinas. Estas moléculas han sido implicadas en la patogénesis crónica de enfermedades vasculares, induciendo la activación de células endoteliales y quinasas c-Jun N-terminal (JNKs), promoviendo la migración de células musculares lisas vasculares (VSMC) y causando la disfunción de la barrera endotelial, lo que acelera aún más la inflamación local (26). Todas estas moléculas se han observado que están involucrados en la lesión por I/R.

Grupo	MMPs	Otros nombres	Sustratos	Posible método de análisis
Colagenasas	MMP-1	colagenasas-1	colágeno: I, II, III, VII, VIII, X, agregano, gelatina, MMP-2, -9	ensayo de zimografía, inmunoensayo
	MMP-8	colagenasas-2	colágeno: I, II, III, V, VII, VIII, X, agregano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina	inmunoensayo, ensayo fluorimétrico, ensayo de perfil basado en actividad
	MMP-13	colagenasas-3	colágeno: I, II, III, IV, agregano, gelatina	ensayo fluorimétrico, análisis de perfil basado en actividad, ensayo de zimografía, ensayo fluorimétrico, ensayo de presentación en fagos, enzima múltiple / reactivo múltiple ensayo, análisis de perfil basado en actividad
Gelatinasas	MMP-2	gelatinasa-A	colágeno: I, II, III, IV, V, VII, X, XI, agregano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, proteoglicano, MMP-9, -13	bioensayo, ensayo de zimografía, inmunoensayo, ensayo fluorimétrico, ensayo radioisotópico, enzima múltiple / ensayo de reactivos múltiples
	MMP-9	gelatinasa-B	colágeno: IV, V, VII, X, XIV, agregano, elastina, fibronectina, gelatina	bioensayo, ensayo de zimografía, ensayo fluorimétrico, ensayo radioisotópico
Estromelisinina	MMP-3	estromelisinina-1	colágeno: II, III, IV, IX, X, XI, agregano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, proteoglicano, MMP-7, -8, -13	ensayo de zimografía, inmunoensayo, ensayo fluorimétrico, ensayo de visualización de fagos
	MMP-10	estromelisinina-2	colágeno: III, IV, V, agregano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, MMP-1, -8	ensayo de zimografía, ensayo de visualización de fagos, ensayo de perfil basado en actividad
Matrilisinina	MMP-7	matrilisinina-1	colágeno: IV, X, agregano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, proteoglicano, MMP-1, -2, -9	ensayo de zimografía, inmunoensayo, ensayo fluorimétrico, ensayo de visualización de fagos, ensayo de perfil basado en actividad
	MMP-26	Matrilisinina-2, endometasa	colágeno: IV, gelatina, fibronectina, gelatina	ensayo de visualización de fagos
MMPs tipo membrana	MMP-14	MT1-MMP	colágeno: I, II, III, agregano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, MMP-2, -13	ensayo de visualización de fagos
	MMP-15	MT2-MMP	colágeno: I, fibronectina, gelatina, laminina, MMP-2	
	MMP-16	MT3-MMP	colágeno: I, MMP-2	
	MMP-24	MT5-MMP	fibrina, gelatina	
Otras MMPs	MMP-11	estromelisinina-3	no escinde colágeno, agregano, fibronectina, laminina	ensayo de perfil basado en actividad, inmunoensayo
	MMP-12	metaloelastasa	colágeno: IV, elastina, fibronectina, gelatina, laminina	
	MMP-19	RASI-1	colágeno: IV, fibronectina, agregano, COMP, laminina, gelatina	
	MMP-20	enamelisinina	colágeno: V, agregano, amelogenina, COMP	
	MMP-21	-	α 1-anti-tripsina	
	MMP-23	CA-MMP	desconocido	
	MMP-25	MT6-MMP, leucolisina	colágeno: IV, gelatina, fibronectina, laminina, fibrina	
MMP-28	epilisinina	desconocido		

Tabla 2. Clasificación de las metaloproteinasas. Modificado de Maciejczyk (25).

Las MMPs se secretan en forma latente y deben activarse mediante proteólisis. Esta conversión de pro-MMP en forma activada puede realizarse *in vitro* por radicales reactivos de oxígeno, condiciones físicas como el pH o la temperatura. *In vivo*, la activación de MMP implica otras MMPs o serina proteasas. La síntesis y funciones de MMPs están reguladas por tres mecanismos principales que incluyen la activación transcripcional, el procesamiento postranscripcional (liberación de pro-dominio, unión a la superficie celular) y el control de la actividad por parte de una familia de inhibidores endógenos conocidos colectivamente como inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs).

Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs)

Hasta la fecha, se han identificado cuatro TIMPs (TIMP-1 a TIMP-4) en vertebrados y están compuestos por un dominio N-terminal y un C-terminal estabilizado por límites de disulfuro, con la capacidad de unirse al sitio activo de las MMPs en relación 1:1. La molécula TIMP se une a la hendidura del sitio activo de la MMP de una forma similar como lo hace el sustrato, pero con la diferencia de que tiene la capacidad de expulsar la molécula de agua unida al ion Zn^{2+} del sitio activo (**Figura 6**) (21).

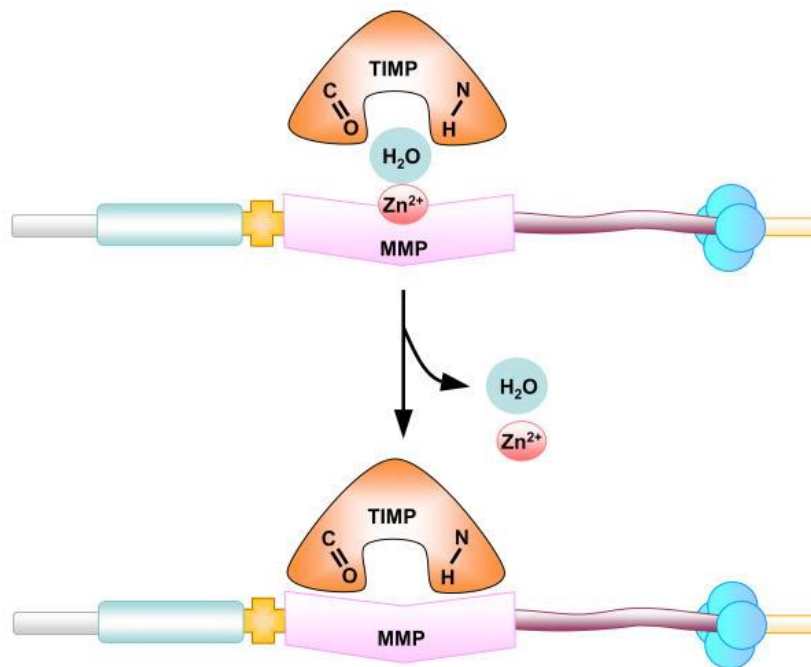


Figura 6. Inhibición endógena de las MMPs por TIMPs. La molécula de TIMP se encaja en la hendidura del sitio activo de la MMP de manera similar a la del sustrato. Modificado de Benjamin (21).

En el pulmón sano, dentro del intersticio pulmonar los fibroblastos residentes son las células más comúnmente identificadas y son las principales responsables de la producción de MEC y sirven como células efectoras durante la reparación de lesiones (27). De igual manera, producen constitutivamente MMP-2, pero también son una fuente celular de MMP-1 y TIMP-1. Las células epiteliales bronquiales liberan MMP-2, MMP-9 y su principal inhibidor, TIMP-1. Además de estos últimos, las células epiteliales alveolares y particularmente los neumocitos tipo II, producen TIMP-2 y MMP-1. Entre las células inflamatorias, los neutrófilos tras su activación producen MMP-9, MMP-8 y TIMP-1 que se sintetizan y liberan de sus gránulos secundarios; los macrófagos alveolares producen MMP-1, MMP-9, MMP-12 y TIMP-1. Los mastocitos juegan un papel clave en los procesos inflamatorios que ocurren en la pared bronquial y, una vez activados por los linfocitos, producen al menos MMP-9 (28).

Por lo que el principal sello distintivo de la inflamación es el reclutamiento y activación de leucocitos, especialmente neutrófilos polimorfonucleares, resultado de una interacción compleja entre estas células y el endotelio vascular, lo que explica la destrucción de patógenos extraños y la descomposición, así como remodelación de los tejidos inflamados (29). En condiciones patológicas, la actividad y el perfil de secreción de estas células pueden modificarse, cambiando la expresión, así como la actividad de MMPs y TIMPs. Hay datos controversiales sobre los efectos de diferentes anticoagulantes como determinantes de la actividad de las MMPs. Mientras que la MMP-2 no muestra diferencias significativas en las concentraciones de plasma y suero, los patrones zimográficos de MMP-9 se ven fuertemente afectados por ellos (30).

