

Curso 2009/10
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/30
I.S.B.N.: 978-84-7756-976-3

MARÍA DEL MAR MARTÍN VELASCO

**Utilidad de los niveles sanguíneos
de la metaloproteasa-9 y del inhibidor tisular
de metaloproteasa-1 como marcadores
del pronóstico de los pacientes con sepsis**

Directores

**ANTONIO SIERRA LÓPEZ
LEONARDO LORENZO RAMOS
SANTIAGO LUBILLO MONTENEGRO**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

DEDICATORIA

*A mi marido, Leonardo,
a mis hijos Daniel y Marina,
y a mis padres,
Aurelio y Esperanza,
porque sois la luz de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor D. Antonio Sierra López, director del estudio, por su disposición para la realización del trabajo.

Al Dr. Santiago Lubillo Montenegro, director de este trabajo y Jefe del Servicio de Medicina Intensiva del Hospital Nuestra Señora de Candelaria, por su apoyo incondicional y sus sabios consejos.

A los Doctores Jordi Solé, César Díaz, José Blanquer y Lorenzo Labarta, por su inestimable colaboración en el reclutamiento de pacientes.

Al Dr. José Antonio Páramo por haber coordinado la determinación de los niveles de Metaloproteasas.

Al Dr. Juan María Borreguero por su esfuerzo en la determinación de los niveles de Interleucinas.

Al Dr. Alejandro Jiménez Sosa, Matemático de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias, por su valiosa aportación en el análisis estadístico.

A mis compañeros del Servicio de Medicina Intensiva del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, y en especial a los Doctores Felipe Belmonte, Juan Carlos Medina, José Carlos Igeño, Raquel Montiel, Froilán Méndez, Pedro Ruiz, Nuria Medina, Gema García, Candelaria Ruiz, Daida García y José Sánchez Godoy, por sus consejos y colaboración para la realización de este trabajo.

Al personal de enfermería del Servicio de Medicina Intensiva del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, por su colaboración.

Al Dr. Leonardo Lorente, mi esposo, Alma Mater y director de este trabajo, por su estímulo y ánimo continuo, por sus consejos, porque siempre está y ha estado ahí cuando lo he necesitado.

A mis hijos, Daniel y Marina, a quien tanto tiempo les he quitado.

A mis padres, Aurelio y Esperanza, porque de ellos aprendí el espíritu de sacrificio y el afán de superación, y por su apoyo incondicional.

Indice

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	5
II. REVISIÓN Y ANTECEDENTES	7
1- INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE LA SEPSIS	8
2- FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS	16
2. 1. INDUCTORES DE LA SEPSIS	18
2. 1. 1. Reconocimiento del microorganismo	18
2.2 CITOCINAS	28
2.2.1 Clasificación y Mecanismos de Acción.....	28
2.2.2 Características funcionales y regulación de la expresión de Citocinas y Quimiocinas	29
2.2.3 Clasificación	34
2.2.3.1 Citocinas Proinflamatorias	37
2.2.3.1.1 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)	37
2.2.3.1.2 Interleucina-1 (IL-1)	40
2.2.3.1.3 Interleucina (IL-8)	43
2.2.3.1.4 Interleucina 12 (IL-12)	44
2.2.3.1.5 Interleucina 18 (IL-18)	45
2.2.3.1.6 Interferón-gamma (INF-γ)	46
2.2.3.1.7 Interleucina 2 (IL-2)	47
2.2.3.1.8 Interleucina 15 (IL-15)	48
2.2.3.1.9 Otros mediadores proinflamatorios	48
2.2.3.2 Mediadores Antiinflamatorios	49
2.2.3.2.1 Interleucina 6 (IL-6)	49
2.2.3.2.2 Interleucina 10 (IL-10)	50
2.2.3.2.3 Interleucina 4 (IL-4)	51
2.2.3.2.4 Interleucina 13 (IL-13)	52
2.2.3.2.5 Interleucina 11 (IL-11)	53
2.2.3.2.6 Factor transformador del crecimiento β (TGF-β)	53
2.3 MEDIADORES CELULARES	55
2.3.1 Monocito-macrófago	55
2.3.2 Neutrófilo	56
2.3.3 Célula endotelial	57
2.4 MEDIADORES INFLAMATORIOS SECUNDARIOS	62
2.4.1 Oxido Nítrico.....	62
2.4.2 Radicales libres de oxígeno	64
2.4.3 Mediadores lipídicos	65
2.4.3.1 Factor Activador de las plaquetas (PAF).....	65
2.4.3.2 Eicosanoides.....	66
2.5 COAGULACIÓN EN LA SEPSIS	68
2.5.1 Generalidades	68
2.5.2 Alteraciones de las Plaquetas	71
2.5.3 Activación de la coagulación	72
2.5.4 Consumo de Inhibidores	76
2.5.5 Bloqueo del Sistema Fibrinolítico.....	80
2.6 METALOPROTEASAS	83
2.6.1 Definición y funciones	83
2.6.2 Estructura.....	86
2.6.3 Clasificación de las Metaloproteasas	89
2.6.3.1 Colagenasas:	91
2.6.3.2 Estromelisininas.....	93
2.6.3.3 Gelatinasas.....	94
2.6.3.4 Metaloproteasas de membrana (MT-MMPS).....	95
2.6.3.5 Otras MMPs	97
2.6.4 Regulación de Producción las MMPs	98
2.6.4.1 Activación de las MMPs.....	101
2.6.4.2 Inhibición de las MMPs	102
2.6.5 Papel de las MMs de la matriz en procesos no infecciosos.....	104
2.6.5.1 Metaloproteasas en los procesos tumorales.....	104
2.6.5.2 Metaloproteasas en osteoartritis y artritis reumatoide	108
2.6.5.3 Metaloproteasas en la enfermedad pulmonar crónica y el asma.....	109
2.6.5.4 Metaloproteasas en enfermedades cardiovasculares.....	111
2.6.6 Metaloproteasas en la respuesta inmune a la infección	114
2.6.6.1 Metaloproteasas en la respuesta inmune normal a la <i>infección</i>	114
2.6.6.2 Metaloproteasas en la respuesta patológica a la infección.....	116

2.6.6.3 Metaloproteasas en Sepsis Grave y Shock Séptico	121
III. MATERIAL Y MÉTODO	124
1. Diseño del estudio	125
2. Lugar de realización del estudio	125
3. Período de estudio	126
4. Tamaño muestral	126
5. Criterios de inclusión	126
6. Criterios de exclusión	126
7. Definiciones	127
8. Manejo de la sepsis grave	129
9. Recogida de datos del paciente:.....	130
10. Recogida de muestras del paciente.....	132
11. Procesamiento de las muestras:.....	133
12. Variable resultado y End-point.....	134
13. Método Estadístico.....	135
IV. RESULTADOS.....	137
1. Casos y Controles	138
Tabla 1 . Comparación del sexo edad, niveles séricos de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1, y cocientes MMP-9/TIMP-1 y MMP-10/TIMP-1	139
2. Características Clínicas de los pacientes	139
Tabla 2. Comparación de las características clínicas entre los pacientes supervivientes y fallecidos.	140
3. Marcadores de Coagulopatía.....	141
Tabla 3. Comparación de los parámetros de coagulación en la evolución	142
4. Niveles de Acido Láctico y Puntuación SOFA de gravedad.....	143
Tabla 4. Comparación de los niveles de ácido láctico y del SOFA.....	143
5. Comparación entre marcadores de gravedad y coagulación	144
Tabla 5. SOFA, ácido láctico, plaquetas, INR y aPTT	144
6. Niveles circulantes de MMPs durante la primera semana.....	145
Tabla 6. Comparación de los niveles séricos de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1	
Figura 1. Comparación de los niveles séricos de MMP-9.	146
Tabla 7. Comparación de los niveles séricos evolutivos de MMP-9	146
Figura 2. Comparación de los niveles séricos evolutivos de TIMP-1	147
Tabla 8. Comparación de los niveles séricos evolutivos de TIMP-1.....	147
Figura 3. Comparación de los niveles séricos de MMP-10 en la evolución	148
7. Mediadores Inflamatorios en Supervivientes y Fallecidos.....	149
Figura 4. Comparación de los niveles séricos de IL-10.	150
Tabla 10. Comparación de los niveles séricos de IL-10.....	150
Figura 5. Comparación de los niveles séricos de TNF-alfa.	151
Tabla 11. Comparación de los niveles séricos de TNF-alfa e IL-10, y TNF-alfa/IL-10...	152
8. Marcadores Protrombóticos.....	153
Figura 6. Comparación de los niveles plasmáticos de PAI-1.	154
9. Correlación entre marcadores proteolíticos, inflamatorios y protrombóticos.....	155
Tabla 12. Correlaciones entre los parámetros proteolíticos y de gravedad.	156
Tabla 13. Correlaciones entre los parámetros proteolíticos y de coagulopatía	157
Tabla 14. Correlaciones entre los parámetros proteolíticos, inflamatorios y protrombóticos	159
Tabla 15. Correlación entre niveles séricos de MMP-9, TIMP-1 y MMP-10, y TIMP-1/ MMP-9 ratio con TNF-alfa, IL-10, PAI-1, ácido láctico, SOFA, plaquetas, INR and aPTT en pacientes sépticos al día 1.	162
Tabla 16. Correlación entre niveles séricos MMP-9, TIMP-1 y MMP-10, yTIMP-1/ MMP-9 ratio con TNF-alfa, IL-10, PAI-1, ácido láctico, SOFA, plaquetas, INR y aPTT en pacientes sépticos al día 4	163
Tabla 17. Correlación entre niveles séricos de MMP-9, TIMP-1 y MMP-10, y TIMP-1/ MMP-9 ratio con TNF-alfa, IL-10, PAI-1, ácido láctico, SOFA, plaquetas, INR y aPTT en pacientes sépticos al 8º día.	164
10. Mortalidad: Análisis “receiver operation characteristics” (ROC).....	165
Table 18. Análisis ROC de la relación TIMP-1, TIMP-1/MMP-9 ratio, ácido láctico y SOFA score como predictores de mortalidad.....	167
11. Análisis de Regresión logística múltiple para predecir mortalidad.....	168
Tabla 19. Análisis de regresión logística múltiple para predecir la mortalidad a los 30 días.....	168
12. Curvas de Supervivencia	169

Figura 8. Proporción de pacientes supervivientes a los 30 días utilizando niveles circulantes de TIMP-1	169
IV. DISCUSIÓN	170
1. Pacientes sépticos frente a controles sanos.....	175
2. Marcadores Proteolíticos en Supervivientes y Fallecidos	176
3. Marcadores de Gravedad en sepsis y MMPs.....	178
4. Marcadores Inflamatorios y MMPs	180
5. Coagulación y Marcadores Proteolíticos	181
6. Fibrinólisis y Marcadores Proteolíticos.....	183
7. MMPs y Predicción de Mortalidad.....	184
8. MMPs como factor independiente asociado a Mortalidad.....	184
9. MMPs y Supervivencia a los 30 días en Sepsis Grave.....	185
10. MMPs en sepsis: proteólisis, inflamación y coagulación.....	186
11. Implicaciones Terapéuticas.....	189
12. Limitaciones de este estudio.....	191
V. CONCLUSIONES	193
VI. BIBLIOGRAFÍA	196
VI. ANEXOS	262
1. APACHE II.....	265
2. SOFA Score.....	266
VII. ABREVIATURAS.....	265

I. Justificación y Objetivos

La sepsis grave es una patología de muy alta prevalencia en los Servicios de Medicina Intensiva, que cursa con una elevada morbilidad y alto impacto económico.

Muchos son los esfuerzos realizados en los últimos años por definir este síndrome, cuyo diagnóstico y tratamiento precoz marcan definitivamente el pronóstico. De ahí la importancia de encontrar biomarcadores que permitan agilizar el diagnóstico y orientar sobre la evolución y pronóstico de esta patología que provoca un muy importante consumo de recursos a nivel mundial.

En estudios de pequeño tamaño muestral (menor de 40 pacientes) se han encontrado niveles más altos de Metaloproteasas de la Matriz-9 (MMP-9) y del Inhibidor Tisular de Metaloproteasas-1 (TIMP-1) en pacientes con sepsis que en controles, y mayores niveles de TIMP-1 o MMP-9 en pacientes fallecidos que en supervivientes. Además, de forma experimental se ha visto que la modulación de la respuesta inflamatoria sistémica a través de fármacos que modulen la expresión de MMPs de la matriz y sus inhibidores puede mejorar el pronóstico de la sepsis.

Planeamos un estudio con la hipótesis de que los niveles de la MMP-9 y del TIMP-1 pueden influir en la morbilidad de los pacientes con sepsis grave.

II. Revisión y Antecedentes

1- INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE LA SEPSIS

La sepsis es hoy en día la “ *enfermedad* ” por excelencia de todas las que se atienden en la Unidades de Cuidados Intensivos. Y esto es así por ser la más prevalente en nuestras unidades ¹, más de un 50% de los pacientes con sepsis requieren ingreso en UMI, lo que representa uno de cada cinco ingresos en intensivos. Además es la causa más frecuente de muerte en UCI no coronarias ² y uno de los principales caballos de batalla de la medicina intensiva contemporánea ³.

En el año 1991 la American College of Chest Physicians (ACCP) y la Society of Critical Care Medicine (SCCM)⁴ convocan una conferencia de consenso para desarrollar una amplia serie de definiciones que mejoren la capacidad de los médicos de diagnosticar, supervisar y tratar la sepsis y otros aspectos relacionados con ésta.

La SCCM, ACCP y otras Sociedades Científicas de Cuidados Intensivos norteamericanas y europeas patrocinaron una nueva Conferencia Internacional de Definiciones de la Sepsis en el año 2001⁵ ante la necesidad de poner al día las definiciones previamente establecidas en el año 1992, a la luz de nuevos avances en fisiopatología y pruebas diagnósticas desarrollados en los últimos años (marcadores celulares, citocinas, datos microbiológicos y parámetros de coagulación, entre otros).

El informe de la conferencia no encontró ninguna prueba que apoyara un cambio de las definiciones de sepsis, pero halló que los signos y síntomas son más variados que los criterios iniciales establecidos en 1991, dando mayor importancia al uso de los *biomarcadores* para el diagnóstico precoz de sepsis.

El concepto de sepsis comprende desde el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS) del huésped, a la infección grave sospechada o documentada.

Hablaremos de sepsis cuando exista una infección documentada o sospechada con dos o más de los siguientes criterios:

- . Fiebre (temperatura central $>38,3^{\circ}$ C) o hipotermia (temperatura central $< 36^{\circ}$ C)
- . Taquicardia > 90 latidos por min, Taquipnea > 20 respiraciones por min
- . Alteración de la consciencia
- . Edema o balance positivo >20 ml/kg en 24h
- . Hiperglicemia (glucosa plasmática >110 mg/dl) en ausencia de diabetes

. Leucocitosis $> 12000/\text{mm}^3$, leucopenia $< 4000/\text{mm}^3$ o recuento normal con $> 10\%$ formas inmaduras

. Niveles plasmáticos de proteína C reactiva o procalcitonina mayores de 2 desviaciones estándar del valor normal

. Saturación central venosa mixta (SvcO_2) $> 70\%$ o índice cardiaco $> 3.5\text{l}/\text{min}/\text{m}^2$

La **sepsis grave** se caracteriza o bien por la alteración aguda de la función de uno o mas órganos (función hemodinámica, renal, respiratoria, hepática, hematológica o neurológica), o bien por mala perfusión tisular (hiperlactacidemia) o hipotensión arterial (transitoria o persistente).

. Hipoxemia con $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 300 \text{ mmHg}$

. Oliguria (diuresis $< 0.5\text{ml}/\text{kg}/\text{h}$ durante al menos 2 horas)

. Incremento de Creatinina $> 0.5\text{mg}/\text{dl}$ o valor $> 2\text{mg}/\text{dl}$

. Trastorno de la coagulación ($\text{INR} > 1,5$ o $\text{TTPa} > 60$ segundos)

. Trombocitopenia $< 100.000/\text{mm}^3$

. Hiperbilirrubinemia (bilirrubina $> 2,0 \text{ mg}/\text{dl}$)

. Hiperlactacidemia ($> 3\text{mmol}/\text{l}$ o $24\text{mg}/\text{dl}$)

. Hipotensión arterial ($\text{TAS} < 90\text{mmHg}$, $\text{TAM} < 70$ o descenso de la $\text{TAS} > 40\text{mmHg}$)

El **shock séptico** es definido por la presencia de hipotensión arterial que no responde a la expansión del volumen intravascular y requiere perfusión de aminas para su tratamiento.

Como fue publicado por *Rangel-Frausto et al.* en 1995⁶ sepsis, sepsis grave y shock séptico no son más que estadios de gravedad en la respuesta sistémica inflamatoria del organismo ante la agresión provocada por un agente infeccioso.

La entrada de microorganismos o sus toxinas en el torrente circulatorio provoca una respuesta inflamatoria por parte del huésped con pérdida de la autorregulación de los mecanismos de defensa, con tendencia a la hiperproducción de sustancias proinflamatorias o mediadores, activadores de la coagulación y fibrinólisis, que interrelacionan, suscitando el control de la infección o su evolución a sepsis grave o shock séptico⁷.

La incidencia de sepsis en España supone unos 333 casos/100.000 habitantes/año. La incidencia de sepsis grave varía según los estudios y la población estudiada, describiéndose una incidencia de sepsis grave de 104 -140 casos por 100.000 habitantes y año, y una incidencia de shock séptico de 31 casos por 100.000 habitantes y año⁸, esta incidencia es mayor que la descrita en otros países.

En la población francesa la incidencia anual de sepsis grave se ha cuantificado en 95 casos/100.000 habitantes⁹, en Australia-Nueva Zelanda en 77 casos/100.000 habitantes¹⁰, en Inglaterra-País de Gales-

Irlanda del Norte en 51 casos/100.000 habitantes², en Australia 76 casos/100.000 habitantes.

En Estados Unidos la incidencia anual de sepsis se ha estimado en cerca de 300 casos/100.000 habitantes¹¹, con una incidencia de sepsis grave de 81/100.000. Se estima que en el mundo se producen 18 millones de casos de sepsis cada año, lo que equivale a la suma de las poblaciones de Dinamarca, Finlandia, Irlanda y Noruega.

La incidencia de estos procesos infecciosos está aumentando a un ritmo del 7-9% anual¹²⁻¹⁴ por diversos factores, como el aumento de la expectativa de vida, que deriva en un mayor número de procesos crónicos en la población, el incremento de realización de técnicas invasivas, estados de inmunodepresión por fármacos, enfermos tratados con quimioterapia, etc.

El 10,4% de los pacientes que acuden a los Servicios de Urgencias hospitalarios son diagnosticados de un proceso infeccioso, de estos ingresan en el hospital entre el 4.4-20.6%, dependiendo de las series^{8,16-18}. El 29% de las sepsis que ingresan en el hospital se transformarán en sepsis grave y el 9% en shock séptico. De los diagnosticados como sepsis grave, más de la mitad de los casos son atendidos fuera de las UCI^{7,8}, pero aún así la sepsis es hoy en día la enfermedad más prevalente en la Unidades de Medicina Intensiva, en las que según *Vincent et al.*¹⁵ supone el 24.7% de las causas de ingreso, y es el diagnóstico del 37.4%

de los pacientes ingresados en las Unidades de Medicina Intensiva Europeas.

Aunque la mortalidad de la sepsis ha disminuido en los últimos años debido a los avances terapéuticos, las tasas de mortalidad siguen aumentando, como consecuencia del aumento constante de incidencia, y por ser los pacientes cada vez más graves.

De forma global se pueden estimar que, de los aproximados 45.000 casos de sepsis grave al año en España, fallecen unos 13.000, lo que supone una tasa de 97 casos/100.000 habitantes/año. En el mundo se producen unos 18.000.000 casos/ año con 1.400 muertos/día.

Según datos del estudio EDU-SEPSIS¹⁹, en España, de octubre a diciembre 2005, la sepsis grave presentó una mortalidad del 47%, que en estudios posteriores alcanza hasta el 54.3%²⁰, cifras superiores a las descritas en otros países^{11,21,22,23}.

En el caso del shock séptico las cifras de mortalidad alcanzaron el 84% en el Estudio EDU-SEPSIS. Estas cifras de mortalidad son muy superiores a las de enfermedades como el infarto agudo de miocardio (IAM) o el ictus. De hecho, comparativamente mueren más personas de sepsis que de cáncer de mama o de colon o como complicación de un IAM.

Pero, la sepsis representa en la actualidad no solo una importante causa de muerte como se ha descrito, sino también un alto coste económico²⁴. En el estudio realizado por Angus y col.¹¹ de 192.980

pacientes con sepsis grave ingresados en 847 hospitales de EEUU durante 1995, se encontró que la mortalidad fue del 29% y el coste medio por caso de 22.100 dólares, estimándose que provocaba tantas defunciones anuales como el infarto agudo de miocardio y un coste anual nacional de \$16.7 billones de dólares.

En un estudio²⁵ realizado en la Comunidad de Madrid en el año 2001 se estimó que el coste económico por episodio de sepsis es de unos 10.000 euros, el coste anual de la atención a la sepsis grave en la Comunidad de Madrid es de 70 millones de euros al año, muy superior al que representa la atención al infarto agudo de miocardio, que supone unos 16 millones de euros, esto supondría que el coste de la sepsis en España estaría alrededor de los 345 millones de euros anuales, siendo muy superior al coste del IAM.

Tras revisar la extensa literatura al respecto, parece claro que a pesar de los potentes antimicrobianos de que disponemos, de los avances en las técnicas de soporte hemodinámico, renal y respiratorio así como de algunos recientes tratamientos para modular la respuesta inflamatoria, la mortalidad de la sepsis grave y el shock séptico continúa siendo muy elevada .

En algunos pacientes, las enfermedades previas pueden explicar una evolución fatal del cuadro infeccioso. Sin embargo, en muchos casos no tenemos una explicación clara de por qué evolucionan desfavorablemente progresando a sepsis grave y fallecimiento, mientras

otros pacientes con similar terapéutica no lo hacen. Es posible que la respuesta a esta cuestión venga de la mano del estudio de factores genéticos del individuo que pueda condicionar una mayor mortalidad en la sepsis, como así lo es en el cáncer y en las enfermedades cardiovasculares²⁹.

Determinados polimorfismos genéticos dan como resultado una respuesta inflamatoria más agresiva y determinan mayor mortalidad³⁰. Así pues, hay pacientes en los que el riesgo de muerte será mayor porque genéticamente están condicionados para una respuesta inflamatoria más agresiva, y el conocimiento de este condicionamiento genético podría derivar en una actitud terapéutica dirigida.

2 - FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS

La sepsis es la respuesta sistémica a la infección y se reconoce a través de una constelación de signos clínicos, hemodinámicos, hematológicos, bioquímicos e inflamatorios resultado de una respuesta excesiva o inadecuada de los mecanismos de defensa del huésped, por la presencia de microorganismos o sus productos, induciendo una reacción inflamatoria que tienen como principal diana el endotelio vascular.

Esta respuesta inflamatoria incluye la activación de monocitos y macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, plaquetas y otras células, la producción de citocinas, a nivel local y sistémico, la activación de sistemas de cascada de proteínas plasmáticas, como el complemento, las vías de coagulación intrínseca y extrínseca, el sistema fibrinolítico, la activación de mediadores lipídicos; la activación de la vía del óxido nítrico (ON), la producción de radicales libres, la activación de los linfocitos B y T y sus productos, y muchas otras sustancias ³¹.

En la respuesta inmune a la infección, estos mediadores provocan el reclutamiento de las células adyacentes a través de un proceso paracrino. Cuando la liberación de mediadores excede las fronteras locales, se diseminan y distribuyen a través de los linfáticos o la sangre, produciendo una activación celular generalizada de tipo endocrino, que se corresponde con el cuadro clínico del síndrome de respuesta inflamatoria

sistémica (SIRS). El SIRS es un mecanismo de defensa del huésped del que forma parte el proceso de reparación tisular.

La respuesta sistémica aguda muy precoz debida a una infección ha quedado caracterizada en trabajos experimentales y clínicos. Ante un daño tisular local, se produce una rápida respuesta del huésped consistente en la activación simultánea de la respuesta inflamatoria (para eliminar posibles microorganismo que hayan podido introducirse en el huésped) y del sistema de la coagulación (para producir una trombosis local que permita localizar y contener la agresión y evitar la pérdida de sangre) para poder sobrevivir a la lesión. Ante una infección local también se produce esta activación simultánea de la respuesta inflamatoria y del sistema de la coagulación para localizar la infección, evitar la progresión de los microorganismos y su paso al torrente sanguíneo. Simultáneamente a la respuesta inflamatoria se inicia una respuesta antiinflamatoria compensatoria para limitar la reacción inflamatoria.

La activación de la respuesta ante la infección es un proceso normal, pero cuando es excesiva el proceso puede ser muy agresivo generando lo que se conoce como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) a la infección o sepsis.

También puede producirse una respuesta antiinflamatoria compensatoria excesiva que se conoce como síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria (SRAC), con depresión de la función inmune.

2. 1. INDUCTORES DE LA SEPSIS

2. 1. 1. Reconocimiento del microorganismo

La respuesta inflamatoria comienza con el reconocimiento celular de uno o varios de los componentes del microorganismo, lo que trae como consecuencia la activación de la célula y la síntesis de proteínas que modifican la respuesta efectora de la célula inmunitaria.

La sepsis iniciada por gramnegativos se desencadena por el lipopolisacárido conocido como endotoxina (LPS).

El LPS es el inductor de respuesta inflamatoria mejor conocido. La parte externa de las bacterias gram-negativas está constituida por una serie de oligosacáridos estructural y antigénicamente diferentes, responsables del serotipo O de las bacterias gram-negativas. A un nivel más interno se halla el core, núcleo heterooligosacárido que contiene azúcares poco usuales, como el 2-ceto, 3-desoxioctonato. La posición más interna está ocupada por el lípido A, molécula estructuralmente muy compleja y similar entre las distintas especies de bacterias gram-negativas, principal responsable de la toxicidad de la endotoxina³².

La endotoxina es vertida a la circulación donde, en animales de experimentación e individuos sanos es responsable de la mayor parte de las alteraciones hemodinámicas del shock séptico y disfunción multiorgánica.

A nivel cardiovascular incrementa la frecuencia cardiaca, el índice cardiaco y disminuye las resistencias vasculares sistémicas provocando hipotensión.

A nivel microvascular, activa la coagulación, el sistema de contacto, del complemento y la fibrinolisis. Actúa sobre el endotelio vascular al inhibir la acción de anticoagulantes endógenos, induciendo la síntesis de radicales libres e incrementando la síntesis de ON. Activa a los macrófagos provocando la síntesis de proteínas y a los neutrófilos, causando lesión endotelial mediante la producción de aniones superóxido y enzimas proteolíticas ³³.

Al invadir el torrente sanguíneo, la endotoxina se enfrenta a una primera línea de sustancias naturales que intentan bloquear la infección: anticuerpos, albúmina, lipoproteínas de alta intensidad (HDL) y BPI (*bactericidal permeability increasing protein*) expresada por polimorfonucleares (PMN), monocitos/macrófagos (M/M) y eosinófilos y, sobre todo, a través de los receptores de la respuesta del sistema inmune innato expresados por dichas células. Funcionalmente estas proteínas pueden ser divididas en tres clases: segregadas, como las opsoninas, endocíticas y de señal. La mejor estudiada es la lectina unida a manano, una opsonina que al unirse a los carbohidratos microbianos, inicia la vía de la lectina para la activación del complemento.

La endotoxina que continúa circulante se une a la LBP (*lipopolysaccharide binding protein*) que es una glucoproteína de fase aguda sintetizada mayoritariamente por el hígado.

La LBP carece de actividad intrínseca y se une a la endotoxina a través del lípido A; forma complejos con la endotoxina y funciona como un ligando específico de alta afinidad del receptor CD14, hasta el momento el receptor mejor caracterizado de LPS.

Se ha identificado una forma de membrana (mCD14) y una forma soluble (sCD14). El mCD14 es una glucoproteína de 55 KDa cuyo gen se localiza en el cromosoma 5 y que se expresa de forma constitutiva en macrófagos y neutrófilos activados. Por su parte el sCD14 es una glucoproteína de 53 Kda que está presente en el suero normal³⁴.

El complejo LPS-LBP va a unirse a los receptores de la pared celular CD14 (fundamentalmente de los macrófagos) iniciándose la secuencia de la señal intracelular a través del complejo TLR4 y la proteína MD-2. En las células donde no existen receptores CD14 (como en las células endoteliales, células dendríticas, fibroblastos, células del músculo liso), esta cascada se inicia uniéndose el complejo LPS-LBP a CD14 soluble circulante en el plasma. Aunque existen otros receptores de la pared celular que reconocen a la LPS como el MSR (*macrophage scavenger receptor*), canales de K⁺, y los receptores CD11/CD18.

El CD14 está unido a la membrana por un anclaje glicosil-fosfatidilinositol que carece de dominio transmembrana, ello se obvia por

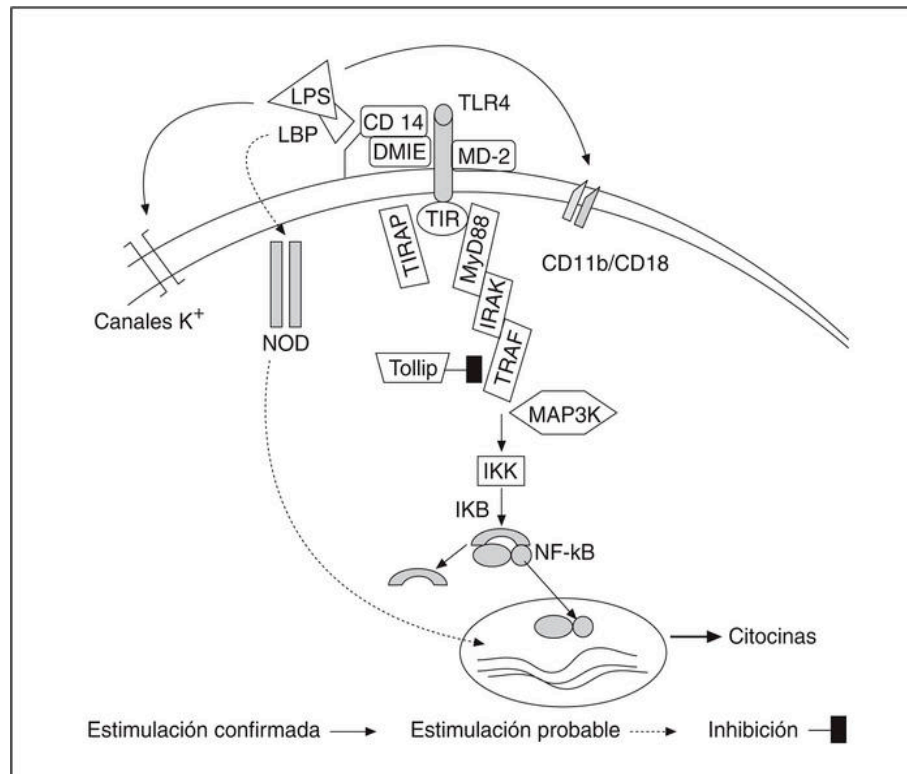
proteínas identificadas como receptores tipo portazgo *toll-like receptors* (TLR) que inician la vía de señales que implica al factor nuclear kappa-B (NF-κ B) y a la subsiguiente transcripción genética^{35,36}.

Los *Receptores Toll-like* (TRL) son proteínas transmembrana tipo I, situadas en la membrana de los macrófagos, con un dominio extracelular rico en leucina y un dominio intracelular homólogo al receptor de interleucina 1 (IL-1). En el genoma humano se han clonado hasta ahora 10 moléculas que interactúan con partículas o componentes bacterianos conocidos como PAMP que comparten muchos patógenos. Los más conocidos son el TLR4 que es un ligando para la endotoxina, TLR2 ligando para componentes de la membrana celular de los grampositivos, TLR5 cuyo ligando es la flagelina de las bacterias flageladas, TLR3 cuyo ligando es el ARN de doble cadena de los virus, TLR9 que recibe al ADN bacteriano con secuencias no metiladas CpG para la estimulación celular, y TLR1 que comparte con el TLR2 el ligarse a factores solubles procedentes de la *Neisseria meningitidis*. Por tanto, hasta el momento se considera que existe una señal común mediada por TLR9, TLR5 y TLR6; y señales específicas (TLR4 para LPS y TLR2 para ácido lipoteicoico).

La señal intracelular se inicia con la unión del dominio intracelular TLR llamado TIR (*Toll/IL-1 receptor homology domain*) a una cinasa asociada, IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*). Este proceso requiere dos proteínas de adaptación, las llamadas MyD88 (*myeloid differentiation protein 88*) y TIRAP (*TIR domain containing adapter protein*), llamada

también Mal (*MyD88-adaptor-like protein*). Y a su vez puede inhibirse por una tercera proteína llamada Tollip (*Toll-interacting protein*). Se produce un proceso de fosforilización y se asocia a otra proteína, TRAF6 (*Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6*) que activa a otra cinasa, la MAP3K (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) para actuar sobre el complejo IKK (*inhibitor KB kinase*) que precisa la proteólisis a través del sistema ubiquitina del inhibidor I κ B para que se liberen los dímeros del NF- κ B (RelA, p65, c-Rel, RelB, p50, y p52) en el núcleo donde se hacen activos, traslocan al núcleo y permiten la traslación, transcripción y producción de un ARNm mensajero que induzca la producción de citocinas y otras moléculas efectoras³⁷. Teóricamente una sepsis debe persistir mientras continúe la translocación nuclear de NF- κ B.

Figura 1. Actuación de la LPS sobre la membrana celular y señales celulares conocidas y probables desencadenadas por la misma



Se han descrito otros factores solubles que se unen a la endotoxina además de la LBP, que además de formar complejos como se ha descrito, puede también actuar como opsoninas, intensificando los efectos de la endotoxina, al unirse a eritrocitos cubiertos de endotoxina y a bacterias gram-negativas.

Entre estos otros factores solubles está la proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad (BPI), cuyo gen se ha localizado en el hombre en el brazo largo del cromosoma 20, próximo al gen de la LBP, y

que neutraliza in vitro muchos de los efectos biológicos de la endotoxina (LPS). La BPI se une a la bacteria a través del LPS presente en la superficie bacteriana, induce un aumento de la permeabilidad de su membrana citoplasmática que conduce a la lisis del patógeno y suprime la activación celular mediada por el LPS. Es un fenómeno de competencia con la LBP y de *down regulation* de los receptores CD14 de monocitos y macrófagos. Además la BPI tiene efecto bactericida y bacteriostático³⁸.

Las endotoxinas también forman complejos con lipoproteínas séricas (LDL, HDL, apolipoproteína A) que disminuyen su toxicidad al ser aclarados de la circulación.

También existen en el suero anticuerpos anti-LPS que pueden modular los efectos biológicos de la endotoxina. Existen estudios que demuestran que la presencia de estos anticuerpos anti-LPS protegen y mejoran el pronóstico de los pacientes sépticos³⁹.

Las células pueden también responder a la endotoxina por otra vía distinta, a través de receptores intracelulares llamados proteínas NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) que también presentan dominios ricos en leucina por los que interactúa con su ligando, el muramil dipéptido (NOD2) o el muramil tripéptido (NOD1), la unidad menor de peptidoglicano común a gram-positivos y a gram-negativos. La expresión tanto de NOD1 como de NOD2 genera una respuesta de la endotoxina pero no del ácido lipoteicoico.

Son varios los estudios que han analizado las concentraciones plasmáticas de endotoxina en pacientes con sepsis, siendo los resultados dispares en cuanto a su incidencia, correlación microbiológica, gravedad y pronóstico de la sepsis ⁴⁰.

La endotoxemia puede detectarse en sangre hasta en un 40% de los pacientes sépticos, pero no es un buen predictor pronóstico ni predictor de infección, ni tan siquiera de bacteriemia por gram-negativos, por ello no esta indicada su determinación como rutina en la clínica ⁴¹.

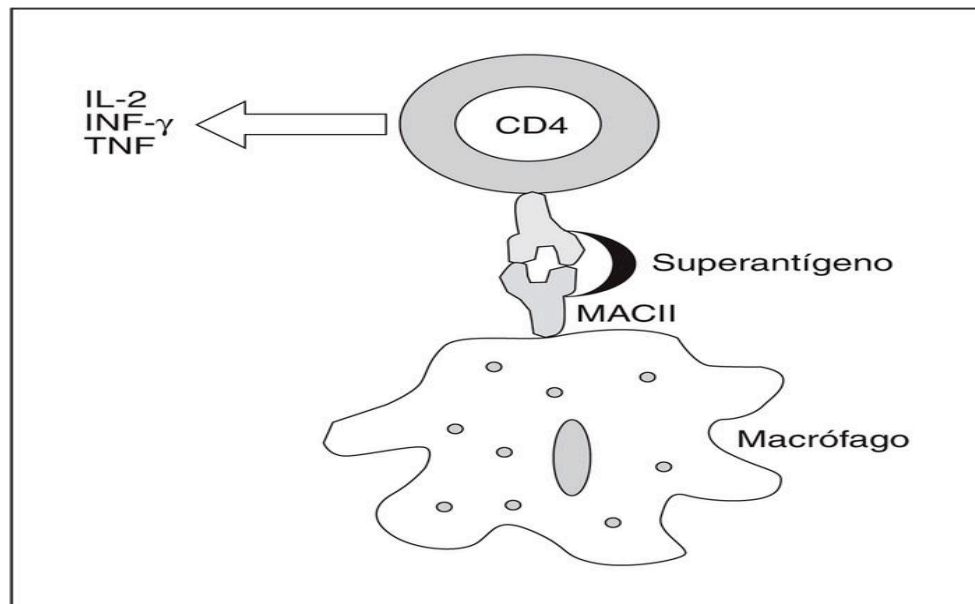
La sepsis debida a gram-positivos puede desencadenarse por la producción de *exotoxinas* que actúan como superantígenos, o por componentes de la membrana celular, que actúan como desencadenantes (peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, lipoproteínas, modulina soluble en fenol), que al unirse a los receptores de la pared celular CD14 inician la secuencia de la señal intracelular a través del complejo *toll-like receptors-2* (TLR2), que conllevará la producción de citocinas.

Los superantígenos son moléculas que se unen a las células presentadoras de antígeno que participan en el MHC-II (complejo mayor de histocompatibilidad clase II), y también a las cadenas V β de los receptores de células T, desencadenando una producción masiva de citocinas proinflamatorias. Así funcionan las exotoxinas del *Staphylococcus* y del *Streptococcus* que producen el síndrome de shock tóxico. Además dependiendo de la secuencia del terminal amino de su

dominio, muestran afinidades para diferentes alelos HLA, de esa manera el superantígeno SPEA (*streptococcal pyrogenic exotoxin A*) muestra mayor afinidad por el HLA-DQ que por el HLA-DR, lo que explicaría la selectividad tan marcada de los síndromes de shock tóxico.

Otro hecho interesante es la hipersensibilidad que se produce a la endotoxina tras una agresión por superantígenos, lo que justificaría el proceder de plantear estrategias frente al LPS aunque la sepsis sea producida por grampositivos⁴².

Figura 2. Actuación de un superantígeno en una sepsis por grampositivos



Aunque como hemos visto hasta ahora parecen existir diferencias en la respuesta inflamatoria del huésped inducida por microorganismos gram-positivos y gram-negativos, la activación se considera bastante similar, independientemente del microorganismo causante de la sepsis ⁴³.

2.2 CITOCINAS

2.2.1 Clasificación y Mecanismos de Acción

Una de las familias de mediadores de la respuesta inflamatoria mejor conocidos son las citocinas, glucoproteínas constituidas por 120-180 aminoácidos, de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 Kda. Actúan como señal para que determinadas células movilicen a distancia las defensas del huésped. Aunque en general están producidas por leucocitos, determinadas citocinas pueden también ser secretadas por otros muchos tipos celulares, como son macrófagos, linfocitos y células endoteliales⁴⁴.

Originariamente se estableció el término linfocina para denominar productos biológicos producidos por linfocitos en respuesta al antígeno. Posteriormente su uso se amplió a moléculas de características similares secretadas por otros tipos celulares, por lo que se utilizó el término más amplio de citocina.

El término interleukina (IL) se aplicó a aquellas moléculas que servían como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, numerándose correlativamente a medida que se descubrían (IL-1, IL-2, etc.). No obstante, algunas de ellas se detectaron inicialmente en ensayos funcionales *in vitro* y aún conservan su denominación original de acuerdo

con la función biológica que permitió su identificación, como es el caso del TNF (factor de necrosis tumoral) y el TGF (factor transformador de tejidos)^{44,45}.

Existen también “citocinas quimiotácticas” o quimiocinas que se denominan así por poseer propiedades quimioatrayentes, regulando el transvase de leucocitos hacia órganos y tejidos.

