



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



PURIFICACIÓN ANALÍTICA Y PREPARATIVA DE LAS PROTEÍNAS HIDROFÓBICAS DEL SURFACTANTE PULMONAR

Tesis de Grado de la Licenciatura en Bioquímica

Bach. Rosina Toledo Gallo

Tutores:

Dr. Leonel Malacrida

Dr. Arturo Briva

MONTEVIDEO, FEBRERO 2015

A la memoria de Armando Gallo, de quien aprendí que vale la pena el esfuerzo y sacrificio por conquistar la verdadera vocación.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	6
1 - FUNDAMENTOS Y ANTECEDENTES	7
1.1 Características generales del surfactante pulmonar:	7
1.2 Composición del surfactante pulmonar:	9
<i>Fracción lipídica:</i>	9
<i>Fracción proteica:</i>	13
1.3 Formación y almacenamiento del surfactante pulmonar:	19
<i>Estructuras del SP y procesamiento de sus proteínas hidrofóbicas:</i>	19
<i>Reciclaje y reservorio de SP:</i>	23
<i>Secreción del SP:</i>	24
1.4 Funciones de las proteínas hidrofóbicas:	26
1.5 Importancia biológica:	27
1.6 Antecedentes:	31
2- OBJETIVOS	32
2.1 Objetivos específicos	32
3 - MATERIALES Y MÉTODOS	33
4 – RESULTADOS	39
4.1 Purificación de las proteínas hidrofóbicas del surfactante y del tejido pulmonar	39
4.2 Purificación analítica y preparativa de SP-B y SP-C	46
5- DISCUSIÓN	60
6 – CONCLUSIONES	68
7 – PERSPECTIVAS A FUTURO	70
8 – AGRADECIMIENTOS	71
9 - ANEXO	72
10 – BIBLIOGRAFÍA	74

ABREVIATURAS

ABC-A3: Proteína transportadora tipo cassette A3.

ACN: Acetonitrilo

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico

Arg: Arginina

β -ME: β -mercaptoetanol

CBs: Cuerpos compuestos

CD: Dicroísmo Circular

CHAPS: 3-[(3-colamidopropilo) dimetilamonio]-1-propano

CRD: Dominio de reconocimiento a carbohidratos

Cys: Cisteína

DOPC: Dioleoilfosfatidilcolina

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

EPOC: Enfermedad obstructiva crónica

FTIR: Transformada de Fourier infrarojo

Glu: Glutamato

Ile: Isoleucina

INF- γ : Interferón gamma

I-bis-PA: ácido bifosfatídico.... corroborar

L $_{\alpha}$: Fase líquido-cristalino

L $_{\beta}$: Fase gel

L_e: Fase líquido-expandida

L_o: Fase líquido-ordenada

LB: cuerpos lamelares

LBA: lavado bronqueoalveolar

Leu: Leucina

Lys: Lisina

lyso-PC: lisofosfatidilcolina

MPM: Marcador de peso molecular

MVB: cuerpos multivesiculares

N/m: Newton/metro – unidad de tensión superficial

NMR: Resonancia magnética nuclear

PAP: Proteinosis alveolar pulmonar

PC: Fosfatidilcolina

PE: fosfatidiletanolamida

PG: Fosfatidilglicerol

PI: Fosfatidilinositol

PKA: Proteína quinasa A

PKC: Proteína quinasa C

PL: Fosfolípidos

PMT: Fotomultiplicador

POPC: Palmitoleoilfosfatidilcolina

POPS: Palmitoleoilfosfatidilserina

PPPC: palmitoleoil-palmitoil-fosfatidilcolina

PS: fosfatidilserina

RE: Retículo endoplasmático

SDR: Síndrome de distrés respiratorio

SDRA: Síndrome de distrés respiratorio agudo

SDRI: Síndrome de distrés respiratorio en infantes

SDS: Dodecil-sulfóxido sódico

SM: esfingomielina

SP: Surfactante pulmonar

SP-A: Proteína del surfactante A

SP-B: Proteína del surfactante B

SP-B_{STD}: Proteína del surfactante B purificada

SP-C: Proteína del surfactante C

SP-C_{STD}: Proteína del surfactante C purificada

SP-D: Proteína del surfactante D

T_m: Temperatura de transición

TM: Mielina tubular

Trp: Triptófano

Val: Valina

RESUMEN

El surfactante pulmonar (SP) es una compleja mezcla de lípidos y proteínas que recubre el epitelio alveolar evitando su colapso durante el ciclo respiratorio. Esta mezcla logra disminuir la tensión superficial a valores cercanos a 0 N/m al final de la espiración. Para esto además es imprescindible la presencia de un grupo de proteínas hidrofóbicas denominadas SP-B y SP-C. Además, el surfactante cumple funciones relativas a la inmunidad innata, para lo cual es necesario la presencia de proteínas hidrofílicas denominadas SP-A y SP-D.

SP-B y SP-C son fundamentales para la dinámica del surfactante, ya que colaboran con su reciclaje y el desempeño de sus funciones biofísicas. Se ha visto que la ausencia de SP-B genera el síndrome del distrés respiratorio en recién nacidos. Por otra parte, se ha observado que la ausencia de SP-C se vincula con el desarrollo de múltiples patologías respiratorias.

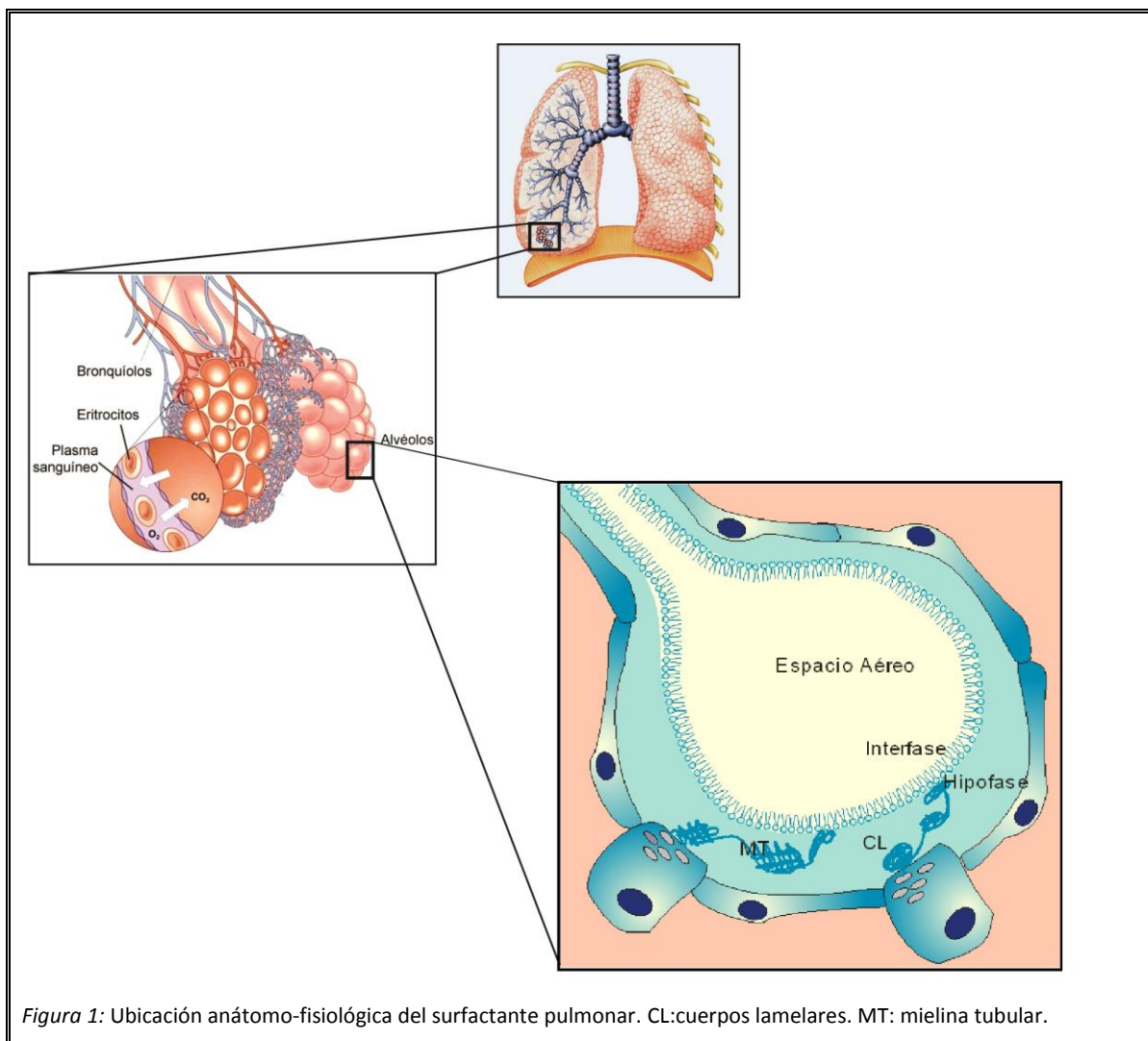
En nuestro país aproximadamente un 10% de los niños nacen prematuros, por lo cual necesitan de terapia de rescate con surfactante exógeno para poder sobrevivir. Pese a varias décadas de investigación en el diseño de mejores surfactante pulmonares exógenos, todavía no se ha logrado resolver completamente el problema. Una de las estrategias para el diseño de surfactante pulmonar exógeno ha sido la extracción de material de origen animal y el enriquecimiento con las proteínas hidrofóbicas del SP. Desafortunadamente los métodos de purificación y separación de estas proteínas en la actualidad se encuentran limitados por la incapacidad de separar preparativamente a SP-B de SP-C. Por este motivo y dada la gran importancia de estas proteínas en la función del surfactante pulmonar, resulta imprescindible contar con un método cromatográfico para la separación de las mismas a escala analítica y preparativa.

1. FUNDAMENTOS Y ANTECEDENTES

1.1 Características generales del surfactante pulmonar:

La respiración es el proceso fisiológico por el cual se produce el intercambio gaseoso en el epitelio alveolar entre O_2 proveniente de la atmósfera y CO_2 producto del metabolismo celular. En los mamíferos, este proceso involucra las vías aéreas superiores e inferiores, las cuales derivan en los pulmones que es donde efectivamente tiene lugar el intercambio gaseoso. El aire ingresa al organismo a través de las vías aéreas superiores, las que incluyen las fosas nasales, faringe y laringe; y continúa su recorrido por la tráquea que se bifurca a nivel pulmonar para formar los bronquios. Éstos se ramifican múltiples veces generando los bronquiolos que finalizan en estructuras de tamaño micrométrico denominadas alvéolos, los cuales están rodeados de capilares. En este espacio se produce el contacto íntimo entre el aire que llega al espacio alveolar y el CO_2 que llega a la circulación pulmonar, que permite, a partir de la diferencia en las presiones parciales de los gases, el intercambio gaseoso. El alvéolo posee mayoritariamente un epitelio mono-estratificado plano que está compuesto fundamentalmente por neumocitos de tipo I, pero además posee neumocitos de tipo II (células cuboides y polarizadas) y macrófagos. El lumen de estas estructuras está revestido por una fina capa de agua denominada hipofase o fluido epitelial, donde se encuentra el surfactante pulmonar para finalmente adsorberse en la interfase aire/líquido y llevar adelante su función (*figura 1*)

El surfactante pulmonar (SP) es una mezcla compleja de lípidos y proteínas que se sintetiza en neumocitos de tipo II, donde además de ser producido es almacenado en estructuras subcelulares que se conocen como cuerpos lamelares (LBs). Se han descripto a los LBs como estructuras multi-membranosas con enzimas lisosomales que mantienen un pH ácido (menor a 6.10), y cuyo fin es el procesamiento y almacenamiento del SP en forma de bicapas concéntricas.¹



El SP es secretado a la hipofase en forma de LBs, donde sufre transformaciones que le permiten posteriormente adsorberse a la interfase aire/agua como una monocapa. Dada su capacidad tensoactiva el SP logra evitar el colapso alveolar durante el ciclo inspiración-espирación al disminuir la tensión superficial a valores cercanos a 0 mN/m. Además de los componentes lipídicos otras dos proteínas presentes en el surfactante pulmonar son imprescindibles para llevar adelante dicha función, estas son denominadas SP-B y SP-C. El surfactante pulmonar desempeña también un rol inmunológico al intervenir en la respuesta innata frente a agentes patógenos. Es capaz de mantener la permeabilidad epitelial en las pequeñas vías aéreas y potencia el movimiento ciliar en la mucosa para remover los contaminantes indeseados.² Este rol inmunitario, esencial para mantener la esterilidad del ambiente, es llevado a cabo por las proteínas SP-A y SP-D. Si bien estas proteínas no activan al sistema del complemento ante la presencia de agentes patógenos, si

actúan como opsoninas al reconocer patrones moleculares de los patógenos, lo que estimula indirectamente la fagocitosis mediante la regulación de receptores fagocíticos. Al mismo tiempo, SP-A y SP-D logran la agregación de patógenos que en ciertos casos favorece su eliminación.³ Se ha visto que ratones knock-out para el gen de las proteínas SP-A y SP-D son más susceptibles a infecciones respiratorias.⁴ Por otra parte, se ha observado que ratones knock-out para la proteína SP-B, presentan un fenotipo letal, mientras que la ausencia de SP-C se relaciona con un aumento de patologías respiratorias.⁵ Estos antecedentes evidencian la importancia de la presencia de las proteínas asociadas del SP, que junto con los lípidos logran cumplir con todas las funciones del SP de manera eficiente.

1.2 Composición del surfactante pulmonar:

Fracción lipídica:

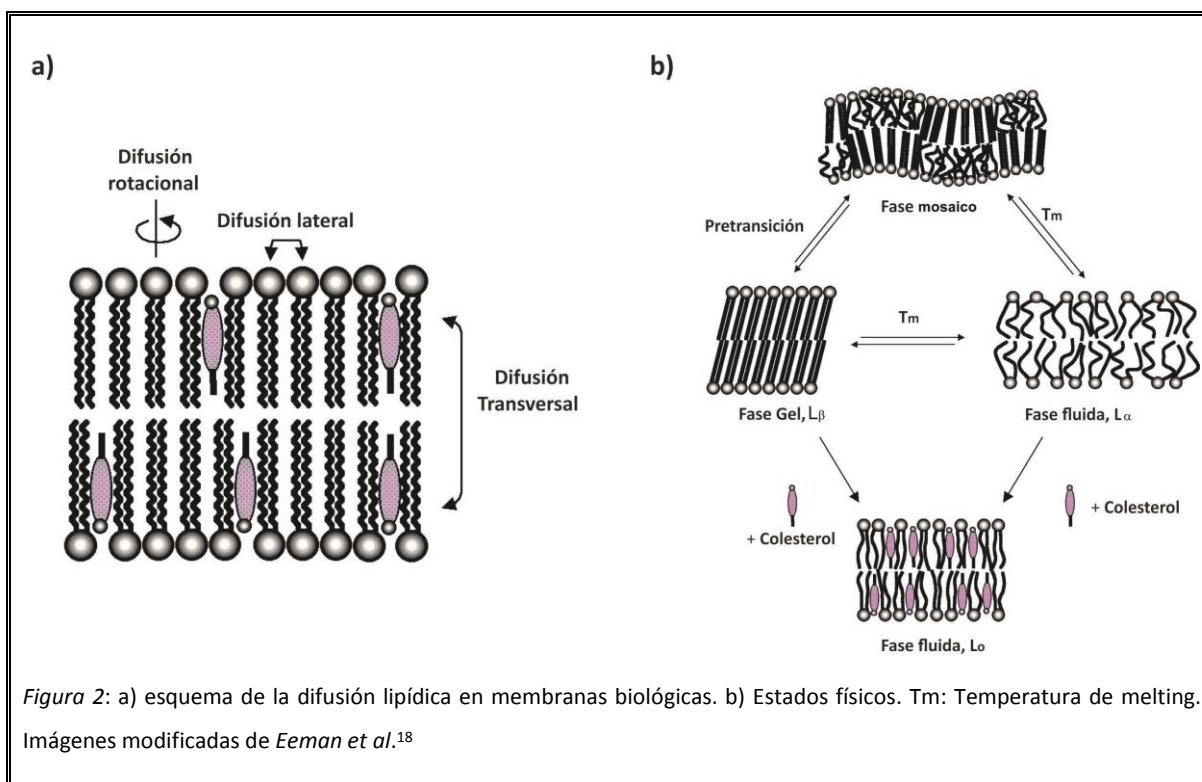
La composición lipídica del SP varía según la especie, pero pese a esto su relación lípido/proteína se mantiene en proporciones 9:1, para la mayoría de las especies de mamíferos. En mamíferos la porción lipídica está compuesta fundamentalmente por fosfatidilcolina (PC) (80% de los fosfolípidos totales), de la cual el componente mayoritario es la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, 60% aproximadamente), responsable mayoritaria de las funciones tensoactivas del SP. En el caso de mamíferos heterotermos que viven en bajas temperaturas se ha visto que los niveles de DPPC disminuyen para darle lugar a palmitoleoilpalmitoilfosfatidilcolina (PPPC) ⁶.

La fracción lipídica posee además fosfatidilglicerol (PG, 10%) y en menor proporción fosfatidilinositol (PI, 2%). El porcentaje relativo de ambos fosfolípidos (PL) varía considerablemente según las especies y estadios del crecimiento para los mamíferos; pero aún se desconocen los efectos de dichas variaciones en la funcionalidad del surfactante ^{7,8,9}. El SP también presenta en baja concentración fosfatidiletanolamina (PE), ácido liso-bis-fosfatídico (l-bis-PA), esfingomielina (SM), fosfatidilserina (PS), liso-fosfatidilcolina (liso-PC), cardiolipina y colesterol.^{2,10,11} La cardiolipina cumple un rol en la homeostasis pulmonar, y si bien se encuentra en valores muy bajos en el SP sus niveles aumentan en el lavado bronqueoalveolar (LBA) de

pacientes con neumonía, por lo que se puede utilizar como señal de daño extracelular.¹¹ El colesterol es fundamental para la dinámica de las membranas del surfactante, ya que a la concentración en que se encuentra en el SP (20% molar de PL totales) permite la segregación de fases líquida-ordenada (L_o) y líquida-desordenada (L_d), lo que influye en la movilidad y dinámica de los fosfolípidos que la conforman.¹² Los niveles de colesterol y PL varían con la dieta y cambios ambientales, lo cual se cree se asocia a la adaptabilidad del SP en diversas circunstancias.¹³

Los fosfolípidos son sintetizados de novo por los neumocitos tipo II en el retículo endoplasmático (RE), donde mediante la reacción de Kennedy se forma la PC. Parte de la misma dará lugar a la formación de liso-PC y de DPPC. Ésta última también puede ser sintetizada mediante la acción enzimática de fosfolipasa A_2 , peroxirredoxina 6 y lisofosfatidilcolina aciltransferasa.^{11,14} El PG es la tercer especie lipídica mayoritaria del SP, y se sintetiza a partir de ácido fosfatídico por la acción de la glicerofosfato fosfatidiltransferasa y la fosfatidilglicerolfosfatasa. El PG cumple funciones relacionadas a la adsorción del SP en la superficie alveolar, pero además colabora en la regulación de la respuesta inmune innata y ante las infecciones virales.^{15,16} Respecto al PI se cree que participa en la estabilización de la monocapa del surfactante.¹¹

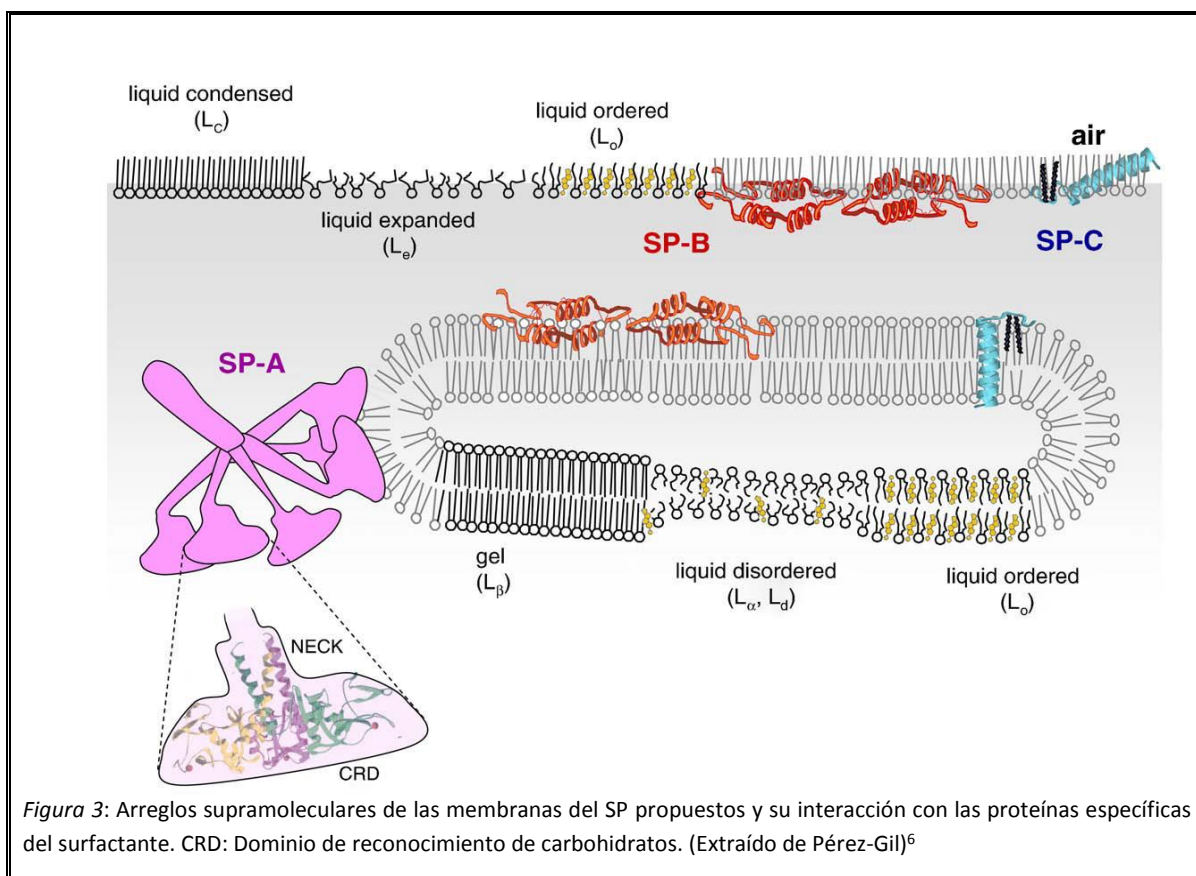
Asociado a los niveles de saturación/insaturación de la fosfatidilcolina y otros fosfolípidos menores, así como la presencia de colesterol, las membranas del SP en forma de bicapa/monocapa adquieren la organización supramolecular en diferentes arreglos o fases en equilibrio termodinámico (*figura 2*). Es importante denotar que a bajas temperaturas (temperaturas por debajo de la temperatura de transición de fase, T_m , melting temperature) y en ausencia de colesterol, las membranas se encuentran en una fase gel (L_β). Para el caso del SP, dado el porcentaje de colesterol, las membranas se encuentran en el estado líquido-ordenado L_o , en la cual los fosfolípidos se encuentran con restricción difusional pero no rotacional (*figura 2-a*). Para temperaturas por encima de la T_m se produce un cambio de fase, donde la membrana logra alcanzar nuevos grados de libertad lo que se conoce como una fase líquido-cristalina (L_α) o también conocida como L_d . En ésta fase los lípidos poseen mayor capacidad difusional y rotacional que en la fase anterior (L_o).¹⁷



Las membranas no solo pueden sufrir transiciones de fase por temperatura, sino que además puede darse por compresión, fuerza iónica, pH y actividad de agua. Para el caso de las monocapas del SP, es posible identificar la transición de fases por el grado de compresión que tienen los lípidos que la componen. Remedando las fases de la materia, cuando en una interfase aire/agua se depositan lípidos a una concentración tal que no pueden interaccionar entre ellos, estos no pueden responder con ningún cambio en la tensión por la compresión. A este estado se lo conoce como fase gas. Continuando con la compresión, luego de esta etapa, se logra una respuesta en la tensión donde los lípidos mantienen un estado de baja compactación sin limitaciones en la movilidad difusional y rotacional, esta fase se denomina líquido-expandida (L_e) (esta fase es análoga a la fase L_α en bicapas). Posteriormente, con el aumento en la compresión se alcanza un estado mucho más compacto que restringe la capacidad difusional entre las moléculas del PL que la componen, lo que se conoce como fase líquido-condensada (L_c , análoga a la fase L_β en las bicapas). Durante la transición L_e/L_c en el SP se han identificados dominios de membrana con características similares a L_o/L_d , lo que sucede a una compresión de 30 mN/m. Esta coexistencia de fases (figura 3) se genera debido a la composición lipídica del SP, y fundamentalmente se piensa

que es debido a la proporción entre fosfolípidos saturados e insaturados y el nivel de colesterol.^{19,20,21}

Como se mencionó anteriormente, la presencia de colesterol modula la fluidez de la membrana; y dependiendo de los niveles y la saturación de los PL es posible generar un nuevo estado líquido-ordenado (L_o). Esta fase tiene características de viscosidad e hidratación particulares y que se asocian con la capacidad del colesterol de interactuar con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos.⁶



Fracción proteica:

La fracción proteica constituye entre el 8-10% del peso en el surfactante pulmonar, y está compuesta por cuatro proteínas conocidas como SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. La SP-A es la proteína más abundante del SP, tiene carácter hidrofílico y pertenece a la familia de las lectinas dependientes de Calcio (colectinas).⁷ Esta glicoproteína, es sintetizada en los neumocitos tipo II y en las células Clara bronquioalveolares, y se secreta en el último trimestre de gestación.²² Se produce inicialmente como una preproteína de 248 residuos aminoácidos y 28 kDa aproximadamente, aunque su tamaño y carga varían según la especie. Esta proteína es blanco de numerosas modificaciones co- y post-traduccionales, dentro de las cuales se incluyen la glicosilación, carboxilación, sulfatación, hidroxilación y acetilación.²³ La secreción de esta proteína se da de forma constitutiva, y se encuentra altamente regulada por glucocorticoides, AMPc, insulina e INF- γ entre otros²⁴; pero también puede ser secretada a través de los LBs una vez que éstos fueron endocitados con el fin de ser reciclados.²⁵

SP-A posee cuatro dominios estructurales: un segmento corto N-terminal de 20 residuos aminoácidos, un dominio tipo colágeno rico en residuos de Prolina, una región “cuello”, y un dominio de reconocimiento de carbohidratos CRD.²⁶ Muchos de los residuos de Prolina sufren hidroxilaciones, lo que permite que esta proteína forme enlaces disulfuro y se asocie de forma estable como trímero. Ésta y otras modificaciones le permiten obtener su estructura final de octadecámero formado por seis trímeros de aproximadamente 700kDa (*figura 4, a y b*).^{26,24} SP-A cumple un rol esencial en la defensa innata, ya que participa en la eliminación de microorganismos, y asimismo tiene efectos pro y antiinflamatorios.^{27,28} Además de sus funciones como colectina esta proteína es capaz de potenciar la adsorción lipídica que llevan a cabo las proteínas hidrofóbicas, proteger la monocapa superficial epitelial de la inhibición por proteínas, regular la recaptación y secreción del surfactante por los neumocitos de tipo II, y contribuir en el desempaquetamiento de los LB a través de la conversión de los estos en la mielina tubular (TM).^{6,25,29}