Entre los anticoagulantes más comunes, la heparina se usa ampliamente como anticoagulante inyectable y aunque se utiliza principalmente en la medicina, el verdadero papel fisiológico en el cuerpo no está del todo claro, ya que la anticoagulación de la sangre se consigue principalmente por HSPG derivado de células endoteliales, dejando una escasez de información sobre los efectos de la heparina sobre las MMP-2, MMP-9, TIMP-1 y TIMP-2 (31). En este contexto, la heparina también puede considerarse como una molécula antiinflamatoria no convencional, ya que tiene varias acciones biológicas independientes de su conocida actividad anticoagulante, incluida la modulación de la síntesis de la matriz extracelular, la proliferación celular, angiogénesis e inflamación. En particular, inhibe la

producción de citocinas proinflamatorias por monocitos estimulados por lipopolisacárido o interferón γ . Por estos motivos, en los últimos años, se han realizado esfuerzos considerables para identificar los dominios de la heparina responsables de sus propiedades antiinflamatorias y para desarrollar derivados sintéticos con propiedades anticoagulantes bajas o nulas y efectos antiinflamatorios claros (29).

Heparina

Las heparinas, incluidas la heparina no fraccionada y las heparinas de bajo peso molecular, son glicosaminoglicanos que se utilizan en gran medida como fármacos antitrombóticos. Si bien los mecanismos de sus acciones anticoagulantes en la sangre han sido ampliamente estudiados, sus efectos sobre las propiedades hemostáticas del endotelio aún están bajo investigación, poseen una variedad de actividades biológicas, que incluyen propiedades antiinflamatorias, antihipertensivas y antitumorales teniendo acciones importantes en el endotelio vascular, que desempeñan un papel clave en numerosos procesos fisiopatológicos, que incluyen hemostasia, inflamación, tráfico de leucocitos, angiogénesis y metástasis tumoral (32).

La inflamación es una respuesta reactiva del cuerpo a estímulos nocivos ésta se logra principalmente mediante el movimiento de los leucocitos desde la sangre hacia los tejidos lesionados, seguido de una cascada de reacciones bioquímicas que propagan y maduran la respuesta inflamatoria, involucrando el sistema vascular local, el sistema inmune y varias células. Un paso esencial en el proceso se inicia mediante la interacción de las selectinas en los leucocitos con el heparán sulfato (HS) asociado a la superficie endotelial, lo que hace que las células circulantes se ralenticen y se recluten a lo largo de la pared del vaso, deteniendo el rodamiento de los leucocitos y permitiendo su transmigración fuera del vaso sanguíneo. Además, se ha observado que, al administrar heparina, esta compite con el HS endógeno en la superficie endotelial por la interacción con los quimioatrayentes, lo que resulta en una menor adhesión y transmigración de los leucocitos (**Figura 7**) (33).

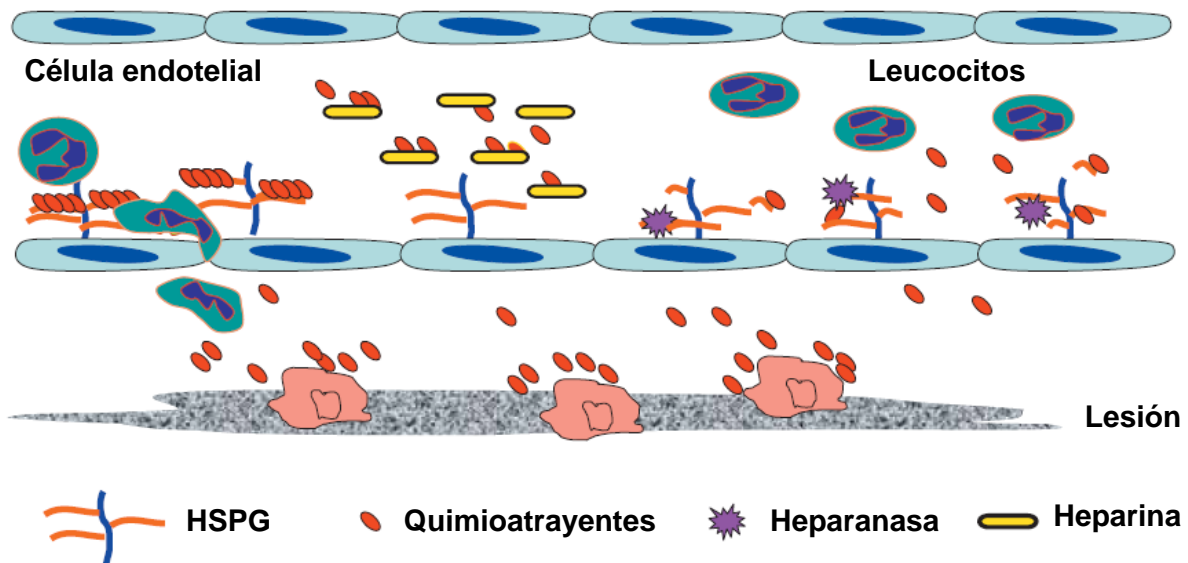


Figura 7. Implicaciones de los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG), heparina y heparanasa en reacciones inflamatorias. Modificado de Li (33).

Su acción anticoagulante se ejerce mediante la formación de un compuesto ternario, uniéndose a la antitrombina y trombina (IIa), para lo que se necesitan 18 sacáridos. Actúa de forma catalítica y su efecto como co-factor se manifiesta también en la inhibición de los factores Xa y XIa, pero no por las proteasas del sistema de contacto. Se ha comprobado que el fragmento más pequeño de heparina con actividad de co-factor frente al factor Xa es un pentasacárido el cual contiene determinados grupos sulfato (3-O-glucosamina sulfato) los cuales interaccionan con los residuos de lisina y arginina de la región de unión a la heparina de la Antitrombina III (AT III).

Esta interacción provoca una alteración en la conformación del sitio reactivo de la AT III favoreciendo la reacción inhibitoria. El fragmento más pequeño de heparina con actividad antitrombínica es un octadecasacárido; la heparina debe unirse tanto a la AT III como a la trombina. La actividad anti-Xa y antitrombínica de la heparina depende de la concentración de calcio iónico y entre otros factores, de la longitud de la cadena heparínica (34).

Sin embargo, el hecho de que la heparina sea prácticamente no detectable en la sangre plantea una cuestión con respecto a su función anticoagulante. En otros estudios realizados por Chen *et al*, se observó que la heparanasa, una endoglicosidasa específica del HS, juega

un papel importante en la inflamación mediando las lesiones pulmonares y renales agudas durante la sepsis, lo que contribuye a la lesión intestinal durante la sepsis temprana, facilitando la destrucción del glicocálix de la mucosa epitelial y la promoción de respuestas inflamatorias dando una sobrerregulación en la expresión de proteasas como MMP-9 (35).

Aunque las funciones biológicas exactas de la heparina no están completamente descubiertas, se reconoce que la heparina es vital para el almacenamiento de proteasas en los mastocitos y puede regular la liberación de estas participando en reacciones inflamatorias (26).

ONO-4817

Diversas investigaciones se han centrado en el desarrollo de nuevos fármacos para aminorar el deterioro de la MEC por una desregulación en la actividad de diversas MMPs, así como por efectos inflamatorios y mantener controlada la progresión de este daño en el tejido. Un ejemplo de esto serían la primera generación de inhibidores de metaloproteinasas (IMMPs) como batimastat, los cuales tienen una amplia actividad inhibitoria contra casi todas las MMPs, pero no es apropiada su administración oral. La segunda generación, como el marimastat y prinomastat, también tiene un amplio espectro, pero a diferencia de la primera generación, pueden administrarse por vía oral. Finalmente, la tercera generación, fue diseñada para tener un espectro más selectivo de inhibición.

ONO-4817 un inhibidor de tercera generación es un nuevo compuesto no peptídico basado en ácido hidroxámico sintético diseñado para ser administrado por vía oral, este fármaco es resistente a la hidrólisis enzimática, pero puede hidrolizarse en etanol. Se une de forma reversible a la región de unión al zinc de las MMPs y tiene un espectro inhibitorio selectivo de mayor afinidad a MMP-2 y MMP-9 y de menor afinidad a MMP-8, MMP-12 y MMP-13. Dentro de sus acciones provoca una reducción significativa en la lesión tisular e inflamación a través de su efecto inhibitorio sobre la infiltración de células inflamatorias. Por lo tanto, puede tener menos efectos adversos que los inhibidores de MMPs de primera o segunda generación (36, 37).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los grandes problemas que dificultan la realización con éxito del trasplante pulmonar, es el rápido deterioro del tejido y la pérdida de la función capilar, presentándose lo que se conoce como falla primaria del injerto y la consecuente generación de edema, lo que dificulta el intercambio gaseoso, estableciéndose como la principal causa de mortalidad posoperatorio con un porcentaje del 10 al 30%. Los mecanismos responsables de este deterioro aún no se comprenden con certeza, sin embargo, una de las claves importantes ha sido la optimización en las condiciones de preservación para minimizar el daño endotelial durante la isquemia-reperusión.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el uso de heparina en soluciones de preservación, valorando la permeabilidad vascular del órgano, además de su efecto directo e indirecto sobre las gelatinasas y sus inhibidores tisulares en específico TIMP-1 y TIMP-2 de pulmones preservados durante 24h, lo que nos guiará a implementar nuevas estrategias de preservación como el uso de IMMPs de tercera generación más selectivos como ONO-4817, logrando conservar la integridad de la matriz extracelular permitiendo extender la viabilidad del órgano con fines de trasplante.

