



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PARTICIPACIÓN DE LA GELATINASA B (MMP-9)  
EN LA FALLA PRIMARIA DEL INJERTO EN UN  
MODELO DE PRESERVACIÓN PULMONAR DE  
CONEJO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**DANIEL MARTÍNEZ FLORES**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Biol. JESÚS ALQUICIRA MIRELES**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

1. Datos del alumno

Martínez

Flores

Daniel

57722612

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

310218889

2. Datos del tutor

Biol.

Jesús

Alquicira

Mireles

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Patricia

Segura

Medina

4. Datos del sinodal 2

Dra.

María Sandra

Cabrera

Benítez

5. Datos del sinodal 3

Dr.

José Luis

Arreola

Ramírez

6. Datos del sinodal 4

Dr.

José Guadalupe

Cisneros

Lira

7. Datos del trabajo escrito

Participación de la gelatinasa B (MMP-9) en la falla primaria del injerto en un modelo de preservación pulmonar de conejo

36 p.

2017

## **Agradecimientos**

---

A mi madre Teresa Flores, por siempre estar presente de forma incondicional en todo momento que la he necesitado, por haberme brindado lo esencial para ser una persona feliz, así como por ser uno de los principales motivos que me impulsa a superarme cada día y nunca desistir en mis metas como lo es la culminación de esta tesis.

A mi padre Jerónimo Martínez, por siempre tener confianza en mi y enseñarme la importancia de la humildad y respeto, por inculcarme el ser detallista en todo lo que haga sin importar que sea, también por esos días de trabajo juntos que siempre he disfrutado y que me han enseñado que las mejores cosas se ganan con el trabajo honrado.

A mi hermana Jessica Martínez por impulsarme a demostrar que tenemos la capacidad para mejorar todos los días y siempre esforzarnos al máximo a pesar de las adversidades.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por brindarme la oportunidad de pertenecer a la máxima casa de estudios de México y al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, así como a todo el personal que en el labora por haberme brindado las facilidades para realizar esta tesis.

A mi tutor el Biol. Jesús Alquicira, por su paciencia y dedicación en mostrarme que el trabajo debe hacerse de la forma más rigurosa y siempre haciendo el mayor esfuerzo posible, por sus valiosos consejos en el ámbito científico y personal, así como por la amistad que me ha brindado y la cual espero conservar durante mucho tiempo.

Al Dr. José Luis Arreola, por ser también un excelente tutor y siempre tener el tiempo para orientarme en la realización de esta tesis, así como en mi formación como Biólogo, además de brindarme su amistad y apoyo por lo cual siempre estaré agradecido. A la Dra. Patricia Segura por permitirme pertenecer al equipo del “Taller de Farmacología y toxicología pulmonar”, por sus consejos para la realización de esta tesis y por siempre tener esa actitud positiva cuando uno más lo necesita.

A la Dra. María Sandra Cabrera y al Dr. José Guadalupe Cisneros por sus tan acertadas correcciones, las cuales fueron de gran ayuda y mejoraron la calidad de este trabajo y de los cuales espero poder seguir aprendiendo.

A mis amigos Atzallaly Torreblanca y Angel Herrera, por el apoyo que me han y nos hemos brindado para algún día ser colegas en el área de las ciencias. Por último, agradezco a mis amigos Kike y Roro, por esos momentos de distracción ajenos a la tesis que a veces son tan importantes, además, por enseñarme el valor de la amistad.

# Índice

---

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción. ....</b>	<b>3</b>
Trasplante pulmonar .....	3
Preservación pulmonar.....	5
Falla primaria del injerto (FPI) .....	6
<i>Isquemia-Reperusión</i> .....	8
Metaloproteinasas de matriz .....	10
Gelatinasa B (MMP-9).....	13
Estructura .....	13
Regulación .....	14
Sustratos.....	16
Gelatinasa B y permeabilidad vascular.....	17
<b>Justificación . ....</b>	<b>19</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivo.....</b>	<b>20</b>
Objetivos particulares.....	20
<b>Material y Métodos .....</b>	<b>20</b>
Animales de estudio .....	20
Extracción del bloque cardiopulmonar .....	20
Lavado y preservación pulmonar .....	21
Pulmón aislado y perfundido.....	22
Medición del coeficiente de filtración capilar (mKfc) .....	23
Cuantificación de proteína total.....	24
Zimografía en geles de gelatina.....	25
Cuantificación de expresión de TIMP-1.....	25
Análisis estadístico.....	26
<b>Resultados.....</b>	<b>26</b>
Cambios en el coeficiente de filtración capilar .....	26
Concentración total de proteína .....	27
Actividad de MMP-9 .....	28
Expresión de Inhibidores tisulares de MMPs. ....	29
Resumen de resultados.....	<b>30</b>
<b>Discusión. ....</b>	<b>30</b>

Conclusiones.....	33
-------------------	----

## Índice de tablas

Tabla 1. Criterios generales para la selección de donadores y receptores de pulmón .....	4
Tabla 2. Algunos sustratos asociados a MMP-9. ....	17
Tabla 3. Resumen de resultados.. ....	30

## Índice de figuras

Figura 1. Trasplantes pulmonares por patología y tipo de trasplante (1995-2015) . ....	4
Figura 2. Causa de muerte post-trasplante 0-30 días. ....	7
Figura 3. Radiografía de Tórax que muestra infiltración pulmonar compatible con edema. 8	
Figura 4. Factores de riesgo para el desarrollo de FPI en pulmón. ....	8
Figura 5. Estructura de subfamilias de MMP .....	11
Figura 6. Mecanismo <i>switch de cisteína</i> .....	11
Figura 7. Inhibición endógena de MMPs por TIMPs. ....	12
Figura 8. Estructura de MMP-9 .....	14
Figura 9. Diversos niveles y vías de regulación de MMP-9 .....	14
Figura 10. Extracción del bloque cardiopulmonar. Inyección de heparina (a) y bloque extraído (b) .....	21
Figura 11. Lavado y preservación pulmonar. ....	22
Figura 12. Representación del método de doble oclusión para el registro del mKfc. ....	24
Figura 13. Efecto en el mKfc por tratamiento con ONO-4817 en pulmones preservados 24 h. ....	27
Figura 14. Concentración total de proteína. ....	27
Figura 15. Actividad de MMP-9 mediante zimografía en geles de gelatina. ....	28
Figura 16. Niveles de actividad de pro-MMP-9 y MMP-9 .....	29
Figura 17. Expresión de TIMP-1.....	29

## Abreviaturas

---

<b>ARDS</b>	Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo	<b>MB</b>	Membrana basal
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato	<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>BO</b>	Bronquiolitis obliterante	<b>mKfc</b>	Coficiente de filtración capilar
<b>DA1AT</b>	Deficiencia Alfa 1-antitripsina	<b>MMP</b>	Metaloproteinasa de matriz
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas	<b>MT-MMPs</b>	Metaloproteinasas de matriz tipo-membrana
<b>EPI</b>	Enfermedad pulmonar intersticial	<b>NADP</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>EPOC</b>	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	<b>NGAL</b>	Lipocalina asociada a gelatinasa-B de neutrófilo
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno	<b>NII</b>	Neumonía intersticial idiopática
<b>ETC</b>	Enfermedad del tejido conectivo	<b>Pa</b>	Presión arterial
<b>FiO<sub>2</sub></b>	Fracción de oxígeno inspirado	<b>PaO<sub>2</sub></b>	Presión arterial de Oxígeno
<b>FPI</b>	Falla primaria del injerto	<b>Pc</b>	Presión capilar
<b>FQ</b>	Fibrosis quística	<b>Pe</b>	Presión de la espiración
<b>HAPI</b>	Hipertensión pulmonar arterial idiopática	<b>PTLD</b>	Síndrome linfoproliferativo pos trasplante
<b>HP</b>	Hipertensión pulmonar	<b>Pv</b>	Presión venosa
<b>i.m.</b>	Intramuscular	<b>SBO</b>	Síndrome de Bronquiolitis obliterante
<b>i.v.</b>	Intravenosa	<b>TIMP</b>	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
<b>ISHLT</b>	International Society for Heart & Lung Transplantation	<b>TMB</b>	Sustrato de membrana

## Resumen

---

**Introducción:** El trasplante pulmonar representa uno de los adelantos más significativos para la medicina actual, además de ser considerado el tratamiento por elección para pacientes que presentan una patología pulmonar progresiva en fase terminal. A pesar de su éxito, del 10 al 30% de los pacientes desarrollan la Falla Primaria del Injerto, la cual es una complicación vascular de origen multifactorial caracterizada por la presencia de edema pulmonar e hipoxemia grave en las primeras 72 h post-trasplante. Los mecanismos que promueven su desarrollo no han sido comprendidos en su totalidad, pero se reconoce que el daño por isquemia-reperfusión es su principal factor causal y que la intervención temprana durante etapas como la preservación, resulta fundamental para mejorar la calidad del injerto. Durante el periodo de isquemia-reperfusión se ha documentado el aumento de la actividad de la gelatinasa B (MMP-9), miembro de las metaloproteinasas de matriz, la cual ha mostrado tener una participación activa en patologías de tipo vascular debido a su potencial para degradar componentes de la matriz extracelular, en particular de la membrana basal. **Objetivo:** Determinar si MMP-9 participa en los cambios de permeabilidad vascular durante el periodo de preservación pulmonar (24 h). **Metodología:** Bloques cardiopulmonares de conejo fueron extraídos y sometidos a un periodo de preservación fría con solución salina fisiológica durante 24 h, mientras que el grupo donde se inhibió MMP-9 se incluyó la adición del inhibidor selectivo de metaloproteinasas ONO-4817 con alta afinidad por MMP-9. Bloques cardiopulmonares obtenidos y estudiados inmediatamente fueron considerados como grupo control. En todos los grupos se evaluó el coeficiente de filtración capilar, la concentración total de proteína presente en tejido, la actividad proteolítica de MMP-9 en su forma latente y activa, así como los niveles de TIMP-1, considerado su principal inhibidor endógeno en tejido. **Resultados:** Con relación al grupo control, se observó que el periodo de preservación pulmonar de 24 h induce considerablemente el aumento de la permeabilidad vascular, así como una tendencia al aumento de los niveles de MMP-9 activa y TIMP-1 (ambos sin diferencia estadística significativa). Respecto al grupo con el inhibidor ONO-4817, se observó que su uso promueve una disminución considerable de la permeabilidad vascular durante la preservación, incluso con niveles similares al grupo control, además se observó una tendencia a la disminución de la actividad de MMP-9, así como el aumento de la concentración total de proteína y la disminución de los niveles de TIMP-1. **Conclusión:** Con base en los resultados, podemos concluir que existe una

tendencia al aumento en la actividad de MMP-9 durante el periodo de preservación pulmonar en comparación al grupo control, lo cual podría indicar que este aumento de MMP-9 se ve involucrado en el desarrollo de edema, sin embargo, no se pueden descartar mecanismos que involucren a otras metaloproteinasas de matriz, debido a que ONO-4817 demostró disminuir la permeabilidad vascular, y regular los niveles de TIMP-1, posiblemente por su potencial para inhibir a otras MMPs diferentes pero no estrictamente independientes a MMP-9.

