



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
Facultad de Medicina – Hospital de Clínicas
Departamento de Fisiopatología**

Tesis de Maestría PEDECIBA-Biología

***Comportamiento dinámico del surfactante
pulmonar en un modelo de lesión inducido por
la ventilación mecánica***

**María José García
Director: Dr. Arturo Briva**

Montevideo, 2020

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primera instancia al Dr. Arturo Briva por haberme brindado la oportunidad de continuar mi formación y haber depositado su confianza en mí para la realización de este proyecto. Muchas gracias por su apoyo y la dirección todos estos años.

Agradecer al Departamento de Fisiopatología que bajo la dirección en primera instancia del Prof. Dr. Javier Hurtado y luego del Dr. Juan Carlos Grigniola me permitieron llevar a cabo la tesis, facilitándome la realización del trabajo. Gracias a los compañeros por el apoyo en el trabajo cotidiano, a Ana Laura, Heber, Adriana a quien recuerdo con mucho cariño, al Dr. Martín Angulo por siempre tenerme en cuenta y estar dispuesto a ayudar en todo momento, y al Dr. Luciano Amerelle por toda su ayuda, dedicación y colaboración en los experimentos y en cada cosa que necesitara.

Quisiera agradecer especialmente al Dr. Leonel Malacrida quien dedico mucho tiempo en la colaboración y discusión crítica de los experimentos y resultados. Agradecer su confianza en mí desde el primer momento, por brindarme su apoyo e infinitas oportunidades todos estos años, por su generosidad no solo a nivel laboral sino también personal. Agradezco profundamente sus enseñanzas, consejos y la motivación en los momentos difíciles que han sido de vital importancia para mí.

Debo agradecer también al Departamento de Fisicoquímica biológica de la Facultad de Ciencias, especialmente al Dr. Matías Möller por abrirme las puertas del laboratorio, brindarme la posibilidad de realizar una pasantía y colaborar en los experimentos de HPLC proporcionándonos lípidos e instrumentación necesaria para realizar las medidas además de su tiempo y dedicación.

Por último quiero agradecer a las personas que me acompañaron no solo durante esta tesis sino durante todo el camino. A mi familia y amigos, en especial a Miguel, Patrick, Valeria, Josiana, Michel y Juliana por su amor, su apoyo incondicional y su aliento en los momentos que más lo necesite. Gracias por creer en mí siempre, festejar mis éxitos como si fueran suyos y estar ahí para levantarme en cada caída.

INDICE

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1 Fisiología respiratoria en el pulmón.....	9
2.2 Surfactante pulmonar	11
2.2.1 Composición del surfactante pulmonar.....	12
2.2.2 Funciones del surfactante pulmonar	17
2.3 Metabolismo del surfactante pulmonar	21
2.3.1 Biosíntesis y almacenamiento	21
2.3.2 Secreción y adsorción.....	23
2.3.3 Degradación y reciclaje	25
2.4 Patologías asociadas al surfactante pulmonar	26
2.5 Mecánica respiratoria	27
2.5.1 Resistencias elásticas	30
2.5.2 Relación presión- volumen.....	31
2.6 Ventilación mecánica	33
2.6.1 Patrones ventilatorios protectivos	35
2.6.2 Papel del surfactante pulmonar en la VILI	37
2.6 Métodos de cuantificación.	37
2.8 Datos preliminares.....	39
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo general	41
3.2 Objetivos específicos	41
4. MATERIALES Y METODOS	42
4.1 Modelo animal	42
4.2 Ventilación Mecánica	42
4.3 Dosificación de Surfactante	43
4.4 Determinación de la concentración de fosfolípidos	43
4.5 Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)	44

4.5.1	Determinación del perfil y cuantificación de especies fosfolipídicas	44
4.5.2	Cuantificación de Colesterol	44
4.6	Análisis Histológico	44
4.6.1	Procesamiento de imágenes para cuantificar grosor de tabique 45	
4.6.2	Procesamiento de imágenes para cuantificar área alveolar	46
4.8	Análisis Estadístico.....	51
5.	RESULTADOS	52
4.9	Constitución y puesta a punto del modelo experimental	52
5.2	Análisis Histológico.....	54
5.2.1	Medida de Grosor de tabique	54
5.2.2	Medida de colapso alveolar	58
5.3	Cuantificación de fosfolípidos.	63
5.3.1	Cuantificación de fósforo	63
5.3.2	Cromatografía líquida de alta performance (HPLC).....	64
5.4	Experimentos explorativos - Microscopia multi-fotónica, resuelta en el tiempo (FLIM) y espectral con microscopio DIVER	71
6.	DISCUSIÓN	74
7.	CONCLUSIONES	80
8.	ANEXO	82
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	85

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARM	Asistencia respiratoria mecánica
AVM	Asistencia ventilatoria mecánica
CBS	Surfactómetro de burbuja cautiva
CDR	Dominio de unión a carbohidrato
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DOPC	Dioleoilfosfatidilcolina
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
E	Elasticidad
EO	Extracto orgánico
F	Flujo
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
FL	Fosfolípidos
PS	Fosfatidilserina
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
Hz	Hertz
IR	Insuficiencia respiratoria
LB	Balanza de Langmuir-Blodgett
LBs	Cuerpos lamelares
LBA	Lavado broncoalveolar
Lα	Fase líquido-cristalina
LPA	Lesión pulmonar aguda
LPS	Lipopolisacarido
Lβ	Fase gel
Lo	Fase líquido-ordenado
Ld	Fase líquido-desordenado
V	Volumen
VILI	Injuria pulmonar inducida por ventilación mecánica
MBV	Cuerpos multivesiculares
MeOH	Metanol
MLVs	Vesículas multilamelares
MS	Espectrometría de masa
MT	Mielina tubular

P	Presión
Pdiaf	Presión diafragmática
PEEP	Presión positiva al final de la espiración
Psr	Presión del sistema respiratorio
Ptp	Presión transpulmonar
Ptx	Presión transtorácica
Pva	Presión de la vía aérea
R	Resistencia
RE	Retículo endoplasmático
RI	Índice de refracción
SD	Desviación estándar
SDR	Síndrome de distrés respiratorio
SDRA	Síndrome de distrés respiratorio agudo
SDRI	Síndrome de distrés respiratorio en infantes.
SM	Esfingomielina
SP	Surfactante pulmonar
SP-A	Proteína del surfactante A
SP-B	Proteína del surfactante B
SP-C	Proteína del surfactante C
SP-D	Proteína del surfactante D
SPE	Surfactante pulmonar exógeno
TLC	Cromatografía de capa fina
UV	Ultravioleta
VM	Ventilación Mecánica
VT	Volumen corriente
π	Presión superficial
γ	Tensión superficial
γ_0	Tensión superficial del agua

1. RESUMEN

El epitelio alveolar es un sector fundamental del sistema respiratorio; es responsable de la reabsorción activa del edema pulmonar, permite la síntesis y secreción de surfactante y participa en los procesos de inflamación y reparación pulmonar.

Su importancia se pone específicamente de manifiesto en la utilización de Asistencia Ventilatoria Mecánica (AVM). La AVM define la necesidad de ingreso de pacientes al área de cuidados críticos formando parte de la terapéutica, sin embargo, puede contribuir a generar una nueva injuria pulmonar (Injuria Pulmonar Inducida por Ventilación Mecánica; VILI).

El surfactante pulmonar es un complejo lipoproteico que cumple diversas funciones que lo hacen un componente indispensable del sistema respiratorio. Durante la VILI, el estrés mecánico se transmite al tejido pulmonar y al espacio alveolar afectando la composición y función del surfactante pulmonar y ésta disfunción significativa se correlaciona con la severidad de la lesión pulmonar. Por este motivo la estrategia terapéutica actual apunta a modificar el patrón ventilatorio para evitar la injuria celular mecánica.

En el presente trabajo estudiamos el Comportamiento dinámico del surfactante pulmonar en pulmones aislados de rata que desarrollan lesión pulmonar aguda (LPA) por VILI, evaluando las modificaciones que sufre en su composición, estructura y la repercusión que determinan en el sistema respiratorio diferentes estrategias ventilatorias. Nuestro estudio involucra un modelo de rata con diferentes grados de LPA por cambios en los parámetros del ventilador (desde protección hasta ventilación mecánica nociva). El uso de pulmón aislado nos permite controlar el intercambio de gases durante todo el periodo de ventilación así como también recolectar la muestra de surfactante pulmonar y el tejido pulmonar para el análisis histológico después del protocolo. Para evaluar el efecto de la VILI, se realizó análisis de histología pulmonar. Los cambios en la composición del surfactante pulmonar fueron evaluados usando HPLC.

El análisis histológico mostró un aumento del deterioro por colapso alveolar y aumento del grosor de tabiques durante la VILI grave. Este agrandamiento del grosor del tabique puede estar relacionado con la aparición de edema pulmonar. El perfil de fosfolípidos se deterioró en el surfactante pulmonar bajo VILI, se alteró la composición de sus componentes, principalmente relacionado con la fosfatidilcolina.

Pudimos producir un modelo aislado de LPA por VILI donde se investigó el efecto de la ventilación mecánica en el agente tensioactivo pulmonar en la interfase alveolar.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Fisiología respiratoria en el pulmón

La respiración es el proceso fisiológico por el cual se produce el intercambio gaseoso en el epitelio alveolar entre O₂ proveniente de la atmósfera y CO₂ producto del metabolismo celular. El órgano encargado de facilitar este intercambio gaseoso y asegurar el aporte de O₂ necesario para la respiración es el pulmón. El aparato respiratorio de los mamíferos se caracteriza por tener dos pulmones divididos en lóbulos, conectados a un sistema de transporte desde y hacia la atmósfera (vía aérea), se alojan en la cavidad torácica rodeados por una doble membrana denominada pleura que evita que estos estén en contacto directo con las paredes de la caja torácica. En la parte inferior se encuentran limitados por el diafragma, músculo que con su distensión y contracción impulsa la entrada y salida de gases. El aire ingresa al organismo a través de las vías aéreas superiores, que incluyen las fosas nasales, faringe y laringe; y continúa su recorrido por la tráquea que se bifurca a nivel pulmonar para formar dos bronquios que alimentan a cada uno de los pulmones. Éstos se ramifican múltiples veces generando los bronquiolos que finalizan en estructuras de tamaño micrométrico denominadas alvéolos, los cuales están rodeados de capilares y donde efectivamente tiene lugar el intercambio gaseoso (Figura 1) (Jimenez-2009).