HIPOTESIS

La permeabilidad de la membrana alveolo-capilar, se altera por la actividad de MMP 2 y 9 durante la I/R, generando edema pulmonar; la heparina previene estos cambios evitando el acopio de células inflamatorias y el daño endotelial en la preservación.

OBJETIVOS

- Implementar la técnica de pulmón aislado y perfundido.
- Determinar la permeabilidad vascular mediante los coeficientes de filtración capilar durante la reperfusión con solución de Krebs-Ringer-bicarbonato en pulmones control, preservados por 24h, con inhibidores de MMPs y heparina.
- Determinar la actividad de las gelatinas A y B en homogenados de pulmones preservados por 24h, con inhibidores de MMPs y heparina, mediante zimografía en gel.
- Demostrar que el uso de inhibidores de MMPs y heparina durante el periodo isquémico podría modificar el coeficiente de filtración capilar en el modelo de pulmón aislado.
- Cuantificar los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP-1 y TIMP-2) en homogenados de pulmones preservados por 24h, con inhibidores de MMPs y heparina.

METODOLOGÍA

Animales de estudio.

Se utilizaron 24 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) machos Nueva Zelanda (peso corporal de 2.5-3.0Kg), mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias bajo un ambiente controlado de temperatura $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 50-70% de humedad y ciclos de luz oscuridad 12:12h, con un régimen de alimentación *ad libitum*. Los animales fueron manejados de acuerdo con los lineamientos de la Ley General de Salud de México y la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio para la Ciudad de México, mientras que el protocolo fue aprobado por el comité de Bioética del INER.

Procedimiento quirúrgico.

Los conejos se pesaron y anestesiaron mediante una inyección de clorhidrato de xilazina (3mg/kg i.m, Procin®/Pisa Agropecuaria) y pentobarbital sódico (28mg/kg i.v, Anestesal®, Pfizer). Se ventilaron mecánicamente con un ventilador para pequeñas especies (modelo Starling, Harvard Apparatus, Holliston, MA) a una frecuencia de 55rpm/min, presión positiva espiratoria final (PEEP) de 2cmH₂O) y un volumen corriente de 10ml/kg, para lo cual se disecó y canuló la tráquea de cada animal, después se realizó una esternotomía media. Una vez expuesto el bloque cardiopulmonar se procedió a inyectar de manera inmediata 1ml de heparina en el ventrículo derecho y posteriormente ligar la vena cava para exanguinar al animal (**Figura 8A**). El bloque cardiopulmonar se extrajo de la cavidad torácica y el corazón se seccionó transversalmente en ambos ventrículos por debajo de las válvulas auriculoventriculares, para colocar dos cánulas de cristal de 5cm de longitud por 3mm de diámetro interno, una de las cuales se introdujo en la arteria pulmonar y otra en la aurícula izquierda (**Figura 8B**). Las estructuras adyacentes fueron incluidas en la ligadura, con el fin de disminuir la distensibilidad de dichas estructuras evitando así que, interfieran en el registro de la presión vascular.

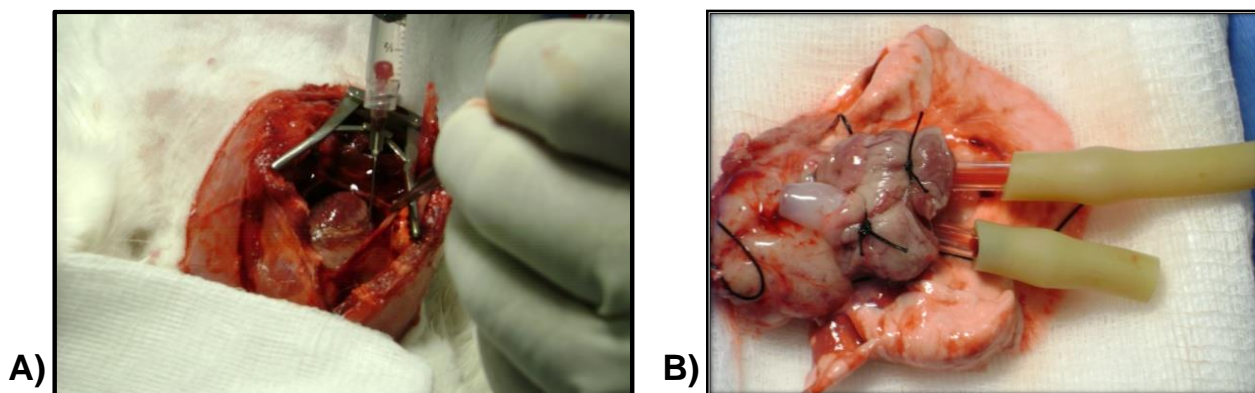


Figura 8. Procedimiento quirúrgico. Esternotomía e inyección de heparina (**A**); Colocación de las cánulas de cristal (**B**)

Lavado y preservación pulmonar.

Una vez obtenido el bloque, se mantuvo bajo ventilación mecánica, se eliminó la sangre intravascular de los pulmones mediante infusión anterógrada (100-150ml de solución de lavado) a través de la cánula pulmonar, con una presión de 20cmH₂O (**Figura 9A**). Al final del lavado, se pinzaron simultáneamente las cánulas de forma que el lecho vascular mantuviera dicha solución. Los pulmones fueron hiperinsuflados 3 veces el volumen corriente para evitar zonas atelectásicas y pinzar la tráquea. Enseguida el bloque cardiopulmonar se sumergió en un recipiente conteniendo solución salina fisiológica (NaCl al 0,9%), y se mantuvo a 4°C (**Figura 9B**). Cada preparación fue distribuida aleatoriamente en uno de los siguientes grupos (6 bloques en cada grupo) de acuerdo con la solución de lavado empleada:

- 1.- Grupo control y grupo de 24h (I/R): lavados con 250ml de solución salina fisiológica (SSF). Ningún fármaco será añadido a estos dos grupos.
- 2.- Grupo ONO-4817: fue lavado con una mezcla de SSF+ONO-4817 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido) a una concentración de 1×10^{-6} M y posterior preservación por 24h.
- 3.- Grupo heparina: Lavado con 1ml de heparina+SSF y posterior preservación por 24h.

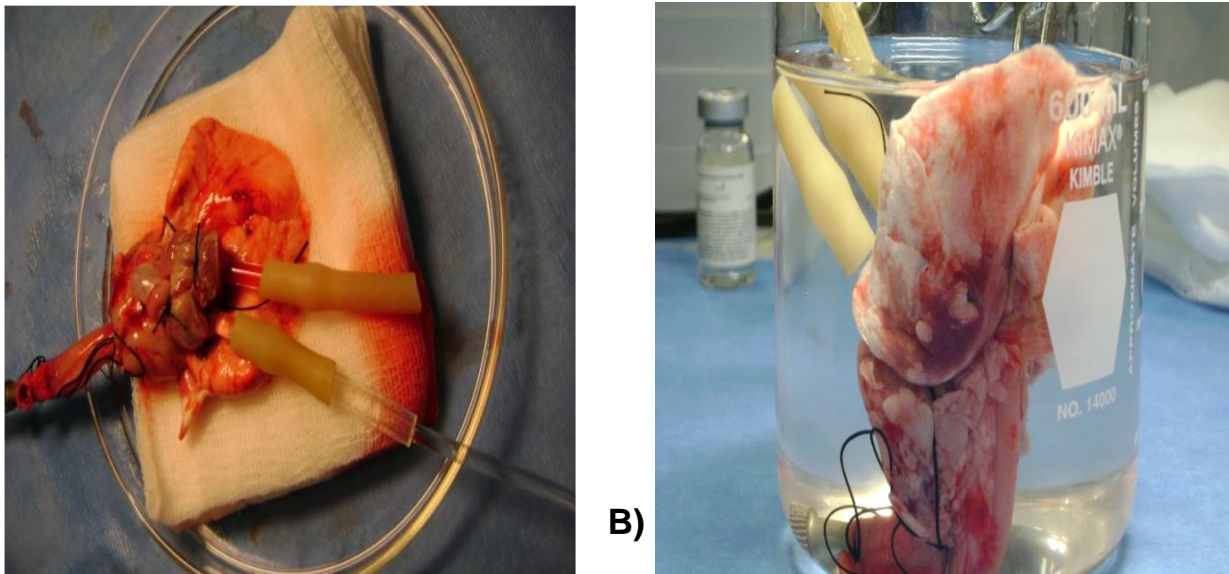


Figura 9. Lavado y preservación pulmonar. Infusión anterógrada para la eliminación de sangre intravascular (A); Pulmón en solución salina para ser preservado (B).