Las quimiocinas secretadas se unen a proteoglicanos y a proteínas de la matriz extracelular donde se cree permanecen inmovilizadas sin pasar a la circulación. Esta capacidad de unión a la matriz extracelular favorece la permanencia de las quimiocinas en su lugar de producción y apoya el concepto de que la migración de los leucocitos se realiza a través de un gradiente sólido. La molécula más representativa de la familia de las quimiocinas es la IL-8, sintetizada por todos los tipos de leucocitos, así como por otros muchos tipos celulares (fibroblastos, células endoteliales, hepatocitos, astrocitos. etc.) y células tumorales (melanoma, carcinoma de ovario, pulmonar, etc.) en respuesta a una amplia variedad de estímulos⁴⁵.

2.2.2 Características funcionales y regulación de la expresión de Citocinas y Quimiocinas

La expresión de la mayoría de las citocinas está estrictamente regulada.

En general, no se detecta una producción constitutiva significativa de estas moléculas, siendo necesaria la activación celular para que se produzcan citocinas en cantidades suficientes para ejercer sus efectos biológicos.

La mayoría de las citocinas son secretadas al espacio extracelular, muchas de ellas en forma glicosilada que incrementa su estabilidad y solubilidad. No obstante, algunas citocinas se pueden acumular en el interior de la célula, o bien permanecer ancladas a la membrana o en la matriz extracelular.

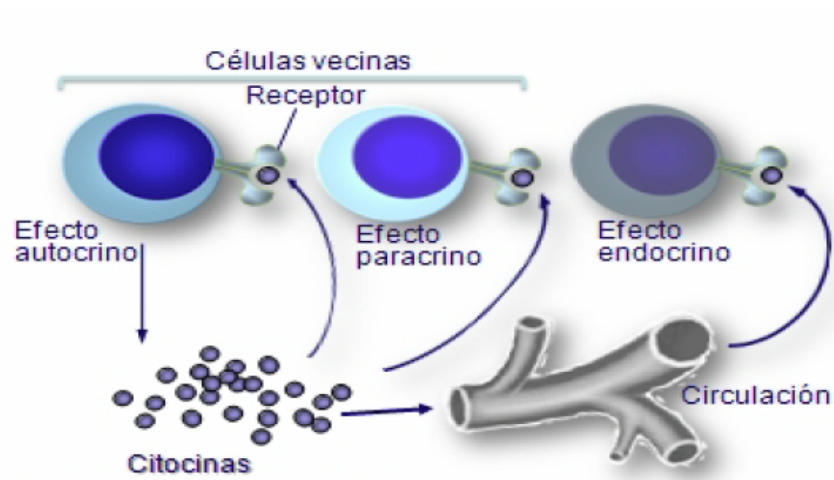
Son moléculas que poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones, del orden de picogramos, mediante la unión a receptores de alta afinidad presentes en la superficie de la propia célula productora o en otros muy variados tipos celulares.

Las citocinas tienen efectos pleomórficos ya que comparten entre ellas algunas funciones, están producidas por diferentes células del organismo y tienen múltiples células diana.

Las citocinas ejercen un efecto autocrino cuando se unen a receptores presentes en la propia célula productora. También pueden tener un efecto paracrino, actuando sobre diferentes tipos celulares que se encuentran en su vecindad. En algunos casos pueden liberarse a la

circulación sanguínea o linfática, ejerciendo su efecto en otros órganos y tejidos, actuando así como las hormonas, de forma endocrina⁴⁴.

Figura 3. Efecto Endocrino, autocrino y paracrino de las Citocinas



Dos importantes características funcionales de las citocinas son su pleiotropismo, de tal manera que una misma citocina es capaz de ejercer efectos biológicos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares, y su redundancia, es decir, que varias citocinas pueden contribuir al desarrollo de la misma función en un determinado tipo celular; consecuencia de estas propiedades es que, en ausencia de una determinada citocina, sus funciones pueden ser reemplazadas total o parcialmente por otras.

Muchas de estas características biológicas de las citocinas se pueden explicar por la estructura y amplia distribución celular de sus receptores.

Las acciones de las citocinas se engloban dentro de un sistema o red funcional, donde el efecto de una molécula está estrechamente regulado, positiva o negativamente, por otras moléculas del sistema. Así, la secreción de una citocina puede estar inducida, potenciada o inhibida por otra citocina que, a su vez, puede incrementar o inhibir la expresión de sus receptores.

Los efectos biológicos de las citocinas pueden ser muy variados, ya que, no solamente desempeñan un papel esencial en las respuestas inmunes, sino que algunas de ellas están también implicadas en la embriogénesis y en el desarrollo de órganos (por ejemplo, en la angiogénesis), otras juegan un papel clave en procesos neuroinmunes y neuroendocrinos, y muchas son importantes reguladores, tanto positivos como negativos, de acontecimientos celulares como la mitosis, la diferenciación, la migración, la supervivencia, la muerte celular, e, incluso, de su transformación maligna.

En la inflamación, la secreción de citocinas funciona como un mecanismo de cascada, en el que la estimulación de una línea celular monocito/macrófago induce la secreción de una citocina proinflamatoria, el TNF- α .

Esta secreción inicial se sigue de ondas de secreción de otras citocinas. Una vez secretadas, las citocinas ejercen sus efectos a concentraciones molares bajas, a través de interacciones altamente específicas, con receptores de la superficie celular de la célula diana. La respuesta de las células a las citocinas está determinada, en parte, por estos receptores, los cuales dependen del tipo de célula diana y de su estado de diferenciación o activación. Mientras que la expresión de algunos receptores es constitutiva, en otros está regulada por la exposición a ligandos específicos o por la activación de señales de otras citocinas⁴⁴.

Como ya se ha descrito, la respuesta inmunológica regulada por las citocinas es muy compleja, ya que existen vías redundantes en el tiempo y con efectos fisiológicos similares. Así, excepto en casos concretos como el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1ra), la mayoría de las citocinas tienen propiedades proinflamatorias y antiinflamatorias. El efecto neto de una citocina dependerá del momento de su producción, del microambiente local donde actúe, de la presencia de elementos compensadores citocínicos y de la respuesta tisular a cada citocina. Es posible, además, que ninguna citocina sea capaz de controlar una función celular específica o proceso fisiológico⁴⁵.

Las células inflamatorias detectan la presencia de un estímulo a través de receptores de superficie. A nivel intracelular esto se traduce en activación del ARN mensajero citocínico y la síntesis de proteínas^{46,47}.

La transcripción genética está regulada por proteínas específicas como el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), que al activarse da lugar a la expresión de sustancias mediadoras proinflamatorias, moléculas de adhesión y otros mediadores, regulando la expresión genética inmunomoduladora.

2.2.3 Clasificación

Es difícil establecer una clasificación funcional de las citocinas debido a su alto grado de pleiotropismo. No obstante, de acuerdo con su función más relevante, podemos clasificarlas en:

a) citocinas implicadas en el desarrollo hematopoyético: promueven el crecimiento y diferenciación de las células sanguíneas maduras a partir de células madre hematopoyéticas. Son producidas por células del estroma de la médula ósea o por linfocitos maduros activados. Son: IL-3, IL-5, IL-7, IL-9, IL- 11, CSF-GM, CSF-G, CSF-M

b) citocinas implicadas en las respuestas inmunes innatas : se producen de forma inmediata tras el contacto de las células implicadas en las respuestas inmunes innatas con un agente extraño. Los monocitos y macrófagos activados son la principal fuente de estas moléculas aunque también pueden ser producidas por linfocitos activados y otras células no pertenecientes al sistema inmune, como células endoteliales y fibroblastos. Son : IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 y TNF.

c) citocinas generadas durante las respuestas inmunes adaptativas: En respuesta a una estimulación antigénica, los linfocitos T se activan, proliferan y se diferencian hacia células efectoras específicas. Estas células ejercen sus funciones produciendo una serie de moléculas solubles, verdaderas artífices de los mecanismos efectores de la respuesta inmune adaptativa. Son : IL-2, IL-4, IL-13, IL-15, IL-16, IFN, TGF.

En relación con la respuesta inflamatoria algunas citocinas favorecen el desarrollo de la misma son los llamados mediadores proinflamatorios mientras que otras ejercen un efecto supresor de la inflamación mediadores antiinflamatorios o inmunosupresores.

Para que la defensa contra la infección se inicie de manera eficaz es necesaria la participación de citocinas con función fundamentalmente pro inflamatoria.

Estas citocinas pro inflamatorias son: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1 beta (IL-1 β), la interleucina 12 (IL-12), el interferón- γ (IFN- γ) y, posiblemente, la interleucina 6 (IL-6). Un exceso de producción de alguna de estas citocinas en una primera fase de la sepsis se ha correlacionado con el desarrollo de fracaso multiorgánico y con un incremento de la mortalidad ⁴⁸.

La respuesta pro inflamatoria inicial está controlada por moléculas inmunorreguladoras como los inhibidores específicos y los receptores solubles de las citocinas.

Las principales citocinas antiinflamatorias son : el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1 ra), el factor transformador del crecimiento beta (TGF- β) y las interleucinas 4, 6, 10, 11 y 13. Los receptores específicos para la IL-1, el TNF y la IL-18 se comportan como inhibidores de sus respectivas citocinas pro inflamatorias. En condiciones fisiológicas, todas estas moléculas sirven como inmunomoduladoras y por lo tanto, limitan el efecto potencialmente dañino de la reacción inflamatoria. Sin embargo, en condiciones patológicas, la respuesta antiinflamatoria puede ser insuficiente para contrarrestar la actividad inflamatoria o, por el contrario, ser sobrecompensadora e inhibir el sistema inmune y dejar al huésped a merced de la infección.

Es importante tener en cuenta que, a excepción del IL-1ra, las citocinas antiinflamatorias también tienen propiedades pro inflamatorias. Su acción depende del momento de su liberación, del lugar en el que actúan, de la presencia de otros elementos competitivos o sinérgicos, de la densidad de sus receptores y de la capacidad de respuesta de ese tejido a cada citocina⁴⁹.

2.2.3.1 Citocinas Proinflamatorias

2.2.3.1.1 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

Es una de las primeras citocinas que aparecen en sangre tras la activación del macrófago, a partir de genes ubicados en el cromosoma 6 y es el principal agente mediador de la respuesta inflamatoria inducida por la endotoxina.⁵⁰ Como hemos descrito anteriormente, es quien inicia la cascada de citocinas durante la respuesta inflamatoria.

Los factores de necrosis tumoral fueron descritos inicialmente por su capacidad de causar necrosis en algunos tumores, posteriormente se descubrieron las funciones que ejercen sobre las respuestas inmunes.

Se han descrito dos moléculas estrechamente relacionadas, el TNF-alfa y el TNF-beta, con un 30% de homología en su secuencia aminoacídica.

El TNF-alfa, también llamado caquectina, es producido fundamentalmente por macrófagos, neutrófilos y células endoteliales en respuesta a antígenos bacterianos tales como el LPS, pero también puede ser producido por linfocitos T y B, NK, fibroblastos y mastocitos. Es una proteína de 17 kDa que tiende a formar dímeros y trímeros simulando conos que ejercen una actividad biológica más intensa.

El TNF-beta o linfoxina, es producido exclusivamente por linfocitos T activados, es una proteína de 25 kDa compuesta por una estructura dimérica constiuida por TNF- β y una proteína transmembrana denominada linfoxina β .

Ambos TNF se unen a los mismos receptores e inducen funciones similares. Los receptores de membrana específicos para los TNF son : el tipo I β (TNF-R1), que tambien se denomina TNFRp55, y el tipo II α (TNF-R2) o TNFRp75.

El TNF-R1 pertenece a una familia de receptores denominada NGF o factor de crecimiento nervioso. Es una proteína de 55 kDa con 455 aminoácidos que se expresa en casi todas las células. Es a través de este receptor donde el TNF α ejerce su función citolítica y citotóxica. En cuanto al TNF-R2 es el que influye sobre la función de proliferación celular del TNF α .

Ambos receptores utilizan vías diferentes para la traducción de señales intracelulares, en concreto, el TNF-R1 utiliza protein cinasa C, fosfolipasa A2, esfingomielinasa y fosfatidilcolina-fosfolipasa, mientras que las vías del TNF-R2 son aún desconocidas⁵⁰.

Ambos tipos de receptores existen también de forma soluble en el plasma, actuando como moléculas antinflamatorias concentración dependientes, al inhibir el TNF por antagonismo competitivo con los

receptores de membrana, o como agonista inflamatorio, prolongando su vida media, y por tanto con efectos sistémicos perniciosos⁵¹.

El TNF α se sintetiza en forma de preproteínas requiriendo un proceso de maduración en el citoplasma para posteriormente ser excretado como activo. Tras la activación sufre un fenómeno de *up-regulation* que permite que se excreten en pocos minutos grandes cantidades, alcanzando un pico máximo en hora y media a dos horas. Posteriormente se produce el fenómeno contrario, de *down regulation*, desciende de forma brusca la producción y el macrófago entra en período refractario que dura 12 a 24h.

Los efectos que produce en el organismo el TNF α son debidos en su mayoría por la molécula en sí, pero otros efectos están en relación con la activación de la cascada de mediadores que amplifican y propagan sus efectos.

Estimula la liberación de IL-1, IL-6, induce la expresión de moléculas de adhesión y estimula la producción de IL-8 por células del endotelio vascular, lo que contribuye a la extravasación de linfocitos, neutrófilos y monocitos, además de aumentar su actividad antimicrobiana. Activa el complemento y la coagulación, estimulando la síntesis y liberación de factor tisular (tPA), pero también la fibrinolisis estimulando la síntesis de activador tisular del plasminógeno en un primer momento,

para después inhibirlo al inducir la síntesis del inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1). Produce daño endotelial y activa la apoptosis de las células endoteliales. Estimula el catabolismo proteico y la gluconeogénesis, elevando la temperatura corporal y produciendo caquexia y sueño al actuar sobre el SNC, altera el tono vascular e incrementa la permeabilidad capilar.⁵⁰

Recientemente se han descrito nuevos TNF que ejercen de ligandos de diversos antígenos de membrana de los linfocitos T reconocidos por anticuerpos monoclonales: CD27L, CD30L y CD40L⁵².

2.2.3.1.2 Interleucina-1 (IL-1)

Es producida fundamentalmente por monocitos y macrófagos, pero también por células dendríticas, endoteliales, NK y otros tipos celulares.

Existen dos formas, IL-1 α e IL-1 β que, aunque solamente tienen un 25 % de homología en su secuencia aminoacídica, comparten el mismo receptor y ejercen efectos biológicos similares. Ambas están formadas por tres polipéptidos cuyos genes están situados en el cromosoma 2.

La IL-1 es sintetizada en forma de precursor como respuesta a sustancias de origen microbiano o por la activación de la cascada de la inflamación. La IL-1 β necesita ser clivada mediante la enzima convertidora

de IL-1 β para conseguir su máxima actividad biológica, y se libera activamente a la circulación mediante un mecanismo de exocitosis, transporte activo o destrucción celular. Por el contrario, la IL-1 α permanece en el citosol celular en forma de precursor o es transportada como tal a la superficie celular, en donde realiza una acción paracrina⁵³.

Existen dos tipos de receptores en la superficie celular para la IL-1, son el IL-1 R1 o tipo I y el IL-1 R2 o tipo II. El tipo I, con mayor afinidad por la IL-1 α es el responsable de la mayoría de los efectos celulares de la IL-1, y está presente en casi todas las células. El tipo II se expresa fundamentalmente en neutrófilos, monocitos, linfocitos B y células de la médula ósea, presentando mayor afinidad por la IL-1 β .⁵³

Existen, además, en diversos fluidos corporales receptores solubles que actúan como antagonistas competitivos de los receptores de membrana tipo I y tipo II, y regulan la actividad de la IL-1 β .

El receptor antagonista de la IL-1 (IL-1ra) es una proteína de 25 kDa que carece de efecto biológico por sí misma, y es sintetizada por gran variedad de células inflamatorias. Su función es actuar como agonista competitivo de corta duración sobre el receptor IL-1 R1, inhibiendo la IL-1 sin producir señal de transducción, motivo por el hoy en día es incluido como mediador antiinflamatorio^{49,54}.

El estímulo para la secreción de IL-1ra son todas las citocinas que inhiben la secreción de IL-1, es decir, IL-4, IL-6, IL-10 y IL-13. En estudios experimentales en animales, se ha objetivado que la administración de IL-1ra previene el desarrollo de SIRS durante la sepsis por gram-negativos. En estudios en ratones se ha visto que un ratón deficiente en IL-1ra es más susceptible de padecer los efectos letales de la endotoxina, y por el contrario, un animal transgénico que produzca IL-1ra en exceso, estará más protegido. En los procesos inflamatorios como la sepsis, los niveles circulantes de IL-1ra ascienden más tarde que los de IL-1 β , y en cantidad que supera las 100 veces. Esta secuencia temporal es la misma que sucede con los receptores solubles del TNF α , y representa un mecanismo de control de la inflamación. La administración a voluntarios sanos a los que les había administrado endotoxina, redujo la gravedad de los síntomas, pero hoy en día todavía existen discrepancias sobre el valor pronóstico de los niveles plasmáticos de IL-1ra, y mientras que unos autores encuentran que tiene valor predictivo en discriminar supervivientes de no supervivientes, otros autores sólo la han relacionado con el desarrollo de shock ⁵⁵.

IL-1 es un potente pirógeno, induce en los monocitos su propia síntesis y la de TNF α (con el que actúa de forma sinérgica) e IL-6, es un factor quimiotáctico de los neutrófilos, monocitos y linfocitos, a través de la inducción de quimiocinas (IL-8) y la modulación de las células de

adhesión. Induce la producción de mediadores lipídicos (factor activador de las plaquetas y eicosanoides), aumenta la expresión de genes para colagenasas y fosfolipasas, y estimula la síntesis de ON (óxido nítrico). IL-1 y TNF α actúan biológicamente de forma sinérgica ⁵⁶.

2.2.3.1.3 Interleucina (IL-8)

Es una proteína básica, de bajo peso molecular de la familia de las quimiocinas. Es producida por fibroblastos, células endoteliales, polimorfonucleares, monocitos y macrófagos en respuesta a la endotoxina o a la IL-1 y TNF.

Es una citocina proinflamatoria que actúa como factor quimiotáctico y activador de neutrófilos, en los que induce su degranulación, cambios morfológicos y quimiotaxis; regula la producción de proteínas de adhesión y la formación de lípidos bioactivos que dan lugar a una amplificación de la respuesta inflamatoria local y lesión tisular.

Tiene una duración de efecto prolongada por ser resistente a la inactivación por proteólisis y a la desnaturalización, además de retardarse su aclaración al unirse a compuestos constitutivos de los tejidos ⁵⁷. También se ha descrito su acción quimiotáctica para eosinófilos y basófilos, así como su potente factor angiogénico.

2.2.3.1.4 Interleucina 12 (IL-12)

Es una citocina de carácter proinflamatorio, implicada como mediador de la respuesta inmunológica en infecciones bacterianas por patógenos intracelulares, virus y parásitos⁵⁸.

Es producida mayoritariamente por monocitos/macrófagos, aunque su producción puede ser también inducida en células dendríticas y linfocitos B.

Inicialmente se describió como el factor estimulador de las células asesinas naturales (NK), pero la actual importancia de esta citocina deriva en su capacidad de dirigir la diferenciación de los linfocitos Th hacia células efectoras tipo Th1 de la hipersensibilidad retardada.

La forma madura de esta molécula (p75) está compuesta de dos subunidades, p35 y p40. La síntesis de ambas subunidades está regulada diferencialmente, siendo ambas necesarias para la actividad funcional del heterodímero.

La IL-12 incrementa la actividad citotóxica de las células NK e induce células LAK (linfocitos asesinos activados por linfocinas). Incrementa la producción de IFN- γ por linfocitos T y células NK y activa linfocitos T citotóxicos.

Recientemente se ha descrito un factor proteico denominado p19, sin actividad biológica por sí mismo, que se combina con la subunidad p40 de la IL-12 para dar lugar a una nueva citocina biológicamente activa denominada IL-23. Esta citocina es producida por células dendríticas activadas, se une al receptor de la IL-12 y comparte algunas de las funciones biológicas con ella.

2.2.3.1.5 Interleucina 18 (IL-18)

Citocina estrechamente relacionada en sus funciones biológicas con la IL-12, ya que posee la misma capacidad de inducción de IFN-gamma (IFN- γ) en linfocitos T y células NK. Sin embargo, es producida por diferentes tipos celulares que la IL-12, siendo las células adrenales y de Kupffer las principales fuentes de producción de la IL-18.

IL-12 e IL-18 actúan de forma sinérgica estimulando la producción de INF- γ ; además la IL-12 incrementa la respuesta celular a la IL-18 al modular la expresión de su receptor.

El receptor de la IL-18 es homólogo al dominio intracelular del receptor Toll-like. El receptor soluble de la IL-18, muy relacionado con la IL-1, puede actuar como molécula antiinflamatoria al impedir su unión con los receptores de membrana⁵⁸.

2.2.3.1.6 Interferón-gamma (INF- γ)

Es una glicoproteína codificada en el cromosoma 12q constituida por tres monómeros.

Su síntesis se induce por la estimulación de IL-1, IL-2 y agentes microbianos en linfocitos T4 (CD4+), células con memoria inmunitaria (CD45PA), células T8 (CD8+), células citocidas naturales (CD16, CD56), células dendríticas (CD23, CD35) y linfocitos B (CD22,CD23).

Tiene un gran número de receptores expresados por todas las líneas celulares humanas. También se ha descrito un receptor soluble que tiene una función inhibitoria y reguladora, como el de otras moléculas.

Participa en la regulación de la respuesta inmunitaria e inflamatoria. Sus acciones más relevantes son : promover la liberación de TNF- α , IL-1 e IL-6 por parte del macrófago activado, actuar de forma sinérgica con el TNF- α incrementando su actividad citotóxica y citostática, aumentar la producción de moléculas de adhesión, además de inducir cambios morfológicos en las células endoteliales, estimular el linfocito B activado, aumentar la adhesión al endotelio del linfocito T, incrementar la activación del polimorfonuclear y actuar como pirógeno⁵⁹.

En la sepsis no sólo no se ha encontrado elevación de esta molécula en los estudios realizados sino que incluso parece que su producción *in vitro* es menor que en voluntarios sanos⁶⁰.

2.2.3.1.7 Interleucina 2 (IL-2)

Es una proteína de 133 aminoácidos y 15.4 kDa cuyo gen se localiza en el cromosoma 4 (4q26-28) .

Es secretada por linfocitos T CD4+ y CD8+ activados en respuesta a un estímulo antigénico.

Inicialmente se describió como factor de crecimiento de células T, ya que es el principal agente que controla su proliferación. Ejerce otros muchos efectos sobre el sistema inmune, teniendo un papel esencial en el desarrollo de las respuestas inflamatorias crónicas, tanto humorales como celulares. Es un factor estimulador del crecimiento de linfocitos T , B y NK. Promueve la actividad citotóxica mediada por linfocitos T y células NK, así como el desarrollo de células LAK (células asesinas activadas por citocinas).

Tras unirse a un receptor de membrana que se expresa modulado por IL-15 e IL-6 en linfocitos T, activa la secreción de IFN-alfa, linfoxina, IL-4, IL-3, IL-5 y GM-CSF. Sobre los linfocitos B estimula su crecimiento y diferenciación e incrementa la expresión de moléculas de MHC de clase II ⁶¹.

2.2.3.1.8 Interleucina 15 (IL-15)

Glucoproteína de 1415 kDa que se une a las cadenas beta y gamma del receptor de la IL-2 participando en el proceso de transducción de señal. Es secretada por una amplia variedad de células, entre las que se incluyen células epiteliales, monocitos, músculo esquelético, hígado, pulmón y placenta.

Destaca su gran similitud funcional con la IL-2, con la que comparte la mayoría de sus actividades biológicas, como la estimulación de células NK, y la proliferación y diferenciación linfocitaria.

2.2.3.1.9 Otros mediadores proinflamatorios

En la fisiopatología de la sepsis existen otros mediadores con características proinflamatorias, como la IL-16, la IL-17, el factor inhibidor de la leucemia, el oncostatín M, el factor neurotrófico ciliar, los factores estimuladores de las colonias y el factor inhibidor de la migración de los macrófagos entre otros⁶².

2.2.3.2 Mediadores Antiinflamatorios

2.2.3.2.1 Interleucina 6 (IL-6)

Es una glucoproteína de 185 aminoácidos producida fundamentalmente por monocitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea. Su liberación se induce por la IL-1, y junto con ella es la principal inductora de la síntesis de proteínas de fase aguda del hígado ⁶³, sobre todo de fibrinógeno. Es un pirógeno endógeno.

Posee características pro y antiinflamatorias, aunque en la actualidad se le confiere más importancia a su actividad antiinflamatoria⁶⁴. Una de sus principales funciones es atenuar la síntesis de mediadores proinflamatorios promoviendo la síntesis de IL-1ra y de TNF-R. Además de su efecto en la inflamación, se ha observado que promueve la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, induciendo la producción de inmunoglobulinas. También puede aumentar la producción de IL-2 y el desarrollo de los precursores hematopoyéticos dependientes de la IL-3 . Estimula la producción de ACTH en la hipófisis.

Las concentraciones plasmáticas de IL-6 se relacionan en numerosos estudios con la gravedad y el pronóstico de las sepsis, actuando como marcador de respuesta inflamatoria ^{62,63,65}.

2.2.3.2.2 Interleucina 10 (IL-10)

Polipéptido producido por linfocitos del tipo Th2, así como también por monocitos/macrófagos, linfocitos B, queratinocitos y otros varios tipos celulares. Es la citocina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la síntesis de muchas otras citocinas, entre las que están el IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-12, y la expresión de MHC-II y moléculas de adhesión en monocitos.

Tiene efectos antiproliferativos sobre muchos tipos celulares.

La IL-10 ejerce además múltiples actividades inmunomoduladoras. Se ha visto que es un cofactor para el crecimiento de líneas y colonias de células mastocíticas *in vitro*. Regula las funciones mediadas por linfocitos B induciendo la síntesis de IgG, y por linfocitos T, influyendo en el desarrollo de timocitos y células T. También ejerce efectos reguladores sobre la angiogénesis. El virus de Epstein Barr secreta una proteína que posee una gran homología estructural con la IL-10 humana (vIL-10), y que tras unirse con baja afinidad al propio receptor de la IL-10, ejecuta actividades biológicas similares.

Relacionadas estructural y funcionalmente con la IL-10 se han descrito recientemente nuevas moléculas tales como la IL-19, IL-20 e IL-22, cuyas funciones son todavía poco conocidas.

La expresión de concentraciones elevadas de IL-10 y reducidas de TNF se ha relacionado con peor pronóstico en la sepsis meningocócica,

predisponiendo al huésped a las infecciones fulminantes⁶⁶. Concentraciones bajas de IL-10 pueden tener consecuencias deletéreas, objetivándose que cuando en el pulmón los niveles de esta interleucina son bajos se correlacionan con desarrollo de SDRA⁶⁷.

2.2.3.2.3 Interleucina 4 (IL-4)

Es una proteína de 20kd producida por linfocitos Th2, mastocitos, basófilos, células del estroma de la médula ósea y, posiblemente, por determinadas subpoblaciones de células NK.

Es una citocina que ejerce numerosos efectos en diferentes tipos celulares. Promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia células de tipo Th2, inhibiendo la generación de células Th1. Posee efectos inmunosupresores, ya que inhibe la producción de determinados mediadores inflamatorios de los macrófagos como es el óxido nítrico, así como la síntesis de IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 y la proteína inflamatoria del macrófago. Puede también actuar como mediadora proinflamatoria al ser inductora de la síntesis de IL-1Ra, que también bloquea la acción de la IL-1⁶⁸.

Es una interleucina promotora del desarrollo de las respuestas inmunes humorales a través de la inducción del crecimiento y diferenciación de linfocitos B, produciendo el cambio isotípico hacia IgG4 e IgE e incrementando la expresión de moléculas CD23 en linfocitos B,

basófilos y eosinófilos. Está relacionada con el desarrollo de los procesos alérgicos y con el incremento de IgE en las infecciones parasitarias.

2.2.3.2.4 Interleucina 13 (IL-13)

Es una proteína no glucosilada de 132 aminoácidos que participa de forma relevante como reguladora de la función de los monocitos y de los linfocitos B. Es producida por linfocitos T activados del tipo Th2, compartiendo muchas de sus funciones con la IL-4 con la que se encuentra genéticamente relacionada, y con la que comparte mismo receptor.

Es una citocina con actividad inmunosupresora ya que inhibe, junto con la IL-4 y la IL-10, la producción de citocinas inflamatorias por los monocitos (IL-1beta, TNF-alfa, IL-8, IL-6). Interviene en la expresión de moléculas de la superficie de monocitos y macrófagos (integrinas, antígenos del MHC de clase II, receptor de CD14 y FC γ) e inhibe al NF-kB.

Incrementa la proliferación y diferenciación de monocitos y células B, incrementa la expresión de CD23 y promueve el cambio de clase de inmunoglobulinas hacia la producción de IgE. Tiene poco efecto sobre la diferenciación, proliferación y actividad de las células Th2, a diferencia de la IL-4⁶⁷.

2.2.3.2.5 Interleucina 11 (IL-11)

Citocina peptídica no glucosilada de 178 aminoácidos producida por fibroblastos del estroma de la médula ósea y otros tipos celulares. Estimula la megacariocitopoyesis y sinergiza con otras citocinas para estimular el crecimiento de otros precursores hemáticos.

Comparte algunas funciones con la IL-6, como la inducción de proteínas de fase aguda en el hígado. También se ha descrito su capacidad como estimuladora de la secreción de inmunoglobulinas por células B en respuestas T-independientes.

Inhibe la síntesis de IL-1 y TNF por los macrófagos a través de la inhibición del NF- κ B e inhibe la síntesis de IFN- γ e IL-2 por las células t CD4⁺ ⁶⁷.

2.2.3.2.6 Factor transformador del crecimiento β (TGF- β)

Hay dos tipos de factores transformadores del crecimiento, el TGF-alfa y el TGF-beta, que no poseen ninguna similitud estructural ni comparten los mismos efectos. Solamente el TGF-beta tiene efectos inmunomoduladores.

Es producido por linfocitos T, plaquetas y otros muchos tipos celulares en forma de precursor inactivo, y presenta 5 isoformas diferentes. Es el inhibidor del crecimiento más potente que se conoce.

Sus actividades biológicas dependen no sólo del tipo celular sobre el que actúen y de su concentración, sino de la presencia de otros factores locales.

El TGF- β puede convertir un sitio de inflamación activa en un lugar de resolución y reparación por su efecto sobre la proliferación de fibroblastos, osteoblastos y células musculares lisas, incrementando también la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, lo que favorece la curación de las heridas. Tiene efecto proinflamatorio y antiinflamatorio, este último se lleva a cabo mediante la modificación y antagonización de otras citocinas. Puede llevar a cabo actividades inmunorreparadoras a nivel local, e inmunosupresoras a nivel sistémico.

En el sistema inmune inhibe la síntesis y/o el efecto del IFN-gamma, TNF-alfa, TNF-beta, IL-1, IL-2 e IL-3, así como la citotoxicidad natural y específica. Actúa de forma muy similar, aunque menos potente que la IL-10 en la desactivación de los monocitos/macrófagos ⁶⁹.

Es una citocina que carece de valor como mediador pronóstico en la fase precoz de la sepsis, pero a partir del séptimo día se ha visto relacionado con la mortalidad, por lo tanto, parece definido que es un mediador antiinflamatorio implicado en el síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora (CARS) ^{70,71}.

2.3 MEDIADORES CELULARES

2.3.1 Monocito-macrófago

Es una célula fagocítica mononuclear que actúa como célula microbicida y citotóxica, realizando una función inmune como presentadora de antígenos.

Los monocitos circulantes poseen un núcleo en forma de haba y un citoplasma finamente granular que contiene lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos citoesqueléticos. Los monocitos se adhieren a la pared arterial debido a la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales (ICAM-1 y 2, VCAM-1, ELAM-1 o E-selectina y P-selectina o GMP-140), que son reconocidas por las glicoproteínas existentes en la superficie del monocito.

Estas células expresan integrinas $\beta 2$ que son mediadores en la adhesión a la matriz extracelular y también juegan un papel importante en la adhesión célula-célula, además de actuar como receptoras del complemento, del fibrinógeno, del factor X y de microorganismos sin opsonizar⁷².

Los monocitos migran al espacio subendotelial donde proliferan y se diferencian en macrófagos. El factor estimulante de colonias de

macrófagos (M-CSF) desempeña un papel clave en esta diferenciación⁷³, que además se acompaña de la expresión de receptores basurero⁷⁴.

Se activa a partir de productos microbianos como la endotoxina y la citocinas producidas por las células T (IFN- γ). induciendo la síntesis de mediadores inflamatorios de carácter proteico (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, metaloproteasas de la matriz (MMPs)) y lipídico (factor activador de los plaquetas, eicosanoides), radicales libres de O₂, peróxido de hidrógeno, y NO. La neopterina, pteridina de bajo peso molecular que se produce como metabolito de la síntesis de la guanosina trifosfato a tetrahidrobiopterina se ha descubierto como principal marcador de la activación de los macrófagos⁷⁵.

La función normal de los macrófagos, es además de actuar como células basurero ("scavenger"), la de presentar el antígeno a los linfocitos T.

2.3.2 Neutrófilo

Son células inmunorreguladoras que juegan un importante papel en la lesión tisular.

Su función durante la infección es la destrucción y neutralización de los microorganismos invasores y en el mecanismo de respuesta inflamatoria incrementan el número y actividad de las moléculas de

adhesión, producen radicales libres, sintetizan lípidos bioactivos y producen enzimas granulares (proteínas séricas neutras, metaproteinasas y mieloperixidasas), proteínas antibacterianas como el BPI, proteínas antimicrobianas catiónicas y defensina, así como citocinas pro y antiinflamatorias.

A destacar, dentro las proteínas séricas neutras generadas por los neutrófilos, la *elastasa*, sintetizada en los gránulos azurófilos de los granulocitos, es un potenter agente proteolítico, y, el principal mediador inflamatorio producido por los neutrófilos.

La *elastasa polimorfonuclear* es la responsable de la lesión entotelial producida por los neutrófilos. Se encuentra formado complejos con sus inhibidores (α 1-proteinasa inhibidor y α 2-macroglobulina), y estimula la activación del sistema del complemento, la coagulación y la fibrinolisis mediante la inactivación de los principales mecanismos de inhibición de estos sistemas, como son el inhibidor C1, antitrombina III y α -1-antitripsina. Actúa también sobre la trombomodulina endotelial interfiriendo en la activación de la proteína C⁷⁶.

2.3.3 Célula endotelial

Es una de las principales diana de los mediadores inflamatorios que se liberan durante el proceso séptico.

El endotelio vascular es una estructura dinámica con múltiples funciones fisiológicas que se mantiene en equilibrio gracias a la existencia de una homeostasis entre las células endoteliales vasculares y de la musculatura lisa.

El endotelio está formado por una monocapa continua de células endoteliales unida a la membrana basal subyacente. Representa la superficie no trombogénica que los vasos sanguíneos exponen a la sangre. Las células endoteliales son células polarizadas, con un dominio apical en contacto con la sangre y uno distal basal en contacto con el subendotelio.

El endotelio sano es una monocapa quiescente, cuya mitosis celular está inhibida por contacto, reflejando la estabilidad e integridad de la pared vascular. Las células endoteliales forman complejas uniones intercelulares y sintetizan componentes de la matriz extracelular como fibronectina y componentes de la lamina basal entre los que se incluyen: proteoglicanos, heparán sulfato, laminina, nitrógeno y colágeno tipos IV y V. Todos estos componentes interactúan a través de dominios de unión específicos formando una red tridimensional. Para mantener la integridad de la monocapa endotelial, las células deben formar uniones con la lámina subyacente y con las células adyacentes ⁷⁷.

El endotelio vascular se considera como el principal órgano de regulación de numerosas funciones vasculares a través de sus acciones endocrina, paracrina y autocrina.

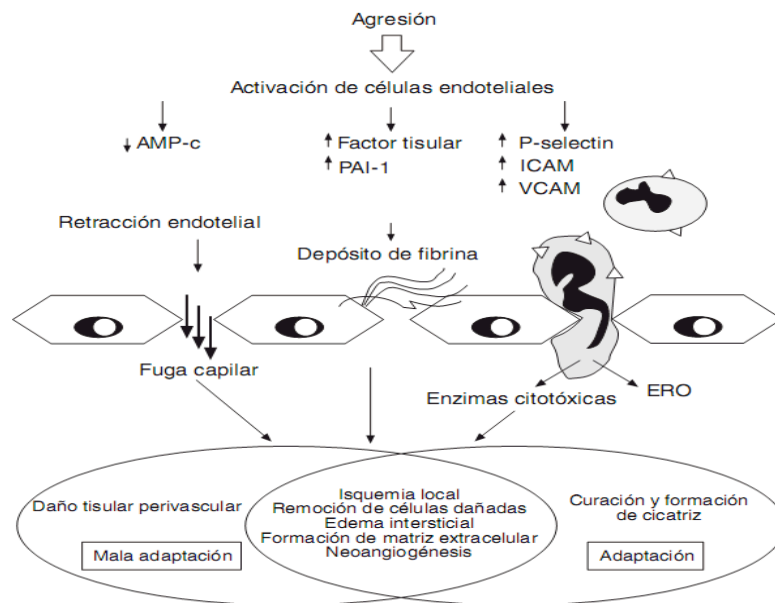
En respuesta a sus interacciones con las células sanguíneas (plaquetas, leucocitos y monocitos), con fuerzas físicas (presión, rozamiento) y con sustancias circulantes o liberadas por células cercanas (angiotensina, catecolaminas, cininas, prostaglandinas, etc.), las células endoteliales son capaces de liberar diversos factores vasodilatadores como el NO, la prostaciclina(PGI₂), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF); vasoconstrictores como las endotelinas (ET), la prostaglandina H₂ (PGH₂), el tromboxano A₂ (TXA₂); diversos factores promotores del crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor-1 de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) y endotelina-1 (ET-1); inhibidores del crecimiento como heparinoides (HPS), factor de crecimiento transformante (TGF), ON y PGI₂; moduladores de la inflamación como las moléculas de adhesión endotelial de leucocitos (ELAM), moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y moléculas de adhesión vascular (VCAM) o vWF ⁷⁸; así como factores hemostáticos y trombolíticos como t-PA, u-PA, PAI-1, factor V, TF y trombomodulina.

Todos estos factores modulan el tono y el crecimiento del músculo liso vascular, así como la coagulación, la fibrinólisis y la adhesión de

células sanguíneas a la pared vascular. En condiciones normales existe un equilibrio entre las acciones de los diferentes factores endoteliales⁷⁹. Sin embargo los equilibrios pueden alterarse en presencia de ciertos agentes que inducirían una disfunción. Entre ellos se encuentran citocinas, proteasas, agentes virales, variaciones de la fuerza de cizalladura, radicales libres, lípidos oxidados y homocisteína.

Durante la sepsis grave se produce lesión endotelial y con ello trastornos en la perfusión, producción de mediadores tóxicos, alteración de la permeabilidad capilar, alteración de la adhesión leucocitaria regulada por las moléculas de adhesión celular, alteraciones del tono vascular y la coagulación, esto último desencadenado por la modificación por parte de la célula endotelial de un fenotipo anticoagulante y profibrinolítico por un fenotipo procoagulante y antifibrinolítico⁸⁰.

Figura 4. Respuesta endotelial a la agresión. Modificada de Ten V, Pinsky D⁸¹. AMPc: 3', 5'-adenosin monofosfa-to cíclico; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno 1; ICAM: moléculas de adhesión intracelular; VCAM: moléculas de adhesión intercelular;ERO: especies reactivas de oxígeno.



En algunos estudios se ha visto que la sepsis induce cambios específicos diferentes en las células del endotelio vascular de los distintos órganos explicando las diferencias en respuesta de los mismos a la estimulación inflamatoria global de la sepsis. Estos cambios inflamatorios podrían ser distintos según la causa de la sepsis y las diferencias genéticas individuales contribuyendo a la variada expresividad clínica del síndrome⁸².

2.4 MEDIADORES INFLAMATORIOS SECUNDARIOS

2.4.1 Oxido Nítrico

El oxido nítrico (ON) es un radical libre con efecto vasodilatador, liberado por el endotelio y que actúa como regulador de la función celular y de la comunicación intercelular. Está implicado en numerosos procesos biológicos: actúa como neurotransmisor, regula el tono vascular, inhibe la agregación plaquetar y la adhesión leucocitaria⁸³.

Furchgott y Zawadzki demostraron en 1980⁸⁴ que el endotelio poseía y liberaba una sustancia con efectos vasodilatadores y la denominaron factor relajante del endotelio. Salvador Moncada realizando estudios en células endoteliales, identificó pocos años después a este factor relajante del endotelio como el ON⁸⁵.

El ON se sintetiza en otras muchas células además de las endoteliales, como son macrófagos, neutrófilos, plaquetas, células adrenales, de la retina, miocardio y células de Kupffer entre otras.