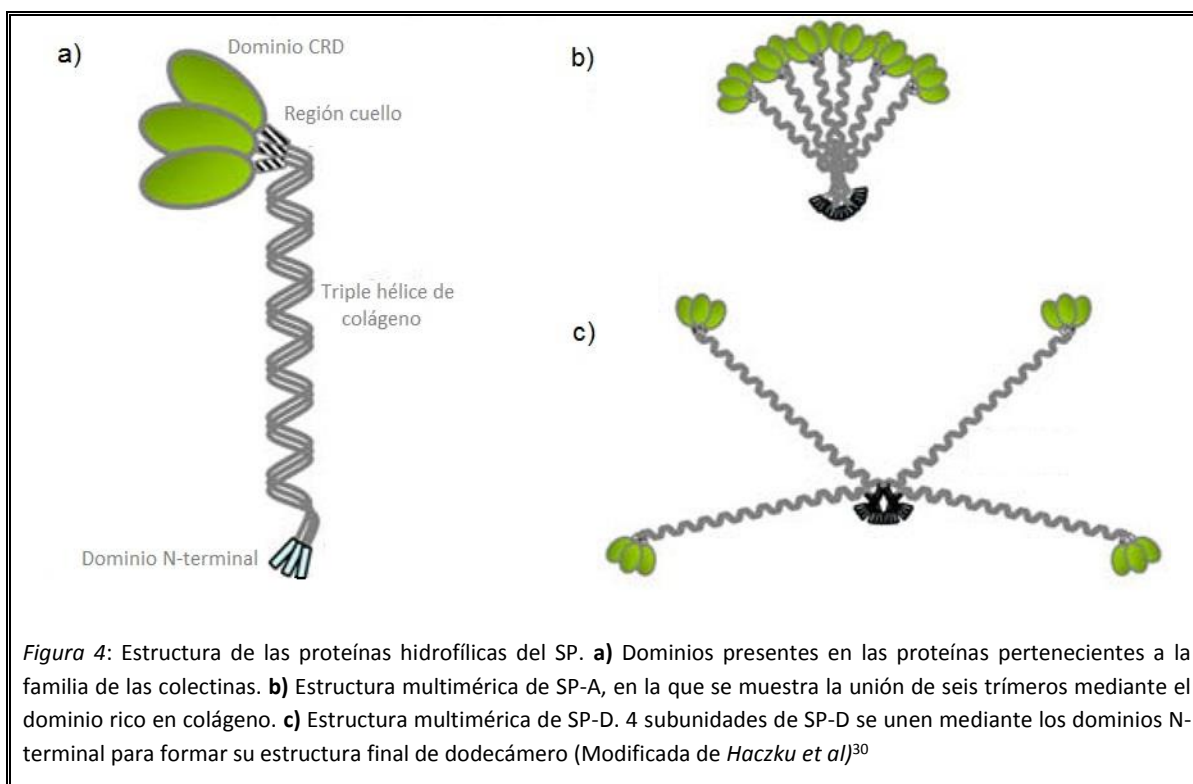


Figura 4: Estructura de las proteínas hidrofílicas del SP. **a)** Dominios presentes en las proteínas pertenecientes a la familia de las colectinas. **b)** Estructura multimérica de SP-A, en la que se muestra la unión de seis trímeros mediante el dominio rico en colágeno. **c)** Estructura multimérica de SP-D. 4 subunidades de SP-D se unen mediante los dominios N-terminal para formar su estructura final de dodecámero (Modificada de Haczku *et al*)³⁰

SP-D es una proteína hidrofílica de 43 kDa, sintetizada constitutivamente por los neumocitos tipo II y por las células Clara bronquioalveolares. En ciertas especies es sintetizada también por células epiteliales y de la submucosa de las glándulas asociadas a la tráquea y a los bronquios.³¹ Al igual que SP-A pertenece a la familia de las colectinas, y posee la misma estructura supramolecular con los siguientes dominios: uno de tipo colágeno rico en residuos de Prolina, un dominio corto N-terminal, uno conector o “cuello”, y un dominio globular de unión a carbohidratos dependiente de calcio. El dominio CRD le permite unirse a diversos ligandos y cumplir así con su rol en la inmunidad innata frente a agentes patógenos. Los ligandos a los que se une preferentemente son azúcares complejos que contienen glucosa, inositol y manosa entre otros; y el hecho de que reconozca inositol en particular le permite a esta proteína interactuar con lípidos, a través del reconocimiento de PI presente en el SP.³²

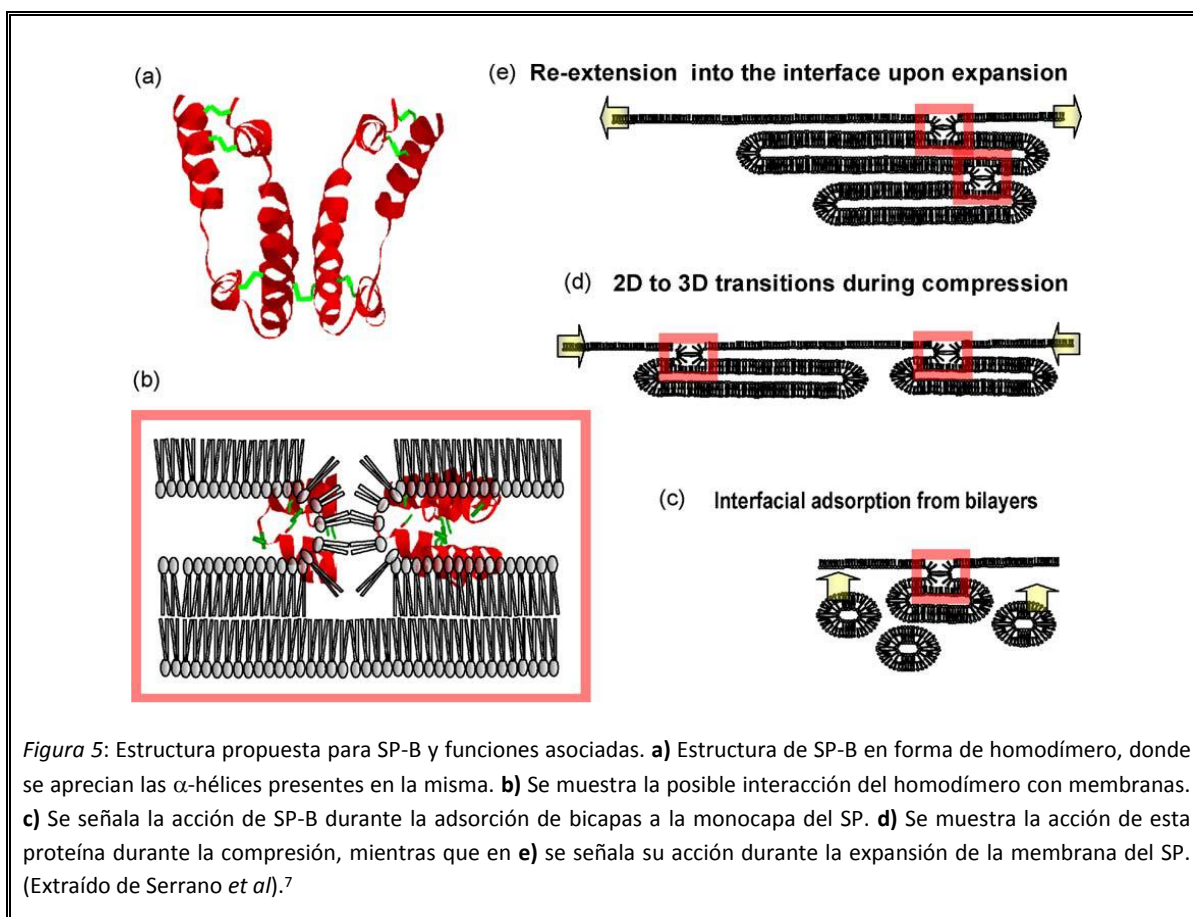
Se presenta en forma de dodecámero (con cuatro unidades triméricas) (*figura 4, c*), pero se ha visto que la proporción de los oligómeros varía según la especie. En especial en el humano, SP-D se ha encontrado como un tetrámero con las subunidades vinculadas mediante las regiones N-terminales.^{31,32}

Esta proteína es capaz de detectar virus (como influenza A), bacterias (Gram negativas y positivas) y hongos, lo cual es crucial para promover su eliminación sin activar la respuesta inmune secundaria.^{4,31} En las células que han sido infectadas potencia la fagocitosis y la eliminación de los agentes patógenos, y al mismo tiempo potencia la respuesta oxidativa a la unión microbicida.³² Esta proteína tiene grandes similitudes con SP-A, no solamente en su estructura sino también en sus funciones. Sin embargo tiene características particulares que permiten diferenciarlas. Ambas proteínas hidrofílicas son capaces de formar estructuras tubulares en el surfactante pulmonar, pero las formadas por SP-D son más largas y homogéneas que la mielina tubular formada por SP-A. Otra diferencia clave es la posibilidad de SP-D en interaccionar con PI, dado que este PL se encuentra enriqueciendo los surfactantes pulmonares de mamíferos. Esta interacción hace posible la formación de un segundo tipo de estructuras tubulares que se conocen como arreglos tubulares, para cuya formación es fundamental la presencia de SP-B.³³

SP-B es sintetizada por los neumocitos tipo II así como por las células Clara en el segundo trimestre de gestación en el humano. Se produce inicialmente como una pre-pro-proteína de 381 aminoácidos y su tamaño es variable según la especie; pero pese a esto se ha visto que aproximadamente el 67% de los residuos aminoacídicos son conservados.³⁴ Los primeros 23 aminoácidos del extremo N-terminal corresponden a una secuencia señal que media la translocación de SP-B al lumen del RE. La escisión co-traducciona del péptido señal genera una pro-proteína con una región N-terminal (residuos 24-200), una porción madura (201-279) y una región C-terminal (280-381) que luego es sometida a sucesivas glicosilaciones.^{24,35} El procesamiento de la pro-SP-B se da en el compartimiento distal del aparato de Golgi, donde también ocurre el procesamiento de los cuerpos multivesiculares (MVBs) que madurarán a LBs.³⁶

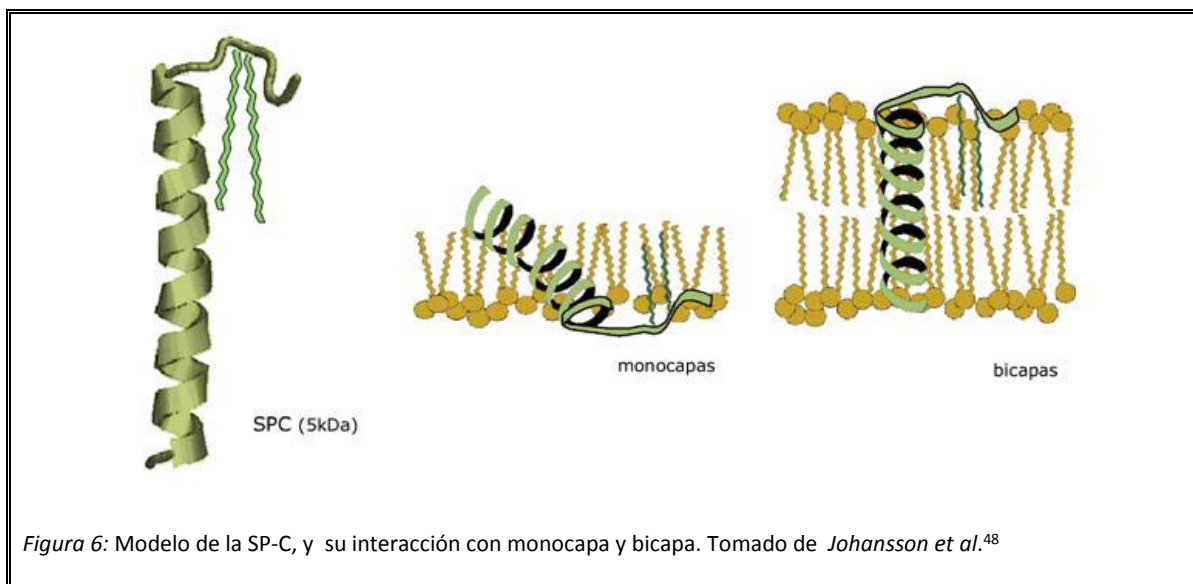
La proteína SP-B en su forma madura está compuesta por 79 aminoácidos con un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos que permiten clasificarla dentro de la familia de las saponinas, y los aminoácidos cargados que posee le otorgan una carga neta positiva (+5).³⁷ El elevado número de residuos hidrofóbicos le otorgan a la SP-B la posibilidad de estar asociada a fosfolípidos en el surfactante. Posee tres puentes disulfuro intramoleculares invariables en las distintas especies y uno intermolecular en la Cys48, el cual hace que esta proteína pueda formar homodímero con una masa aproximada de 17.4 kDa. Si bien es su forma más común, se ha encontrado también en forma de trímero.^{38,35,39,40} Varios estudios de dicróismo circular, infrarrojo y resonancia magnética

nuclear han revelado que mayoritariamente SP-B posee estructura de α -hélice, y que la proporción de estas estructuras varían según el entorno en que se encuentre la proteína (*figura 5-a*).^{26,40} SP-B posee cuatro α -hélices anfipáticas que le permiten insertarse en las membranas mediante la interacción con las cabezas de los fosfolípidos y las regiones hidrofóbicas que la componen, lo que resulta fundamental para que cumpla sus funciones (*figura 5 b, c y d*). El enlace disulfuro intermolecular que permite la formación del dímero se genera inmediatamente después o incluso durante la maduración de la proteína, y le brinda resistencia a la degradación proteolítica.⁴¹



La forma dimérica de la SP-B interacciona con membranas uniéndose a ellas y además de promover el acercamiento entre membranas cercanas, también promueve la formación de estructuras no lamelares. Se propone que la proteína en su forma madura se asocia con las vesículas internas de los MVBs y promueve la fusión de las vesículas, lo cual podría facilitar la multi-lamellaridad de los LBs.²⁹ El extremo C-terminal de pro-SP-B es procesado durante la maduración de la proteína y parece ser determinante en el tamaño de los LBs.³⁵ Se han identificado que mutaciones en la región C-terminal del péptido pueden causar síndrome de distrés respiratorio letal. Se cree que las mutaciones podrían ocasionar alteraciones en el procesamiento de la pro-proteína en el aparato de Golgi.³⁷

SP-C se ha encontrado presente únicamente en mamíferos, siendo actualmente la proteína más hidrofóbica del proteoma ⁴². Se cree que evolutivamente se ha desarrollado en los sistemas respiratorios para superar el problema de las elevadas tensiones superficiales a las que se encuentran sometidos los alvéolos de estos animales, y que es necesario que sean disminuidas para evitar su colapso.^{7,10} SP-C se produce en los neumocitos tipo II en el segundo trimestre de embarazo como una pro-proteína de 197 aminoácidos y 21 kDa, que posteriormente es clivada en sucesivos pasos para generar una pequeña proteína transmembrana de tan solo 35 residuos aminoácidos y aproximadamente 3.5kDa.⁴³ Su secuencia posee en la región N-terminal aminoácidos hidrofílicos con cargas positivas, y a continuación una región rica en Val, Ile, Leu (altamente conservada en las distintas especies⁴⁴) lo que la transforman en una proteína altamente hidrofóbica. Esta región abarca desde el residuo aminoácido 9 al 34, y en ella se genera una estructura α -hélice muy estable que le permite incluirse en membranas, como una proteína con un pase transmembrana (*figura 6*). La actividad de esta proteína es estrictamente dependiente de la presencia de su estructura en α -hélice, ya que la longitud de la misma se ajusta perfectamente con el ancho de una bicapa de DPPC, siendo muy importante para que tenga lugar la rápida adsorción del surfactante.^{2, 44,45} La presencia de residuos de Arg y Lys en su secuencia le otorga una carga neta positiva que permite su interacción con las cabezas polares de los fosfolípidos; y a su vez determinan la orientación transmembrana de SP-C madura.^{46,47}



El procesamiento de proSP-C comienza en el RE, donde la proSP-C es traducida y translocada. La proSP-C posee tres regiones, un péptido N-terminal de 23 aminoácidos, la porción de SP-C madura y un péptido C-terminal de 138 aminoácidos. El dominio hidrofóbico (que constituye la porción madura) tiene dos funciones, una es actuar como dominio de anclaje a la membrana, y la otra es actuar como péptido señal para que se produzca la inserción de la proteína en la membrana.⁴⁶ La región N-terminal se encuentra en la cara citosólica, mientras que la región C-terminal se ubica en la cara al luminal del retículo. La presencia de un puente disulfuro intramolecular en este último segmento permite el correcto plegamiento de dicha región y procesamiento de proSP-C.^{37,43} La proSP-C es clivada cuatro veces. En primera instancia se procesa la región C-terminal en dos pasos, lo cual genera dos péptidos de 16 y 7 kDa. Luego de la inserción en la membrana, proSP-C es transportada a los MVBs donde la SP-B madura coopera para que se escinda la región N-terminal en dos pasos. La región N-terminal de SP-B tiene gran importancia ya que se cree que puede intervenir en el proceso de maduración y plegamiento de SP-C.⁴⁹

Durante la maduración de la SP-C en la región trans del aparato de Golgi la proteína es dipalmitoilada en los residuos de Cys 5 y 6. En ciertas especies se ha hallado SP-C tripalmitoilada en el residuo 11-Lys⁴⁵ y así como la forma monopalmitoilada (perro y visón⁴⁴), pero ambas en bajas proporciones. La presencia de los palmitoilos favorece la estabilización de la α -hélice, y al

encontrarse en la región N-terminal de SP-C madura favorece la interacción con otras membranas y genera la posibilidad de interaccionar con bicapas.⁴⁰ Así, se ha visto que la palmitoilación de esta proteína es capaz de potenciar la re-expansión de la membrana surfactante (debido a dicha interacción) y aumentar su estabilidad, fundamentalmente a altas presiones donde su rol es crucial para mantener las asociaciones entre la mono/bicapas del surfactante.^{12,50} La palmitoilación de SP-C permite además estabilizar el contenido de colesterol en las capas del surfactante al promover la interacción de ciertas proteínas con los dominios de la membrana ricos en colesterol. Se ha visto que en ausencia de palmitoilaciones se podrían generar colapsos antes de lograr alcanzar el valor mínimo de tensión superficial, al verse imposibilitada SP-C de mantener la asociación entre las membranas en los estados de mayor presión de la capa interfacial.¹² La palmitoilación también permite que la región N-terminal de SP-C madura inmersa en una membrana pueda interaccionar con otra membrana o con otras regiones de la misma bicapa lipídica; por lo que esta modificación postraducciona es clave para los diversos roles de SP-C.^{12,}

37,51

1.3 Formación y almacenamiento del surfactante pulmonar:

Estructuras del SP y procesamiento de sus proteínas hidrofóbicas:

Ambas proteínas hidrofóbicas del SP comparten la misma vía de transporte luego que son sintetizadas. En seguida a la translocación en la membrana del RE, ambas proteínas en su forma inmadura son transportadas hacia los cuerpos lamelares (LBs) mediante el compartimiento distal del aparato de Golgi, cuerpos multivesiculares (MVBs) y cuerpos compuestos (CBs). Los MVBs son organelos con múltiples vesículas unilamelares que están enriquecidos en lípidos saturados y en las proteínas hidrofóbicas del SP en su estado inmaduro. Los mismos, en un estadio más avanzado de maduración se transforman en CBs que posteriormente se transformarán en los LBs nacientes (*figura 7*). Como fue previamente mencionado, los LBs poseen un pH ácido y enzimas proteolíticas que son responsables de que SP-B y SP-C sufran los procesos de clivaje que dan lugar a las proteínas en su forma madura.^{6,35} El transporte de los lípidos del surfactante a través de estos organelos se ve facilitado por la presencia del transportador en forma de cassette de unión a ATP

A3 (ABC-A3), que transporta DPPC, PC y PG desde el RE hacia los LBs.^{6,36,52} La presencia de este transportador es clave ya que interviene activamente en la formación de los LBs; y se ha visto que su ausencia no solo afecta a la formación de los mismos sino que también repercute en la secreción del SP hacia la superficie alveolar, generando fallas respiratorias.⁵³

Una vez formados, los LBs poseen una estructura multilamelar característica, con membranas empaquetadas muy estrechamente de forma concéntrica (*figura 8*). Mediante la recepción de estímulos y por vías de secreción reguladas, son direccionados hacia la membrana plasmática a través del transporte por actina y otros componentes del citoesqueleto. Una vez que se encuentran allí son secretados al exterior celular donde liberan al surfactante almacenado, y junto con la acción de SP-A, SP-B y Calcio generarán la TM.

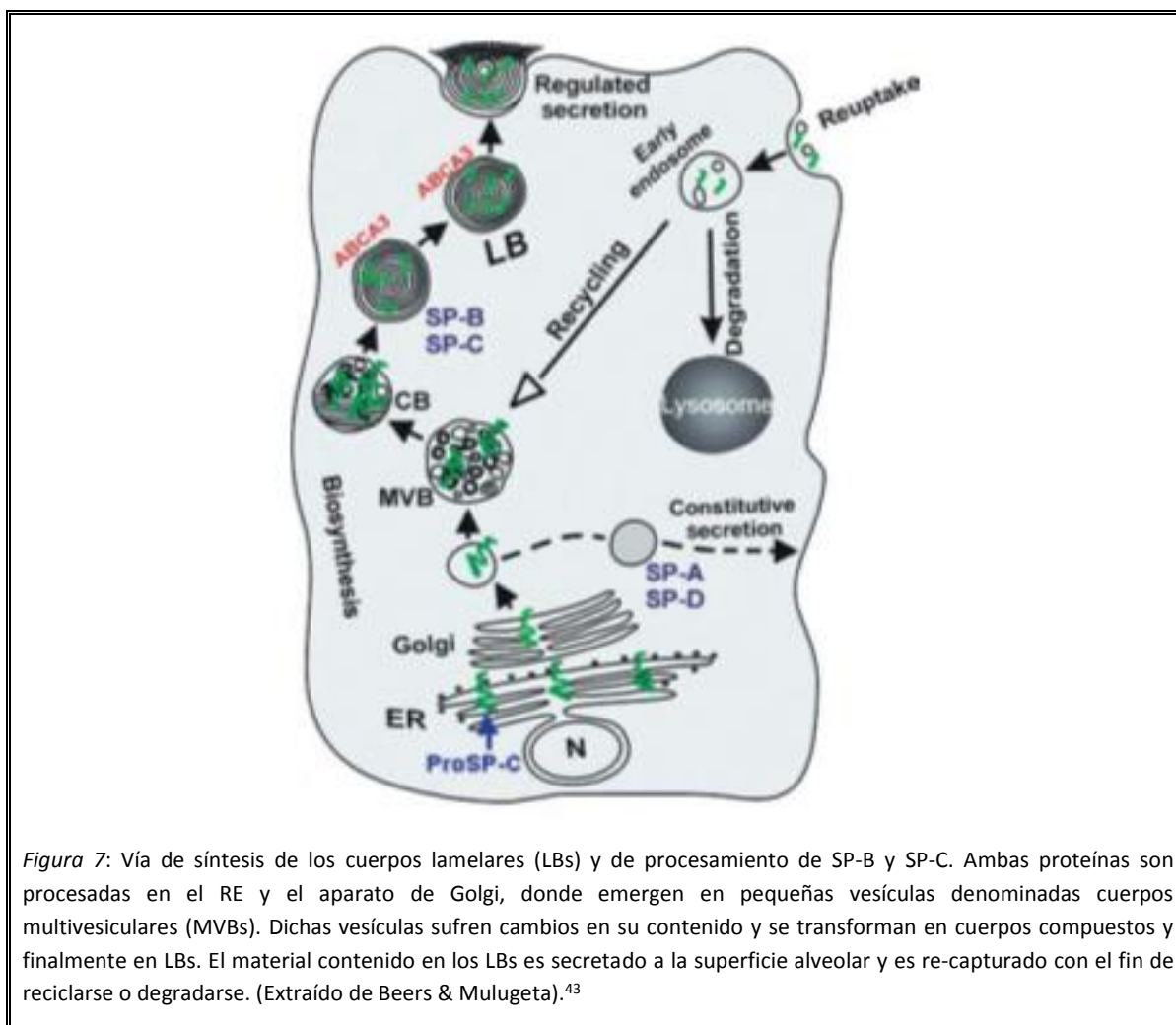


Figura 7: Vía de síntesis de los cuerpos lamelares (LBs) y de procesamiento de SP-B y SP-C. Ambas proteínas son procesadas en el RE y el aparato de Golgi, donde emergen en pequeñas vesículas denominadas cuerpos multivesiculares (MVBs). Dichas vesículas sufren cambios en su contenido y se transforman en cuerpos compuestos y finalmente en LBs. El material contenido en los LBs es secretado a la superficie alveolar y es re-capturado con el fin de reciclarse o degradarse. (Extraído de Beers & Mulugeta).⁴³

La TM es la estructura en forma de cuadrícula que adopta el surfactante una vez que se halla en el espacio alveolar. Se genera al intersectarse dos conjuntos de bicapas lipídicas antes de que se forme la monocapa en la hipofase aire-líquido. Cada cuadrícula de TM está formada por bicapas que emergen de dos o más LBs diferentes, y a su vez cada LB participa en la formación de dos cuadrículas de TM (*figura 8*).^{54,55,56}

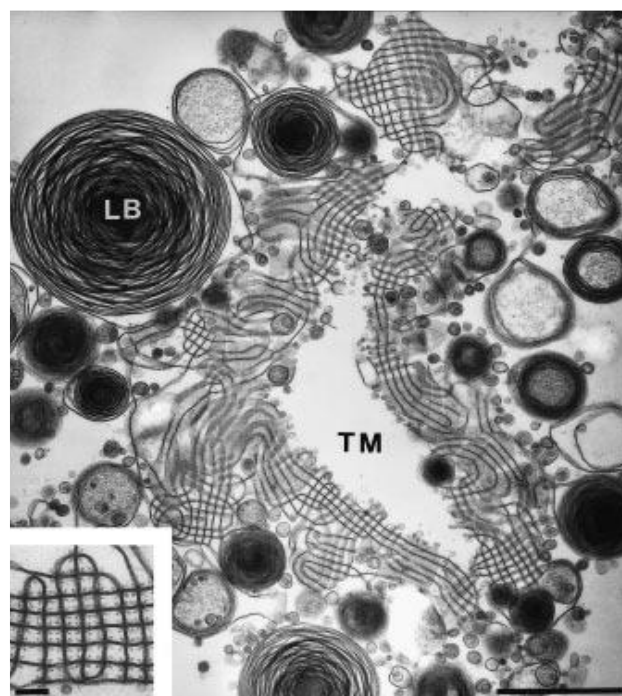


Figura 8: Formación de la mielina tubular (TM) en el espacio alveolar a partir de la secreción de las membranas almacenadas en los cuerpos lamelares. En la esquina inferior izquierda se tiene un acercamiento de la estructura en forma de TM. (Tomado de Goerke et al).²