Pulmón aislado y perfundido.

El bloque fue colgado a un transductor de fuerza tensil (FT03, Grass Instruments, Co., Boston, MA) mediante su montaje en una “hamaca” de malla Marlex®, inmediatamente fue conectado a un circuito de perfusión recirculatorio flujo constante de 10ml/min, compuesto por una bomba peristáltica de circulación (NY-7550-62 Materflex, Barrington, IL) con indicador de flujo de perfusión y termómetro (**Figura 10**), para ello se realizó lo siguiente:

Se preparó la solución de perfusión Krebs-Ringer-bicarbonato conteniendo (g): NaCl 6.90, KCl 0.354, CaCl₂·2H₂O 0.373, KH₂PO₄ 0.162, MgSO₄·7 H₂O 0.293, NaHCO₃ 2.1, Glucosa 0.98 y 2.5% de albúmina bovina (g/L), para lavar y conservar el bloque cardiopulmonar, estando monitoreando continuamente la temperatura junto con el pH para mantenerlos en límites fisiológicos (pH 7.4 a 7.5, 37 a 38°C).

Permeabilidad vascular.

La presión arterial (Pa) y venosa (Pv) se midió a través de transductores de presión (Gould 23XL, Quincy, MA) conectados a las cánulas colocadas en la arteria pulmonar y la aurícula izquierda. Dichas presiones se ajustaron a cero a nivel del hilio pulmonar. El equilibrio en el sistema se obtuvo entre 10 y 15min, donde el peso del pulmón, las presiones arterial y venosa se mantuvieron relativamente estables en un estado isogravimétrico; los parámetros

(peso y presión) se registraron mediante un polígrafo multicanales (Dynograph Recorder R611, Beckman Instruments, Palo Alto, CA). La máxima apertura de los vasos sanguíneos se obtuvo cuando la presión arterial fue mayor que la venosa y ésta es a su vez mayor que la presión al final de la espiración.

Una vez transcurridos los tiempos establecidos en el protocolo para cada uno de los grupos, se inició la técnica para obtener el registro que nos permitió medir el coeficiente de filtración capilar modificado (mKf,c). Se tuvo especial cuidado para evitar la entrada de aire al sistema de perfusión. Además, los pulmones se hiperinsuflaron (3 veces el volumen corriente) periódicamente para evitar atelectasias.

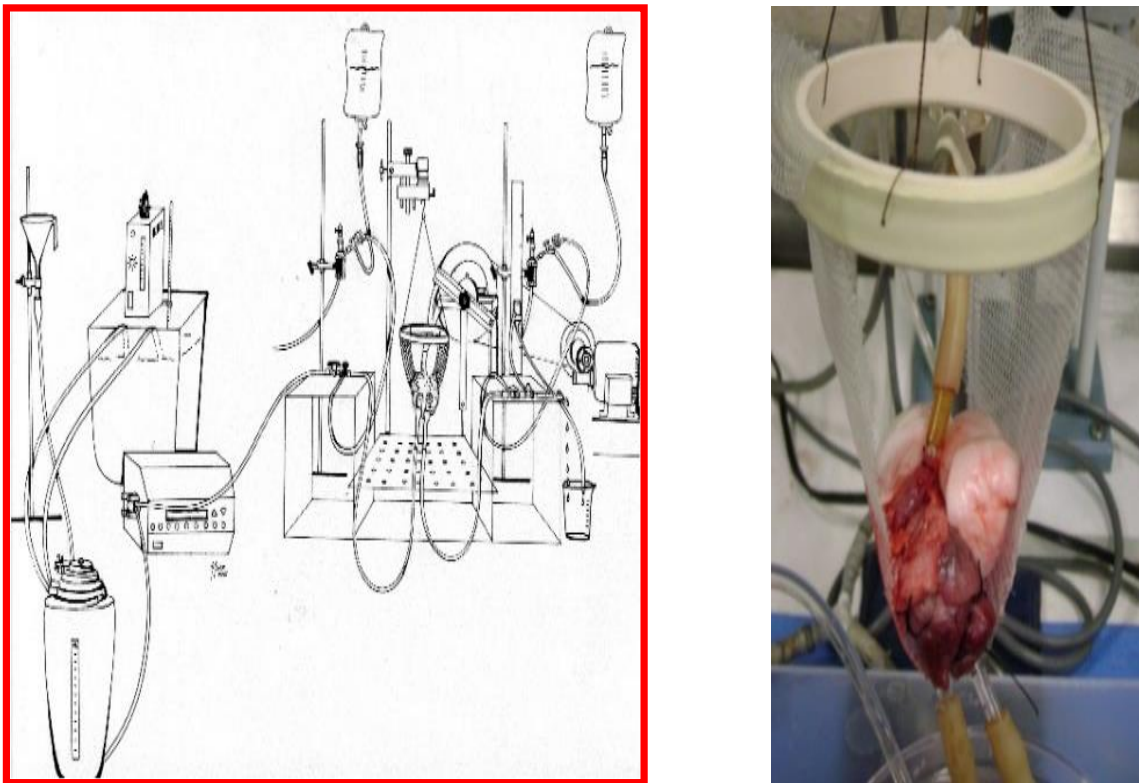


Figura 10. Bloque cardiopulmonar de conejo montado en el equipo de pulmón aislado y perfundido. Y esquema del equipo de pulmón aislado y perfundido del laboratorio.

Inmediatamente, de forma súbita se realizó un pinzamiento simultáneo de las cánulas arterial y venosa, produciendo un incremento de la Pv y un decremento de la Pa, al cabo de 2-3 segundos ambas presiones se estabilizaron. Después de haber transcurrido ~10 segundos,

se quitó la doble oclusión para restablecer el flujo, posteriormente se incrementó la Pv en 10cmH₂O mediante la oclusión parcial del flujo de salida venosa manteniéndolo así durante 3min, ocasionando el rápido aumento del peso pulmonar por efecto de la congestión capilar, durante 30 a 60 segundos, seguido de una ganancia más lenta de peso, que se asocia con el líquido filtrado a través de los capilares entre los 60 a 180 segundos después de haber iniciado la oclusión parcial del lado venoso. La fase lenta durante la ganancia de peso se utilizó para calcular el mKf,c. Al final de los 3min, y aún con la elevación de la Pv de 10cmH₂O, se efectuó otra doble oclusión para obtener la Pc. El mKf,c se expresó como ml•min⁻¹•cmH₂O⁻¹•g⁻¹, lo que representa el líquido que se filtró a través del capilar (es decir, la ganancia de peso del pulmón, asumiendo que el líquido filtrado tiene una densidad de 1.0) por minuto de obstrucción venosa, por diferencia de presión capilar (Pc) y por gramo de tejido pulmonar (**Figura 11**).

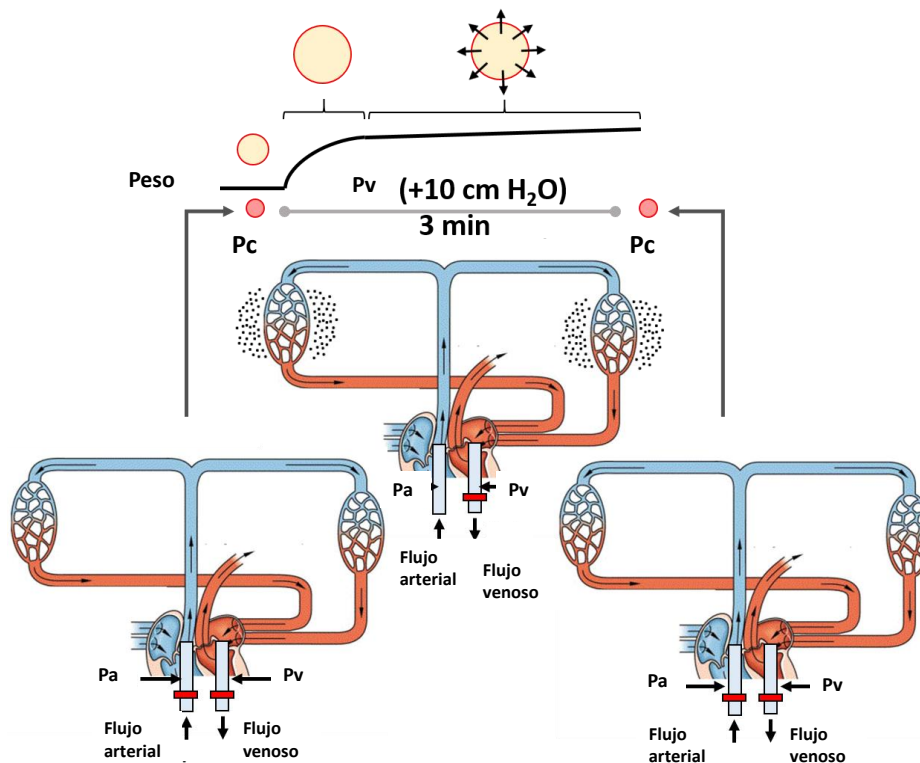


Figura 11. Representación del método para el registro del mKf,c. Pa: presión arterial; Pv: presión venosa; Pc: presión capilar.