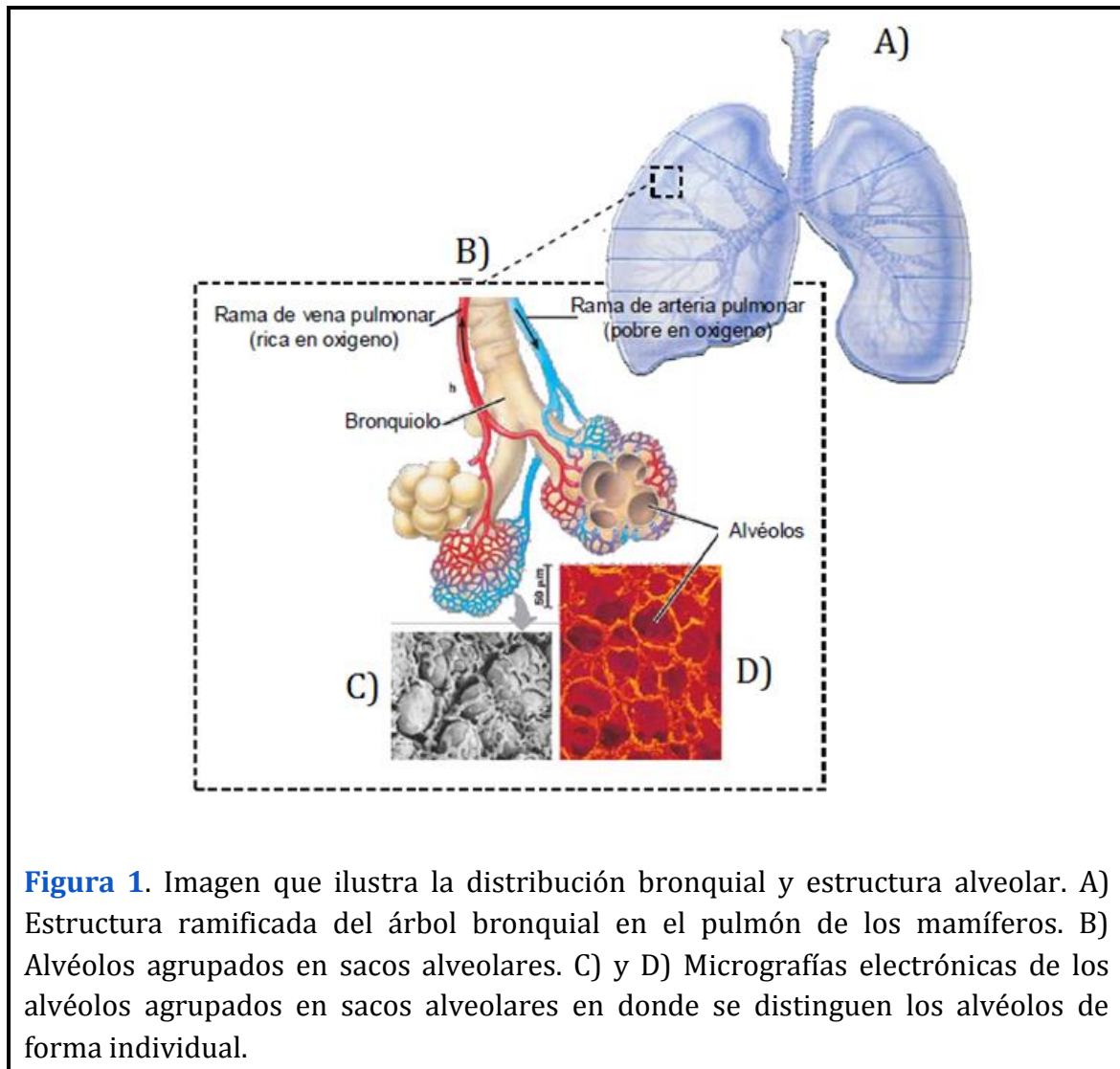


Figura 1. Imagen que ilustra la distribución bronquial y estructura alveolar. A) Estructura ramificada del árbol bronquial en el pulmón de los mamíferos. B) Alvéolos agrupados en sacos alveolares. C) y D) Micrográficas electrónicas de los alvéolos agrupados en sacos alveolares en donde se distinguen los alvéolos de forma individual.

Una vez en el alvéolo, para llegar a la sangre el oxígeno tiene que atravesar la barrera alvéolo-capilar, de un grosor medio en humanos de alrededor de $0.6 \mu\text{m}$ (Maina, West-2005), distancia mínima que permite la difusión eficiente de gases entre el alvéolo y el capilar. Esta barrera está formada secuencialmente por epitelio alveolar, una fina capa de líquido intersticial y endotelio alveolar.

El epitelio alveolar que ocupa el 31% del volumen de la barrera alveolar, está compuesto por dos tipos celulares. Un 90% está constituido por neumocitos tipo I, células escamosas, planas y delgadas que facilitan la difusión de gases y además expresan canales iónicos y acuaporina 5 por lo que se cree que podrían estar implicados en el mantenimiento del fluido alveolar (Johnson-2007, Herzog-2008) y un 10 % por neumocitos tipo II, células cúbicas con microvellosidades apicales encargadas de la distensión y recuperación del tamaño de los alvéolos mediante la síntesis de un material con alta actividad de superficie que se localiza en el espacio alveolar

denominado, surfactante pulmonar (SP). Además los neumocitos tipo II están implicados en la síntesis de componentes de la matriz extracelular y moléculas mediadoras en los procesos de crecimiento y desarrollo, como citoquinas y factores de crecimiento (Gonzalez-2005) y pueden diferenciarse a neumocitos tipo I en caso de daño en el pulmón (Herzog-2008).

Existen además en el epitelio alveolar macrófagos, que tienen un rol fundamental en la defensa inmunológica.

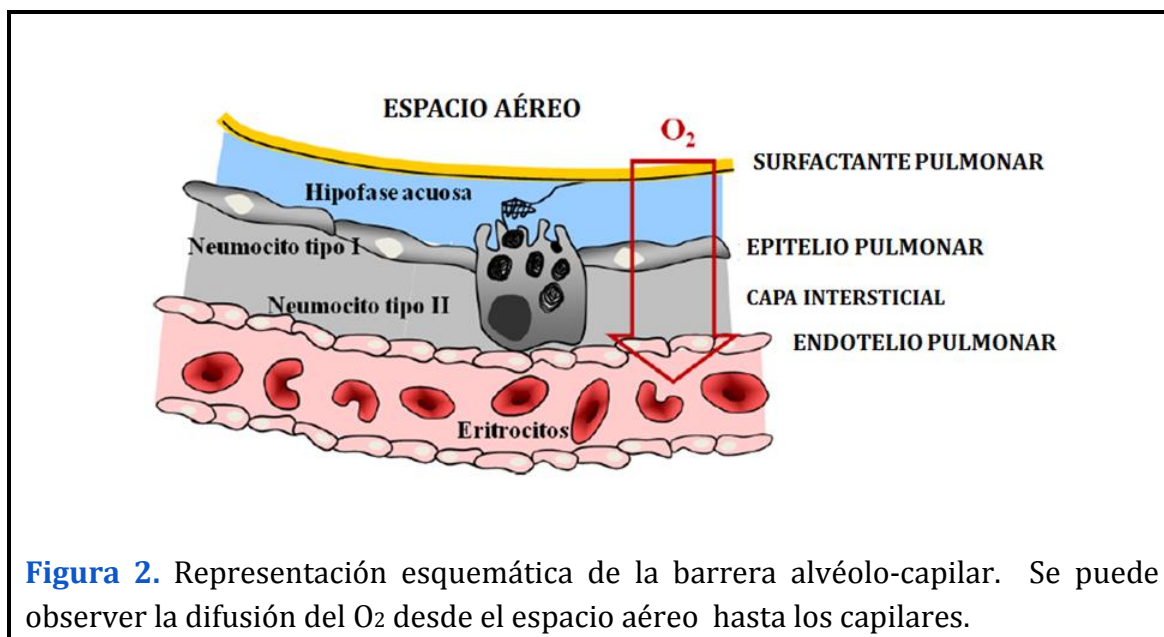


Figura 2. Representación esquemática de la barrera alvéolo-capilar. Se puede observar la difusión del O_2 desde el espacio aéreo hasta los capilares.

2.2 Surfactante pulmonar

El surfactante pulmonar (SP) es una mezcla compleja de lípidos y proteínas que es producido y almacenado por neumocitos tipo II, como estructuras subcelulares denominados cuerpos lamelares (LBs). Se han descrito a los LBs como estructuras multi-membranosas con enzimas lisosomales que mantienen un pH ácido (menor a 6.10) y apolipoproteínas que regulan la función de almacenamiento y procesamiento del SP en forma de bicapas concéntricas (Perez Gil-2008, Wang-2008). 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 y poder llevar a cabo sus funciones. La función principal del SP consiste en facilitar la mecánica respiratoria, minimizando la energía que el tejido pulmonar debe aportar para mantener abierta y expuesta la superficie de intercambio gaseoso durante los sucesivos ciclos de inspiración-expiración, evitando así el colapso alveolar (Zuo-2008). Pero además el SP brinda

respuesta inmunológica innata dado que muchos de sus componentes moleculares constituyen la primera barrera a la entrada de microorganismos patógenos al sistema respiratorio (Pérez Gil-2010). Una deficiencia en la cantidad o en la composición del surfactante pulmonar es causa de atelectasia, daño alveolar y compromete la integridad estructural en la superficie de la mucosa pulmonar, necesaria para hacer eficiente el intercambio gaseoso. Muchos trastornos respiratorios graves como el Síndrome de Distress Respiratorio (SDR) o Síndrome de Distress Respiratorio Agudo (SDRA) se caracterizan por la presencia de edema pulmonar, colapso alveolar e hipoxia (Seeger-1993), síntomas que están asociados a la falta, deficiencia o inactivación del surfactante pulmonar (Matthay-2011).