Se sintetiza a partir del nitrógeno de la guanidina terminal de la L-arginina por la acción de una ON-sintetasa (ONs), que produce ON y L-citrulina. Posteriormente el ON reacciona con el O₂ para formar ON₂, que se degrada a nitrito (ON⁻²) y nitrato (ON⁻³), el nitrito reaccionará con la oxihemoglobina, formando metahemoglobina y nitrito⁸⁵.

Existen varias isoformas de ONs, una de ellas es la cONs, presente en las células endoteliales y neuronales. El ON producido por esta sintetasa cONs activa la guanidilciclasa y genera GMPc, que será responsable de la relajación vascular, la inhibición de la adherencia y agregación plaquetaria, la inhibición de la quimiotaxis de los neutrófilos y actuará como señal de transducción en el sistema nervioso central y periférico. En presencia de endotoxina y algunas citocinas, algunas células del sistema inmunológico como macrófagos, hepatocitos, células de la musculatura, miocitos cardiacos, islotes pancreáticos, condrocitos, células endoteliales y astrocitos, producen ON a través de otra isoforma de ONs que se denomina iONs. El ON así producido activa la guanilato-ciclasa, que activa e inhibe otros sistemas enzimáticos.

El ON es responsable durante la sepsis de la hipotensión arterial y de la hiporreactividad a los fármacos vasopresores, reacción mediada por el GMPc, que actúa mediante dos mecanismos. Por una parte el ON disminuye los niveles de calcio intracelular y aumenta la permeabilidad de los canales de potasio, llevando a la hiperpolarización de la membrana plasmática, lo cual provoca una contracción subsiguiente. Por otro lado, el GMPc activa proteincinasas que desfosforilan las cadenas de miosina, evitando la activación del sistema miosina/actina, causando en el shock séptico disfunción miocárdica.

El ON en grandes cantidades es tóxico para los macrófagos y células endoteliales, actuando como radical libre, e inhibiendo la

respiración mitocondrial y la síntesis de ADN. Además, al actuar como antiagregante plaquetario y leucocitario sobre el endotelio vascular disminuye la permeabilidad capilar y con ello el paso de los leucocitos a los tejidos.

Por otra parte tiene también efectos beneficiosos al permitir el mantenimiento del flujo sanguíneo durante los estados de shock séptico y con ello el aporte de O₂ a los tejidos; así como en experimentación se ha visto efecto protector de la mucosa gástrica a la ulceraciones de estrés, actuando como vasodilatador endógeno y manteniendo por lo tanto la permeabilidad vascular y la perfusión mesentérica y hepática. Así mismo, su potente efecto antioxidante limita el daño producido por el anión superóxido de los neutrófilos durante la endotoxemia.

2.4.2 Radicales libres de oxígeno

El estrés tisular producido por la respuesta inflamatoria en la sepsis dificulta el metabolismo oxidativo celular generando excesiva cantidad de metabolitos del oxígeno como el ya descrito ON, peróxido de hidrógeno, superóxido y radical hidroxilo, que saturan las enzimas reductoras (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión-peróxidasa), no pudiendo ser neutralizados adecuadamente.

Estos radicales libres van a actuar sobre la microcirculación, provocando vasodilatación e incremento de la permeabilidad capilar, pero

además van a potenciar la respuesta inflamatoria originando factores quimiotácticos para los neutrófilos y monocitos, que atacan la matriz extracelular y las membranas celulares por medio de la formación de lipoperóxidos⁸⁶.

2.4.3 Mediadores lipídicos

Tras la activación de la cascada inflamatoria, la enzima fosfolipasa A2 metaboliza los fosfolípidos de la membrana de las células inflamatorias produciendo factor activador de las plaquetas (PAF) y ácido araquidónico (AA), que por la vía de la ciclooxigenasa forma prostaglandinas y tromboxanos, y por la vía de la lipooxigenasa dará lugar a la formación de leucotrienos⁸⁷.

Estos mediadores inflamatorios lipídicos funcionan como mensajeros intracelulares secundarios, dianas en la modulación de la activación de las células inflamatorias intracelulares y extracelulares.

2.4.3.1 Factor Activador de las plaquetas (PAF)

Es un fosfolípido quimiotáctico y estimulante de plaquetas, macrófagos y neutrófilos. Es liberado como respuesta a un estímulo inmunitario (un antígeno, la IL-1 o Ig E) o no inmunitario (ionóforos de calcio, factores quimiotácticos, trombina). Puede ser producido por

plaquetas, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, mastocitos, linfocitos y células endoteliales.

Sus efectos son producidos directamente, uniéndose al receptor de superficie de las células y activándolas, induciendo agregación plaquetaria y quimiotaxis neutrofílica.

También el PAF puede ejercer un efecto indirecto, tras activar la célula induce la liberación de histamina en los mastocitos, serotonina y tromboxano A2 en las plaquetas, y superóxido y metabolitos del ácido araquidónico en los neutrófilos.

De forma experimental se ha visto que la administración exógena de PAF reproduce las alteraciones fisiológicas asociadas a la sepsis: hipotensión sistémica, hipertensión pulmonar, leucopenia, trombocitopenia, edema pulmonar, depresión miocárdica, insuficiencia renal, úlcera gástrica, enteritis necrotizante, coagulación intravascular diseminada y alteraciones metabólicas⁸⁸.

2.4.3.2 Eicosanoides

Los eicosanoides son productos derivados del AA.

El AA se genera por la acción de la fosfolipasa A2 sobre los fosfolípidos que componen la membrana celular del macrófago. La fosfolipasa A2 actúa como proteína de fase aguda, incrementando sus niveles en presencia de TNF- α , IL-1 e IL-6.

Su activación contribuye al desarrollo de la disfunción multiorgánica, mediada directamente por un efecto citotóxico, e indirectamente produciendo la liberación de enzimas proinflamatorias.

La endotoxina estimula la capacidad de los macrófagos para producir metabolitos del ácido araquidónico a través de la vía de la ciclooxigenasa (prostaglandinas y tromboxanos) o de la vía de la lipooxigenasa (leucotrienos).

El tromboxano A₂ es un potente vasoconstrictor y activador de la agregación plaquetaria, y se ha relacionado con el aumento de resistencias pulmonares, la disminución de la compliance pulmonar y la hipoxemia durante la sepsis.

Los leucotrienos actúan como factores quimiotácticos, incrementan la permeabilidad vascular y promueven la adherencia del neutrófilo al endotelio.

Las prostaglandinas (PGE₁ y PGI₂) actúan como sustancias vasodilatadoras, disminuyen la actividad procoagulante y pueden mejorar la oxigenación tisular⁸⁷.

2.5 COAGULACIÓN EN LA SEPSIS

2.5.1 Generalidades

Hace más 30 años que se demostró que la activación de la coagulación se correlacionaba positivamente con el shock en los pacientes con sepsis, y que esta activación era independiente del agente infeccioso, ya que los gérmenes gramnegativos, grampositivos y los parásitos eran capaces de desencadenar esta respuesta.

Los conocimientos aportados por la biología molecular han mejorado la comprensión de la relación entre coagulación e inflamación en el contexto de la sepsis y numerosos estudios clínicos se han publicado sobre el tema. En los pacientes sépticos la coagulación intravascular diseminada (CID) aparece frecuentemente, pudiendo complicar la ya compleja situación clínica y contribuir a su alta mortalidad⁸⁹.

En los últimos años se ha podido demostrar que el sistema de coagulación es activado por productos bacterianos (endotoxina o LPS) y los mediadores de la inflamación. Los cambios inducidos por la endotoxina cambian las propiedades del endotelio vascular desde el estado profibrinolítico y anticoagulante normal a un estado antifibrinolítico y procoagulante.

La activación del sistema de coagulación y la coagulopatía microvascular son parte de la respuesta del huésped a la infección, existiendo una estrecha relación entre la coagulación microvascular, la sepsis y la mortalidad de los pacientes sépticos.

Los pacientes con sepsis grave presentan frecuentemente trombocitopenia, niveles elevados de productos de degradación de fibrina o D-dímero, que son marcadores de coagulopatía microvascular.

Las citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL1, IL6, IL-8)⁹⁰⁻⁹² incrementan la expresión del factor tisular, principal activador de coagulación en la sepsis, sobre la superficie de las células endoteliales y monocitos, e inhiben la expresión en la superficie de las células endoteliales del receptor de la proteína C, la trombomodulina, bloqueando de esta manera la activación de la vía anticoagulante de la proteína C.

Estudios in vitro han demostrado que estas citoquinas reducen la expresión del activador tisular del plasminógeno (t-PA) y producen una intensa liberación del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). Los neutrófilos activados en el curso de la respuesta inflamatoria producen y liberan la enzima proteolítica elastasa que destruye a la antitrombina III (ATIII) y trombomodulina, disminuyendo de esa manera la actividad de los anticoagulantes naturales.

La proteína de fase aguda PCR (proteína C reactiva), secretada en el hígado en respuesta a citoquinas proinflamatorias (fundamentalmente la IL-1) regula de forma positiva el factor tisular de la coagulación.

Todas estas acciones contribuyen a la aparición del estado procoagulante característico de la respuesta inflamatoria sistémica, que lleva al consumo de los factores de coagulación y de los anticoagulantes naturales, y a una ruptura del balance normal entre la coagulación y la fibrinólisis.

La inflamación activa la coagulación, pero a su vez la activación de la cascada de la coagulación promueve la aceleración de la respuesta inflamatoria aguda.

La enzima trombina, que es responsable de la formación del trombo, es también un mediador mayor de la inflamación, ya que induce la regulación positiva de las selectinas E y P, mediadores fundamentales en el inicio del proceso de paso de los neutrófilos de la circulación sanguínea a los tejidos⁹³ e induce por efecto directo la activación de las células endoteliales, leucocitos y plaquetas. A través de sus funciones proinflamatorias y procoagulantes, la formación inapropiada de trombina puede contribuir a algunas de las complicaciones de la sepsis, incluyendo disfunción vascular y adhesión leucocitaria. El depósito de fibrina produce microtrombos en la circulación, lo que genera isquemia tisular.

2.5.2 Alteraciones de las Plaquetas

La alteración plaquetar desempeña un papel muy importante en la fisiopatología de la sepsis, siendo la trombopenia una de las alteraciones más precoces y significativas de todas las que se producen durante el estado séptico. La causa fundamental de ello es la destrucción del espacio microvascular y el secuestro de las plaquetas en diferentes órganos, sobre todo en hígado, pulmón y especialmente en el intestino⁹⁴.

La sepsis se asocia además con un aumento en la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las plaquetas, sobre todo glucoproteínas IIb-IIIa, lo cual facilita su unión al fibrinógeno y a la trombospondina, que contribuyen a la formación de agregados de plaquetas y leucocitos circulantes, siendo esta la causa de su posterior secuestro^{95,96}.

Además, algunos estudios han demostrado que la intensidad de la degranulación de los leucocitos está relacionada con la severidad del cuadro séptico y la evolución a fallo multiorgánico⁹⁶.

Por lo tanto, parece claro que en la sepsis existe una disminución del número de plaquetas, así como una activación y un aumento de su adhesión a otras células, así como alteraciones en el reclutamiento plaquetar y en la interacción entre las plaquetas y los hematíes.

2.5.3 Activación de la coagulación

Una de las más importantes aportaciones del conocimiento de la fisiopatología de la hemostasia en la sepsis apareció cuando se consiguió vincular al factor tisular (TF) (tromboplastina), expresado en el endotelio vascular, con los mecanismos que inician la coagulación en el proceso séptico. Hasta entonces se pensaba que el punto de inicio de la cascada de la coagulación se producía a través del sistema de contacto, las citocinas alteraban físicamente la barrera endotelial lo que activaría la *vía intrínseca* de la coagulación.

Hoy en día parece claro que el TF es el mediador central de la coagulación en la sepsis, y por lo tanto es la *vía extrínseca* de la coagulación la que se pone en marcha, y así ha sido demostrado de forma experimental en monos, a los que inyectándole anticuerpos monoclonales anti-factor tisular se le consiguió detener la coagulopatía generada por dosis letales de E. Coli⁹⁷.

El TF es un receptor transmembrana situado en la pared del endotelio vascular que inicia la vía coagulativa al servir de cofactor al factor VIIa. El TF dispone de dos módulos de fibronectina tipo III en una orientación similar al dominio del receptor de las citocinas de ciertas células, lo que le sitúa en un miembro de la familia de las citocinas⁹⁸.

El TF está contenido en pequeñas vesículas plasmáticas, y la señal para que se produzca su expresión parece depender del propio factor tisular. El TF activado por la citocina actúa sobre los otros componentes de la hemostasia a través de un factor pivote, el factor VIIa, que a su vez es dependiente del TF, puesto que deja de ser un zimógeno de cadena simple, para convertirse en una enzima de doble cadena por sección desdoblamiento proteolítica. Esta modificación pone al descubierto zonas internas de la estructura del factor VII y una reorganización del núcleo interno, lo que le proporciona actividad catalítica. El factor VII tiene así una doble función: extracelular en el plasma, siguiendo la cascada de la coagulación, e intracelular.

El factor VIIa en la superficie celular no es activo si no está en presencia del TF. Además, es inactivo si lo bloqueamos con anticuerpos anti-TF. La señal del factor VIIa sobre ciertas células produce un flujo de calcio hacia el interior, una activación de la proteína mitogénica, quimiotaxis y transcripción genética, responsable de la inducción de ciertos genes de expresión.

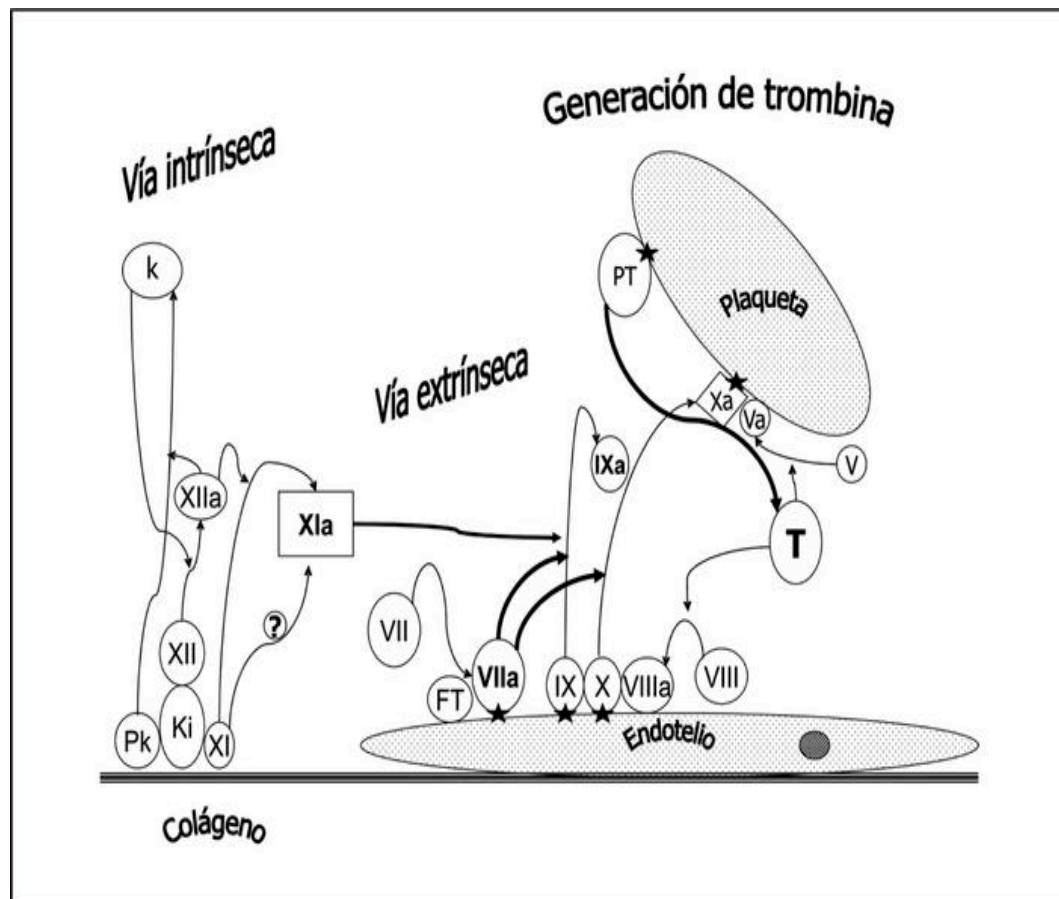
Tras la formación del complejo FT-VIIa se genera factor Xa, IXa y trombina en la superficie de las células portadoras de FT. La acumulación en la superficie de la plaqueta activada de los cofactores activados y su unión a los factores activados da lugar a trombina y la polimerización ulterior de la fibrina.

Así pues, la hemostasia *in vivo* abarca dos procesos, ambos iniciados por el complejo FT-VIIIa, en el primero se genera Xa en la célula portadora de FT y proporciona pequeñas cantidades de trombina a partir de la protrombina, activa la plaqueta, libera el factor VIII del factor von Willebrand y activa el factor V en la superficie plaquetaria; en el segundo se produce factor IXa que al unirse con el VIIIa en la superficie de la plaqueta activada cataliza la formación de Xa y gran cantidad de trombina en la superficie plaquetaria.

Las uniones de los factores VIIIa, IX, X, Xa y PT a la superficie celular se realizan por la presencia de complejos de calcio, fosfolípido y ácido dicarboxiglutámico, siendo este último paso consecuencia de la acción de la vitamina K sobre los factores dependientes de la misma.

La formación de trombina actúa como un mecanismo amplificador ya que favorece la activación de plaquetas y la activación del factor XI y del cofactor VIII y V. Además se une a los receptores de trombina, acoplados a proteínas G, presentes en el endotelio, linfocitos, monocitos, macrófagos y neutrófilos, manteniendo así la hemostasia a nivel local y proporcionando un mecanismo de activación inflamatoria.

Figura 5. Esquema de la coagulación de Lopez Rodríguez, A. *Med Intensiva* 2005; 29(3):166-177⁹⁹



La acción de la trombina sobre el fibrinógeno circulante genera monómeros de fibrina y fibrinopéptidos A y B.

En una fase ulterior se polimeriza la fibrina y por acción de la trombina que activa el factor XIII se entrecruzan las fibras de fibrina dando lugar a la fibrina estable que estructura el coágulo plaquetario.

2.5.4 Consumo de Inhibidores

Se ha visto que en la sepsis se produce una disminución de los niveles de antitrombina III (AT) y proteína C (PC) que son enzimas reguladoras de la activación de la coagulación, lo cual conlleva a una producción descontrolada de trombina.

La antitrombina III es un inhibidor de las serina proteasas con un peso molecular de 58.200 dalton, consta de 432 aminoácidos y es producida por el hígado. Su concentración plasmática es de 112 a 140 mg/l y tiene una vida media de dos a tres días. Su actividad como inhibidor fisiológico de la trombina, Xa y en menor medida de los factores IXa, XIa, XIIa, kalikreína y plasmina se multiplica por mil en presencia de heparina, mediando su acción fisiológica por la acción del heparán sulfato ligado a riducán o sindecán en la superficie endotelial.

Se ha visto que los niveles de antitrombina III están reducidos en la sepsis^{99,100} y ello es debido a una combinación de circunstancias. Por una parte existe activación de su consumo debido a la alta producción de trombina, pero además se produce una disminución de su síntesis como consecuencia de una disfunción hepática, y una degradación por la elastasa liberada por los neutrófilos. Además se ha visto una clara correlación en estudios entre los niveles de AT y la mortalidad en la sepsis¹⁰¹.

Por otra parte también se ha constatado en la sepsis una disminución de los niveles de Proteína C¹⁰², de forma incluso más importante si cabe que de antitrombina III, con lo que no existe una adecuada acción inhibitoria del factor Va y VIIIa.

La Proteína C es una serina proteasa sintetizada en el hígado y dependiente de vitamina K, con un peso molecular de 55.000 dalton y una concentración plasmática de 4μgr/ml. La Proteína C plasmática es heterogénea, con diferentes variantes estructurales que dependen de modificaciones en la cadena ligera. En situaciones normales la PC desempeña un papel crítico para el mantenimiento de la hemostasia, inhibiendo la conversión de protrombina a trombina por su efecto inhibitor sobre los factores Va y VIIIa.

La proteína C se liga a un receptor endotelial, y cuando la trombina se ha unido al complejo de trombomodulina endotelial se activa a Proteína C activada, que en presencia de Proteína S inhibe los factores Va y VIIIa.

En la sepsis la proteína S se encuentra en un 60% unida a la fracción C4b del sistema del complemento, el cual está aumentado en la sepsis como proteína de fase aguda reactiva, ocasionando una falta de Proteína S y como consecuencia una disfunción del sistema Proteína C-Proteína S¹⁰³.

Estudios experimentales han podido demostrar que la administración del C4b incrementa la mortalidad y el fallo orgánico en animales en los que se ha inducido sepsis por E. Coli¹⁰⁴, así como

estudios en humanos con administración de Proteína C activada obtenida por recombinación genética (Estudio Prowes) parecen demostrar una disminución de la mortalidad de los pacientes con sepsis grave¹⁰⁵.

Otros de los factores que influye en el estado procoagulante que supone la sepsis es el Factor inhibidor del factor tisular (TFPI).

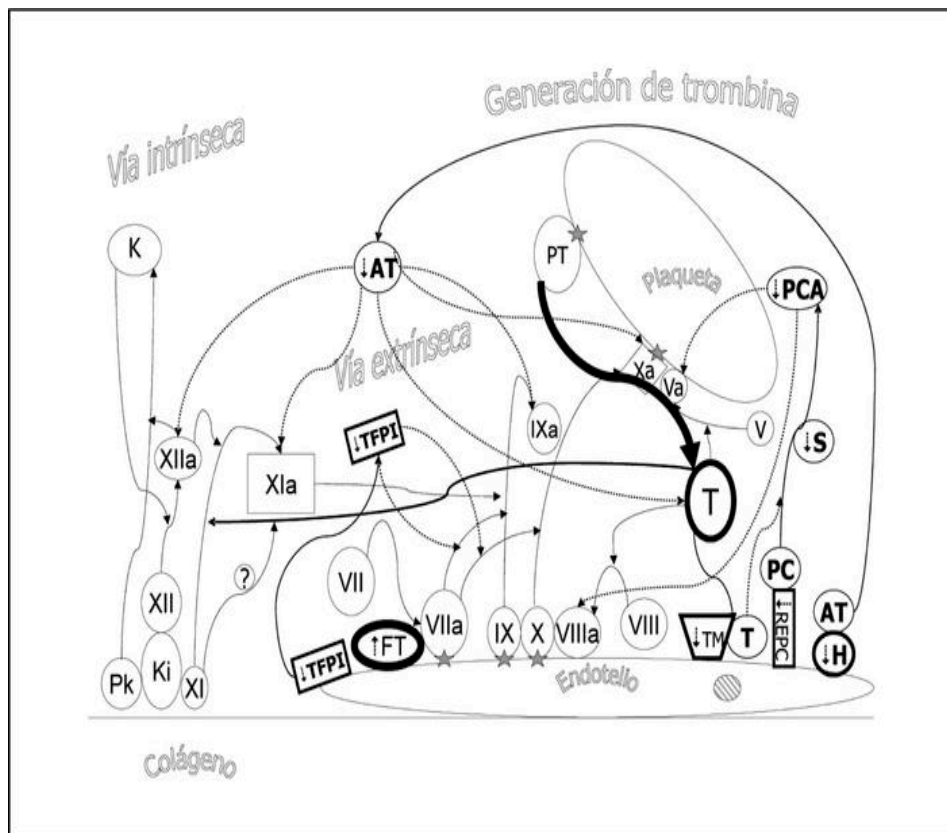
El TFPI es una serpina producida en las células endoteliales vasculares encontrándose ligado a glucosaminoglicanos de la membrana y que se libera a la circulación, ligado a lipoproteínas, en presencia de heparina. En las plaquetas se almacena una pequeña cantidad que se libera cuando se activan. El TFPI inhibe directamente el factor Xa y dependiendo de éste el complejo catalítico FT-VIIa¹⁰⁶.

El TFPI se muestra incapaz de inhibir la abundante producción de FT que se produce en el estado séptico, encontrándose en algunos estudios una correlación estrecha entre sus niveles, la severidad de la sepsis, tanto de la Coagulación intravascular diseminada (CID)¹⁰⁷, como del número de órganos disfuncionantes¹⁰⁸.

La incompetencia del TFPI mantiene la activación de la coagulación en la sepsis, así la generación de trombina, como consecuencia, medida a través de marcadores específicos (fragmento 1+2, complejo trombina-AT III (TAT) o el fibrinopéptido A), se encuentra directamente ligada a los niveles medidos de TFPI¹⁰⁹. A su vez, la administración de TFPI parece prevenir la mala evolución de la sepsis en

la utilización experimental en animales¹¹⁰, aunque en ensayos clínicos en humanos no ha podido demostrar un beneficio en la mortalidad¹¹¹.

Figura 6. Efecto procoagulante en la sepsis, de Lopez Rodriguez A.⁹⁹



2.5.5 Bloqueo del Sistema Fibrinolítico

Tras la inducción de la sepsis se produce una respuesta de liberación de activador tisular del plasminógeno (t-PA) que tiene su pico máximo hacia las dos horas, según se ha podido observar en estudios experimentales con animales, además de una elevación de los complejos plasmina- α 2-antiplasmina en el plasma, al unirse la plasmina generada por la acción del t-PA sobre el plasminógeno con su inhibidor específico, la α 2-antiplasmina¹¹².

Así pues, el balance hemostático global muestra un predominio de la actividad fibrinolítica del plasma.

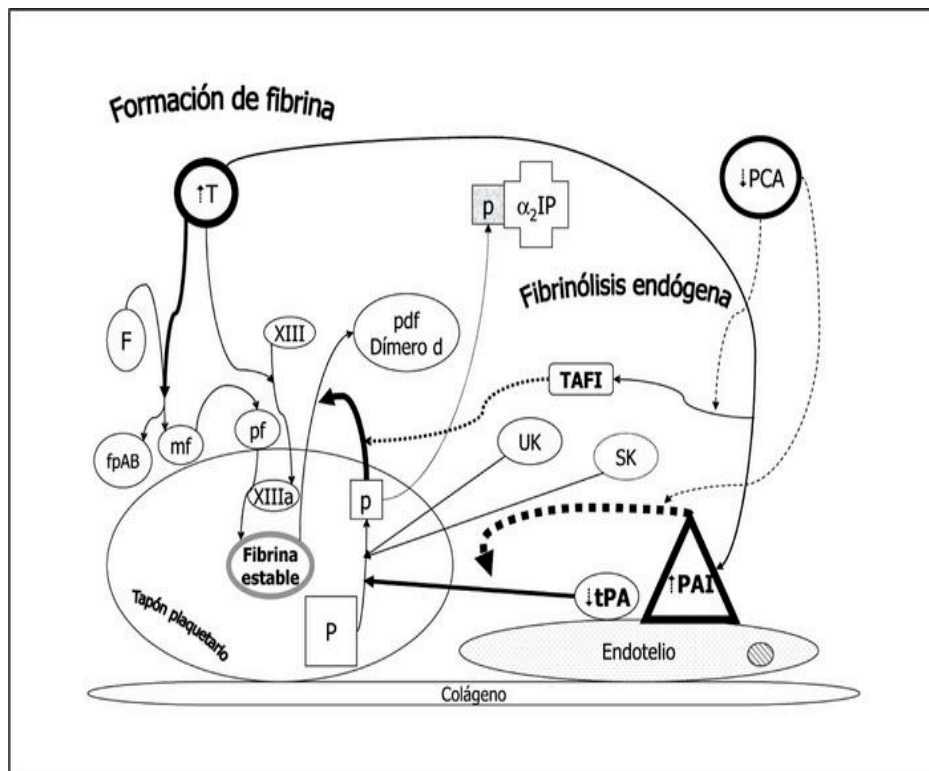
Además, agotada la liberación de t-PA se inicia una liberación progresiva de un potente inhibidor como así lo es el inhibidor tisular del plasminógeno (PAI-1)¹¹³, lo cual lleva a un estado de bloqueo de la fibrinólisis que es el responsable de la perpetuación de la CID que se produce en el estado séptico¹¹⁴. Todo esto va a marcar de forma definitiva el pronóstico de la sepsis, puesto que se ha relacionado el grado de alteración de la fibrinólisis con la intensidad de disfunción orgánica y con la gravedad de la sepsis^{115,116}.

Recientemente se ha descubierto la existencia de un inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina (TAFI), que muestra unos valores incrementados en la sepsis¹¹⁷, y parece tener un importante papel en el control de la hemorragia, al ser responsable de la permanencia de la

fibrina depositada en el lugar de la lesión, sin que se vea afectada por la fibrinolisis, lo cual contribuye a mantener un estado de hipofibrinolisis.

Como consecuencia de todo lo anterior, tras la formación de trombina existe una primera respuesta de hiperfibrinolisis que intenta reparar y eliminar el depósito de fibrina establecido, para posteriormente producirse una hipofibrinolisis secundaria al bloqueo del sistema fibrinolítico, consecuencia del consumo del activador del t-PA y del predominio del inhibidor (PAI-1), que lleva a un estado de bloqueo e incapacidad funcional para eliminar la fibrina depositada.

Figura 7. Efecto antifibrinolítico en la sepsis⁹⁹



Para resumir, en la fisiopatología de la hemostasia en la sepsis es necesario tener en cuenta que, junto con la trombopenia y las alteraciones de la función plaquetar, tiene lugar activación de la coagulación, a través de la vía extrínseca, iniciada por el TF expresado en la célula endotelial activada por las citocinas y por la endotoxina en una primera fase.

Todo lo anterior conlleva a la generación de trombina, que a su vez va a desencadenar la formación de fibrina en el espacio microvascular. En esta primera fase, el sistema de los inhibidores de la coagulación (AT,PC,TFPI) intenta frenar esta activación pero, la producción constante de trombina lleva al consumo de estos factores, quedando la coagulación activada y sin freno.

Con todo este mecanismo puesto en marcha, el último recurso para limitar el proceso lo lleva a cabo el sistema de la fibrinólisis. El consumo de su activador t-PA y la liberación del PAI conducen a un estado de bloqueo de la fibrinólisis. La activación de la coagulación cae en un estado de depósito de fibrina irreversible en el espacio microvascular con trombosis y por supuesto con un consumo constante de factores, que va a ser el responsable tanto de la disfunción orgánica por un lado, como de la diátesis hemorrágica por otro.

2.6 METALOPROTEASAS

2.6.1 Definición y funciones

Para que el control de la infección pueda llevarse a cabo con éxito es necesaria un adecuado control del agente infeccioso, la resolución del proceso inflamatorio y por último una adecuada remodelación de la matriz extracelular (MEC) que ha intervenido en el proceso, para lo que las metaloproteasas de la matriz (MMPs) juegan un papel determinante.

Pero además, las MMPs se han visto implicadas en el daño tisular producido durante el proceso inflamatorio, daño que como consecuencia puede producir una diseminación del patógeno, la persistencia del mismo o la creación de focos “inmunoprivilegiados”, donde el acceso para las células del sistema inmune sea complicado. Por lo tanto, las MMPs van a jugar un papel crucial en la respuesta inmune a la infección, normal y patológica¹¹⁸.

La matriz extracelular (MEC) está formada por un esqueleto de proteínas fibrilares como son el colágeno y la elastina, que se ensamblan con gran variedad de glicoproteínas (fibronectina, laminina, etc.), carbohidratos y proteoglicanos, cuya diversidad y distribución permite una enorme variedad de tejidos, adaptados estructural y funcionalmente a un entorno celular concreto. Estos elementos que conforman la MEC no son un mero soporte de las células, participan activamente en la adhesión y

migración celular, así como en las interacciones célula-célula, ejerciendo además un papel muy importante durante el proceso inflamatorio tanto como siendo sitio de unión de células infiltrantes, como en el papel de ligando de moléculas inflamatorias.

En el esqueleto de la matriz encontramos diferentes elementos celulares como fibroblastos, macrófagos y células endoteliales.

Los fibroblastos se encargan del mantenimiento del tejido conectivos, y son los responsables de la transformación fibrótica de los tejidos lesionados al proliferar en respuesta a una noxa inflamatoria.

Las células endoteliales se encargan del paso desde el torrente circulatorio hasta la zona lesionada de células y productos inflamatorios, y ante diversos estímulos proliferan y son responsables de la angiogénesis en el tejido inflamado.

Los macrófagos, por su parte, actúan remodelando la MEC liberando citocinas que actúan sobre otros elementos celulares, enzimas proteolíticos y radicales tóxicos que intervienen en la degradación de los tejidos.

Por lo tanto, la MEC es un elemento de sostén y transporte, y su remodelación está implicada en la regeneración tisular y en la migración celular¹¹⁹⁻¹²⁰, jugando un papel crucial en muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos, y entre ellos en la sepsis.

Las MMPs son una familia de proteinasas , en el momento actual se conocen 28, todas ellas contienen un dominio zinc dependiente con actividad catalítica sobre componentes de la matriz extracelular¹²¹.

La primera MMP en ser identificada fue una colagenasa, en 1962 por Gross y Lapiere¹²², quienes observaron que la cola del renacuajo durante la metamorfosis contenía una enzima que degradaba el colágeno. Posteriormente en la década de los 60 principios de los 70 se comenzó a estudiar la implicación que las MMPs tenían en algunas enfermedades en humanos^{123,124}.

Las MMPs han sido estudiadas en procesos fisiológicos¹²⁵, tales como la ovulación¹²⁶, el crecimiento y diferenciación embrionaria¹²⁷, la invasión del trofoblasto¹²⁸, la involución uterina tras el parto¹²⁹, la remodelación mamaria en la lactancia¹³⁰, el crecimiento y la remodelación ósea¹³¹, así como en el desarrollo de algunos órganos como son las glándulas salivares¹³² y mamarias^{120,133}, los gérmenes dentales¹³⁴, y los ovarios¹³⁴; también se ha estudiado su implicación en numeros procesos patológicos, como enfermedades en las que se produce un “turn-over” excesivo y aberrante de la matriz extracelular como es el caso de la artritis reumatoide , el crecimiento, agresividad y poder metastático de los tumores, la arterioesclerosis y algunas otras enfermedades cardiovasculares, en el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, o en la enfermedad vasculítica primaria (Kawasaki, Wegener, Takayasu y arteritis de células gigantes), entre otras¹²³.

En un principio, las MMPs se consideraron enzimas cuyo único papel era intervenir en la remodelación de la MEC, en el momento actual se conoce su importante implicación en los mecanismos de inmunomodulación.

En tejidos no lesionados se detecta una actividad muy baja de MMPs. Su expresión está regulada transcripcionalmente por citoquinas inflamatorias, transformación celular, hormonas y factores de crecimiento.

2.6.2 Estructura

Todos los enzimas de la familia de las MMPs tienen en común:

a- **Un péptido señal** que no está presente en la forma inactiva del enzima, y es la responsable de la secreción de la molécula.

b- **Un dominio proteolítico o catalítico** que contiene 2 iones zinc y al menos un ion calcio. Uno de los iones de zinc está presente en el centro activo e implicado en el proceso catalítico de las MMPs. El segundo ion de zinc, también denominado zinc estructural, y el ion de calcio están presentes en el dominio catalítico a unos 12 Å del zinc catalítico. El ion de zinc catalítico es esencial para la actividad proteolítica de las MMPs, los tres residuos de histidina y el zinc catalítico están conservados en todas las MMPs.

Menos conocido es el papel del segundo ion de zinc y el del ion de calcio. Este dominio catalítico es altamente conservado y determina la especificidad del sustrato junto al dominio hemopexina-like¹²³.

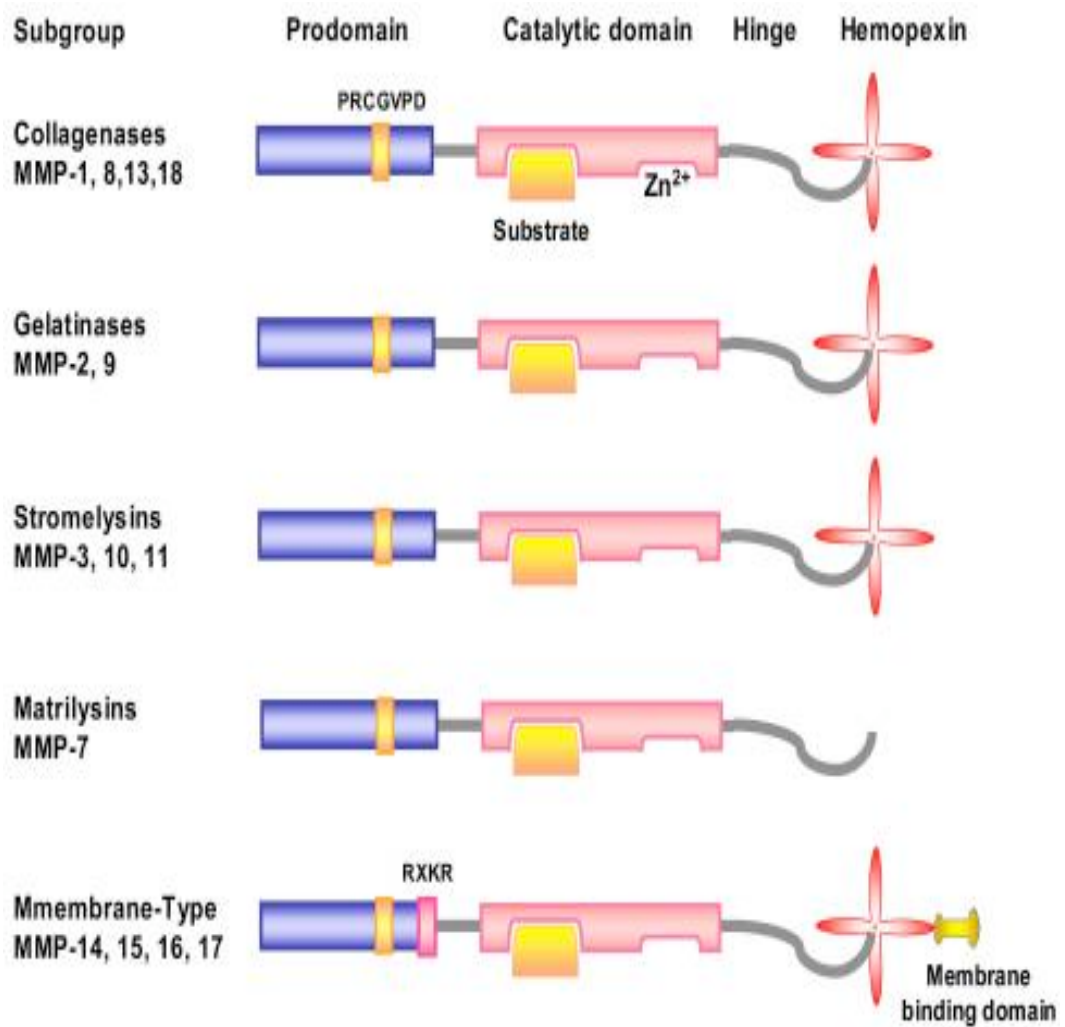
c- *Un dominio propéptido* que consiste en 80-90 aminoácidos que contienen un residuo de cisteína el cual interactúa con el átomo de zinc del dominio catalítico a través de un grupo tiol.

La proteólisis de este propéptido da como resultado la activación del zimógeno. La activación puede darse por la acción de enzimas proteolíticas, agentes mercuriales o el calor^{135,136}.

d- *Un dominio hemopexina/vitronectina* que muestra una secuencia similar a la proteína plasmática hemopexina, que al parecer juega un papel funcional en la unión al sustrato y en las interacciones con los TIMPs.

Además de estos dominios básicos, las MMPs se dividen en diferentes subgrupos por la incorporación y/o delección de dominios estructurales y funcionales.

Figura 8. Estructura de la MMP de Joseph D. and cols.¹³⁷



2.6.3 Clasificación de las Metaloproteasas

Dependiendo de la especificidad del substrato, la similitud de aminoácidos y los módulos de secuenciación identificables, la familia de las MMPs se puede clasificar en colagenasas, estromelisininas, elastasas, metaloproteasas de membrana y un grupo denominado “otras MMPs”, en el que se han ido incluyendo nuevas MMPs de reciente descripción.