Cuantificación de proteínas

Para la preparación de las muestras y extracción de proteínas se tomaron 250mg de tejido pulmonar (lóbulos inferiores), adicionados con 600µl de PBS 1X pH 7.3, los cuales fueron homogeneizados mediante el equipo Omni TH (OMNI international, Georgia, EE. UU.) y centrifugados de 12000-14000rpm durante 10min a una temperatura de 4°C. Se tomó solamente el sobrenadante, a partir del cual se realizó una cuantificación total de proteína para cada una de las muestras mediante el método de cuantificación colorimétrica con ácido bicinconínico (BCA) (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC. No. 23235). La determinación de proteína por BCA es un método altamente sensible. Este método combina la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} en un medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección selectiva del catión Cu^{+1} utilizando BCA. El producto de la reacción tiene un color púrpura formado por el complejo de BCA con un ion Cu^{+1} . Por último, todas las muestras se llevaron a una concentración de 2.5µg/µl y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

Zimografía en gel

La zimografía en gel es una técnica electroforética que permite observar actividad de proteasas. Una vez que las muestras fueron ajustadas a la misma concentración, la actividad fue analizada mediante geles de poliacrilamida al 8%, adicionado con 10mg/ml de gelatina soluble (Gelatin Type A, from porcine skin, Sigma No. G-2625). Cada carril se cargó con 10µl de muestra [2.5µg/µl] o control positivo (línea celular U937) junto con amortiguador de carga, posteriormente se realizó la electroforesis en una cámara vertical con una corriente de 120-130V durante ~1.5h. Al terminar la electroforesis los geles fueron transferidos para ser lavados tres veces durante 15min con Tritón X-100 (Research Organics, Ohio, EE. UU.) al 2.5% y tres lavados más con agua destilada durante 15min. Los geles fueron incubados a 37°C durante ~20h con una solución de glicina 0.1M, CaCl_2 5mM pH 8.0, adicionada con ZnCl_2 5mM y teñidos al término de la incubación con azul de Coomassie por 1h para después desteñirlos con solución de metanol 40% y ácido acético 10%. Por último, los geles se analizaron mediante el software ImageJ, para cuantificar la intensidad de las bandas de las gelatinasas, donde las bandas claras representan la actividad gelatinolítica en contraste con el fondo azul y las unidades de medida se establecieron como el porcentaje de las unidades arbitrarias (% u.a.) obtenidas de la densitometría.

Cuantificación de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP-1 y TIMP-2)

Para la cuantificación de la expresión de TIMP-1 y TIMP-2 en tejido pulmonar se realizó un ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA) de tipo competitivo (No. catalogo: CSB-E06935Rb; CSB-EL023561RB, CUSABIO®, Hubei, China). El ensayo se realizó por duplicado para todas las muestras de los diferentes grupos, siguiendo las instrucciones del fabricante. El tejido pulmonar (100mg) fue homogeneizado con 1ml de solución PBS 1X mediante el Omni TH (OMNI international, Georgia, EE. UU.) después, fueron centrifugadas por 5min a 5000 x g a una temperatura de 4°C. El sobrenadante fue removido y almacenado a -80°C hasta su uso.

Ya para el ensayo se colocó en cada pozo de la placa 50µl de cada estándar (curva estándar) o de cada muestra, inmediatamente se adicionaron 50µl del conjugado HRP-anticuerpo (específico para TIMP-1 o TIMP-2 respectivamente) (1X) a cada pozo y se incubo por 1h a 37°C. Posterior al periodo de incubación, todos los pozos fueron lavados cuatro veces durante 2min con amortiguador de lavado (200µl) usando una pipeta multi-canal. Consecutivamente se adicionaron 90µl de sustrato TMB a cada pozo y se dejó incubar durante 20min a 37°C. Al terminar el periodo de incubación se adicionaron 50µl de solución de paro a cada pozo e inmediatamente se determinó la densidad óptica a 450nm. Para el análisis de los datos se utilizó el programa "Curve Expert" (Hyams D., 2013) versión 1.4 para realizar la curva estándar y con ella determinar la concentración de cada muestra.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software INERSTAT-a v1.7 b, mediante el cual se determinó la diferencia entre los grupos por análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey. Los datos fueron expresados como promedio \pm error estándar de la media y se consideró que existía diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de significancia fue de $p \leq 0.01$.

RESULTADOS

Al término de los experimentos se graficaron los valores de mKf,c , con el propósito de evaluar el daño endotelial por la isquemia-reperfusión en los bloques cardiopulmonares utilizando el modelo de pulmón aislado y perfundido, primero se comprobó que entre el grupo control y preservado por 24h existe una diferencia significativa respectivamente de los valores obtenidos, siendo 3.67 ± 0.37 en el primero a 20.48 ± 0.52 el de 24h, ($p \leq 0.01$), donde el grupo de 24h presenta valores muy altos, se pueden interpretar como un daño severo en el tejido pulmonar, generando edema y por ende un fallo respiratorio. En los dos grupos restantes se utilizaron algunas herramientas farmacológicas y para estas condiciones experimentales se consiguieron los siguientes resultados ONO-4817 (inhibidor de gelatinas) 4.65 ± 0.50 , ($p \leq 0.01$) y heparina 5.71 ± 0.54 , ($p \leq 0.05$).

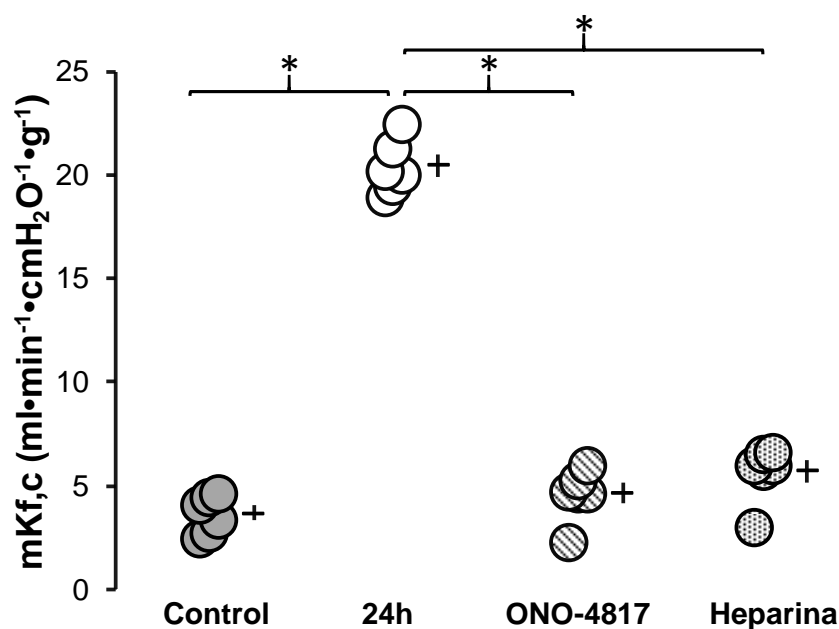


Figura 12. Coeficientes de filtración de los pulmones preservados a 24h en diferentes condiciones experimentales. * $p \leq 0.01$ mediante prueba de Tukey.

En la figura 12, observamos una disminución del mKf,c en el grupo ONO-4817 y heparina, alcanzando valores similares al grupo control. Lo que sugiere la participación de las gelatinasas en generar daño sobre la arquitectura pulmonar, provocando un desequilibrio en la permeabilidad de sus capilares. Además, indican un efecto protector de la heparina, debido a que tiene propiedades antiinflamatorias, evitando la agregación celular junto con la liberación de citocinas por algunas células inflamatorias (26). Igualmente, al presentar una similitud estructural y funcional al HS (componente principal de la MEC) ha permitido mantener la integridad de la MEC, evitando alteraciones en la composición y/o modulación del microambiente generado durante la preservación.