2.2.1 Composición del surfactante pulmonar

Si bien la composición del Surfactante pulmonar de cada especie animal es única, en todos los organismos la mayor proporción está constituida por lípidos. Los lípidos ocupan el 90% en peso del material tensoactivo, mayoritariamente corresponde a fosfolípidos (FL), el resto son lípidos neutros, entre los que se destaca una proporción notable de colesterol, el 8-10% restante en peso está constituido por proteínas, de las cuales 5-6% son proteínas específicas asociadas al surfactante pulmonar (Figura 3).

En mamíferos la fracción lipídica está compuesta fundamentalmente por fosfatidilcolina (PC) (80% de los fosfolípidos totales), aproximadamente el 40% de la PC se encuentra disaturada en forma de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), la cual es una especie inusual en cualquier otro tejido y tiene implicancias muy importantes en la funcionalidad del SP (Hawgood-1997). La DPPC es principal responsable de las propiedades tensoactivas del surfactante pulmonar, posee dos cadenas de ácidos grasos saturadas que resultan esenciales para la disminución de la tensión superficial por el SP, estas cadenas le permiten al fosfolípido empaquetarse estrechamente en las película interfacial reduciendo al máximo la exposición de las moléculas de agua al aire, y por lo tanto reduciendo al mínimo la tensión superficial de la interfase aire-líquido, evitando el colapso alveolar durante la espiración (Jimenez-2009). El surfactante contiene otras PC insaturadas (25%), fosfolípidos aniónicos, principalmente fosfatidilglicerol (PG), segundo fosfolípido más abundante cuya función es favorecer la homeostasis y estabilidad alveolar, colaborando en la adsorción del SP y su expansión sobre la hipofase y fosfatidilinositol (PI), ambos son fosfolípidos aniónicos con una cabeza polar conteniendo carga negativa a pH fisiológico y

representan el 10% y 2% respectivamente de los fosfolípidos del agente tensoactivo. Además posee otros fosfolípidos como fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) y esfingomielina (SM), así como lípidos neutros, de los que el más abundante es el colesterol (8-10%). El colesterol es fundamental para la dinámica de las membranas del surfactante, y permite la segregación de las fases líquido ordenada (*Lo*) y líquido desordenada (*Ld*) (De la Serna- 2013). Por último es posible encontrar cantidades pequeñas de mono, di, tri acil glicerol y algunos ácidos grasos libres como palmitato (Agassandian-2013).

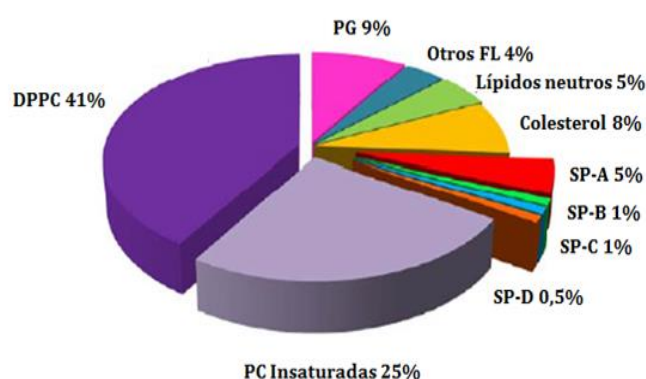
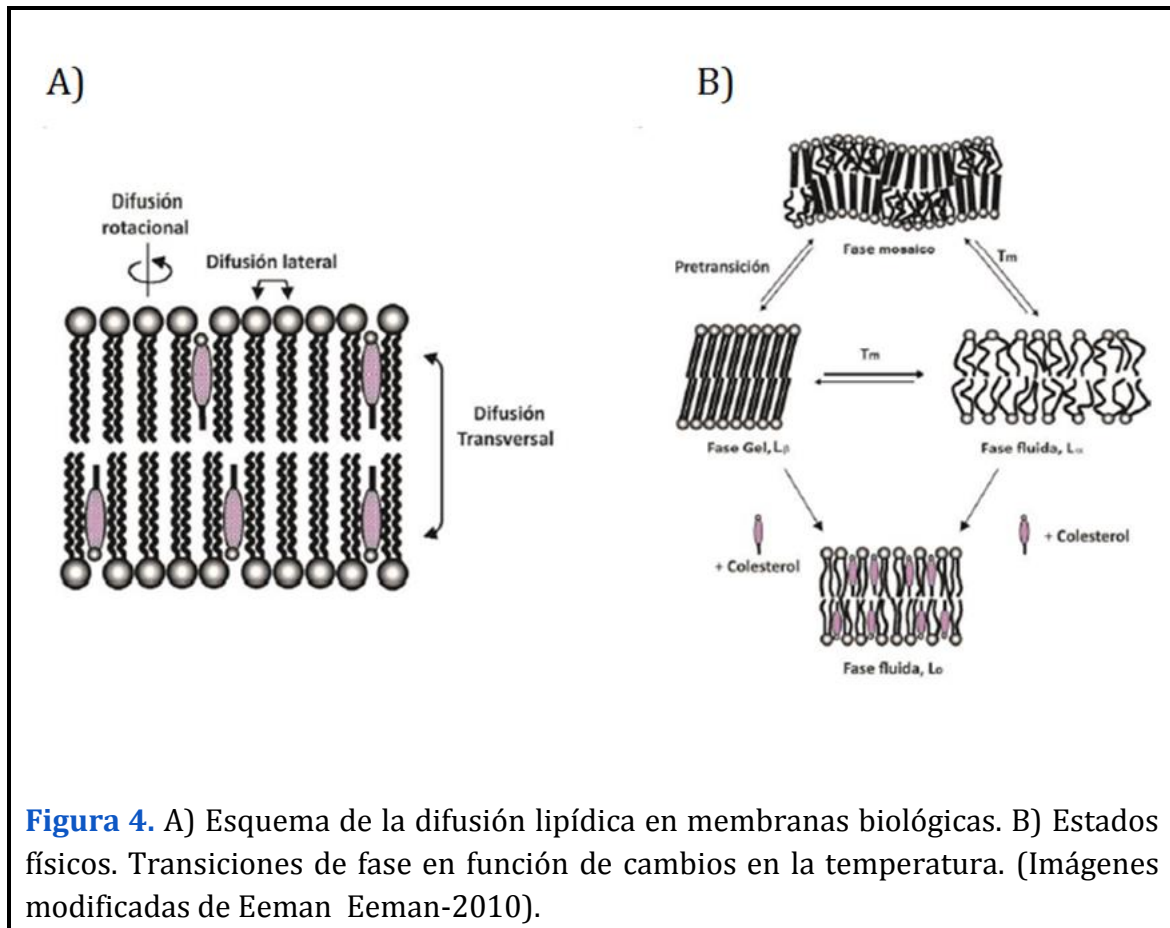


Figura 3. Composición de un surfactante pulmonar tipo en porcentaje de peso seco.

Dependiendo de la cantidad/actividad de agua los fosfolípidos se pueden organizar como bicapas, particularmente se piensa que esta es la forma en la que el surfactante es sintetizado y almacenado por los neumocitos tipo II, sin embargo luego de secretado, el SP en la interfaces aire/agua es capaz de adsorberse y formar monocapas (Perez-Gil-2008). Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, poseen un grupo de cabeza polar o hidrofílica y una cola apolar o hidrofóbica, en estas monocapas se orientan con las cabezas polares hacia la fase líquida y las colas hidrofóbicas apuntando hacia el aire. La organización supramolecular de los fosfolípidos del surfactante depende no solo de la composición sino de la temperatura, los niveles de saturación/insaturación de la fosfatidilcolina y otros fosfolípidos menores, así como la presencia de colesterol y en el caso de la interfase alveolar, el estado de compresión. Los cambios se asocian a parámetros termodinámicos que permiten modificar las propiedades físicas de los lípidos y sus grados de libertad (rotacional, difusional, etc) (Bagatolli-2014)

(Figura 4). Según los grados de libertad, los elementos necesarios para definir adecuadamente una fase en membrana, podemos definir una fase gel (sólida, $L\beta$), líquida cristalina (fluida, $L\alpha$ o líquido desordenada, Ld) o una fase líquido ordenada (Lo) cuando a una membrana por encima de su punto de fusión posee niveles suficientes de colesterol (Bagatolli-2014). Los lípidos son moléculas sociales, lo que significa que expuestos a cambios termodinámicos como compresión, temperatura, fuerza iónica, etc; pueden sufrir transiciones de fase (Figura 4). Esta temperatura o nivel de compresión para llevar adelante la transición es particular para cada fosfolípido y define su respuesta a los parámetros físicos que se están cambiando (Bagatolli-2014). El ordenamiento máximo de los fosfolípidos ocurre a temperaturas por debajo de su temperatura de transición (T_m , melting temperatura) y en ausencia de colesterol, en esta situación, las bicapas de fosfolípidos se encuentran en fase gel ($L\beta$), donde las moléculas de lípidos presentan muy poca movilidad lateral con restricción rotacional y difusional. En el SP dada la presencia de colesterol las membranas se encuentran en el estado líquido-ordenado (Lo), en la cual los fosfolípidos poseen restricción difusional pero no rotacional (figura 4-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 ($L\alpha$) o también conocida como líquido desordenada (Ld). En esta fase las moléculas de lípido están desordenadas y presentan mayor capacidad difusional y rotacional que en la fase anterior (Eeman-2010).