## Introducción

---

### Trasplante pulmonar

Los trasplantes de órganos representan uno de los adelantos más significativos para la medicina, constituyéndose como una alternativa terapéutica efectiva para pacientes con falla terminal de órganos vitales <sup>[1]</sup>. El Registro Internacional en Trasplante y Donación de Órganos (IRODaT por sus siglas en inglés de *International Registry on Organ Donation and Transplantation*) estima que a nivel mundial se han realizado un total de 118,127 trasplantes de órganos sólidos, tan solo para el año 2013 y que la lista de pacientes en espera sobrepasa en gran medida la lista de donadores. Es por ello que la procuración desde la extracción, preservación y el mismo trasplante son pasos fundamentales que se ven reflejados en la viabilidad funcional.

En el año de 1963, en la Universidad de Mississippi, Hardy y colaboradores realizaron el primer alotrasplante pulmonar en humano, con un éxito de sobrevivencia de 18 días. Para el año de 1980 se habían reportado 38 trasplantes pulmonares en la literatura, con una sobrevida mayor a un mes tan solo para 2 pacientes, lo cual ocasionó el desinterés por los trasplantes de tejido pulmonar. No fue sino hasta el año de 1983, que el esfuerzo del Grupo de Trasplante de la Universidad de Toronto, logró el primer trasplante cardiopulmonar exitoso para un paciente que tuvo una sobrevida mayor a seis años <sup>[2]</sup>.

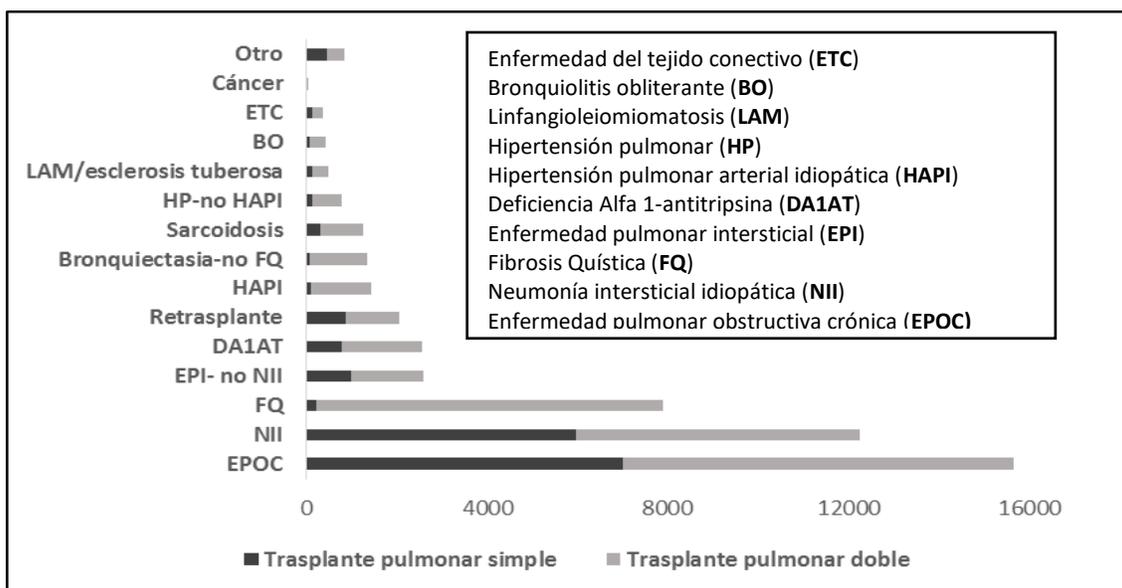
El trasplante pulmonar es actualmente el tratamiento por elección para pacientes que presentan una patología pulmonar progresiva en fase terminal, sin compromiso de otro órgano vital y con una sobrevida esperada menor a dos años, entre otros criterios de priorización tanto para receptores como para donadores (**Tabla 1**) <sup>[2] [3] [4] [5]</sup>.

Se estima que al menos el 50% de los trasplantes pulmonares son realizados a causa de Enfermedad Pulmonar Obscruectiva Crónica (EPOC) y Neumonía Intersticial Idiopática (NII), ya sea mediante el trasplante de un solo pulmón (trasplante simple) o los dos pulmones (trasplante doble o bilateral secuencial) (**Figura 1**), mientras que el trasplante

cardiopulmonar se reserva para pacientes con enfermedad pulmonar terminal asociada a cardiopatía terminal. [6],

Criterios Donador	Criterios Receptor	
Edad <55 años Compatibilidad ABO Radiografía de tórax normal (ausencia de infiltrados alveolares o intersticiales) PaO <sub>2</sub> > 300 mmHg a una FiO <sub>2</sub> 1.0 y PEEP 5 cm H <sub>2</sub> O Ausencia de trauma torácico Ausencia de patología pulmonar concurrente Broncoscopia normal sin evidencia de salida de material gastrointestinal o secreciones purulentas Tinción gram de esputo sin microorganismos Ausencia de antecedentes de cirugía torácica Índice tabáquico <20 paquetes/año	Enfermedad pulmonar terminal Sobrevida esperada no mayor a 12-18 meses Ausencia de enfermedades sistémicas acompañantes Ausencia de enfermedad coronaria significativa Apego favorable al tratamiento Estabilidad psicológica sin adicciones Paciente ambulatorio con oxígeno según necesidad Sin necesidad de terapia a base de esteroides	
	Trasplante unilateral: -Edad <65 años -Sin enfermedad pulmonar crónica infecciosa (bronquitis crónica, bronquiectasias, fibrosis quística) -Enfermedad pulmonar obstructiva (enfisema) restrictiva (fibrosis pulmonar) o vascular (hipertensión pulmonar primaria)	Trasplante bilateral: -Edad < 55 años -Enfermedad pulmonar crónica infecciosa (fibrosis quística, bronquiectasias, bronquitis crónica) -Enfermedad pulmonar obstructiva o vascular

**Tabla 1.** Criterios generales para la selección de donadores y receptores de pulmón



**Figura 1.** Trasplantes pulmonares por patología y tipo de trasplante (1995-2015) [6].

De acuerdo al registro más actual de la Sociedad Internacional de Trasplante Corazón Pulmón (ISHLT por sus siglas en inglés) la cantidad de trasplantes de pulmón se ha incrementado en las últimas décadas en las modalidades simple y bilateral, alcanzando 3973 tan solo para Norteamérica y Europa en 2014 <sup>[6]</sup>. Aunado a ello el número de pulmones disponibles con fines de trasplante es limitado, por lo tanto se requieren métodos eficaces, seguros y fiables para mantener la viabilidad del pulmón antes y después del trasplante.

La realización de un trasplante pulmonar requiere la utilización de un injerto que deberá estar sometido a un periodo de preservación, mediante el cual se pretende mantener la viabilidad funcional del órgano. Es por ello que la preservación se considera uno de los pasos más importantes en el trasplante pulmonar.

### **Preservación pulmonar**

La preservación pulmonar es descrita como “la línea de suministro para el trasplante de órganos” y tiene dos objetivos principales: 1) Mantener en un estado mínimo el efecto causado por la isquemia durante el almacenamiento (24 h o menos) , conservando al pulmón estructural, funcional, y bioquímicamente intacto para que una vez trasplantado su función sea óptima. 2) Y por otra parte, mantener la integridad pulmonar el mayor tiempo posible, de modo que el injerto sea funcional en la reperfusión (restablecimiento del flujo sanguíneo) <sup>[7] [8]</sup>.

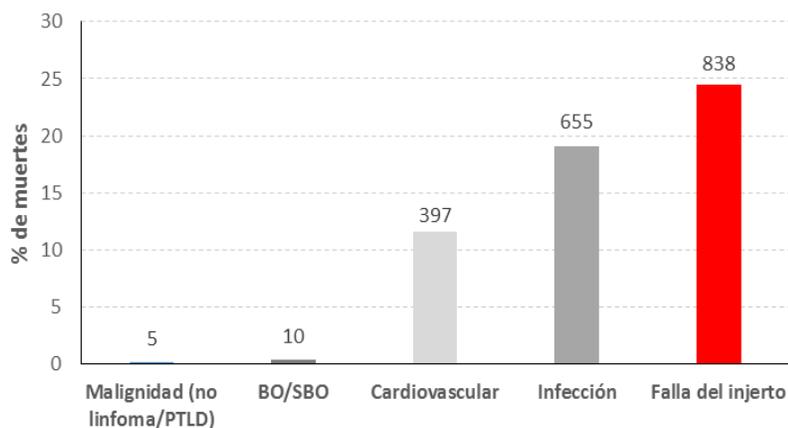
Diversas técnicas de preservación han sido desarrolladas <sup>[9]</sup>, pero la mayoría se han enfocado en la supresión del metabolismo y de las enzimas catabólicas, que se logra mediante un estado de hipotermia, disminuyendo la temperatura a 4°C <sup>[10] [11]</sup>. Sin embargo, el control metabólico pulmonar no es suficiente para asegurar el éxito que pretende la preservación. Es por ello que el desarrollo de soluciones de perfusión usadas durante la preservación, es fundamental para aumentar considerablemente la viabilidad del tejido pulmonar.

Diversos grupos de investigación han enfocado su esfuerzo en el desarrollo de soluciones de preservación, precedidos por los resultados obtenidos por Haverich y col. (1986) en los que se demostraba que el lavado abundante con un alto volumen de líquido de perfusión (solución Euro-Collins) y una alta velocidad de flujo daba como resultado una mejor función pulmonar después de la reperfusión. Estas soluciones de preservación tienen entre sus objetivos la prevención de edema celular, acidosis intracelular, actividad de especies reactivas de oxígeno, edema intersticial, así como aportar precursores de ATP y disminuir la entrada de calcio al interior de la célula durante la reperfusión <sup>[10]</sup> <sup>[7]</sup>.

Las soluciones de preservación contienen diferentes elementos que varían en sus concentraciones, ya sea si son de carácter intracelular (Universidad de Wisconsin y Euro Collins) o extracelular (Celsior y Perfadex). Entre los elementos más importantes se incluyen iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Mg}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ), impermeabilizantes o coloides (p.e. Glucosa, rafinosa, lactobionato, manitol, dextrán, albúmina), amortiguadores de pH “Buffers” (Fosfato, bicarbonato, histidina), antioxidantes (p.e. glutatión, alopurinol, triptófano, manitol), nutrientes como glucosa, entre otros elementos <sup>[11]</sup>

### **Falla primaria del injerto (FPI)**

El éxito del trasplante pulmonar en las últimas décadas ha mejorado gracias al avance en aspectos como cuidado perioperatorio, técnicas quirúrgicas e inmunosupresión. Sin embargo, la preservación es uno de los pasos que se requiere mejorar para asegurar el éxito del injerto y evitar complicaciones que deriven en comprometer la salud del paciente. Siendo una de ellas la FPI, la cual representa del 10 al 30% de la morbilidad y mortalidad, después del trasplante pulmonar (**Figura 2**) <sup>[6]</sup> <sup>[12]</sup>.



**Figura 2.** Causa de muerte post-trasplante 0-30 días. Bronquiolitis obliterante (BO), Síndrome de bronquiolitis obliterante (SBO), Síndrome linfoproliferativo post-trasplante (PTLD).