Sin embargo, también se ha descrito en la bibliografía que la heparina se utiliza para mejorar la actividad de las MMPs durante la técnica de zimografía cuando se tienen niveles bajos de sustrato ya sea caseína o gelatina. Para ello se adiciona heparina a las muestras durante o antes de la electroforesis, pudiendo mejorar aproximadamente de 5 incluso 20 veces la detección de pro-MMP-7 (38). Entonces se verificó con un experimento externo el efecto de la heparina sobre la actividad de las metaloproteinasas, trabajando con muestras obtenidas inmediatamente de tejido pulmonar (sin preservación) colocando diferentes concentraciones de heparina (0, 1667, 3334, y 5000UI) durante la incubación de los geles, tomando como referencia la concentración de 5000UI la cual se utiliza al momento de obtener el bloque cardiopulmonar; ya que esto permitirá tener una mejor interpretación y análisis de los resultados (**Figura 13**).

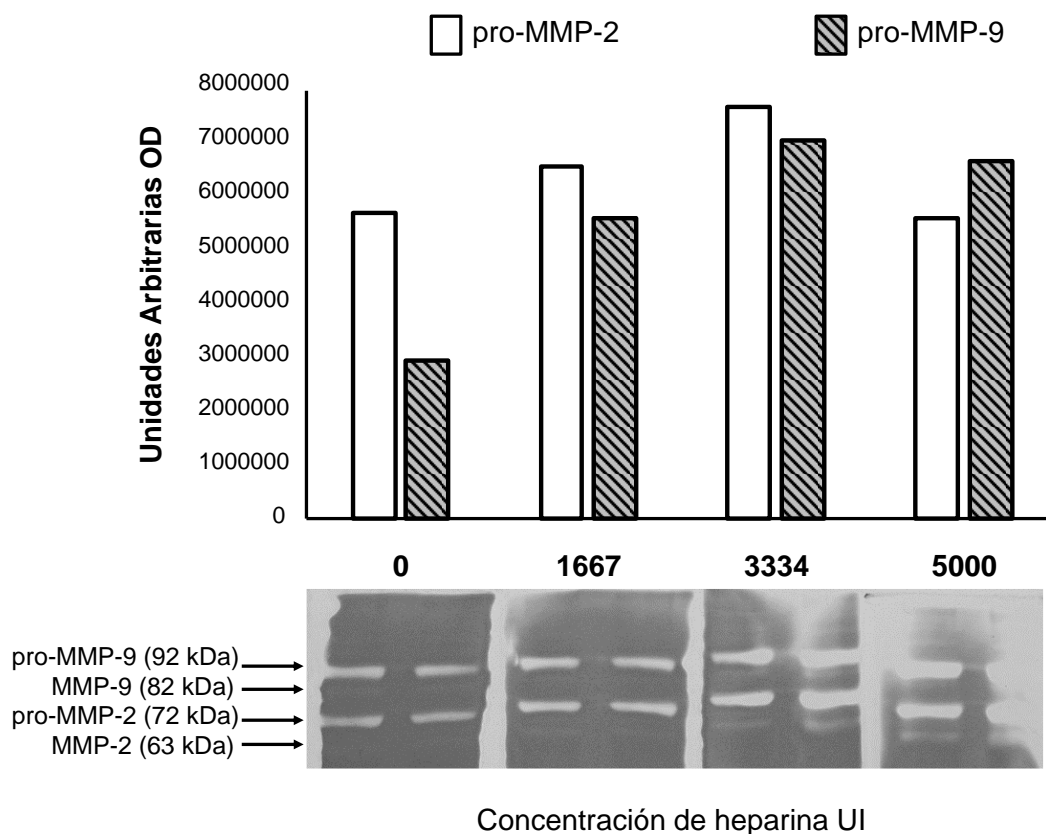


Figura 13. Concentración relativa de las pro-MMP-2 y pro-MMP-9 dependiente de la concentración de heparina.

En la figura 13 se observa un aumento en los niveles de gelatinasas, principalmente de la MMP-9, en proporción directa a la concentración de heparina, tanto de la enzima como proenzima, como se había encontrado en la literatura. No obstante, al momento de realizar el análisis mediante el software de ImageJ las bandas de menor peso molecular de cada una de las gelatinasas, no se logró encontrar alguna diferencia, ya que la intensidad de los píxeles en las bandas no es suficiente, aunque visualmente se detalla una variación en ambas MMPs. Sin embargo, falta dilucidar el papel de la heparina en la preservación del tejido, pues como se observa en la figura 8, la heparina disminuye notablemente la permeabilidad vascular evitando así daño por I/R, lo que indica un efecto dual, donde en condiciones *in vitro* mejorara la señal de las metaloproteinasas (38) mientras que *in vivo* al interactuar con los TIMPs provoca una disminución en la actividad de las MMPs (31).

De igual manera se midió la concentración relativa de las gelatinasas en los grupos experimentales por zimografía en gel. Así como la cuantificación por el método de ELISA

para cada uno de los inhibidores tisulares TIMP-1 y TIMP-2. Obteniendo los siguientes resultados.

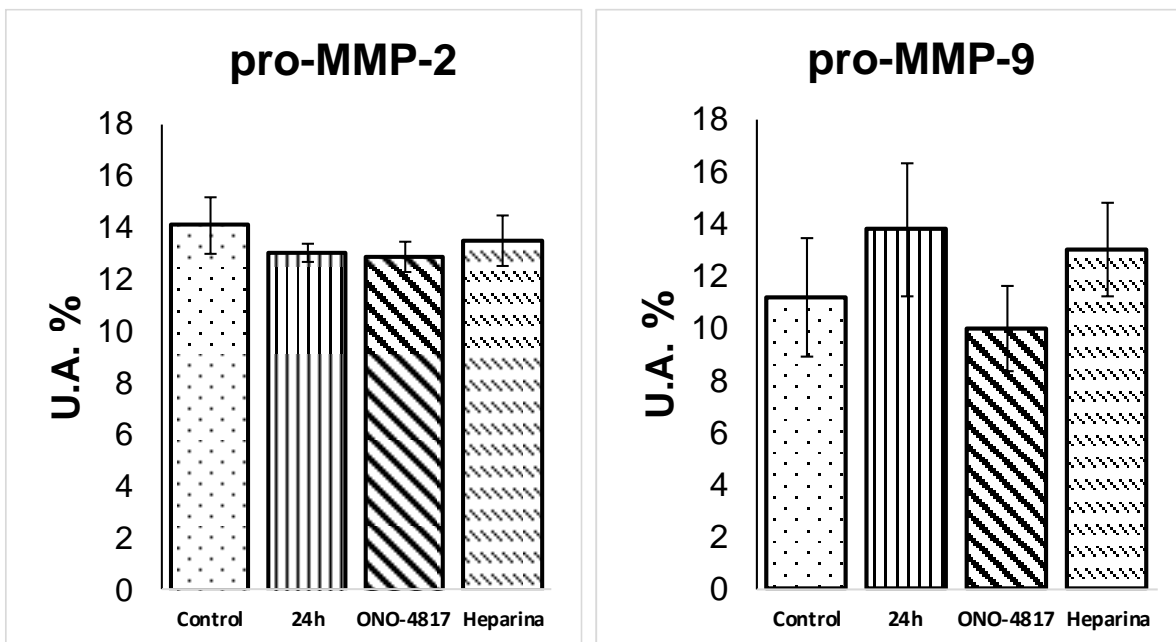


Figura 14. Concentración relativa de las proenzimas de las gelatinasas para cada uno de los grupos de estudio. No se encontraron diferencias significativas.

En la figura 14 se observan cambios significativos en la concentración de cada una de las MMPs en el pulmón, desafortunadamente en ambos casos no se alcanzó una diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, con estos resultados podríamos decir que entre los dos tipos de gelatinasas existe una mayor participación por parte de MMP-9 en comparación con MMP-2; ya que esta primera muestra la tendencia que esperábamos para nuestros experimentos, donde el grupo de 24h presenta una mayor actividad lo que se manifiesta en un mayor daño del tejido pulmonar generando un aumento en la permeabilidad vascular con la consecuente generación de edema, a diferencia de los otros grupos restantes donde la actividad es menor y los valores de mKf,c son notablemente parecidos a nuestro grupo control.