Tal como se mencionó anteriormente, el empaquetado de los FL en una interfaz no solo está definido por temperatura. Es posible identificar la transición de fases por el grado de compresión que tienen los lípidos que componen la monocapa, situación que se da por ejemplo durante el ciclo respiratorio, en el que existe expansión-compresión. En este caso, las transiciones de fase están asociadas a la reducción del radio alveolar, lo cual se traduce en cambios en el área disponible para cada FL. Cuando la compresión es baja los lípidos tienen poca densidad de compactación por lo que poseen libertad de movimiento y se encuentran en fase líquido expandida (L_e), en esta fase la movilidad y el orden de los fosfolípidos es análoga a la fase de bicapa L_{α} . Posteriormente, con el aumento en la compresión se alcanza un estado mucho más compacto que restringe la capacidad de difusión entre las moléculas del FL que la componen, lo que se conoce como fase líquido-condensada (L_c), en esta fase las moléculas están altamente ordenadas y presentan similitud con la fase de bicapa L_{β} (Eeman-2010).

Otro factor determinante de la organización de fosfolípidos en la interfaz es el nivel de colesterol, este modula la fluidez de la membrana y dependiendo de la temperatura, puede favorecer el orden o bien el desorden de los lípidos

que lo conforman. Un alto contenido de colesterol en las bicapas/monocapas de fosfolípidos tiende a disminuir la compactación y generar una mayor libertad de movimiento de los lípidos en las fases ordenadas (L_c en monocapas y L_β en bicapas) por lo que la presencia de colesterol define una fase particular denominada líquido ordenada (L_o). Esta fase tiene características de viscosidad e hidratación particulares y que se asocian con la capacidad del colesterol de interaccionar con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos (Pérez Gil-2008).

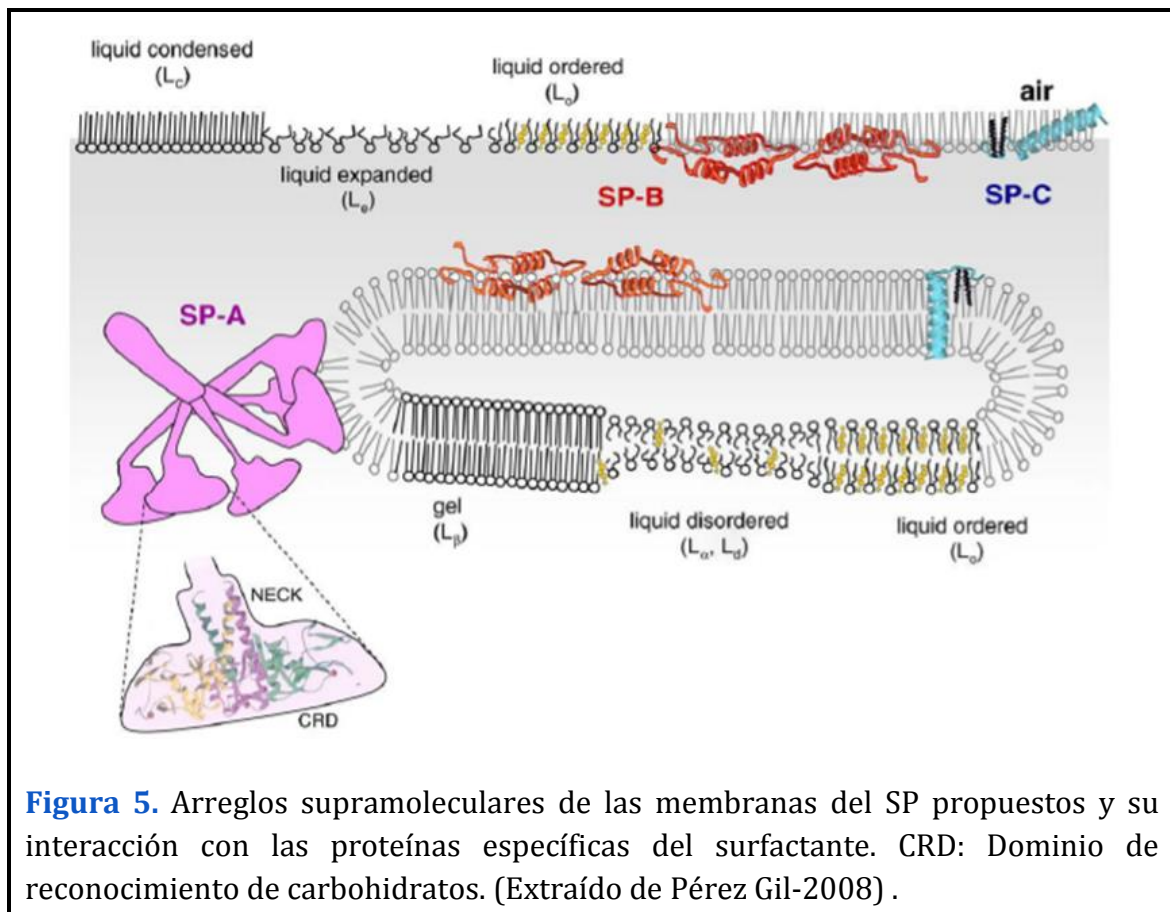


Figura 5. Arreglos supramoleculares de las membranas del SP propuestos y su interacción con las proteínas específicas del surfactante. CRD: Dominio de reconocimiento de carbohidratos. (Extraído de Pérez Gil-2008) .

La fracción proteica del SP está constituida por cuatro proteínas específicas conocidas como SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. Estas cuatro proteínas se agrupan en dos familias en función de su estructura y propiedades, SP-A y SP-D (hidrofílicas) y SP-B y SP-C (hidrofóbicas). La SP-A es la proteína más abundante del SP (aproximadamente un 5%), y pertenece a la familia de las lectinas dependientes de Calcio (colectinas). La SP-B junto con la SP-C constituyen alrededor del 2% del peso seco del surfactante pulmonar. La SP-D se encuentra en muy poca proporción, alrededor del 0,5%, no aparece asociada a complejos lipoproteicos del surfactante por lo que es considerada la proteína de menor relevancia. La ausencia de cualquiera de estas

proteínas del surfactante produce alteraciones respiratorias de mayor o menor gravedad, pero sólo la falta de SP-B resulta letal poco después del nacimiento (Melton-2003, Noguee-2004)

2.2.2 Funciones del surfactante pulmonar

El surfactante pulmonar cumple con tres funciones básicas en el pulmón: reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido, mantener la homeostasis del líquido alveolar y brindar defensa al organismo frente a la entrada de patógenos a partir de una respuesta inmune innata (Meyer-Zimmerman-2002). La reducción de la tensión superficial es considerada la principal función del surfactante, esencial para evitar el colapso alveolar y reducir el trabajo pulmonar, por tanto, será desarrollada en mayor profundidad.

1. Reducción de la tensión superficial en la interfase aire/líquido

Las moléculas en un líquido se encuentran rodeadas por otras moléculas idénticas que ejercen fuerzas sobre ella y pueden establecer interacciones en todas las direcciones, el componente energético de esas interacciones en el seno de la fase acuosa se encuentra equilibrado en todas las direcciones del espacio, sin embargo las moléculas que se encuentran en una interfase líquido-gas presentan ausencia de interacciones con la fase gas, esto genera que sean atraídas hacia el interior por el resto de las moléculas, dando como resultado un componente neto cohesivo hacia la masa de líquido (Figura 6-A) (Notter-2000). Este efecto hace que la superficie minimice su área dado que abrir una nueva interfase supone trasladar nuevas moléculas en equilibrio del líquido a la interfase generando un gasto energético (Olmeda-2011). Esta energía que se necesita da lugar a lo que se conoce como tensión superficial (γ), que es la fuerza necesaria para expandir el área superficial del sistema.

Los agentes tensoactivos de superficie, como el surfactante pulmonar, son capaces de equilibrar las diferencias de fuerzas, disminuyendo así, la tensión superficial (Figura 6-B). La naturaleza anfifílica de los surfactantes (poseen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica) es la responsable de su acumulación en las interfaces aire/agua donde se orientan formando películas monomoleculares capaces de disminuir la tensión superficial.