Para la formación de TM es necesaria la presencia de DPPC, PG, SP-A, SP-B y Ca^{2+} . Mediante el dominio CRD, SP-A interacciona con las cabezas aniónicas de los fosfolípidos que conforman las membranas empaquetadas en los LBs (como PG), para poder curvar la membrana y así formar la cuadrícula; aunque también se cuestiona que este comportamiento esté favorecido por interacciones laterales SP-A/SP-A.⁶ Si bien no hay suficiente información acerca de cómo se

fusionan las bicapas cuando se intersectan, se cree que ocurre con la acción de SP-B, ya sea mediante interacciones SP-B/membranas o SP-B/SP-B; y por ello es imprescindible la presencia de esta proteína para la formación de esta estructura (*figura 9*).^{6,57}

Si bien la mielina tubular es una estructura muy importante en la dinámica del SP, su ausencia no resulta fatal, por lo que no es imprescindible para la función respiratoria normal.⁷

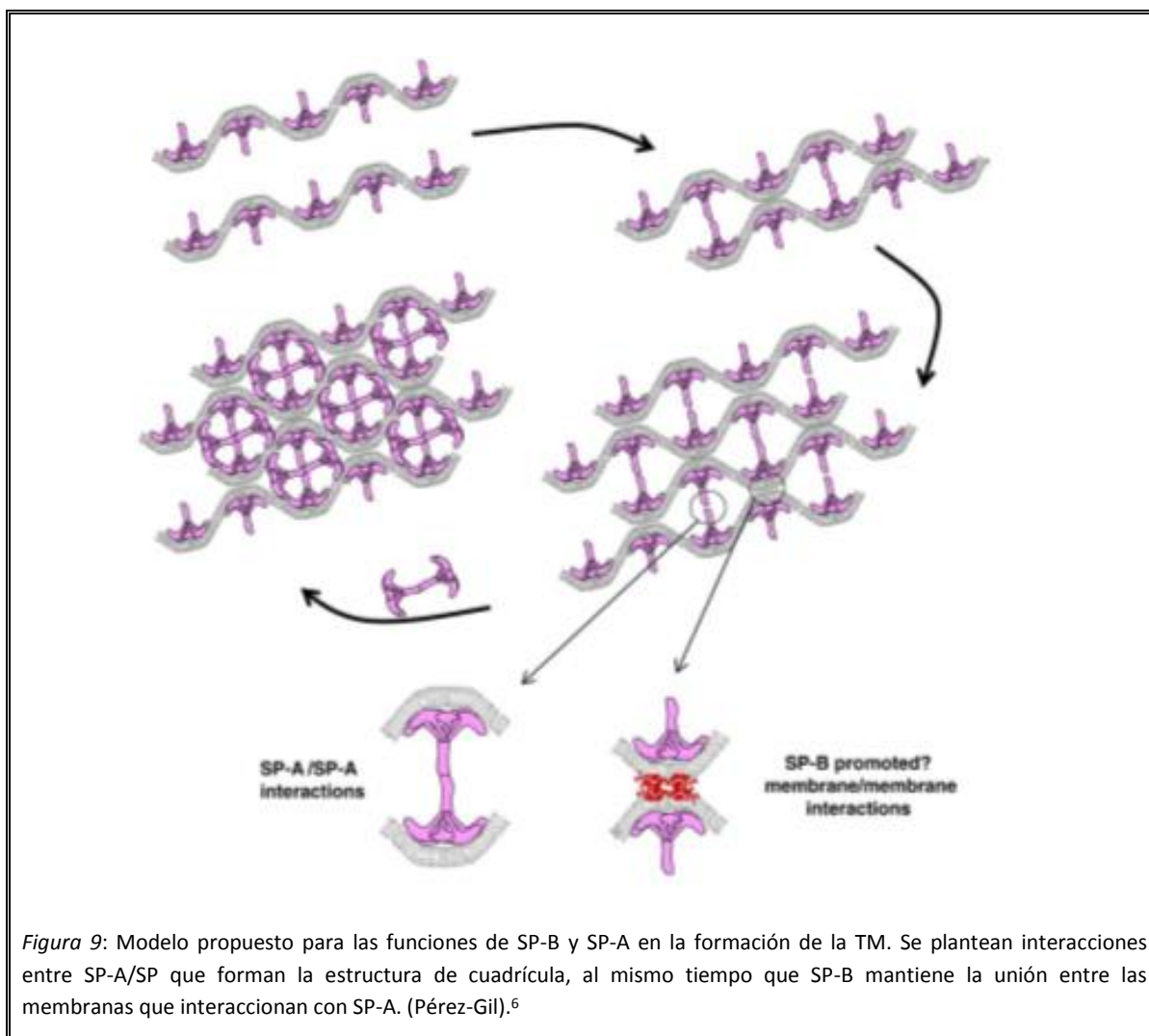


Figura 9: Modelo propuesto para las funciones de SP-B y SP-A en la formación de la TM. Se plantean interacciones entre SP-A/SP que forman la estructura de cuadrícula, al mismo tiempo que SP-B mantiene la unión entre las membranas que interaccionan con SP-A. (Pérez-Gil).⁶

Reciclaje y reservorio de SP:

A medida que fue avanzando el conocimiento respecto al surfactante y su funcionalidad, se propuso la existencia de un “reservorio” de SP cercano a la membrana apical de los neumocitos tipo II, ubicado justo por debajo de la monocapa (espacio conocido como hipofase). Este reservorio permite que el SP tenga una dinámica muy activa en los ciclos inspiración-espiración, siendo el responsable de albergar el SP durante la exclusión en la espiración y su re-inserción durante la inspiración. Se ha demostrado que para que se desempeñe esta función de forma rápida y eficiente es necesario que el SP permanezca en extrema proximidad a la monocapa, para lo cual se necesita que esté presente SP-C. Esta proteína se encuentra vinculada a la mantención del reservorio del material tensoactivo, ya que sus palmitoilos permiten que exista un estrecho contacto entre las bicapas de la hipofase y la monocapa en el proceso de inclusión y exclusión de material. La forma dimérica de SP-B también está involucrada en la mantención del reservorio pero de forma menos activa que SP-C (*figura 10*).^{52,58}

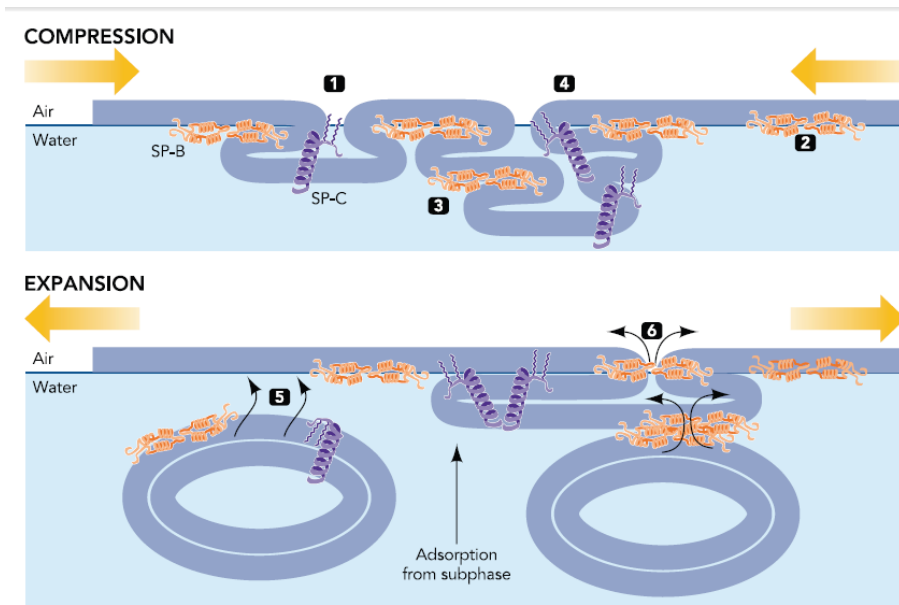


Figura 10: Rol de la SP-B y SP-C durante el ciclo de compresión/expansión de las membranas del SP durante el ciclo respiratorio. Se puede observar cómo se da la exclusión de material durante la compresión y cómo la presencia de las proteínas hidrofóbicas del SP favorecen el proceso. Durante la expansión se puede ver cómo se vuelve a expandir la membrana del SP también mediado por la acción de proteínas (Extraído de Pérez-Gil & Weaver).⁵²

Durante el ciclo respiratorio el surfactante presente en la monocapa sufre procesos de compresión/exclusión/re-inserción del material tensoactivo. Durante la compresión, la monocapa se enriquece en material altamente tensoactivo (DPPC) y se excluye el material de escasa capacidad a través de la función de las proteínas hidrofóbicas. Particularmente, SP-B promueve la formación de curvaturas negativas para la eliminación del SP, y SP-C ofrece la posibilidad de que este material permanezca adherido a la monocapa. Esto es crucial durante el ciclo inspiratorio donde la interfase se expande y es necesario cubrir los espacios moleculares que quedaron disponibles para que no se forme una fase gas y con esto el colapso alveolar. El material tensoactivo que queda en la hipofase vuelve a ser endocitado gracias a que tiene lugar la formación de pequeñas vesículas (que forman los pequeños agregados del SP), que pueden ser internalizadas por los neumocitos tipo II para que tenga lugar el reciclaje.³⁷ La re-internalización ocurre mediante la activación por SP-A y su receptor P63 de elevada afinidad en estas células a través de endosomas.⁵⁹ Este proceso es dependiente de clatrina, aunque se sabe que el reciclaje de ciertos componentes del SP se da de manera independiente a este sistema.^{11,60} Otra parte del surfactante pulmonar en la hipofase es degradado por los macrófagos presentes en el epitelio alveolar, aunque los mecanismos por lo que se procede a la degradación o reciclaje del SP aún no son del todo claros. Es importante destacar que ambos procesos son dependientes de la especie y edad del individuo.⁶¹

Secreción del SP:

La secreción de SP a través de los LBs involucra tres vías de señalización relacionadas entre sí, las cuales conducen a su liberación hacia el espacio alveolar. Los receptores celulares involucrados en las cascadas de señalización son los receptores β -adrenérgicos, receptores purinérgicos P2Y₂ y receptores de Adenosina A_{2B}. Una de las vías implica la activación de la proteína quinasa C (PKC), que a través de una cascada en la que ATP y UTP participan como activadores de la fosfolipasa C- β 3 que logra la formación de inositol-3-fosfato y diacilglicerol. Este último es el responsable de activar a la PKC para que tenga lugar la fosforilación proteica. Por otro lado la vía adenilato ciclasa es activada mediante los receptores β -adrenérgicos y su traducción intracelular esta acoplada a la proteína G. La adenilato ciclasa genera AMPc, el cual actúa como segundo mensajero y activa a la proteína quinasa A (PKA) como efector de la señalización. La liberación de Ca²⁺ intracelular constituye el tercer mecanismo de señalización involucrado en la liberación de los LBs, el Ca²⁺

activa a las proteín-quinasas dependientes de calmodulina y generan la señal para la liberación.⁶² La vía más potente involucra a la PKC, aunque se ha identificado que la activación conjunta además de la liberación de Ca^{2+} y la PKA producen la secreción de surfactante con mayor potencia. Los procesos que ocurren luego de la activación de PKC son complejos y aún no están elucidados por completo, pero se cree que la activación de esta enzima está en íntima relación con la activación de Calcio, y en forma conjunta provocan la liberación del SP a partir de los LBs.⁶²

La ventilación pulmonar favorece la secreción del surfactante debido al estiramiento que sufre el tejido pulmonar; ya que logra que los neumocitos tipo I liberen ATP al espacio alveolar y este actúe como molécula de acción parácrina en los receptores purinérgicos de los neumocitos tipo II para promover la secreción.^{63,64} Tanto el estiramiento como la acción parácrina del ATP son capaces de activar la vía de secreción dependiente de Ca^{2+} en los neumocitos tipo II y así provocar la liberación de los LBs. Durante el parto, la síntesis de lípidos del surfactante así como su secreción también se ven incrementadas, lo que se cree que es debido a la estimulación de los receptores adrenérgicos.^{60,62,65}

El SP puede ver afectada su función debido a la capacidad inhibitoria de algunas sustancias endógenas y exógenas. Ejemplo de esto son la presencia de proteínas plasmáticas, ácidos grasos libres y especies reactivas de oxígeno. Además, los niveles altos de colesterol, lisofosfolípidos, contaminantes presentes en el aire, proteasas y fosfolipasas, son muy importantes en el agravamiento y/o desarrollo de la patología respiratoria.⁶⁶

1.4 Funciones de las proteínas hidrofóbicas:

Las proteínas hidrofóbicas del surfactante son co-responsables de la actividad tensoactiva del SP y por consiguiente de evitar el colapso alveolar. Tanto SP-B como SP-C son capaces de interactuar con fosfolípidos aniónicos, lo que favorece la formación y estabilización de la monocapa durante el ciclo respiratorio. En forma conjunta, SP-B y -C son capaces de favorecer el enriquecimiento de la monocapa del surfactante con DPPC.²⁶

SP-B permite la interacción entre dos bicapas lipídicas o bien entre una bicapa y una monocapa; siendo capaz de transferir lípidos de una membrana a la otra, y de excluir PG de la monocapa durante el estado de mayor compresión para lograr disminuir la tensión superficial.^{38,67} SP-B interviene en la formación de los LBs, influyendo en el tamaño de los mismos. Si esta proteína no está presente los LBs sufren deficiencias y se genera un acúmulo de MVBs.^{6,68} SP-B también interviene en la formación de la mielina tubular en colaboración con la SP-A y en presencia de DPPC, Calcio y PG.⁶⁷ Esta proteína tiene un rol importante en el procesamiento de SP-C, lo que se ha esclarecido al observar que ratones knock-out para el gen de SP-B acumulan proSP-C en los cuerpos MVBs.

SP-C se caracteriza por favorecer en gran medida la reinserción de los fosfolípidos del surfactante una vez que fueron excluidos de superficie alveolar durante la espiración. A su vez esta proteína interviene en la formación del reservorio del SP y permite que los mismos se mantengan unidos a la interfase cuando la compresión es máxima. El reservorio es clave para que se produzca la re-inserción de fosfolípidos durante la expansión de la monocapa, y para que tenga lugar la exclusión de material durante la compresión de la misma. Las palmitoilaciones de SP-C potencian la re-expansión y la estabilización de la monocapa que se ha adsorbido en el espacio alveolar; y al mismo tiempo estas palmitoilaciones permiten que SP-C contrarreste los efectos adversos que el colesterol puede llegar a tener en la membrana surfactante.¹²

Ambas proteínas hidrofóbicas son capaces de promover el enriquecimiento de DPPC en la monocapa al excluir el material no tensoactivo, aunque SP-B lo hace de forma más eficaz.^{10,26,39} SP-B también resulta más efectiva que SP-C en el intercambio de fosfolípidos de la membrana, ya que

excluye a los fosfolípidos más fluidos de la misma y favorece la presencia de DPPC en los estados más comprimidos. Como se mencionó anteriormente, si bien SP-C tiene un rol fundamental y esencial en la reinserción de material a partir de los reservorios de SP, SP-B colabora también con ello.¹² Estudios recientes han mostrado que ambas proteínas hidrofóbicas son capaces de formar poros en la membrana, generando cambios en la permeabilización de la misma y el intercambio de material, haciendo que la misma sea permeable a pequeñas moléculas polares.⁶⁷ Por lo tanto, estas dos proteínas conjuntamente son capaces de favorecer la adsorción de la capa interfacial de SP, purificarla al enriquecerla con DPPC, estabilizarla y generar su re-expansión luego de la espiración.⁶⁹

Si bien SP-A es una proteína hidrofílica, cumple funciones tensoactivas relacionadas con SP-B y SP-C. SP-A es capaz de favorecer la formación de la capa superficial del surfactante una vez que éste ha sido secretado al espacio alveolar, aunque las proteínas hidrofóbicas lo hacen de forma más efectiva y rápida.^{10,24} SP-A también coopera con SP-B en el enriquecimiento selectivo de la monocapa en DPPC, únicamente si SP-B está presente.⁵⁸ También vale destacar que SP-A se cree que es esencial para formar la TM.

Las funciones conjuntas de SP-B como de SP-C permiten acelerar la formación de la monocapa, la expansión y la reabsorción de la misma, y así protegen al alvéolo del colapso en el ciclo respiratorio. Estas funciones en su conjunto hacen de estas proteínas elementos claves en la dinámica del surfactante pulmonar.

1.5 Importancia biológica:

Tanto SP-B como SP-C han demostrado ser esenciales para una correcta función del surfactante pulmonar. Las terapias con surfactantes exógenos han tenido mejores resultados cuando además de la mezcla lipídica poseen ambas proteínas hidrofóbicas. Estas terapias son altamente utilizadas en bebés prematuros, cuyo surfactante propio no ha podido desarrollarse (total o parcialmente) y por tanto necesitan de la administración de uno exógeno para sobrevivir.

SP-B es esencial para la vida y el correcto funcionamiento del SP. Su ausencia total resulta letal para los recién nacidos debido a que se afecta la homeostasis pulmonar, ocasiona una disminución de la tensión superficial indebida; genera también un aumento de pro-SP-C en el espacio alveolar y defectos en los LBs que perjudican la composición fosfolipídica del SP.⁷⁰

Respecto a SP-C, se ha visto que no es esencial para la supervivencia de neonatos, ya que para ratones knock-out en el gen de SP-C no se ha visto afectada la función pulmonar, la estructura de los LBs o la TM; pero se ha correlacionado su ausencia con el desarrollo de enfermedades respiratorias en diversos grados.^{5,12} SP-C posee varias isoformas que se cree pueden estar vinculadas a diferentes patologías respiratorias. Por ejemplo, se ha encontrado que los pacientes con proteinosis alveolar presentan la isoforma mono o no-palmitoilada.⁴⁵ Estos hallazgos permiten inferir una relación entre las diferentes isoformas de SP-C y la fisiopatología asociada. Si bien SP-C no es esencial en el momento del nacimiento, sus funciones hacen que ésta cumpla un rol crucial en la mantención del funcionamiento del surfactante.

El síndrome de distrés respiratorio (SDR) es una enfermedad compleja que se caracteriza principalmente por la presencia de edema pulmonar, colapso alveolar e hipoxia. En niños se conoce como síndrome de distrés respiratorio en infantes (SDRI), y suele generarse en los neonatos por inmadurez gestacional y deficiencias en el surfactante. Esta carencia afecta a las funciones que son desempeñadas por el SP y fundamentalmente aquellas que lleva a cabo SP-B ya que la disminución de la presencia de esta proteína genera efectos drásticos. Mutaciones en el extremo N-terminal y C-terminal de SP-B impiden su maduración y plegamiento. Especialmente las mutaciones en el extremo C-terminal de SP-B impiden que esta proteína se pliegue correctamente y genera la retención de la misma en el RE imposibilitando su procesamiento. Ambas mutaciones terminan afectando las funciones de SP-B, entre ellas se destaca el procesamiento de SP-C.³⁷ La deficiencia de SP-B por tanto resulta letal ya que no permite que se disminuya la tensión superficial en el ciclo respiratorio, y por tanto se genera colapso alveolar. SDRI también puede generarse por fallas en el transportador ABCA3, debido a que éste está involucrado en el almacenamiento de los fosfolípidos y proteínas en los LBs.⁶ Como consecuencia de esta deficiencia no solo se ve afectado el procesamiento de SP-C, sino también la formación de los LBs y TM, ocasionando finalmente el incremento en la tensión superficial.

En neonatos la falla pulmonar también se puede generar por la aspiración de meconio en el momento del parto, debido a que los altos niveles de colesterol y sales biliares presentes generan inhibición de la funcionalidad SP. La inhibición también se ve favorecida por la obstrucción en las vías aéreas que genera la aspiración ya que provoca la inflamación de las mismas. Los componentes inflamatorios compiten por el espacio interfacial con el SP desplazando a éste y disminuyendo así su funcionalidad.⁷¹

El síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) en adultos presenta inhibición en la funcionalidad del SP debido a la infiltración de proteínas y material del plasma sanguíneo. En este síndrome, como en SDRI, hay variaciones en el perfil lipídico normal del SP y en el nivel de sus proteínas, siendo incapaz de disminuir la tensión superficial en el alvéolo de forma eficiente, entre otros factores. Además se ha visto que el aumento de la presencia de colesterol en el SP puede jugar un rol crucial en el desarrollo de esta enfermedad.^{72,73}

Dado que en SDR los niveles de síntesis y liberación de SP se ven afectados, la terapia que se aplica es la utilización de SP exógenos; que si bien resulta útil (pero no óptima) para neonatos, no ha sido completamente efectiva en adultos que padecen esta patología. Esto se debe a que pacientes con SDRA, además de la inhibición del SP poseen disfunción vascular, daño celular y daño oxidativo, lo que junto con la presencia de edema dificulta la performance del SP exógeno para tratar este síndrome; al mismo tiempo que la administración en adultos no es adecuada.⁷⁴

La proteinosis alveolar pulmonar (PAP) se caracteriza por la acumulación de SP, no debido al aumento en la producción del mismo sino a interferencias en su recaptación. Este defecto se debe a que SP-C no posee los grupos palmitoilos asociados, y provoca que forme fibras amiloides impidiendo que pueda cumplir su función relevante al reciclaje del SP.^{51,75,76} En PAP se ha encontrado a su vez que los niveles de síntesis de PG están disminuidos mientras que los de PI se encuentran aumentados así como los niveles de SP-D.³³

Los componentes del humo de tabaco afectan la funcionalidad del SP y se han demostrado los efectos que tiene por sobre el surfactante. Es posible identificar niveles disminuidos de DPPC, mientras que genera la acumulación de PE y SM. En el humo de tabaco pueden encontrarse radicales libres, toxinas y oxidantes que pueden alterar al SP impidiendo la correcta función de sus

componentes. Afecta la capacidad de disminuir la tensión superficial, el reservorio de surfactante, la dinámica de liberación y recaptación del mismo. Al mismo tiempo los componentes del tabaco generan la oxidación de lípidos, SP-B y SP-C, y disminuyen los niveles de SP-A, B y D en humanos.^{77,78}

El surfactante y su actividad se han visto afectados también en diversas patologías respiratorias, tales como asma, neumonía y la enfermedad obstructiva crónica (EPOC) entre otras. En pacientes con asma se observó que el surfactante se encuentra en una forma menos funcional debido a una disminución de los grandes agregados de SP. Durante la inflamación que tiene lugar en los casos agudos de esta enfermedad, la presencia de proteínas, especies reactivas de oxígeno y otros compuestos favorecen la disfunción del SP, lo que podría favorecer la obstrucción de las vías aéreas.⁷⁹ Respecto a la neumonía, el SP ve afectada su funcionalidad debido a una disminución en los niveles de SP-A, PC y PG; mientras que en EPOC se ve afectada la función de mantener libre de patógenos el espacio alveolar, de disminuir la tensión superficial y de disminuir la adhesividad de las pequeñas vías aéreas, favoreciendo a esta patología.^{73,80}

La terapia con surfactante exógenos se ha utilizado en pacientes con diversas patologías respiratorias tales como SDRI, SDRA, ALI entre otros; con el fin de suplantar la ausencia o deficiencia del SP endógeno. Se han utilizado surfactantes de origen sintético (ALEC, Exosurf) pero dada su pobre performance se han desarrollado surfactantes de origen orgánico que han mejorado ampliamente su acción (Survanta, Alveofact, CLSE, Curosurf entre otros). La adición de las distintas clases de fosfolípidos presentes en el SP endógeno junto con las proteínas hidrofóbicas del mismo mostró ser indispensable para obtener un mejor resultado en la terapia de las distintas patologías.⁸¹ Se han observado diferencias notorias entre estos últimos relativas a la disminución de la tensión superficial y a la resistencia a la inhibición. Se vio que Survanta (utilizado actualmente en nuestro país) es el surfactante que menos disminuye la tensión superficial (alcanzando valores de 4mN/m).⁷²

Fundamentalmente para SDRI se ha visto que la terapia con SP exógeno mejora la funcionalidad pulmonar, disminuye la severidad del síndrome y las pérdidas pulmonares de aire así como el enfisema intersticial pulmonar, lo cual aumenta la sobrevida del paciente.⁸² Sin embargo aún existen aspectos que deben mejorarse, tales como la administración. Usualmente se aplica la instilación intratraqueal como método de administración; la cual si bien es útil no permite que la

terapia sea del todo eficaz. El edema y la inflamación impiden que el SP exógeno alcance efectivamente la superficie alveolar, y por dicho motivo actualmente se está intentando aplicar al mismo mediante aerosol.^{83,84}

Además de las limitaciones en la administración, la terapia tiene también como limitación la composición de cada mezcla comercial, ya que se utiliza una única preparación para las diferentes patologías. Un mayor estudio en la terapia con surfactante exógeno puede ser útil no únicamente para mejorar su performance en pacientes con SDR, sino también para desarrollar su potencial uso en aquellos con asma, neumonía, EPOC, PAP y fumadores entre otros; aunque son necesarias exhaustivas investigaciones en esta área para haya una utilización de SP adecuada para cada patología.

1.6 Antecedentes:

Debido a la gran importancia que tienen SP-B y SP-C en la dinámica del SP, se han buscado estudiar de forma más exhaustiva; aunque dada su complejidad esto se ha visto dificultado. *Crusted et al*⁸⁵ en 1987 desarrollaron un método para la purificación de estas proteínas utilizando una cromatografía de exclusión molecular en una columna *Sephadex LH-60* y como fase móvil Cloroformo:Metanol (1:1) + 5% HCl 0.1M. Posteriormente, en 1988, *Arjomaa et al*⁸⁶ desarrollaron un método para la purificación de SP-C utilizando HPLC en fase reversa en una columna C4, utilizando acetato de amonio (pH 6.5) y luego un gradiente lineal de 1-propanol 0-80%. Más recientemente, *Bünger et al*⁸⁷ en el año 2000 desarrollaron un método más rápido que los anteriores para lograr la purificación deseada; en el cual utilizaron una columna C4 y una fase móvil compuesta por Cloroformo:Metanol:TFA 0.1M (95:95:10). Sin embargo este método no logra una separación satisfactoria entre ambas proteínas, por lo que la separación óptima entre SP-B y SP-C mediante HPLC en fase reversa continúa siendo un desafío.

Dada la gran relevancia tanto SP-B como SP-C creemos que es sumamente relevante incursionar en su estudio, ya que un mejor conocimiento de las mismas, de forma conjunta e individual, puede permitirnos vincularlas con diversas patologías respiratorias e intentar así buscar soluciones prácticas y eficaces.

2. OBJETIVOS:

El objetivo principal planteado es lograr la purificación de las proteínas hidrofóbicas del surfactante pulmonar (SP-B y SP-C) a escala analítica y preparativa.

Como objetivos específicos se plantean:

- 1) Procesamiento de tejido y LBA porcino y obtención de las fracciones lipoproteicas ricas en proteínas hidrofóbicas.
- 2) Purificación de los componentes proteicos hidrofóbicos (SP-B y SP-C) de las fracciones lipídicas.
- 3) Purificación por cromatografía del alta performance de la SP-B y SP-C.
- 4) Identificación de SP-B y SP-C purificadas mediante electroforesis y espectrometría de masa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

Obtención del surfactante pulmonar

Para obtener la fracción proteica del surfactante pulmonar se utilizaron dos estrategias; la primera fue la purificación de las proteínas hidrofóbicas del LBA de porcinos⁸⁸ y la segunda fue a partir de pulmones porcinos obtenidos inmediatamente luego de la faena en frigorífico.