Tabla 1. Clasificación de las Metaloproteasas, Rodríguez JA, et al.¹³⁸

MMP (Type)	Name	ECM Substrate
Collagenases		
MMP-1	Collagenase-1	Collagen I, II, III, VII, VIII, and X, gelatin, proteoglycans, tenascin, entactin
MMP-8	Collagenase-2	Collagen I, II, III, V, VIII, and X, gelatin, aggrecan
MMP-13	Collagenase 3	Collagen I, II, III, IV, IX, X, and XIV, gelatin, tenascin, fibronectin, aggrecan, osteonectin
Gelatinases		
MMP-2	Gelatinase A	Collagen I, IV, V, VII, X, XI, and XIV, gelatin, elastin, fibronectin, laminin, aggrecan, versican, osteonectin, proteoglycans
MMP-9	Gelatinase B	Collagen IV, V, VII, X, XIV, gelatin, elastin, aggrecan, versican, proteoglycans, osteonectin
Stromelysins		
MMP-3	Stromelysin-1	Collagen III, IV, V, and IX, gelatin, aggrecan, versican, proteoglycan, tenascin, fibronectin, laminin, osteonectin
MMP-10	Stromelysin-2	Collagen III, IV, V, gelatin, casein, aggrecan, elastin, proteoglycans
MMP-11	Stromelysin-3	Casein, laminin, fibronectin, gelatin, collagen IV, transferrin
Membrane type		
MMP-14	MT1-MMP	Collagen I, II, and III, casein, elastin, fibronectin, vitronectin, tenascin, proteoglycans, laminin, entactin
MMP-15	MT2-MMP	Tenascin, fibronectin, laminin
MMP-16	MT3-MMP	Collagen III, gelatin, casein, fibronectin
MMP-17	MT4-MMP	ND
MMP-24	MT5-MMP	ND
MMP-25	MT6-MMP	ND
Others		
MMP-7	Matrilysin	Collagen IV and X, gelatin, aggrecan, proteoglycans, fibronectin, laminin, entactin, tenascin, casein, transferrin, integrin b ₄ , osteonectin, elastin
MMP-12	Metalloelastase	Collagen IV, gelatin, elastin, casein, laminin, proteoglycans, fibronectin, vitronectin, entactin
MMP-20	Enamelysin	amelogenin
MMP-23A	MMP-21	ND
MMP-23B	MMP-22	ND
MMP-26	Matrilysin 2	Collagen IV, fibrinogen, fibronectin, casein
MMP-27	ND	ND
MMP-28	Epilysin	Casein

2.6.3.1 Colagenasas:

Fueron las primeras MMPs que se describieron. Dentro de este grupo tenemos: MMP-1 (colagenasa 1), MMP-8 (colagenasa 2) y MMP-13 (colagenasa 3). Son las encargadas de degradar colágeno nativo de los tipos I, II, III, y V, y parecen jugar un papel crucial en la degradación de colágeno de la matriz extracelular (MEC) tanto en situaciones fisiológicas como en algunas patológicas¹³⁹.

- **MMP-1:** se ha encontrado en áreas con una remodelación rápida de la MEC tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Es producida por: fibroblastos, queratinocitos, condrocitos, monocitos y macrófagos, células musculares lisas, células endoteliales, polimorfonucleares, hepatocitos y células tumorales y es activada por plasmina, calicreína y MMP-3.

Tiene como substrato: colágeno I, II, III, VII, VIII, X, gelatina, agregán, serpinas, tenascina y α 2-macroglobulina . Se ha demostrado la existencia de mRNA y proteína de MMP-1 en placas de arterioesclerosis en carótida de humanos, mientras que no se ha encontrado en carótidas normales¹⁴⁰. La expresión de esta MMP se localiza preferentemente en los bordes del centro lipídico adyacente a la cápsula fibrosa y en la parte dorsal de está. Su contenido se correlaciona positivamente con la incidencia de hemorragias en el interior de la placa.

▪ **MMP-8:** es sintetizada por los leucocitos polimorfonucleares que la liberan de los gránulos secretores bajo diversos estímulos.

También se ha visto que la producen condrocitos, fibroblastos sinoviales y células endoteliales^{141,142}. Degrada los colágenos tipo I, II, III, VII, VIII y X; también puede actuar sobre agregán, elastina, fibronectina, gelatina, α 2-antiplasmina y α 1-antitrombina.

Puede ser activada por plasmina y MMP-3 y 10.

▪ **MMP-13:** originalmente fué clonada de tejido de carcinomas de mama.

Comparada con otras colagenasas su especificidad del sustrato es excepcionalmente amplia incluyendo fibras de colágeno de los tipos I, II, III y XI, membrana basal y colágeno de cartílago de los tipos IV y X, colágeno tipo IX, gelatina, laminina, tenascina, agregán, fibronectina y PAI-2¹⁴³.

Es una MMP que se expresa en situaciones en las que se requiere una remodelación rápida y efectiva del colágeno de la MEC¹⁴⁴, así como cuando existe una excesiva degradación del colágeno de la MEC como en el cartílago osteoartrítico, en úlceras crónicas cutáneas, úlceras intestinales, en líquido sinovial en reumatoides y en periodontitis¹⁴⁵, así como en tumores malignos como los carcinomas de mama¹⁴⁶.

La MMP-13 es activada por plasmina, MMP-2, 3 y 14.

2.6.3.2 Estromelisininas

Dentro de este grupo de MMP encontramos la MMP-3 (estromelisina 1), la MMP-10 (estromelisina 2) y la MMP-11 (estromelisina 3). Tanto la MMP-3 como la MMP-10 son expresadas por fibroblastos y por células escamosas de la piel normales y transformadas¹⁴⁷. Pueden ser activadas por plasmina, calicreína, triptasa, elastasa y catepsina G.

- **MMP-10:** es expresada por fibroblastos y por células escamosas de la piel normales y transformadas¹⁴⁸. Degrada agregán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, MMP-1 y MMP-8.

En estudios recientes se ha observado su implicación en el desarrollo de arterioesclerosis, así como de forma experimental *in vitro* se ha visto que sus niveles se incrementan en humanos y en modelos animales tras la infección de la vía aérea¹⁴⁹⁻¹⁵².

- **MMP-3:** Como la MMP-10 la expresan fibroblastos y células escamosas de la piel, así como células endoteliales, condrocitos, células tumorales, queratinocitos, macrófagos, y células musculares lisas. Degrada colágeno tipo II, III, IV, IX, X y XI y además agregán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, MMP-7, MMP-2 y MMP-9.

▪ **MMP-11:** inicialmente pudo ser clonada a partir de tejido de carcinoma de mama, liberándose tanto en forma activa como inactiva. Su substrato son serpinas, degrada α -1-antitripsina, gelatina, fibronectina y proteoglicanos¹⁵³. Se ha visto implicada en la progresión de tumores malignos y también en lesiones arterioscleróticas humanas. En su regulación parece estar implicado CD40-CD40L¹⁵⁴. Puede ser activada por convertasas.

2.6.3.3 Gelatinasas

En este grupo se han aislado la MMP-2 (gelatinasa A) y la MMP-9 (gelatinasa B).

▪ **MMP-2:** Se expresa en células endoteliales, condrocitos, polimorfonucleares, células tumorales, monocitos y macrófagos, fibroblastos, mastocitos y células musculares lisas^{155,156}.

Los substratos de la MMP-2 son colágeno de los tipos I, II, III, IV, V, VII, X, XI y XIV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina-1, laminina-5, galectina-3, agrecán, decorín, hialuridasa-versicán, proteínas unidas a proteoglicanos, osteonectina, GST-TNF/TNF péptido, IL-1 β , α 1-AT, MMP-1, MMP-9 y MMP-13. Puede ser activada por MMP-1, 7, 14, 15, 16, 24, 25 y trombina.

▪ **MMP-9:** Se produce en queratinocitos, monocitos, macrófagos alveolares, leucocitos polimorfonucleares, células musculares lisas, macrófagos, fibroblastos y una gran variedad de células tumorales¹⁵⁷. La MMP-9 actúa sobre colágeno tipo IV, V, VII, X y XIV, gelatina, elastina, gectina-3, agregán, hialuronidasa-versicán, proteoglicanos unidos a proteínas, fibronectina, entactina, osteonectina, α 1-AT, MBP, IL-1 β y plasminógeno. Puede ser activada por plasmina, elastasa, MMP-2, 3 y 13.

Existen varios trabajos en la literatura que estudian el papel de la MMP-9 en el proceso séptico¹⁵⁸⁻¹⁶¹.

2.6.3.4 Metaloproteasas de membrana (MT-MMPS)

El primer miembro de esta familia fue clonado a partir de células de cáncer de pulmón. Hasta ahora se han descrito: MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17 (MT4-MMP), MMP-24 (MT5-MMP) y MMP-25 (MT6-MMP).

▪ **MMP-14, MMP-15, MMP-16:** La forma activa de la MMP-14 actúa como receptor de membrana para el complejo formado por la forma latente de la MMP-2 y TIMP-2. MMP-14 y MMP-15 pueden activar a la pro-MMP-2 en la superficie celular¹⁶², además ambas pueden degradar

colágeno de tipo I, II y III, gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina y agregán.

La MMP-14 se encuentra en fibroblastos del estroma adyacentes al tumor y en células epiteliales malignas¹⁶³, así como en células musculares lisas en placas arterioescleróticas, viéndose además que su regulación se produce a través de moléculas inflamatorias¹⁶⁴.

El papel de MT-1, -2, -3 y -5 es común. Se ha visto que pueden ser activada por convertasas y que produce la activación de la pro-MMP-2¹⁶⁵.

- **MMP-17:** clonada a partir de cDNA de células de carcinoma de mama¹⁶⁶ también se expresa en pulmón, colon, ovario y tejido testicular así como en leucocitos.

Activa a la pro-MMP-2 convirtiéndola en una molécula intermedia de 68 kDa. Se inhibe con TIMP-1 y TIMP-2¹⁶⁷. Es una proteinasa que se ancla a la membrana por una cola de glicosil fosfatidil-inositol, por tanto la parte hidrofóbica se ancla en el lumen del retículo endoplasmático de similar manera a como lo hace el receptor de la uroquinasa¹⁶⁸.

Puede ser activada por convertasas, y tiene a la gelatina como substrato¹⁶⁹.

- **MMP-24:** Tiene la especial característica de que puede solubilizarse o presentarse unida a la pared celular. Destaca su papel en

la remodelación a nivel cerebral y durante el desarrollo embrionario¹⁷⁰ . Activa la pro-MMP-2 y puede ser activada por convertasas.

- **MMP-25:** leucolisina o MT6-MMP . Se ha identificado en leucocitos de sangre periférica. Parece jugar su baza en la respuesta inflamatoria y puede activarse intracelularmente, y como otras MMP puede ser activada por convertasas^{171,172} .

2.6.3.5 Otras MMPs

Además de todas las MMPs citadas hasta el momento, existe un grupo de MMPs que no puede encuadrarse en ningún grupo de las hasta ahora mencionadas, entre estas MMPs podemos incluir: MMP-7 (matrilisina), MMP-12 (metaloelastasa de macrófagos), MMP-19 (RASI-1), MMP-20 (enamelisina), MMP-23 y MMP-26 (endometasa humana).

- **MMP-7:** es una MMP con gran afinidad por los proteoglicanos heparan sulfato que están alrededor de las células epiteliales y en la membrana basal, lo que le confiere la capacidad de almacenarse y autoregularse¹⁷³ .

Tiene como sustratos al colágeno tipo IV, X, agregán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, MMP-1, MMP-2, MMP-9, caseína, α 1-AT, plasminógeno y MMP-9/TIM-1. Juega un importante papel en la invasión de los carcinomas y la metástasis y parece además estar implicada en

apoptosis de células epiteliales^{174,175}. Su activación se lleva a cabo por plasmina y MMP-3.

- **MMP-12:** Degrada elastina, fibronectina, gelatina, laminina y colágeno tipo IV y su activación se lleva a cabo a través de la plasmina. Se ha demostrado la presencia de mRNA de esta MMP en aneurismas y en enfermedad aortica oclusiva¹⁷⁶, así como en lesiones arteriales en aorta en animales de experimentación¹⁷⁷.

2.6.4 Regulación de Producción las MMPs

Las MMPs se secretan tanto por las células inflamatorias como por las células del estroma en respuesta a insultos exógenos, así como por la señal producida por algunas de las citocinas que se liberan en la respuesta inflamatoria, como son el TNF- α ¹⁷⁸ y la interleucina-1 β ¹⁷⁹.

Además puede existir una “up-regulation” desencadenada por el contacto entre las propias células inflamatorias, como se ha descrito por la interacción linfocitos B-monocitos^{180,181}, y también se ha descrito una “down regulation” en respuesta a algunas otras citocinas inflamatorias como son IFN- γ , IL-4 e IL-10¹⁸²⁻¹⁸⁴, aunque la regulación de la secreción es célula y estímulo específica.

En el interior de la célula la regulación de la producción de MMPs se ha relacionado con factores como la prostaglandina E o el AMP

cíclico^{185,186}. En la tabla se describen algunos factores más que se han visto implicados en la producción de MMPs¹⁸⁷.

Tabla 2. Factores Activadores de la producción de MMPs, adaptado de Peña E.¹⁸⁷

<i>Factores activadores de la producción:</i>	
<i>Factores que actúan en la superficie de la célula:</i>	<i>Agentes físicos que actúan en la célula:</i>
Ionoforo del calcio A23187	Shok térmico
Fusión celular	Radiación UV
Tipos de colágeno en el sustrato	
Concavalina A	<i>Citocinas/Factores de crecimiento:</i>
Cristales de: urato	Factor de crecimiento de la epidermis
Hidroxiapatita	Factor de crecimiento de fibroblastos b
Fosfato cálcico	Interferón α , β , γ
Hierro	Interleucina 1 α , β
Fagocitosis	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
Polihidroxietilmetacrilato	Factor de necrosis tumoral α
<i>Agentes químicos:</i>	<i>Otros:</i>
AMP	Transformación vírica, oncogenes
Colchicina	Agentes autocrinos
Citochalasina B, D	Envejecimiento de los fibroblastos
Lipopolisacaridos	
Mitomicina C	
Diesteres de Forbol	
Prostaglandina E	

Tabla 3. Factores Represores de la producción de MMPs, adaptado de Peña E.¹⁸⁷

<i>Factores represores de la producción:</i>
Ácido retinoico
Glucocorticoides
Adenovirus-5
Estrógenos
Progesterona

La expresión de la actividad de las MMPs está regulada a cuatro niveles:

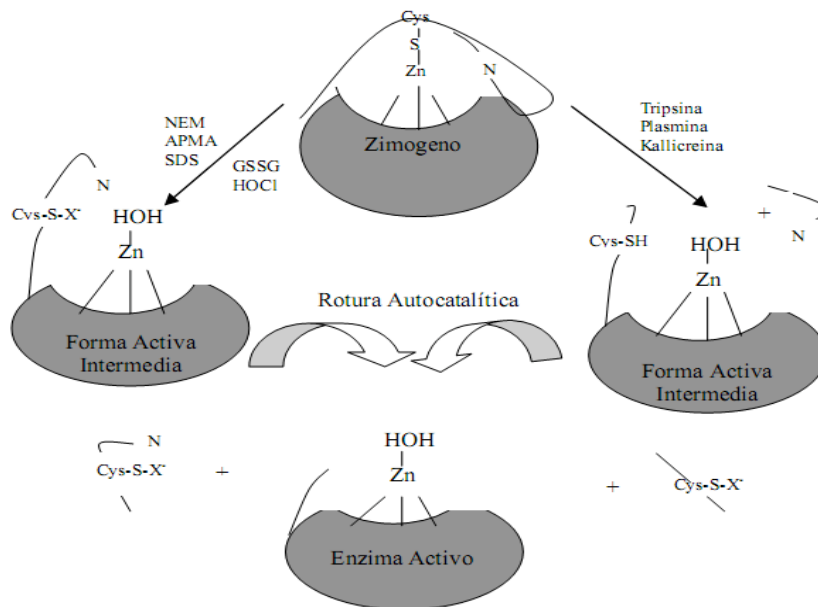
1. Transcripción genética
2. Activación del pro-enzima: todas las MMPs son secretadas como pro-enzimas, requiriendo una fragmentación proteolítica para su activación como anteriormente se ha descrito.
3. Después de la secreción de MMPs se acumulan en compartimentos próximos a la célula.
4. Su actividad está regulada por inhibidores de las metaloproteasas (TIMPs).

2.6.4.1 Activación de las MMPs

Las MMPs solubles son secretadas al espacio pericelular como enzimas inactivos y su propia activación ya supone un importante nivel de regulación.

En las formas zimógenas secretadas el pro-dominio (N-terminal) se pliega de forma que la cisteína interactúa con el zinc catalítico y actúa como escudo del centro catalítico. Esta conformación se mantiene gracias a las interacciones tiol entre los residuos de cisteína del prodominio y el átomo de zinc presente en el centro catalítico de todas las MMPs. La activación de los proenzimas se produce de forma secuencial.

Figura 9. Mecanismo proteolítico de activación de las MMPs¹⁸⁸



Una activación parcial puede ocurrir cuando el prodominio es atrapado por otras proteasas como la plasmina, tripsina, kaliceína, triptasa, quimasa y algunas MMPs¹⁸⁸, o cuando la unión entre la cisteína y el zinc es interrumpida por componentes no proteolíticos como agentes reactivos del tiol y desnaturalizantes o por tratamiento con calor¹⁸⁹. La activación parcial generada, va a ser la responsable de los cambios necesarios en la enzima para que se produzca su rotura catalítica¹⁸⁹.

Se han descrito otros mecanismos de activación de las MMPs como el descrito por Sato¹⁹⁰ en la activación de la pro gelatinasa A en la superficie celular por la MT1-MMP, o como la activación de la pro- MMP-2 por la acción de MT3, o la potenciación de la activación de esta misma MMP por la asociación progelatinasa-TIMP-MT-MMP, en el que a dosis bajas de TIMP se potencia la activación, mientras que a dosis más elevadas de TIMP el efecto es el contrario¹⁹¹.

2.6.4.2 Inhibición de las MMPs

La regulación de la actividad de las MMP se realiza a través de la unión a TIMPs. Hasta el momento se han caracterizado cuatro de estos inhibidores de las MMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4.

Su estructura consta de dos dominios, el dominio N-terminal que consta de 125 aminoácidos y el dominio C-terminal constituido por 65 aminoácidos¹⁹², estos dominios requieren para su estabilidad la existencia de puentes disulfuro. El dominio N-terminal es capaz de formar una molécula estable con capacidad para inhibir las MMPs¹⁹³.

Es necesario que exista un equilibrio entre la expresión de los TIMPs y las MMPs en los tejidos para mantener el metabolismo de la matriz extracelular, si en algún momento se produce un desequilibrio se producen situaciones patológicas como artritis, cáncer, enfermedad cardiovascular, nefritis, desordenes neurológicos, ulceración y fibrosis de tejidos, etc...

El TIMP-1 y el TIMP-2 son capaces de inhibir la actividad de todas las MMPs conocidas en una unión estequiometrica de 1:1 y por tanto juegan un papel importante en mantener el balance entre la deposición y la degradación de la matriz extracelular. El TIMP-3 es el único miembro de la familia que se secreta de forma insoluble y se localiza exclusivamente en la matriz extracelular¹⁹⁴. El TIMP-4 está implicado en el mantenimiento de la homeostasis de la matriz extracelular^{195,196}.

Los TIMPs-2 y 3 son inhibidores efectivos de las MT-MMPs, así como la α 2-macroglobulina, que actúa como inhibidor irreversible de

proteasas activas incluyendo las MMPs, sobre todo en lugares con inflamación¹⁹⁷.

Se podido demostrar que además de su papel como inhibidores de las MMPs, los TIMP tienen otras actividades biológicas, como son inducir la activación de granulocitos, protegerlos de la apoptosis e inhibir su migración a través de las membranas basales¹⁹⁸.

Como hemos desarrollado hasta ahora, las metaloproteasas de la matriz extracelular y sus inhibidores participan de multitud de procesos fisiológicos como son la curación de heridas, angiogénesis, embriogénesis y ciclo reproductivo femenino entre otros; pero también está descrito su papel en procesos patológicos como son el desarrollo tumoral, patología osteoarticular, arteroesclerorisis y otras enfermedades cardiovasculares, patología respiratoria como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el asma, y como no, también en la respuesta normal y patológica a la infección.

2.6.5 Papel de las MMs de la matriz en procesos no infecciosos

2.6.5.1 Metaloproteasas en los procesos tumorales

Las MMPs juegan un papel importante en la invasión tumoral y en el desarrollo y crecimiento de determinados tipos de tumores malignos. Se ha visto la relación de la expresión de algunas MMPs con la capacidad

metastásica de algunos tumores, así como con su recurrencia y el pronóstico de estos pacientes. También se ha podido demostrar la capacidad de los TIMPs para inhibir el crecimiento, capacidad de invasión y metástasis de algunos tumores malignos¹⁹⁹.

Se han detectado expresión de MMP-13 in vivo en tumores malignos invasivos como carcinomas de mama²⁰⁰, carcinoma de células escamosas, carcinomas de cabeza y cuello²⁰¹, carcinomas de vulva^{202,203} melanomas^{204,205}, condrosarcomas²⁰⁶, y carcinomas de vejiga²⁰⁷.

MMP-11 se ha encontrado expresado en estroma de tumores malignos^{208,209}, MMP-12 en macrófagos alveolares de fumadores²¹⁰ y en carcinomas de células escamosas de piel²¹¹. MMP-26 en tumores malignos de pulmón, próstata y mama²¹². Diversas MT-MMPs han sido descritas en varios tipos de tumores malignos, fundamentalmente de células del estroma²¹³.

MMP-2 y MMP-9 degradan componentes de la membrana basal y son cruciales en la invasión tumoral. En varios estudios se ha visto que existe relación entre expresión de determinadas MMPs y estadio del tumor o agresividad del mismo, así como entre expresión y actividad de MMPs con recurrencia tumoral y/o riesgo metastático.

Existe asociación entre expresión de MMP-2 y MMP-9 y bajo grado de diferenciación en tumores de cavidad oral²¹⁴, adenocarcinoma de pulmón²¹⁵, ovario²¹⁶, vejiga²¹⁷ y carcinoma papilar de tiroides²¹⁸. Así como entre expresión de MMP-2 o MT1-MMP con estadios avanzados de

carcinoma de cervix²¹⁹; expresión de MMP-13 o MT1-MMP y agresividad de tumores laríngeos²²⁰ o esofágicos²²¹, MMP-7 y agresividad de carcinoma esofágico²²².

En diversas estirpes tumorales se ha podido encontrar asociación entre expresión de determinadas MMPs y capacidad invasora del tumor. En la mayoría de los tumores son los fibroblastos del estroma los primeros que expresan MMPs, la infiltración posterior por células inflamatorias hace que se expresen otras MMPs, además estas células inflamatorias producen citocinas que también facilitan la expresión de MMPs con las células del estroma y tumorales. Las células tumorales también inducen la expresión de MMPs por los fibroblastos^{223,224}, y las propias MMPs al actuar sobre los componentes de la matriz extracelular inducen y activan la expresión de otras MMPs.

Por lo tanto son distintas las MMPs que van a jugar su papel dependiendo del estadio y desarrollo del tumor. Algunas de las MMPs que se han relacionado con la capacidad invasora del tumor in vivo son: MMP-13 en carcinoma de laringe²²⁵, MMP-7, MMP-9, MT1-MMP en carcinoma esofágico²²⁶, MMP-2, MMP-3, MMP-1, MMP-9 y MT1-MMP en carcinoma oral de células escamosas^{214,227}. También se ha descrito asociación entre comportamiento invasivo de carcinoma gástrico con expresión de MT1-MMP²²⁸, de vejiga con MMP-2 y MT1-MMP²²⁹ papilar de tiroides con MMP-2 y MMP-9 que además se correlaciona con infiltración de ganglios linfáticos²¹⁸.

Las MMPs pueden usarse como marcadores de recurrencia tumoral en algunos tipos de tumores, es el caso de MMP-2 y MMP-3 en pacientes con carcinoma urotelial²³⁰, MMP-2 en tumores ováricos²³¹, MMP-2 y E-caderina en tumores pancreáticos²³². Se ha visto que la existencia de sobre-expresión de MMP-2 y MMP-7 está asociada a recurrencia del cáncer hepatocelular²³³, así como expresión elevada de MMP-9 se asocia con recurrencia de carcinoma de vejiga²³⁴.

La expresión de ciertas MMPs en un tumor primario puede predecir el riesgo de metástasis, tal es el caso de la expresión de MMP-1 en estadio IB de cáncer de cervix que se asocia a invasión linfática y vascular²³⁵, o de metástasis peritoneal en el caso de cáncer gástrico²³⁶. Expresión de MMP-2 indica alto riesgo de metástasis en melanoma de úvea²³⁷ y de células escamosas de la lengua²³⁸.

También se ha podido encontrar asociación entre expresión de MMPs y capacidad de predecir la aparición de metástasis vía hematogena por el papel que las MMPs juegan en la vascularización tumoral²³⁹. Se ha visto que MMP-3, -7 y MMP-9 pueden producir angiostatina a partir de plasminógeno, lo que indica que su actividad en el área peritumoral puede inhibir la angiogénesis inducida por el tumor²⁴⁰⁻²⁴³.

En resumen, la expresión de algunas MMPs en determinado tipo de tumores podría utilizarse para, por ejemplo, indicar una terapia adyuvante cuando existe alto riesgo de recurrencia o metástasis, o seleccionar pacientes para usar fármacos que interfieran con la actividad

de algunas MMPs ya que en algunos estudios se ha visto que la disminución de su actividad se asocia a mejor respuesta al tratamiento²⁴⁴. Con este fin se han utilizado MMPi (Inhibidores de Metaloproteasas) que se han mostrado eficientes en estudios preclínicos²⁴⁴, como es el caso de inhibidores peptídicos²⁴⁵ y no peptídicos²⁴⁶, inhibidores naturales, bifosfonatos²⁴⁷ y derivados de las tetraciclinas²⁴⁸. Sin embargo, aún queda un largo camino para poder demostrar en la clínica si el concepto de inhibición de las MMPs tiene su lugar en el arsenal terapéutico contra el crecimiento, invasión y capacidad metastática de los tumores malignos. Es posible que inhibidores específicos y más información sobre la expresión de distintas MMPs en los diferentes tipos de tumores malignos lo haga posible²³⁹.

2.6.5.2 Metaloproteasas en osteoartritis y artritis reumatoide

La destrucción del cartílago articular es fundamental en el proceso fisiopatológico que tiene como resultado algunas formas de artritis como son la artritis reumatoide y la osteoartritis²⁴⁹.

El cartílago articular está compuesto de gran cantidad de matriz extracelular, de la que el colágeno es uno de los componentes fundamentales junto con el agregán, compuesto de proteoglicanos con sulfato. El agregán confiere al cartílago sus propiedades de elasticidad y compresibilidad que requiere para su función. Durante el desarrollo de la

enfermedad artrítica la matriz extracelular del cartílago pierde sus propiedades por disrupción del colágeno y del agregán²⁵⁰.

Tanto en osteoartritis, como en artritis reumatoide se han podido hallar niveles elevados de algunas metaloproteasas²⁵¹, como colagenasas MMP-1, MMP-8 y MMP- 8 o gelatinasas MMP-2 y MMP-9 en cartílago enfermo de pacientes con osteoartritis^{252,253}. Así como niveles elevados de estromelisininas MMP-3, MMP-10 y MMP-11. Se han encontrado niveles muy elevados de MMP-10 en tejido articular de pacientes con osteoartritis, así como niveles elevados de MMP-11 en fibroblastos articulares de pacientes con artritis reumatoide.

Otras MMPs como MT-MMP²⁵⁴ y adamalisininas (ADAM y ADAMTS) también muestran altos niveles de expresión en la matriz extracelular de articulaciones de pacientes con enfermedades artríticas²⁵⁵⁻²⁵⁷.

2.6.5.3 Metaloproteasas en la enfermedad pulmonar crónica y el asma

El papel de las MMPs está bien documentado en las enfermedades pulmonares tanto en enfermedad pulmonar obstructiva crónica, como en enfisema pulmonar y asma. Tanto macrófagos como células epiteliales, endoteliales y de la musculatura lisa alveolar están involucradas en la expresión de MMP-12²⁵⁸⁻²⁶². La elastina representa el 2.5% de la composición del pulmón²⁶³ y es crucial en las propiedades elásticas y

resistivas de alveolos y bronquios. La actividad elevada de MMP-12 produce una importante degradación de la elastina y desestructuración del parénquima pulmonar²⁶⁴. La MMP-12 no puede actuar sobre otros componente de la matriz extracelular, como son fibronectina, colágeno tipo IV, condroitin sulfato, laminina, vitronectina o heparan sulfato²⁶⁵⁻²⁶⁷, pero sí “in vivo” tiene capacidad para activar otras MMPs tal como MMP-2 y pro-MMP-3, que a su vez pueden activar pro-MMP-1 y pro-MMP-9, lo que explica la amplificación del proceso proteolítico, que va a facilitar la degradación no solo de elastina por parte de la MMP-12, sino de otras proteínas de la matriz extracelular, incluyendo colágeno tipo I, III, IV y V y gelatina²⁶⁸.

En la patogénesis de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se produce un proceso inflamatorio en el que se ven implicados células inflamatorias (macrófagos y neutrófilos), estrés oxidativo, destrucción del parénquima, infección recurrente y un balance entre actividad de proteasas y antiproteasas, donde un exceso de enzimas proteolíticas (MMPs cisteína y serinproteasas) no es equilibrado con enzimas antiproteolíticas²⁶⁹⁻²⁷².

En la EPOC tipo enfisematoso se produce una destrucción pulmonar que resulta en un inadecuado intercambio gaseoso, su principal origen es el consumo de tabaco que contribuye a la activación y reclutamiento de células inflamatorias^{273,274}, y con ello una sobreproducción por los macrófagos de MMP-12²⁷⁵, pero además, en el

enfisema se ha asociado a un déficit de α 1-antripsina²⁷⁴, que como hemos descrito anteriormente es un inhibidor de la liberación de pro-MMP-12 por los macrófagos.

Por su parte, en el asma se produce un proceso inflamatorio en la vía aérea como causa de alérgenos, polución o infecciones respiratorias. Durante el curso de esta enfermedad, se produce una continua remodelación en la vía aérea con daño epitelial, de la musculatura lisa, hiperplasia de glandulas mucosas, hiperreactividad bronquial, angiogénesis, depósito de colágeno y fibrosis de la vía aérea²⁷⁶. Los mediadores inflamatorios liberados por las células epiteliales y leucocitos como son el TNF- α , IL-1 β , factores de crecimiento (TGF- β , GM-CSF, EFG) y endotelinas, estan implicados en la remodelación de la vía aérea^{277,278}. En modelos experimentales con ratas se ha podido apreciar que aquellos animales con déficit de MMP-12 tenían menos inflamación y con el tiempo menos fibrosis peribronquial²⁷⁹. En pacientes con asma crónica se ha visto que son más resistentes a corticoides porque tienen mayor fibrosis subepitelial secundaria a la producción de colágeno II y V, y laminina por los fibroblastos²⁸⁰.

2.6.5.4 Metaloproteasas en enfermedades cardiovasculares

Las MMPs tienen un papel muy importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, incluyendo la arterioesclerosis²⁸¹, la

miocardiopatía dilatada²⁸² y la remodelación del miocardio tras el infarto²⁸³.

El estrés oxidativo que tiene lugar durante la patología cardiovascular estimula la producción y activación de MMPs²⁸⁴, a la vez que la producción de óxido nítrico las inhibe²⁸⁵⁻²⁸⁶. Se ha encontrado también que el TIMP-4 tiene un papel importante en el infarto, la miocardiopatía y en la insuficiencia cardíaca²⁸⁷.

Las MMPs influyen en el desarrollo de la lesión arterioesclerótica. La pared arterial está formada por colágeno tipo I y II, macrófagos y células musculares lisas, en el proceso de generación de una placa arterioesclerótica se observa un aumento de su contenido en colágeno²⁸⁸, en el número de células musculares lisas²⁸⁹ y en los niveles de MMP-9²⁸¹. Se ha visto que en pacientes con angor inestable, los niveles de MMP-9 son más elevados que en aquellos pacientes con angor estable²⁹⁰, de tal forma que los niveles de MMP-9 se pueden considerar como factor independiente de mortalidad²⁹¹.

Además se han encontrados niveles elevados de MMP-9 en plasma en dislipidemia^{292,293}, diabetes²⁹⁴ e hipertensión arterial²⁹², así como en fumadores y consumidores de alcohol^{292,295}, todos ellos factores de riesgo cardiovascular. En la obesidad no hay estudios que demuestren niveles elevados de MMP-9, pero sí de TIMP-1²⁹⁶.

También se ha podido objetivar que la trombolisis es un poderoso estímulo para la expresión de MMPs²⁹⁷, así como se han podido

determinar la liberación de MMP-9 a sangre tras la realización de angioplastia coronaria con balón¹⁴⁹.

El grupo de Páramo et al., ha podido demostrar la expresión de MMP-10 en carótidas con lesiones arterioescleróticas extraídas mediante endarterectomía²⁹⁸, existiendo una asociación entre la expresión de esta MMP y la existencia de aneurismas²⁹⁹.

MMP-9 y 10, además de desempeñar un papel relevante en la fisiopatología del proceso aterotrombótico y contribuir a la expansión de los aneurismas arteriales, pueden ser de utilidad como biomarcadores de riesgo aterosclerótico y predictores de recurrencia de enfermedad coronaria y cerebrovascular^{298,299}.

Estudios recientes sugieren que las estatinas pueden ejercer resultados beneficiosos sobre la pared vascular arterial en parte por sus efectos sobre las MMPs y los TIMPs³⁰⁰⁻³⁰². Otros tratamientos que también influyen sobre la función de las MMPs son la nitroglicerina³⁰³, heparina³⁰⁴, antagonistas del Ca⁺⁺³⁰⁵, losartan³⁰⁶ e IECAs³⁰⁷.

2.6.6 Metaloproteasas en la respuesta inmune a la infección

2.6.6.1 Metaloproteasas en la respuesta inmune normal a la infección

Cuando un microorganismo invade al huésped se desencadena una respuesta inmediata del sistema inmunológico que recluta leucocitos y los atrae hacia el lugar de la infección para la rápida erradicación del patógeno, cuando esto se ha producido se ponen en funcionamiento mecanismos para la resolución de la inflamación. Como hasta ahora se ha descrito, las metaloproteasas de la matriz juegan un papel importante en ambos procesos, modulando la actividad de citocinas y quimicinas, y remodelando componentes de la matriz extracelular.

Para que sea posible la migración de las células inmunes hacia el lugar de la infección es necesario que se produzca una proteólisis de la membrana basal que permita el desplazamiento de las células inflamatorias, aunque aún no ha podido demostrarse *in vivo*, todos los estudios experimentales llevados a cabo hasta el momento apuntan a la implicación de las MMPs en la migración de las células inflamatorias hacia las zonas donde se ha producido el insulto infeccioso. *In vitro* se ha objetivado la dependencia en este mecanismo de migración de los linfocitos T de la MMP-9³⁰⁸⁻³¹⁰, así como en estudios llevados a cabo en ratones se ha visto el papel necesario de las MMPs en la migración de los

linfocitos desde los ganglios linfáticos a través de las venúlas³¹¹ de tal forma que cuando existe un déficit de MMP-3 no se produce la correcta llegada de los neutrófilos hacia el tejido afectado³¹². En estudios realizados en Pancreatitis en ratas también se ha podido explorar el papel de la MMP-9 en la migración de los neutrófilos hacia la zona afectada y su intervención en el proceso posterior de reparación tisular^{313,314}.

Pero, además de favorecer la migración de las células inflamatorias a través de la matriz extracelular, las MMPs modulan el gradiente de citocinas y quimiocinas para que se produzca el reclutamiento de células inflamatorias. Las MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 y MMP-12 pueden inducir la liberación del precursor de TNF- α y su activación³¹⁵, así como regular de forma positiva y negativa la activación de IL-1 β ^{316,317}. Se ha estudiado también la participación de la MMP-9 en el clivaje de la IL-8, convirtiéndola en un fragmento diez veces más potente que el original³¹⁸. Y, por el contrario, la participación de MMP-2, MMP-1, MMP-3 y MMP-8 en la producción de receptores antagonistas de algunas quimiocinas producidas por monocitos³¹⁹ con el fin de permitir la resolución de la inflamación cuando se ha controlado la infección³²⁰.

De forma experimental en ratones se ha estudiado el papel de las MMPs en la regulación del reclutamiento de neutrófilos. En concreto la influencia de la MMP-7 en la creación de un gradiente de quimiocinas que atraen a los neutrófilos a través del intersticio hacia el alveolo pulmonar,

así como la influencia de esta MMP-7 para liberar determinadas quimiocinas con actividad biológica de la superficie celular³²¹.

Otro de los papeles atribuidos a las MMPs en la respuesta inmune a la infección es la activación de defensinas, que ejercen su papel en la ruptura de la membrana bacteriana. La MMP-7 en el intestino libera pro- α -defensinas y las convierte en su forma activa³²², también estudiado de manera experimental en ratones, en los que la infección de E. Coli en células del epitelio pulmonar induce la expresión de MMP-7³²³. Componentes bacterianos como la flagelina, también aumenta la expresión de MMP-7 aunque no existan bacterias viables³²⁴, lo cual sugiere la importancia de la secreción de MMP-7 como mecanismo precoz de la respuesta inmune del huésped a la infección.

2.6.6.2 Metaloproteasas en la respuesta patológica a la infección

Mientras que una apropiada expresión de MMPs facilita y hace efectiva la respuesta inmune del huésped a la infección, se ha visto que un exceso de actividad de MMPs puede producir daño en el huésped, tanto por un exceso de producción de dichas MMPs, como por un defecto de producción de sus inhibidores (TIMP).

Son numerosos los síndromes en los que se detectan los efectos adversos secundarios a una excesiva producción o a un déficit de

inhibición, algunos de los mejores estudiados van a ser revisados a continuación.

Se ha podido relacionar la demencia secundaria a la infección crónica por HIV y otras enfermedades neurológicas en estos pacientes con niveles elevados de MMP-9 en LCR³²⁵⁻³²⁷. El mecanismo de la muerte neuronal es desconocido, pero se ha visto que la infección de los monocitos por el HIV provoca *in vitro* un aumento de la expresión de MMP-9, lo cual provoca un aumento de la permeabilidad de la célula endotelial y con ello una pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica³²⁸. En modelos experimentales en animales se ha visto un incremento de la secreción de MMP-9 por parte de linfocitos T y células de la glía en respuesta a la administración de determinadas proteínas del HIV-1, así como el aumento de niveles en LCR de MMP-9 paralelo a la ruptura de la barrera hematoencefálica³²⁹.

Pero además, se ha podido demostrar que la administración de inhibidores de las MMPs controlan este mecanismo de incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica³³⁰.

En LCR de pacientes con demencia secundaria a infección crónica HIV se han cuantificado niveles bajos de TIMP-1, así como una excesiva producción de MMP-9 por parte de los astrocitos, cuya prolongada activación provoca una supresión de producción de TIMP-1. Se ha podido

comprobar que la administración de medicación anti-HIV previene el desarrollo de demencia asociada a infección HIV y reduce la secreción por parte de los astrocitos de MMP-2 y MMP-9³³¹⁻³³³. Además de esto, se ha visto recientemente la implicación en la producción en astrocitos y células del estroma de proteínas altamente neurotóxicas mediada por MMP-2³³⁴.

Otro retrovirus que produce neuropatología es el HTLV-1, causante de la paraparesia espástica tropical. Se han encontrado niveles elevados de MMP-9 en LCR de pacientes con infección por este virus y enfermedad neurológica³³⁵, así como en biopsias, encontrándose relación directa entre los niveles de MMP-9 y la ruptura de la barrera hematoencefálica³³⁶. Además se ha observado que en otra de las complicaciones importantes relacionadas con la infección por HTLV-1 como es la leucemia de células T, los niveles plasmáticos de MMP-9 son más elevados que en los pacientes control con infección HTLV-1 sin leucemia³³⁷, y estos niveles de MMP-9 son aún más elevados en pacientes con leucemia de células T secundaria a infección HTLV-1 con afectación orgánica³³⁸.

También se ha podido encontrar una asociación entre niveles de MMP-14 e invasión tumoral en pacientes con carcinoma hepatocelular secundario a infección crónica por virus B³³⁹. Se ha visto a su vez que, niveles elevados de MMP-14 están asociados a mayor invasividad no sólo por efecto directo sobre la matriz extracelular sino también por activación

directa de MMP-2. También se ha podido demostrar que pacientes con hepatocarcinoma celular con niveles más elevados de TIMP-2 tienen una mayor supervivencia a los dos años que aquellos con niveles más bajos³⁴⁰.

De forma experimental en ratones se ha visto que la modulación de la actividad de MMPs en hepatitis aguda por virus B, puede reducir el daño tisular sin afectar al aclaramiento del virus³⁴¹.

Otra de las infecciones en las que se ha visto relación directa entre niveles de MMPs y patología es la infección crónica por *Helicobacter pylori*, relacionada tanto con la producción de úlceras pépticas, como de cáncer gástrico. Se ha encontrado una alta expresión de MMP-7 en biopsias de pacientes con infección por esta bacteria, encontrándose *in vitro* una secreción elevada de dicha MMP^{342,343}. También se ha podido observar que las células del epitelio gástrico secretan MMP-1 y MMP-3 en respuesta a TNF- α e IL- β , citocinas inflamatorias liberadas en respuesta a la infección por *Helicobacter pylori*^{344,345}. Por lo tanto, se ha podido demostrar que la bacteria aumenta la expresión de MMP tanto directamente como por interconexión celular, causando tanto destrucción tisular local, como invasión tumoral.

La infección por *Micobacterium tuberculosis* se caracteriza por destrucción tisular en diferentes órganos. La ruptura de la matriz

extracelular que induce la cavitación pulmonar es vital para la transmisión de una bacteria que infecta a un tercio de la población mundial³⁴⁶.