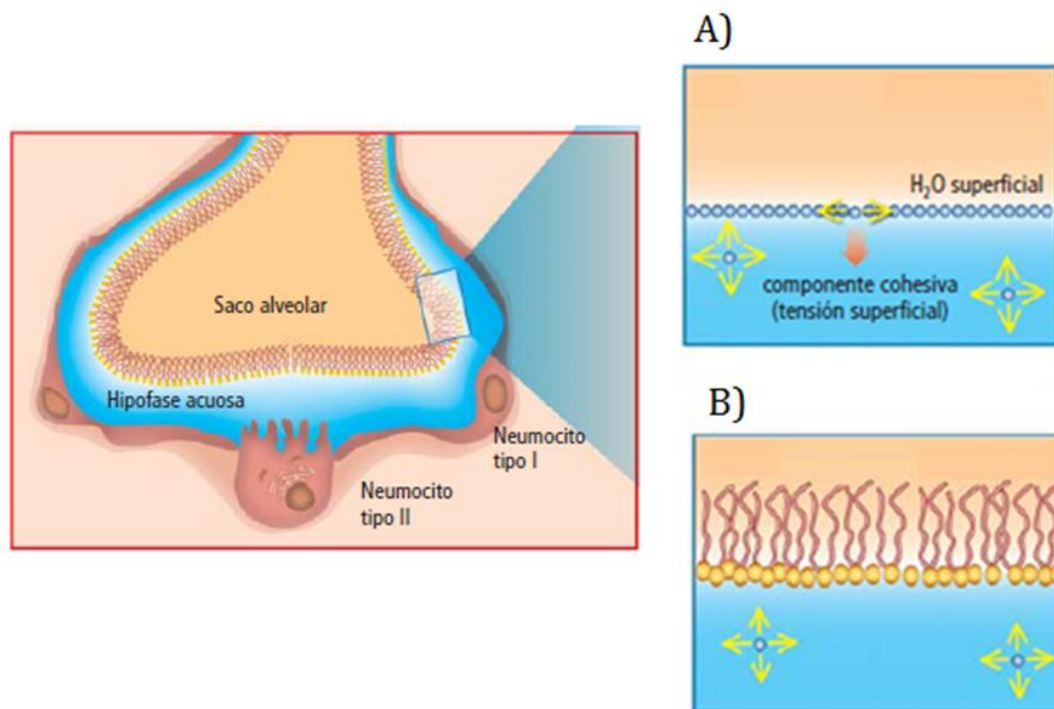
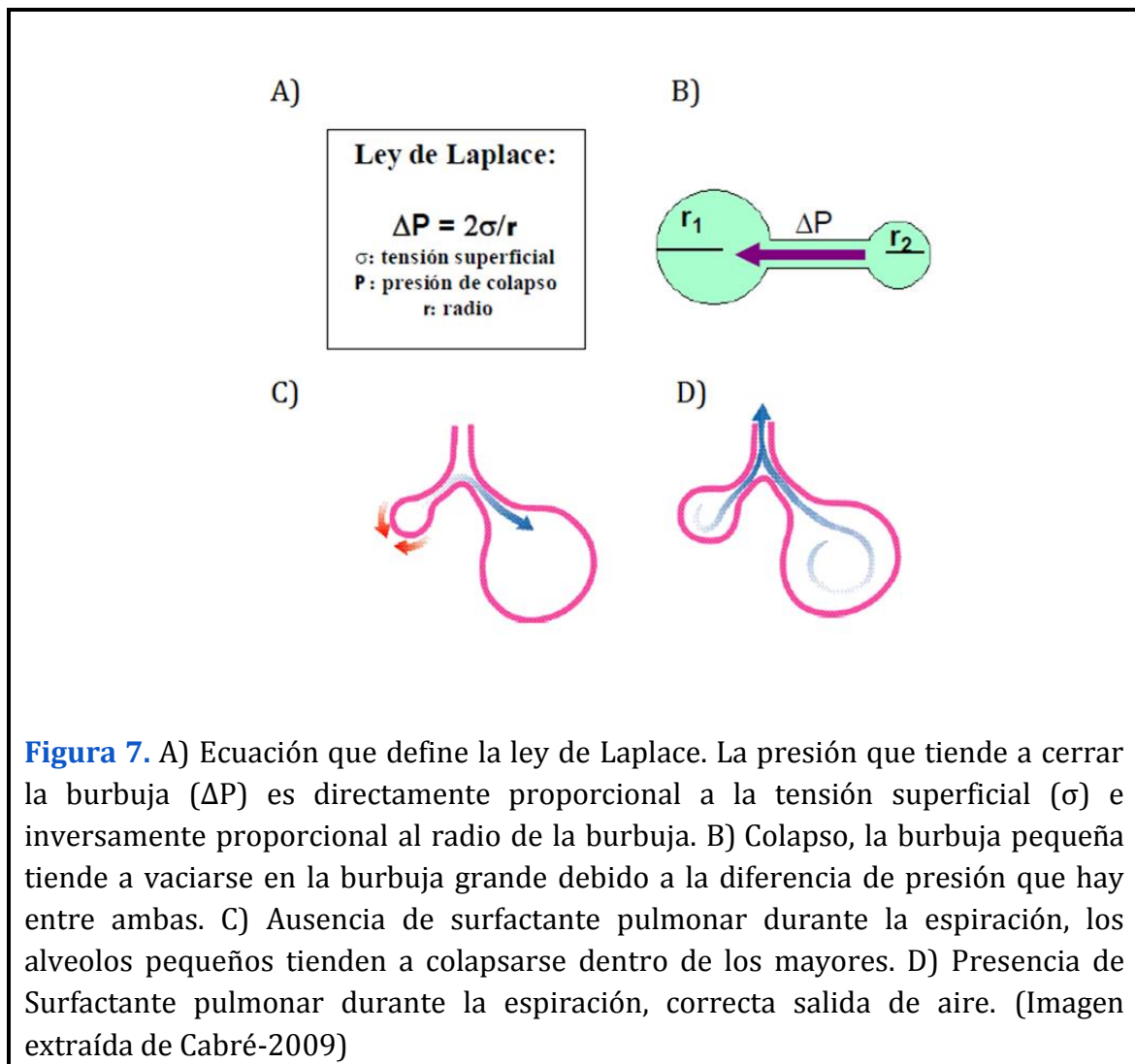


Figura 6. Fuerzas moleculares que causan la tensión superficial. A) En ausencia de agentes tensioactivos, las moléculas de agua en la superficie de contacto con el aire tienen un componente neto cohesivo hacia la masa de líquido, la tensión superficial, que resulta de la falta de interacciones con la fase aérea. B) Los agentes tensioactivos como las moléculas secretadas por el espacio alveolar son compuestos anfipáticos y su disposición en la interfase aire/líquido desplaza las moléculas de agua superficiales. (Modificado de Pérez Gil-2010)

La importancia de la tensión superficial en el contexto del pulmón puede ilustrarse desde el punto de vista cuantitativo por la ley de Laplace, la cual establece que la presión en el interior de una burbuja es directamente proporcional a la tensión superficial e inversamente proporcional al radio de la burbuja. La presión superficial está definida como la reducción de tensión superficial en una interfase agua/aire por la presencia de una película de material surfactante a través de la ecuación: $\pi = \gamma_0 - \gamma$, donde γ_0 es la tensión superficial del agua y γ la tensión superficial cuando el surfactante está presente en la superficie (Notter-2000). Según la ley de Laplace cuanto menor es la burbuja, mayor es la presión que soportan sus paredes. Si consideramos a los alveolos como pequeñas burbujas, teniendo en cuenta que el tamaño de los mismos no es homogéneo y que su volumen varía un 30-40% durante el ciclo respiratorio, en ausencia de surfactante las diferencias de presión entre los más pequeños y los más grandes ocasionaría el colapso de los pequeños durante la espiración dada la alta tensión

superficial de la capa de agua que recubre el epitelio alveolar (Figura 7-C). El surfactante pulmonar tiene la capacidad de disminuir la tensión superficial a valores muy cercanos a cero, por lo que su presencia entre las moléculas de agua hace que el cambio de volumen no incremente las presiones intra-alveolares, evitando así el colapso alveolar (Figura 7-D) (Zuo-Possmayer-2007, Planells-2010). Cuantas más moléculas de tensioactivo se sitúan en la interfase, mayor número de moléculas de agua son liberadas a la fase acuosa y menor es la tensión superficial.



El fosfolípido imprescindible para que el SP pueda llevar a cabo su función es la DPPC, que debido a su estructura molecular es capaz de empaquetarse formando películas interfaciales muy densas, ordenadas y estables durante los momentos de máxima compresión (al final de la espiración), llegando a valores de tensión superficial cercanos a 0 mN/m. A pesar de que DPPC es

una especie tensoactiva muy eficaz, presenta una cinética de adsorción muy lenta y su re-extensión luego del colapso es poco eficiente durante la expansión, por lo que el SP requiere de la presencia de fosfolípidos insaturados y proteínas hidrofóbicas. Estos contribuyen a fluidificar las membranas ricas en DPPC facilitando la adsorción y re-expansión de la monocapa, evitando el colapso alveolar en los sucesivos ciclos respiratorios (Veldhuizen-1998). Se piensa que existe un reservorio de material tensoactivo asociado a la monocapa interfacial donde los fosfolípidos pueden ser re-incorporados rápidamente en cada ciclo de expansión. Para que el SP pueda llevar a cabo su función tensoactiva y muestre actividad óptima en la interfase respiratoria debe presentar una adsorción rápida a la interfase durante la inspiración, reducir la tensión superficial a valores cercanos a 0 mN/m durante la espiración y re-extender el material expulsado durante la compresión para formar nuevamente la película durante la inspiración. La rápida absorción interfacial y la eficiente re-extensión del material se atribuyen particularmente a las proteínas SP-B y SP-C mientras que la capacidad de reducir la tensión superficial a valores mínimos se atribuyen a la composición lipídica del surfactante (Baumgart-2010, Gómez-Gil-2009).

2. Mantenimiento de la homeostasis del líquido alveolar

La presión del líquido de los capilares del pulmón debe mantenerse en equilibrio con la presión que se ejerce desde la hipofase acuosa de la superficie alveolar y que depende de la tensión superficial. Cuando la tensión superficial aumenta tiene como consecuencia un incremento en la presión hidrostática de los capilares, lo que finalmente produce la filtración de líquido desde los capilares hacia la capa intersticial y al espacio alveolar (Ganter-2006). Por tanto la regulación de la tensión superficial por el surfactante pulmonar es importante para controlar el balance de fluidos (Daniels-1998). Estudios han demostrado que la falta o deficiencia de SP en determinadas patologías respiratorias produce una invasión del espacio alveolar con líquido intersticial generando edema pulmonar (Ganter-2006).

3. Defensa del organismo frente a la entrada de patógenos

Dada la gran superficie respiratoria que el pulmón expone al exterior (aprox. 80 m²) para permitir el intercambio gaseoso, es un órgano muy vulnerable a la entrada de agentes potencialmente patógenos y contaminantes. El surfactante constituye la primera barrera física a la entrada de cualquier

microorganismo (Pérez Gil-2010) siendo las principales responsables de dicho papel las proteínas hidrofílicas SP-A y SP-D (Wright-2003), que se unen a la superficie de los patógenos, incluyendo bacterias y virus, y los opsonizan facilitando su fagocitosis por macrófagos y monocitos, además también son responsables de la regulación de la producción de mediadores de la inflamación (Crouch-Wright-2001, Kramer -Speer-2003). La SP-A media respuestas pro o antiinflamatorias según actúe de manera directa sobre los microorganismos uniéndose al lipopolisacárido bacteriano (LPS) o a través de activación de células fagocitarias (Orgeig-2010). La SP-D, que también une LPS, promueve eliminación de patógenos sin la estimulación de una respuesta inmune secundaria (Kuroki-2007).