La primer estrategia que se llevó a cabo constó de la instilación intratraqueal de suero fisiológico (NaCl 140mM; 1L/Kg de pulmón), y el LBA obtenido se filtró y se centrifugó por 5 minutos 1000g y 4°C. El sobrenadante obtenido fue nuevamente filtrado y se almacenó en freezer a -20°C.

Para llevar a cabo la segunda estrategia, los pulmones porcinos fueron lavados con suero fisiológico (NaCl, 140 mM) y almacenados en freezer a -80°C. El tejido pulmonar se troceó de manera manual para luego ser disgregado con un homogeneizador *Potter-Elvehjem* a 3000 rpm y 4°C. Por cada Kg de tejido pulmonar se agregó para el homogeneizado 1 litro de suero fisiológico. Posteriormente el disgregado se filtró por gasa y se centrifugó durante 5 minutos a 1000xg y 4°C, luego de lo cual el sobrenadante fue conservado en freezer a -20°C hasta su utilización.

Extracción orgánica del tejido procesado y del LBA:

Con el fin de obtener la fracción hidrofóbica del tejido pulmonar se realizó una extracción orgánica según el método propuesto por *Bligh & Dyer*⁸⁹. En el mismo, por cada mililitro de muestra se agregan 3.75 ml de Cloroformo:Metanol en relación 1:2 (v/v) y se agita vigorosamente por 60 segundos; posteriormente se le añaden 1.25 ml de Cloroformo y 1.25 ml de agua destilada lo cual genera dos fases visualmente distinguibles. Es necesario agitar vigorosamente la mezcla durante 30 minutos a 37°C para favorecer el reparto moléculas hidrofóbicas a la fracción clorofórmica. Luego la mezcla se centrifuga por 5 minutos a 1000 rpm y temperatura ambiente, lo que genera un sistema de dos fases donde la inferior (correspondiente a la fase orgánica) es recogida y secada. De esta manera, al recoger dicha fase se recolecta la porción hidrofóbica del tejido pulmonar que contiene lípidos y las proteínas hidrofóbicas del surfactante pulmonar. La

fracción clorofórmica obtenida fue secada bajo atmósfera de nitrógeno, y resuspendida en una mezcla de Cloroformo:Metanol (1:1; v/v) y se almacenó a -20°C.

Purificación de las proteínas SP-B y SP-C mediante HPLC:

Las proteínas SP-B y SP-C fueron purificadas del resto de los componentes lipídicos (fosfolípidos y lípidos neutros como el colesterol) a partir de una cromatografía de exclusión molecular *Sephadex* LH-20 para moléculas orgánicas. Se utilizó un sistema cromatográfico resistente a solventes orgánicos que fue optimizado en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Institut Pasteur de Montevideo, donde se empacó una columna de vidrio, de 100cm x 0.9cm (Volumen: 57 cm³) con plungers resistentes a los solventes utilizados. La fase móvil utilizada fue Cloroformo:Metanol en relación 1:1 con 5% HCl 0.1N; la cual fue bombeada con una bomba *LKB Bromma* modelo 2150 *HPLC Plump* a un flujo de 1 ml/min y a temperatura ambiente. Para la detección de las moléculas de interés se utilizó un detector UV *Spectra 100* de *Thermo* con una absorbancia de 240nm, mientras que la sensibilidad del detector y registrador fueron de 100mV en una escala de 1mm/min y 1 AUFs. Para inyectar las muestras se utilizó una válvula *Rehodyne* 7125 con un loop de 1.5 ml, intentando utilizar el volumen máximo del loop en cada inyección. Para mejorar la pureza de las proteínas el primer pico de cromatografía (correspondiente a las proteínas de interés) luego de colectado y concentrado fue re-purificado en iguales condiciones, con lo cual se logró mejorar la pureza de las proteínas de interés, eliminando restos de fosfolípidos y colesterol presentes en la muestra.

Identificación de SP-B y SP-C:

Para corroborar la purificación conjunta de SP-B y SP-C en la fracción del extracto orgánico obtenido de LBA y tejido pulmonar, se recurrió a realizar electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente pre-hecho de NuPAGE® Bis-Tris Precast Gels (*Life Technologies*), con un porcentaje de entrecruzamiento de 4-12%. El voltaje utilizado para todas las corridas electroforéticas fue de 200mV y el amperaje fue de 20mA.

Las muestras fueron preparadas según protocolo recomendado por *Laemmli et al*⁹⁰, el cual

propone la evaporación casi total del solvente de la muestra. Para los geles realizados se secaron aproximadamente 50µl de las fracciones recolectadas a partir de la columna LH-20 las cuales fueron concentradas previamente; y se le añadieron 20µl buffer de carga diseñado para nuestro sistema de proteínas hidrofóbicas (ver composición en la *Tabla 1*). En el caso que las muestras fueron tratadas con condiciones no reductoras, al buffer que se diseñó anteriormente se excluyó el agregado de DTT. Para algunos casos particulares también se adicionaron al buffer de carga 5 µl del agente reductor β-mercaptoetanol (β-ME), el cual tuvo como objetivo mejorar las condiciones de corrida. Para todos los geles se utilizó un marcador de peso molecular (MPM) *General Electric*, (GE) con un patrón de pesos moleculares de 97, 66, 45, 30, 21.1 y 14.4 KDa.

Tabla 1: Composición del buffer de carga utilizado para sembrar las muestras en el gel de poliacrilamida.

Stacking buffer 4x 0.125 M	12.50%
Glicerol 50%	20.00%
Azul de bromofenol	1.00%
DTT 1M (*)	10.00%
SDS 20%	25.00%
CHAPS 10%	25.00%
H ₂ O dd (csp)	6.50 %

(*) DTT se adicionó únicamente al buffer de carga del primer gel en gradiente.

Para revelar los geles se utilizó el método de Azul de Coomassie, propuesto por *Fazekas et al.*⁹¹ Se realizó una solución de fijación compuesta por Etanol 95%, agua destilada y ácido acético en proporciones 50:40:10 (v/v), y se incubó gel a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación constante. Posteriormente el gel se incubó con la solución de tinción de Azul de Coomassie y Etanol 95% en proporciones 80:20 (v/v), a temperatura ambiente y con agitación durante la noche. El proceso de lavado requirió de tres enjuagues con agua destilada durante 30 minutos en agitación, y posteriormente se escaneó.

Los geles en los que se sembraron proteínas marcadas fluorescentemente fueron revelados utilizando un sistema de escaneo *Typhon FLA 9500* de *General Electric*. Los sets de filtros de excitación y emisión utilizados fueron de 532nm y 685nm con un filtro LPG; y los datos fueron obtenidos mediante el software *Typhoon FLA 9500 v1.0* y procesados con el software *ImageQuant TL v8.1*. Para ello se utilizó una lámpara halógena, y utilizando filtros correspondientes se escaneó la imagen.

Para confirmar la identidad de las proteínas que se observaron en los geles, las bandas de interés fueron cortadas y digeridas “in gel” con la enzima tripsina; para luego eluir los péptidos y analizar las masas usando un espectrómetro de masa. Como protocolo de extracción se utilizó una mezcla de ácido fórmico:ACN:Isopropanol:H₂O en proporciones 50:25:15:10 (v:v) a 4°C por 1hr.^{92,93} Luego de extraídos los péptidos se incubaron con la matriz para espectrometría de masas ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA), y se sembraron en la placa. Para los experimentos de espectrometría de masas se utilizó el equipo *MALDI TOF/TOF Analyzer 4800* y la técnica utilizada fue de ionización inducida por láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF-TOF).

Purificación de SP-B y de SP-C mediante RP-HPLC:

Con el objetivo del desarrollo de un nuevo método cromatográfico se realizó una cromatografía de fase reversa en un sistema de cromatografía de alta performance (RP-HPLC), en la que se utilizó una columna *C4 Phenomenex* y dimensiones 150 x 2.00 mm y poro de 300 Å. Para la puesta a punto del método desarrollado se utilizaron proteínas marcadas fluorescentemente con la sonda Alexa-530 y Alexa-660 (proteínas provistas por el Prof. Pérez-Gil, de aquí en adelante denominadas SP-B_{STD} y SP-C_{STD}). Las concentraciones del stock de cada proteína fueron de 58µg/ml (7.2µM) para SP-B_{STD} y 67µg/ml (16.7µM) para SP-C_{STD}. La temperatura a la cual se realizaron todas las corridas fue 23°C y el flujo utilizado fue de 0.5ml/min.

La detección de las proteínas se siguió mediante la medición de absorbancia a 240nm, 280nm (en todas las corridas realizadas), 530nm y 670nm con un detector de arreglo de diodos (DAD, *Agilent 1100*) y con un detector de fluorescencia con λ_{ex} =530nm y λ_{em} =570nm para SP-B_{STD}.

Para realizar la purificación de SP-B_{STD} se utilizó como fase móvil una mezcla Metanol+TFA 0.1%: Agua+TFA 0.1% en relación 80:20, a 23°C y con un flujo de 0.5ml/min. Posteriormente se aplicó un gradiente de 80% a 100% de MeOH + TFA 0.1%. Para realizar la curva de calibración para esta proteína se excitó la sonda a $\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$ y se midió su emisión a $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$. Las concentraciones inyectadas fueron de 58, 11.6, 5.8 y 2.32 $\mu\text{l/ml}$. Además se utilizaron las columnas C8 (100 x 4.6 mm y tamaño de poro 5 μm) y C18 (100 x 4.6 mm y tamaño de poro de 3 μm) con el fin de estudiar la resolución y eficiencia cromatográfica, manteniendo la fase móvil y el gradiente y aplicando un flujo fue de 1.25ml/min, a 23°.

La purificación de SP-C se realizó mediante la columna C4 *Phenomenex* (anteriormente utilizada) aplicando un flujo de 0.5 ml/min a 23°. La fase móvil utilizada estaba compuesta por Metanol:Cloroformo (1:1) y 5% de TFA 0.1M, según el método propuesto por *Bünger et al*⁸⁷. La curva de calibración se realizó inyectando 67, 26.8, 13.4 y 6.7 $\mu\text{l/ml}$ de SP-C_{STD}, y las corridas se monitorearon mediante la absorbancia de la sonda a 670nm.

Con el fin de obtener un patrón característico de elusión de ambas proteínas presentes en una misma muestra a escala analítica, se realizó una mezcla en iguales proporciones de SP-B_{STD} y SP-C_{STD}, y se inyectó en la columna C4 con un flujo de 0.5ml/min y 23°C empleando el método propuesto por *Bünger et al*⁸⁷. Como se vio anteriormente, el método de *Bünger et al* no aportó suficiente capacidad resolutive para separar de manera adecuada a ambas proteínas, por lo cual ha sido necesario el desarrollo de un nuevo método. Inicialmente se comenzó con una fase móvil compuesta por Metanol y agua con 0.1% de TFA y fue necesario variar las proporciones de ambos solventes así como el gradiente entre estos. Además también fue necesario un segundo gradiente de cloroformo/metanol.

A continuación se describe un detalle de los principales parámetros cromatográficos modificados para llegar el método propuesto. En primera instancia se utilizó como fase móvil inicial a una mezcla Metanol+0.1%TFA + H₂O+0.1%TFA en proporciones 90:10 (v/v), a lo que le siguió un gradiente lineal a 100% de Metanol+0.1%TFA (5 minutos) el cual se mantuvo durante 5 minutos y luego se aplicó un gradiente lineal a 100% de Cloroformo+0.1%TFA (en 5 minutos). Para finalizar se aplicó un gradiente lineal de Metanol+0.1%TFA (en dos minutos) (ver gradientes y cromatogramas en *Anexo III*). Posteriormente a esto se variaron las proporciones de Metanol/agua 0.1% TFA a 85:15 y 80:20 (v/v) (ver gradientes y cromatogramas en *Anexo III*)

Además de variar las proporciones de Metanol+0.1% TFA:Agua+0.1% TFA, se modificaron los tiempos de gradiente Metanol+0.1% TFA:Agua+0.1% TFA (*figura A.III*) y finalmente se incluyó período de cromatografía isocrática de Metanol+0.1% TFA por 5 minutos lo que permitió eluir a SP-C.

El método desarrollado para purificar SP-B y SP-C consta de una fase móvil inicial compuesta por una mezcla de Metanol+0.1%TFA + H₂O+0.1%TFA (80:20 v/v) durante 3 minutos, seguida por un gradiente lineal de Metanol+0.1%TFA a 100% (en 5 minutos), que se mantuvo durante 6 minutos. La columna utilizada fue una C4 *Phenomenex* de dimensiones 150x2.0mm y 300 Å de tamaño de partícula; la temperatura de cromatografía fue 23°C, flujo 0.5 ml/min y el setup cromatográfico un HPLC *Agilent 1100* con degaseador, bomba cuaternaria, autosampler, horno de columna, detector DAD y fluorímetro. Para analizar los resultados de cromatografía se utilizó el software *Chemstation*.

La cromatografía a escala semi-preparativa se llevó a cabo en una columna C4 *Vydac* cuyas dimensiones fueron 250x10mm y tamaño de poro 30µm. Para los experimentos se inyectaron 500µl de extracto orgánico pulmonar, y se utilizó el sistema de gradiente tal como se mostró para la cromatografía a escala analítica; con la modificación de los tiempos de inicio, gradiente y mantenimiento a 10 minutos cada uno. El flujo usado fue 2.0 ml/min y la temperatura de columna 23°C, mientras que el sistema cromatográfico utilizado fue el mismo que para la cromatografía analítica.

4. RESULTADOS

4.1 Purificación de las proteínas hidrofóbicas del Surfactante y del tejido pulmonar:

Se caracterizó la capacidad resolutive del sistema de cromatografía preparativo en columna LH-20 para moléculas hidrofóbicas de bajo peso molecular a partir de la utilización de estándares de fosfolípidos y colesterol (*figura 11 a y b*). También se observa el perfil obtenido para una muestra de extracto orgánico (*figura 11-c*). En la *figura 12* se puede ver los espectros de masa de la elusión de los picos de fosfolípidos (a y b) y colesterol (c). Hemos podido identificar masas respectivas a 760.67, 794.67 Da las cuales coinciden con la masa prevista para el valor de los fosfolípidos (Fosfatidilcolina y Fosfatidilserina respectivamente) y 369.50 Da que coincide con el valor promedio de masa para el colesterol. Las fragmentaciones de los fosfolípidos permitieron identificar principalmente DPPC, DOPC, POPC y POPS. En la *figura 13-a* se muestra el cromatograma obtenido al inyectar el extracto orgánico obtenido. A los 24 minutos es posible identificar el pico correspondiente a la elusión de las proteínas hidrofóbicas del SP; mientras que a los 37 y 45 minutos se pueden identificar dos picos correspondientes para los fosfolípidos y el colesterol, respectivamente. A los 64 minutos se ve un pico que no fue identificado. El primer pico fue colectado y re-purificado en las mismas condiciones (*figura 13 b y c*). Finalmente se recolectaron las fracciones I_A, II_B1 y II_B2.

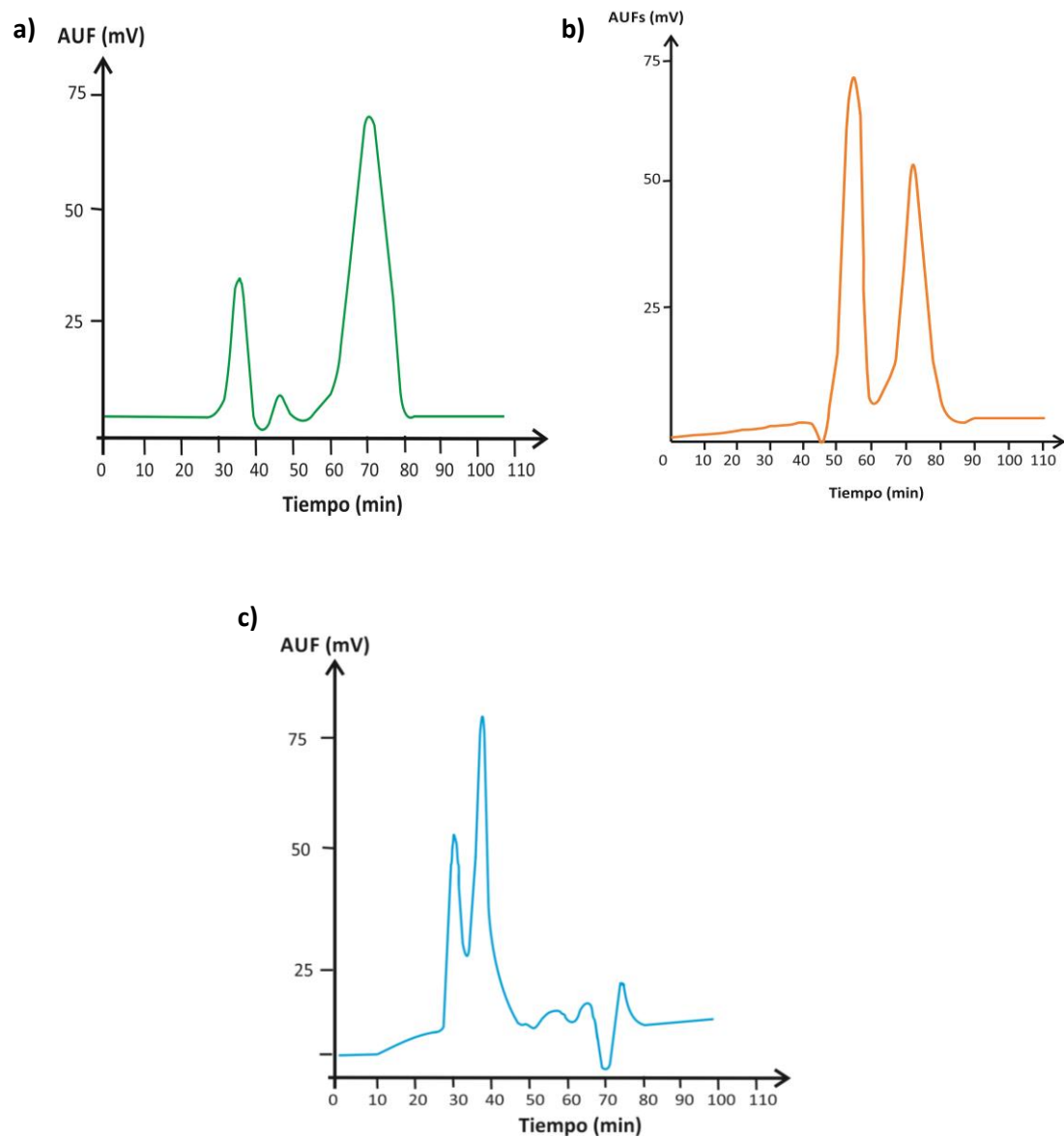


Figura 11: Perfiles cromatográficos para la columna *Sephadex* LH-20. **a)** Estándares de fosfolípidos. **b)** Estándar de colesterol. **c)** Muestra de extracto orgánico.

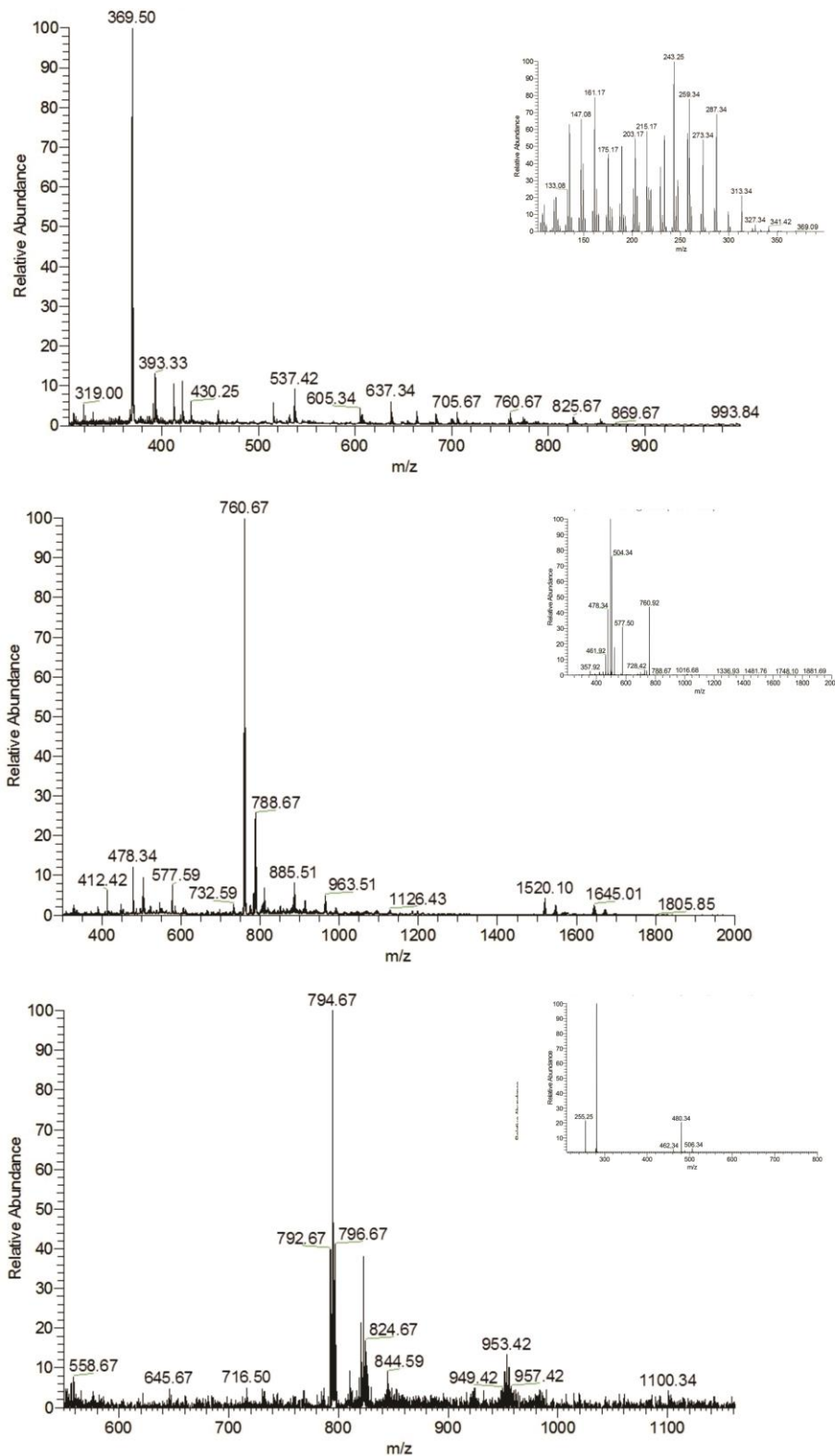
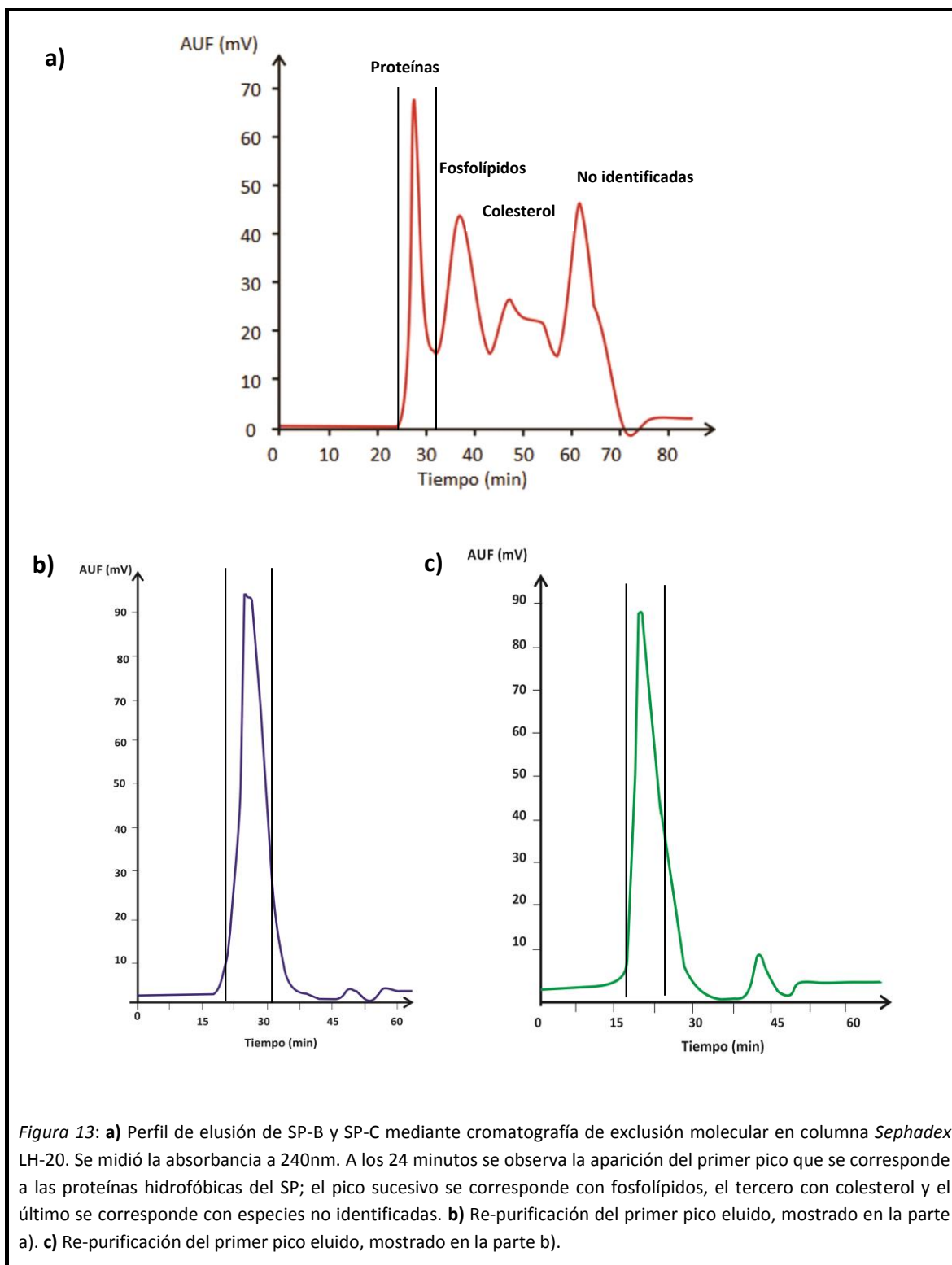


Figura 12: Espectros de masa de colesterol y de fosfolípidos, y la fragmentación del pico mayoritario en cada caso. **a)** Colesterol. **b)** Fosfatidilcolina. Las fragmentaciones identificaron la presencia de DPPC, DOPC, POPC. **c)** Fosfatidilserina con la fragmentación del pico mayoritario (794.67) (POPS).



Posteriormente, como estrategia para la identificación de las masas moleculares de las proteínas se procedió al concentrado de la muestra para correr en un gel de poliacrilamida. En la *figura 14* se puede observar el gel en gradiente de poliacrilamida donde se sembraron las eluciones de la cromatografía de exclusión molecular en LH-20 (fracciones I_A, II_B1 y II_B2). Se pueden ver las bandas que, por comparación con el MPM, se corresponden con proteínas de bajos pesos moleculares, aproximadamente de 14.4 kDa. El tratamiento con β -ME no produjo diferencias significativas en la migración de las bandas.