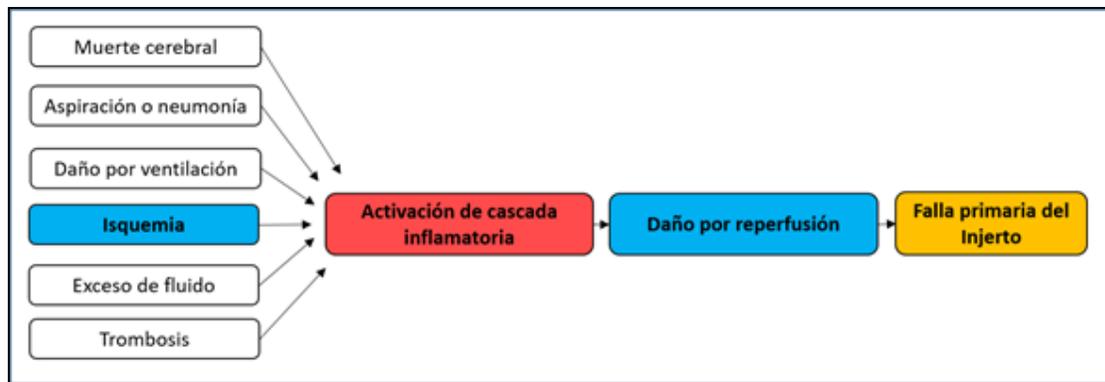
La FPI representa una grave lesión multifactorial, que se caracteriza por hipoxemia grave y formación de edema pulmonar no cardiogénico debido a la alteración del parénquima pulmonar en las primeras 72 h post-trasplante <sup>[13]</sup> <sup>[14]</sup> <sup>[12]</sup>. El edema pulmonar generado durante la FPI representa una acumulación anormal de líquido y proteínas en el espacio intersticial pulmonar, presente entre la membrana alveolo-capilar, que ocurre por un incremento en la permeabilidad de la pared de los vasos sanguíneos causando el deterioro del intercambio gaseoso <sup>[15]</sup> <sup>[16]</sup>.

En el año 2005 la ISHLT documentó el consenso para la definición de FPI debido a la ambigüedad generada entre los diferentes grupos de investigación y clínicos, tomando en cuenta sólo dos parámetros clínicos durante las primeras 72 h post-trasplante: 1) Radiografía de tórax que muestra infiltrados pulmonares compatibles con edema pulmonar (**Figura 3**) y 2) la relación entre la Presión arterial de Oxígeno y la Fracción de oxígeno inspirado ( $PaO_2/FiO_2$ ). <sup>[13]</sup>



**Figura 3.** Radiografía de Tórax que muestra infiltración pulmonar compatible con edema [42]

La FPI es de origen multifactorial (**Figura 4**) y su origen puede estar en el donante, en el receptor, en el implante pulmonar o en la ventilación mecánica. Sin embargo, la isquemia-reperusión (IR) representa la principal causa para el desarrollo de la FPI, teniendo como órgano diana el endotelio de los capilares y su alteración que se traduce en edema pulmonar [7].



**Figura 4.** Factores de riesgo para el desarrollo de FPI en pulmón.

### *Isquemia-Reperusión*

El daño pulmonar ocasionado por la IR es una condición inflamatoria compleja que implica un estrés oxidativo rápido y subsecuente respuesta de las células del pulmón a nivel global, que en conjunto promueven el rompimiento de la barrera endotelial y epitelial, dando como resultado un edema potencialmente mortal y la deficiencia del intercambio gaseoso [17].

Durante la isquemia se ha observado que células endoteliales y células del sistema inmune como los macrófagos, liberan una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales participan como uno de los principales causantes del daño por IR. Sin embargo, durante este periodo también se puede inducir la sobrerregulación de factores pro-inflamatorios como citocinas, factores como NF- $\kappa$ B, fuentes de oxidantes como NADPH, así como el aumento de moléculas de adhesión de superficie celular en el endotelio pulmonar. Todos estos cambios contribuirán directa o indirectamente en los cambios fisiológicos de la microvasculatura, como lo es el incremento de la resistencia y permeabilidad vascular pulmonar y edema pulmonar, que pueden ser agravados durante el periodo de reperfusión <sup>[18]</sup>.

Aunque es claro que la isquemia está involucrada en el desarrollo de la falla primaria del injerto, se ha hecho evidente que la reperfusión es responsable de la mayoría de las lesiones después de un trasplante pulmonar, ya que la restauración del flujo sanguíneo se asocia a menudo con una exacerbación de la lesión tisular y una intensa respuesta inflamatoria, principalmente por la formación de ERO. Aunque es común hablar de la reperfusión como un periodo continuo, algunos investigadores han recurrido a dividirla en dos fases: reperfusión temprana y tardía. Sin embargo no existe un consenso acerca de esta división del periodo de reperfusión, ya que algunos investigadores han considerado un periodo de 30 min como reperfusión temprana <sup>[19]</sup>, mientras que otros la establecen en un periodo no mayor a 1 h <sup>[20]</sup>.

A pesar de que las ERO son consideradas las principales causantes del daño durante la IR, otros agentes como enzimas proteasas han comenzado a ser estudiadas como posibles blancos terapéuticos. Uno de estos son las metaloproteinasas de matriz (MMPs), las cuales tienen como función principal la degradación y remodelación de los componentes de la matriz extracelular (MEC). Uno de los blancos con potencial terapéutico pertenecientes a las MMPs son el grupo de las gelatinasas, en particular la gelatinasa B o también conocida como MMP-9. En años recientes la gelatinasa B ha sido estudiada

ampliamente por tener un papel clave en la inflamación de las vías aéreas, sin embargo, la investigación de su participación en la FPI no ha sido ampliamente estudiada en comparación con otras patologías tales como Asma, EPOC, fibrosis quística, cáncer, fibrosis pulmonar intersticial, entre otras [21]. Es por ello que la investigación centralizada en MMPs como la gelatinasa B, permitirá una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la FPI.

### **Metaloproteinasas de matriz**

Las metaloproteinasas de matriz, también conocidas como matrixinas, son una familia de enzimas endopeptidasas dependientes de  $Zn^{2+}$  que son sintetizadas como zimógenos. Colectivamente tienen la capacidad de degradar todos los componentes de la MEC, que incluyen: proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (colágeno y elastina), y proteínas de adhesión (fibronectina y laminina) [22]. Sin embargo, estudios de identificación de sustratos recientes revelan que las MMPs también tienen la capacidad para regular la liberación o activación de otros sustratos como quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento, péptidos antibióticos y otras moléculas bioactivas, que en conjunto con su capacidad para degradar componentes de la MEC, les permiten participar en procesos inflamatorios, de angiogénesis, migración celular, proliferación celular, diferenciación, apoptosis, entre otros [23],[24].

Las MMPs pertenecientes a vertebrados comprenden una familia compuesta por más de 20 diferentes proteínas divididas en 6 subgrupos o subfamilias que se diferencian tradicionalmente con base en su estructura de dominios y preferencia de sustratos: 1) colagenasas (MMP-1/-8/-13); 2) estromelinas (MMP-3/ -10); 3) gelatinasas (MMP-2/ -9); 4) matrilisinas (MMP-7/ -26); 5) Metaloproteinasas de matriz tipo-membrana (MT-MMPs); y 6) otras [24] (**Figura 5**).

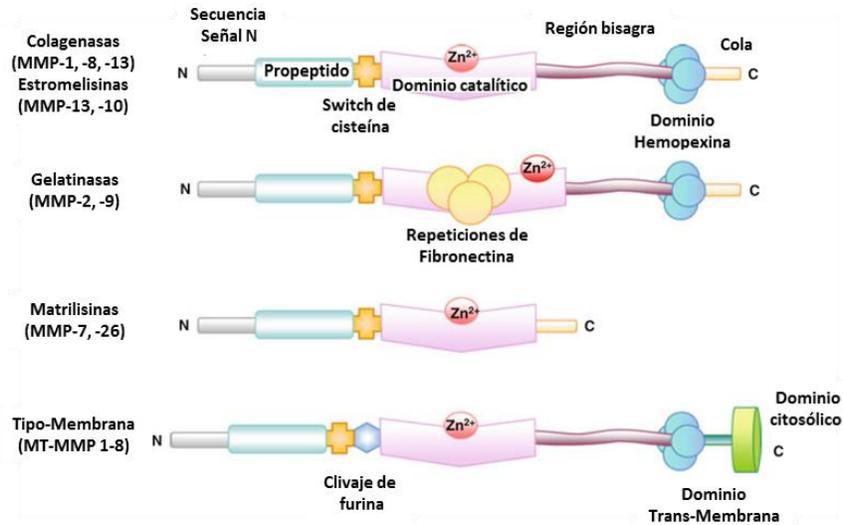


Figura 5. Estructura de subfamilias de MMP. Modificado de Benjamin y Khalil, 2012 [23].

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 **pro-dominio** 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 6**); 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**) [25].

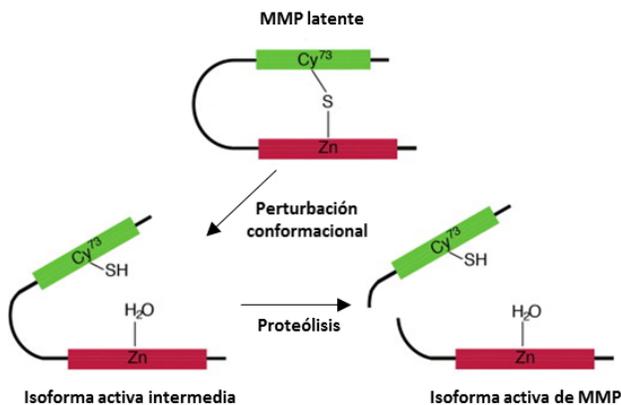
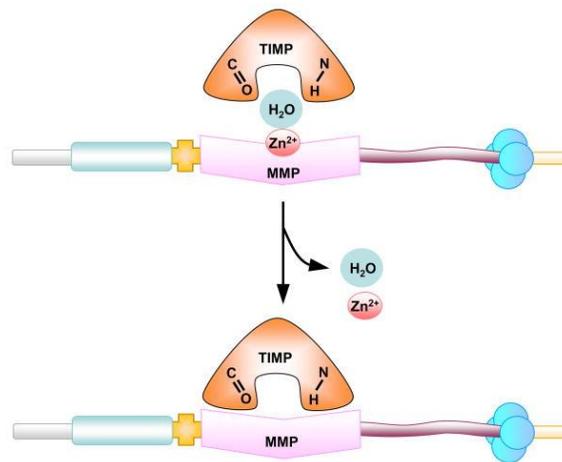


Figura 6. Mecanismo *switch de Cisteína*. Modificado de Jones, 2014 [26]

La actividad de las MMPs puede estar regulada de diversas maneras. Ya sea a través de la proteína  $\alpha$ -2 macroglobulina que inhibe a las MMPs presentes en plasma sanguíneo o mediante los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs). Los TIMPs son un grupo de inhibidores endógenos específicos de amplio espectro compuesto por 4 diferentes proteínas (TIMP 1-4) 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 7**) [23].



**Figura 7.** Inhibición endógena de MMPs por TIMPs [22].

La alteración en los niveles de expresión y actividad de MMPs puede contribuir al desarrollo de una amplia gama de patologías, asociadas a la destrucción de tejido (tales como metástasis, artritis, diferentes tipos de úlceras, enfermedades inflamatorias), fibrosis (tales como cirrosis en hígado, esclerosis múltiple, aterosclerosis), degradación de matriz (p.e. cardiomiopatías, aneurisma aortica), así como en diversas enfermedades óseas y articulares. Es por ello que diversos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos en desarrollar inhibidores sintéticos con la capacidad de regular la actividad de estas enzimas [27].