En pacientes con tuberculosis se han podido relacionar los niveles circulantes de MMP-9 con la gravedad de la enfermedad³⁴⁷. En estudios experimentales con ratones se ha visto que los ratones infectados con *M. tuberculosis* tienen niveles elevados de MMP-2 y MMP-9 en el tejido infectado³⁴⁸ y los macrófagos incrementan su secreción en respuesta a la infección³⁴⁹, así como la relación entre esta elevada expresión de MMPs y la diseminación desde el pulmón al resto de órganos por la erosión del alveolo que facilita la extravasación del bacilo a los capilares³⁵⁰.

En pacientes con meningitis tuberculosa se ha podido encontrar una relación entre niveles de MMP-9 en LCR y coma, déficit neurológico e incluso mortalidad³⁵¹.

En granulomas tuberculosos se ha podido encontrar una alta expresión de MMP-9 con muy bajos niveles de TIMP-1 a pesar de que existan pocos bacilos, lo que pone de manifiesto la capacidad del bacilo de *Koch* para provocar destrucción tisular con poca carga bacteriana, a través de la secreción de MMP³⁵².

2.6.6.3 Metaloproteasas en Sepsis Grave y Shock Séptico

El papel de las MMPs en la degradación y restauración del colágeno de la matriz extracelular juega un papel fundamental en el proceso inflamatorio en respuesta a la infección facilitando el paso de linfocitos y otros leucocitos desde la circulación sanguínea o linfática, pero además como hasta ahora se ha venido describiendo, las MMPs juegan un importante papel en la modulación de la respuesta inmune por su interrelación con citocinas y quimiocinas³⁵³.

Las endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana son los responsables del inicio de la activación de sistema inmune del huésped. El colágeno tipo IV es el principal componente de la membrana basal del endotelio y su degradación por las MMPs provoca un compromiso importante de la barrera endotelial y un aumento de la permeabilidad vascular que va a tener un papel determinante en la evolución del cuadro séptico y en el fallo multiorgánico.

El LPS provoca secreción por parte de monocitos y macrófagos de MMP-1, MMP-7 y MMP-9³⁵⁴⁻³⁵⁶, así como liberación de MMP-9 por los neutrófilos³⁵⁷. Además, las citocinas inflamatorias secretadas en la cascada inflamatoria también contribuyen a la amplificación de la producción de MMP-9 por parte de los monocitos³⁵⁸, lo cual exacerba aún

más la cascada inflamatoria, encontrándose relación entre los niveles de MMP-9 en suero y la gravedad del cuadro séptico^{158,359}.

En un estudio en voluntarios sanos a los que se les inyectó endotoxina se observó un aumento en los niveles séricos de MMP-9 en relación con los controles, no objetivándose diferencias en los niveles de MMP-2¹⁵⁹. En otros estudios publicados en pacientes con sepsis grave y shock séptico se han detectado niveles elevados de MMP-9¹⁶⁰⁻¹⁶¹, encontrándose además una relación entre niveles elevados y mortalidad¹⁶¹. También se ha comprobado que la utilización de técnicas de depuración extrarrenal utilizando filtros de Polimixina B con carácter adsorbtivo para las endotoxinas, disminuye los niveles plasmáticos de MMP-9, estableciendo una clara relación entre carga de endotoxinas y niveles de MMP-9¹⁶¹.

Paralelamente a la determinación de MMP-9 se han medido niveles de TIMP-1 y TIMP-2 en pacientes con sepsis grave/shock séptico, encontrando que sus niveles están elevados en dichos pacientes con respecto a controles sanos, pero además Hoffman and cols., pudieron demostrar una relación directa entre mortalidad en la sepsis y niveles elevados de TIMP-1¹⁶¹.

Una de las complicaciones de la sepsis grave/shock séptico es el Síndrome de Distress Respiratorio del Adulto (SDRA). Se han encontrado

niveles elevados de MMP-9³⁶⁰, MMP-8, MMP-2 y TIMP-2 en el lavado broncoalveolar de estos pacientes con SDRA, además de haberse encontrado una correlación entre mortalidad por SDRA y niveles elevados de MMP-1 y MMP-3³⁶¹⁻³⁶³.

No solo la endotoxina puede inducir la expresión y secreción de MMPs, también algunos agentes infecciosos liberan enzimas proteolíticas que pueden activar las pro-MMPs del huésped. Tal es el caso de proteasas de la familia de la termolisina secretadas por *Pseudomona aeruginosa* y *Vibrio cólera*, que activan la pro-MMP-1, -8 y -9³⁶⁴, una proteasa secretada por el patógeno oral *Porphyromonas gingivalis* activa la MMP-1,-3 y-9³⁶⁵ ó la zinc metaloproteasa (ZmpC) producida por *Streptococcus pneumoniae* que *in vitro* es capaz de activar la MMP-9³⁶⁶.

III. Material y Método

1. Diseño del estudio

Se ha realizado un estudio observacional, prospectivo y multicéntrico. El proyecto de investigación fue aprobado por todos y cada uno de los Comités de ética e investigación de los hospitales participantes.

2. Lugar de realización del estudio

El reclutamiento de pacientes ha sido llevado a cabo en seis Unidades de Cuidados Intensivos españolas.

Las Unidades de Cuidados Intensivos que han participado en el estudio han sido:

- Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria. Santa Cruz de Tenerife.
- Hospital Universitario de Canarias. San Cristóbal de la Laguna. Santa Cruz de Tenerife
- Hospital Universitario Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria
- Hospital Materno Insular de Canarias. Las Palmas de Gran Canaria
- Hospital Clínico Universitario de Valencia
- Hospital San Jorge de Huesca

El análisis de las muestras se ha realizado en el Laboratorio de Arterioesclerosis del CIMA-Universidad de Navarra y en el Laboratorio Central del Hospital Universitario de Canarias (La Laguna, Tenerife).

3. Período de estudio

La recogida de muestras del estudio se ha llevado a cabo a lo largo de 17 meses, desde Noviembre de 2008 hasta Marzo de 2009.

4. Tamaño muestral

Un total de 192 pacientes con el diagnóstico de Sepsis Grave o Shock séptico.

5. Criterios de inclusión

Pacientes que ingresaron en UCI durante el período de recogida de datos y que cumplían con los criterios de sepsis grave o shock séptico de la International Sepsis Definitions Conference⁵.

6. Criterios de exclusión

Los motivos de exclusión fueron los siguientes: Pacientes menores de 18 años, embarazadas, antecedentes personales de

neutropenia < 1000 neutrófilos/mm³, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tumor de órgano sólido o médula ósea, utilización de inmunosupresores, esteroides o radioterapia.

7. Definiciones

Definición de Sepsis: cualquier infección documentada a sospechada con uno o más de los siguientes criterios:

I) Parámetros generales:

- Fiebre (temperatura central >38.3°C) o Hipotermia (temperatura central <36°C)
- Taquicardia > 90 latidos/minuto.
- Taquipnea > 30 respiraciones/minuto.
- Alteración de la conciencia.
- Edema o balance positivo >20 ml/kg. en 24 h.
- Hiperglucemia (glucosa plasmática >110 mg/dl) en ausencia de diabetes

II) Parámetros inflamatorios:

- Leucocitosis (>12,000 mm³) o Leucopenia (<4000/mm³) o recuento normal con >10% formas inmaduras

- Niveles Plasmáticos altos de proteína C reactiva o Procalcitonina, 2 veces por encima de la desviación estandar

III) Parámetros hemodinámicas:

- Hipotensión arterial (PAS <90 mmHg, PAM <70, o descenso de la PAS >40 mmHg).
- SvO₂ >70% o índice cardiaco >3.5 L/min/m².

IV) Parámetros de disfunción orgánica:

- Hipoxemia con PaO₂/FIO₂ <300 mmHg.
- Oliguria (diuresis <0.5 ml/kg/hr durante al menos 2 horas)
- Creatinina Incremento > 0,5 mg/dl o valor > 2.0 mg/dl
- Trastorno de la coagulación (INR >1.5 o aPTT >60 seg)
- Trombocitopenia <100,000/ mm³
- Hiperbilirrubinemia (bilirrubina > 2.0 mg/dl).

V) Parámetros de hipoperfusión tisular:

- Hiperlactacidemia (>3 mmol/L o 24 mg/dl).

Definición de Sepsis Grave: Episodio de sepsis complicado con al menos una disfunción orgánica.

8. Manejo de la sepsis grave

a) **Paquete de Medidas de resucitación** (7 puntos) para intentar alcanzar dentro de las seis primeras horas:

- 1.- Determinación de lactato.
- 2.- Hemocultivos previos a la administración de antibióticos.
- 3.- Administración de antibióticos de amplio espectro en menos de 3 horas en pacientes de urgencias y en menos de 1 hora en pacientes ingresados.

Y en presencia de hipotensión:

4.- Iniciar aporte de volumen (20 ml/kg de cristaloides o equivalente en coloide).

- 5.- Drogas vasoactivas para mantener una TAM \geq 65 mmHg.

En presencia de hipotensión refractaria a volumen o lactacidemia $>$ 3 mmol/L o 24mg/dl (shock séptico):

- 6.- Conseguir una Presión Venosa Central \geq 8 mmHg.
- 7.- Conseguir SvO₂ mixta \geq 70% (SvCO₂ \geq 65%).

b) **Paquetes de Medidas de tratamiento** (4 puntos) para intentar alcanzar dentro de las veinticuatro primeras horas:

- 1.- En presencia de shock séptico: Corticoides a dosis de 200-300 mg/d, según protocolo centro.

- 2.- Considerar la administración de Drotrecogina alfa activada según protocolo de cada centro.
- 3.- Control glucémico entre 80- 150 mg/dl.
- 4.- Presión plateau < 30 cm H₂O en pacientes sometidos a ventilación mecánica.

9. Recogida de datos del paciente:

El cuaderno de recogida de datos de cada uno de los pacientes incluyó los siguientes parámetros:

- Iniciales del paciente
- Edad
- Sexo
- Fechas de ingreso en el hospital y en UCI
- Dias de estancia en UCI y hospital pos-UCI
- Motivo del egreso en UCI y hospital: vivo/muerto
- Vivo/muerto a los 28 días
- Tipo de paciente: médico, coronario, quirúrgico, traumatológico
- Comorbilidad asociada
- Diagnóstico principal al ingreso en UCI de acuerdo a los criterios de la CDC
- Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II)⁸⁴ al ingreso en UCI

- Sepsis related Organ Failure Assessment (SOFA)³⁶⁷ al comienzo de la sepsis y evolutivo

- Número de órganos disfuncionantes
- Puntuación de los órganos disfuncionantes
- Criterios de sepsis, sepsis grave o shock séptico
- Foco de origen de la sepsis
- Lugar de adquisición de la sepsis: comunitaria, nosocomial, intra

Unidad de Medicina Intensiva

- Microorganismos responsables de la sepsis
- Antibioterapia empírica adecuada o no
- Tiempo desde inicio de la sepsis-comienzo de la perfusión de

antibióticos

- Antibióticos empíricos utilizados: monoterapia o combinación, especificación del antibiótico y forma de administración (bolus/perfusión continua).
- Modificación del tratamiento antibiótico inicial y sus motivos
- Administración de Corticoides
- Administración de PCa: SI/NO

- Tiempo desde inicio de la sepsis-comienzo de la perfusión de

PCa

- Tiempo en horas de duración de la perfusión de PCa
- Motivos por lo que no se haya administrado PCa
- Cifras máximas y mínimas de glucemia cada día: Control

glucémico < 150 mg/dl.

- Ventilación mecánica protectora con presión plateau < 30 cm H₂O
- Técnicas de depuración extra-renal
- Número de concentrado de hematíes administrados.

10. Recogida de muestras del paciente

A los pacientes que se incluyeron en el estudio se le extrajeron muestras de sangre para la medición de niveles séricos de la MMP-9 y del TIMP-1, TNF $-\alpha$, IL-10 y PAI-1, previa firma del consentimiento informado por parte del paciente o familiar.

Las muestras fueron recogidas:

1. al diagnóstico de la sepsis grave/shock séptico.
2. a las 72 horas
3. a los 7 días del diagnóstico

Se depositaron 5 cc de sangre arterial o venosa en un tubo de plástico sin anticoagulante, pero con un separador gel y un activador como sílice de 5cc tapón (tubo SST de tapón amarillo), agitándose unas 10 veces para diluir el activador. Tras esperar a la formación de un coágulo (unos 10-15 minutos), la muestra se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos. Tras ello se extrae la muestra de la centrífuga encontrando en el fondo del tubo un depósito de hematíes y en el plano

superior el suero, que fue extraído en cantidad cantidad aproximada de 0.45 cc o 450 lambdas mediante pipeta y depositado en un tubo Eppendorf y congelado a – 80°C hasta la determinación de los niveles.

Además se depositaron otros 5 cc de sangre arterial o venosa en un tubo de plástico con citrato (tubo de tapón azul), que tras ser agitado para la total dilucción del citrato y pasados aproximadamente 30 minutos se procede a su centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos. Tras ello se extrae el plasma en cantidad aproximada 0.45cc o 450 lambdas, mediante pipeta y depositado en tubo Eppendorf y congelado a –80°C hasta la determinación de niveles de PAI.

11. Procesamiento de las muestras:

La determinación de los niveles de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1 fue centralizada en el Laboratorio de Arteriosclerosis del CIMA-Universidad de Navarra (Pamplona). Se determinaron por ELISA (Quantikine®, R&D Systems, Abingdon, United Kingdom) con un dilución sérica según las instrucciones del fabricante 1:80, 1:2 y 1:100 respectivamente. El coeficiente de variación (CV) interensayo fue <8% (n=20) y el límite inferior de detección fueron respectivamente 0.31 ng/ml, 78.1 pg/ml y 0.15 ng/ml.

La medición de los niveles de TNF- α e IL-10 fue centralizada en el Laboratorio central del Hospital Universitario de Canarias (La Laguna, Santa Cruz de Tenerife). Las concentraciones de TNF-alfa y IL-10 se determinaron en una fase sólida de quimioluminiscencia inmunométrica (Immulite®, Siemens Healthcare Diagnostics Products, Llamberis, United Kingdom). Los coeficientes de variación (CVs) interensayo fueron < 6.5% (n = 20) y < 9.9% (n=40) respectivamente, y el límite de detección fue 1.7 pg/ml y 1 pg/ml, respectivamente.

Las concentraciones del antígeno PAI-1 se determinaron en el Laboratorio central del Hospital Universitario de Canarias (La Laguna, Santa Cruz de Tenerife). El método de determinación fue por ELISA (Imubind Plasma PAI-1 Elisa™, American Diagnostica, Inc, Stanford, CT, USA). Este método detecta la forma latente (inactiva) y activa del PAI-1. El coeficiente de variación (CV) interensayo fue <5% (n=20) y el límite inferior de detección fue 1 ng/ml.

12. Variable resultado y End-point

Mortalidad a los 30 días.

13. Método Estadístico

En un estudio preliminar con 30 pacientes ingresados por sepsis severa, encontramos que los 11 pacientes que fallecían tenían unos niveles séricos de TIMP-1 de 750 ± 326 ng/ml y los 19 pacientes supervivientes de 652 ± 208 ng/ml. Para una potencia del 80% y un error alfa del 5% se precisan 192 pacientes para detectar una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de TIMP-1 entre los pacientes fallecidos y los supervivientes.

Las variables cuantitativas se expresan como medianas y rangos intercuartiles, y se compararon con los test de Wilcoxon, Mann-Whitney o Friedman. Las variables cualitativas se expresan como frecuencias y se compararon con las pruebas Chi-cuadrado o Fisher. Se utilizó el coeficiente rho de Spearman para determinar la asociación entre las variable continuas.

Se utilizó el análisis "receiver operation characteristic" (ROC) para analizar la bondad de los niveles sanguíneos del TIMP-1, del cociente MMP-9/TIMP-1, de la puntuación del SOFA score y los niveles de ácido láctico para determinar la mortalidad de los pacientes. Se realizó una regresión logística múltiple para determinar las variables que se asociaban de forma independiente con la mortalidad. Se realizó un análisis de supervivencia utilizando los niveles circulantes de TIMP-1 y se representó gráficamente mediante las curvas de Kaplan-Meyer. Se

consideró estadísticamente significativo todo valor $p < 0,05$. Para el análisis estadístico utilizaremos los programas SPSS 17.0 (Chicago, IL, USA) y StatXact 5.0.3 (Cytel Co, MA, USA), LogXact 4.1 (Cytel Co, MA, USA) y NCSS 2000 (Kaysville, Utah).

IV. Resultados

El estudio incluyó 192 pacientes, de los cuales 128 fueron varones y 64 mujeres, la mediana de edad fue de 60 años. Fallecieron 67 (34.9%) durante la estancia en la UCI: 22 pacientes durante las primeras 72 horas, 14 pacientes entre los días 4-7, y 31 pacientes tras 7 días de ingreso en la Unidad de Medicina Intensiva.

1. Casos y Controles

Como primer paso, y para conocer si nuestro grupo de estudio era homogéneo, comparamos nuestra muestra a estudio con un grupo de pacientes control.

No encontramos diferencias en los datos obtenidos en el grupo de pacientes sépticos con respecto a los controles en: sexo ($p=0.11$), edad ($p=0.39$) y niveles de MMP-9 ($p=0.07$), pero sí encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de TIMP-1, MMP-10, y ratios MMP-9/TIMP-1, MMP-10/TIMP-1, en comparación con el grupo control, con $p<0.001$ (**tabla 1**). Aunque no encontramos diferencias significativas en los niveles de MMP-9 entre casos y controles, parece existir una tendencia a unos mayores niveles circulantes de MMP-9 en los pacientes sépticos.

Tabla 1 . Comparación del sexo (número y %), edad, niveles séricos de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1, y cocientes MMP-9/TIMP-1 y MMP-10/TIMP-1 (mostrados como medianas y percentiles 25-75) entre los pacientes sépticos y los controles.

	Controles (n=50)	Pacientes Sépticos (n=192)	P
Sexo mujer– n (%)	13 (26.0)	64 (33.3)	0.11
Edad– años	57 (50-63)	60 (49-70)	0.39
MMP-9 (ng/ml)	498 (350-735)	676 (308-1164)	0.07
TIMP-1 (ng/ml)	226 (213-241)	618 (445-831)	<0.001
MMP-10 (pg/ml)	466 (288-614)	1880 (1217-3285)	<0.001
MMP-9/TIMP-1 (ratio)	2.19 (1.57-3.01)	1.16 (0.49-2.24)	<0.001
MMP-10/TIMP-1 (ratio)	2.07 (1.17-2.84)	3.09 (2.08-5.06)	<0.001

2. Características Clínicas de los pacientes

No encontramos diferencias significativas en el sexo, edad, diagnóstico de EPOC y sitio de la infección entre supervivientes y fallecidos, excepto una mayor incidencia de diabetes mellitus en los fallecidos que en los supervivientes (37.5% vs 19.8%, p=0.02). **Tabla 2.**

Tabla 2. Comparación de las características clínicas entre los pacientes supervivientes y fallecidos.

	Supervivientes (n=125)	Fallecidos (n=67)	P
Sexo femenino – n (%)	40 (31.2%)	24 (37.5)	0.27
Edad – mediana años (percentil 25-75)	56 (47-69)	62 (52-71)	0.15
Diabetes Mellitus - n (%)	25 (19.8)	24 (37.5)	0.02
EPOC - n (%)	17 (13.5)	10 (15.6)	0.67
Lugar de la infección			0.82
· Respiratoria - n (%)	67 (53.2)	38 (59.4)	
· Abdominal - n (%)	28 (22.2)	13 (20.3)	
· Otros localizaciones - n (%)	31(24.6)	13 (20.3)	

3. Marcadores de Coagulopatía

En el momento del diagnóstico, casi todos los pacientes con sepsis grave presentaron una respuesta generalizada que incluía la activación de la cascada de la coagulación y de la respuesta inflamatoria.

No encontramos diferencias significativas entre supervivientes y fallecidos en cuanto a valores de INR al diagnóstico y al 8º día, mientras que sí encontramos significación estadística en el conteo de plaquetas, los fallecidos tenían mayor trombopenia, y en el aPTT, significación que se mantuvo a lo largo de la primera semana de la sepsis grave. **Tabla 3.**

Tabla 3. Comparación de los parámetros de coagulación, mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 8 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos.

	Al diagnóstico	A las 72h	Al 8º día
	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=67) <i>P</i>	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=45) <i>P</i>	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=31) <i>P</i>
Plaquetas - mediana $\times 10^3/\text{mm}^3$ (percentil25-75)	210 (127-273) 139 (63-218) <i><0.001</i>	192 (88-269) 122 (56-201) <i>0.004</i>	234 (113-368) 88 (58-173) <i><0.001</i>
INR - mediana (percentil25-75)	1.27 (1.10-1.50) 1.42 (1.10-1.66) <i>0.17</i>	1.17 (1.06-1.36) 1.30 (1.15-1.40) <i>0.004</i>	1.12 (1.01-1.23) 1.14 (1.03-1.36) <i>0.34</i>
aPTT - mediana seg. (percentil25-75)	30 (26-39) 39 (30-47) <i><0.001</i>	31 (28-36) 35 (29-44) <i>0.01</i>	28 (26-30) 37 (27-47) <i>0.001</i>

4 . Niveles de Acido Láctico y Puntuación SOFA de gravedad

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre supervivientes y fallecidos en marcadores de gravedad, como son los niveles de láctico en sangre, en los tres momentos del análisis, al diagnóstico y en los días 4 y 8, $p<0.001$.

También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la puntuación SOFA, como puede apreciarse en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Comparación de los niveles de ácido láctico y del SOFA, mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 8 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos.

	Día 1	Día 4	Día 8
	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=67) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=45) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=31) P
Acido Láctico mediana mmol/L (percentil 25-75)	2.0 (1.20-3.70) 3.9 (1.47-6.55) <0.001	1.1 (0.8-1.6) 1.9 (1.5-2.4) <0.001	1.0 (0.8-1.2) 1.2 (0.9-2.1) <0.001
SOFA score mediana (percentil 25-75)	9 (7-11) 12 (9-14) <0.001	7 (5-10) 10 (8-14) <0.001	4 (2-7) 12 (8-13) <0.001

5. Comparación entre marcadores de gravedad y coagulación

Los pacientes fallecidos presentaron mayor puntuación del SOFA score y niveles de ácido láctico, y mayor coagulopatía (con menor contaje de recuento plaquetario y prolongados INR y aPTT), como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. SOFA, ácido láctico, plaquetas, INR y aPTT en los pacientes sépticos que fallecieron y sobrevivieron, mostrados como mediana (percentil 25-75).

	Día 1	Día 4	Día 8
	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=67) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=45) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=31) P
Ac.láctico (mmol/L)	2.0 (1.20-3.70) 3.9 (1.47-6.55) <0.001	1.1 (0.8-1.6) 1.9 (1.5-2.4) <0.001	1.0 (0.8-1.2) 1.2 (0.9-2.1) 0.001
SOFA score	9 (7-11) 12 (9-14) <0.001	7 (5-10) 10 (8-14) <0.001	4 (2-7) 12 (8-13) <0.001
Plaquetas (x 10 ³ /mm ³)	210 (127-273) 139 (63-218) <0.001	192 (88-269) 122 (56-201) 0.004	234 (113-368) 88 (58-173) <0.001
INR	1.27 (1.10-1.50) 1.42 (1.10-1.66) 0.17	1.17 (1.06-1.36) 1.30 (1.15-1.40) 0.004	1.12 (1.01-1.23) 1.14 (1.03-1.36) 0.34
aPTT (segundos)	30 (26-39) 39 (30-47) <0.001	31 (28-36) 35 (29-44) 0.01	28 (26-30) 37 (27-47) 0.001

SOFA= Sepsis-related Organ Failure Assessment score; INR = International normalized ratio; aPTT = Tiempo de tromboplastina parcial activada.

6. Niveles circulantes de MMPs durante la primera semana

Comparamos los marcadores proteolíticos entre supervivientes y fallecidos por el cuadro séptico, encontrando que los pacientes que fallecieron presentaron niveles superiores de MMP-10 y TIMP-1, menores niveles de MMP-9 y menor cociente MMP-9/TIMP-1 que los que sobrevivieron en los días 1, 4 y 8. Los niveles circulantes durante la evolución se muestran en la **Tabla 6,7 8. Figuras 1 y 2.**

Tabla 6. Comparación de los niveles séricos de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1, mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 8 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos.

	Día 1	Día 4	Día 8
	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=67) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=45) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=31) P
MMP-9 - mediana ng/ml (percentil 25-75)	784 (371-1222) 554 (240-1044) 0.04	690 (358-1128) 266 (156-621) 0.03	960 (512-1228) 504 (228-1032) 0.03
TIMP-1 — mediana ng/ml (percentil 25-75)	573 (422-724) 797 (499-1012) <0.001	446 (347-537) 527 (369-645) <0.001	420 (341-539) 465 (331-576) 0.09
TIMP-1/ MMP-9 ratio - mediana (percentil 25-75)	0.73 (0.46-1.54) 1.12 (0.60-2.25) 0.003	0.76 (0.47-1.31) 1.62 (0.58-2.82) <0.001	0.57 (0.34-0.93) 1.01 (0.41-1.88) 0.005

Figura 1. Comparación de los niveles séricos de MMP-9, mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 7 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos.

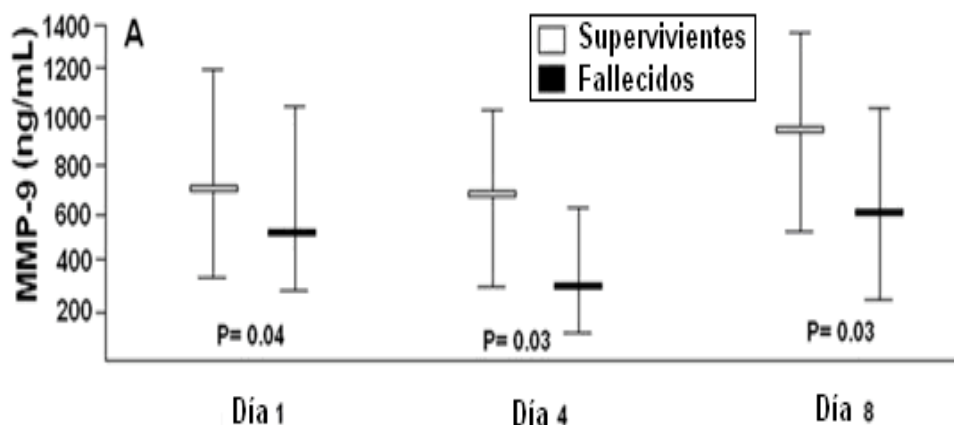


Tabla 7. Comparación de los niveles séricos de MMP-9 mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 7 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos.

	Día 1	Día 4	Día 8
	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=67) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=45) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=31) P
MMP-9 mediana ng/ml (percentil 25-75)	784 (371-1222) 554 (240-1044) 0.04	690 (358-1128) 266 (156-621) 0.03	960 (512-1228) 504 (228-1032) 0.03

Figura 2. Comparación de los niveles séricos de TIMP-1, mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 7 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos.

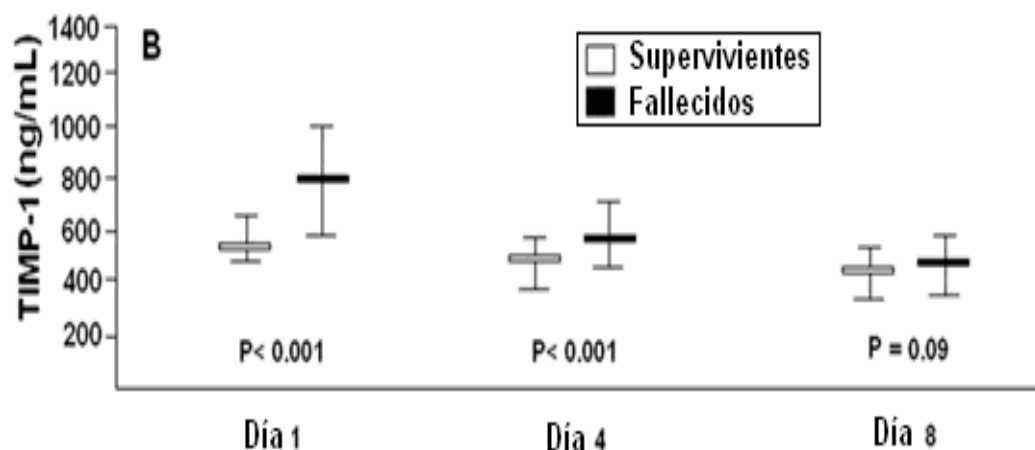
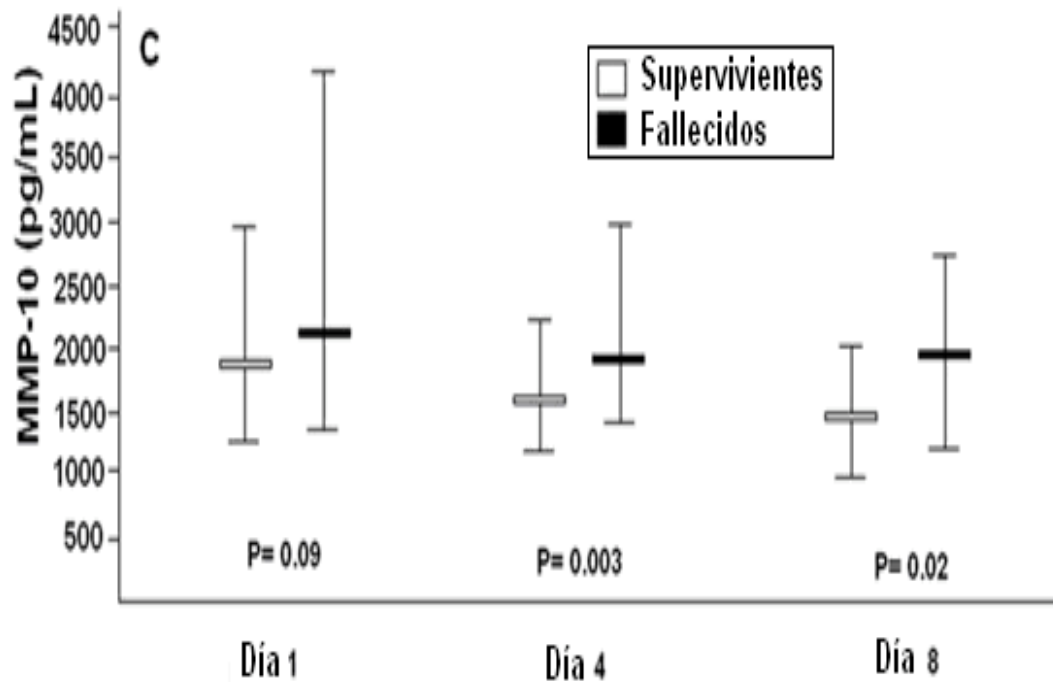


Tabla 8. Comparación de los niveles séricos de TIMP-1 mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 7 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos

	Al diagnóstico	Al 4º día	Al 8º día
	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=67) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=45) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=31) P
TIMP-1 mediana ng/ml (percentil 25-75)	573 (422-724) 797 (499-1012) <0.001	446 (347-537) 527 (369-645) <0.001	420 (341-539) 465 (331-576) 0.09

Figura 3. Comparación de los niveles séricos de MMP-10, mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 7 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos.



7. Mediadores Inflamatorios en Supervivientes y Fallecidos

Además de MMPs, en el estudio se midieron niveles citocinas de IL-10 y TNF- α , ambas implicadas en modular la expresión de MMP-9 y TIMP-1. Encontramos una asociación entre los pacientes que fallecieron y niveles superiores de IL-10 ($p < 0.001$ al diagnóstico y al 4º día, $p = 0.002$ al 8º día). No pudimos demostrar diferencias en niveles de TNF- α entre los pacientes supervivientes y fallecidos, sólo existe significación estadística en los niveles circulantes de TNF- α al 4º día ($p = 0.07$) (**Figuras 4 y 5**).

Posteriormente comparamos en los días 1, 4 y 8, la ratio TNF- α /IL-10, entre supervivientes y fallecidos (**tabla 9**), encontrando que existían diferencias significativas en este cociente en el día 1 y 4, ($p > 0.001$) entre supervivientes y fallecidos, tenían ratios más elevadas los pacientes supervivientes. No pudimos encontrar diferencias en la ratio TNF- α /IL-10 al 8º día ($p = 0.06$).

Figura 4. Comparación de los niveles séricos de IL-10, mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 7 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos.

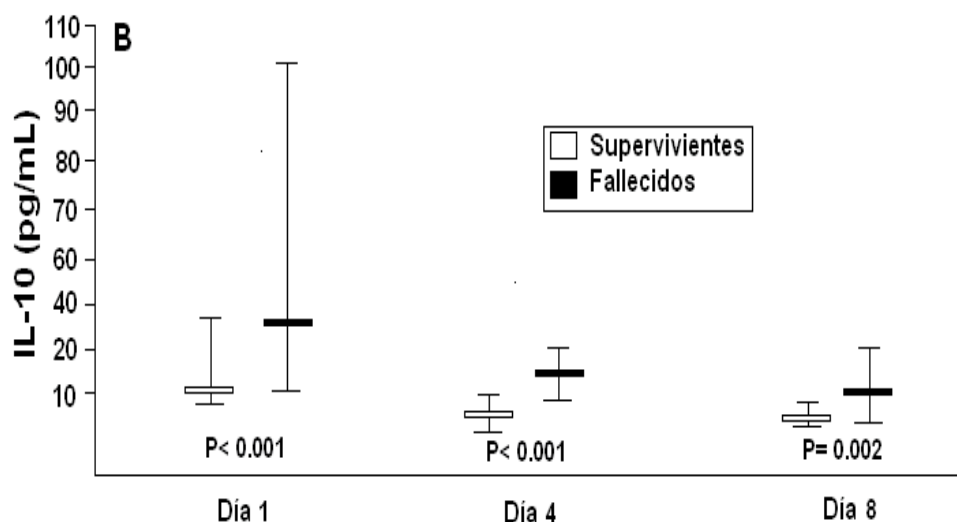


Tabla 9. Comparación de los niveles séricos de IL-10, mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 7 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos.

	Al diagnóstico	Al 4º día	Al 8º día
	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=67) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=45) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=31) P
IL-10 pg/ml mediana (percentil 25-75)	10 (5-37) 36 (9-103) <0.001	6 (5-13) 13 (8-21) <0.001	6 (5-9) 11 (6-26) 0.002

Se midieron también niveles de TNF- α en todos los pacientes al ingreso, 4^o día y 8^o día.

Figura 5. Comparación de los niveles séricos de TNF-alfa, mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 7 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos.

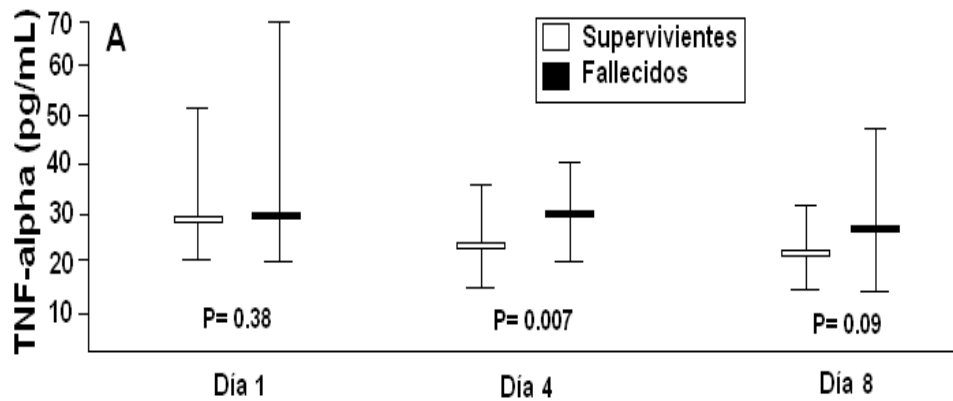


Tabla 10.	Al diagnóstico	Al 4 ^o día	Al 8 ^o día
	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=67) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=45) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=31) P
TNF-alfa Mediana pg/ml (percentil 25-75)	30 (19-51) 34 (18-70) 0.38	22 (14-34) 29 (18-38) 0.007	19 (12-29) 26 (14-47) 0.09

Se compararon los niveles de TNF- α con los niveles de IL-10 en los tres momentos del estudio, así como la ratio TNF- α /IL-10.

Tabla 11.

Tabla 11. Comparación de los niveles séricos de TNF- α e IL-10, y del cociente TNF- α /IL-10 mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 7 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos.

	Al diagnóstico	Al 4º día	Al 8º día
	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=67) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=45) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=31) P
TNF-α Mediana - pg/ml (percentil 25-75)	30 (19-51) 34 (18-70) 0.38	22 (14-34) 29 (18-38) 0.007	19 (12-29) 26 (14-47) 0.09
IL-10 mediana pg/ml (percentil 25-75)	10 (5-37) 36 (9-103) <0.001	6 (5-13) 13 (8-21) <0.001	6 (5-9) 11 (6-26) 0.002
TNF-α/IL-10 ratio - mediana (percentil 25-75)	2.49 (1.39-3.92) 1.20 (0.47-2.38) <0.001	2.52 (2.00-4.32) 2.33 (1.37-2.76) 0.001	2.56 (1.69-3.88) 2.10 (1.75-2.63) 0.06

8. Marcadores Protrombóticos

Debido al importante papel que juega en la respuesta antifibrinolítica asociada con la sepsis el PAI-1 y su asociación con la morbilidad y mortalidad del proceso séptico reportada en estudios previos, se midieron niveles circulantes de PAI-1 en todos los pacientes al diagnóstico y evolutivos, encontrando diferencias entre supervivientes y fallecidos en los tres momentos del estudio, si bien al ingreso y al 4º día existe significación estadística en los niveles circulantes entre pacientes supervivientes y fallecidos, con valores de $p < 0.001$, al 8º día sólo podemos demostrar que existe una tendencia en los pacientes fallecidos hacia unos valores más altos de niveles circulantes (mediana 34 ng/ml, frente a 19 ng/ml en los pacientes supervivientes) con un valor de $p = 0.09$.

Figura 6. Comparación de los niveles plasmáticos de PAI-1, mostrados como medianas y percentiles 25-75, en los días 1, 4 y 7 del diagnóstico de sepsis grave entre los pacientes supervivientes y fallecidos.

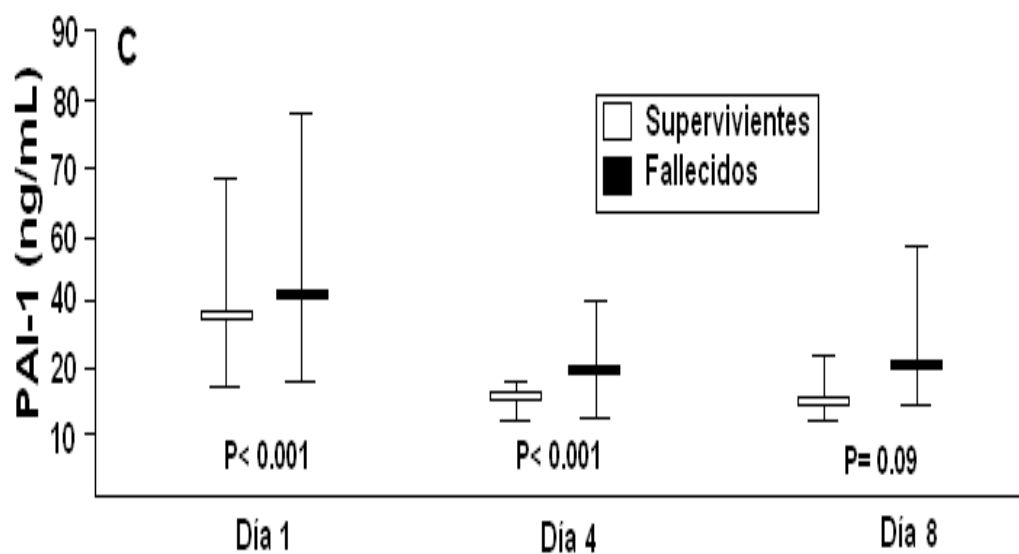


Tabla 12	Al diagnóstico	Al 4º día	Al 8º día
	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=67) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=45) P	Supervivientes (n=125) Fallecidos (n=31) P
PAI-1 mediana ng/ml (percentil 25-75)	38 (18-69) 40 (19-84) <0.001	15 (9-18) 27 (13-42) <0.001	19 (12-34) 34 (10-52) 0.09

9. Correlación entre marcadores proteolíticos, inflamatorios y protrombóticos

Un vez analizados por separado los valores de niveles circulantes de marcadores proteolíticos, inflamatorios y protrombóticos, así como los marcadores de gravedad ácido láctico y SOFA, buscamos la existencia de correlación entre ellos.

En primer lugar intentamos ver la correlación que existía entre los niveles circulantes de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1 y los niveles de ácido láctico y SOFA score en las muestras obtenidas al diagnóstico, y en la evolución en los días 4 y 8.