Los lípidos también participan en la defensa del organismo, suprimen algunas de las funciones de las células inmunes como la proliferación de los linfocitos, por lo que el rol del surfactante en la respuesta inmune está íntimamente relacionado a un equilibrio en la composición entre sus elementos lipoprotéicos (Wright-1997).

2.3 Metabolismo del surfactante pulmonar

2.3.1 Biosíntesis y almacenamiento

El surfactante pulmonar es sintetizado por los neumocitos tipo II. Estos se encargan de sintetizar, almacenar y secretar a través de organelos específicos denominados cuerpos lamelares (LB), todos los componentes del surfactante a la fina capa acuosa que reviste al epitelio, que se conoce como hipofase (Zuo-2008). Los LB son estructuras esféricas, formadas por bicapas concéntricas altamente empaquetadas con lípidos y proteínas del surfactante (Figura 11) (Dietl-2001). Tienen un origen lisoendosomal y poseen en su interior PH ácido, altas concentraciones de calcio y enzimas proteolíticas. Indicios sobre su biogénesis destacan la presencia de la proteína SP-B como esencial para su correcto desarrollo. La biogénesis de LB y el transporte de los lípidos del surfactante a través de estos organelos está facilitado además por la presencia de una proteína de membrana denominada proteína transportadora de unión a ATP A3 (ABCA3, del inglés ATP-binding cassette A3) (Hollenstein-2007, Linton-2007). ABCA3 transporta DPPC, PC y FG desde el RE hacia los LBs y su presencia es muy importante, se ha visto que la ausencia de ABCA3 lleva a la falta de acumulación de las especies saturadas de PC en el surfactante pulmonar, a la ausencia de cuerpos lamelares y como consecuencia a un fallo irreversible

por distres respiratorio en los recién nacidos (Shulenin-2004, Cheong-2007, Somaschini-2007).

Los componentes del SP son almacenados en los cuerpos lamelares luego de su maduración hasta que sea necesaria su secreción a la hipofase acuosa donde sufren transformaciones morfológicas como la formación de mielina tubular o su adsorción a la interfase aire-líquido para formar una película (monocapa). La formación de la mielina tubular (MT) depende de una composición lipídica adecuada, la presencia de las proteínas SP-A y SP-B y de calcio (Benson-1984; Suzuki-1989; Poulain-1992). Está organizada como un entramado de túbulos membranosos en forma de retícula (Perez-Gil-2008) y permite junto con otras estructuras que los componentes del surfactante se liberen y se adsorban rápidamente a la interfase aire/líquido para formar la película tensoactiva (Figura 8).

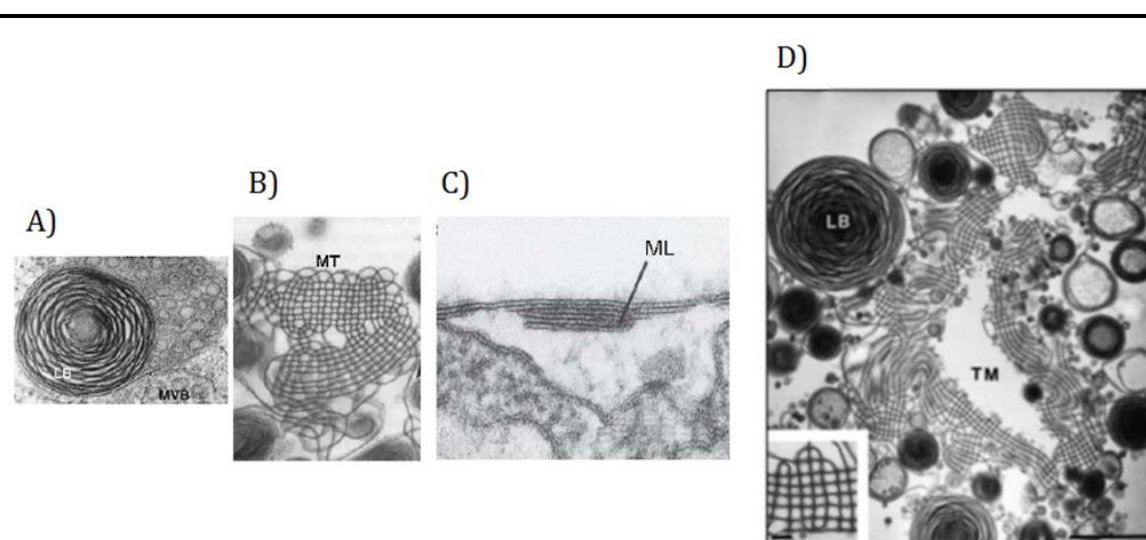


Figura 8. Imágenes de microscopia electrónica que muestran: A) Cuerpo lamelar (LB) en neumocitos tipo II de pulmones de ratón (Weaver-2002). B) La organización de la mielina tubular (MT) a partir de los cuerpos lamelares (Young-1992). C) La película superficial de surfactante sobre un neumocito, en la que se aprecian estructuras multilamelares. D) Cuerpos lamelares y mielina tubular secretados al espacio alveolar (Goerke, 1998).

La síntesis de los componentes lipídicos del surfactante se da en el retículo endoplasmático de los neumocitos tipo II. La PC principal componente del surfactante y de todas las membranas celulares se sintetiza a través de dos vías: síntesis de novo o mediante remodelación de PC insaturada. La síntesis de novo da lugar al 45% de la DPPC, se produce casi exclusivamente a través de la formación de CDP-colina siendo limitante la reacción catalizada por la colinafosfato citidilil transferasa (Van Golde-Casals-1997). La ruta de

síntesis mediante remodelación de especies insaturadas de PC requiere la participación de una serie de enzimas como fofolipasa A2, peroxirredoxina 6 (dependiente e independiente de calcio, respectivamente) y la lisofosfatidilcolina aciltransferasa (Perez-Gil-Weaver-2010) y constituye la principal vía de síntesis permitiendo obtener un 55% de la DPPC. La síntesis de PG y PI depende principalmente de la enzima fosfatidilglicerofosfato sintasa, que actúa convirtiendo CDP-diacilglicerol a fosfatidilglicerolfosfato. En cuanto al colesterol, la mayor proporción es obtenida a partir de las lipoproteínas séricas (Guthmann-1997), el nivel de estas lipoproteínas en sangre se encarga de controlar la síntesis endógena de colesterol a partir de acetato o glucosa en los neumocitos tipo II (Batenburg-Haagsman-1998).

Las cuatro proteínas específicas del surfactante SP-A, SP-B, SP-C y SP-D son sintetizadas en los neumocitos tipo II. La SP-A proteína principal de SP comienza su síntesis como una proteína con un péptido señal un dominio tipo colágeno N-terminal y un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), luego de su translocación al retículo endoplásmico el péptido señal es eliminado y en el lumen del mismo sufre una glicosilación para finalmente ensamblarse como multímero (Weaver-Whitsett-1991). Tanto la SP-B como la SP-C son sintetizadas en forma de precursores pre-pro-proteína de mucho mayor tamaño que las proteínas maduras. Su síntesis ocurre en el retículo endoplásmico y en el caso de las SP-C son di-palmitoiladas en el aparato de Golgi (ten Brinke-2002). Por último, la SP-D tiene un procesamiento muy similar al de SP-A, dando lugar a la proteína madura hidrofílica de 43 KDa.

2.3.2 Secreción y adsorción

La secreción del surfactante se produce a través de 2 vías: Secreción asociada a cuerpos lamelares y secreción no asociada a cuerpos lamelares. En la secreción asociada a cuerpos lamelares están involucrados lípidos y proteínas hidrofóbicas. Las proteínas hidrofóbicas del surfactante, SP-B y SP-C inmaduras son transportadas hacia los LB desde la membrana del RE pasando por el aparato de Golgi y los cuerpos multivesiculares donde son procesadas por la acción de enzimas proteolíticas y secretadas junto con los lípidos que se encuentran en su interior (Oosterlaken, Dijksterhuis-1991b). Por otro lado, las proteínas hidrofílicas del surfactante SP-A y SP-D, en su síntesis de novo, no están asociadas a cuerpos lamelares por lo que su secreción se produce de manera independiente del resto de sus componentes (Crouch-1991, Voorhout-1992, Osanai-1998).

La secreción asociada a cuerpos lamelares puede ser desencadenada por varios estímulos siendo el principal la hiperventilación (Hawgood-1997),

esta es debido a la acción mecánica producida por distorsión celular, también por cambios en el pH extracelular y/o ambos factores (Batenburg-1995). La secreción de surfactante pulmonar se produce por exocitosis de los cuerpos lamelares mediado por calcio citosólico. El estiramiento que sufre el tejido pulmonar durante la ventilación activa la vía de secreción dependiente de calcio en los neumocitos tipo II incrementando el nivel de calcio citosólico necesario para la fusión de los cuerpos lamelares con la membrana apical del neumocito (Ashino-2000, Frick-2004). Sin embargo, la secreción de surfactante también tiene lugar por mecanismos independientes de calcio, donde intervienen receptores β -adrenérgicos, adenosina A2B, y purinérgicos P2Y2. Los receptores β -adrenérgicos y los receptores de adenosina AB activan una vía de excreción dependiente de AMPc, la enzima adenilato ciclasa genera AMPc y se activa la enzima protein-quinasa A dependiente de AMPc que interviene en la fosforilación proteica y posterior liberación de surfactante (Rooney-2001).

Luego de que se produce la fusión entre los LBs y la membrana apical del neumocito tipo II, el SP se libera y con la colaboración de la SP-A, se expande sobre la hipofase (Fehrenbach-2005). Los LBs secretan las membranas de surfactante que se intercalan entre sí, dando lugar a una organización tubular en forma de red denominada mielina tubular (MT) (Aberg-2010). Estas estructuras del surfactante son de gran importancia para su absorción, facilitan el tránsito del material tensioactivo desde la subfase a la interfase aire-líquido alveolar (Perez-Gil, 2008).