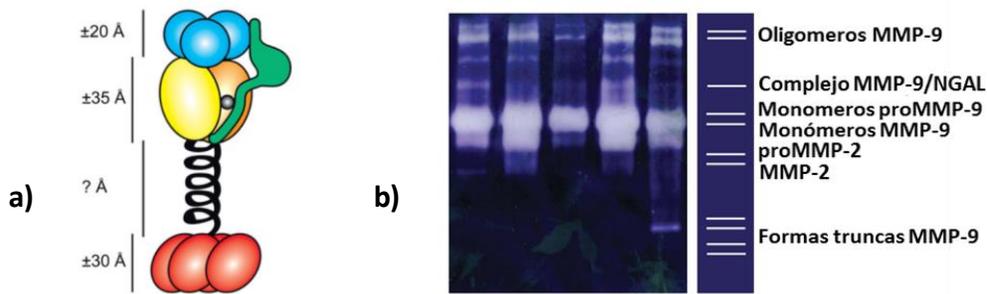
### **Gelatinasa B (MMP-9)**

La gelatinasa B o también conocida como MMP-9 pertenece junto con la gelatinasa A/MMP-2 a la subfamilia de las gelatinasas. Los estudios biológicos sobre MMP-9 se han orientado principalmente en comprender como estas proteínas se involucran en procesos de tipo vascular, inflamatorios y cancerígenos, particularmente a través de células inflamatorias como neutrófilos. MMP-9 es producida por células inmunes como neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos y células dendríticas, así como por otras células como osteoblastos, fibroblastos y células endoteliales [28].

#### *Estructura*

MMP-9 como la mayoría de las MMPs se sintetiza como zimógeno o pro-enzima (pro-MMP-9: 92KDa), que al eliminarse el prodominio pasa a su forma activa (MMP-9: 82 KDa) [29]. MMP-9 al igual que MMP-2 posee la estructura general de las MMPs ( **péptido señal--prodominio--dominio catalítico-- región bisagra--dominio tipo hemopexina**), además de contener tres repeticiones de fibronectina las cuales facilitan la degradación de sustratos de tipo gelatinoso. Únicamente MMP-9 posee un dominio O-glicosilado central, anteriormente llamado “dominio colágeno tipo-V”, el cual es un “ligador” flexible de 64 a.a. que se encuentra entre el dominio catalítico y el dominio hemopexina, el cual se sabe puede contribuir al tamaño y forma de la MMP-9, además de que la enzima posee múltiples sitios para su glicosilación a lo largo de toda su estructura, donde el dominio O-glicosilado es el que posee una mayor cantidad de sitios potenciales de glicosilación [21].

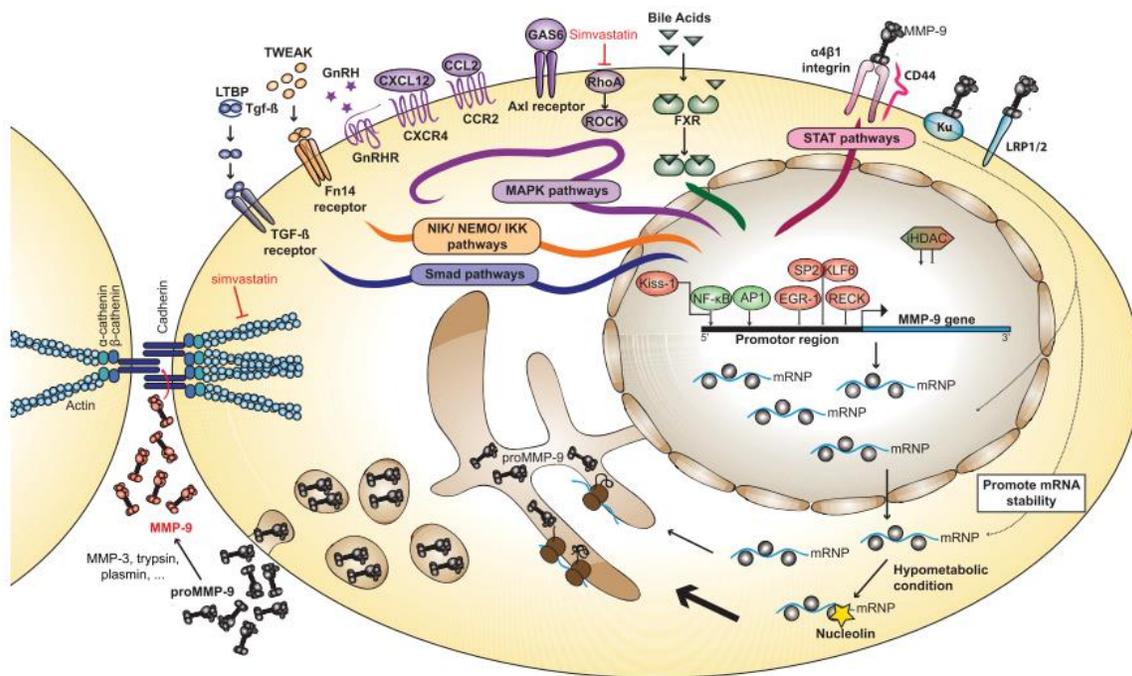
MMP-9 puede ser encontrada como monómeros u oligómeros, en complejos con otras moléculas y como formas truncas de bajo peso molecular (**Figura 8b**). Lo cual da origen a nuevos cuestionamientos enfocados en saber si estos tienen funcionalidades idénticas, si existe una afinidad diferencial por otros sustratos y si tienen la capacidad de desarrollar otras funciones regulatorias a nivel fisiológico o patológico [21].



**Figura 8.** Estructura de MMP-9; propéptido (verde), dominio catalítico (amarillo), tres repeticiones de fibronectina (azul), sitio de unión a metal (naranja) con el ion zinc catalítico (gris) (a) y gel de análisis zimográfico que ilustra las diversas formas de expresión de MMP-9; monómeros, oligomeros, complejos y formas trucas (b) modificado de Vandooren, et al., 2013 [21].

### Regulación

La Regulación de MMP-9 al igual que muchas otras MMPs se da en diferentes niveles (Figura 9).



**Figura 9.** Diversos niveles y vías de regulación de MMP-9 [21].

El primer nivel involucra la regulación bajo mecanismos de control mediante una variedad de vías de señalización que estimulan o reducen la **transcripción** del gen MMP-9 a través de la interacción directa con el promotor. Al igual que muchas MMPs, MMP-9 es

controlada transcripcionalmente por citocinas (p.ej. IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), factores de crecimiento (p.ej. TGF- $\beta$ ), hormonas y neurotransmisores (p. ej. Histamina, receptor-4 de serotonina, adrenalina) e interacciones celulares. Sin embargo, su principal vía de regulación involucra a ERK1/2 (extracellular signal-related kinases) perteneciente a la vía de señalización MAPKs (mitogen-activated protein kinases) [21].

El almacenamiento en vesículas secretoras de neutrófilos, hace de la **secreción** y la **activación** de pro-MMP-9 un segundo nivel de regulación. MMP-9 producida por neutrófilos es almacenada en gránulos de zimógenos, con la capacidad de ser secretados en cuestión de minutos ante un estímulo inflamatorio, a comparación de otras células inflamatorias como macrófagos, los cuales dependen de la síntesis de *novo* antes de la secreción de MMP-9, en un proceso que toma varias horas. Es por ello que la capacidad de los neutrófilos para secretar MMP-9 es prioritaria para comprender el papel que tanto estas células como la MMP-9 tienen en procesos inflamatorios. Es importante reconocer que en neutrófilos MMP-9 forma un complejo con lipocalina asociada a gelatinasa-B de neutrófilo (NGAL). Una vez que pro-MMP-9 ha sido secretada, esta debe ser activada a través del mecanismo *switch de cisteína*, el cual explica la latencia de pro-MMP-9 e indica que cualquier medio que pueda extraer la cisteína (99) del ion Zn<sup>2+</sup> dará como resultado la accesibilidad del sitio Zn<sup>2+</sup> a una molécula de agua hidrolítica y el sitio para el sustrato, lo que se traduce en la activación de la enzima y con ello su actividad catalítica [21].

La activación de pro-MMP9 se puede dar a través de dos mecanismos principales: proteolíticos o no proteolíticos. Factores asociados a la activación proteolítica involucran una red de interacciones enzimáticas en las que se puede mencionar a MMP-3 (considerado el principal activador de pro-MMP-9), MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-10, MMP-13, MMP-26, tripsina, elastasa de neutrófilos, entre otros como la activación mediada por el complejo formado entre MT-MMPs, TIMP-2 y MMP-2 o MMP-13 [30]. Por otra parte, activación de tipo no proteolítica puede ser adquirida a través de la unión de pro-MMP-9 a gelatina, colágeno tipo-IV, elastina entre otros, mediante la unión con los

dominios de fibronectina tipo II que promueven el cambio conformacional de la proteína, liberando el sitio activo del dominio catalítico [21].

Finalmente, la actividad enzimática de la MMP-9 activa debe ser controlada través de la **inhibición** para mantener el balance fisiológico, ya sea en la circulación sanguínea o en el tejido. Las proteínas encargadas de cumplir esta función pueden ser  $\alpha$ 2-macroglobulina, presente en la circulación sanguínea, así como los inhibidores tisulares de MMPs (TIMP1-4), presentes en tejido. A pesar de que todos los TIMPs tienen la capacidad de inhibir a la MMP-9, se ha determinado que MMP-9 forma complejos preferencialmente con TIMP-1 (y TIMP-3) al interactuar con el dominio hemopexina C-terminal de MMP-9. Al ser un blanco terapéutico potencial, la investigación enfocada en la inhibición de MMP-9 ha promovido el desarrollo de fármacos capaces de inhibir su actividad catalítica. Un ejemplo es ONO-4817, un inhibidor sintético de MMPs de tercera generación, precedido por inhibidores de primera generación como batimastat con una amplia actividad inhibitoria contra casi todas las MMPs pero no apropiado para administración oral. La segunda generación de inhibidores de MMPs tales como marimastat y prinomastat, también con un amplio espectro de inhibición de MMPs, disponibles para administración vía oral [31]. ONO-4817 fue desarrollado como un compuesto sintético no peptídico ácido-base hydroxámico, en comparación con otros inhibidores de tercera generación como BAY12-9566, tiene un espectro inhibitorio selectivo, uniéndose de manera reversible a la región del sitio de unión a  $Zn^{2+}$  de MMPs como MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-12 y MMP-13 pero no a MMP-1 o MMP-7 [32]. En comparación a BAY12-9566, ONO-4817 es más eficiente en la inhibición de MMP-2 y MMP-9 [31].

### *Sustratos*

MMP-9 al igual que todas las MMPs interactúan con una gran cantidad de sustratos de la MEC, aunado a ello las recientes investigaciones señalan que también otros sustratos independientes a la MEC se involucran con MMP-9. Por términos de practicidad solo se mencionan algunos sustratos de la MEC e independientes a esta (**Tabla 2**). Las

repeticiones de fibronectina tipo II, resultan ser muy importantes para la unión y catálisis de sustratos de gran tamaño como elastinas y colágeno desnaturalizado (gelatina).

Sustratos de MMP-9/Gelatinasa B			
MEC	OTROS		
Colágeno III, IV, V	proTNF- $\alpha$	CXCL1/GRO- $\alpha$	Inhibidor de proteínasa $\alpha$ 1 Plasminogeno KISS-1 IFN- $\beta$
Gelatina	IL-2R $\alpha$	CXCL8/IL-8	
Elastina	ICAM-1	CXCL9/MIG	
Fibronectina	EGFR-1	CXCL11/ITAC	
Entactina	Ligando Kit	CXCL12/SDF-1	

**Tabla 2.** Algunos sustratos asociados a MMP-9 [29].

#### *Gelatinasa B y permeabilidad vascular*

La capacidad que tienen las MMPs sobre la degradación de componentes de la MEC, se ve asociada a diversos procesos, uno de ellos incluye la remodelación del tejido vascular a través de la regulación de la integridad de la membrana basal (MB) y asociación de las células endoteliales.