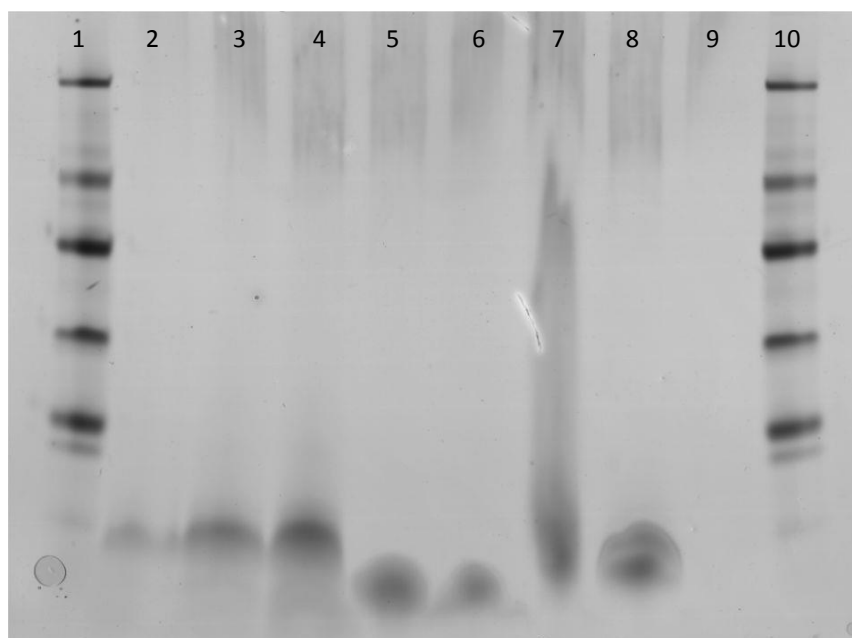
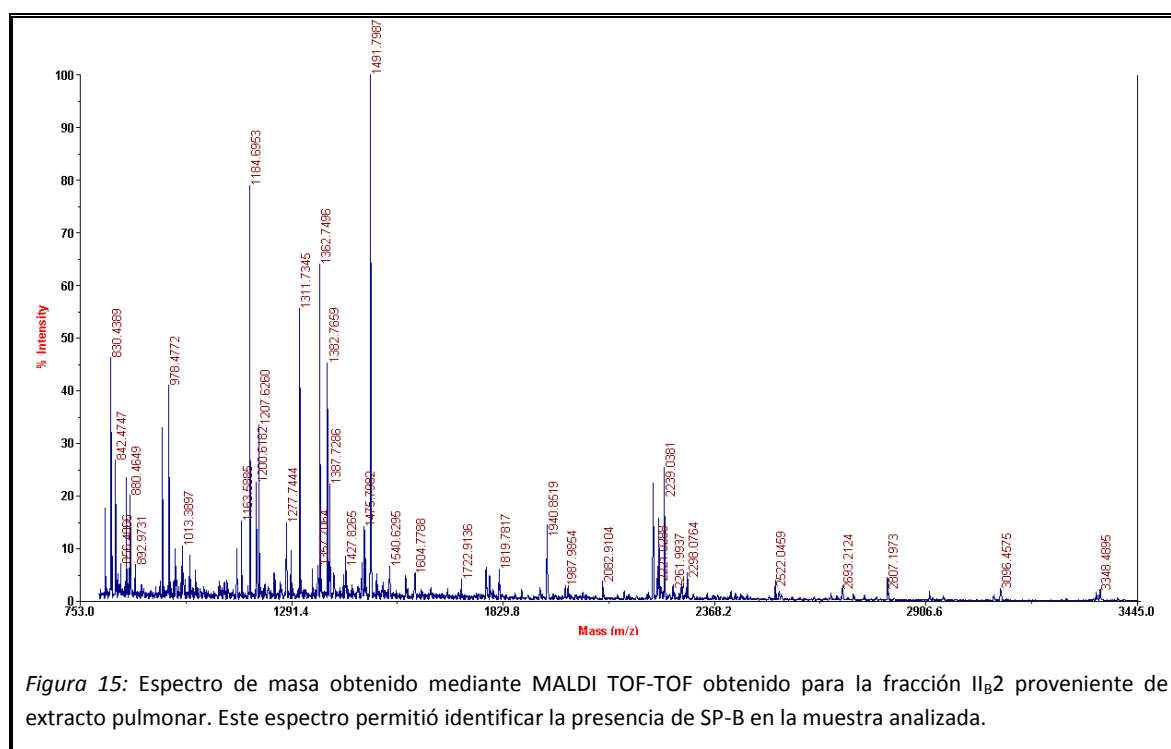
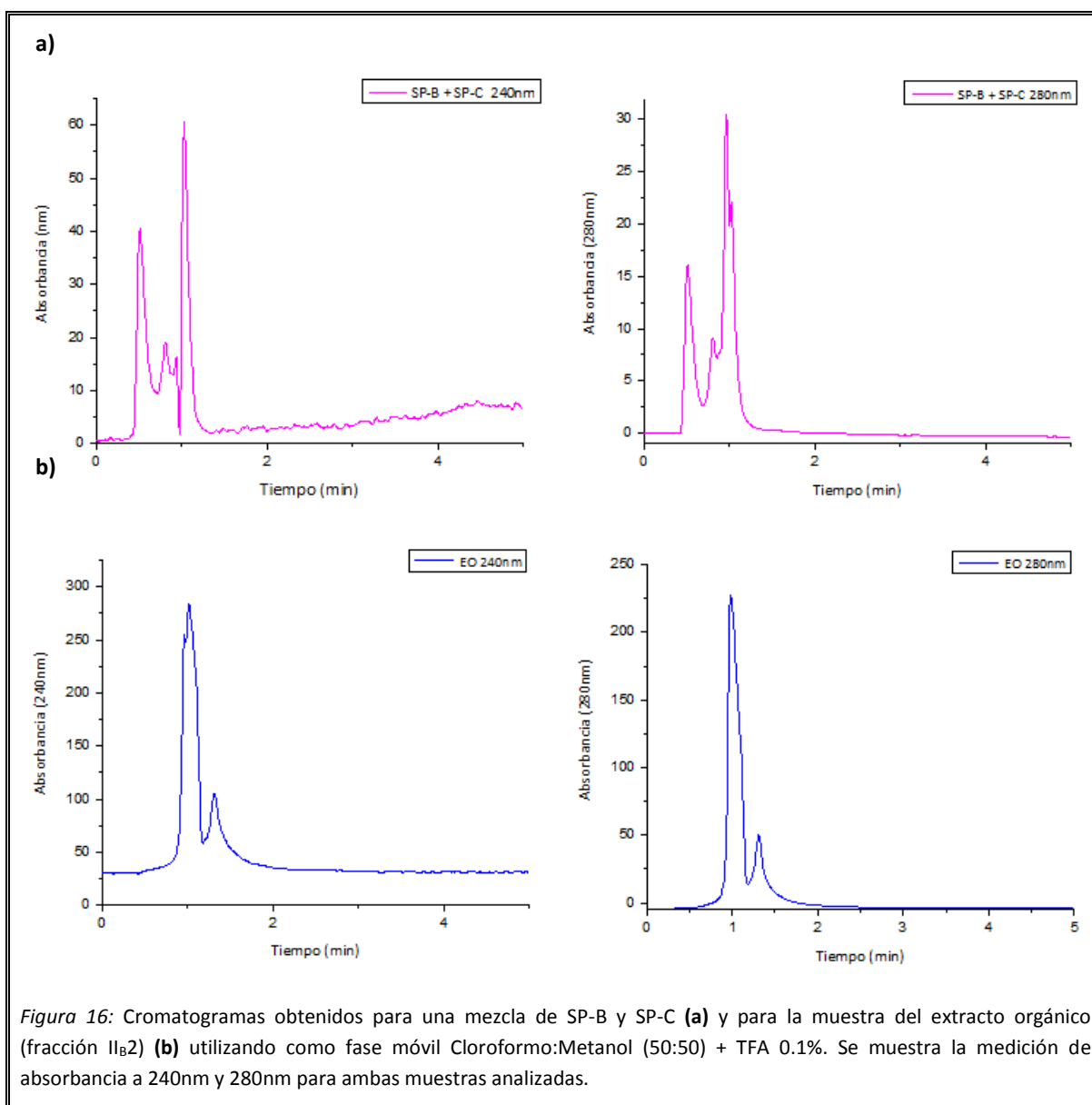


Figura 14: Gel en gradiente de poliacrilamida 4-12%. Carril 1: MPM. Carril 2: Fracción I_A (5 μ l). Carril 3: Fracción I_A. Carril 4: Fracción I_A+ β -ME. Carril 5: Fracción II_B1. Carril 6: Fracción II_B1+ β -ME. Carril 7: Fracción II_B2. Carril 8: Fracción II_B2+ β -ME. Carril 9: vacío. Carril 10: MPM. Se observa que todas las fracciones sembradas migraron como proteínas de bajo peso molecular.

Posteriormente, la banda que se identifica en el gel con la fracción II_B2 (ver *figura 14*, carril 8) fue recortada para ser analizada por espectrometría de masa. Luego de la digestión con tripsina “in gel” y la elusión de los péptidos, se pudo obtener el espectro que se muestra en la *figura 15*, donde se seleccionaron los iones moleculares mayoritarios (962.48, 1184.69, 1362.75 y 1491.80) que se volvieron a fragmentar y se obtuvieron los espectros mostrados en la *figura A.I del Anexo*. Para identificar las proteínas se realizó una búsqueda en la base de datos NCBI con el motor de búsqueda Mascot cuyos resultados se muestran en el Anexo I. Fue posible identificar con significancia estadística la presencia de SP-B porcina en la fracción II_B2.



Con el fin de lograr la separación de SP-B y SP-C se procedió a la realización de una cromatografía de fase reversa previamente descrito por Bünger et al⁸⁷. En la *figura 16*, puede verse un cromatograma tipo de los obtenidos utilizando el método de Bünger y colaboradores, con una fase móvil compuesta por una mezcla de Cloroformo: Metanol (1:1, v/v) y 5% de TFA. Dado la incapacidad resolutive que este método mostró se procedió a la optimización de un nuevo método con aplicabilidad a escala analítica y preparativa.



4.2 Purificación analítica y preparativa de SP-B y SP-C:

Como estándares de las proteínas del surfactante pulmonar se utilizaron proteínas SP-B y SP-C purificadas y marcadas con Alexa Fluor 543 y 660, respectivamente (provistas por el Dr. Jesús Pérez-Gil). En la *figura 17* se muestran los espectros de excitación y emisión de las proteínas, con el objetivo de determinar los máximos de excitación y emisión para cada proteína conjugada con Alexa Fluor. Se obtuvo un máximo de excitación y emisión para la SP-B_{STD} a 540nm y 570nm respectivamente; mientras que para SP-C_{STD} el máximo de excitación se encontró a 670nm y el de emisión a 700nm. Se corroboró la calidad de las proteínas estándares obtenidas a través de un gel de poliacrilamida en gradiente revelado por fluorescencia. La *figura 18* muestra el resultado obtenido, en el que se puede observar la migración de las proteínas marcadas con Alexa-543 y -660 (SP-B_{STD}/verde; SP-C_{STD}/rojo, respectivamente), al mismo tiempo que el efecto de la adición de agente reductor (β -ME). La adición de β -ME produjo un incremento en la migración de SP-B, mientras que para SP-C no mostró cambios significativos.

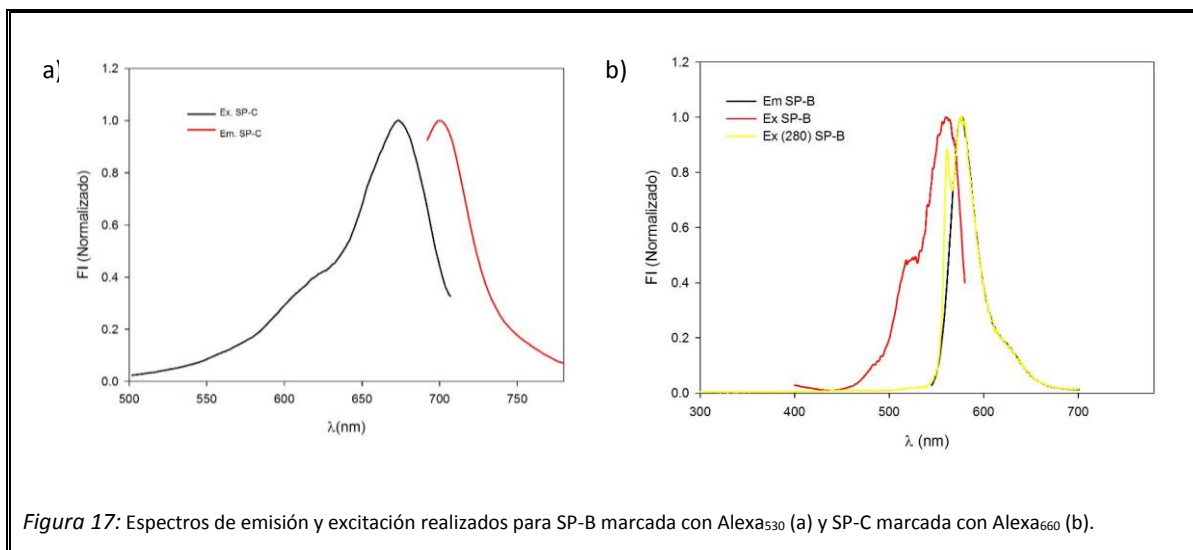


Figura 17: Espectros de emisión y excitación realizados para SP-B marcada con Alexa₅₃₀ (a) y SP-C marcada con Alexa₆₆₀ (b).

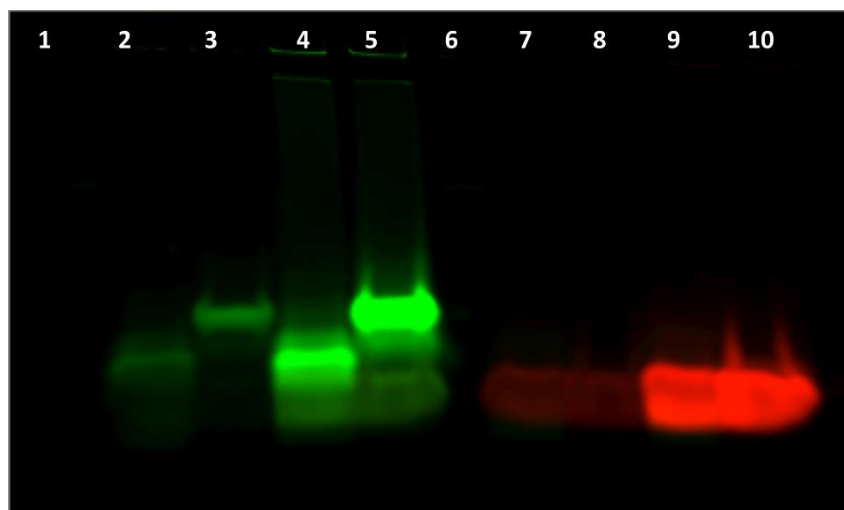


Figura 18: Gel de poliacrilamida en gradiente 4-12%. Carril 1 y 6: MPM. Carril 2 y 4: 10 y 100 μ l de SP-B/Alexa₅₄₀ con BME. Carril 3 y 5: 10 y 100 μ l de SP-B/Alexa₅₄₀ sin BME. Carril 7 y 9: 10 y 100 μ l de SP-C/Alexa₆₇₀ con BME. Carril 8 y 10: 10 y 100 μ l de SP-C/Alexa₆₇₀ sin BME.

Con el fin de caracterizar a las proteínas estándares por espectrometría de masa se realizaron análisis de MALDI TOF-TOF. Para ello se sembró una alícuota de cada proteína sin digerir en una placa, de modo de obtener espectros correspondientes a cada proteína. En la *figura 19 a y b* se presentan los resultados obtenidos, identificándose para SP-B señales correspondientes a m/z 10511 y 21027 Da; y para SP-C señales correspondientes a m/z 4187 y 5012 Da. De esta manera se obtuvieron señales en el espectro correspondientes a la masa de la proteína entera sumada a la masa de la sonda fluorescente correspondiente, tal como se muestra en las figuras. La masa esperable para suma de SP-B-Alexa₅₄₃ es de 9400 y 18800 kDa (aprox.) para su estado de monómero y dímero; y para SP-C-Alexa₆₆₀ es de 4.8 kDa (aprox.).

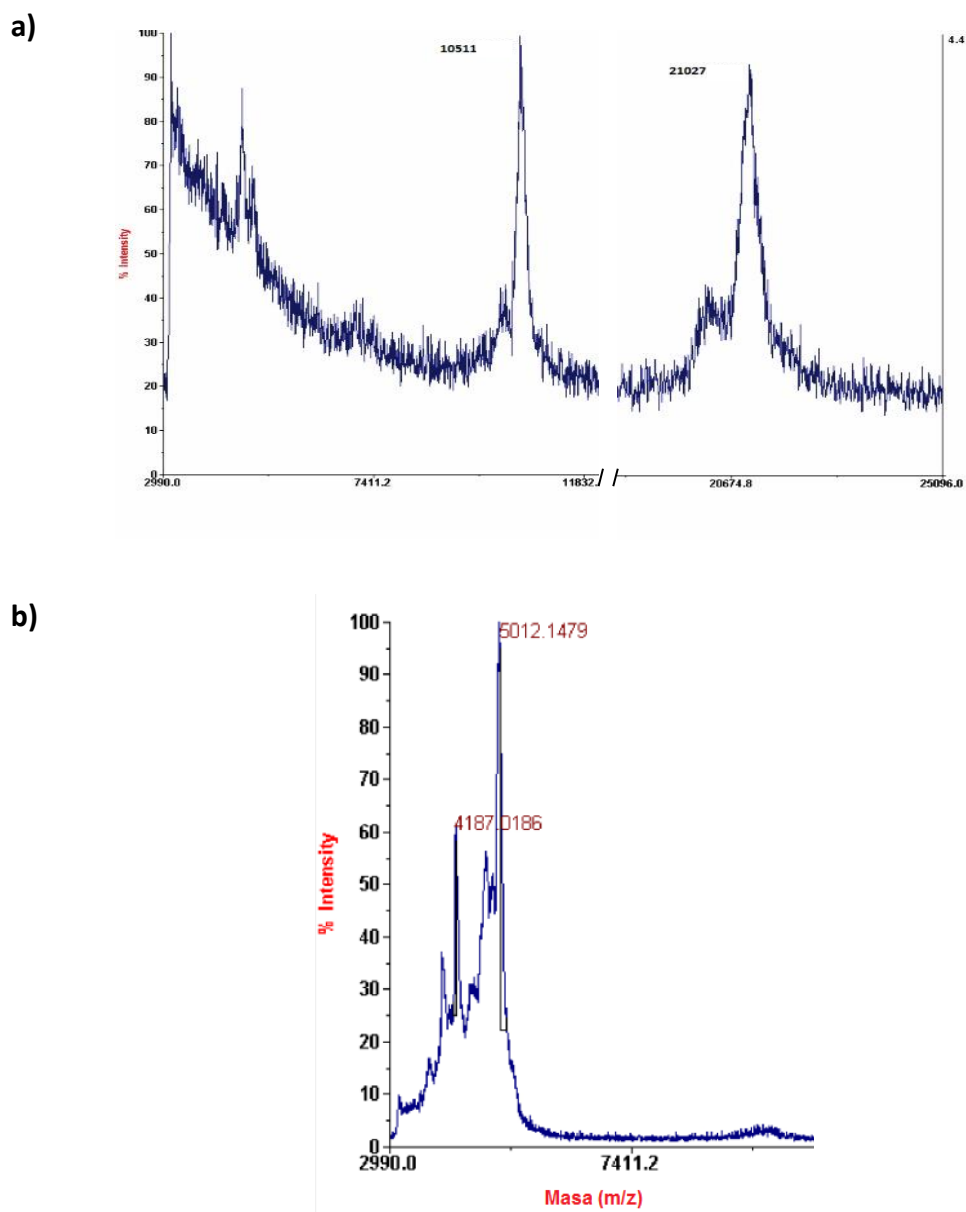
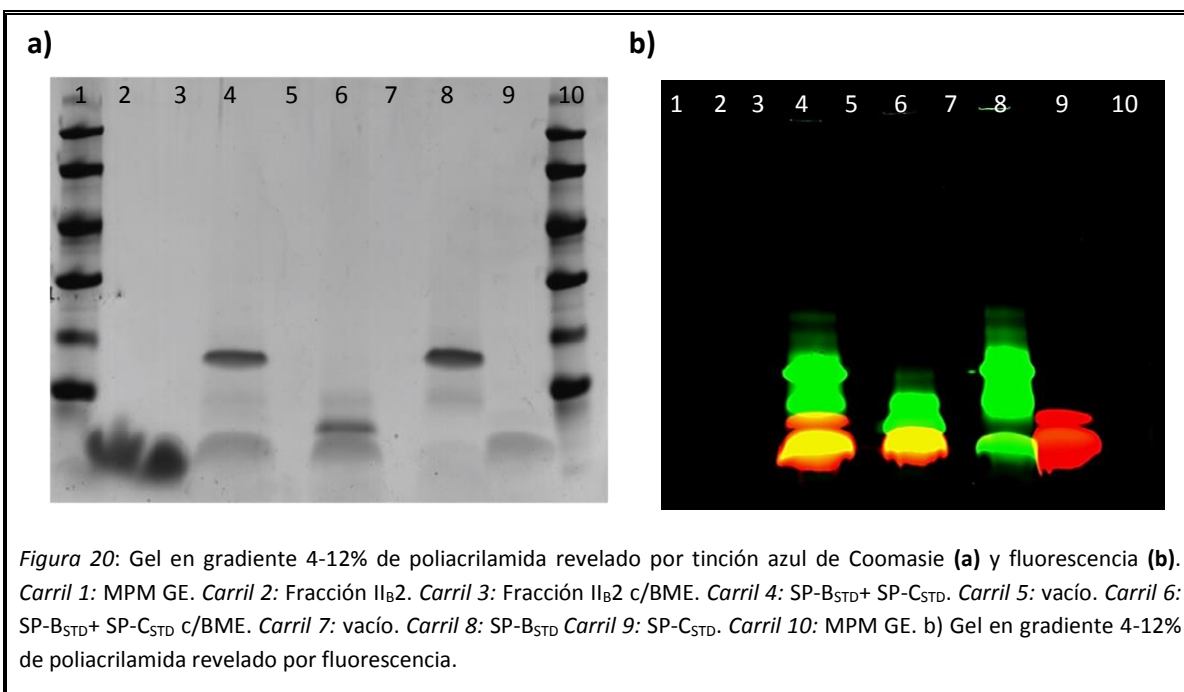


Figura 19: a) Espectro de masa entera para SP-B_{STD}. Picos mayoritarios centrados en 10511.3454 y 21027.6901 Da. **b)** Espectro de masa entera para SP-C_{STD}. Se observan dos picos mayoritarios a 4187.0186 y 5012.1479 Da respectivamente.

Con el fin de identificar el patrón de migración de las proteínas provenientes del extracto pulmonar, se comparó la migración de las proteínas nativas con los estándares puros marcados fluorescentemente. Se realizó un gel en gradiente con las mismas condiciones experimentales que

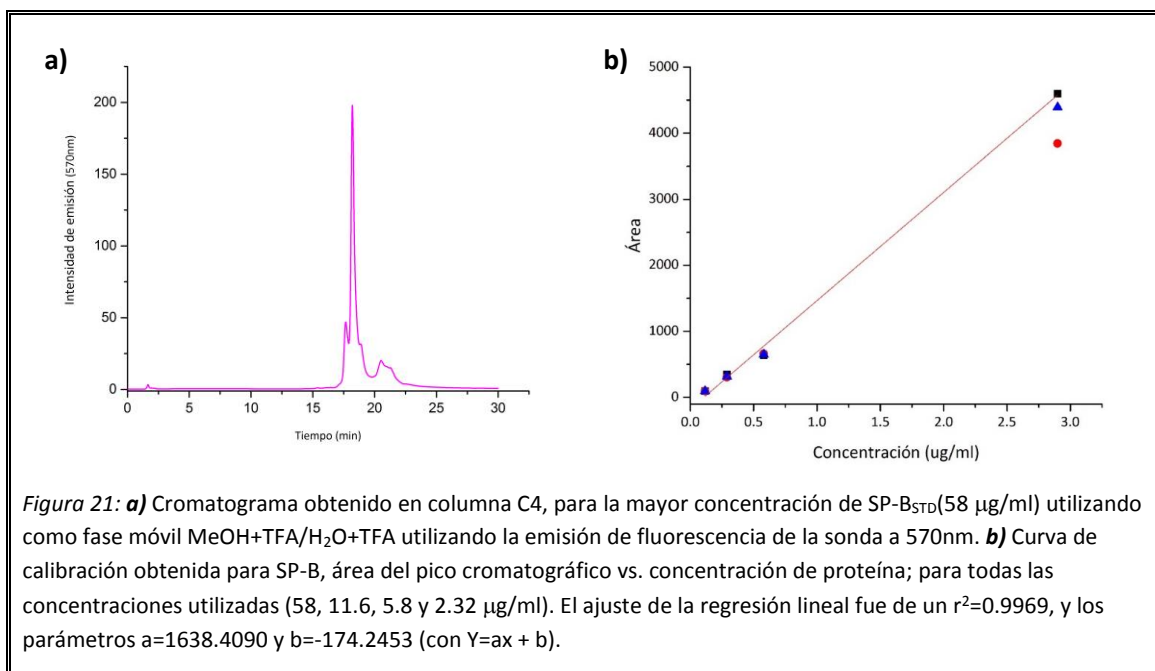
las utilizadas para la *figura 18*, obteniéndose el patrón de migración para las proteínas nativas y marcadas (*figura 20 a y b*).