Encontramos que niveles de MMP-10 y TIMP-1 se correlacionaron de forma positiva con la puntuación del SOFA score en los días 1, 4 y 8; y también existían una correlación positiva entre estos marcadores proteolíticos y los niveles de ácido láctico en las tres muestras. El valor p fue < 0.001 para la correlación MMP-10 y SOFA en los días 1, 4 y 8 mientras la correlación con los niveles de ácido láctico fueron significativas únicamente en los días 1 y 4. Para TIMP-1 y ácido láctico tampoco existe significación estadística con $p=0.74$ (**Tabla 13**).

Por el contrario, los niveles circulantes de MMP-9 se correlacionaron de forma negativa con dichos marcadores de gravedad de la sepsis en los 3 momentos, con valores de $p < 0.05$. Interesantemente, el cociente MMP-9/TIMP-1 se asoció de forma

significativa con la puntuación del SOFA score y los niveles de ácido láctico en los días 1, 4 y 8.

Tabla 13. Correlaciones entre los parámetros proteolíticos y marcadores de gravedad de sepsis (SOFA y ácido láctico), mostradas como el coeficiente rho de Spearman y su correspondiente valor de p.

	Día 1		Día 4		Día 8	
	SOFA	Acido láctico	SOFA	Acido láctico	SOFA	Acido láctico
MMP-9 (ng/ml)	-0.37 p<0.001	-0.31 p<0.001	-0.18 p=0.03	-0.25 p=0.003	-0.27 p=0.003	-0.23 p=0.01
MMP-10 (pg/ml)	0.36 p<0.001	0.29 p<0.001	0.37 p<0.001	0.18 p=0.02	0.37 p<0.001	0.01 p=0.93
TIMP-1 (ng/ml)	0.42 p<0.001	0.51 p<0.001	0.42 p<0.001	0.29 p<0.001	0.21 p=0.01	0.03 p=0.74
MMP-9/ TIMP-1	-0.46 p<0.001	-0.44 p<0.001	-0.32 p<0.001	-0.33 p<0.001	-0.37 p<0.001	-0.23 p=0.011

MMP = Metaloproteasa de la matriz; TIMP = inhibidor tisular de metaloproteasas de la matriz; SOFA = Sepsis-related Organ Failure Assessment Score.

Posteriormente quisimos ver la correlación existente entre marcadores proteolíticos (MMP-9, MMP-10, MMP-9/TIMP-1) y los parámetros de coagulopatía (trombopenia, INR y aPTT). **Tabla 14.**

Tabla 14. Correlaciones entre los parámetros proteolíticos y los marcadores de coagulopatía en la sepsis, mostradas como el coeficiente rho de Spearman y su correspondiente valor de p.

	Día 1			Día 4			Día 8		
	Plaq	INR	aPTT (sg)	Plaq	INR	aPTT (sg)	Plaq	INR	aPTT (sg)
MMP-9 (ng/ml)	0.48 p<0.001	-0.28 p=0.001	-0.28 p=0.001	0.26 p=0.002	-0.19 p=0.04	-0.11 p=0.24	0.35 p<0.001	-0.06 p=0.58	0.04 0.72
MMP-10 (pg/ml)	-0.24 p=0.001	0.22 p=0.008	0.13 p=0.13	-0.30 p<0.001	0.13 p=0.17	0.13 p=0.16	-0.15 p=0.07	0.08 p=0.41	0.25 p=0.01
TIMP-1 (ng/ml)	-0.24 p<0.001	0.41 p<0.001	0.29 p=0.001	-0.21 p=0.01	0.24 p=0.007	0.29 p=0.002	0.11 p=0.21	0.18 p=0.06	0.25 p=0.009
MMP-9/TIMP-1	0.48 p<0.001	-0.43 p<0.001	-0.35 p<0.001	0.31 p<0.001	-0.25 p=0.006	-0.22 p=0.02	0.32 p=0.001	-0.11 p=0.26	-0.08 p=0.41

MMP = Metaloproteasa de la matriz; TIMP = inhibidor tisular de metaloproteasas de la matriz; INR = International normalized ratio; aPTT = Tiempo de tromboplastina parcial activada; Plaq = Plaquetas

Encontramos que existía una correlación positiva entre cifra de plaquetas y niveles de MMP-9, que se mantenía de forma evolutiva. Por su parte los niveles de MMP-10 se correlacionaban negativamente con la cifra de plaquetas, así como con la ratio MMP-9/TIMP-1. Además también encontramos una correlación negativa entre ratio MMP-9/TIMP-1 y aPTT.

Después estudiamos la correlación entre marcadores inflamatorios y de fibrinólisis (citocinas TNF- α , IL-10 y PAI-1) con los marcadores proteolíticos.

Los niveles circulantes de MMP-10 y TIMP-1 se correlacionaron fuertemente de forma positiva con los niveles de TNF- α , IL-10 y PAI-1 en los días 1 y 4 (**Tabla 15**); mientras los niveles de MMP-9 se correlacionaron de forma negativa con dichos marcadores inflamatorios y protrombóticos. Sin embargo, en el día 8, los niveles de MMP-10 mantenían una asociación débil con TNF- α , mientras los niveles de TIMP-1 mantenían una fuerte correlación con dichos marcadores.

Tabla 15. Correlaciones entre los parámetros proteolíticos, inflamatorios y protrombóticos en la sepsis, mostradas como el coeficiente rho de Spearman y su correspondiente valor de p.

	Día 1			Día 4			Día 8		
	TNF- α	IL-10	PAI-1	TNF- α	IL-10	PAI-1	TNF- α	IL-10	PAI-1
MMP-9	-0.25 p=0.001	-0.38 p<0.001	-0.16 p=0.03	-0.04 p=0.69	-0.22 p=0.02	-0.18 p=0.03	-0.04 p=0.66	-0.13 p=0.22	-0.08 p=0.35
MMP-10	0.35 p<0.001	0.30 p<0.001	0.29 p<0.001	0.18 p=0.056	0.17 p=0.06	0.23 p=0.005	0.21 p=0.03	0.06 p=0.55	0.05 p=0.52
TIMP-1	0.56 p<0.001	0.50 p<0.001	0.49 p<0.001	0.47 p<0.001	0.47 p<0.001	0.53 p<0.001	0.49 p<0.001	0.20 p=0.04	0.41 p<0.001
MMP-9/TIMP-1	-0.43 p<0.001	-0.45 p<0.001	-0.27 p<0.001	-0.18 p=0.055	-0.33 p<0.001	-0.35 p<0.001	-0.25 p=0.01	-0.19 p=0.053	-0.21 p=0.02

MMP = Metaloproteasa de la matriz; TIMP = inhibidor tisular de metaloproteasas de la matriz; TNF = factor de necrosis tumoral; IL = interleukina; PAI = inhibidor del activador del plasminógeno.

Por último realizamos correlaciones entre marcadores proteolíticos (MMP-9, MMP-10, TIMP-1 MMP-9/TIMP-1) e inflamatorios (TNF- α , IL-10), de coagulopatía (plaquetas, INR y aPTT), fibrinolisis (PAI-1) y de gravedad (ácido láctico y SOFA), en cada uno de los momentos del estudio, diagnóstico, 4^o y 8^o días.

Encontramos que, en el día 1 existía una correlación fuertemente negativa ($p < 0.001$) entre niveles circulantes de MMP-9 y TIMP-1, MMP-10 y ratio MMP-9/TIMP-1 (**Tabla 16**). Esta correlación tan negativa se mantenía de forma evolutiva en los días 4 y 8 para la asociación MMP-9 y ratio MMP-9/TIMP-1 (**Tablas 17 y 18**). Por su parte, encontramos una asociación positiva entre niveles circulantes de MMP-10 y ratio MMP-9/TIMP-1 que se mantenía en las tres muestras.

Los niveles de citocinas TNF- α e IL-10 se correlacionaron de forma negativa con los niveles de MMP-9 al diagnóstico, 4^o y 8^o días. Lo mismo que SOFA, ácido láctico y PAI. Por el contrario, encontramos que esa correlación era positiva para el recuento de plaquetas, y que también se mantenía de forma evolutiva (**Tablas 16,17 y 18**).

En cuanto a MMP-10, existía una correlación fuertemente positiva al diagnóstico, con los niveles de citocinas, TNF- α e IL-10 ($p < 0.001$), correlación positiva que se mantuvo en la evolución, pero sin significación estadística (excepto con TNF- α al 8^o día). Por su parte también observamos una correlación positiva entre MMP-10 y niveles circulantes de PAI-1, ácido láctico y SOFA score en los días 1, 4 y 8, correlación que

es fuertemente positiva para este último marcador ($p < 0.001$) en los tres momentos estudiados. También los niveles de MMP-10 se correlacionaron negativamente con la cifra de plaquetas ($p < 0.001$ en los **Tablas 16,17 y 18.**

El TIMP-1 por su parte se vió correlacionado negativamente con la cifra de plaquetas en los días 1 y 4, pero positivamente con ellas en el día 8. La correlación fue positiva con el resto de parámetros estudiados, excepto con la MMP-9. **Tablas 16,17 y 18.**

Por último, la ratio MMP-9/TIMP-1 mantuvo una correlación fuertemente negativa con la cifra de plaquetas ($p < 0.001$) de forma evolutiva. Con los demás parámetros se correlacionó positivamente (excepto con los niveles circulantes de MMP-9 con los que existía una fuerte correlación negativa ($p < 0.001$ en los días 1,4 y 8). **Tablas 16,17 y 18.**

Tabla 16. Correlación entre niveles séricos de MMP-9, TIMP-1 y MMP-10, y TIMP-1/ MMP-9 ratio con TNF-alpha, IL-10, PAI-1, ácido láctico, SOFA, plaquetas, INR and aPTT en pacientes sépticos al día 1.

	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	MMP-9/ TIMP-1 (ratio)	MMP-10 (pg/ml)
MMP-9 (ng/ml)	No estimado No estimado	rho= -0.25 p<0.001	rho= -0.88 p<0.001	rho= -0.29 p<0.001
TIMP-1 (ng/ml)	rho= -0.25 p<0.001	No estimado No estimado	rho= 0.63 p<0.001	rho= 0.51 p<0.001
MMP-10 (pg/ml)	rho= -0.29 p<0.001	rho= 0.51 p<0.001	rho= 0.42 p<0.001	No estimado No estimado
TNF-alpha (pg/ml)	rho= -0.25 p=0.001	rho= 0.56 p<0.001	rho= 0.42 p<0.001	rho= 0.35 p<0.001
IL-10 (pg/ml)	rho= -0.38 p<0.001	rho= 0.50 p<0.001	rho= 0.49 p<0.001	rho= 0.30 p<0.001
PAI-1 (ng/ml)	rho= -0.16 p=0.03	rho= 0.49 p<0.001	rho= 0.35 p<0.001	rho= 0.29 p<0.001
Acid lactic (mmol/L)	rho= -0.31 p<0.001	rho= 0.51 p<0.001	rho= 0.48 p<0.001	rho= 0.29 p<0.001
SOFA score (points)	rho= -0.37 p<0.001	rho= 0.42 p<0.001	rho= 0.46 p<0.001	rho= 0.36 p<0.001
Plaquetas /mm ³	rho= 0.48 p<0.001	rho= -0.24 p= 0.001	rho= -0.46 p<0.001	rho= -0.24 p<0.001
INR (ratio)	rho= -0.28 p= 0.001	rho= 0.41 p<0.001	rho= 0.43 p<0.001	rho= 0.22 p= 0.008
aPTT (segundos)	rho= -0.28 p= 0.001	rho= 0.29 p= 0.001	rho= 0.35 p<0.001	rho= 0.13 p= 0.13

MMP =Metaloproteasa de la matriz; TIMP =inhibidor tisular de metaloproteasa de la matriz; TNF =factor de necrosis tumoral; IL = Interleucina; PAI =Inhibidor del activador del plasminógeno; SOFA = Sepsis-related Organ Failure Assessment score; INR = International normalized ratio; aPTT = Tiempo parcial de tromboplastina activada; rho = Coeficientes de correlación de Spearman's .

Tabla 17. Correlación entre niveles séricos MMP-9, TIMP-1 y MMP-10, yTIMP-1/ MMP-9 ratio con TNF-alpha, IL-10, PAI-1, ácido láctico, SOFA, plaquetas, INR y aPTT en pacientes sépticos al día 4 .

	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	TIMP-1/ MMP-9 (ratio)	MMP-10
MMP-9 (ng/ml)	No estimado No estimado	rho= -0.01 p= 0.91	rho= -0.92 p<0.001	rho= -0.10 p= 0.27
TIMP-1 (ng/ml)	rho= -0.01 p= 0.91	No estimado No estimado	rho= 0.35 p<0.001	rho= 0.40 p<0.001
MMP-10	rho= -0.10 p= 0.27	rho= 0.40 p<0.001	rho= 0.24 P=0.004	No estimado No estimado
TNF-alpha (pg/ml)	rho= -0.04 p= 0.69	rho= 0.47 p<0.001	rho= 0.20 p= 0.04	rho= 0.18 p= 0.056
IL-10 (pg/ml)	rho= -0.22 p= 0.02	rho= 0.47 p<0.001	rho= 0.33 p<0.001	rho= 0.17 p= 0.06
PAI-1 (ng/ml)	rho= -0.18 p= 0.03	rho= 0.53 p<0.001	rho= 0.34 p<0.001	rho= 0.23 p= 0.005
Acido láctico (mmol/L)	rho= -0.25 p= 0.003	rho= 0.29 p<0.001	rho= 0.33 p<0.001	rho= 0.18 p= 0.02
SOFA score (puntos)	rho= -0.18 p= 0.03	rho= 0.42 p<0.001	rho= 0.32 p<0.001	rho= 0.37 p<0.001
Plaquetas /mm ³	Rho= 0.26 p= 0.002	rho= -0.21 p= 0.01	rho= -0.28 p= 0.001	rho= -0.30 p<0.001
INR (ratio)	rho= -0.19 p= 0.04	rho= 0.24 p= 0.007	rho= 0.26 p= 0.005	rho= 0.13 p= 0.17
APTT (segundos)	rho= -0.11 p= 0.24	rho= 0.29 p= 0.002	rho= 0.22 p= 0.02	rho= 0.13 p= 0.16

MMP =Metaloproteasa de la matriz; TIMP = Inhibidor tisular de metaloproteasa de la matriz; TNF = factor de necrosis tumoral; IL = Interleucina; PAI = Inhibidor del activador del plasminógeno; SOFA = Sepsis-related Organ Failure Assessment score; INR = International normalized ratio; aPTT = Tiempo de actividad parcial de tromboplastina; rho = Coeficientes de Correlación de Spearman's .

Tabla 18. Correlación entre niveles séricos de MMP-9, TIMP-1 y MMP-10, y TIMP-1/ MMP-9 ratio con TNF-alpha, IL-10, PAI-1, ácido láctico, SOFA, plaquetas, INR y aPTT en pacientes sépticos al 8° día.

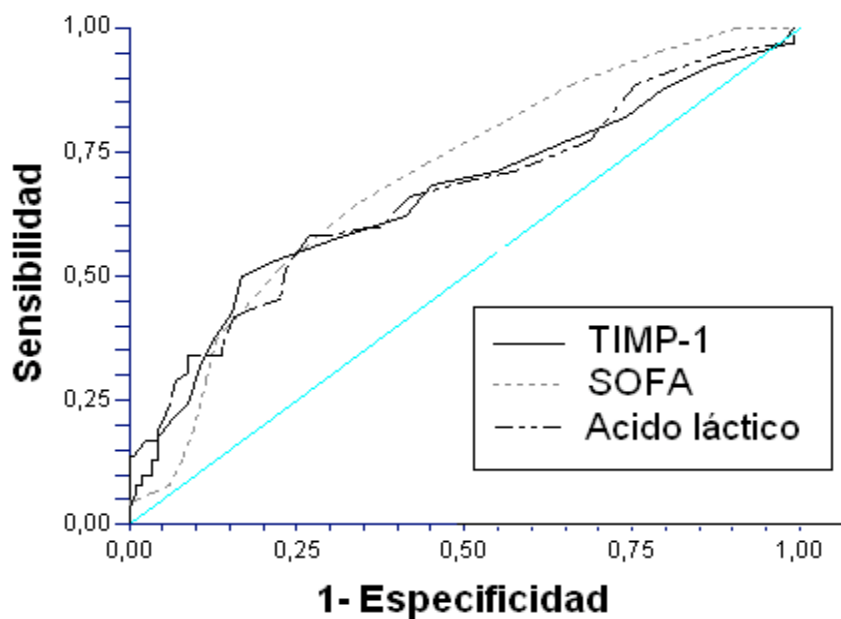
	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)	TIMP-1/ MMP-9 (ratio)	MMP-10
MMP-9 (ng/ml)	No estimado No estimado	rho= 0.13 p= 0.14	rho= -0.89 p<0.001	rho= -0.04 p= 0.65
TIMP-1 (ng/ml)	rho= 0.13 P= 0.14	No estimado No estimado	rho= 0.28 p= 0.001	rho= 0.33 p<0.001
MMP-10	rho= -0.04 P= 0.65	rho= 0.33 p<0.001	rho= 0.19 p=0.04	No estimado No estimado
TNF-alpha (pg/ml)	rho= -0.04 P= 0.66	rho= 0.49 p<0.001	rho= 0.25 p= 0.01	rho= 0.21 p= 0.03
IL-10 (pg/ml)	rho= -0.13 P= 0.22	rho= 0.20 p= 0.04	rho= 0.19 p= 0.053	rho= 0.06 p= 0.55
PAI-1 (ng/ml)	rho= -0.08 P= 0.35	rho= 0.41 p<0.001	rho= 0.22 p= 0.01	rho= 0.05 p= 0.52
Acido lactico (mmol/L)	rho= -0.23 P= 0.01	rho= 0.03 p= 0.74	rho= 0.21 p= 0.02	rho= 0.008 p= 0.93
SOFA score (puntos)	rho= -0.27 P= 0.003	rho= 0.21 p= 0.01	rho= 0.36 p<0.001	rho= 0.37 p<0.001
Plaquetas /mm ³	rho= 0.35 P<0.001	rho= 0.11 p= 0.21	rho= -0.29 p=0.001	rho= -0.15 p= 0.07
INR (ratio)	rho= -0.06 P= 0.58	rho= 0.18 p= 0.06	rho= 0.11 p= 0.26	rho= 0.08 p= 0.41
aPTT (segundos)	rho= 0.04 P= 0.72	rho= 0.25 p= 0.009	rho= 0.08 p= 0.41	rho= 0.25 p= 0.01

MMP = Metaloproteasa de la matriz; TIMP = Inhibidor tisular de metaloproteasa de la matriz; TNF = factor de necrosis tumoral; IL = Interleukina; PAI = Inhibidor del activador del Plasminógeno; SOFA = Sepsis-related rgan Failure Assessment score; INR = International normalized ratio; aPTT = Tiempo parcial de tromboplastina activada; rho = Coeficiente de correlación de Spearman's

10. Mortalidad: Análisis “receiver operation characteristics” (ROC)

Con el propósito de determinar si los niveles de TIMP-1 en el momento del ingreso eran predictores de mortalidad en los pacientes con sepsis grave tal y como hasta ahora han demostrado ser los niveles de láctico y el SOFA score, se realizaron análisis ROC. La curva resultado muestra que los niveles de TIMP-1 (**Figura 7**) son tan buenos predictores de mortalidad al diagnóstico como ácido láctico o SOFA score .

Figura 7. Curva “receiver operation characteristic (ROC)” utilizando TIMP-1, ácido láctico y SOFA al ingreso en UCI como predictores de mortalidad.



Las áreas bajo las curvas (AUC), su 95% intervalo de confianza y el valor de *P* para cada predictor de mortalidad fueron los siguientes: inhibidor tisular de metaloproteasas de la matriz TIMP-1 (AUC = 0.68; 95% IC = 0.59-0.76; $p < 0.001$), ácido láctico (AUC = 0.67; 95% IC = 0.58-0.75; $p < 0.001$) y Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score (AUC = 0.71; 95% IC = 0.64-0.79; $p < 0.001$).

Así mismo se realizaron receiver operation characteristic (ROC) curves para determinar la bondad de los niveles sanguíneos de la MMP-9 y del TIMP-1 en los tres momentos del estudio para determinar la mortalidad de los pacientes. La predicción de mortalidad por el cociente MMP-9/TIMP-1 en los días 1, 4 y 8 es similar a la predicción prevista por otros marcadores de gravedad de sepsis como la puntuación del SOFA score y los niveles de ácido láctico .

Table 19. Análisis utilizando “Receiver operation characteristic” de la relación TIMP-1, TIMP-1/MMP-9 ratio, ácido láctico y SOFA score como predictors de mortalidad al día 1, 4 y 8.

	Día 1	Día 4	Día 8
TIMP-1 (ng/ml)	AUC = 0.68 (95% CI=0.59-0.76) p<0.001	AUC = 0.73 (95%CI=0.63-0.84) p<0.001	AUC = 0.58 (95% CI=0.45-0.71) p=0.24
TIMP-1/MMP-9 ratio	AUC = 0.66 (95%CI=0.58-0.74) p<0.001	AUC = 0.69 (95% CI=0.57-0.80) p=0.01	AUC = 0.67 (95%CI=0.54-0.80) p=0.007
Acido lactico mediana mmol/L	AUC = 0.67 (95% CI=0.58-0.75) p<0.001	AUC = 0.76 (95%CI=0.66-0.85) p<0.001	AUC = 0.66 (95%CI=0.53-0.79) p=0.01
SOFA score	AUC = 0.71 (95%CI=0.64-0.79) p<0.001	AUC = 0.80 (95%CI=0.72-0.88); p<0.001	AUC = 0.85 (95% CI=0.78-0.93) p<0.001

TIMP =Inhibidor tisular de Metaloproteasa de la matriz; MMP = Metaloproteasa de la matriz. SOFA = Sepsis-related Organ Failure Assessment score; AUC= Area bajo la curva de “receiver operation curves”; CI= Intervalo de confianza

11. Análisis de Regresión logística múltiple para predecir mortalidad

Se realizó un análisis de regresión logística múltiple para estimar el valor de TIMP-1, SOFA score y niveles de láctico, como predictores de mortalidad a los 30 días en los pacientes con sepsis grave. Encontramos que los tres factores eran buenos predictores de mortalidad a los 30 días, con un valor $p = 0.02$ para TIMP-1 y ácido láctico, y $p = 0.04$ para SOFA score.

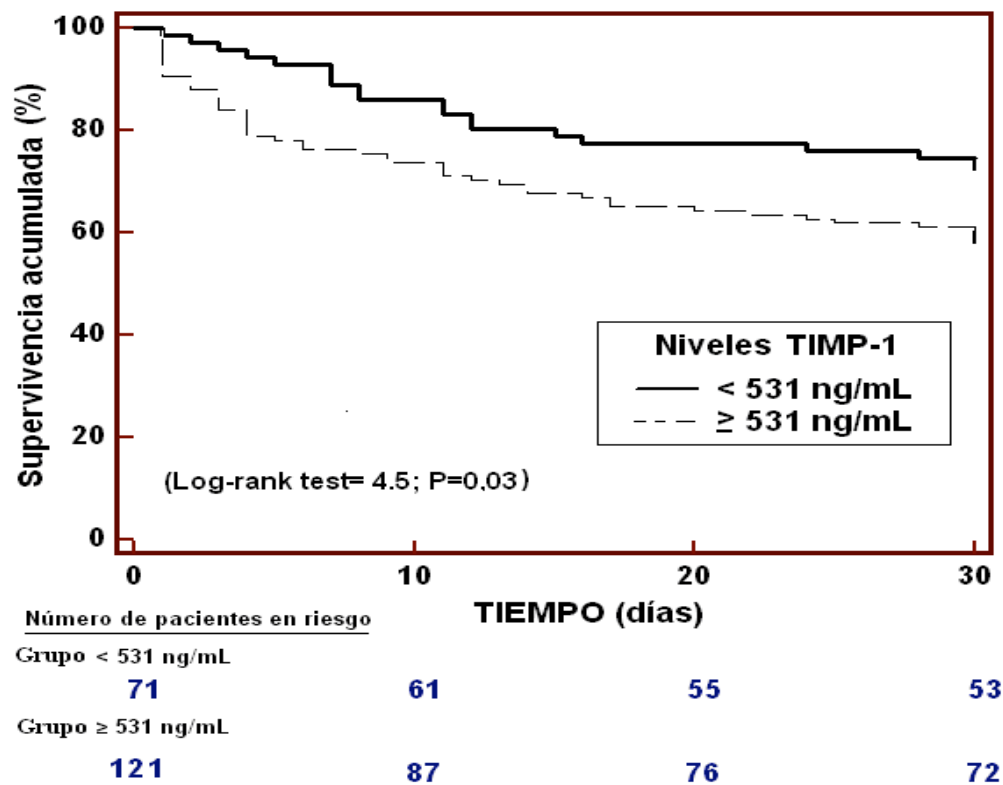
Tabla 20. Análisis de regresión logística múltiple para predecir la mortalidad a los 30 días.

	Odds Ratio	95% Intervalo de Confianza	Test de Wald	P
TIMP1 (ng/ml)	1,001	1,0001 – 1,0012	5,12	0.02
Acido láctico (mmol/L)	1,13	1,007 – 1,278	4,30	0.04
SOFA Score	1,12	1,018 – 1,243	5,35	0.02

12. Curvas de Supervivencia

Se realizó un análisis de la supervivencia a los 30 días utilizando los niveles circulantes de TIMP-1. Encontramos, como se refleja en la curva de Kaplan-Meyer, que los pacientes con niveles de TIMP-1 mayores de 531 ng/mL , tenían una mayor mortalidad que los pacientes con niveles inferiores.

Figura 8. Proporción de pacientes supervivientes a los 30 días utilizando niveles circulantes de TIMP-1 superiores o inferiores de 531 ng/mL.



IV. Discusión

Los resultados de este estudio describen, por primera vez, la evolución de los niveles circulantes de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1 en los pacientes con sepsis grave y su influencia en la gravedad y mortalidad a los 30 días.

Hasta el momento se trata de la serie de mayor tamaño muestral (192 pacientes) que mide los niveles circulantes de MMP-9, MMP-10 y del TIMP-1 en pacientes con el diagnóstico de sepsis grave, apoyando los datos encontrados en series previas de menor tamaño muestral^{160,161} y ofreciendo nuevas aportaciones en cuanto a que se describe su evolución a lo largo de la primera semana del proceso séptico.

Pero además, hasta el momento no hemos encontrado en la literatura ninguna otra serie que haya conseguido establecer la relación de estos marcadores proteolíticos que son las MMPs, con inflamación, coagulación y fibrinolisis.

El análisis de los datos obtenidos indica que los niveles de TIMP-1 y el cociente MMP-9/TIMP-1 podrían ser utilizados como nuevos marcadores pronósticos de morbilidad y mortalidad en los pacientes sépticos.

Los nuevos hallazgos que no se ha descrito previamente y que han sido encontrados en el estudio fueron los siguientes:

a) Los pacientes que fallecieron presentaron un incremento sostenido a lo largo de la primera semana del diagnóstico de sepsis grave, de los niveles circulantes de MMP-10 y TIMP-1 que, junto a unos

niveles reducidos de MMP-9, han dado lugar a una disminución del cociente MMP-9/TIMP-1.

b) Los niveles circulantes de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1 se correlacionaron con otros marcadores de gravedad de la sepsis (como puntuación del SOFA y niveles de ácido láctico) durante el período de seguimiento.

c) La predicción de la mortalidad proporcionada por los niveles de TIMP-1 y el cociente MMP-9/TIMP-1 no fue diferente a la de otros marcadores clásicos para la misma variable resultado (como la puntuación del SOFA y niveles de ácido láctico) durante la primera semana.

d) Los resultados de nuestro análisis demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos de MMP-10 en los pacientes sépticos con respecto a los controles sanos.

e) Los niveles circulantes de citocinas anti-inflamatorias como es la IL-10, se correlacionan positivamente con los niveles de TIMP-1.

f) Existe una correlación entre PAI-1 y TIMP-1 que asocia la mortalidad de la sepsis grave con un estado procoagulante y antifibrinolítico.

g) El TIMP-1 es un factor independiente asociado a mortalidad, y niveles séricos superiores a 531 ng/ml están relacionados con la precocidad de la muerte.

Debido a que que la sepsis es hoy en día la enfermedad más prevalente en las Unidades de Medicina Intensiva¹ y su mortalidad cuando alcanza la fase de shock séptico llega a cifras superiores al 85%¹⁹, es determinante, realizar un diagnóstico precoz de sepsis, identificar pacientes que se beneficiarían de tratamientos específicos y evaluar su respuesta a dicho tratamiento. De ahí que en los últimos años sean muchos los estudios clínicos y experimentales que evalúan diferentes biomarcadores, la mayoría de ellos como marcadores pronóstico, y relativamente pocos como marcadores diagnóstico, pero desgraciadamente hasta el momento, ninguno ha sido suficientemente sensible o específico como para ser utilizado de forma rutinaria en la práctica clínica³⁶⁸.

El papel de las MMPs en la sepsis permanece sin aclarar, aunque parece establecida su implicación en los mecanismos de inmunomodulación, incluso algunos investigadores han apuntado su papel como predictor de mortalidad en pacientes con sepsis¹⁶¹.

Con el objetivo de investigar el papel que las MMPs de la matriz extracelular y sus inhibidores desempeñan en la sepsis, llevamos a cabo una revisión exhaustiva de la literatura y sólo encontramos una serie de 40 pacientes en la que en determinaciones realizadas al ingreso del cuadro de sepsis grave se pudo demostrar la existencia de niveles elevados de MMP-9 y TIMP-1 en los pacientes sépticos con respecto a un

grupo control, y además que los niveles elevados de TIMP-1 eran predictores de mortalidad en este grupo de pacientes.

Decidimos por lo tanto, diseñar un estudio prospectivo, observacional, multicéntrico y con evolución en el tiempo, con un mayor tamaño muestral (192 pacientes), en el que se midieran niveles circulantes de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1, con la hipótesis de investigar la influencia de las MMPs de la matriz extracelular y de sus inhibidores en la morbimortalidad de los pacientes con sepsis. Además, como hasta el momento no encontramos ningún trabajo en la literatura revisada que explorara la relación de los niveles circulantes de MMPs y sus inhibidores con otros procesos fisiopatológicos implicados en la sepsis, como son el sistema de coagulación/fibrinólisis, decidimos también estudiar esta asociación, midiendo niveles circulantes al diagnóstico y de forma evolutiva durante la primera semana de PAI-1, así como también exploramos su relación con niveles circulantes de interleucinas.

El estudio fue llevado a cabo en seis Unidades de Cuidados Intensivos españolas, pertenecientes a hospitales universitarios. Se reclutaron un total de 192 pacientes con el diagnóstico de sepsis grave que ingresaron de forma consecutiva en las Unidad de Intensivos a lo largo de diecisiete meses. A los pacientes se le extrajeron muestras sanguíneas seriadas en los días 1, +3 y +7 del diagnóstico para medición de niveles circulantes de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1, así como TNF- α e IL-10 y ácido láctico. Se recogieron datos epidemiológicos de todos los

pacientes y se llevaron a cabo determinaciones de biomarcadores de coagulación (contaje de plaquetas, INR, aPTT y PAI-1).

A continuación se discuten los hallazgos encontrados en el estudio.

1. Marcadores proteolíticos en pacientes sépticos frente a controles sanos

Nuestros hallazgos confirman lo ya publicado por Hoffman et al.,¹⁶¹ cuando se comparan marcadores proteolíticos en la población de pacientes sépticos con controles sanos.

En el análisis de los resultados de los marcadores proteolíticos (MMP-9, TIMP-1, MMP-10, MMP-9/TIMP-1, MMP-10/TIMP-1) comparamos los niveles encontrados en nuestra muestra de 192 pacientes sépticos con un grupo control de 50 pacientes, objetivando que entre casos y controles no existían diferencias significativas en cuanto a sexo, edad ni comorbilidades que pudieran interferir en los resultados.

Tampoco encontramos significación estadística en los niveles de MMP-9 entre ambos grupos, aunque la tendencia sí que es a niveles más elevados en los pacientes sépticos.

Lo que sí muestra en nuestro estudio significación estadística son los niveles aumentados de TIMP-1 y MMP-10, en el grupo de pacientes con sepsis grave, así como una menor ratio MMP-9/TIMP-1, MMP-10/TIMP-1 también significativa ($p < 0.001$).

En estudios previos con menor tamaño muestral^{160,161}, se encontraron niveles más elevados de MMP-9 y TIMP-1 en los pacientes sépticos que en los controles. En este estudio hemos encontrado niveles circulantes elevados de TIMP-1, pero sin embargo, no hemos encontrado en los pacientes sépticos niveles estadísticamente significativos más elevados de MMP-9 que en los pacientes sanos y como consecuencia, en nuestra muestra, la ratio MMP-9/TIMP-1 es baja en los pacientes sépticos.

Es posible que el tamaño muestral de controles sanos haya contribuido a la ausencia de diferencia significativa en los niveles de MMP-9 entre los pacientes sépticos y los controles sanos. Además, es la primera vez que se describen niveles más altos de MMP-10 en los pacientes sépticos que en los controles sanos como así resulta del análisis de nuestros datos.

2. Marcadores Proteolíticos en Supervivientes y Fallecidos

Después de analizar los niveles de MMPs y TIMP-1 en relación con la mortalidad, encontramos niveles plasmáticos más elevados de TIMP-1 y de MMP-10, y más bajos de MMP-9 en los pacientes sépticos que fallecieron. Ya había sido descrito en estudios previos este dato; niveles más elevados de TIMP-1 en pacientes fallecidos por sepsis grave, en

relación con los supervivientes ¹⁶¹, sin embargo, no se habían descrito niveles bajos de MMP-9 en el grupo de pacientes fallecidos.

En el estudio de Nakamura et al.¹⁶⁰, observaron niveles elevados de MMP-9, mientras que en el estudio de Hoffman et al.¹⁶¹, no se encontraron diferencias en cuanto a niveles de MMP-9 en supervivientes y fallecidos. Esto puede ser explicado por el reducido tamaño muestral del grupo de fallecidos, que podría haber reducido la potencia estadística y esto ser reflejo de los resultados aparentemente contradictorios.

Pero además, nosotros encontramos que estas diferencias en los niveles de MMPs y su inhibidor TIMP-1 se mantienen e incluso incrementan durante la primera semana de seguimiento y lo mismo ocurre con los marcadores inflamatorios como veremos más adelante.

Aunque la MMP-9 es secretada fundamentalmente por los leucocitos ^{118,157}, el conteo de los mismos no pudo en nuestro estudio explicar los resultados, ya que no encontramos diferencias significativas en el número de leucocitos, en el grupo de supervivientes con respecto a los fallecidos.

Este resultado confirma lo ya objetivado en el estudio de Hoffman et al.¹⁶¹, mostrando que TIMP-1 y APACHE II fueron predictores de mortalidad en 37 pacientes, con un riesgo relativo de 4.4 para el punto de corte elegido de TIMP-1, si bien con un gran intervalo de confianza (1.14 a 17.6).

Nuestro estudio, con un tamaño muestral más largo, nos ha permitido aumentar la precisión de los parámetros estudiados; sobre un total de 192 pacientes el punto de corte presentado tiene un menor intervalo de confianza (riesgo relativo 1.8, 95% CI, 1.13 a 2.87).

Los niveles de TIMP-1 encontrados en nuestro trabajo fueron más bajos que los descritos en estudio previos, probablemente en relación con el uso de diferentes kits comerciales en la determinación del mismo. De acuerdo con el manual de instrucciones del kit, la media de niveles séricos de TIMP-1 en 60 pacientes sanos era de 190 ng/ml. En este trabajo, la media de niveles séricos de TIMP-1 en los casos control fue de 226 ng/ml. En el estudio de Hoffman et al., la media de niveles plasmáticos de TIMP-1 en 37 pacientes sanos control fue de 742 ± 34 ng/ml, usando diferente kit comercial por ELISA, para determinar niveles plasmáticos, no séricos como en nuestro caso (Biotrak; Amerxham Biosciences, Freiburg, Germany).

Otra posible explicación sería la existencia de diferencias en las características de los pacientes en cada una de las series; sin embargo el cálculo del APACHE II score fue de 19 y 24 puntos en pacientes supervivientes y no supervivientes, respectivamente; y en el estudio de Hoffman y cols., la media de APACHE II score fue de 14 puntos en los supervivientes y 23 puntos en los pacientes que fallecieron.

3. Marcadores de Gravedad en sepsis y MMPs

Comparamos marcadores de gravedad validados en la sepsis como el SOFA y los niveles circulantes de ácido láctico en los tres momentos del estudio, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre supervivientes y fallecidos.

Parece interesante destacar la correlación que hemos podido encontrar entre niveles circulantes de MMP-10 y TIMP-1 y algunos de los marcadores de gravedad en la sepsis, como SOFA y APACHE II scores^{84,367}, ácido láctico y marcadores de coagulopatía como son la trombopenia y el aPTT, correlación que se mantiene a lo largo de la evolución (días 1, 4 y 8).

Por el contrario, los niveles circulantes de MMP-9 encontrados en nuestro estudio, se correlacionaron igualmente, pero de forma negativa con los anteriormente mencionados parámetros de gravedad en la sepsis, es decir, a menores niveles de MMP-9 mayor gravedad.

Por lo tanto, y en vista de estos resultados, podemos decir que además de los ya conocidos marcadores de mortalidad en la sepsis, como son los niveles elevados de ácido láctico y el SOFA score, nuestros resultados sugieren que alteraciones en la ratio MMP-9/TIMP-1 y los niveles de MMP-10 están asociados con la gravedad del proceso séptico. Hay que decir, que esto parece contradecir un estudio publicado previamente que relaciona de forma positiva los niveles de MMP-9 y APACHE-II score en este grupo de pacientes¹⁶⁰.

4. Marcadores Inflamatorios y MMPs

Decidimos además explorar los niveles circulantes de TNF- α e IL-10, ya que ambas citocinas se encuentran implicadas en modular la expresión de MMP-9 y TIMP-1^{178-184,369-370}.

El TNF- α es el principal agente mediador de la respuesta inflamatoria inducida por endotoxinas, y el responsable del inicio de la cascada de citocinas durante la respuesta inflamatoria, además activa el complemento, la coagulación y la fibrinólisis⁵⁰. Su papel como inductor de la expresión de la MMP-9 ha sido descrito en la literatura¹⁷⁸⁻¹⁸⁴, demostrándose así mismo que la expresión de MMP-9 puede ser modulada con anticuerpos anti-TNF- α ³⁷¹.

En cuanto a la IL-10, citocina inmunosupresora por excelencia, niveles séricos elevados se han asociado con mal pronóstico en algunas infecciones⁶⁶. Estimula en monocitos y macrófagos la expresión de TIMP-1³⁶⁹⁻³⁷⁰ y reduce la de MMP-9 en cultivos endotelio/monocito³⁷².

En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en los niveles de TNF- α entre los pacientes supervivientes y los fallecidos, puede ser que a ello sea debido el no encontrar tampoco diferencias significativas en los niveles de MMP-9 en ambos grupos de pacientes; sin embargo, encontramos niveles circulantes elevados de IL-10 en el grupo

de pacientes que evolucionaron desfavorablemente, lo que podría explicar los niveles más bajos de MMP-9 y elevados de TIMP-1 encontrados en el grupo de pacientes no supervivientes al cuadro séptico.

5. Coagulación y Marcadores Proteolíticos

Comparamos parámetros de coagulación: número de plaquetas, INR y aPTT en los tres momentos del estudio, entre supervivientes y fallecidos.

Encontramos diferencias significativas en las determinaciones de marcadores de coagulopatía (trombopenia y aPTT alargado) entre los dos grupos de pacientes.

Comparamos los tres marcadores de coagulopatía con los niveles circulantes de MMP-9, MMP-10, TIMP-1 y ratio MMP-9/TIMP-1, encontrando que existía una correlación positiva entre la cifra de plaquetas y los niveles de MMP-9, correlación que se mantenía a lo largo de la evolución. Por su parte pudimos encontrar una correlación negativa entre la cifra de plaquetas y los niveles de MMP-10 y ratio MMP-9/TIMP-1.

Las trombopenia es una de las alteraciones más precoces y significativas de todas las que se producen durante el estado séptico, y es un buen predictor de mortalidad en los pacientes críticos³⁷³. La causa fundamental por la que se produce la trombopenia en la sepsis es la destrucción del espacio microvascular y el secuestro de plaquetas en

diferentes órganos, sobre todo en hígado, pulmón y especialmente en el intestino⁹⁴ , además de por causas autoinmunes, hemofagocitosis y disminución de su producción en la médula ósea³⁷⁴.

Debido al papel que juegan las MMPs en la proteólisis de la membrana basal, y a que uno de los mecanismos por los que se produce trombopenia en la sepsis es la adhesión plaquetaria al endotelio no íntegro^{374,375}, resultando ser la MMP-9 un importante inhibidor de la agregación plaquetaria^{376,377}, y dado que en la sepsis este es el origen de la coagulación intravascular diseminada que conlleva el fallo orgánico, podemos explicar los hallazgos encontrados en nuestro estudio, de forma que los pacientes más graves, y por lo tanto que más fallecieron tuvieron niveles séricos más bajos de MMP-9 que los que sobrevivieron, y además también tuvieron menos contaje de plaquetas. También está descrito en la literatura el papel que la MMP-9 juega en la producción de las plaquetas a nivel medular³⁷⁶, otro de los mecanismos por los que en la sepsis se produce trombopenia.