La actividad proteolítica de MMPs como MMP-9 y el desequilibrio con su principal inhibidor TIMP-1, ha mostrado tener un papel importante en el incremento de la permeabilidad vascular, debido a su potencial para contribuir a la migración celular a través de la MEC, MB y capa endotelial. Al poseer la capacidad de degradar colágeno desnaturalizado (gelatina), colágeno tipo IV, elastina, fibronectina y laminina, se asocia con la alteración de la MB de las células endoteliales, la cual se relaciona con el reclutamiento de linfocitos y leucocitos, pero también en el riesgo de aumentar la permeabilidad vascular [28] [33] [34].

Una de las patologías a las que se asocia el aumento de la permeabilidad capilar por la desregulación del equilibrio entre MMP-9 y TIMP-1, con cierta similitud etiológica con la FPI, es el Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (ARDS por sus siglas en inglés), el cual

es una forma de daño pulmonar agudo, caracterizado por alta permeabilidad microvascular, edema pulmonar de baja presión, hipoxemia y falla respiratoria. Debido al daño ocasionado principalmente a la MB, se asocia con una severa disrupción de las estructuras alveolo-capilares y una variedad de cambios en las poblaciones celulares pulmonares <sup>[34]</sup>.

Una gran cantidad de células como eosinófilos, monocitos, linfocitos, células endoteliales, entre otras, producen MMP-9 durante procesos inflamatorios, sin embargo, los neutrófilos pueden producir y almacenar MMP-9 en gránulos, lista para ser liberada rápidamente (menos de 1 h) después de la estimulación para la degranulación, aunado a ello estos mismos son los únicos capaces de liberar MMP-9 libre de su inhibidor endógeno TIMP-1 y por lo tanto liberar MMP-9 altamente activa en asociación con NGAL<sup>[35]</sup>.

La capacidad de MMP-9 para promover el aumento de la permeabilidad vascular durante procesos de migración celular, permite relacionarla con el desarrollo de edema pulmonar durante la FPI, es por ello que la identificación de blancos terapéuticos potenciales como MMP-9 permitirá idear nuevas estrategias durante el periodo de preservación pulmonar y con ello mantener la funcionalidad del tejido pulmonar antes y después del trasplante, con ello disminuyendo los índices de morbilidad y mortalidad de los pacientes.

## **Justificación**

---

Uno de los factores más importantes para el éxito del trasplante pulmonar es el uso de soluciones de perfusión durante el periodo de preservación, ya que tienen como objetivo conservar el pulmón estructural, funcional, y bioquímicamente intacto manteniendo la integridad pulmonar el mayor tiempo posible, para que una vez trasplantado su función sea óptima y con ello reducir el desarrollo de afecciones post-operatorias como la FPI, la cual representa del 10 al 30% de la morbilidad y mortalidad en las primeras 72 h. Diversos grupos centran sus investigaciones en determinar factores de riesgo y aspectos fisiopatológicos de la FPI, con el objetivo de identificar blancos terapéuticos que puedan ser regulados durante la preservación pulmonar. Uno de estos es la gelatinasa B (MMP-9) ya que su capacidad para promover la alteración de la integridad endotelial durante procesos de migración celular a través de la degradación de componentes de la MB, permite asociarla con los mecanismos que promueven el desarrollo de edema pulmonar en la FPI. Esto permitirá incluir nuevas alternativas durante la preservación pulmonar que permitan mejorar la calidad de los injertos.

## **Hipótesis**

---

La gelatinasa B (MMP-9) puede tener un papel importante en los cambios de permeabilidad vascular por alteración de su actividad durante el periodo de preservación pulmonar, contribuyendo al desarrollo de la FPI.

## Objetivo

---

Evaluar la participación de la enzima MMP-9 en los cambios de permeabilidad vascular durante la preservación pulmonar en tres grupos diferentes:

- Pulmones intactos (control)
- Pulmones preservados 24 h
- Pulmones preservados 24 h adicionados con ONO-4817

### Objetivos particulares

- Evaluar el coeficiente de filtración capilar
- Evaluar la actividad de MMP-9 en su forma activa y latente
- Evaluar si se afecta la expresión de TIMP-1

## Material y Métodos

---

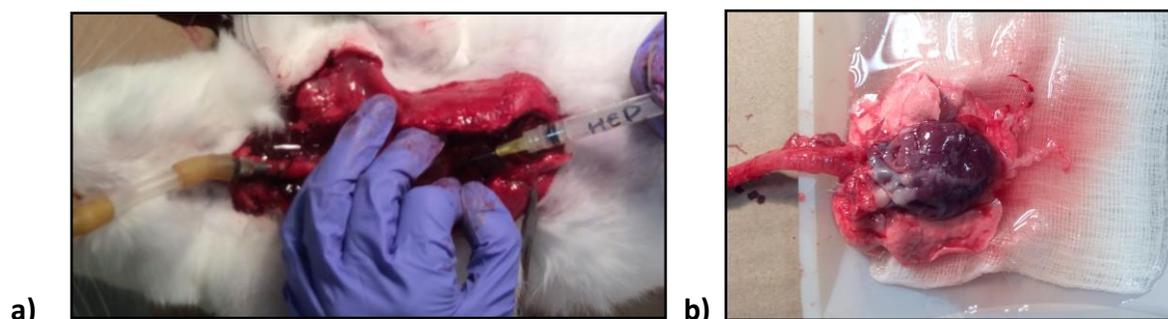
### Animales de estudio

Se utilizaron 18 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) macho de la raza Nueva Zelanda, adquiridos en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y mantenidos en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) con una dieta *ad libitum*, en un ambiente controlado con temperatura de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , 50-70% de humedad y ciclos de oscuridad 12/12 h. Mantenimiento y procedimientos experimentales se llevaron de acuerdo a la Guía para el cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias (NAS por sus siglas en inglés) (1999) y fueron aprobados por el comité de Bioética del INER.

### Extracción del bloque cardiopulmonar

Los animales fueron sedados mediante inyección de clorhidrato de Xilazina (3mg/Kg i.m, Procin<sup>®</sup> / Pisa Agropecuaria) y anestesiados con pentobarbital sódico (28mg/Kg i.v, Anestosal<sup>®</sup>, Pfizer). El pulmón fue ventilado mecánicamente a través de la disección y canulación de la tráquea (volumen corriente de 10mL/Kg, frecuencia respiratoria de 55/min) mediante un ventilador para pequeñas especies (Starling, Harvard Apparatus, Holliston, MA). Se realizó la exposición del bloque cardiopulmonar mediante una esternotomía y posteriormente se inyectó heparina (1000 UI) (Rimbipar<sup>®</sup> /Rimsa) en el

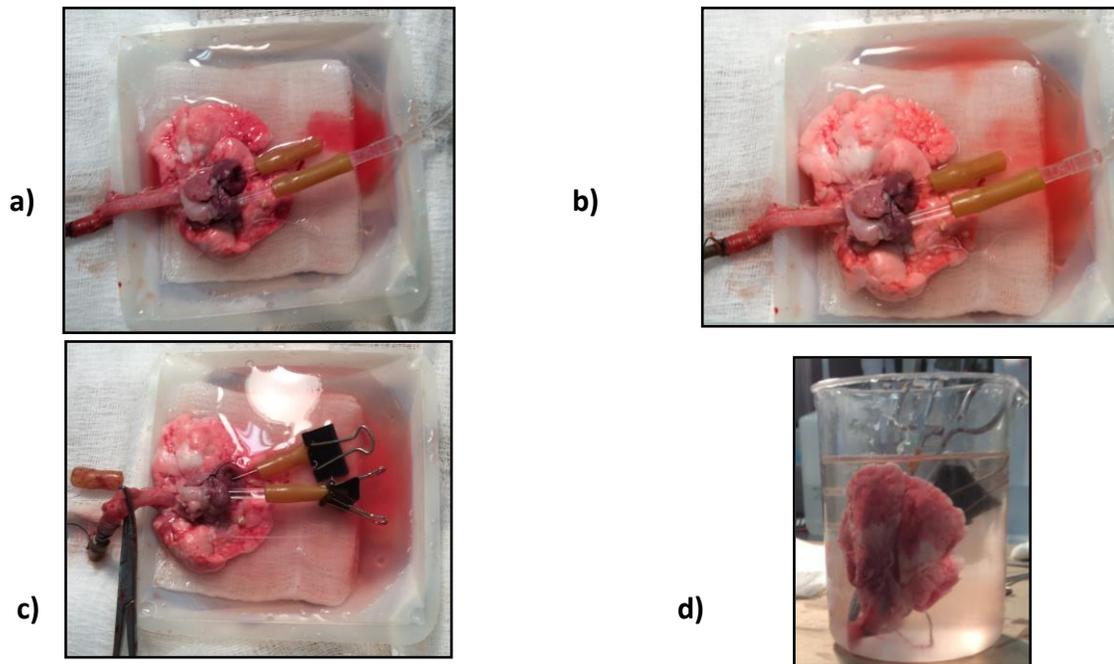
ventrículo derecho para evitar la coagulación de la sangre. Finalmente se extrajo el bloque cardiopulmonar procurando no dañar el tejido y se realizó un corte transversal en el corazón a la altura de los ventrículos.



**Figura 10.** Extracción del bloque cardiopulmonar. Inyección de heparina (a) y bloque extraído (b)

### **Lavado y preservación pulmonar**

Los bloques cardiopulmonares extraídos fueron divididos en 3 grupos: “Intactos: sin preservar” (control), “Preservados 24 h” y “Preservados 24 h + ONO-4817”. El grupo “Preservados 24 h + ONO-4817” (Tocris Bioscience, Bristo, Reino Unido) tuvo una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M del inhibidor, la cual ha mostrado ser suficiente para la inhibición de MMP-9 [32]. El corte transversal en el corazón se realizó para colocar dos cánulas de cristal de 5cm de longitud por 3mm de diámetro interno, la primera se colocó en la arteria pulmonar y la segunda en la aurícula izquierda para la eliminación de la sangre intravascular pulmonar mediante infusión anterógrada con 100ml de solución salina fisiológica (SSF) (NaCl al 0.9%) y una presión constante de 20cm H<sub>2</sub>O. Al finalizar el lavado, se mantuvo la solución intravascularmente pinzando las cánulas, el pulmón fue hiperinsuflado 3 veces el volumen corriente para evitar zonas atelectásicas. El bloque cardiopulmonar fue preservado en solución salina isotónica (NaCl al 0.9%) a una temperatura de 4°C durante 24 h, con excepción de los bloques cardiopulmonares del grupo control, en los cuales se midió inmediatamente el coeficiente de filtración capilar (mKFC: mL\*min<sup>-1</sup>\*cmH<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>\*g<sup>-1</sup>)



**Figura 11.** Lavado y preservación pulmonar. Infusión anterógrada para la eliminación de sangre intravascular (a), pulmón después del lavado (b), pinzamiento de las cánulas para mantener la solución intravascularmente (c), pulmón en solución salina para ser preservado (d).