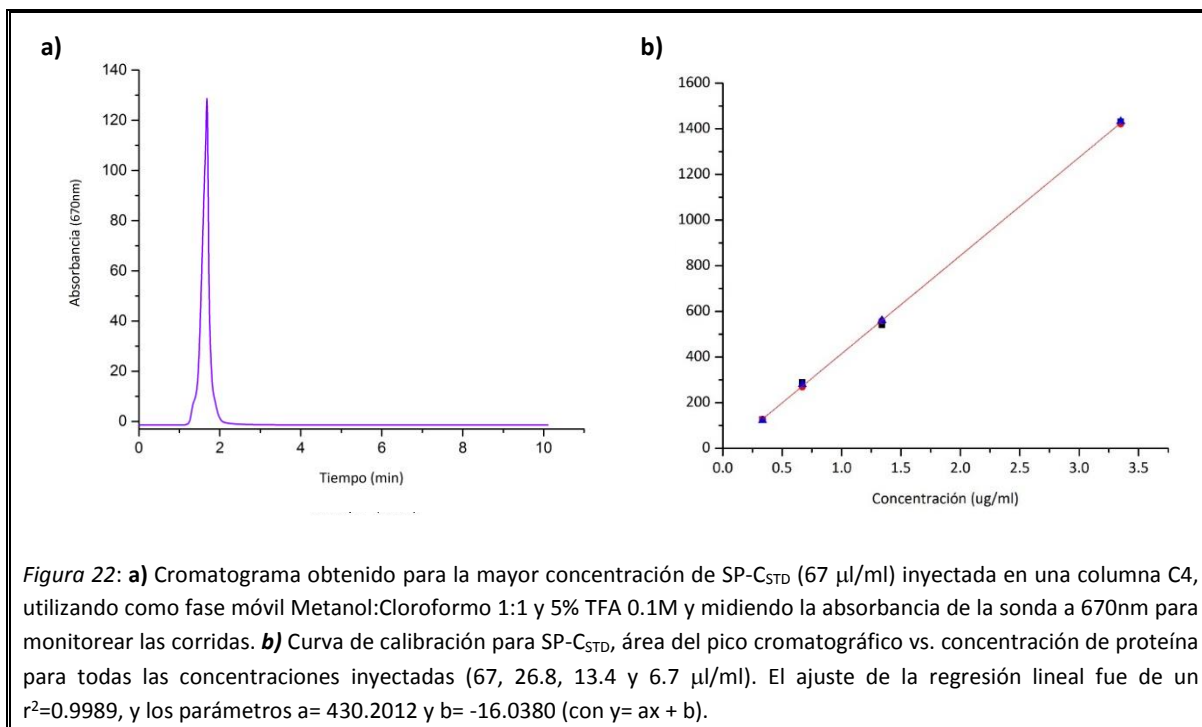
El revelado por azul de Coomasie y fluorescencia muestra que SP-B_{STD} (*Carril 8 y 5*, sin β -ME) presenta tres bandas, mientras que para SP-B incubada con agente reductor (*Carril 6*) se identifica la desaparición de las bandas correspondientes a mayores pesos moleculares. Por otra parte se observa que SP-C_{STD} que co-migra con SP-B, evidenciado por la mezcla de los revelados verde y rojo (Alexa543 y 660) de los *carriles 5 y 6*. Mediante la tinción de Coomasie se identificaron las bandas correspondientes a las proteínas nativas de la fracción II_B2 obtenida de la purificación preparativa (*figura 12*). Se observó una única banda de bajo peso molecular (*Carriles 2 y 3*) con una masa similar a las proteínas marcadas (*Carril 6*). Para la fracción II_B2 el tratamiento con β -ME no tuvo un efecto significativo.

Para separar a ambas proteínas entre sí se procedió a realizar una cromatografía de fase reversa con una columna analítica. Para la puesta a punto de las condiciones cromatográficas se utilizaron las proteínas puras marcadas con las sondas fluorescentes y luego de la optimización del método se utilizó la muestra proveniente del extracto pulmonar de cerdo purificada previamente.

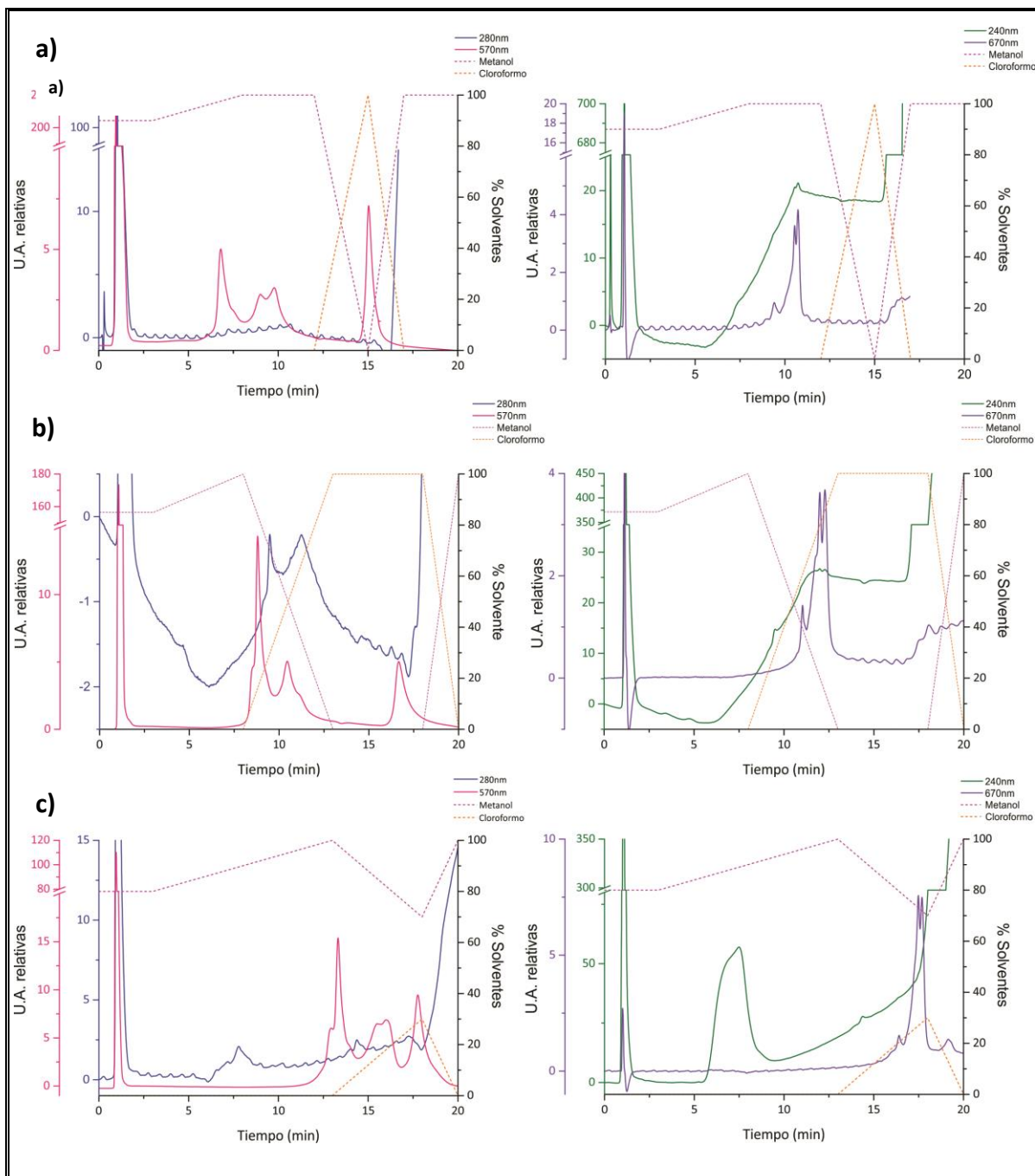
Para valorar la respuesta de nuestro sistema de cromatografía al incremento en la concentración de la muestra se procedió a realizar una curva de calibración para SP-B_{STD}, mostrada en la *figura 21-a*. En la *figura 21-b* se muestra la curva de calibración obtenida al procesar el área debajo de cada pico del cromatograma vs. concentración utilizada.



El estudio de SP-C_{STD} se llevó a cabo utilizando el método propuesto por *Bünger et al 2000m* aplicando una fase móvil compuesta por una mezcla de Metanol:Cloroformo (1:1) y 5% TFA 0.1M (*ver Materiales y métodos*). De igual manera que con SP-B, se procedió a realizar una curva de calibración para esta proteína, con la diferencia de que el menor volumen usado fue de 5µl. Los cromatogramas adquiridos se muestran en la *figura 22 a* y *b* se muestra la curva de calibración obtenida luego de procesar los datos del cromatograma. Se puede apreciar que el pico correspondiente a SP-C_{STD} en cada cromatografía realizada eluyó en un tiempo cercano a 1.5 minutos.



Dado que el método de Bünger et al⁸⁷ no resultó eficiente para la separación de SP-B y SP-C se planteó un nuevo método capaz de purificar a ambas proteínas con mejor resolución y mayor separación entre los picos. Se realizaron corridas cromatográficas para inyecciones de SP-B_{STD} y SP-C_{STD} empleando diferentes condiciones de corrida hasta lograr obtener las condiciones óptimas para la purificación. Las cromatografías se siguieron mediante la emisión de la sonda la 570nm para SP-B_{STD} y la absorbancia a 670nm para SP-C_{STD}; y se obtuvieron los parámetros mostrados en la *Tabla 2*. En la *figura 23* se muestran los cromatogramas obtenidos para las diferentes condiciones empleadas para la inyección de la mezcla de SP-B_{STD} y SP-C_{STD}. Se puede observar que la disminución del porcentaje de H₂O provocó la elusión de las proteínas junto con el volumen muerto. El aumento de tiempo de mantención de Metanol 100% disminuyó el tiempo de retención de ambas proteínas. Se observó también que el gradiente de Cloroformo no era necesario para lograr la elusión de SP-B ni de SP-C. En la *tabla 2* se muestran los parámetros obtenidos en cada corrida mostrada en la *figura 23*.



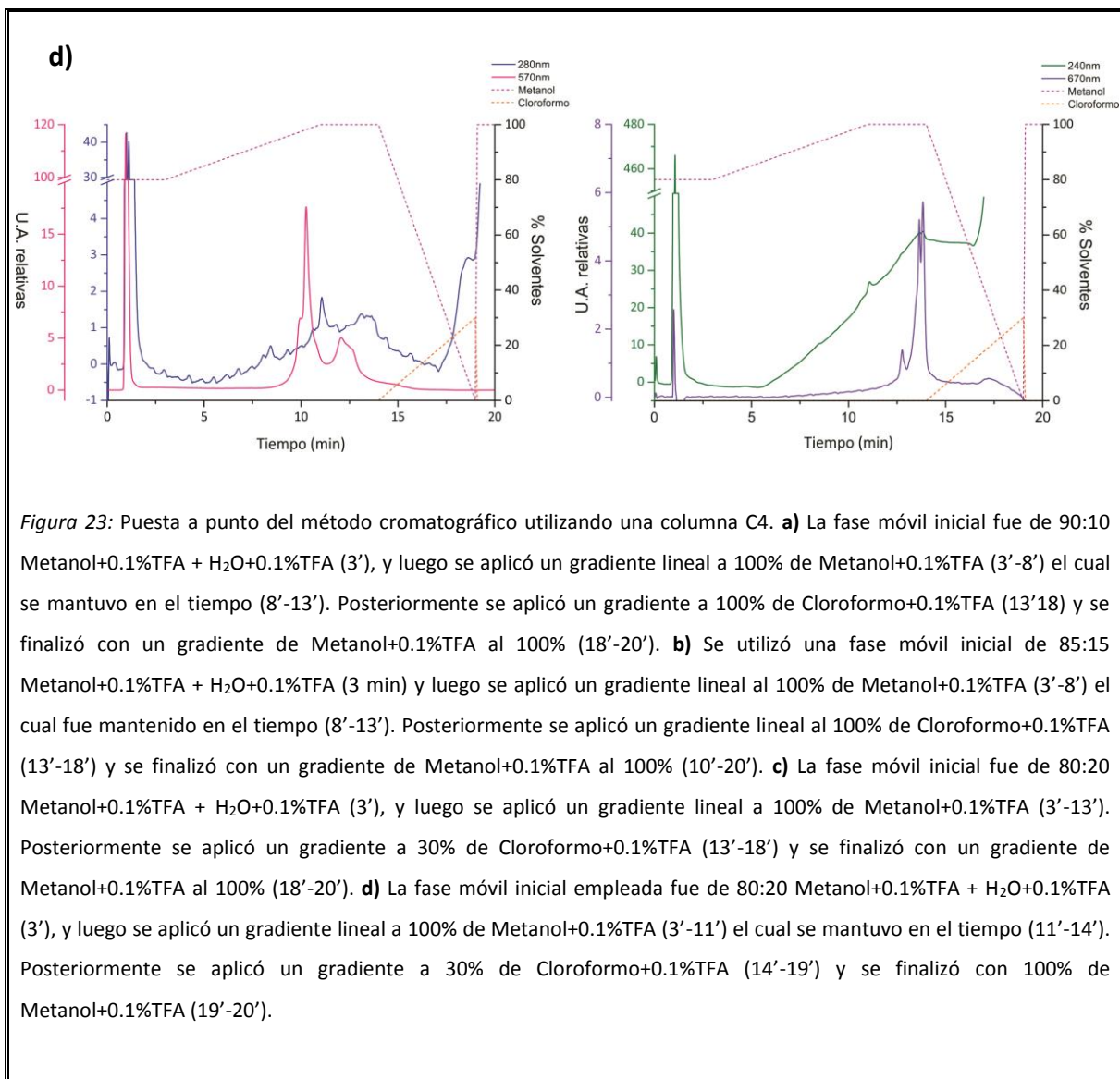


Tabla 2. Datos cromatográficos de la purificación de las proteínas del surfactante pulmonar para $\lambda=570\text{nm}$ y $\lambda=670\text{nm}$.

SP-B					SP-C				
λ_{abs}	t_R	A	S	Δt_R	λ_{abs}	t_R	A	S	Δt_R
570	1.07	1428.5	0.76	6.31	670	1.04	63.30	0.8	9.69
	7.38	81.24	0.71	---		10.73	33.40	0.79	---
570	1.06	1387.7	0.52	7.75	670	1.01	22.50	0.72	10.33
	8.81	142.2	0.59	---		11.34	30.70	0.72	---
570	1.08	943.40	0.58	---	670	1.01	15.18	0.59	16.47
	---	---	---	---		17.48	132.08	3.50	---
570	1.07	955.60	0.58	10.08	670	1.00	13.25	0.54	12.85
	11.13	231.12	0.71	---		13.85	55.53	0.79	---

En la primer fila se muestran los parámetros obtenidos de la cromatografía mostrada en la *figura A.III-a*.

En la segunda fila se muestran los parámetros obtenidos de la cromatografía mostrada en la *figura A.III-b*.

En la tercer fila se muestran los parámetros obtenidos de la cromatografía mostrada en la *figura A.III-c*.

En la cuarta fila se muestran los parámetros obtenidos de la cromatografía mostrada en la *figura A.III-d*.

λ_{abs} : longitud de onda de absorbancia en nanómetros

t_R : tiempo de retención (segundos)

A: área (unidades relativas de Absorbancia)

S: parámetro de simetría

$\Delta t_{R1} = t_2 - t_i$

$\Delta t_{R2} = t_2 - t_1$

Finalmente con las condiciones de corrida óptimas para el sistema en estudio, se realizaron cromatografías inyectando las proteínas estándares de forma independiente y una mezcla de ambas, y posteriormente la fracción II_B2 (ver más adelante, *figura 25*). El cromatograma obtenido para la elusión de cada proteína (*figura 24-a*) muestra que para SP-B hay un primer pico a 1 minuto aprox. (570nm y 280nm) de comenzada la cromatografía, y posteriormente uno de menor intensidad a los 8 minutos aprox. Para SP-C (*figura 24-b*) se observa un pico minoritario que eluye junto con el volumen muerto de la columna, un pico central posterior a los 10 minutos (670nm y 240nm) y uno minoritario cercano a los 9 minutos. En la *Tabla 3* se muestran los parámetros obtenidos para el cromatograma mostrado.

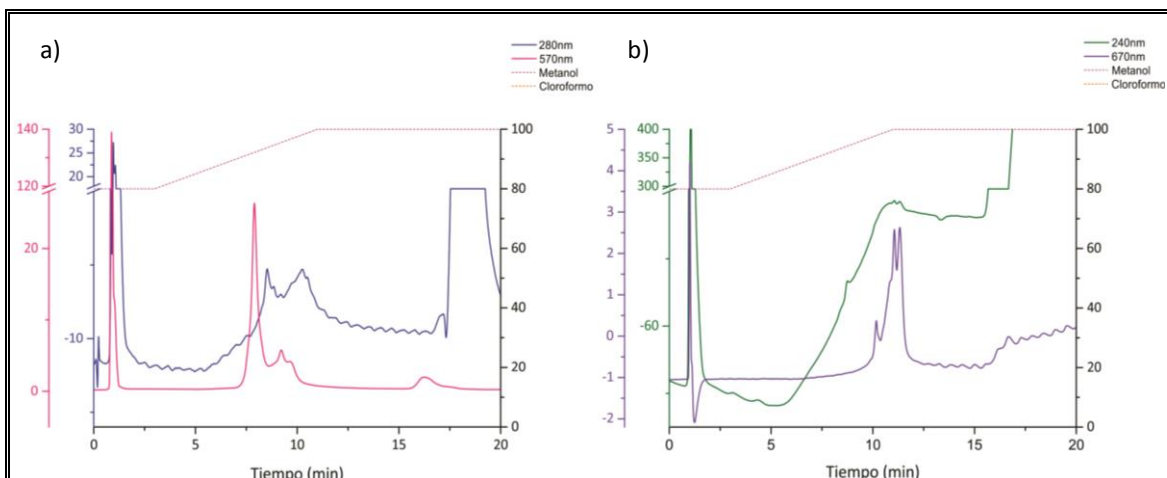


Figura 24: Cromatogramas obtenidos para para SP-B **(a)** y SP-C **(b)** midiendo la absorbancia de la sonda a 570nm y 670nm respectivamente y comparándola con la absorbancia a 280 y 240nm respectivamente; utilizando como fase móvil inicial MeOH+TFA 0.1% : H₂O+TFA0.1% (80:20). Se aplicó un gradiente a 100% de MeOH+TFA0.1% el cual se mantuvo en el tiempo. La elusión mayoritaria de SP-B ocurrió a los 8 minutos y de SP-C a los 11 minutos aprox.

Tabla 3: Parámetros obtenidos del cromatograma mostrado en la *figura 21*, al inyectar una mezcla de SP-B_{STD} y SP-C_{STD} en una columna de fase reversa C4.

λ (nm)	Tiempo de retención	Área	Simetría
240	0.978	---	---
	8.526	60.88	1.66
	10.416	101.62	2.93
670	0.962	20.12	1.24
	9.661	13.20	0.59
	10.416	301.84	2.94
280	0.965	---	---
	8.527	12.29	1.07
570	0.991	955.49	0.74
	8.574	519.91	1.06

Al aplicar el nuevo método propuesto para una mezcla de SP-B_{STD} y SP-C_{STD} en iguales cantidades de obtuvieron los cromatogramas que se muestran en la *figura 25*. Se comparan los cromatogramas obtenidos para SP-B_{STD}(a), SP-C_{STD} (b) y la fracción II_B2 (c) midiendo la absorbancia a 240 (1) y 280nm (2). En la *figura 25-a* 1 y 2 se ve uno pronunciado pico a 1 minuto, como se observó en la *figura 24-a* que se corresponde con la elusión de SP-B y posteriormente cercano a los 8 minutos tanto a 240 como a 280nm. La elusión de SP-C se muestra en la *figura 25-b* 1 y 2; donde se ve un pico inicial a 1 minuto de comenzada la corrida y un de menor intensidad a los 10 minutos; que se observa a 240nm y es casi imperceptible a 280nm. Para la fracción II_B2 (*figura 25-c* 1 y 2) se obtuvo un pico mayoritario a un minuto de comenzada la corrida, tal como ocurrió en a) y b) para ambas proteínas. Para la absorbancia a 240nm también se ve un pico a los 9 minutos aproximadamente, mientras que para 280nm se ve señal a los 9 y 10 minutos respectivamente.

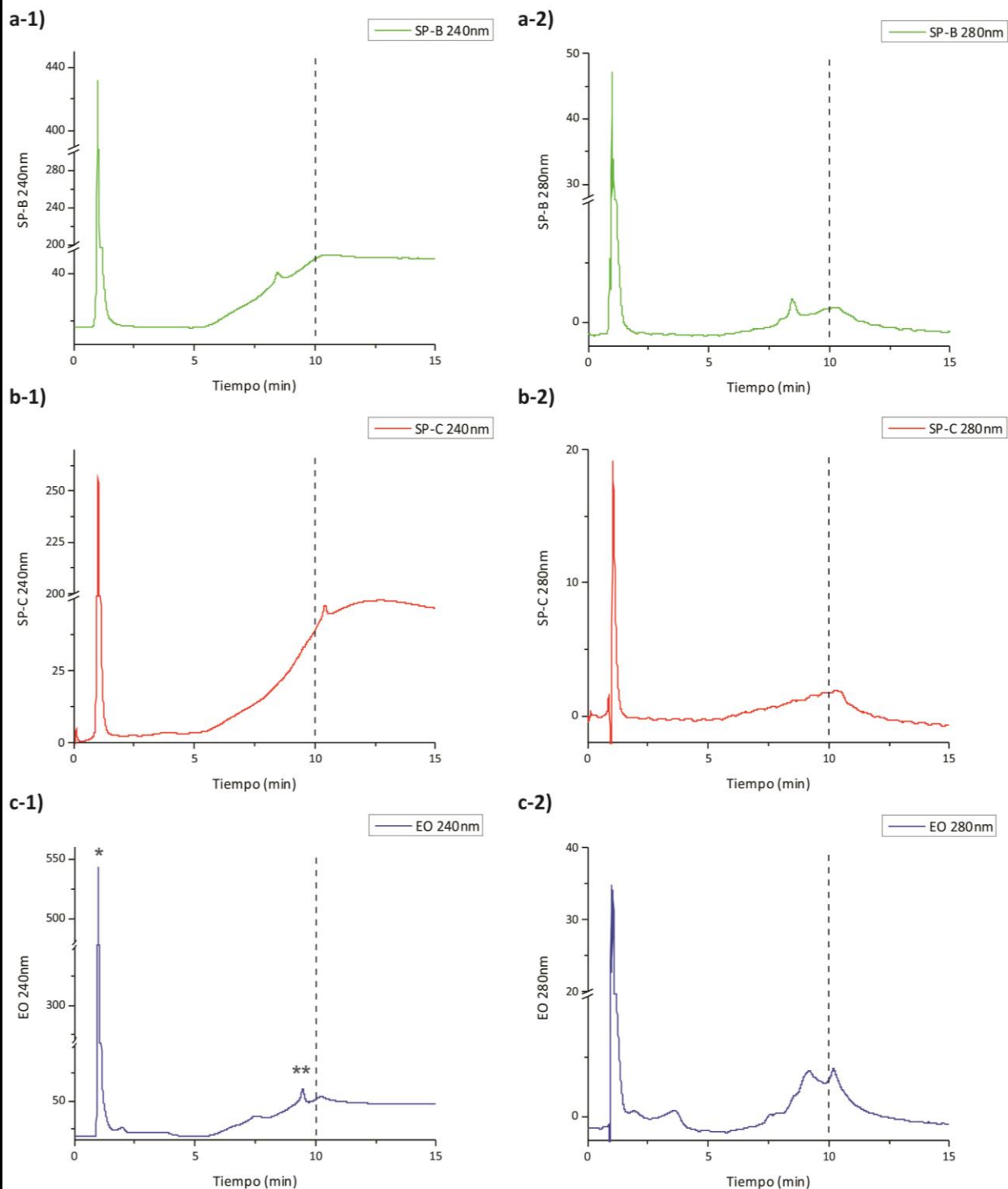
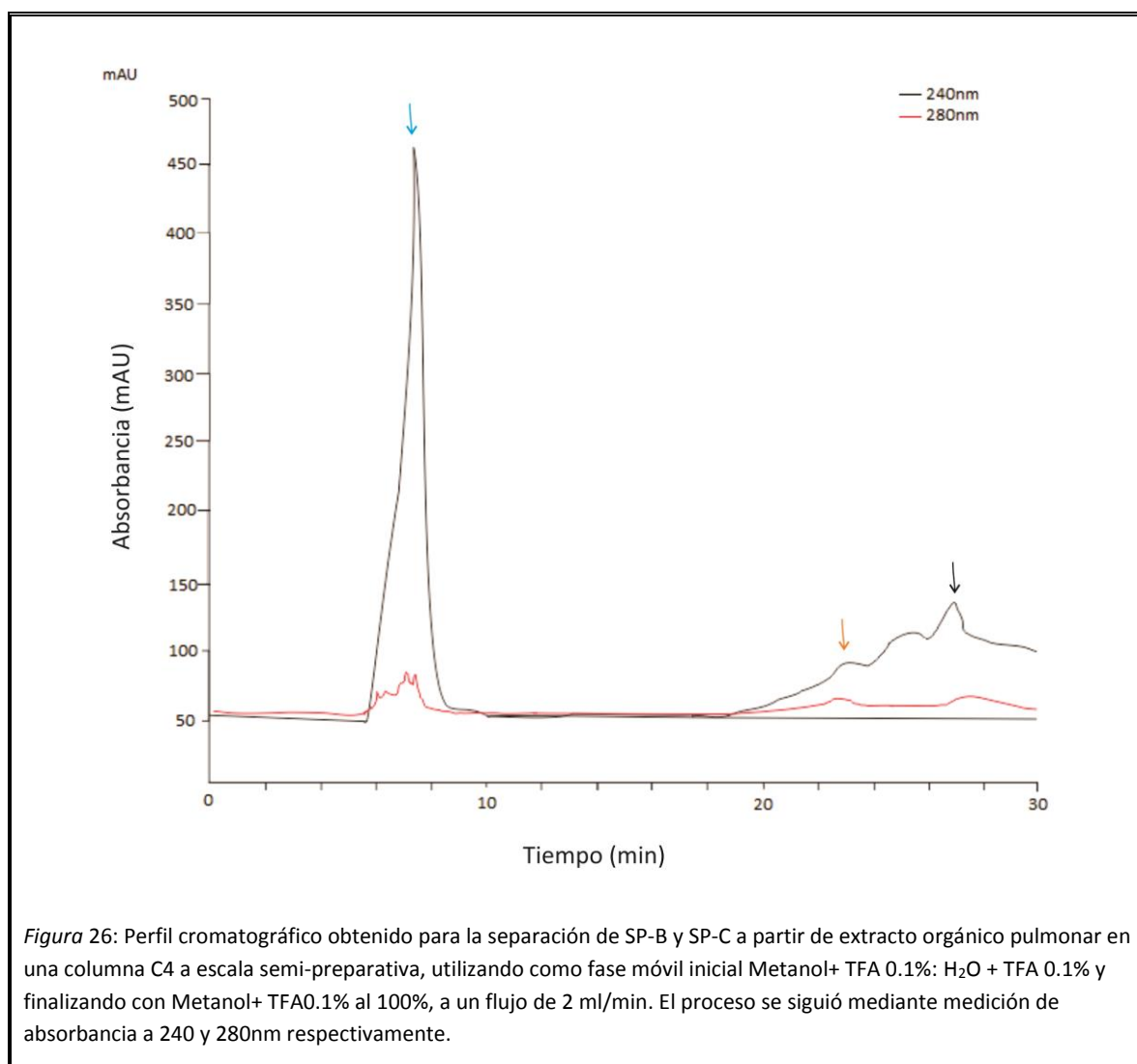


Figura 25: Cromatograma obtenido al inyectar 20 μ l de SP-B_{STD}, SP-C_{STD} y de fracción II_{B2} en una columna C4, utilizando como fase móvil MeOH+TFA 0.1%:H₂O+TFA 0.1% (80:20) y posteriormente un gradiente a 100% de MeOH+TFA 0.1% a un flujo de 0.5 ml/min y una presión de 210barr aprox. En 22-1 se muestran los cromatogramas obtenidos para 240nm y en 22-2 se muestran los obtenidos para 280nm. **a)** SP-B_{STD}. **b)** SP-C_{STD}. **c)** Fracción II_{B2} proveniente del extracto pulmonar.

Posteriormente se realizó la separación de SP-B y SP-C a escala preparativa (*figura 26*) partiendo de una muestra de extracto orgánico pulmonar (sin previa purificación por LH-20). En concordancia con el perfil cromatográfico obtenido para la separación a escala analítica, se observa la aparición de un pico en el volumen muerto de la columna (7 minutos), tanto a 240nm como a 280nm. Avanzada la cromatografía se observó un pequeño pico a 280nm y 240 a los 22 minutos, y posteriormente un pico más pronunciado únicamente a 240nm a los 27 minutos.