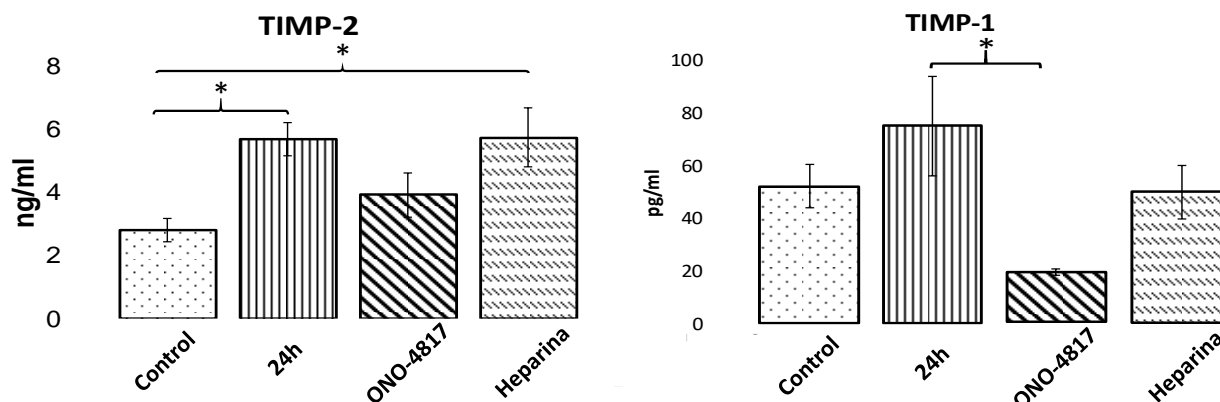


Figura 15. Cuantificación de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP-1 y TIMP-2) en tejido para cada uno de los grupos experimentales. * $p \leq 0.05$ mediante prueba de Tukey.

Sobre los resultados en la cuantificación de los TIMPs (Figura 15), podemos observar que TIMP-1 muestra en efecto similar que pro-MMP9, siendo que el grupo de 24h presenta una mayor concentración en comparación a los demás grupos de estudio, alcanzando una diferencia significativa hacia las muestras preservadas con el fármaco ONO-4817. Mientras que los valores obtenidos para los grupos control y heparina, prácticamente fueron similares. Por otro lado, revisando los valores de TIMP-2 se obtuvo una diferencia estadística entre el grupo control y los grupos 24h y heparina, donde en estos últimos grupos las concentraciones que se hallaron son parecidas.

n=	Grupo	mKf,c	Concentración relativa		Cuantificación de inhibidores	
			pro-MMP-2	pro-MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
6	24h	20.48 ± 0.52 ↑↑	↓	↑	↑	↑↑
6	ONO 4817	4.65 ± 0.50 ↑	↓	↓	↓	↑
6	Heparina	5.71 ± 0.54 ↑	↓	↑	=	↑↑

Tabla 3. Cuadro comparativo con respecto al grupo control; coeficiente de filtración capilar (mKf,c), concentración relativa de las proenzimas y niveles de cuantificación de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). ↑↑: Incremento significativo; ↑↓ aumento o disminución respectivamente; =: sin cambios.

Finalmente, y como resumen en la tabla 3 se agrupan los diferentes resultados obtenidos, integrando cualitativamente los cambios que se presentaron. En el grupo de 24h mKf,c aumentó significativamente, prácticamente 5 veces más que el grupo control, lo que nos habla de un daño severo a toda la arquitectura del tejido pulmonar, de igual manera en el mismo grupo se da un aumento en la actividad de la gelatinasa B, aunque no igual en la gelatinasa A, donde se mantuvo estable en todos los grupos. Sin embargo, para los TIMPs se ve un aumento en el grupo de 24h para ambos inhibidores, siendo razonable ya que intentan limitar el daño ocasionado por la actividad de las MMPs.

Para los grupo de ONO-4817 y heparina en lo que respecta a sus valores de mKf,c, ostentan un ligero incremento, pero a pesar de ello continúan manteniéndose en valores aceptables donde no se llega a presentar un daño agudo por la I/R, sin olvidar el hecho que estos grupos también se mantuvieron durante 24h de preservación, conjuntamente al examinar la actividad de las gelatinasas en estos grupos esta disminuyó en comparación al control, a excepción de pro-MMP-9 en el grupo de heparina. Mientras que para los TIMPs en estos grupos se encontró en mayor cantidad TIMP-2 teniendo significancia estadística para el grupo de heparina y TIMP-1 solo disminuyo para ONO-4817, sin mostrar cambio alguno para heparina.

DISCUSIÓN

En el presente estudio pudimos comprobar que las gelatinasas son unas enzimas importantes durante la preservación pulmonar, así mismo, nuestros resultados hablan de que durante este periodo sobre la procuración del tejido es un paso importante para mantener la viabilidad funcional y con ello evitar el desarrollo de padecimientos postoperatorios como la FPI. Caracterizada por ser una forma de lesión pulmonar aguda, induciendo un daño en la membrana alveolo capilar con la consecuente generación de edema, estableciéndose como la principal causa de mortalidad posoperatorio con un porcentaje de mortalidad alrededor del 10 al 30% (8, 9).

Como la FPI es el resultado final de múltiples vías, es poco probable que una estrategia preventiva sea universalmente efectiva en todos los receptores. En cambio, probablemente será necesario un enfoque que implique la consideración de biomarcadores al igual que los factores de riesgo clínico de los donantes y receptores.

Con el uso de herramientas farmacológicas como la heparina, un anticoagulante que se usa ampliamente en la clínica, y ONO-4817, un inhibidor de metaloproteasas de tercera generación, fuimos capaces de prevenir el aumento en la permeabilidad vascular inducido por la pérdida en la arquitectura pulmonar de la MEC. Esto a su vez plantea posibilidades para el acondicionamiento de órganos como nuevas terapias durante el período de isquemia-perfusión; ya que existen pruebas sobre el estrés mecánico cíclico que afecta la liberación y activación de MMPs jugando un papel importante en la regulación de la remodelación de MEC (14).

En el pulmón, la matriz extracelular tiene varias funciones que proporcionan: 1) resistencia mecánica a la tracción y compresión al igual que elasticidad, 2) bajo cumplimiento del tejido mecánico 3) control del comportamiento celular mediante la unión de factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas junto a la interacción con los receptores de superficie celular, y 4) reparación y remodelación de tejidos. Los componentes de MEC como el sulfato de condroitina (versican) y los proteoglicanos de heparán sulfato (perlecan) desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del fluido tisular (13).

Lo anterior nos permite comprender el posible efecto protector por parte de la heparina cuando se agrega a la solución de preservación, puesto que el HS como una molécula ubicua, está implicada en un espectro de actividades biológicas, que le permite interactuar específicamente con muchas proteínas, actuando en la adhesión inicial de los leucocitos al endotelio inflamado, hasta su posterior extravasación y el establecimiento de una respuesta inflamatoria crónica. Se sabe que TNF- α aumenta durante la lesión I/R pulmonar e induce la producción endotelial de MMP-9, contribuyendo así a una mayor permeabilidad endotelial vascular dentro de las 4-6h del inicio de la isquemia (19, 33).

Por lo tanto, la heparina un clásico anticoagulante exhibe efectos antiinflamatorios en modelos animales y la clínica, entre estos se incluye la modulación de algunos de los efectos fisiopatológicos de la endotoxina y el TNF- α , la migración de neutrófilos, la formación de edemas, hipertensión pulmonar, la hipoxemia, al igual que, la expresión y biodisponibilidad de quimiocinas y citocinas inflamatorias. Además, presumiblemente por interferencia con las funciones de HS, ya que este último es crítico al ser quimioatrayente para los leucocitos rodantes, inhibiendo significativamente la adhesión y migración de células inflamatorias en respuesta a el factor quimiotáctico, junto con la unión a moléculas de adhesión expresadas en la superficie de las células endoteliales y/o leucocitos como CD11b/CD18. Igualmente, sobre la regulación durante la biosíntesis, ya que las estructuras de HS y heparina están moduladas significativamente por la heparanasa, una endoglicosidasa que se sintetiza en una serie de afecciones inflamatorias (33, 39).

Por consiguiente, los mecanismos que explican nuestros resultados con la heparina pueden deberse a su efecto antiinflamatorio evitando el acopio de células inflamatorias, principal fuente de MMPs en especial de MMP-9. Así como, sus efectos sobre el complejo MMP/TIMP, logrando separar cada componente favoreciendo el desplazamiento, pero no el desprendimiento del predominio. Lo que coincide con los valores obtenidos sobre la medición de la concentración relativa de pro-MMP-2 (31).

Mientras que el uso de un inhibidor selectivo de MMPs con alta afinidad por las gelatinasas durante la reperfusión, también atenúa el daño por I/R, induciendo una mejora de la capacidad de oxigenación pulmonar, aunado a ello Yano y colaboradores (2001) (40),

observaron que MMP-9 participa de forma activa en el daño por I/R, pero su participación se hace más evidente posterior a 1h de la reperfusión. No podemos descartar la participación de otras MMPs, ya que ONO-4817 también tiene una alta afinidad por MMP-2, MMP-8 (colagenasa de neutrófilos), MMP-12 (metaloelastasa de los macrófagos) y MMP-13 (colagenasa-3), lo cual permite formular nuevas hipótesis acerca de la relevancia de estas en el aumento de la permeabilidad vascular durante el periodo de preservación.

Por otra parte, MMP-8 es capaz de degradar gelatina al igual que MMP-13 además de colágeno tipo IV y PAI-2 (inhibidor del activador del plasminógeno) o MMP-12 la cual tiene la capacidad de degradar colágeno tipo IV, gelatina y fibronectina. Por lo que la participación de estas otras MMPs no puede ser descartada de tener un papel importante en el aumento de la permeabilidad vascular y consecuente desarrollo de la FPI.