### **Pulmón aislado y perfundido.**

El bloque cardiopulmonar fue conectado a un circuito de perfusión recirculatorio, compuesto por una bomba peristáltica de circulación (NY-7550-62 Materflex, Barrington, IL) con indicador de flujo de perfusión y termómetro. 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® y ventilado con aire ambiental humedecido con un volumen corriente de 10mL/Kg, frecuencia respiratoria de 55/min, PEEP de 2 cmH<sub>2</sub>O. Para evitar la formación de zonas atelectásicas, los pulmones se hiperinsuflaron periódicamente

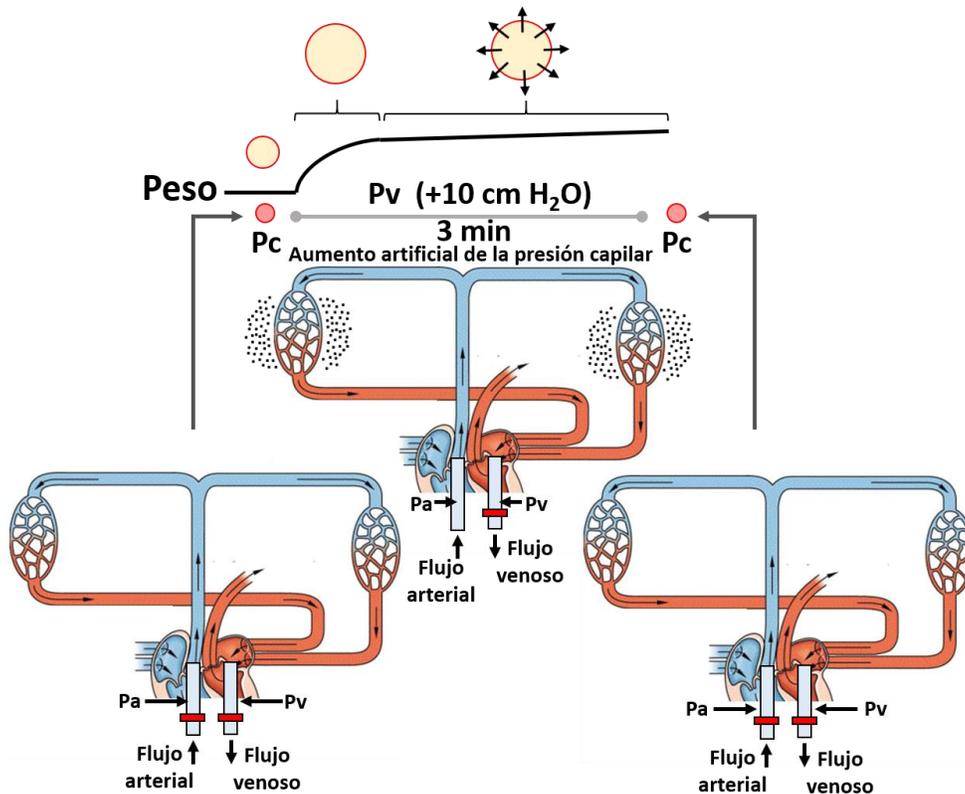
El pulmón fue lavado haciendo pasar líquido de perfusión a través del lecho vascular, para posteriormente perfundirlos con solución artificial Krebs-Ringer-bicarbonato (g): NaCl 6.90, KCl 0.354, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.373, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.162, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0.293, NaHCO<sub>3</sub> 2.1, Glucosa 0.98 y 2.5% de albúmina bovina (g/L). Se mantuvo un flujo constante de 10 mL/min, temperatura de 37°C y pH de 7.3 a 7.4 mantenido por adición de HCL (1M).

### **Medición del coeficiente de filtración capilar (mKfc)**

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 15 min, 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 a su vez mayor que la presión al final de la espiración ( $P_a > P_v > P_e$ ).

El periodo de registro del mKfc fue de aproximadamente 1 h, el cual fue considerado como el periodo de reperfusión. Durante el registro del mKfc, los pulmones se desconectaron temporalmente (aproximadamente 4 min) para evitar la influencia de la ventilación mecánica. La permeabilidad capilar se midió a través del método de la doble oclusión, en el cual se realiza un pinzamiento simultáneo de las cánulas arterial y venosa, lo que produce inmediatamente el incremento de la Pv y un decremento de la Pa, con una estabilización no mayor a 2 o 3 seg. En estas condiciones la Pv se consideró como un indicador de la presión capilar (Pc). Aproximadamente 10 seg después se quitó la doble oclusión y se restableció el flujo. Posteriormente se incrementó la Pv en 10 cmH<sub>2</sub>O mediante la oclusión parcial del flujo de salida venosa y se mantuvo así durante 3 min, ocasionando el rápido aumento del peso pulmonar por efecto de la congestión capilar, durante 30 a 60 seg, 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 seg después de haber iniciado la oclusión parcial del lado venoso. La fase lenta durante la ganancia de peso se utilizó para calcular el mKfc. Al final de los 3 min, y aún con la elevación de la Pv de 10 cmH<sub>2</sub>O, se efectuó otra doble oclusión para obtener la Pc. El mKfc se expresó como  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cmH}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ , lo que representó 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  $P_c$  y por gramo de tejido pulmonar.



**Figura 12.** Representación del método de doble oclusión para el registro del mKfc. Presión arterial ( $P_a$ ), Presión venosa ( $P_v$ ), Presión capilar ( $P_c$ ), oclusión (barra horizontal roja).

### Cuantificación de proteína total

Para la preparación de las muestras y la extracción de proteínas se tomaron 250mg de tejido pulmonar (lóbulos inferiores), adicionados con 600  $\mu\text{l}$  de PBS 1X pH 7.3, los cuales fueron homogeneizados mediante el equipo Omni TH (OMNI international, Georgia, EUA) y centrifugados de 12000 a 14000 rpm durante 10 min 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 bicinónico, usando el kit de ensayo de proteína micro-BCA™ (Thermo Scientific™, Illinois, USA), por último todas las muestras se llevaron a una concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis

### **Zimografía en geles de gelatina**

Una vez que las muestras fueron ajustadas a la misma concentración, la actividad de las gelatinasas fue analizada mediante geles para zimografía de gelatina al 8%, adicionado con 10 mg/ml de gelatina. Cada carril se cargó con 10µl muestra [2.5µg/µl] o control positivo (línea celular U937), para posteriormente realizar la electroforesis en una cámara vertical con una corriente de 120-130V durante ~1.5 h. Al terminar la electroforesis los geles fueron lavados tres veces durante 15min con Tritón X-100 (Research Organics, Ohio, EUA) al 2.5% y tres lavados más con agua destilada durante 15 min. Los geles fueron incubados a 37°C durante ~20 h con una solución de glicina 0.1M, CaCl<sub>2</sub> 5mM pH 8.0, adicionada con ZnCl<sub>2</sub> 5mM y posteriormente teñidos 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 actividad proteolítica 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 expresión de TIMP-1**

Para la cuantificación de la expresión de TIMP-1 en tejido pulmonar se realizó un ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA) de tipo competitivo (No. catalogo: CSB-E06935Rb, CUSABIO, Hubei, China). El ensayo se realizó por duplicado para todas las muestras de los diferentes grupos, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tejido pulmonar (100mg) fue homogeneizado con 1 ml de solución PBS 1X mediante el equipo Omni TH (OMNI international, Georgia, EUA), una vez homogeneizadas las muestras, fueron centrifugadas por 5 minutos a 5000 x g a una temperatura de 4°C. El supernadante fue removido y almacenado a -80°C hasta su uso.

Para la cuantificación de TIMP-1, se colocó en cada pozo de la placa 50 µl de cada estándar (curva estándar) o de cada muestra, inmediatamente se adicionaron 50 µl del conjugado HRP-anticuerpo (específico para TIMP-1) (1X) a cada pozo y se incubó por 1 h a

37°C. Posterior al periodo de incubación, todos los pozos fueron lavados cuatro veces durante 2 minutos con buffer de lavado (200 µl) usando una pipeta multi-canal. Posteriormente se adicionaron 90 µl de sustrato TMB a cada pozo y se dejó incubar durante 20 min a 37°C. Al terminar el periodo de incubación se adicionaron 50 µl de solución de paro a cada pozo e inmediatamente se determinó la densidad óptica a 450 nm. 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**

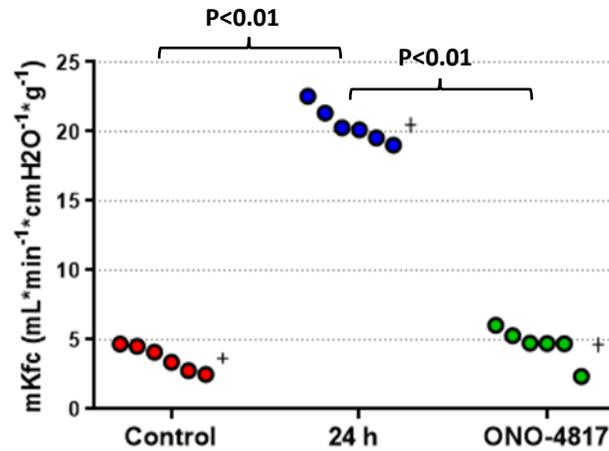
Para el análisis estadístico se utilizó el software INERSTAT-a v1.7 b, mediante el cual se determinó la diferencia entre los grupos por análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey para evaluar la diferencia entre dos grupos. Los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  error estándar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

## **Resultados**

---

### **Cambios en el coeficiente de filtración capilar**

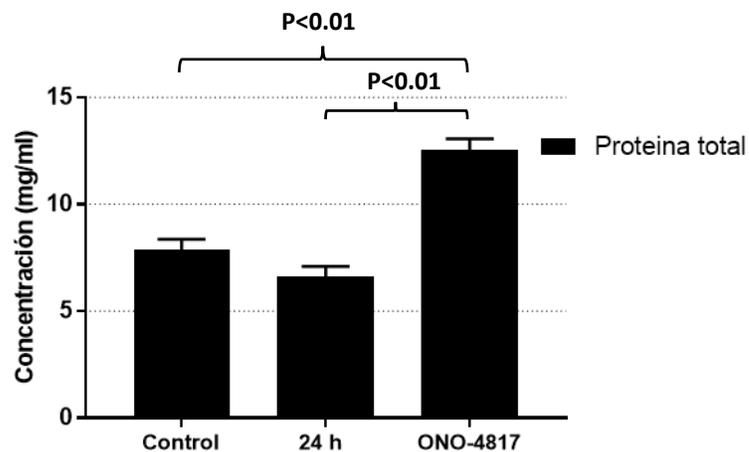
La medición del mKfc en los diferentes grupos indicó que el periodo de preservación de 24 h (mKfc = **20.4**  $\pm$  0.52) induce un aumento en el valor del mKfc en comparación con el grupo control (mKfc = **3.6**  $\pm$  0.37), mientras que el mKfc promedio del tratamiento con ONO-4817 durante la preservación pulmonar (mKfc = **4.65**  $\pm$  0.5) presentó una disminución en relación al grupo de 24 h y valores similares con el grupo control. Esto indica que el inhibidor ONO-4817 usado durante la preservación pulmonar está ocasionando una disminución del mKfc 4.3 veces en comparación con los pulmones preservados 24 h, incluso obteniendo valores similares al tratamiento control. Esto fue corroborado por la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) que existe solamente para el grupo de pulmones preservados 24 h con respecto a los otros dos grupos.



**Figura 13.** Efecto en el mKfc por tratamiento con ONO-4817 en pulmones preservados 24 h. mKfc ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cmH}_2\text{O}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ), el error estándar y promedio está representado por las barras ubicadas al lado derecho de cada serie de datos. Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.01$  mediante prueba de Tukey (posterior a ANOVA de una vía) entre dos grupos, se muestra entre corchetes.