Las fracciones eluidas de las cromatografías realizadas a escala analítica y preparativa se sembraron en un gel en gradiente, cuyo resultado se muestra en la *figura 27*. Se sembraron los picos marcados en la *figura 25-c1* (*, **) y en la *figura 26* (minutos 7↓, 21↓, 27↓).

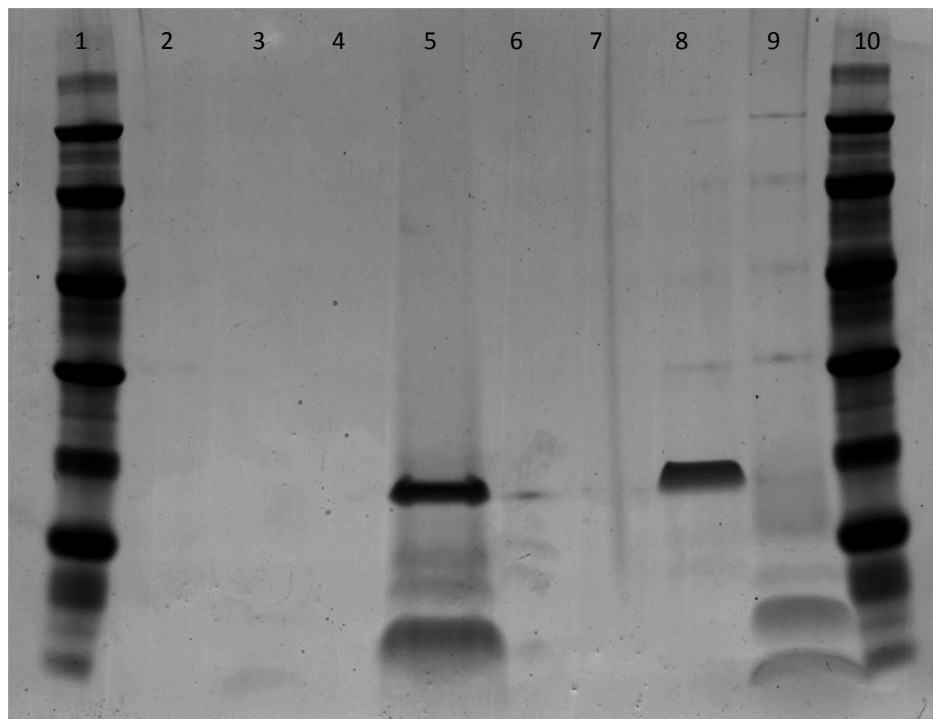


Figura 27: Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente 4-12%. Carril 1:MPM. Carril 2: elución de $t= 1\text{min}$ aprox. de la cromatografía mostrada en la *figura 22-c*. Carril3: elución de $t= 9\text{min}$ aprox. de la cromatografía mostrada en la *figura 22-c*. Carril 4: Vacío. Carril 5: SP-B_{STD}+SP-C_{STD}. Carril 6:Vacío. Carril 7: elución de $t= 7\text{min}$ aprox. de la cromatografía mostrada en la *figura Carril 8: elución de $t= 21\text{min}$ aprox. de la cromatografía mostrada en la figura 23. Carril 9: elución de $t= 27\text{min}$ aprox. de la cromatografía mostrada en la figura 23. Carril 10: MPM*

El resultado obtenido muestra para las muestras provenientes de la cromatografía preparativa la presencia de una banda intensa (*carril 8*) que co-migra con la banda de SP-B_{STD} (*carril 5*); y dos bandas (*carril 9*) que co-migran con la banda correspondiente SP-C (*carril 5*). Las siembras correspondientes a la cromatografía realizada a escala analítica generaron una única banda (*carril 3*) casi imperceptible.

5. DISCUSIÓN

Para la obtención de las proteínas hidrofóbicas del surfactante pulmonar fue necesario purificar a las mismas presentes en el tejido pulmonar y el LBA, lo cual se realiza clásicamente por extracciones orgánicas. Dichas extracciones fueron exitosas ya que se logró generar un sistema de dos fases y extraer únicamente la fase clorofórmica. Para excluir a los componentes lipídicos de la fracción proteica, la muestra fue separada a través de una columna de exclusión molecular *Sephadex LH-20*, permitiendo obtener las proteínas en el volumen muerto de la cromatografía. Este sistema de cromatografía está basado en una hidroxipropilación de una resina convencional *Sephadex G-25*, lo cual permite la utilización de solventes orgánicos.

Previamente *Hall et al.*⁹⁴ han demostrado que esta cromatografía permite la separación y purificación de proteínas, fosfolípidos y colesterol en tiempos crecientes de retención. Para validar esto y ajustar los tiempos de retención en nuestro sistema recurrimos a el uso de estándares de cromatografía para los lípidos y análisis por espectrometría de masas de las fracciones eluidas de las muestras de extracto de surfactante pulmonar (*figura 11*). De los resultados de espectrometría de masas es posible identificar a alguno de los fosfolípidos mayoritarios del SP (tal como DPPC, DOPC, POCP y POPS), así como del colesterol (*figura 12*).

En la *figura 11* se pueden identificar los tiempos de retención para los estándares y en la *figura 13* puede verse los cromatogramas obtenidos a partir de la cromatografía de exclusión molecular LH-20 donde se observa que se logró separar satisfactoriamente a SP-B y SP-C del resto de los componentes lipídicos. La aparición de un pico agudo permitió inferir que se correspondía con la elusión de las proteínas de interés, ya que coincidió con los resultados publicados previamente.⁹⁴ Las re-purificaciones fueron realizadas con el fin de eliminar toda contaminación de lípidos de la fracción obtenida (I_A). La aparición de dos picos luego de la segunda purificación testifica que la re-purificación resultó exitosa y necesaria. El hecho de haber re-purificado permitió que la fracción con la que se trabajó posteriormente (II_{B2}) estuviera libre de lípidos, facilitando en cierto grado los análisis ulteriores y logrando que la purificación proteica fuera eficiente.

Si bien la estrategia de re-purificación de las proteínas en la columna LH-20 eliminó la interferencia de los lípidos, la hidrofobicidad de las proteínas en estudio dificultó el procesamiento de la muestra en cada experimento realizado, debido a que las metodologías desarrolladas están

concebidas para sistemas hidrofílicos. Por dicho motivo hubo que poner a punto las condiciones experimentales para cada técnica utilizada; especialmente en las corridas electroforéticas donde la hidrofobicidad de las proteínas dificultó su migración en el gel. Con el fin de solucionar dicho inconveniente se realizaron varios geles con diferente porcentaje de poliacrilamida y diferentes buffer de carga. Se observó que al variar únicamente el porcentaje de poliacrilamida (y manteniendo el mismo buffer de carga) no mejoraba la entrada de las proteínas al gel ni tampoco su migración; por lo cual se propuso variar el buffer de carga especial para nuestras proteínas. Se incrementaron los niveles de SDS a 20% y se adiciono además un detergente no iónico como CHAPS (10%). Esto mejoró las condiciones ingreso al gel y migración de la muestra para una resolución satisfactoria en un gel en gradiente.

El resultado obtenido en la electroforesis en gel en gradiente 4-12% mostrada en la *figura 14* muestra únicamente bandas de bajo peso molecular, tal como se esperaba (3.7 y 8.7 kDa para SP-C y SP-B monomérica respectivamente). La presencia de una única banda en cada carril demuestra la co-migración de las proteínas presentes en las fracciones sembradas, lo que puede deberse a las interacciones que presentan SP-B y SP-C entre sí cuando se encuentran en la misma solución. La co-migración evidencia que el porcentaje de poliacrilamida utilizado no es suficiente para lograr separar ambas proteínas entre sí, por lo cual debería ser necesario aplicar otras técnicas que permitan su purificación. Para la SP-B no se identificó una segunda banda de mayor peso molecular, debido a que el buffer de carga utilizado poseía DTT. Dicho motivó llevó a eliminar la presencia de DTT del buffer de carga para los geles realizados posteriormente de forma de lograr evidenciar la presencia de SP-B dimérica. La presencia de “smear” observada en el gel muestra en menor grado la dificultad que implica realizar la electroforesis para estas proteínas.

A partir de la digestión con tripsina y posterior análisis de los fragmentos peptídicos de la banda recortada del carril 8 (*figura 14*, fracción II_B2) mediante la técnica MALDI TOF/TOF, se pudo identificar a la SP-B. El espectro obtenido (*figura 15*) muestra las señales correspondientes a la masa de los péptidos y fragmentos, para la SP-B porcina de forma significativa (ver *Anexo*). No se logró evidenciar la presencia SP-C, lo cual sea probablemente debido a su baja concentración en la fracción obtenida del extracto orgánico.

Para la purificación preparativa de la SP-B y SP-C, *Crustedt et al*⁸⁵ ha propuesto un método utilizando una columna de exclusión molecular *Sephadex* LH-60 la cual requiere la previa purificación utilizando la columna LH-20. En 1988, *Arjomaa et al*⁸⁶ propusieron un método

analítico de separación de SP-C mediante HPLC en fase reversa, utilizando para equilibrar la columna acetato de amonio (pH 6.5) y aplicando un gradiente lineal de 1-propanol 0-80%, el cual no resultó efectivamente exitoso. Posteriormente, *Gustafsson et al*⁴⁵ propuso otro método para lograr la purificación de SP-B y SP-C a escala analítica utilizando como fase móvil inicial Isopropanol+TFA 0.1%. Este método pese a mostrar resultados alentadores no fue utilizado debido a las elevadas presiones que genera dicho solvente en el sistema cromatográfico y además por el tiempo de corrida. No existiendo referencias sobre su aplicabilidad a sistemas preparativos. *Bünger et al*⁸⁷ desarrolló un método diferente a los anteriores, utilizando una cromatografía de fase reversa y una fase móvil compuesta fundamentalmente por Metanol: Cloroformo en proporciones 50:50% v/v y acidificados con TFA. El método permitía la elusión en un corto período de tiempo (5 minutos) a escala analítica y semi-preparativa; por lo cual inicialmente se pretendió usar dicho método o variaciones del mismo. Lamentablemente no se obtuvo una separación con buena resolución entre las proteínas hidrofóbicas (*figura 16*); por lo que se procedió al desarrollo de un nuevo método capaz de purificar a SP-B y SP-C a escala analítica y preparativa.

Para lograr desarrollar un nuevo método cromatográfico eficiente para la purificación de SP-B y SP-C se utilizaron a modo de estándares las proteínas puras marcadas con sonda fluorescente (SP-B/Alexa₅₄₃ y SP-C/Alexa₆₆₀). Se realizó una corrida electroforética para SP-B_{STD} y SP-C_{STD} (*figura 18*), la cual muestra claramente como la presencia o ausencia del agente reductor hace variar el estado oligomérico de SP-B, pasando de estar en su forma dimérica a la monomérica. Este resultado infiere que en el stock de SP-B_{STD} esta proteína se encuentra en su forma mono y dimérica, aunque la segunda estaría en mayor proporción (evidenciado por la presencia de una banda mayoritaria en el *Carril 5*; *figura 18*). La presencia de agente reductor para SP-C_{STD} no modificó su patrón de migración, lo cual era previsible ya que esta proteína existe únicamente en forma de monómero y no es esperable una reducción de los enlaces tioéster de sus palmitoilos.

Los estándares de cada proteína presenta el color característico a la luz visible de las sondas (rosado para SP-B y lila para SP-C), lo que permitió identificar que estas proteínas luego de tratadas con tripsina en los geles no eluían con el tratamiento convencional de ACN: Agua 60/40 (v/v). Por dicho motivo fue necesaria la utilización de nuevos protocolos de extracción: ACN 100%, ACN: Isopropanol (50:50), Isopropanol: Ácido fórmico (90:10) e incluso Cloroformo: Isopropanol (50:50); pero en ninguno de estos procedimientos se tuvo éxito. Finalmente se utilizó una mezcla

de Ácido fórmico: ACN: Isopropanol: H₂O (50:25:15:10) propuesta por *Feick et al*⁹³ para péptidos hidrofóbicos en gel, la cual logró la liberación de los mismos para su posterior análisis de espectrometría de masas.

En la *figura 19 a y b* se muestran los espectros de masa entera obtenidos para la siembra directa de las proteínas puras marcadas fluorescentemente. En la *figura 19-a* se aprecian dos señales mayoritarias para SP-B_{STD} (10511 y 21027 Da aproximadamente), que junto con el resultado mostrado en la *figura 18* permite afirmar que SP-B_{STD} está bajo su forma de monómero y dímero. En la *figura 19-b*, se pueden ver dos señales mayoritarias de SP-C (4187 y 5012 Da aproximadamente). Esta proteína se presenta únicamente en su forma de monómero (en concordancia con el resultado obtenido para la *figura 18*), por lo que las señales se corresponden a la proteína marcada con la sonda y sin marcar, ya que la diferencia entre ambas es el peso de la sonda Alexa₆₆₀ (1100 Da aproximadamente).

La co-migración de ambas proteínas es evidente en el gel en gradiente como puede verse en la *figura 20*, lo que se aprecia de manera inequívoca por el revelado por de la fluorescencia. Además es posible identificar otras bandas de menor intensidad entre la forma mono y dimérica, así como por encima de la masa molecular de la forma dimérica. Esto puede deberse a la combinación de proteínas no marcadas y multi-marcadas con la sonda fluorescente que genera una modificación de masa de aproximadamente 1 kDa por cada adición. La *figura 19-a* no es totalmente concluyente en esta hipótesis, pero es posible ver unos picos menores en masa a los mayoritarios para la forma mono y dimérica, que podrían explicarse por la alternancia en el marcado de la proteína.

Los resultados de la migración de la fracción II_B2 indican la presencia de la proteína SP-B en su estado monomérico mayoritariamente; y es esperable que sea la responsable de la mayor intensidad de la banda, dado que se encuentra habitualmente en una relación 10:1 con respecto a la SP-C. Dado los resultados que se obtuvieron para las proteínas marcadas fluorescentemente, es esperable la presencia de una única banda para SP-B y SP-C debido a la escasa capacidad resolutive que presenta el gel en gradiente para estas proteínas.

Para el desarrollo de un nuevo método cromatográfico que permita obtener una separación eficaz de SP-B y SP-C, se hizo un estudio previo de las características de elusión de cada proteína.

Las cromatografías realizadas para SP-B (*figura 21*) mostraron que es necesaria la presencia de un porcentaje de agua (20%) en Metanol (80%) para que esta proteína logre adherirse a la

columna. Esta relación debe mantenerse, ya que experimentalmente se vio que un menor porcentaje de agua favorece su elusión junto con el volumen muerto, y un porcentaje superior favorece su precipitación. La presencia de un pico anterior al pico principal de elusión de SP-B puede corresponderse con la especie monomérica de esta proteína, lo cual se explica por la menor hidrofobicidad y fuerzas de adhesión a la columna que presenta frente a la forma dimérica (*figura 21 a y b*). Los picos que se identifican después del pico mayoritario asociado a la forma dimérica (aprox. 18 minutos) podrían deberse, tal como se mencionó anteriormente, a formas mono y multi-marcadas de la proteína, así como combinaciones de subunidades con diferente número de marcas.

Para la purificación de la SP-C fue necesario superar algunos aspectos técnicos en el sistema de detección del equipo utilizado. Particularmente, la lámpara halógena y el fotomultiplicador (PMT) que posee el detector del HPLC *Agilent 1100*, tiene una caída en sus respuestas de iluminación y detección para longitudes de onda mayores a 650nm (ver catálogo de fabricante). Por dicho motivo la proteína marcada con Alexa-660 no lograba ser efectivamente excitada a 670nm y la respuesta del PMT resultaba ser extremadamente pobre a 700nm. Esto llevó a decidir utilizar la absorbancia de la sonda a 670nm para monitorear la cromatografía.

Para la purificación de la SP-C_{STD} luego de intentos fallidos con diferentes mezclas de Cloroformo: Metanol, así como diferentes gradientes; se logró su purificación en una columna C4 mediante la utilización del método de *Bünger et al*⁸⁷. La identificación del estándar de SP-C no resuelve lo que previamente hemos demostrado a la co-elusión de ambas proteínas en el método propuesto por *Bünger* y sus colaboradores, por lo cual se propuso un nuevo método que mejora la resolución y separación de ambas proteínas mediante cromatografía en fase reversa.

En la puesta a punto del método cromatográfico se modificaron las proporciones de Agua: Metanol: Cloroformo, así como los tiempos de gradiente y espacios estacionarios. Particularmente, fue necesario el incremento el porcentaje de agua inicial para retener suficientemente a ambas proteínas y al mismo tiempo separarlas entre sí. Luego de un gradiente lineal de metanol 80 a 100% en 10 minutos, es necesario un período de cromatografía en modo isocrático a 100% de Metanol para eluir a SP-C y sin la necesidad de incluir cloroformo en el sistema. Los cambios cromatográficos y las variaciones en los parámetros pueden ser observados en la *figura 23* y *tabla 2*.

Para la optimización de las condiciones cromatográficas las proteínas marcadas permitieron trabajar de manera independiente con cada una de ellas buscando un sistema óptimo que permitiese separar a ambas proteínas sin la necesidad de una cromatografía de exclusión molecular previa. Para esto se intentó primeramente eluir SP-B cerca del volumen muerto y retener a SP-C con un porcentaje de agua que no indujera la precipitación de las proteínas. Los porcentajes menores al 20% de H₂O+0.1%TFA no fueron eficientes para separar a ambas proteínas; y además era necesario incluir una breve gradiente de Cloroformo+0.1%TFA con el fin de eluir a SP-C (*figura 23*). Sin embargo, luego de varias pruebas de gradientes y mantenimiento de metanol isocrático tras un gradiente lineal, fue posible identificar que SP-C eluía independientemente de la presencia de cloroformo, por lo cual se varió finalmente la cromatografía que se observa en la *figura 23-d* al patrón que se propone en la *figura 24*, donde SP-B y SP-C eluyen a tiempos de retención razonable y sin solapamiento.

Del análisis de los resultados en la puesta punto de la purificación de SP-B y –C se desprende que los estándares de las proteínas no fueron un sistema completamente puros, lo que dificultó enormemente la puesta punto del método. Esto pudo haberse debido a la presencia de monómero y dímeros para SP-B (tal como se revela en el gel de la *figura 21*), así como las modificaciones en peso e hidrofobicidad por el mono/multi-marcado de las proteínas. Pese al esfuerzo realizado por el grupo del Prof. Pérez-Gil en el marcado y purificación de las proteínas, es evidente que la columna LH-60 no es capaz de separar diferencias de masas tan sutiles como las mono/multi-marcadas de la sonda, ni tampoco la forma monomérica y dimérica de SP-B.

Luego de trabajar con la mezcla de proteínas puras de SP-B y SP-C se procedió a purificar la muestra proveniente del extracto pulmonar. La *figura 25* muestra la comparación a 240 y 280nm para la elusión de SP-B_{STD}, SP-C_{STD} y la fracción II_B2. Como se observó en la *figura 24* para la mezcla de ambas proteínas, la elusión de SP-B (25-a) ocurrió a los 8 minutos aproximadamente (a ambas longitudes de onda), mientras que la elusión de SP-C (25-b) tuvo lugar aproximadamente a los 11 minutos, evidenciado únicamente a 240nm. Esto era esperable dado que la SP-C no posee triptófanos para que pueda ser detectada a 280nm. Para la mezcla de proteínas presentes en la fracción II_B2 se observó un pico a los 8 minutos aproximadamente a 280nm y otro aproximado a los 9 minutos de iniciada la corrida a 240nm. En todos los casos se obtuvo señal a 240 y 280nm en el volumen muerto, el cual fue sembrado posteriormente en un gel junto con la elusión a los 9 minutos (*figura 27*).

A escala preparativa se realizó una cromatografía en fase reversa aplicando el nuevo método desarrollado con variaciones en los tiempos de gradiente y períodos isocráticos. Se inyectó una muestra de extracto orgánico sin purificar previamente en la columna LH-20, y se obtuvo el resultado que se muestra en la *figura 26*. Se puede observar que de forma similar al resultado mostrado en la *figura 25*, hay un pico a 240 y 280nm que se corresponde con el volumen muerto de la columna (aproximadamente a los 7 minutos para la columna utilizada). Posteriormente se obtuvieron picos a los 22 (240 y 280nm, correspondientes a SP-B) y 27 minutos aproximadamente (240nm, correspondiente a SP-C) los cuales fueron recolectados. El cromatograma obtenido fue similar al adquirido a escala analítica, lo que demuestra que el método desarrollado es aplicable a ambas escalas; permitiendo obtener mayor cantidad de proteínas que los métodos propuestos anteriormente para la purificación de SP-B y SP-C. Al mismo tiempo, el resultado obtenido muestra que no es imprescindible realizar una purificación previa del extracto orgánico mediante LH-20 para obtener la purificación satisfactoria de SP-B y SP-C, ya que se tuvo una separación entre los picos de cada proteína similar a la obtenida a escala analítica para la fracción II_B2 (previamente purificada por LH-20).

Todos los picos obtenidos en la cromatografía realizada a escala preparativa fueron sembrados en el gel de poliacrilamida mostrado en la *figura 27* junto con los picos eluidos para la cromatografía a escala analítica de la fracción II_B2 (*figura 25-c*, previamente mencionado). Las siembras de los picos correspondientes a los volúmenes muertos de cada columna (*carriles 2 y 7*) no muestra la presencia de bandas, por lo que los picos observados en la cromatografía no se corresponden con elusión proteica. Este hecho evidencia que la fase móvil inicial del nuevo método desarrollado logra la interacción entre las proteínas y la fase estacionaria de forma óptima. La siembra del pico eluido a los 9 minutos de la cromatografía a escala analítica (*carril 3*) generó una banda muy tenue de bajo peso molecular, que migró a la misma altura que SP-C_{STD}. Dado que dicho pico se evidenció únicamente a 240nm, y migra como una única banda a la misma altura que el estándar de SP-C utilizado, se puede inferir que dicha elusión posee a SP-C proveniente del procesado de pulmón porcino. Para las eluciones relativas a la purificación a escala preparativa se observan bandas de gran intensidad debido a que se tiene mayor concentración proteica. En el *carril 8* (pico eluido a los 22 minutos) se observa la presencia de una única banda que migra a la misma altura que SP-B_{STD}; por lo que se infiere que se trata de SP-B presente en el extracto orgánico. De manera similar, en el *carril 9* (pico eluido a los 27 minutos aproximadamente) se observa la presencia de dos bandas que migraron a la misma altura que las

bandas correspondientes al estándar SP-C, por lo que nuevamente se infiere que se corresponde con SP-C presente en el extracto orgánico.

El método que se logró desarrollar resultó capaz de separar SP-B y SP-C entre sí con mejor resolución que los métodos ya propuestos, siendo útil para lograr la purificación tanto a escala analítica como preparativa.

6. CONCLUSIONES

A partir de la cromatografía de exclusión molecular se concluye que se logró poner a punto el método para separación de proteínas hidrofóbicas, lípidos y colesterol del surfactante pulmonar. Con el fin de separar a SP-B y SP-C se aplicó el método desarrollado por *Bünger et al*⁸⁷. Al aplicarlo, los resultados obtenidos mostraron que éste no resulta efectivo para la separación entre SP-B y SP-C, lo que nos planteo el desafío de desarrollar un nuevo método que permitiera la purificación de las mismas a escala analítica y preparativa.

Con el fin de desarrollar un nuevo método de purificación de SP-B y SP-C se utilizaron ambas proteínas puras marcadas con sondas fluorescentes (SP-B_{STD} y SP-C_{STD}) que permitieron tener los patrones de migración electroforética y elusión cromatográfica de dichas proteínas. Los geles en gradiente de poliacrilamida evidenciaron que SP-B_{STD} se encontraba en forma de monómero y dímero; lo que se vio respaldado por el resultado obtenido al realizar espectrometría de masa entera (sin digerir con tripsina) de esta proteína. Para SP-C_{STD}, los geles en gradiente mostraron que la misma se encontraba en su forma monomérica, y el resultado de masa entera mostró que en dicho stock había SP-C marcada con sonda y sin marcar. Mediante fluorescencia se pudo detectar la presencia de Alexa530 en los carriles en que se había sembrado únicamente SP-C_{STD} y se vio Alexa660 en los carriles en que solamente se había sembrado SP-B. Dichos resultados permiten concluir que la purificación y el marcado de SP-B y SP-C realizado por el grupo de *Pérez-Gil* no resulto satisfactorio, habiendo contaminación de una proteína con otra, así como posiblemente sonda libre. Respecto a la siembra de la fracción purificada II_B2 se vio que migra a la misma altura que la mezcla de SP-B_{STD} y SP-C_{STD}, por lo cual el gradiente de poliacrilamida no permitió obtener la resolución necesaria para separar a ambas proteínas presentes en una misma mezcla. La intensidad de la banda correspondiente a la fracción II_B2 muestra que se obtuvo una buena concentración de proteínas luego de la purificación y re-purificación mediante LH-20.

La utilización de las proteínas marcadas con sonda fluorescente permitió evidenciar que las mismas no logran ser extraídas del gel mediante métodos convencionales. Por dicho motivo se aplicó el método descrito por *Feick et al*⁹³, el cual logró remover a las proteínas del gel de manera eficiente. Los resultados obtenidos a partir de espectrometría de masa evidencian la presencia de SP-B en la fracción de extracto orgánico purificada, aunque no muestran señales correspondientes a

SP-C. Dado que la relación entre ambas proteínas es de 10:1 creemos que la ausencia de señales de esta última se debe a su concentración extremadamente baja en el extracto pulmonar.

La puesta a punto del nuevo método a desarrollar para purificar a SP-B de SP-C evidenció que es necesaria la presencia de una pequeña cantidad de agua (20%) para lograr que ambas proteínas interaccionen con la fase estacionaria; ya que un porcentaje menor favorece la elusión de ambas junto con el volumen muerto de la columna, y un porcentaje mayor favorece la precipitación de las mismas. A su vez, la puesta a punto del método permitió llegar a la conclusión de que es estrictamente necesaria la mantención en el tiempo de la fase 100% Metanol+0.1%TFA para lograr la separación satisfactoria entre SP-B y SP-C.

Los cromatogramas obtenidos al utilizar las proteínas marcadas con sonda fluorescente mostraron también que SP-B estaba en su forma de dímero y monómero, y que probablemente la misma estuviera conjugada con una única molécula de Alexa530 o más de una. Para SP-C se obtuvieron múltiples picos lo que probablemente se deba a degradación del stock al mismo tiempo que SP-C mono o multi-marcadas.

Mediante cromatografía en fase reversa se logró separar efectivamente SP-B de SP-C, obteniendo gran separación temporal entre la elusión de ambas proteínas, tanto a escala analítica como preparativa. A su vez, a escala preparativa se logró la separación de SP-B y SP-C provenientes del extracto orgánico sin purificar previamente mediante cromatografía de exclusión molecular en LH-20.

El conjunto de resultados obtenidos permite afirmar que se pudo desarrollar un método cromatográfico que permite obtener la separación de ambas proteínas con buena resolución, tanto a escala analítica como preparativa, en cortos períodos de tiempo utilizando HPLC en fase reversa.