A partir de la mielina tubular y de otras estructuras, los componentes del surfactante son liberados y se adsorben rápidamente en la interfase aire/agua dando lugar a la formación de la película tensoactiva, pese a esto, se ha demostrado también que es posible liberar material tensoactivo directamente de los cuerpos lamelares a una interfase independientemente de la formación intermedia de mielina tubular (Haller-2004). Existe un reservorio de surfactante asociado a la interfase compuesto de múltiples capas implicado en el mantenimiento y estabilidad de la película tensoactiva. Este reservorio facilita la reinserción de material tensoactivo a lo largo de los sucesivos ciclos de inspiración/espriación, alberga el SP durante la exclusión en la espriación y permite su re-inserción durante la inspiración, por lo que es clave para evitar la pérdida definitiva de material tensoactivo durante la respiración (Figura 9) (Perez Gil-2008).

Actualmente se considera el surfactante pulmonar en el espacio alveolar como un arreglo supramolecular con una estructura tridimensional que considera la función tensoactiva desde el punto de vista dinámico y que permite a la vez un correcto intercambio gaseoso, estabilización mecánica y

protección de la superficie expuesta del pulmón frente a patógenos (Pérez Gil-2014).

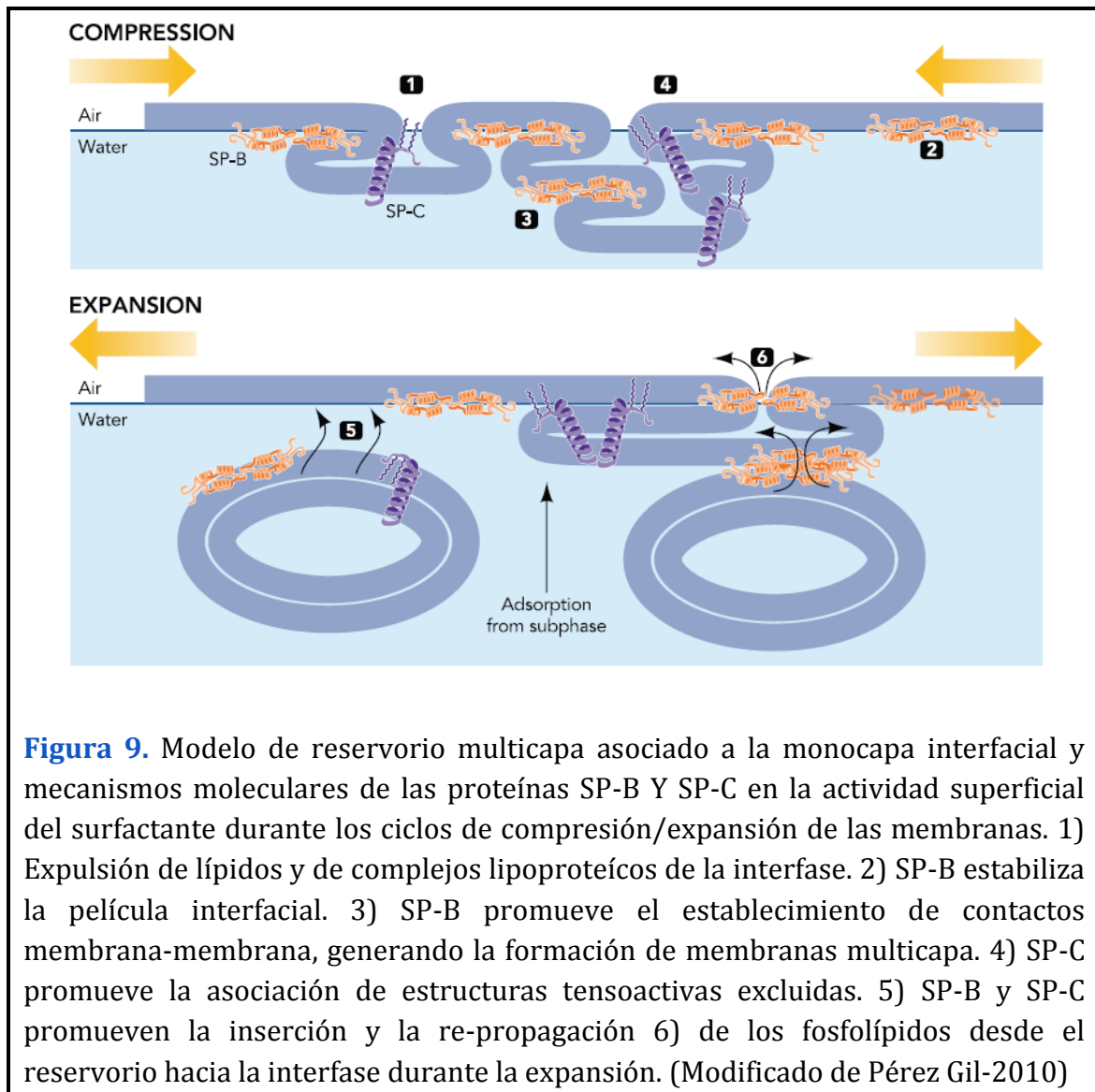


Figura 9. Modelo de reservorio multicapa asociado a la monocapa interfacial y mecanismos moleculares de las proteínas SP-B Y SP-C en la actividad superficial del surfactante durante los ciclos de compresión/expansión de las membranas. 1) Expulsión de lípidos y de complejos lipoproteicos de la interfase. 2) SP-B estabiliza la película interfacial. 3) SP-B promueve el establecimiento de contactos membrana-membrana, generando la formación de membranas multicapa. 4) SP-C promueve la asociación de estructuras tensoactivas excluidas. 5) SP-B y SP-C promueven la inserción y la re-propagación 6) de los fosfolípidos desde el reservorio hacia la interfase durante la expansión. (Modificado de Pérez Gil-2010)

2.3.3 Degradación y reciclaje

Una vez secretado y adsorbido para formar la película interfacial y cumplir su función, una parte del surfactante es internalizado mediante endocitosis por los neumocitos tipo II para su reutilización. La endocitosis tiene lugar debido a la formación de pequeñas vesículas, que forman los pequeños agregados del SP, que son internalizadas por los neumocitos tipo II para permitir el reciclaje de aproximadamente el 90% del material (Weaver-2001). El 10 % restante es capturado y degradado por macrófagos alveolares.

Al igual que los fosfolípidos las proteínas del surfactante pueden ser recapturadas por los neumocitos tipo II. SP-A puede ser internalizada por los macrófagos y degradada en los lisosomas, o reciclada por los neumocitos tipo II que la recapturan mediante su receptor P63 de manera dependiente de calcio (Stevens-2001). SP-B se fija a zonas determinadas de la membrana de los neumocitos tipo II (Bates-1992) para ser internalizada, una parte es secretada de nuevo con los cuerpos lamelares y otra fracción es degradada en el interior de estas células y en macrófagos alveolares. SP-C es recapturada y vuelta a secretar al espacio intra-alveolar en un proceso favorecido por la proteína SP-A e inhibido por la SP-B (Baritussio-1992, Pinto-1995, Horowitz-1997a). Por otro lado SP-D es degradada por macrófagos alveolares, en un proceso que es independiente de la presencia de SP-A y lípidos del surfactante (Dong & Wright-1998).

2.4 Patologías asociadas al surfactante pulmonar

La deficiencia de SP conduce a problemas respiratorios severos, como consecuencia de la pérdida de funciones tensioactivas, anti-inflamatorias, y antipatogénicas que posee el surfactante.

El SP es uno de los últimos sistemas en madurar durante el desarrollo fetal, la síntesis y acumulación de DPPC, así como la síntesis de PG y de las proteínas específicas del surfactante, se dispara alrededor de la semana 35 de gestación, por tanto, niños prematuros nacidos previo a las 35 semanas de gestación presentan falta total o parcial de surfactante. La deficiencia de algunos de sus componentes resulta letal para los recién nacidos, un ejemplo claro es la proteína SP-B, implicada en la homeostasis pulmonar. Su ausencia imposibilita desalojar el líquido amniótico que rellena sus pulmones desarrollando una patología que se conoce como síndrome de distrés respiratorio en infantes (SDRI) (Meyer-Zimmerman-2002).

En neonatos la falla pulmonar también se puede generar por la aspiración de meconio en el momento del parto. El meconio corresponde a las heces del recién nacido y se genera por estrés prenatal, caracterizándose por elevadas concentraciones de colesterol y sales biliares. Los altos niveles de colesterol y sales biliares presentes perturban la membrana surfactante impidiendo que pueda llevar a cabo sus funciones (López-Rodríguez-2011).

El síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) es una enfermedad compleja que se da en adultos y se caracteriza por la presencia de inflamación generalizada a nivel pulmonar, afectando las funciones del epitelio alveolar. Se observa un aumento de la permeabilidad alvéolo-capilar que conlleva liberación de proteínas del plasma y edema en los espacios

alveolares. Como consecuencia se produce la inactivación del surfactante, atelectasia, por aumento de la tensión superficial mínima durante la espiración y alteración del intercambio gaseoso (Matthay-2011).

Durante el SDRA se producen alteraciones en el contenido de las especies lipídicas y proteicas fundamentales para el funcionamiento del SP. Se genera disminución de la cantidad de fosfolípidos totales, principalmente FG (Obladen-1983), aumento de los fosfolípidos minoritarios (FI, FS, FE, SM), disminución de las cantidades de SP-A, SP-B y SP-C y por consiguiente ausencia de mielina tubular (Weaver-Whitsett-1991) y un incremento de las proteínas séricas asociadas a la fracción activa del SP, lo cual se debe a la alteración de la barrera alveolo-capilar (Panda-2004). Se ha identificado también aumento de la cantidad de colesterol desde un 5% (p/p) en el surfactante normal a proporciones del 20% cuando existe daño pulmonar agudo (Panda-2004, Gunasekara-2005, Zuo-2008).