Por último, como se pudo observar en ambos TIMPs al encontrar valores altos de concentración en las muestras del grupo de 24h, se podría estar hablando de un posible mecanismo homeostático para mantener la integridad de la MEC, dependiente del equilibrio entre síntesis y degradación de sus componentes, amortiguando el daño del tejido pulmonar durante la preservación. Mientras tanto, en el grupo de heparina, se reporta en la literatura que los anticoagulantes pueden modificar los niveles de concentración en los TIMPs, aumentando de tal manera que podría disminuiría la actividad de las MMPs, dando un efecto protector y evitando los cambios de permeabilidad vascular.

CONCLUSIONES

Las gelatinasas sí participan en la alteración de la permeabilidad vascular durante la preservación pulmonar prolongada, como lo vimos al utilizar ONO-4817 un inhibidor de metaloproteinasas con gran afinidad por las MMP 2 y 9. Esto presumiblemente se deba a los procesos inflamatorios por los que pasa el órgano durante el periodo isquémico y su posterior reperfusión. Frente a las múltiples alteraciones que se generan en estas condiciones, es bien sabido que las plaquetas y los leucocitos contienen varios TIMPs y MMPs que puede activarse en forma extracelular o durante la agregación.

Así mismo, la heparina presenta un efecto indirecto y directo en la medición de MMPs y TIMPs, de acuerdo con evidencias previas de su participación en la liberación de TIMP, pues se ha probado en estudios de zimografía que al agregar heparina aumenta la actividad de algunas MMPs, mientras que, en muestras de plasma heparinizado, al separar cada componente del complejo MMP/TIMP, aumenta los niveles de TIMP-2 (31).

Por lo anterior, se puede sugerir el uso de un inhibidor de MMPs, para atenuar el daño en la membrana basal en la solución de preservación, logrando que con esto se pudiera contribuir en aumentar el número de órganos con fines de trasplante y cubrir la alta demanda que existe tanto en México como en el mundo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, Harhay MO, Hayes D, Jr., Hsich E, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult heart transplantation report - 2019; focus theme: Donor and recipient size match. *J Heart Lung Transplant*. 2019;38(10):1056-66.
2. Cameron AM, Barandiaran Cornejo JF. Organ preservation review: history of organ preservation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(2):146-51.
3. Petrenko A, Carnevale M, Somov A, Osorio J, Rodriguez J, Guibert E, et al. Organ Preservation into the 2020s: The Era of Dynamic Intervention. *Transfus Med Hemother*. 2019;46(3):151-72.
4. Guibert EE, Petrenko AY, Balaban CL, Somov AY, Rodriguez JV, Fuller BJ. Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfus Med Hemother*. 2011;38(2):125-42.
5. Hoffmann T, Minor T. New strategies and concepts in organ preservation. *Eur Surg Res*. 2015;54(3-4):114-26.
6. Laubach VE, Sharma AK. Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21(3):246-52.
7. de Perrot M, Keshavjee S. Lung transplantation. Lung preservation. *Chest Surg Clin N Am*. 2003;13(3):443-62.
8. Suárez López VJ, Miñambres E, Robles Arista JC, Ballesteros MA. [Primary graft dysfunction after lung transplantation]. *Med Intensiva*. 2012;36(7):506-12.
9. Gennai S, Pison C, Briot R. [Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation]. *Presse Med*. 2014;43(9):921-30.
10. Schossleitner K, Habermeyer A, Finsterwalder R, Friedl HP, Rauscher S, Gröger M, et al. A Peptide to Reduce Pulmonary Edema in a Rat Model of Lung Transplantation. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142115.
11. Shah RJ, Diamond JM. Primary Graft Dysfunction (PGD) Following Lung Transplantation. *Semin Respir Crit Care Med*. 2018;39(2):148-54.
12. Porteous MK, Lee JC. Primary Graft Dysfunction After Lung Transplantation. *Clin Chest Med*. 2017;38(4):641-54.
13. Pelosi P, Rocco PR, Negrini D, Passi A. The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. *An Acad Bras Cienc*. 2007;79(2):285-97.

14. Cruz FF, Rocco PRM, Pelosi P. Role of the extracellular matrix in the genesis of ventilator-induced lung injury. *Med Klin Intensivmed Notfmed*. 2018;113(Suppl 1):2-6.
15. Negrini D, Passi A, Moriondo A. The role of proteoglycans in pulmonary edema development. *Intensive Care Med*. 2008;34(4):610-8.
16. de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):490-511.
17. Pelosi P, Rocco PR. Effects of mechanical ventilation on the extracellular matrix. *Intensive Care Med*. 2008;34(4):631-9.
18. Qi B, Chen HL, Shang D, Dong Y, Zhang GX, Yu L. Effects of hypoxia-inducible factor-1 α and matrix metalloproteinase-9 on alveolar-capillary barrier disruption and lung edema in rat models of severe acute pancreatitis-associated lung injury. *Exp Ther Med*. 2014;8(3):899-906.
19. Soccia PM, Gasche Y, Miniati DN, Hoyt G, Berry GJ, Doyle RL, et al. Matrix metalloproteinase inhibition decreases ischemia-reperfusion injury after lung transplantation. *Am J Transplant*. 2004;4(1):41-50.
20. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(1):3-19.
21. Benjamin MM, Khalil RA. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease. *Exp Suppl*. 2012;103:209-79.
22. Jones GT. Matrix metalloproteinases in biologic samples. *Adv Clin Chem*. 2014;65:199-219.
23. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516.
24. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006;69(3):562-73.
25. Maciejczyk M, Pietrzykowska A, Zalewska A, Knaś M, Daniszewska I. The Significance of Matrix Metalloproteinases in Oral Diseases. *Adv Clin Exp Med*. 2016;25(2):383-90.
26. Farwell SL, Kanyi D, Hamel M, Slee JB, Miller EA, Cipolle MD, et al. Heparin Decreases in Tumor Necrosis Factor α (TNF α)-induced Endothelial Stress Responses Require Transmembrane Protein 184A and Induction of Dual Specificity Phosphatase 1. *J Biol Chem*. 2016;291(10):5342-54.
27. White ES. Lung extracellular matrix and fibroblast function. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12 Suppl 1:S30-3.

28. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006;533(1-3):133-44.
29. Ceccarelli M, Bani D, Cinci L, Nistri S, Uliva C, Ragazzo E, et al. Anti-inflammatory effects of low molecular weight heparin derivative in a rat model of carrageenan-induced pleurisy. *J Cell Mol Med.* 2009;13(8B):2704-12.
30. Gerlach RF, Uzuelli JA, Souza-Tarla CD, Tanus-Santos JE. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal Biochem.* 2005;344(1):147-9.
31. Mannello F, Jung K, Tonti GA, Canestrari F. Heparin affects matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases circulating in peripheral blood. *Clin Biochem.* 2008;41(18):1466-73.
32. Vignoli A, Marchetti M, Balducci D, Barbui T, Falanga A. Differential effect of the low-molecular-weight heparin, dalteparin, and unfractionated heparin on microvascular endothelial cell hemostatic properties. *Haematologica.* 2006;91(2):207-14.
33. Li JP, Vlodaysky I. Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. *Thromb Haemost.* 2009;102(5):823-8.
34. Faioni EM. *Fisiología Y Fisiopatología De Los Anticoagulantes Naturales.* Milán, Italia: Centro Emofilia e Trombosi; 2012.
35. Chen S, He Y, Hu Z, Lu S, Yin X, Ma X, et al. Heparanase Mediates Intestinal Inflammation and Injury in a Mouse Model of Sepsis. *J Histochem Cytochem.* 2017;65(4):241-9.
36. Yamamoto A, Yano S, Shiraga M, Ogawa H, Goto H, Miki T, et al. A third-generation matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor (ONO-4817) combined with docetaxel suppresses progression of lung micrometastasis of MMP-expressing tumor cells in nude mice. *Int J Cancer.* 2003;103(6):822-8.
37. Ro Y, Hamada C, Inaba M, Io H, Kaneko K, Tomino Y. Inhibitory effects of matrix metalloproteinase inhibitor ONO-4817 on morphological alterations in chlorhexidine gluconate-induced peritoneal sclerosis rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(10):2838-48.
38. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 2005;38(1):73-83.
39. Salas A, Sans M, Soriano A, Reverter JC, Anderson DC, Piqué JM, et al. Heparin attenuates TNF-alpha induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. *Gut.* 2000;47(1):88-96.

40. Yano M, Omoto Y, Yamakawa Y, Nakashima Y, Kiriya M, Saito Y, et al. Increased matrix metalloproteinase 9 activity and mRNA expression in lung ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20(6):679-86.