7. PERSPECTIVAS A FUTURO:

El estudio del SP y su funcionalidad resulta indispensable para el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan avanzar en el combate de la mortalidad de los prematuros así como mejorar su calidad de vida más allá de los primeros meses de vida. Por ello el estudio de las proteínas hidrofóbicas del SP resulta indispensable, ya que sus funciones son elementales en la dinámica del mismo. El desarrollo de un nuevo método cromatográfico rápido y eficiente que permite separar SP-B y SP-C, y la puesta a punto de las metodologías empleadas, deja sobre la mesa las condiciones necesarias para continuar con el estudio de este sistema de forma más exhaustiva y así avanzar en una problemática de gran relevancia a nivel local y mundial.

En un futuro resultará fundamental un análisis de las propiedades tensoactivas de ambas proteínas, dado que se ha evidenciado anteriormente que el método de purificación condiciona esta capacidad³⁹, pero resulta claro que dicho trabajo excede los objetivos de esta tesina.

Pensamos que el estudio de las propiedades funcionales así como estructurales en la organización supramolecular del surfactante pulmonar, permitirá comprender de mejor manera los mecanismos involucrados en disfunciones del surfactante pulmonar durante la patología pulmonar y proponer nuevas terapéuticas con diseño específico para cada patología.

8. AGRADECIMIENTOS:

Quisiera agradecer en primera instancia al Dpto de Fisiopatología, que bajo la tutoría del Dr. Arturo Briva y co-tutoría del Dr. Leonel Malacrida me permitió finalizar con la pasantía de grado e involucrarme en su proyecto. Gracias al Dr. Arturo Briva por la tutoría de este proyecto y brindarme esta posibilidad.

En particular quisiera agradecerle al Dr. Leonel Malacrida quién estuvo en cada paso de este proyecto, y quién me enseñó no solo las metodologías a emplear sino a investigar a fondo y plantear nuevos horizontes. Muchas gracias.

También quiero agradecer a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UByPA) del Institut Pasteur de Montevideo bajo la dirección de los Dres. Carlos Batthyány y Rosario Durán, quienes abrieron las puertas a este proyecto poniendo a nuestro alcance materiales y personal humano para poder desarrollar las metodologías empleadas. Gracias por su disposición en todo momento, especialmente cuando se hizo cuesta arriba. Un agradecimiento particular a todos los integrantes de la Unidad que colaboraron desde el cominezo con el desarrollo de las técnicas empleadas.

Debo agradecerle al equipo de trabajo del Dr. Jesús Pérez-Gil, de la Universidad Complutense de Madrid, en particular a él y a la Dra. Mercedes Echaide quienes proporcionaron a las proteínas SP-B y SP-C purificadas y marcadas con sonda fluorescente. Sin su colaboración no habría sido posible el desarrollo de este método por lo que les agradezco enormemente su disposición.

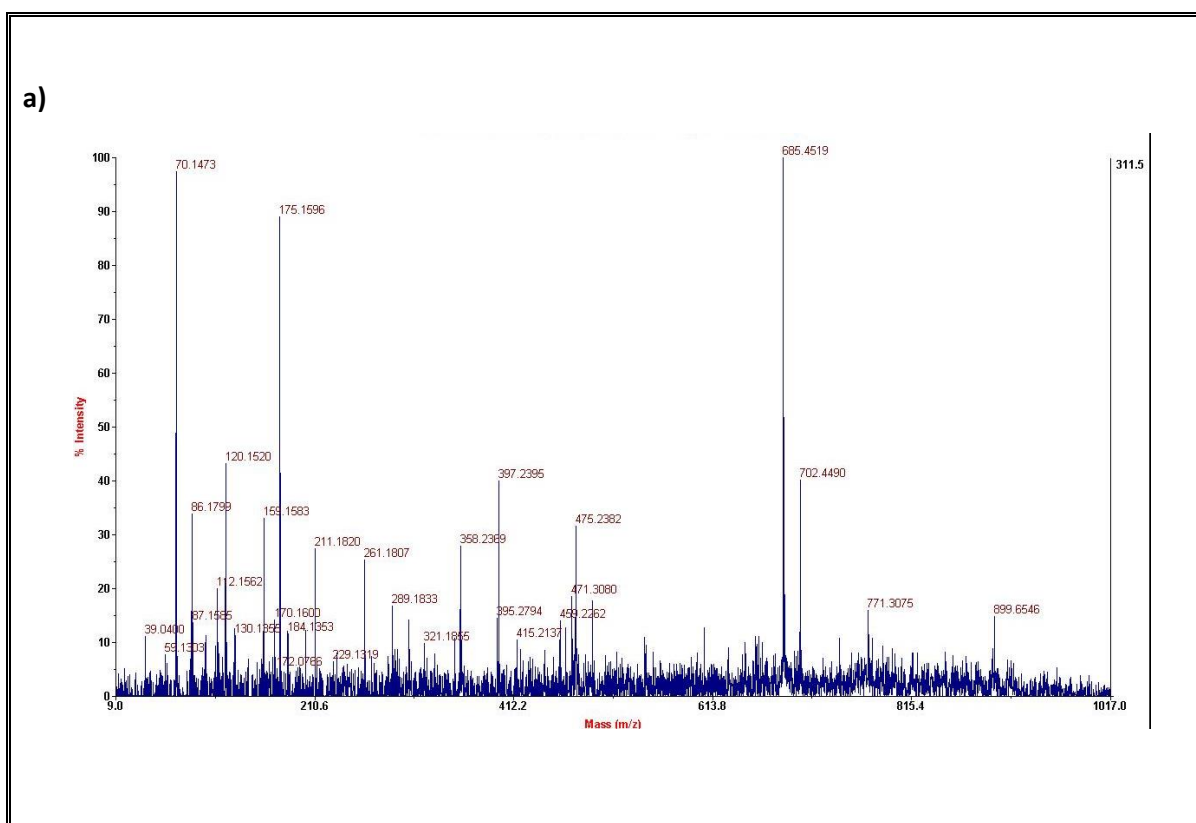
Finalmente, quiero agradecerle a las personas que Dios ha puesto en mi camino y cuyo apoyo y amor fueron indispensables para mí, no solo durante el desarrollo de esta tesis sino durante toda mi carrera. Un gracias especial a Griselda, Denisse, Nilda, Wilda, Jorge, Jorgen, amigas y amigos que fueron y son fundamentales para mí. Gracias por su preocupación, apoyo y aliento en cada momento.

9. ANEXO

Resultados de espectrometría de masa obtenidos para la fracción II_B2 analizada:

Se identificó la siguiente secuencia de SP-B proveniente de la especie *Sus scrofa* de manera significativa:

FPIPLPFCWLCRTLKRIQAVVPKGVLGKAVAQVCHVVPVVGICQCLAERYIVILLNMLLDRTLPLQLVCGLVLRCS



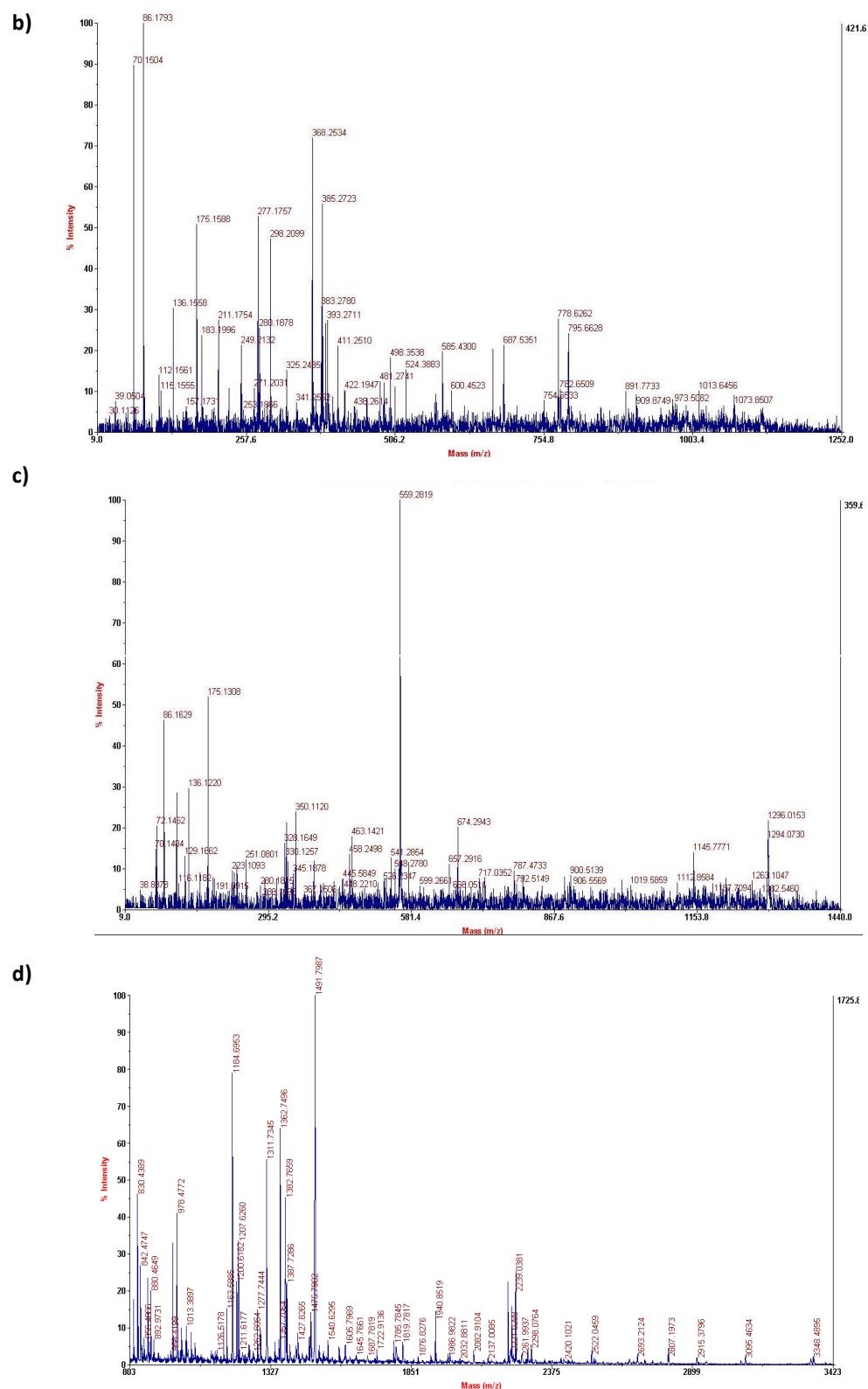


Figura A.I: Fragmentaciones obtenidas a partir del espectro mostrado en la Fig 15, a partir de los precursores 962.48, 1184.69, 1362.75 ,1491.80 (a, b, c y d respectivamente)

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Wang, P. *et al.* Proteomic analysis of lamellar bodies isolated from rat lungs. *BMC Cell Biol.* **9**, 34 (2008).
2. Goerke, J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1408**, 79–89 (1998).
3. Kerrigan A.M, B. G. . No TitleC-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology Jorunal* **214**, 526–575 (2009).
4. Nayak, A., Dodagatta-Marri, E., Tsolaki, A. G. & Kishore, U. An Insight into the Diverse Roles of Surfactant Proteins, SP-A and SP-D in Innate and Adaptive Immunity. *Front. Immunol.* **3**, 131 (2012).
5. Glasser, S. W. *et al.* Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6366–71 (2001).
6. Pérez-Gil, J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1676–95 (2008).
7. Serrano, A. G. & Pérez-Gil, J. Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system. *Chem. Phys. Lipids* **141**, 105–18 (2006).
8. Bernhard, W. *et al.* Phosphatidylcholine Molecular Species in Lung Surfactant Composition in Relation to Respiratory Rate and Lung Development. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* **25**, 725–731.
9. Daniels C.B, O. S. The comparative biology of pulmonary surfactant: past,present and future. *CBP* **129**, 9–36 (2001).
10. Possmayer, F., Nag, K., Rodriguez, K., Qanbar, R. & Schurch, S. Surface activity in vitro : role of surfactant proteins. *Comp Biochem Physiol A Mol IntegrPhysiol* **129**, 209–220 (2001).
11. Agassandian M, M. R. K. Surfactant phospholipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 612–625 (2013).
12. Baumgart, F., Ospina, O. L., Mingarro, I., Rodríguez-Crespo, I. & Pérez-Gil, J. Palmitoylation of pulmonary surfactant protein SP-C is critical for its functional cooperation with SP-B to sustain compression/expansion dynamics in cholesterol-containing surfactant films. *Biophys. J.* **99**, 3234–43 (2010).
13. Postle, A. D., Heeley, E. L. & Wilton, D. C. A comparison of the molecular species compositions of mammalian lung surfactant phospholipids. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **129**, 65–73 (2001).
14. Olmeda Lozano, B. Relaciones estructura-función del sistema surfactante pulmonar: detección de complejos multiproteicos nativos y participación del surfactante en la difusión interfacial del oxígeno. 16–22 (2011).
15. Numata, M., Chu, H. W., Dakhama, A. & Voelker, D. R. Pulmonary surfactant phosphatidylglycerol inhibits respiratory syncytial virus-induced inflammation and infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 320–5 (2010).
16. Schlame M, Rüstow B, Kunze D, Rabe H, R. G. Phosphatidylglycerol of rat lung. Intracellular sites of formation de novo and acyl species pattern in mitochondria,microsomes and surfactant. *Biochem. Jorunal* **240**, 247–252 (1986).

17. Eeman M, D. M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14**, 719–736 (2010).
18. Eeman, M. & Deleu, M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14**, 719–736 (2010).
19. De la Serna J.B, Pérez-Gil J, Simonsen A.C, Bagatolli L.A. Cholesterol rules. Direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures. *The Journal of Biological Chemistry* **279**(39): 40716-40722 (2004).
20. De la Serna J.B, Orådd G, Bagatolli L.A, Simonsen A.C, Marsh D, Lindblom G, Pérez-Gil J. Segregated phases in pulmonary surfactant membranes do not show coexistence of lipid populations with differentiated dynamic properties. *Biophysical Journal* **97**: 1381-1389 (2004).
21. De la Serna J.B, Hansen S, Berzina Z, Simonsen A.C, Hannibal-Bach H.K, Knudsen J, Ejsing C.S, Bagatolli L.A. Compositional and structural characterization of monolayers and bilayers composed of native pulmonary surfactant from wild type mice. *Biochimica et Biophysica Acta* **1828**: 2450-2459 (2013).
22. King R.J, Ruch J, Gikas E.G, Platzker A.C, Creasy R.K. Appearance of apoproteins of pulmonary surfactant in human amniotic fluid. *J Appl Physiol* **39**(5): 735-741 (1975).
23. Haagsman H.P, Van Golde L.M.G. Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annual Rev. Physiology*, **53**:441-464. (1991)
24. Hawgood S, Clements J.A . Pulmonary surfactant and its apoproteins. *J Clin Invest* **86**, 1–6 (1990).
25. Fisher AB, Dodia C, Ruckert P, Tao JQ, Bates S.R. Pathway to lamellar bodies for surfactant protein A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **299**, L51–59 (2010).
26. Veldhuizen, E. J. A. & Haagsman, H. P. Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1467**: 255-270. (2000).
27. Wright J.R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* **5**, 58–68 (2005).
28. Kuoriki Y, Takahashi M, Nishitani C. Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell Microbiol* **9**, 1871–1879 (2007).
29. Schmitz, G. & Muller, G. Structure and function of lamellar bodies , lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *Journal of lipid research* **32**, 1539–1570 (1991).
30. Haczk, A. Protective role of the lung collectins surfactant protein A and surfactant protein D in airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* **122**, 861–881 (2008).
31. Crouch, E. C. Surfactant protein-D and pulmonary host defense. *Respiratory research* **1**,93-103 (2000).
32. Crouch, E., Persson, A., Chang, D. & Heuser, J. Molecular Structure of Pulmonary Surfactant Protein D (SP-D). *The Journal of biological chemistry* **269**, 17311–17319 (1994).
33. Poulain, F. R., Akiyama J, Allen L, Brown C, Chang R, Goerke J, Dobbs L, Hawgood S. Ultrastructure of Phospholipid Mixtures Reconstituted with Surfactant Proteins B and D. *American Journal of respiratory cell and molecular biology*, **20**, 1049-1058 (1999).
34. Weaver, T. E. & Whitsett, J. A. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochem Journal* **273**, 249–264 (1991).
35. Weaver, T. E. Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochim. Biophys. Acta.* **1408**, 173–179 (1998).

36. Weaver, T. E., Na, C. & Stahlman, M. Biogenesis of lamellar bodies , lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Elsevier Science* **13**, 263–270 (2002).
37. Weaver, T. E. & Conkright. Functions of surfactant proteins B and C. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 555-578 (2001).
38. Zaltash, S., Palmblad, M., Curstedt, T., Johansson, J. & Persson, B. Pulmonary surfactant protein B: a structural model and a functional analogue. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1466**, 179–186 (2000).
39. Pérez-Gil J, Cruz A, Casals C. Solubility of hydrophobic surfactant proteins in organic solvent/water mixtures. Structural studies on SP-B and SP-C in aqueous organic solvents and lipids. *Biochim Biophys Acta* **1168**, 261–270 (1993).
40. Wüstneck, N., Wüstneck, R., Perez-gil, J., Pison, U. Effects of Oligomerization and Secondary Structure on the Surface Behavior of Pulmonary Surfactant Proteins SP-B and SP-C. *Biophysical J* **84**, 1940–1949 (2003).
41. Hawgood, S. Surfactant Protein B : Structure and Function. *Biology of the neonate* **85**, 285–289 (2004).
42. Li, Y., Qin Y, Li H, Wu R, Yan C, Du H. Lysosomal acid lipase over-expression disrupts lamellar body genesis and alveolar structure in the lung. *Int. J. Exp. Pathol.* **88**, 427–36 (2007).
43. Beers, M. F. & Mulugeta, S. Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease. *Annu. Rev. Physiol.* **67**, 663–96 (2005).
44. Ten Brinke, A., van Golde, L. M. & Batenburg, J. J. Palmitoylation and processing of the lipopeptide surfactant protein C. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1583**, 253–265 (2002).
45. Gustafsson M, Curstedt T, Jörnvall H, Johansson J. Reverse-phase HPLC of the hydrophobic pulmonary surfactant proteins: detection of surfactant protein C isoform containing Ne-palmitoyl-lysine. *Biochem. J* **326**, 799–806 (1997).
46. Keller, A., Eistetter, H. R., Voss, T. & Schafert, K. The pulmonary surfactant protein C (SP-C) transmembrane protein precursor. *Biochem J* **277**, 493–499 (1991).
47. Mulugeta, S. & Beers, M. F. Processing of surfactant protein C requires a type II transmembrane topology directed by juxtamembrane positively charged residues. *J. Biol. Chem.* **278**, 47979–86 (2003).
48. Johansson, J., Szyperski, T., Curstedt, T., Wüthrich, K. The NMR structure of the pulmonary surfactant-associated polypeptide SP-C in an apolar solvent contains a valyl-rich alpha-helix. *Biochemistry* **33**, 6015–23 (1994).
49. Li, J. Hosia W, Hamvas A, Thyberg J, Jörnvall H, Weaver T.E, Johansson J. The N-terminal propeptide of lung surfactant protein C is necessary for biosynthesis and prevents unfolding of a metastable alpha-helix. *J. Mol. Biol.* **338**, 857–62 (2004).
50. Gustafsson, M., Palmblad, M., Curstedt, T., Johansson, J. & Schu, S. Palmitoylation of a pulmonary surfactant protein C analogue affects the surface associated lipid reservoir and film stability. *Biophys Acta* **1466**, 169–178 (2000).
51. Gustafsson, M., Griffiths, W. J., Furusjö, E. & Johansson, J. The palmitoyl groups of lung surfactant protein C reduce unfolding into a fibrillogenic intermediate. *J. Mol. Biol.* **310**, 937–50 (2001).
52. Perez-Gil, J. & Weaver, T. E. Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology* **25**, 132–41 (2010).

53. Fitzgerald, M. L., Xavier R, Haley K.J, Weltu R, Goss J.L, Brown C.E, Zhuang D.Z, Bell S.A, Lu N, Mckee M, Seed B, Freeman M.W. ABCA3 inactivation in mice causes respiratory failure, loss of pulmonary surfactant, and depletion of lung phosphatidylglycerol. *J. Lipid Res.* **48**, 621–32 (2007).
54. Aberg C, Sparr E, Larsson M, Wennerström. H. A theoretical study of diffusional transport over the alveolar surfactant layer. *Jorunal R. Soc. Interface* **7**, 1403–1410 (2010).
55. Williams, M. C. Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs. *The Journal of Cell Biology* **72**, 260–277 (1977).
56. Gil, J. & Reiss, O. K. Isolation and characterization of lamellar bodies and tubular myelin from rat lung homogenates. *The Journal of Cell Biology* **58**, 154–171 (1973).
57. Palaniyar, N., Ridsdale, R. A., Hearn, S. A., Possmayer, F. & Harauz, G. Formation of membrane lattice structures and their specific interactions with surfactant protein A. *American Phisiologycal society* (1999).
58. Veldhuizen, E. J. A., Batenburg, J. J., van Golde, L. M. G & Haagsman, H. P. The Role of Surfactant Proteins in DPPC Enrichment of Surface Films. *Biophysical Journal* **79**, 3164–3171 (2000).
59. Kazi A.S, Tao J, Feinstein S.I, Zhang L, Fisher A.B, Bates S. R. Role of the PI3-kinase signaling pathway in trafficking of the surfactant protein A receptor P63 (CKAP4) on type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **299**, L794–L807 (2010).
60. Andreeva, A. V, Kutuzov, M. A & Voyno-Yasenetskaya, T. A. Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **293**, L259–71 (2007).
61. Zimmermann LJ, et al. Surfactant metabolism in the neonate. *Biol Neonate* **87**, 296–307 (2005).
62. Rooney, S. A. Regulation of surfactant secretion. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **129**, 233–243 (2001).
63. Wright J.R, Dobbs L. G. Regulation of Pulmonary Surfactant Secretion and Clearance. *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 395–414 (1991).
64. Patel, A. S, Reigada D, Mitchell C.H, Bates S.R, Margulies S.S, Koval M. Paracrine stimulation of surfactant secretion by extracellular ATP in response to mechanical deformation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **289**, L489–96 (2005).
65. Gobran L.I, Rooney S. A. Adenylate cyclase-coupled ATP receptor and surfactant secretion in type II pneumocytes from newborn rats. *AM J Physiol* **272**, L187–L196 (1997).
66. El-Gendy, N., Kaviratna, A., Berkland, C. & Dhar, P. Delivery and performance of surfactant replacement therapies to treat pulmonary disorders. *Ther. Deliv.* **4**, 951–80 (2013).
67. Parra, E., Alcaraz, A., Cruz, A., Aguilera, V. M. & Pérez-Gil, J. Hydrophobic pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C induce pore formation in planar lipid membranes: evidence for proteolipid pores. *Biophys. J.* **104**, 146–55 (2013).
68. Akinbi H.T, Breslin J.S, Ikegami M, Iwamoto H.S, Clark J.C, Whitsett J.A, Jobe A. and Weaver T. E. Rescue of SP-B Knockout Mice with a Truncated SP-B Proprotein. Function of the C-terminal propeptide. *J. Biol. Chem.* **272**, 9640–9647 (1997).
69. Krüger, P., Schalke, M., Wang, Z., Notter, R. H., Dluhy, R. A., Lösche M. Effect of Hydrophobic Surfactant Peptides SP-B and SP-C on Binary Phospholipid Monolayers . I . *Fluorescence and Dark-Field Microscopy.* **77**, 903–914 (1999).

70. Clark, J. C., Wert S.E, Bachurski C.J, Stahlman M.T, Stripp B.R, Weaver T.E, Whitsett J.A. Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis , causing respiratory failure in newborn mice. *Cell Biology* **92**, 7794–7798 (1995).
71. López-Rodríguez, E., Echaide, M., Cruz, A., Taeusch, H. W. & Perez-gil, J. Meconium Impairs Pulmonary Surfactant by a Combined Action of Cholesterol and Bile Acids. *Biophysj* **100**, 646–655 (2011).
72. Frerking, I., Günther A, Seeger, W. & Pison, U. Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. *Intensive Care Med.* **27**, 1699–717 (2001).
73. Nag K. Lung biology in health and disease. Lung surfactant: function and disorder. Vol.201 Taylor & Francis Group. (2005)
74. Raghavendran K, Wilson D, Notter R. Surfactant therapy of ALI and ARDS. *Crit Care Clin* **37**, 525–559 (2011).
75. Carey, B. & Trapnell, B. C. The molecular basis of pulmonary alveolar proteinosis. *Clin Immunol.* **135**, 223–235 (2011).
76. Caralheda, C. A., Campos, S. R. R., Machuqueiro, M., Baptista, M. Structural Effects of pH and Deacylation on Surfactant Protein C in an Organic Solvent Mixture : A Constant-pH MD Study. *Journal of chemical information and modelling.* **53**:2979-2989 (2013).
77. Scott, J. E. The Pulmonary Surfactant: Impact of Tobacco Smoke and Related Compounds on Surfactant and Lung Development. *Tob. Induc. Dis.* **2**, 1 (2004).
78. Stenger P.C, Alonso C, Zasadzinski J.A. Environmental tobacco smoke effects on lung surfactant film organization. *Biochim Biophys Acta* **1788**(2):358-370. (2009)
79. Hohlfeld, J. M. The role of surfactant in asthma. *Resp. res* **8**, 1–8 (2002).
80. Devendra, G. & Spragg, R. G. Lung surfactant in subacute pulmonary disease. *Resp res* **3**, 19–22 (2002).
81. Robertson B,Taeusch H.W. *Lung Biol. Heal. Dis.* 217–262; 309–321 (1995).
82. Robert H. Notter. in *Lung Biol. Heal. Dis.* 281–298; 319–344 (2000).
83. Anzueto, A. *et al.* Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1417–21 (1996).
84. Davis, J. M. *et al.* Safety and pharmacokinetics of multiple doses of recombinant human CuZn superoxide dismutase administered intratracheally to premature neonates with respiratory distress syndrome. *Pediatrics* **100**, 24–30 (1997).
85. Curstedt T, Jörnvall H, Robertson B, Bergman T, B. P. Two hydrophobic low-molecular-mass protein fractions of pulmonary surfactant. *Eur. J Biochem* **168**, 255–262 (1987).
86. Arjomaa P, H. M. Purification of a hydrophobic surfactant peptide using High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem* **171**, 207–212 (1988).
87. Kaufner, L., Pison, U. & Bunger, H. Quantitative analysis of hydrophobic pulmonary surfactant proteins by high-performance liquid chromatography with light-scattering. **870**, 363–369 (2000).
88. Cabré, E. Determinantes y efectos de la integración de la proteína SP-B del surfactante pulmonar en membranas lipídicas. 65–97 (2009).

89. Bligh E.G, Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochem and Physiol*, **37** (8): 911-917.(1959).
90. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5 (1970).
91. Fazekas de St Groth, S., Webster, R. G. & Datyner, A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim. Biophys. Acta* **71**, 377–91 (1963).
92. Cohen, S. L. & Chait, B. T. Mass spectrometry of whole proteins eluted from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* **247**, 257–67 (1997).
93. Feick, R. G. & Shiozawa, J. a. A high-yield method for the isolation of hydrophobic proteins and peptides from polyacrylamide gels for protein sequencing. *Anal. Biochem.* **187**, 205–211 (1990).
94. Hall, S. B., Wang, Z. & Notter, R. H. Separation of subfractions of the hydrophobic components of calf lung surfactant. *J. Lipid Res.* **35**, 1386–94 (1994).