### Concentración total de proteína

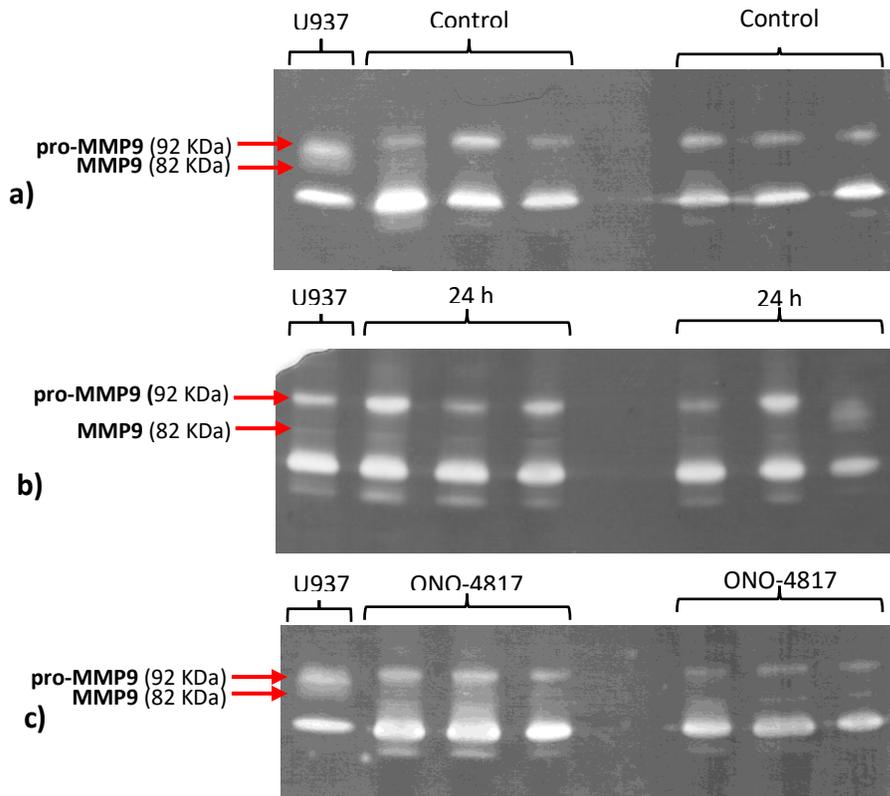
La cuantificación total de proteína permitió observar que el uso de ONO-4817 induce un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.01$ ) de la concentración de proteína (**12.55**  $\text{mg/ml} \pm 0.51$ ) con respecto al grupo control (**7.88**  $\text{mg/ml} \pm 0.49$ ) y los pulmones preservados 24 h (**6.6**  $\text{mg/ml} \pm 0.49$ ) (**Figura 14**)



**Figura 14.** Concentración total de proteína.

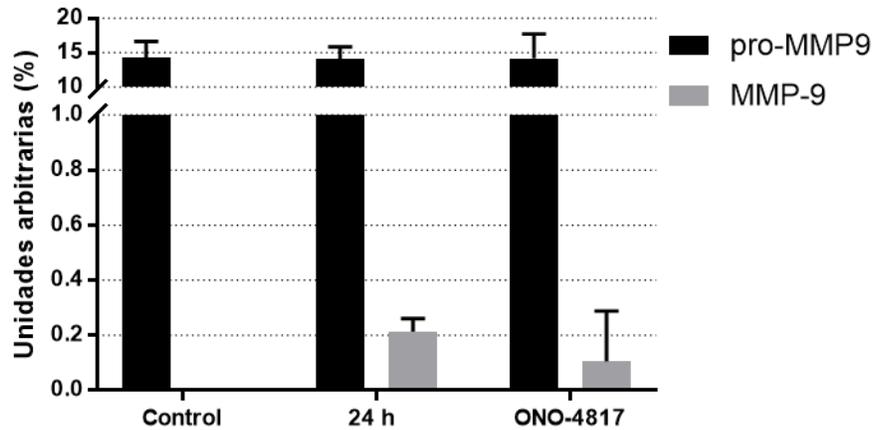
### Actividad de MMP-9

Para evaluar si el uso de ONO-4817 tiene efecto sobre la actividad de MMP-9 en nuestro modelo, se realizó la comparación de actividad de la proteína en su forma latente (pro-MMP-9) y en su forma activa (MMP-9) en los diferentes grupos (**Figura 15**).



**Figura 15.** Actividad de MMP-9 mediante zimografía en geles de gelatina. Grupo: a) Control, b) 24 h y c) ONO-4817 + 24 h. Línea celular U937

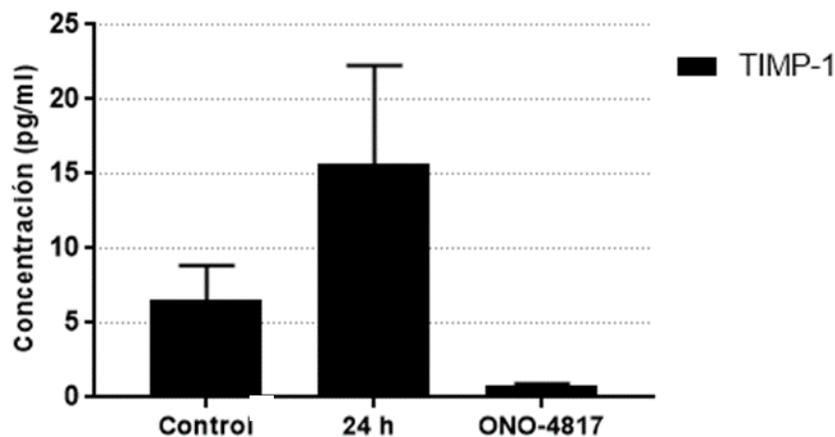
Se observó que los niveles de actividad de pro-MMP-9 fueron similares tanto para el grupo control (**14.02 %u.a.  $\pm$  0.61**), los pulmones preservados 24 h (**12.9 %u.a.  $\pm$  0.45**) y ONO-4817 (**13.26 %u.a.  $\pm$  0.55**). La actividad de MMP-9 fue mínima en comparación con la de pro-MMP9, ya que el grupo control no mostró actividad de MMP-9, mientras que los pulmones preservados 24 h mostraron actividad de tan solo **0.21 %u.a.  $\pm$  0.04** y los pulmones adicionados con el inhibidor ONO-4817 tuvieron una actividad de **0.1 %u.a.  $\pm$  0.18**. Se observó que ninguno de los grupos de pro-MMP9 y MMP-9 presentaba diferencia estadística (**Figura 16**)



**Figura 16.** Niveles de actividad de pro-MMP-9 y MMP-9 en grupo control (sin preservación), 24 h (preservación durante 24 h) y ONO-4817 (preservación durante 24 h + adición del inhibidor de MMPs ONO-4817)

### Expresión de Inhibidores tisulares de MMPs.

Para determinar si el uso del inhibidor ONO-4817 modifica la expresión de TIMP-1, se realizó la prueba de ELISA en muestras de tejido pulmonar (**Figura 17**).



**Figura 17.** Expresión de TIMP-1.

Esta prueba permitió observar que la mayor expresión de TIMP-1 se da en los pulmones preservados 24 h sin algún tipo de tratamiento (TIMP-1= **15.64 pg/ml**  $\pm$  6.6), en comparación con el grupo control el cual obtuvo un promedio de expresión de TIMP-1 de **6.55 pg/ml**  $\pm$  2.29, indicando que la preservación pulmonar durante 24 h promueve 2.3 veces más la expresión de TIMP-1. Por el contrario, el uso del inhibidor ONO-4817 durante la preservación pulmonar mostró tener un efecto sobre la expresión de TIMP-1 (**TIMP-1=**

0.82 pg/ml  $\pm$  0.1), indicando que el uso de este inhibidor de MMPs con alta afinidad por MMP-9, se ve involucrado en la disminución de los niveles promedio de TIMP-1 presente en tejido pulmonar. A pesar de que se observó un cambio de expresión de TIMP-1 en los diferentes grupos, el análisis estadístico indicó que no existe significancia estadística para demostrar que los grupos son diferentes.

### Resumen de resultados

Medición \ Grupo		24 h	ONO-4817
mKFC		↑↑↑	=
MMP-9	Latente	=	=
	Activa	↑	↑↓
Proteína total		=	↑↑↑
TIMP-1		↑	↓

**Tabla 3.** Resumen de resultados. Comparación con respecto al grupo control de las mediciones: coeficiente de filtración capilar (mKFC); actividad de la enzima MMP-9 en su forma latente y activa; niveles de proteína total; y niveles de TIMP-1. ↑↑: Incremento significativo; ↑,↓: Tendencia al aumento o disminución respectivamente, comparación con relación a grupo 24 h (rojo); = : sin cambios.

### Discusión

El periodo de preservación del trasplante pulmonar representa un paso determinante para mantener la viabilidad funcional del tejido y con ello evitar el desarrollo de afecciones post-operatorias como la FPI, caracterizada por la presencia de edema pulmonar debido al aumento de la permeabilidad vascular durante el periodo de IR, reconocido como su principal factor causal [12] [13]. El propósito de esta investigación, fue determinar si la metaloproteinasa de matriz 9 participa durante el periodo de preservación en los cambios de permeabilidad vascular asociados al desarrollo de la FPI, debido a que su potencial para degradar componentes de la membrana basal, ha hecho que se le asocie con el desarrollo de patologías de tipo vascular e inflamatorio, considerándola un blanco terapéutico potencial [28].

A pesar de que investigaciones demuestran la participación de MMP-9 en el daño por IR [36][37][38], no se ha determinado con certeza si esto ocurre propiamente durante la

preservación, es por ello que nuestra investigación se centra en determinar la participación de MMP-9 durante este periodo. Los resultados obtenidos mostraron que durante la preservación pulmonar ocurre un ligero aumento de MMP-9 en su forma activa, el cual es atenuado levemente por el uso de ONO-4817 que también se observó, disminuye la permeabilidad vascular. Esto indica que a pesar de que los niveles de MMP-9 son bajos, es posible que estos estén contribuyendo en el aumento de la permeabilidad vascular durante la preservación pulmonar. Algunas investigaciones han determinado que el daño pulmonar por isquemia durante la preservación y posterior reperfusión, promueve el incremento de los niveles de actividad de MMP-9 a medida que aumenta el periodo de preservación y reperfusión del tejido y que el uso de un inhibidor no selectivo de MMPs durante el periodo de IR, atenúa el daño a la membrana alveolo-capilar disminuyendo la permeabilidad vascular <sup>[36]</sup>, mientras que el uso de un inhibidor selectivo de MMPs con alta afinidad por MMP-9 durante la reperfusión, también atenúa el daño por IR, induciendo una mejora de la capacidad de oxigenación pulmonar <sup>[37]</sup>, aunado a ello Yano y col. (2001) <sup>[19]</sup> observaron que MMP-9 participa de forma activa en el daño por IR, pero su participación se hace más evidente posterior a 1 h de la reperfusión.