Pero además, nosotros encontramos que los niveles de TIMP-1 estaban más elevados en los pacientes que evolucionaron desfavorablemente, y los niveles de TIMP-1 se correlacionaron negativamente con la cifra de plaquetas.

Así mismo encontramos una correlación negativa entre aPTT y ratio MMP-9/TIMP-1, de forma que los pacientes que fallecieron tenían

cifras más alargadas de aPTT, a la vez que menores niveles séricos de MMP-9 y niveles más elevados de TIMP-1.

6. Fibrinolisis y Marcadores Proteolíticos

Debido al importante papel que juega en la respuesta antifibrinolítica asociada con la sepsis el PAI-1, a que en estudios previos se ha reportado que los niveles de PAI-1 se asociaron con la morbilidad y la mortalidad del proceso séptico³⁷⁸⁻³⁸¹, y a que existen reportados en la literatura estudios que muestran una asociación entre los niveles de TIMP-1 y PAI-1³⁸², decidimos también medir los niveles circulantes de PAI-1 en nuestros pacientes sépticos, encontrando diferencias significativas entre supervivientes y no supervivientes.

Tras la inducción de la sepsis se produce una respuesta de liberación de activador tisular del plasminógeno (t-PA) y agotada ésta, una liberación progresiva de inhibidor tisular del plasminógeno (PAI-1), que lleva a un estado de bloqueo de la fibrinolisis, responsable de la perpetuación de la CID que se produce en el estado séptico¹¹³⁻¹¹⁴, que se asocia con la disfunción orgánica y con la gravedad de la sepsis^{115,116}.

En algunos estudios se ha podido constatar el papel que ejercen los inhibidores de las MMPs (TIMP-1 y TIMP-2) en la hemostasia, encontrándose una correlación positiva entre niveles de fibrinógeno y PAI-1 y niveles séricos de TIMP-1³⁸².

Los pacientes que fallecieron presentaron niveles superiores de PAI-1 en los días 1, 4 y 8. Por lo tanto, el aumento mantenido de los niveles circulantes de TIMP-1 que hemos encontrado en los pacientes fallecidos respecto a los supervivientes podría ser debido a unos mayores niveles de PAI-1, que favorecería el desarrollo de trombosis vascular generalizada, disfunción multiorgánica y fallecimiento de los pacientes sépticos.

7. MMPs y Predicción de Mortalidad

Cuando llevamos cabo el análisis ROC para cuantificar la bondad de nuestras variables como predictoras de mortalidad, encontramos que el TIMP-1 en los días 1 y 4 era un buen predictor de mortalidad, y su capacidad predictiva no era diferente a la de otros predictores de mortalidad clásicos (como la puntuación del SOFA y los niveles de ácido láctico) ^{5,383,367}.

En cuanto al el cociente MMP-9/TIMP-1 en los días 1, 4 y 8 encontramos tras el análisis ROC que también era tan buen predictor de mortalidad como los predictores clásicos (SOFA score y los niveles de ácido láctico) .

8. MMPs como factor independiente asociado a Mortalidad

Tras analizar los datos obtenidos en este estudio podemos destacar otro aspecto que no hemos encontrado descrito hasta el momento en la literatura, como es el que, en nuestro trabajo, los niveles circulantes de TIMP-1 se asociaban de forma independiente con la mortalidad en los pacientes con sepsis grave, aunque este inhibidor de las metaloproteasas ya había sido descrito como factor independiente asociado a la mortalidad en el paciente con cardiopatía isquémica³⁸⁴.

Es posible que la explicación a que también en los pacientes con cardiopatía isquémica el TIMP-1 se asocie de forma independiente con la mortalidad, como en los enfermos con sepsis grave, pueda encontrarse en la relación existente entre PAI-1 y TIMP-1³⁸⁴, ya que también en la cardiopatía isquémica se ha encontrado una correlación positiva entre ambos marcadores, fruto del estado procoagulante y antifibrinolítico que también se asocia con la cardiopatía isquémica.

9. MMPs y Supervivencia a los 30 días en Sepsis Grave

Al interpretar los resultados de la curva de supervivencia podemos establecer que los pacientes que presentaban al ingreso unos niveles circulantes de TIMP-1 $\geq 531\text{ng/ml}$ presentaban menos días de supervivencia durante los primeros 30 días que los pacientes con niveles inferiores, esta dato tampoco ha sido descrito hasta el momento en la literatura.

10. MMPs en sepsis: proteólisis, inflamación y coagulación

Las MMPs son una familia de endoproteasas zinc-dependientes que degradan la matriz extracelular^{121,385-387}, y forman parte en la reparación epitelial y en el control de la actividad de las citocinas³⁵⁰. Su actividad es regulada por específicos inhibidores tisulares de las metaloproteasas¹⁹⁴⁻¹⁹⁸.

Hasta el momento actual, las MMPs han sido estudiadas en procesos fisiológicos¹²⁵, tales como la ovulación¹²⁶, el crecimiento y diferenciación embrionaria¹²⁷, la invasión del trofoblasto¹²⁸, la involución uterina tras el parto¹²⁹, la remodelación mamaria en la lactancia¹³⁰, el crecimiento y la remodelación ósea¹³¹, así como en el desarrollo de algunos órganos como son las glándulas salivares¹³² y mamas¹³³, los gérmenes dentales¹³⁴, y los ovarios¹³⁴.

También podemos encontrar en la literatura numerosos estudios que demuestran el papel que las MMPs de la matriz juegan en algunos procesos patológicos, como en el crecimiento, agresividad y poder metastático de algunos tumores, en la arterioesclerosis y otras enfermedades cardiovasculares, en la artritis y osteoartritis, en el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, o en la enfermedad

vasculítica primaria (Kawasaki, Wegener, Takayasu y arteritis de células gigantes), entre otras¹²³.

Se ha estudiado la implicación de las MMPs en algunos procesos infecciosos como en la tuberculosis, patología en la que la expresión de MMP-9 parecen jugar un papel determinante en formación de cavernas, y con ello en la transmisión de la enfermedad³⁴⁶, así como en la extensión de la enfermedad desde el pulmón a otros órganos³⁵⁰ y en la mortalidad³⁵¹ de la infección tuberculosa.

También en algunas enfermedades víricas se han podido relacionar los niveles séricos de algunas MMPs y en concreto también la MMP-9, con la ruptura de la integridad de la barrera hematoencefálica y todas las consecuencias que de ello se derivan³²⁵⁻³³⁰.

Sin embargo, hay pocos trabajos en la literatura que analicen la influencia de las MMPs de la matriz y sus inhibidores en la sepsis, y su papel hasta el momento permanece sin determinar.

Los resultados de algunos trabajos hasta ahora publicados apuntan el papel que desempeñan las MMPs en el reclutamiento de los leucocitos desde el torrente sanguíneo hacia el lugar de la infección. La migración de las células inmunitarias desde el torrente sanguíneo hacia el foco de inflamación requiere la proteólisis de la membrana basal de los vasos sanguíneos, tal y como se ha descrito *in vitro* y en modelos animales²⁸⁶⁻²⁸⁹.

Las MMPs juegan también su papel en la respuesta inflamatoria ya que participan como moduladoras y además son moduladas por citocinas. Las MMPs promueven la liberación de TNF- α , activan la pro-interleucina 1- β , intervienen en la fragmentación de la interleucina 1- β para su activación y en convertir la IL-8 en un fragmento 10 veces más activo que la molécula inicial³⁰⁸⁻³¹¹. Pero a su vez las citocinas modulan la expresión de las MMPs^{319,320}. Las MMPs son secretadas en respuesta a citocinas tal y como el TNF- α y la IL-1 β , y se regulan negativamente por citocinas como el INF- γ , IL-4, e IL-10. Los esteroides, la progesterona y las retinoides también producen esta regulación negativa de las MMPs. Finalmente, el balance MMPs/TIMPs también puede modular la respuesta protrombótica/antifibrinolítica de la sepsis³⁸²⁻³⁷⁷.

En estudios llevados a cabo en voluntarios sanos se ha podido demostrar que la endotoxemia conlleva una liberación de MMP-9¹⁵⁹ y en pacientes con shock séptico la utilización de hemofiltración con filtros de Polimixina B que absorben las endotoxinas produce a su vez una disminución en los niveles plasmáticos de MMP-9¹⁶⁰. A su vez en estudios experimentales en ratones se ha podido comprobar que la administración de endotoxemia conlleva una liberación de MMP-9 y como consecuencia un shock inducido en ratones, y que en ratones con déficit de MMP-9 al administrar endotoxina no se produce³⁷⁹.

La relación entre coagulación e inflamación en la sepsis es ampliamente conocida³⁸⁸⁻³⁸⁹ y es posible que, MMPs/TIMPs puedan

también jugar su papel en la respuesta del sistema de coagulación y fibrinolisis en la sepsis, como así se puede entender en estudios en los que se ha explorado la capacidad de la MMP-9 para inhibir la agregación plaquetaria^{376,377,380,381}, así como la correlación encontrada entre TIMP-1 y PAI-1³⁸².

Todo indica que la sepsis es un proceso clínico complejo en el que se ven implicadas respuesta inflamatoria y coagulación. Los mediadores inflamatorios activan la coagulación y a su vez, la coagulación produce la activación del sistema inflamatorio. Las correlaciones observadas entre los marcadores proteolíticos, inflamatorios y de la coagulación soportan la hipótesis de la relación de estos mecanismos en la respuesta del huésped.

Una ratio más baja MMP-9/TIMP-1 y niveles más elevados de MMP-10 en no supervivientes con respecto a supervivientes como hemos encontrado en este estudio puede estar asociada con un estado de mayor inflamación, protrombosis y antifibrinolisis, responsable de la microtrombosis capilar, fallo multiorgánico y como consecuencia, mortalidad.

11. Implicaciones Terapéuticas

La Doxiciclina tiene efectos antiinflamatorios independientemente de su actividad como antimicrobiano, y sus propiedades como inhibidor

de las MMPs está bien documentado en la literatura, y posiblemente esté relacionado con el efecto que las doxiciclina produce sobre el sistema plasminógeno/plasmina.

Se ha estudiado de forma experimental el papel que las MMPs ejercen sobre la pared endotelial en la respuesta a la administración de endotoxinas, y el papel que el endotelio juega en la hiporeactividad vascular a la administración de vasoconstrictores en el shock séptico, que puede ser modulado con la administración de doxiciclina³⁹¹⁻³⁹⁴.

También hemos encontrados trabajos en la literatura en los que se estudia el papel de las MMPs en la disfunción miocárdica en el sepsis grave/shock séptico, en los que se ha visto el aumento de la expresión de MMP-9 en los animales que presentaban disfunción miocárdica asociada a la sepsis, y su modulación tras la administración de doxiciclina³⁹⁵.

Los bifosfonatos y las estatinas también son agentes terapéuticos que parecen haber demostrado su efecto sobre la expresión de MMPs³⁰⁰⁻³⁰², pero hasta el momento no hemos encontrado en la literatura estudios sobre su utilización en pacientes con sepsis.

Por otra parte, el desarrollo de moduladores específicos de la actividad MMP/TIMP^{244-248,396-399}, han sido estudiados de forma experimental en patología tumoral, remodelación cardíaca o pulmonar, y podrían ser utilizados como una nueva clase de fármacos para el tratamiento de la sepsis grave, sin embargo hasta el momento no hemos encontrado tampoco en la literatura estudios experimentales en sepsis.

Pocos son los estudios que hemos encontrado en la literatura que valoran la evolución de la sepsis grave con la administración de moduladores de las MMPs^{395,400-378,379}.

En un estudio llevado a cabo por Zhu y col³⁷⁸ se observó que la administración intraperitoneal de espermina en ratones sépticos se asoció a una reducción de los niveles de TIMP-1 en líquido peritoneal y en suero, y de la mortalidad.

Otro estudio llevado a cabo por Ho y col³⁷⁹, la administración intravenosa de ácido siálico en ratas sépticas se asoció con una disminución de los niveles sanguíneos de TIMP-1 y con la corrección de la hipotensión.

12. Limitaciones de este estudio

Mientras la fortaleza de nuestro estudio fué el relativamente amplio tamaño muestral, algunas limitaciones deben ser reconocidas.

Primera, la gran variabilidad en los niveles circulantes de los biomarcadores entre los pacientes, como se deduce de los grandes rangos intercuartiles de los biomarcadores.

Segunda, la variación circadiana de los niveles circulantes de MMPs and TIMP-1 no fue analizada y podría explorarse en próximos estudios.

Tercera, no se analizaron marcadores específicos de coagulación y fibrinolisis para poder establecer su asociación con la actividad de las MMPs.

Finalmente, la determinación de otras MMPs/TIMPs podría ser deseable para analizar mejor la relación entre las MMPs/TIMPs y la respuesta inflamatoria y protrombótica de estos pacientes.

V. Conclusiones

1. Los pacientes sépticos presentaron niveles más elevados de MMP-10 y TIMP-1, y menor ratio MMP-9/TIMP-1, MMP-10/TIMP-1 con respecto a controles sanos.

2. Los pacientes sépticos que fallecieron presentaron de forma mantenida mayores niveles circulantes de TIMP-1, menores niveles de MMP-9, y menor cociente MMP-9/TIMP-1 en comparación con los pacientes supervivientes.

3. Los pacientes sépticos que fallecieron presentaron de forma mantenida niveles séricos de MMP-10 significativamente más elevados que los pacientes supervivientes.

4. Los pacientes sépticos que fallecieron tuvieron niveles séricos sostenidos a lo largo de la primera semana de evolución más elevados de IL-10 que los pacientes que sobrevivieron, y se correlacionaron positivamente con los niveles séricos de TIMP-1.

5. Encontramos niveles séricos más elevados de PAI-1 en los pacientes que fallecieron como consecuencia de la sepsis grave, niveles que se mantuvieron elevados a lo largo de la primera semana de evolución; además los niveles séricos de PAI-1 se correlacionaron de forma positiva con los niveles de TIMP-1.

6. Los niveles circulantes de MMP-9, MMP-10 y TIMP-1 se correlacionaron de forma mantenida con otros marcadores de gravedad de la sepsis (como puntuación del SOFA, niveles de ácido láctico, parámetros de coagulopatía y niveles de mediadores inflamatorios).

7. Los niveles circulantes de TIMP-1 se asocian de forma independiente con la mortalidad y podrían ser utilizados como un nuevo marcador pronóstico de gravedad y mortalidad en los pacientes sépticos.

8. Existe una relación entre niveles séricos de TIMP-1 elevados y estado procoagulante/antifibrinolítico y mortalidad en la sepsis grave.

9. Creemos que en el futuro la modulación terapéutica de la expresión de MMPs/TIMPs podría mejorar el pronóstico de los pacientes con sepsis grave.

VI. Bibliografía

1. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113: 227-242.
2. Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, Young D, Black N, Rowan K.. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. *Crit Care Med* 2003; 31:2332-8
3. Cohen J, Guyatt G, Bernard GR, Calandra T, Cook D, Elbourne D, Marshall J, Nunn A, Opal S; UK Medical Research Council International Working Party. New strategies for clinical trials in patients with sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2001; 29: 880-886.
4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/ SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992; 101:1644-55.
5. Levy MM, Fink M P, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. "2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference". *Intensive Care Med*. 2003; 29:530-8.

6. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA*. 1995; 273:117-23
7. León Gil, C. et al. Documento de Consenso (SEMES-SEMICYUC): Recomendaciones del manejo diagnóstico-terapéutico inicial y multidisciplinario de la sepsis grave en los Servicios de Urgencias hospitalarios. *Med. Intensiva*. 2007;31:375-387
8. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, Peñuelas O, Lorente JA, Gordo F, Honrubia T, Algora A, Bustos A, García G, Diaz-Regañón IR, de Luna RR. Sepsis incidence and outcome: contrasting the intensive care unit with the hospital ward. *Crit Care Med* 2007; 35: 1284-1289
9. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B, for the EPISEPSIS Study Group.. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004;30:580-8
10. Finfer S, Bellomo R, Lipman J, French C, Dobb G, Myburgh J.. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med* 2004;30:589-96
11. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR.. Epidemiology of severe sepsis in the United States:

- analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10.
12. De Miguel-Yanes JM, Andueza-Lillo JA, González-Ramallo VJ, Pastor I, Muñoz J. Failure to implement evidence-based clinical guidelines for sepsis at the EDB. *Am J Emerg Med*. 2006;24:553-9.
 13. Annane D, Aegerter P, Jars-Guinestre MC, Guidet B, for the CUBRÉa Network. Current epidemiology of septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:165-72
 14. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003; 348:1546-54.
 15. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D; Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators. Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators: Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP Study. *Crit Care Med* 2006; 34: 344-353.
 16. Grupo para el Estudio de la Infección en Urgencias. Estudio epidemiológico de las infecciones en el Área de urgencias. *Emergencias*. 2000;12:80-9
 17. Martínez Ortiz de Zárate M. Aspectos epidemiológicos de las infecciones en las Áreas de Urgencias. *Emergencias*. 2001;13: S44-S50

18. Olivan Ballabriga AS, Agudo Pascual O, Agorreta Ruiz J, Pinillos Echevarría MA, Etxebarria Lus M, Moros Morgoñón MA, et al. La patología infecciosa en el Servicio de Urgencias de un hospital terciario. *Emergencias* 1998;10 Supl 1:22-5
19. Ferrer R, Artigas A, Levy MM, Blanco J, González-Díaz G, Garnacho-Montero J, Ibáñez J, Palencia E, Quintana M, de la Torre-Prados MV; Edusepsis Study Group. Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. *JAMA* 2008; 299: 2294-2303
20. Blanco J, Muriel-Bombín A, Sagredo V, Taboada F, Gandía F, Tamayo L, Collado J, García-Labattut A, Carriedo D, Valledor M, De Frutos M, López MJ, Caballero A, Guerra J, Alvarez B, Mayo A, Villar J; Grupo de Estudios y Análisis en Cuidados Intensivos. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care* 2008; 12: R158
21. Flaaten H.. Epidemiology of sepsis in Norway in 1999. *Crit Care* 2004;8:180-4
22. Silva E, de Almeida PM, Beltrami AC, Mohovic T, de Oliveira CL, Janiszewski M, et al, for the Brazilian sepsis epidemiological study.. Brazilian sepsis epidemiologic study. *Crit Care* 2004; 8:R251-R60.
23. Sundararajan V, Macisaac CM, Presneill JJ, Cade JF, Visvanathan K.. Epidemiology of sepsis in Victoria, Australia. *Crit Care Med* 2005;33:71-80

24. Burchardi H, Schneider H. Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics*. 2004;22:793-813.
25. Iñigo, J. et al. Epidemiología y costes de la sepsis grave en Madrid: Estudio de altas hospitalarias. *Med. Intensiva* 2006;30(5) :197-203
26. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J; et al, French ICU Group for Severe Sepsis. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults: a multicenter prospective study in intensive care units. *JAMA*. 1995;274(12):968-974
27. Nin N, Lorente JA, Ortiz-Leyba C, Valenzuela F, Baigorri F, López Rodríguez A, et al, por la Red para el Estudio del Shock y la Sepsis (RESYS). Estudio multicéntrico sobre la asociación entre variables relacionadas con la resucitación y la mortalidad en sepsis grave. *Med Intensiva* 2005;29:212-8.
28. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM; Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign Guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2004; 30: 536-555
29. Gospodarowics M, Benedet L, Hutter RV y cols. History and international developments in cancer starting. *Cancer Prev Control* 1998;2:262-268

30. Mira JP, Cariou A, Grall F, y cols. Association of TNF2, a TNF-alfa promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality. *JAMA* 1999;282:561-568.
31. Martin MC, Anglés R, Palau J, Perecaula R. Avances en la fisiopatología y tratamiento del shock séptico. *Urol Inter Invest* 1997; 2:141-150
32. Manthous CA, Hall JB, Samsel RW. Endotoxin in human disease. Part 1: biochemistry, assay and possible role in diverse disease states. *Chest* 1993; 104:1572-1581
33. Stephens R, Mythen M. Endotoxin immunization. *Intensive Care Med* 200; 26:S129-136
34. Frey E, Miller D, Jahr T, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay B, Wright S. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1992;176:1665-1671
35. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1931-1933
36. Lamy M, Deby-Dupont G. Is sepsis a mediator-inhibitor mismatch? *Intensive Care Med* 1995; 21:S250-257
37. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002; 420:885-91

38. Marra MN, Wilde CG, Griffith JE, Snable JL, Scott RW. Bactericida/permeability-increasing protein has endotoxin-neutralizing activity. *J Immunol* 1990;144:662-666
39. Lynn WA. Anti-endotoxin therapeutic options for the treatment of sepsis. *J Antimicrob Chemother* 1998;41:71-80
40. Hurley JC. Reappraisal with meta-analysis of bacteremia, endotoxemia, and mortality in gram-negative sepsis. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1278-1282
41. Cohen J. The detection and interpretation of endotoxaemia. *Intensive Care Med* 2000;26:S51-56
42. Ortiz Leiva C, Garnacho Montero J. Conocimientos actuales en fisiopatología de la sepsis. *Med Intensiva*. 2005; 29:135-41.
43. Opal S, Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 1999;27:1608-1616
44. Williams G, Giroir BP. Regulation of cytokine gene expression: tumor necrosis factor, interleukin-1, and the emerging biology of cytokine receptors. *New Horizons* 1995;3:276-287
45. Ein A, Abraham E. Can we make sense out of cytokines? *Chest* 2000; 117:932-934
46. Hayashi SH, Gillam IC, Bondy G, Duronio V, Hogg J. Molecular mechanisms of sepsis: molecular biology of the cell. *J Crit Care* 1995; 10:82-95

47. Adrie C, Pinsky MR. The inflammatory balance in human sepsis. *Intensive Care Med* 200;26:364-375
48. Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth.* 1996;77:110-7.
49. De Pablo Sánchez R, et al. Balance entre citocinas Pro y Antinflamatorias en estados sépticos. *Med Intensiva* 2005;29 (3):151-8
50. Tracey K, Cerami A. Tumor necrosis factor: an update review of its biology. *Crit Care Med* 1993;21:S415-422
51. Bazzoni F, De Backer D. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *New Eng Med* 1996;3334:1717-1725
52. Modawer LL. Biology of proinflammatory cytokines and their antagonists. *Crit Care Med* 1994;22:53-57
53. Dinarello C, Wolff S. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993;328:106-113
54. Vincent JL, De Backer D. Pathophysiology of septic shock. *Advances in sepsis* 2001; 1:87-89
55. Kasai T, Inada K, Takakuwa T, Yamada Y, Inoue Y, Shimura t, et al. Anti-inflammatory cytokine levels in patients with septic shock. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1997;98:34-42
56. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991; 77:1627-1652

57. Bagglioni M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; 55:97-109
58. Lauw FN, Van Deventer SJH, Van der Poll T. The role of interleukin 12 and IL-18 during endotoxemia and bacterial infection. *2000 Yearbook of intensive care and emergency medicine*: 18-26
59. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115:457-569
60. De Pablo Sánchez R, Monserrat Sanz J, Prieto Martín A, Reyes Martín E, Alvarez de Mon Soto M, Sánchez García M. Balance entre citocinas pro y antiinflamatorias en estados sépticos. *Med Intensiva* 2005;29(3):151-8
61. Tokman MG, Carey KD, Quimby FW. The patogénesis of experimental toxic shock síndromes: the role of interleukin 2 in the induction of hypotension and release of cytokines. *Shock* 1995; 3:145-181
62. Cavailon JM, Adib-Conquy M. Involvement of pro-and anti-inflammatory cytokines in sepsis. *The sepsis text*, 2002:160-195
63. Wong GC, Clark SC. Multiple actions of interleukin-6 within a cytokine network. *Immunol Today* 1988; 9:137-139
64. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflamamatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997; 112:S321-329

65. Hack CE, et al. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 1989; 74:1704-1710
66. Van Deuren M, Van der Ven-Jongekrijg, et al. Correlation between proinflammatory cytokines and antiinflammatory mediators and the severity of disease in meningococcal infections. *J Infect Dis* 1995; 172(2):433-9
67. Opal S, de Palo V. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 17: 1162-1172
68. Paul WE. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991; 77: 1859-1870
69. Letterio JJ, Roberts AB, TGF-beta: a critical modulator of immune cell function. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997;84:244-50
70. Torre D, et al. Anti-inflammatory response of IL-4, IL-10 and TGF-beta in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Mediators Inflamm.* 2000;9:193-5
71. Knapp S, Thalhammer F, Locker GJ. et al. Prognostic value of MIP-1 alpha, TGF-beta 2, Selam-1, and sVCAM-1 in patients with gram-positive sepsis. *Clin Immunopathol.* 1998;87:139-44
72. Patarroyo M, Makgoba MW. Leukocyte adhesion to cells. Molecular basis physiological relevance and abnormalities. *Scand J Immunol* 1989; 30:129-164
73. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix

- metalloproteinas 3(stromelysin). *Biochemistry* 1990; 29(44):10261-10270
74. Geng YJ, Holm J, Nygren S, Bruzelius M, Stemme S, Hansson GK. Expression of the macrophage scavenger receptor in atheroma. Relationship to immune activation and the T-cell cytokine interferon-gamma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1995-2002
75. Johnston RB Jr. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 1988; 318: 747-752
76. Fujishima S, Aikawa N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intensive Care Med* 1995;21:277-285
77. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 1995; 9(10):910-918
78. Bosmans JM, Kockx MM, Vrints CJ, Bult H, De Meyer GR, Herman AG. Fibrinogen and von Willebrand factor deposition are associated with intimal thickening after balloon angioplasty of the rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(4): 634-645
79. Lahera V, Navarro-Cid J, Maeso R, Rodrigo E, Cachafeiro V:Disfunción endotelial y arteriosclerosis. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1997; 9(2):15-20
80. Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med* 2001;29(S): S21-27

81. Ten VS, Pinsky DJ. Endothelial response to hypoxia: physiologic adaptation and pathologic dysfunction. *Curr Opin Crit Care.* 2002;8:242-50
82. Aird WC. Vascular bed-specific hemostasis: Role of endothelium in sepsis pathogenesis. *Crit Care Med.* 2001; 29:S29-34.
83. Torrabadella de Reynoso P, Salgado Remigio A. Oxido Nítrico y sus inhibidores em la sepsis y el shock séptico. *Med Intensiva* 1993; 17:477-483
84. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE: APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985, 13:818-829
85. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric-oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:201-2012
86. Luce J, Yaffe M, Fink M. Lipid mediators in the pathophysiology of critical illness. *Crit Care Med* 200; 28:27-36
87. Davies Mg, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Siurg* 1997;84:920-935
88. Marcel Levi, Hugo ten Cate, Tom van der Poll. Pathogenesis of Disseminated Intravascular Coagulation in Sepsis. *JAMA.*1993.270:975-979.
89. Lorant DE, Topham MK, Whatley RE et al. Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest.*1993.92:559-570.

90. Levi M. The coagulant response in sepsis. *Clin Chest Med* 2008;29:627-642.
91. Levi M. The coagulant response in sepsis and inflammation. *Hamostaesologie* 2010; 30(1):10-6
92. Levi M, Van der Poll T. Inflammation and coagulation. *Crit Care Med* 2010;38(2 Suppl):S26:34
93. Sigurdsson GH, Christenson JT, Al-Rakshy MB, Sadek S. Intestinal platelet trapping after traumatic shock. An early sign of sepsis and multiorgan failure critically ill patients? *Crit Care Med* 1992; 20:458-467
94. Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 1997; 23:379-385
95. Gawaz M, Fateh-Moghadam S, et al. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest* 1995; 25:843-845
96. Gawaz M, Fath-Moghadam S, Pliz G, Gurland HJ, Werdan K. Severity of multiple organ failure but not of sepsis correlates with irreversible platelet degranulation. *Infection* 1995; 23:16-23

97. Taylor FB, Chang A, Ruf W, Morrissey JH, Hinshaw I, Carlett R, and cols. Lethal E.Coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock* 1991; 33: 127-134
98. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Immunol* 1995; 13:369-398
99. Lopez Rodríguez, A. Alteraciones de la Coagulación en la sepsis. *Med Intensiva* 2005 ; 29(3):166-177
100. Dickneite G. Antithrombin III in animal models of sepsis and organ failure. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24:61-69
101. Eisele B, Lamy M, Thijs LG, Keinecke HO, Schuster IL-P, Mathias FR, Fourrier E, Heinrichs H, Delvos U. Antithrombin III in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 1998; 24:663-672
102. Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, Hendricx S, Caron C, Rime A, Marey A, Lesvatel P. Septic Shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. *Chest* 1992; 101:816-823
103. Alcaraz A, España F, Sánchez J, y cols. Activation of the protein C pathway in acute sepsis. *Thromb Res* 1995;79:83-93
104. Taylor FB, et al. C4b-binding protein exacerbates the host response to Escherichia Coli. *Blood* 1991; 78:357-363

105. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PR, LaRosa S, Dhainaut JF, López-Rodríguez A, y cols. Por el Recombinant Human Activate Protein C World Wide Evaluation in Severe Sepsis (PROWES) Study Group. *N Engl J Med* 2001; 344:699-709
106. Creasey AA, Chang AC, Feigen L, Wun TC, Taylor FB Jr, Hinshaw LB. Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from *Escherichia Coli* septic chock. *J Clin Invest.* 1993; 91:2850-60
107. Shimura M, Wade H, Wakita Y, Nakase T, Hiyoyama K, Nagaya S, Mori Y, Shiku H. Plasma tissue factor pathway inhibitor levels in patients with disseminates intravascular coagulation. *Am J Hematol* 1997; 55:169-174
108. Gando S, Nanzaki S, Aoi K, Kemmotsu O. Activation of the extrinsic coagulation pathway in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 1998; 26. 2005-2009
109. Gando S, Nanzaki S, et al. Significant correlations between tissue factor and thrombin markers in trauma and septic patients with disseminates intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1111-1115
110. Goldfarb RD, Glock D, Johnson K, Creasey AA, Carr C, McCarthy RJ, et als. Randomized, blinded, placebo-controlled trial of tissue factor pathway inhibitor in porcine septic shock. *Shock* 1998; 10: 1073-1123

111. Abraham E, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Doig C, López Rodríguez A, y cols. Por el OPTIMIST Trial Study Group. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis. A randomised controlled trial. *JAMA* 2003; 290:238-247
112. Suffredini AF, Harpel PD, Parrillo JE. Promotion and subsequent inhibition of plasminogen activation after administration of intravenous endotoxin to normal subjects. *N Engl J Med* 1989; 320:1165-1172
113. Colucci M, Páramo JA, Collen D. Generation in plasma of a fast-acting inhibitor of plasminogen activator in response to endotoxin stimulation. *J Clin Invest* 1985; 75: 818-824
114. Voss R, Mathias FR, Borkowski G, Reitz D. Activation and inhibition of fibrinolysis in septic patients in an internal intensive care unit. *Crit Care Med* 1990; 75:99-105
115. Gando S, Nakanishi Y, Tede I. Cytokines and plasminogen activator inhibitor-1 in post-trauma disseminated intravascular coagulation: relationship to multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 1995; 23: 1835-1842
116. Lorente JA, García-Frade LJ, Landín L, de Pablo R, Torrado C, Renes E, et al. Time course of hemostatic abnormalities in sepsis and its relation to outcome. *Chest*. 1993;103:1536-42

117. Watanabe R, Wada H, Watanabe Y, Sakakura M, Nakasaki T and cols. Activity and antigen levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 2001; 104: 1-6
118. Elkington PTG, O`kane CM and Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin & Experim Inmul* 2005; 142: 12-20
119. Rajogapalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996; 98:2572-2579
120. Mignatti P, Rifkin DB. Nonenzymatic interactions between proteinases and the cell surface: novel roles in normal and malignant cell physiology. *Adv Cancer Res* 2000; 78:103-157
121. Parks WC, Wison CL, Lopez- Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:617-29
122. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962;47:1014–1022.

123. Brinckerhoff CE, Matrisian LM, Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:207-14
124. Birkedal-Hansen H, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197–250
125. Werb, Z., C. M. Alexander and R. R. Adler: Expression and Function of Matrix Metalloproteinases in Development. In: *Matrix Metalloproteinases and Inhibitors*. 1992, Spec.Suppl. No. 1. Gustav Fischer, Stuttgart pp. 337-343.
126. Brannstrom, M., J. F. Woessner, Jr., R. D. Koos, C. H. J.Sear and W. J. LeMaire: Inhibitors of Mammalian Tissue Collagenase and Metalloproteinase Suppress Ovulation in the Perfused Rat Ovary. *Endocrinology*. 1988;122:1715-1721
127. Brenner, C. A., R. R. Adler, D. A. Rappolee, R. A. Pedersen and Z. Werb: Genes for Extracellular Matrix-Degrading Metalloproteinases and their Inhibitor, TIMP, Are Expressed During Early Mammalian Development. *Genes Develop*. 1989;3:848-859
128. Librach, C.L., Z. Werb, M. L. Fitzgerald, K. Chiu, N. M. Corwin, R. A. Esteves, D. Grobelny, R. Galaray, C. H. Damsky and S. J. Fisher: 92-kDA Type IV Collagenase Mediates Invasion of Human Cytotrophoblasts. *Cell Biol*. 1991;113:437-449

129. Rajabi, M. R., D. D. Dean and J. F. Woessner, Jr.: Changes in Active and Latent Collagenase in Human Placenta Around the Time of Parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990;163:499-505
130. Wiseman BS, et al. Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *J Cell Biol* 2003;162:1123–1133
131. Sellers, A., J. J. Reynolds and M. C. Meikle: Neutral MetalloProteinases of Rabbit Bone. *Biochem. J.* 1978;171:493-496
132. Nakanishi, Y., F. Gugiura, J.-L. Kishi and T. Haykawa: Collagenase Inhibitor Stimulates Cleft Formation during Early Mophogenesis of Mouse Salivary Gland. *Dew Biol.* 1986;113:201-206
133. Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, Werb Z. Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* 2006;74:365–381
134. Nomura, S.. B. L. M. Hogan. A. J. Wills, J. K. Heath and D. R. Edwards: Developmental Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) RNA. *Development.* 1989;105:575-584
135. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378(3-4):151-160

136. Okada Y, Nakanishi I. Activation of matrix metalloproteinase 3(stromelysin) and matrix metalloproteinase 2(gelatinase) by human neutrophil elastase and cathepsin G. FEBS 1989; 249(2): 353-356.
137. Joseph D. Raffetto, MD and Raouf A. Khalil, MD, PhD Biochem Pharmacol. 2008; 75(2): 346–359
138. Rodríguez JA, et al. Metalloproteases, Vascular Remodeling, and Atherothrombotic Syndromes. Rev Esp Cardiol. 2007;60(9):959-67
139. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. Curr Opin Cell Biol 1998; 10:602-608.
140. Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. Circulation 1995; 92(6):1393-1398.
141. Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT, Ding Y, Sutinen M, Visser H, van Hinsbergh V W, Helaakoski T, Kainulainen, T., Ronka, H., Tschesche, H., Salo, T. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor and doxycycline. J Biol Chem 1997; 272:31504-31509.

142. Kainulainen T, Ronka H, Tschesche H, Salo T. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor and doxycycline. *J Biol Chem* 1997; 272:31504-31509.
143. Knäuper V, Cowell S, Smith B, López-Otín C, O'Shea M, Morris H, Zardi L, Murphy G. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3(MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* 1997; 272:7608-7616.
144. Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J, Vuorio E, Heino J, Kähäri VM. Collagenase-3(MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn* 1997; 208:387-397.
145. Uitto VJ, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins E, Firth JD, Salonen J, López-Otín C, Saarialho-Kere U, Kähäri VM. Collagenase-3(matrix metalloproteinase-3) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. *Am J Pathol* 1998; 152:1489-1499.
146. Uría JA, Stähle-Bäckdahl M, Seiki M, Fueyo A, López-Otín C. Regulation of collagenase-3 expression in human breast

- carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res* 1997; 57:4882-4888.
147. Saarialho-Kere UK. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res* 1998; 290:S47-S54.
148. Holtz B, Cuniasse P, Boulay A, Kannan R, Mucha A, Beau F, Basset P, Dive V. Role of the S1'subsite glutamine 215 in activity and specificity of stromelysin-3 by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 1999; 38(37):12174-12179.
149. Cedro K, Radomski A, Radomski MW, Ruzylo W, Herbaczynska - Cedro K. Release of matrix metalloproteinase- 9 during balloon angioplasty in patients with stable angina: a preliminary study. *Int J Cardiol* 2003; 92: 177–180
150. Orbe J, Montero I, Rodríguez JA, Belouqui O, Roncal C, Páramo JA: Independent association of matrix metalloproteinase-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2007, 5:91-97.
151. Kassim SY, Gharib SA, Mecham BH, Birkland TP, Parks WC, McGuire JK: Individual matrix metalloproteinases control distinct transcriptional responses in airway epithelial cells infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 2007, 75:5640-5650.

152. Ritter M, Mennerich D, Weith A, Seither P: Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly (I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. *J Inflamm (Lond)* 2005, 2:16.
153. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture?. *Circ Res* 1997; 81(3):448-454.
154. Okada Y, Katsuda S, Okada Y, Nakanishi I. An elastinolytic enzyme detected in the culture medium of human arterial smooth muscle cells. *Cell Biol Int* 1993; 17(9):863-869.
155. Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol* 1996; 149(1):273-282.
156. Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S, Gavrilovic J. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 1999; 107(1):38-44.

157. Murphy G, Knauper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?. *Matrix Biol* 1997; 15(8-9):511-518.
158. Pugin J, Widmer MC, Kossodo S, Liang CM, Preas H, Ln Suffredini AF. Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:458–64
159. Albert J, Radomski A, Soop A, Sollevi A, Frostell C, Radomski MW. Differential release of matrix metalloproteinase-9 and nitric oxide following infusion of endotoxin to human volunteers. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003; 47:407-10.
160. Nakamura T, Ebihara I, Shimada N, Shoji H, Koide H. Modulation of plasma metalloproteinase-9 concentrations and peripheral blood monocyte mRNA levels in patients with septic shock: effect of fibre-immobilized polymyxin B treatment. *Am J Med Sci* 1998; 316: 355-60
161. Hoffmann U, Bertsch T, Dvortsak E, Liebetrau C, Lang S, Liebe V, Huhle G, Borggreffe M, Brueckmann M: Matrix metalloproteinases and their inhibitors are elevated in severe sepsis: prognostic value of TIMP-1 in severe sepsis. *Scand J Infect* 2006, 38:867-872

162. Gilles C, Polette M, Seiki M, Birembaut P, Thompson EW. Implication of collagen type I-induced membrane-type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in the metastatic progression of breast carcinoma. *Lab Invest* 1997; 76(5):6516-6560.
163. Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Meisel S, Xu XO, Chai NN, Fishbein MC, Kaul S, Cercek B, Sharifi B, Shah PK. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation* 1999; 99(24):3103-3109.
164. Yamanaka H, Makino K, Takizawa M, Nakamura H, Fujimoto N, Moriya H, Nemori R, Sato H, Seiki M, Okada Y. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in rheumatoid synovium. *Lab Invest* 2000; 80(5):677-687.
165. Puente XS, Pendas AM, Llano E, Velasco G, Lopez-Otin C. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56(5):944-949.
166. Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knauper V, Murphy G, Lopez-Otin C. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of

- progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res* 1999; 59(11):2570-2576.
167. Itoh Y, Kajita M, Kinoh H, Mori H, Okada A, Seiki M. Membrane type 4 matrix metalloproteinase(MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. *J Biol Chem* 1999; 274(48):34260-34266.
168. Wang Y, Johnson AR, Ye QZ, Dyer RD. Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J Biol Chem* 1999; 274(46):33043-33049.
169. Pei D. Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J Biol Chem* 1999a; 274(13):8925-8932.
170. Pei D. Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell Res* 1999b; 9(4):291-303.
171. Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, Gavilovic J, Edwards D. Cellular mechanisms for local proteolysis and the regulation of the microenvironment. *Fibrinolysis and Proteolysis* 2000; 14(2/3):165-174.

172. Yu WH, Woessner JF Jr. Heparan sulfate proteoglycans as extracellular docking molecules for matrix metalloproteinase 7. *J Biol Chem* 2000; 275(6):4183-4191.
173. Yamashita K, Mori M, Shiraishi T, Shibuta K, Sugimachi K. Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 expression in esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3):1169-1174
174. Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM. The metalloproteinase matrixlysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr Biol* 1999; 9(24):1441-1447.
175. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 1998; 102(11):1900-1910.
176. Matsumoto S, Kobayashi T, Katoh M, Saito S, Ikeda Y, Kobori M, Masuho Y, Watanabe T. Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development. *Am J Pathol* 1998; 153(1):109-119.