No podemos descartar la participación de otras MMPs, ya que ONO-4817 también tiene una alta afinidad por MMPs como MMP-2, MMP-8 (colagenasa de neutrófilos), MMP-12 (metaloelastasa de los macrófagos) y MMP-13 (colagenasa-3) <sup>[22]</sup> <sup>[37]</sup>, lo cual permite formular nuevas hipótesis acerca de la relevancia de estas en el aumento de la permeabilidad vascular durante el periodo de preservación. En el caso de MMP-2, se ha evidenciado que no participa de forma activa en el daño causado durante la IR <sup>[19]</sup> <sup>[38]</sup>. Por otra parte MMP-8 es capaz de degradar gelatina, mientras que MMP-13 también degrada gelatina, además de colágeno tipo IV y PAI-2 (inhibidor de la activación de MMP-9 mediante plasmina) <sup>[21]</sup>, o MMP-12 la cual tiene la capacidad de degradar colágeno tipo IV, gelatina y fibronectina <sup>[39]</sup>. Es por ello 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.

A pesar de que la actividad de MMP-9 fue mínima y los niveles de TIMP-1 no tuvieron diferencia estadística entre los grupos, se pudo observar que cuando se usa el inhibidor ONO-4817, ocurre una disminución en los niveles de TIMP-1, en comparación a los altos niveles observados en pulmones preservados 24 h. Esto indica que TIMP-1 toma un papel importante durante la IR. Yano y col. (2001) <sup>[19]</sup> reportan que la máxima expresión de mRNA de TIMP-1 se promueve durante el periodo de reperfusión, lo cual posiblemente se relaciona con la función de inhibir a la enzima MMP-9 activa durante este periodo.

El periodo de isquemia durante la preservación pulmonar es algo inevitable, esta pérdida del flujo sanguíneo se ha asociado con procesos de mecano-transducción del endotelio, que representan la respuesta celular a alteraciones físicas y químicas en el ambiente local. Se ha observado que estas alteraciones principalmente ocasionadas por la despolarización de la membrana celular endotelial pueden inducir la generación de ERO y daño oxidativo pulmonar, ambos involucrados en la activación de vías de señalización como MAPK; ERK 1-2 y factores de transcripción como NFκB y AP-1 <sup>[40]</sup>, los cuales en conjunto son sumamente importantes en la expresión a nivel transcripcional de MMPs incluyendo MMP-9, esto indica que posiblemente estas vías de señalización y factores de transcripción estén regulando positivamente la expresión de MMPs durante el periodo de preservación, contribuyendo al daño de la membrana alveolo-capilar en la FPI <sup>[41]</sup>. El aumento de calcio intracelular durante el evento de despolarización también ha sido considerado para regular de forma positiva la vía de señalización ERK de las MAPK, por lo cual posiblemente también puede participar de forma activa en la regulación positiva de MMPs <sup>[40]</sup>.

Para determinar la participación de MMP-9 en la falla primaria del injerto será necesario continuar con la investigación de esta enzima integrando otras técnicas que permitan realizar una evaluación más puntual de su participación, así como su relación con tipos celulares importantes involucrados en el aumento de la permeabilidad vascular como lo son las células del sistema inmune.

## Conclusiones

---

- El periodo de preservación pulmonar induce el aumento de la permeabilidad vascular en comparación con el grupo control, el cual puede ser atenuado cuando se usa el inhibidor ONO-4817 durante la preservación pulmonar, incluso llegando a niveles similares al del grupo control.
- La preservación pulmonar promueve una tendencia al aumento en los niveles de MMP-9 activa en comparación al grupo control, lo cual indica que MMP-9 podría participar en el aumento de la permeabilidad vascular, mientras que el uso del inhibidor ONO-4817 durante la preservación tiende a disminuir los niveles de MMP-9 activa.
- Los niveles de pro-MMP-9 son al menos 70 veces más altos en todos los grupos en comparación con los niveles de MMP-9 activa, además de no haber diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.
- El uso de ONO-4817 durante la preservación pulmonar promueve el aumento en los niveles de proteína total, en comparación con el grupo control y el grupo de pulmones preservados 24 h.
- El periodo de preservación induce el aumento en los niveles de TIMP-1, los cuales disminuyen cuando se utiliza el inhibidor ONO-4817 durante la preservación.

## Referencias

---

1. Lyn J., (2010), **History of Organ Transplantation**, Des Moines University, OMS, 12p.p.
2. Santillán P., Jasso R., Olmos R., Sotres A., Argote LM., Escalante T., Villalba J., (2005), **Trasplante de pulmón**, Revista de Investigación Clínica, 57(2):350-357.
3. Munshi L., Keshavjee S., Cypel M., (2013), **Donor management and lung preservation for lung transplantation**, Lancet Respir Med, 1(4): 318-328.
4. Parada MT., Sepúlveda C., (2015), **Trasplante pulmonar: Estado Actual**, Revista Médica Clínica Las Condes, 26(3): 367-375.
5. Weill, D., Benden, C., Corris, P. A., Dark, J. H., Davis, R. D., Keshavjee, S., ... Glanville, A. R. (2015). **A consensus document for the selection of lung transplant candidates: 2014 - An update from the Pulmonary Transplantation Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation**. Journal of Heart and Lung Transplantation, 34(1), 1–15. <http://doi.org/10.1016/j.healun.2014.06.014>

6. ISHLT, (2016), **Lung Transplantation: Adult Recipients**, JHLT, 35(10): 1149-1205
7. Padilla AM., Padilla JD., (2004), **Lung Preservation: Current Practices**, Arch Bronconeumol, 40(2): 86-93.
8. Southard JH., Belzer FO., (1995), **Organ preservation**, Annual Review of Medicine, 46:235-247.
9. Finger EB., (2015), **Organ preservation**, eMedicine, Obtenido 7/11/2016 de <http://emedicine.medscape.com/article/431140-overview#showall>
10. Escalante JL., Del Río F., (2009), **Preservación de órganos**, Medicina Intensiva, 33(6):282-292.
11. Latchana N., Peck JR., Whitson B., Black SM., (2014), **Preservation solutions for cardiac and pulmonary donor grafts: a review of the current literature**, Journal of Thoracic Disease, 6(8): 1143-1149.
12. López Suárez VJ., Miñambres E., Robles Arista JC., Ballesteros MA., (2012), **Disfunción primaria del injerto tras el trasplante pulmonar**. Medicina intensiva, 36(7): 506-512.
13. Christie JD., Carby M., Bag R., Corris P., Hertz M., Weill D., ISHLT Working Group on Primary Lung Graf Dysfunction, (2005), **Report of the ISHLT working group on primary lung graft dysfunction: Part II: Definition. A Consensus Statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation**, Journal Heart Lung Transplant, 24:1454-1459
14. Diamond JM., Lee JC., Kawut SM., Shah RJ., Localio AR., Bellamy SL., Lederer DJ., Cantu E., Kohl BA., Lama VN., Bhorade AM., Crespo M., Demissie E., Sonett J., Wille K., Orens J., Shah AS., Weinacker A., Arcasoy S., Shah PD., Wilkes DS., Ware LB., Palmer SM., Christie JD., (2013), **Clinical Risk Factors for Primary Graft Dysfunction after Lung Transplantation**, Am J Respir Crit Care Med, 187(5): 527-534.
15. Azzam ZS., Sznajder JI., (2015), **Lung Edema Clearance: Relevance to Patients with Lung Injury**, Rambam Maimonides Medical Journal, 6(3): e0025
16. Martin KT., (1991), **Pulmonary edema**, RCECS: USA, 39 p.p.
17. Laubach VE., Sharma AK., **Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury**, Curr Opin Organ Transplant, 21(3): 246-252.
18. den Hengst WA., Glielis JF, Lin JY, Van Schil PE., De Windt LJ., Moens AL., (2010), **Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process**, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 299(5): 1283-1299.
19. Yano M., Omoto Y., Yamakawa Y., Nakashima Y., Kiriya M., Saito Y., Fujii Y., (2001), **Increased matrix metalloproteinase 9 activity and mRNA expression in lung ischemia-reperfusion injury**, Heart Lung Transplant, 20(6):679-686.

20. Fiser SM., Tribble CG., Long SM., Kaza AK., Cope JT., Laubach VE., Kern JA., Kron IL., (2001) **Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response**, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 121(6): 1069-1075.
21. Vandooren J., Van den Steen PE., Opdenakker G., (2013), **Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade**, *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(3):222-272.
22. Siefert SA., Sarkar R., (2012), **Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease**, *Vascular*, 20(4):210-216.
23. Benjamin MM., Khalil RA., (2012), **Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigative Tools in the Pathogenesis and Management of Vascular Disease**, *Experimental supplement*; 103: 209-279
24. Löffek S., Schilling O., Franzke CW., (2011), **Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance**, *European Respiratory Journal*, 38(1):191-208.
25. Murphy G., Nagase H., (2008), **Progress in matrix metalloproteinase research**, *Molecular Aspects of Medicine*, 29(5): 290-308
26. Jones GT., (2014), **Matrix Metalloproteinases in biologic samples**, *Adv Clin Chem*, 65:199-219.
27. Galliera E., Tacchini L., Corsi Romanelli MM., (2015), **Matrix metalloproteinases as biomarkers of disease: updates and new insights**, *Clin Chem Lab Med*, 53(3): 349-355.
28. Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. (2001). **Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions**. *Trends Immunol* 22 (10): 571–579.
29. Bauvois B., (2012), **New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1825(1):29-36.
30. Van den Steen PE., Dubois B., Nelissen I., Rudd PM., Dwek RA., Opdenaker G., (2002), **Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)**, *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 37(6):375-536
31. Yamamoto A., Yano S., Shiraga M., Ogawa H., Goto H., Miki T., Zhang H., Sone S., (2003), **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**, *Internacional Journal of Cancer*, 103(6):822-828.
32. Yamada A., Uegaki A., Nakamura T., Ogawa K., (2000), **ONO-4817, an orally active matrix metalloproteinase inhibitor, prevents lipopolysaccharide-induced proteoglycan release from the joint cartilage in guinea pigs**, *Inflammation Research*, 49(4):144-146

33. Hübner RH, Meffert S., Mundt U., Böttcher H., Freitag S., El Mokhtari NE., Pufe T., Hirt S., Fölsch UR., Bewing B., (2005), **Matrix metalloproteinase-9 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation**, Eur Respir J., 25(3):494-501.
34. Corbel M., Boichot E., Lagente V., (2000), **Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury**, Braz J Med Biol Res, 33(7):749-754.
35. Phillipson M., Kubes P., (2011), **The neutrophil in vascular inflammation**, Nat Med, 17(11): 1381-1390.
36. Soccia PM., Gasche Y., Miiati DN., Hoyt G., Berry GJ., Doyle RL., Theodore J., Robbins RC., (2004), **Matrix metalloproteinase inhibition decreases ischemia-reperfusion injury after lung transplantation**, Am J Transplant, 4(1):41-50
37. Shimoyama T., Tabuchi N., Chung J., Koyama T., Sunamori M., (2006), **Matrix metalloproteinase inhibitor (ONO-4817) attenuates ischemia-reperfusion injury in rat lung**, Med Sci Monit, 12(2):51-56
38. Keck T., Balcom JH., Fernández-del Castillo C., Antoniu BA., Warshaw AL., (2002), **Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat**, Gastroenterology, 122(1):188-201.
39. Bohorquez- Sierra JC., (2006), **Metaloproteinasas de matriz: su implicación en las enfermedades vasculares periféricas**, Angiología, 58(4): 269-277.
40. Chatterjee S., Chapman KE., Fisher AB., (2009), **Lung ischemia: A model for endothelial Mechanotransduction**, Cell Biochem Biophys, 52(3): 125-138.
41. Fanjul-Fernández M., Folgueras AR., Cabrera S., López-Otín C., (2010), **Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models**, Biochimica et Biophysica Acta, 1803(1): 3-19.