177. Brenner DA, O'Hara M, Angel P, Chojkier M, Karin M. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor alpha. *Nature* 1989; 337:661-3
178. Unermori EN, Hibbs Ms, Amento EP. Constitutive expression of a 92-kD gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1991; 88:1656-62
179. Miltenburg AM, Lacraz S, Welgus HG, Dayer JM. Immobilized anti-CD3 antibody activates T cell clones to induce the production of interstitial collagenase, but not tissue inhibitor of metalloproteinases, in monocytic THP-1 cells and dermal fibroblasts. *J Immunol* 1995;154:2655-67.
180. Lacraz S, Isler P, Vey E, Welgus HG, Dayer JM. Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J Biol Chem* 1994;269:22027-33
181. Wahl LM, Corcoran ME, Mergenhagen SE, Finbloom DS. Inhibition of phospholipase activity in human monocytes by IFN-gamma blocks endogenous prostaglandin E2-dependent collagenase production. *J Immunol* 1990; 144:3518-22
182. Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Wahl LM. Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E2 synthesis blocks

- interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. *J Biol Chem* 1992;267:515–9.
183. Mertz PM, DeWitt DL, Stetler-Stevenson WG, Wahl LM. Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *J Biol Chem* 1994;269:21322–9.
184. Reunanen N, Westermarck J, Hakkinen L, Holmstrom TH, Elo I, Eriksson JE, Kahari VM. Enhancement of fibroblast collagenase (matrix metalloproteinase-1) gene expression by ceramide is mediated by extracellular signal-regulated and stress-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1998; 273:5137–45.
185. Lai WC, Zhou M, Shankavaram U, Peng G, Wahl LM. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol* 2003; 170:6244–9
186. Wahl SM, Wahl LM, McCarthy JB, Chedid L, Mergenhagen SE. Macrophage activation by mycobacterial water soluble compounds and synthetic muramyl dipeptide. *J Immunol* 1979; 122:2226–31

187. Peña E. Sistema fibrinolítico, plasmina y metaloproteasas en la art eriosclerosis. Tesis doctoral Universidad de Barcelona. 2001
188. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; 378(3-4):151-160
189. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(14): 5578-5582.
190. Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, Gavilovic J, Edwards D. Cellular mechanisms for local proteolysis and the regulation of the microenvironment. *Fibrinolysis and Proteolysis* 2000; 14(2/3):165-174.
191. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994; 370(6484):61-65..
192. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 1995; 270(10):5331-5338
193. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. : *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477(1-2):267-283

194. Huang W, Meng Q, Suzuki K, Nagase H, Brew K. Mutational study of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) locates an inhibitory region for matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1997; 272(35):22086-22091
195. Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, Hawkes SP. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. : *J Biol Chem* 1992; 267(24):17321-17326.
196. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 1996; 271(48):30375-30380.
197. Nagase H, Itoh Y, Binner S. Interaction of alpha 2-macroglobulin with matrix metalloproteinases and its use for identification of their active forms. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 732:294-302
198. Chromek M, Tullus K, Lundahl J, Brauner A. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 activates normal human granulocytes, protects them from apoptosis, and blocks their transmigration during inflammation. *Infection and Immunity* 2004; 72: 82-8
199. Kähäri V-M, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 1999;31:34-45

200. Freije JM, Diez Itza I, Balbín M, et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1994; 269:16766 –73.
201. Johansson N, Airola K, Grénman R, et al. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am J Pathol* 1997;151:499–508.
202. Airola K, Johansson N, Kariniemi A-L, et al. Human collagenase-3 is expressed in malignant squamous epithelium of the skin. *J Invest Dermatol* 1997;109:225–31
203. Johansson N, Vaalamo M, Grénman S, et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by tumour cells in invasive vulvar squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 1999; 154:469–80.
204. Airola K, Karonen T, Vaalamo M, et al. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br J Cancer* 1999;80:733–43.
205. Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, et al. High collagenase-1 expression correlates to favourable chemoimmunotherapy response in human metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2001;11:157–66.

206. Uriá JA, Balbín M, López JM, et al. Collagenase-3 (MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor. *Am J Pathol* 1998; 153:91–101.
207. Bostrom PJ, Ravanti L, Reunanen N, et al. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Int J Cancer* 2000; 88:417–23.
208. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990; 348:699–704.
209. Basset P, Bellocq JP, Wolf C, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990;348:699–704
210. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of 163 Matrix metalloproteinases in cancer unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1993;268:23824–9
211. Kerkel E, Ala-aho R, Jeskanen L, et al. Expression of human macrophage metalloelastase (MMP-12) by tumour cells in skin cancer. *J Invest Dermatol* 2000;114:1113–9
212. Uria JA, Lopez-Otin C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumours and showing the minimal domain organization required for secretion, latency and activity. *Cancer Res* 2000;60:4745–51

213. Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2730–4
214. Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumour tissues correlates with invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17:315–23.
215. Kodate M, Kasai T, Hashimoto H, et al. Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int* 1997; 47:461–9.
216. Papathoma AS, Petraki C, Grigorakis A, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Res* 2000; 20:2009–13.
217. Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases (mmp)-2, mmp-9 and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7:2396–404.
218. Maeta H, Oghi S, Terada T. Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. *Virchows Arch* 2001;438:121–8

219. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, et al. MMP-2 and TIMP-2 expression correlates with poor prognosis in cervical carcinoma a clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. *Gynecol Oncol* 1999; 73:372–82.
220. Du B, Wang P, Guo X, et al. Expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in laryngeal carcinoma. *Pathol Oncol Res* 1999; 5:214–7.
221. Etoh T, Inoue H, Yoshikawa Y, et al. Increased expression of collagenase-3 (MMP-13) and MT1-MMP in eosophageal cancer is related to cancer aggressiveness. *Gut* 2000; 47:50–6.
222. Salmela MT, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, et al. Up regulation and differential expression of matrilysin (MMP-7) and metalloelastase (MMP-12) and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-3 in Barrett's oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2001;85:383–92
223. Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, et al. The human tumour cell derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 1995; 55:434–9.
224. Westermarck J, Li S, Jaakkola P, et al. Activation of fibroblast collagenase-1 expression by tumour cells of squamous cell carcinomas is mediated by p38 mitogen-activated protein

- kinase and c-Jun NH2-terminal kinase-2. *Cancer Res* 2000;60:7156–62
225. Cazorla M, Hernandez L, Nadal A, et al. Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol* 1998; 186:144–50.
226. Ohashi K, Nemoto T, Nakamura K, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 2000; 88:2201–9.
227. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, et al. Expression of MMPs, MT-MMP and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumour invasion and metastasis. *Head Neck* 1999;21:627–38.
228. Bando E, Yonemura Y, Endou Y, et al. Immunohistochemical study of MT-MMP tissue status in gastric carcinoma and correlation with survival analyzed by univariate and multivariate analysis. *Oncol Rep* 1998; 5:1483–8.
229. Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y, et al. Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer* 1998;82:1359–66.

230. Gojhi K, Fujimoto N, Komiyama T, et al. Elevation of serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -3 as new predictors of recurrence in patients with urothelial carcinoma. *Cancer* 1996;78:2379–8
231. Westerlund A, Apaja-Sarkkinen M, Hyytiäinen M, et al. Gelatinase A-immunoreactive protein in ovarian lesions—prognostic value in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1999; 75:91–8.
232. Kuniyasu H, Ellis LM, Evans DB, et al. Relative expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts disease outcome in patients with resectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5:25–33.
233. Yamamoto H, Itoh F, Adachi Y, et al. Messenger RNA expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human hepatocellular cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1999;29:58–62
234. Hara I, Miyake H, Hara S, et al. Significance of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase expression in the recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2001;165:1769–72
235. Moser PL, Kieback DG, Hefler L, et al. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMP) 1 and 2 and tissue

- inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP 2) in stage IB cervical cancer. *Anticancer Res* 1999;19:4391–3.
236. Inoue T, Yashiro M, Nishimura S, et al. Matrix metalloproteinase-1 expression is a prognostic factor for patients with advanced gastric cancer. *Int J Mol Med* 1999;4:73–7
237. Yoshizaki T, Maruyama Y, Sato H, et al. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2001;95:44–50
238. Yamashita K, Azumano I, Mai M, et al. Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human gastric 164 carcinomas. Implications for vessel invasion and metastasis. *Int J Cancer* 1998;17:187–94
239. Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1104–17
240. Patterson BC, Sang QA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem* 1997; 272:28823–5.
241. Lijnen HR, Ugwu F, Bini A, et al. Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry* 1998; 37:4699–702.

242. Dong Z, Kumar R, Yang X, et al. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 1997; 88:801–10.
243. Brown PD. Ongoing trials with matrix metalloproteinase inhibitors. *Exp Opin Invest Drugs* 2000; 9:2167–77.
244. Vihinen P, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer* 2002;99:145-166
245. Nelson AR, Fingleton B, Rotherberg ML, et al. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000;18:1135–49
246. Rowinsky EK, Humphrey R, Hammond LA, et al. Phase I and pharmacologic study of the specific matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 on a protracted oral daily dosing schedule in patients with solid malignancies. *J Clin Oncol* 2000;18:178–86
247. Teronen O, Heikkilä P, Konttinen YT, et al. MMP inhibition and downregulation by biphosphonates. *Ann NY Acad Sci* 1999;878:453-65
248. Lokeshwar BL, Escatel E, Zhu B. Cytotoxic activity and inhibition of tumour cell invasion by derivatives of a chemically modified tetracycline CMT-3 (COL-3). *Curr Med Chem* 2001;8:271-

-
249. Pelletier P, Martel-Pelletier J and Howell DS, Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: W J Koopman, Editor, A Textbook of Rheumatology, Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore (2000), pp. 2195–2245
250. Martell Pelletiel J, et al. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. Best Practice & Research Clinical Rheumathology 2001; 15(5):805-829
251. Martel-Pelletier JP and Pelletier JP. Wanted the collagenase responsible for the destruction of the collagen network in human cartilage. British Journal of Rheumatology 1996; 35: 818–820
252. Moldovan F, Pelletier JP, Hambor J. Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. Arthritis & Rheumatism, 1997;40: 1653–1661
253. Fernandes C, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V. Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. Journal of Rheumatology, 1998; 25: 1585–1594.
254. Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S. Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism, 2000; 43 : 1226–1232

255. Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell*, 1997; 90: 589–592.
256. Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Developmental Biology*, 1995; 169: 378–383
257. Lark MW, Bayne EK, Flanagan F. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *Journal of Clinical Investigation*, 1997; 100: 93–106
258. Lavigne MC, Thakker P, Gunn J, Wong A, Miyashiro JS, Wasserman AM, et al. Human bronchial epithelial cells express and secrete MMP-12. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324:534–46.
259. Lian X, Qin Y, Hossain SA, Yang L, White A, Xu H, et al. Overexpression of Stat3C in pulmonary epithelium protects against hyperoxic lung injury. *J Immunol* 2005;174:7250–6
260. Xie S, Issa R, Sukkar MB, Oltmanns U, Bhavsar PK, Papi A, et al. Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 in human airway smooth muscle cells. *Respir Res* 2005; 6:148.

261. Lagente V, Boichot E. Models for chronic obstructive pulmonary disease involving matrix metalloproteinases. *Drug Discov Today Dis Models* 2006; 3:231–6.
262. Nenan S, Planquois JM, Berna P, De Mendez I, Hitier S, Shapiro SD, et al. Analysis of the inflammatory response induced by rhMMP-12 catalytic domain instilled in mouse airways. *Int Immunopharmacol* 2005; 5:511–24.
263. Starcher BC. Elastin and the lung. *Thorax* 1986; 41:577–85.
264. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:602–8.
265. Chen YE. MMP-12, an old enzyme plays a new role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Am J Pathol* 2004;165:1069–70
266. Gronski Jr TJ, Martin RL, Kobayashi DK, Walsh BC, Holman MC, Huber M, et al. Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J Biol Chem* 1997; 272:12189–94.
267. Ashworth JL, Murphy G, Rock MJ, Sherratt MJ, Shapiro SD, Shuttleworth CA, et al. Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. *Biochem J* 1999; 340(1):171–81.

268. Matsumoto S, Kobayashi T, Katoh M, Saito S, Ikeda Y, Kobori M, et al. Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development. *Am J Pathol* 1998; 153:109–19.
269. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22:672–88.
270. Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res* 2003;52:95–100.
271. Demedts IK, Morel-Montero A, Lebecque S, Pacheco Y, Cataldo D, Joos GF, et al. Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD. *Thorax* 2006; 61:196–201.
272. Shapiro SD. Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:98–102.
273. Babusyte A, Stravinskaite K, Jeroch J, Lotvall J, Sakalauskas R, Sitkauskiene B. Patterns of airway inflammation and MMP-12 expression in smokers and exsmokers with COPD. *Respir Res* 2007; 8:81.

274. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350:2645–53.
275. Shapiro SD. Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:S160–4.
276. Pascual RM, Peters SP. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:477–86
277. Beasley R, Page C, Lichtenstein L. Airway remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy Rev* 2002; 2:109–16.
278. Holgate ST. Epithelial damage and response. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(Suppl.1):37–41.
279. Warner RL, Lukacs NW, Shapiro SD, Bhagarvathula N, Nerusu KC, Varani J, et al. Role of metalloelastase in a model of allergic lung responses induced by cockroach allergen. *Am J Pathol* 2004; 165:1921–30.
280. Beasley R, Page C, Lichtenstein L. Airway remodelling in asthma. *Clin Exp Allergy Rev* 2002; 2:109–16.
281. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94:2493–2503

282. Tyagi SC, Campbell SE, Reddy HK, Tjahja E, Voelker DJ. Matriz metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol Cell Biochem* 1996; 155: 13–21
283. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1281–1292
284. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996; 98: 2572–2579
285. Milkiewicz M, Kelland C, Colgan S, Haas TL. Nitric oxide and p38 MAP kinase mediate shear stress-dependent inhibition of MMP-2 production in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 2006; 208: 229-237
286. Sinha I, Hannawa KK, Ailawadi G, et al. The nitric oxide donor DETA-NONOate decreases matrix metalloproteinase-9 expression and activity in rat aortic smooth muscle and abdominal aortic explants. *Ann Vasc Surg* 2006; 20: 92-98
287. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circulation Res* 1995; 77:863–873

288. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1512–1531
289. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Isner JM. Differential expression of 92-kDa gelatinase in primary atherosclerotic versus restenotic coronary lesions. *Am J Cardiol* 1997; 79: 878–882
290. Brown DL, Hibbs MS, Kearney M, Loushin C, Isner JM. Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions: association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation* 1995; 91: 2125–2131
291. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, et al. AtheroGene Investigators. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003; 107: 1579–1585
292. Sundström J, Evans JC, Benjamin EJ, et al. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures. The Framingham Heart Study. *Circulation* 2004; 109: 2850–2856
293. Kalela A, Pönniö M, Koivu TA, et al. Association of serum sialic acid and MMP-9 with lipids and inflammatory markers. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 99–104

294. Papazafropoulou A, Perrea D, Moysakis I, Kokkinos A, Katsilambros N, Tentolouris N. Plasma levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 are not associated with arterial stiffness in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*, 2008
295. Sundström J, Evans JC, Benjamin EJ, et al. Relations of plasma total TIMP-1 levels to cardiovascular risk factors and echocardiographic measures: the Framingham heart study. *Eur Heart J* 2004; 25: 1509–1516
296. Koh KK, Ahn JY, Kang MH, et al. Effects of hormone replacement therapy on plaque stability, inflammation, and fibrinolysis in hypertensive or overweight postmenopausal women. *Am J Cardiol* 2001; 88: 1423–1426
297. Lee E, Vaughan DE, Parikh SH, et al. Regulation of matrix metalloproteinases and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by plasminogen in cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996; 78: 44–49
298. Rodriguez JA, Orbe J, Páramo JA. Metalloproteases, Vascular Remodelling and Atherothrombotic Syndromes. *Rev Esp Cardiol Rev Esp Cardiol*. 2007;60(9):959-67
299. Montero I, Orbe J, Varo N, Beloqui O, Monreal JI, Rodríguez JA, et al. C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and

- 10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47:1369-78.
300. Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1,-2,-3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 769–775
301. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 1998; 97: 2433–2444
302. Aikawa M, Rabkin E, Voglic SJ, et al. Lipid lowering promotes accumulation of mature smooth muscle cells expressing smooth muscle myosin heavy chain isoforms in rabbit atheroma. *Circ Res* 1998; 83: 1015–1026
303. Death AK, Nakhla S, McGrath KC, et al. Nitroglycerin up-regulates matrix metalloproteinase expression by human macrophages. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 1943–1950
304. Tyagi SC, Kumar S, Katwa L. Differential regulation of extracellular matrix metalloproteinase and tissue inhibitor by heparin and cholesterol in fibroblast cells. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29: 391–404
305. Eickelberg O, Roth M, Mussmann R, et al. Calcium channel blockers activate the interleukin-6 gene via the transcription

- factors NF-IL-6 and NF-KB in primary human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1999; 99: 2276–2282
306. Papakonstantinou E, Roth M, Kokkas B, Papadopoulos C, Karakiulakis G. Losartan inhibits the angiotensin II-induced modifications on fibrinolysis and matrix deposition by primary human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38: 715–728
307. Funck RC, Wilke A, Rupp H, Brilla CG. Regulation and role of myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease. *Adv Exp Med Biol* 1997; 432: 35–44
308. Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol* 1995; 154:4379–89.
309. Xia M, Leppert D, Hauser SL, Sreedharan SP, Nelson PJ, Krensky M, Goetzl EJ. Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. *J Immunol* 1996; 156:160–7.
310. Baratelli FE, Heuze-Vourc'h N, Krysan K, Dohadwala M, Riedl K, Sharma S, Dubinett SM. Prostaglandin E2-dependent enhancement of tissue inhibitors of metalloproteinases-1 production limits dendritic cell migration through extracellular matrix. *J Immunol* 2004;173:5458–66.

311. Faveeuw C, Preece G, Ager A. Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases. *Blood* 2001;98:688–95
312. Warner RL, Beltran L, Younkin EM, Lewis CS, Weiss SJ, Varani J, Johnson KJ. Role of stromelysin 1 and gelatinase B in experimental acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:537–44
313. Keck T, Balcom JHT, Fernandez-del Castillo C, Bozena A, Antoniu BA, Warshaw AL. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122: 188-201.
314. Okada S, Kita H, George TJ, Gleich GJ, Leifermann KM. Migration of eosinophils through basement membrane components in vitro: role of matrix metalloproteinase-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 519-28.
315. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M et al. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 1994; 370: 555–7
316. Schonbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-

- independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* 1998; 161:3340–6
317. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1996; 271:14657–60.
318. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 2000; 96:2673–81.
319. McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 2000; 289:1202–6
320. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* 2002; 100:1160–7.
321. Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* 2002; 111:635–46

322. Wilson CL, Ouellette AJ, Satchell DP et al. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. *Science* 1999; 286:113–7.
323. Lopez-Boado YS, Wilson CL, Hooper LV, Gordon JI, Hultgren SJ, Parks WC. Bacterial exposure induces and activates matrilysin in mucosal epithelial cells. *J Cell Biol* 2000; 148:1305–15.
324. Lopez-Boado YS, Wilson CL, Parks WC. Regulation of matrilysin expression in airway epithelial cells by *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *J Biol Chem* 2001; 276:41417–23
325. Sporer B, Paul R, Koedel U, Grimm R, Wick M, Goebel FD, Pfister HW. Presence of matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1998;178:854–7
326. Conant K, McArthur JC, Griffin DE, Sjulson L, Wahl LM, Irani DN. Cerebrospinal fluid levels of MMP-2, 7, and 9 are elevated in association with human immunodeficiency virus dementia. *Ann Neurol* 1999; 46:391–8.
327. Liuzzi GM, Mastroianni CM, Santacroce MP, Fanelli M, D'Agostino C, Vullo V, Riccio P. Increased activity of matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurological diseases. *J Neurovirol* 2000; 6:156–63

328. Dhawan S, Weeks BS, Soderland C et al. HIV-1 infection alters monocyte interactions with human microvascular endothelial cells. *J Immunol* 1995; 154:422–32
329. Lafrenie RM, Wahl LM, Epstein JS, Hewlett IK, Yamada KM, Dhawan S. HIV-1-Tat modulates the function of monocytes and alters their interactions with microvessel endothelial cells. A mechanism of HIV pathogenesis. *J Immunol* 1996; 156:1638–45.
330. Sporer B, Koedel U, Paul R, Kohleisen B, Erfle V, Fontana A, Pfister W. Human immunodeficiency virus type-1 Nef protein induces blood–brain barrier disruption in the rat: role of matrix metalloproteinase-9. *J Neuroimmunol* 2000;102: 125–30
331. Leveque T, Le Pavec G, Boutet A, Tardieu M, Dormont D, Gras G. Differential regulation of gelatinase A and B and TIMP-1 and -2 by TNFalpha and HIV virions in astrocytes. *Microbes Infect* 2004; 6:157–63.
332. Suryadevara R, Holter S, Borgmann K et al. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by astrocytes: links to HIV-1 dementia. *Glia* 2003; 44:47–56.
333. Liuzzi GM, Mastroianni CM, Latronico T, Mengoni F, Fasano A, Lichtner M, Vullo V, Riccio P. Anti-HIV drugs decrease the expression of matrix metalloproteinases in astrocytes and microglia. *Brain* 2004; 127:398–407

334. Zhang K, McQuibban GA, Silva C et al. HIV-induced metalloproteinase processing of the chemokine stromal cell derived factor-1 causes neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2003; 6:1064–71.
335. Giraudon P, Vernant JC, Confavreux C, Belin MF, Desgranges C. Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) in cerebrospinal fluid of HTLV-1 infected patients with tropical spastic paraparesis. *Neurology* 1998; 50:1920.
336. Giraudon P, Szymocha R, Buart S, Bernard A, Cartier L, Belin MF, Akaoka H. T lymphocytes activated by persistent viral infection differentially modify the expression of metalloproteinases and their endogenous inhibitors, TIMPs, in human astrocytes: relevance to HTLV-I-induced neurological disease. *J Immunol* 2000; 164:271827
337. Kodama D, Saito M, Matsumoto W et al. Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-I Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neuroimmunol* 2004; 156:188–94
338. Mori N, Sato H, Hayashibara T et al. Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates the matrix metalloproteinase-9 gene:

- potential role in mediating adult T-cell leukemia invasiveness. *Blood* 2002; 99:1341–9
339. Lara-Pezzi E, Gomez-Gavero MV, Galvez BG et al. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 2002; 110:1831–8
340. Giannelli G, Bergamini C, Marinosci F, Fransvea E, Quaranta M, Lupo L, Schiraldi O, Antonaci S. Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 97:425–31
341. Sitia G, Isogawa M, Iannacone M, Campbell IL, Chisari FV, Guidotti LG. MMPs are required for recruitment of antigen-nonspecific mononuclear cells into the liver by CTLs. *J Clin Invest* 2004; 113:1158–6
342. Bebb JR, Letley DP, Thomas RJ et al. *Helicobacter pylori* upregulates matrilysin (MMP-7) in epithelial cells in vivo and in vitro in a Cag dependent manner. *Gut* 2003; 52:1408–13
343. Crawford HC, Krishna US, Israel DA, Matrisian LM, Washington MK, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori* strain-selective induction of matrix metalloproteinase-7 in vitro and within gastric mucosa. *Gastroenterology* 2003; 125:1125–36

344. Gooz M, Shaker M, Gooz P, Smolka AJ. Interleukin 1beta induces gastric epithelial cell matrix metalloproteinase secretion and activation during Helicobacter pylori infection. *Gut* 2003; 52:1250–6
345. Pillinger MH, Marjanovic N, Kim SY et al. Matrix metalloproteinase secretion by gastric epithelial cells is regulated by E prostaglandins and MAPKs. *J Biol Chem* 2005; 280:9973–9
346. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* 1999; 282:677–86
347. Hrabec E, Strek M, Zieba M, Kwiatkowska S, Hrabec Z. Circulation level of matrix metalloproteinase-9 is correlated with disease severity in tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6:713–9
348. Rivera-Marrero CA, Schuyler W, Roser S, Roman J. Induction of MMP-9 mediated gelatinolytic activity in human monocytic cells by cell wall components of Mycobacterium tuberculosis. *MicrobPathog* 2000; 29:231–44.
349. Quiding-Jarbrink M, Smith DA, Bancroft GJ. Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. *Infect Immun* 2001; 69:5661–70

350. Izzo AA, Izzo LS, Kasimos J, Majka S. A matrix metalloproteinase inhibitor promotes granuloma formation during the early phase of Mycobacterium tuberculosis pulmonary infection. *Tuberculosis (Edinb)* 2004; 84:387–96
351. Price NM, Farrar J, Tran TT, Nguyen TH, Tran TH, Friedland JS. Identification of a matrix-degrading phenotype in human tuberculosis in vitro and in vivo. *J Immunol* 2001; 166:4223–30
352. Price NM, Gilman RH, Uddin J, Recavarren S, Friedland JS. Unopposed matrix metalloproteinase-9 expression in human tuberculous granuloma and the role of TNF-alpha-dependent monocyte networks. *J Immunol* 2003; 171:5579–86
353. Opdenakker G, van den Stehen PHE, van Damme J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. *Trends in Immunology* 2001; 22:571-9.
354. Welgus HG, Campbell EJ, Cury JD, Eisen AZ, Senior RM, Wilhelm SM, Goldberg GI. Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *J Clin Invest* 1990; 86:1496–502
355. Campbell EJ, Cury JD, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG. Neutral proteinases of human mononuclear phagocytes. Cellular differentiation markedly alters cell phenotype for serine

- proteinases, metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Immunol* 1991; 146:1286–93
356. Busiek DF, Baragi V, Nehring LC, Parks WC, Welgus HG. Matrilysin expression by human mononuclear phagocytes and its regulation by cytokines and hormones. *J Immunol* 1995; 154:6484–91
357. Opdenakker G, Masure S, Grillet B, Van Damme J. Cytokine mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis. *Lymphokine Cytokine Res* 1991; 10:317–24
358. Speidl WS, Toller WG, Kaun C et al. Catecholamines potentiate LPS-induced expression of MMP-1 and MMP-9 in human monocytes and in the human monocytic cell line U937: possible implications for peri-operative plaque instability. *FASEB J* 2004; 18:603–5
359. Yassen KA, Galley HF, Webster NR. Matrix metalloproteinase-9 concentrations in critically ill patients. *Anaesthesia* 2001; 56: 729-32
360. Torii K, Iida K, Miyazaki Y et al. Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:43–6.

361. Fligel Se, Standiford T, et al. Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in acute lung injury. *Hum Pathol* 2006; 37;4:422-30
362. Lanchou J, Corbel M, Tanguy M, Germain N, Boichot E, Theret N, Clement B, Lagente V, Malledant Y. Imbalance between matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med.* 2003 Feb;31(2):536-42.
363. Ricou B, Nicod L, Lacraz S, Welgus HG, Suter PM, Dayer JMAm J Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome. *Respir Crit Care Med.* 1996 Aug;154(2 Pt 1):346-52.
364. Okamoto T, Akaike T, Suga M et al. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *J Biol Chem* 1997; 272:6059–66
365. DeCarlo AA Jr, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal Hansen B, Birkedal-Hansen H. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res* 1997; 76:1260–70
366. Oggioni MR, Memmi G, Maggi T, Chiavolini D, Iannelli F, Pozzi G. Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves

- human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia. *Mol Microbiol* 2003; 49:795–805.
367. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG, for the Working Group on Sepsis-related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine: The Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 1996, 22:707–710
368. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: A review. *Crit Care* 2010;14(1):R15. Epub ahead of print
369. Wang M, Hu Y, Shima I, Stearns ME. IL-10/IL-10 receptor signaling regulates TIMP-1 expression in primary human prostate tumor lines. *Cancer Biol Ther* 2002;1(5):556-63
370. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest.* 1995 ;96(5):2304-10
371. Wang S, et al. Mechanisms of matrix metalloproteinase-9 upregulation and tissue destruction in various organs in influenza A virus infection. *J Med Invest* 2010; 57(1-2):26-34
372. Mostafa Mtairag E, Chollet-Martin S, Oudghiri M, Laquay N, Jacob MP, Michel JB, Feldman LJ: Effects of interleukin-10 on

- monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. *Cardiovasc Res* 2001, 49:882-890.
373. Lee KH, Hui KP, Tan WC. Thrombocytopenia in sepsis: a predictor of mortality in the intensive care unit. *Singapore Med J* 1993;34:245-246
374. Levi M. Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004;2(12):2094-5.
375. Warkentin TE, Aird WC, Rand JH. Platelet-endothelial interactions: sepsis, HIT, and antiphospholipid syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003:497-519
376. Sheu JR, Fong TH, Liu CM, Shen MY, Chen TL, Chang Y, Lu MS, Hsiao G: Expression of matrix metalloproteinase-9 in human platelets: regulation of platelet activation in in vitro and in vivo studies. *Br J Pharmacol* 2004, 143:193-201
377. Lee YM, Lee JJ, Shen MY, Hsiao G, Sheu JR: Inhibitory mechanisms of activated matrix metalloproteinase-9 on platelet activation. *Eur J Pharmacol* 2006, 537:52-58
378. Zhu S, Ashok M, Li J, Li W, Yang H, Wang P, Tracey KJ, Sama AE, Wang H: Spermine protects mice against lethal sepsis partly by attenuating surrogate inflammatory markers. *Mol Med* 2009, 15:275-282.

379. Ho CH, Hsu SP, Yang CC, Lee YH, Chien CT: Sialic acid reduces acute endotoxemia-induced liver dysfunction in the rat. *Shock* 2009, 32:228-235
380. Hesselvik JF, Bolmback M, Brodin B et al. Coagulation, fibrinolysis and kallikrein system in sepsis: Relation to outcome. *Crit Care Med* 1989; 17: 724-733.
381. Madoiwa S, et al. Plasminogen activator inhibitor 1 promotes a poor prognosis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Int J Hematol.* 2006 ;84(5):398-405
382. Aznaouridis K, Vlachopoulos C, Dima I, Vasiliadou C, Ioakeimidis N, Baou K, Stefanadi E, Stefanadis C: Divergent associations of tissue inhibitors of metalloproteinases-1 and -2 with the prothrombotic/fibrinolytic state. *Atherosclerosis* 2007, 195:212-215
383. Marecaux G, Pinsky MR, Dupont E, Kahn RJ, Vincent JL: Blood lactate levels are better prognostic indicators than TNF and IL-6 levels in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 1996, 22:404-408
384. Cavusoglu E, Rubendre C, Chopra V, Yanamadala S, Eng C, Pinsky DJ, et al.. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) is an independent of all cause mortality, cardiac mortality, and myocardial infarction. *Am Heart J.* 2006;151(5):1101-e1-8

385. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003; 200(4):448-464
386. Huan SC, Sheu BC, Chang VC. Extracellular matrix proteases cytokine regulation role in cancer and pregnancy. *Front Biosci* 2009 (1)14:1571-88
387. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix Metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:221-233
388. Kinasewitz GT, Yan SB, Basson B, Comp P, Russell JA, Cariou A, Um SL, Utterback B, Laterre PF, Dhainaut JF, PROWESS Sepsis Study Group: Universal changes in biomarkers of coagulation and inflammation occur in patients with severe sepsis, regardless of causative micro-organism [ISRCTN74215569]. *Crit Care* 2004, 8:R82-R90
389. Esmon CT: Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. *Trends Immunol* 2004, 25:536-542
390. Schultz MJ, Haitzma JJ, Zhang H, Slutsky AS: Pulmonary coagulopathy as a new target in therapeutic studies of acute lung injury or pneumonia: a review. *Crit Care Med* 2006, 34:871-877.

391. Cena J, Lalu MM, Rosenfelt C, Schulz R. Endothelial dependence of matrix metalloproteinase-mediated vascular hyporeactivity caused by lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol.* 2008;582(1-3):116-22.
392. Lijnen, H.R., 2001. Elements of the fibrinolytic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936, 226–236
393. Mignatti, P. Cellular matrix remodeling by metalloproteinases and plasminogen activators. *Kidney Int.*, 1995. Suppl. 49, 12–14.
394. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv. Dent. Res.* 1998;12: 12–26.
395. Lalu MM, Gao CQ, Schulz R. Matrix metalloproteinase inhibitors attenuate endotoxemia induced cardiac dysfunction: a potential role for MMP-9. *Mol Cell Biochem.* 2003 ;251(1-2):61-6
396. Steinberg J, Halter J, Schiller HJ, Dasilva M, Landas S, Gatto LA, Maisi P, Sorsa T, Rajamaki M, Lee HM, Nieman GF: Metalloproteinase inhibition reduces lung injury and improves survival after cecal ligation and puncture in rats. *J Surg Res* 2003, 111:185-195
397. Maitra SR, Bhaduri S, Valane PD, Tervahartiala T, Sorsa T, Ramamurthy N: Inhibition of matrix metalloproteinases by

- chemically modified tetracyclines in sepsis. *Shock* 2003, 20:280-285
398. Achayra M, Venitz J, Figg WD, Sparreboom A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Durg Resistance Updates* 2004;7:195-208
399. Fingleton B. MMPs as therapeutic targets-still a viable option? *Semin Cell Dev Biol* 2008;19(1):61-68
400. Ruiz S, Morales D, Guarda E. Metalloproteinase activity in myocardium of rats exposed to endotoxin and its inhibition with doxycycline. *Rev Med Chil.* 1999;127(2):131-7.

VI. Anexos

APACHE II (escala de gravedad)

Variables fisiológicas	Rango elevado					Rango Bajo			
	+4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temperatura rectal (Axial +0,3°C)	≥ 41°	39-40,9°		38,5-38,9°	36-38,4°	34-35,9°	32-33,9°	30-31,9°	≤ 29,9°
Presión arterial media (mmHg)	≥ 160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤ 49
Frecuencia cardiaca (respuesta ventricular)	≥ 180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤ 39
Frecuencia respiratoria (no ventilado o ventilado)	≥ 50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤ 5
Oxigenación : Elegir a o b a. si FiO ₂ ≥ 0,5 dar P A-a O ₂ b. si FiO ₂ < 0,5 dar PaO ₂	≥ 500	350-499	200-349		< 200 > 70	61-70		55-60	< 55
pH arterial (Preferido) HCO ₃ sérico (venoso mEq/l)	≥ 7,7 ≥ 52	7,6-7,59 41-51,9		7,5-7,59 32-40,9	7,33-7,49 22-31,9		7,25-7,32 18-21,9	7,15-7,24 15-17,9	< 7,15 < 15
Sodio Sérico (mEq/l)	≥ 180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	< 110
Potasio Sérico (mEq/l)	≥ 7	6-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9		< 2,5
Creatinina sérica (mg/dl) Doble puntuación en caso de fallo renal agudo	≥ 3,5	2-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		< 0,6		
Hematocrito (%)	≥ 60		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		< 20
Leucocitos (Total/mm ³ en miles)	≥ 40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		< 1
Escala de Glasgow Puntuación=15-Glasgow actual									
A. APS (Acute Physiology Score) Total: Suma de las 12 variables individuales									
B. Puntuación por edad (< 44 = 0 punto; 45-54 = 2 puntos; 55-64 = 3 puntos; 65-74 = 5 puntos; > 75 = 6 puntos)									
C. Puntuación por enfermedad crónica (5 puntos en postcirugía urgente o no quirúrgicos; y 2 puntos en postcirugía electiva)									
Puntuación APACHE II (Suma de A+B+C)									

DEFINICIONES de enfermedad crónica

Hígado: Cirrosis (con biopsia), hipertensión portal comprobada, antecedentes de hemorragia gastrointestinal alta debida a HTA portal o episodios previos de fallo hepático, encefalohepatopatía, o coma.

Cardiovascular: Clase IV según la New York Heart Association

Respiratorio: Enfermedad restrictiva, obstructiva o vascular que obligue a restringir el ejercicio, como por ej. incapacidad para subir escaleras o realizar tareas domésticas; o hipoxia crónica probada, hipercapnia, policitemia secundaria, hipertensión pulmonar severa (>40 mmHg), o dependencia respiratoria.

Renal: Hemodializados.

Inmunocomprometidos: que el paciente haya recibido terapia que suprima la resistencia a la infección (por ejemplo inmunosupresión, quimioterapia, radiación, tratamiento crónico o altas dosis recientes de esteroides, o que padezca una enfermedad suficientemente avanzada para inmunodeprimir como por ej. leucemia, linfoma, SIDA)

Escala SOFA de fallo orgánico

Sistema orgánico	0 puntos	1 puntos	2 puntos	3 puntos	4 puntos
Respiratorio: relación P_iO_2/F_iO_2	> 400	≤ 400	≤ 300	≤ 200 Con soporte	≤ 100 Con soporte
Hematológico: Plaquetas/ mm^3	> 150000	≤ 150000	≤ 100000	≤ 50000	≤ 20000
Hepático: Bilirrubina en mg/dl o mmol/l	< 1.2 < 20	1.2 - 1.9 20 - 32	2.0 - 5.9 33 - 101	6.0 - 11.9 102 - 204	> 11.9 > 204
Cardiovascular: Hipotensión	NO	MAP < 70	Dopa ≤ 5 o Dobutamina	Dopa > 5 Epinefrina ≤ 0.1 Norepinefrina ≤ 0.1	Dopa > 15 Epinefrina > 0.1 Norepinefrina > 0.1
Neurológico: Escala de Glasgow	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
Renal: Creatinina en mg/dl o mmol/l o diuresis en litros/día	< 1.2 < 110	1.2 - 1.9 110 - 170	2.0 - 3.4 171 - 299	3.5 - 4.9 300 - 440 < 0.5 l/día	> 5 > 440 < 0.71/día

VII. Abreviaturas

AA - Acido araquidónico
ACCP - American College of Chest Physicians
ADAM y ADAMTS - Adamalinas
AMPc - 3', 5'-adenosin monofosfato cíclico
aPTT - Tiempo Parcial de tromboplastina activada
ATIII - antitrombina III
BFGF - Factor básico de crecimiento de fibroblastos
BPI - Bactericidal permeability increasing protein
CARS - Síndrome de respuesta antiinflamatoria compensadora
CD4+ - Linfocitos T4
CD45PA - Células con memoria inmunitaria
CD8+ - Células T8
CID - Coagulación intravascular diseminada
EDHF - Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
ELAM - Moléculas de adhesión endotelial de leucocitos
EPOC - Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERO - especies reactivas de oxígeno
ET - Endotelinas
FiO2 - Fracción inspirada de oxígeno
FT - Factor tisular
HDL - Lipoproteínas de alta intensidad
HIV - Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HPS - Inhibidores del crecimiento como heparinoides
HTLV - Virus linfotrópico humano
IAM - Infarto agudo de miocardio
ICAM - Moléculas de adhesión intercelular
IECA - Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IFN-γ - Interferón-γ
IGF-1 - Factor-1 de crecimiento
IKK - Inhibitor KB cinasa
IL - Interleucina
IL-1ra - Receptor antagonista de la IL-1
INR - Ratio Internacional normalizada
IRAK - IL-1 receptor-associated kinase
LAK - Linfocitos asesinos activados por linfocinas
LBP - Lipoproteína unida a polisacárido
LCR - Líquido Cefalorraquídeo
LPS - Lipopolisacárido
MAL - MyD88 adaptador like proteína
MAP3K -Protein cinasa mitogénica activada
MEC - Matriz extracelular
MHC - Complejo mayor de histocompatibilidad
MMP - Metaloproteasas de la Matriz
MSR - Macrophage scavenger receptor
MyD88 - Myeloid differentiation protein 88
NF-κ B - Factor nuclear kappa-B
NK - Células asesinas naturales
NOD - Nucleotide binding oligomerization domain
ON - óxido nítrico

PAF - Factor activador de las plaquetas
PAI – Inhibidor del activador tisular del Plasminógeno
PAI-1 - Inhibidor tisular del plasminógeno
PaO₂ – Presión arterial de oxígeno
PCR - proteína C reactiva
PDGF - Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PGH₂ - Prostaglandina H₂
PGI₂ - Prostaciclina
PMN - Polimorfonucleares
SCCM - Society of Critical Care Medicine
SDRA - Síndrome de Distress Respiratorio del Adulto
SPEA – Exotoxina A pirogénica del *Estreptococo*
SRAC - Síndrome de respuesta antiinflamatoria compensatoria
SRIS - Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
SvcO₂ - Saturación central venosa mixta
TAFI - Inhibidor de la fibrinólisis activado por la trombina
TAM – Presión arterial media
TAS – Presión arterial sistólica
TAT - Complejo trombina-AT III
TF - Factor tisular o tromboplastina
TFPI - Factor inhibidor del factor tisular
TGF - Factor transformador de tejidos
TGF- β - Factor transformador del crecimiento beta
TIMP - Inhibidor Tisular de Metaloproteasas de la Matriz
TIR - Toll/IL-1 receptor homology domain
TIRAP - TIR domain containing adapter proteína
TNF - Factor de necrosis tumoral
Tollip - Toll-interacting proteína
tPA – Activador tisular del Plasminógeno
TRAF6 - Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6
TRL - Receptores Toll-like
TXA₂ - Tromboxano A₂
VCAM - Moléculas de adhesión vascular
ZmpC - zinc metaloproteasa