El SDRA es uno de los principales motivos para iniciar una asistencia ventilatoria mecánica. Estudios recientes de tipo metabólico han podido identificar una alteración de los componentes energéticos y de algunos lípidos de las membranas durante la ventilación mecánica con volúmenes corrientes elevados (Izquierdo-García-2014).

Todas estas alteraciones generadas por diferentes patologías pulmonares y como efecto de la asistencia ventilatoria mecánica producen la inhibición de las funciones del surfactante. Una alternativa para el tratamiento de estas patologías es la utilización de surfactantes exógenos.

La primera vez que se utilizaron surfactantes exógenos con éxito fue en 1985 cuando Tore Curstedt probó su administración en neonatos como forma de tratamiento de SDRI. Si bien los resultados en este caso fueron alentadores y se ha visto que la utilización de surfactante pulmonar exógeno mejora la función pulmonar, no ha sido completamente efectivo para adultos con SDRA (Curstedt-2015).

2.5 Mecánica respiratoria

En condiciones normales el ser humano moviliza aire entre la atmósfera y el alvéolo y viceversa, fenómeno que se conoce como ventilación. Este es un proceso que consume energía aportada a través de la contracción muscular generando un gradiente de presión entre el espacio alveolar y la atmósfera que favorece el intercambio gaseoso (Cristancho, west-2004). En la primera fase del ciclo ventilatorio, durante la inspiración, la contracción del diafragma y los intercostales externos genera un aumento del volumen

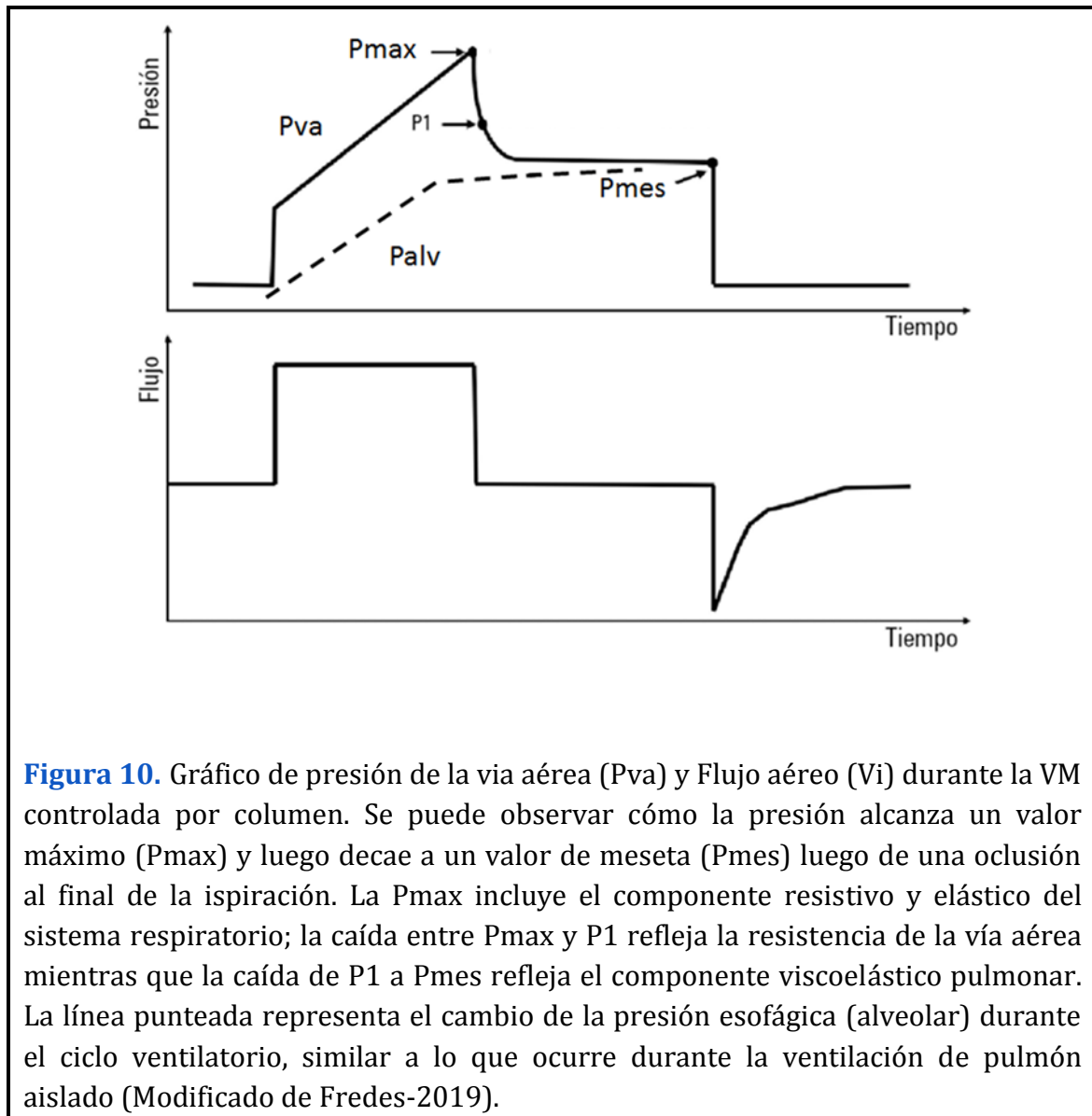
intratorácico con la consecuente disminución de la presión en la cavidad. Esta presión se torna negativa o subatmosférica con lo que se crea el gradiente de presión en sentido atmósfera-alvéolo que produce el llenado pulmonar. En fase espiratoria este gradiente se invierte principalmente por acción de la elasticidad pulmonar generando la presión supra-atmosférica o positiva necesaria para el vaciado pulmonar (Cristancho-2004). Este proceso involucra entonces tres variables: presión, volumen y flujo, la diferencia de presión a lo largo del sistema respiratorio debe ser suficiente para vencer las resistencias elásticas del pulmón generando un cambio del volumen del tejido pulmonar suficiente para vencer las resistencias viscosas de la vía aérea y determinar así un flujo de aire a través de ella. La relación entre estas tres variables se define mediante la ecuación:

$$\Delta P = (E \times V) + (R \times f)$$

Donde ΔP representa el gradiente de presión generado, E representa la elasticidad, V el volumen movilizado, R la resistencia anatómica de la vía aérea y f el flujo generado. La P se define como fuerza por unidad de área y se expresa en cmH₂O, la presión atmosférica es tomada como valor cero, de modo que las presiones serán positivas o negativas en función de ese valor. Para evaluar los cambios de presión en el sistema respiratorios se utiliza algún punto del sistema respiratorio como boca, vía aérea, alvéolo y se evalúa la diferencia de presión entre ese punto y la presión atmosférica. Los gradientes de presión mas importantes en la vía aérea son: La presión de la vía aérea (P_{va}), diferencia entre la presión alveolar y la presión a nivel de la boca es la energía necesaria para vencer la resistencia de la vía aérea y por lo tanto es la mayor determinante del flujo de aire. La presión transpulmonar (P_{tp}), que esta definida por la diferencia de presión entre el espacio pleural y el alveolar y representa una medida de las fuerzas elásticas en los pulmones que tienden hacia el colapso. Presión transtorácica (P_{tx}), que es la diferencia de presiones entre el espacio pleural (cara interna de la caja torácica) y la presión atmosférica (cara externa), representa la energía necesaria para deformar la caja torácica. La presión del sistema respiratorio (P_{sr}), equivale a la diferencia entre la presión alveolar y la atmosférica y es la suma de la P_{tp} y la P_{tx} . Por último la presión transdiafragmática (P_{diaf}), que es la diferencia entre la presión pleural y la abdominal y refleja la contracción diafragmática (Briva-2011B, Grieco-2017).

Por otro lado, el flujo es definido como el volumen que circula en un punto determinado por unidad de tiempo, comúnmente se expresa en L/s y es medido mediante un flujímetro de presión variable (neumotacógrafo) o de resistencia variable. El flujo se puede diferenciar en laminar o turbulento, durante un flujo laminar el aire se desplaza a la mayor velocidad y por lo tanto desplazando el mayor volumen, generando la mínima fricción contra la paredes de la vía aérea. En oposición con el flujo turbulento donde hay un marcado aumento de la fricción generando un aumento de la resistencia a avance a través de la vía aérea disminuyendo la eficacia del gradiente de presión para movilizar el aire. Esta resistencia generada por el flujo turbulento es conocida también como un componente viscoso y en contra posición se denomina componente viscoelástico al elemento aportado por las propiedades del tejido pulmonar (Balcells-2003, Briva-2011B).

Durante la VM con flujo constante de todo el sistema respiratorio (que incluye tejido pulmonar y caja torácica) se puede observar que la Pva en el proceso inspiratorio aumenta hasta lograr un nivel máximo ($P_{m\acute{a}x}$). Cuando se hace una pausa inspiratoria mediante oclusión al final de espiración la Pva disminuye hasta que se estabiliza alcanzando una presión denominada presión de meseta (P_{mes}), esta presión refleja la P_{alv} y se corresponde con la presión de distensión alveolar o de retroceso elástico mientras que la $P_{m\acute{a}x}$ esta influenciada por la resistencia de la vía aérea. Al realizar ventilación de pulmón aislado se observa el comportamiento del tejido pulmonar exclusivamente (Figura 10) (Hurtado & Santos-2005, Marini-2019, Fredes-2019).



2.5.1 Resistencias elásticas

El pulmón es una estructura elástica, tiende a recuperar su posición de reposo, las fuerzas que se oponen al aumento de volumen por encima de su volumen de reposo son las elásticas y restrictivas (Hurtado & Santos- 2005). La relación entre ΔP y ΔV (Cambio de volumen) define las características elásticas del sistema respiratorio, el cambio de presión necesario para generar un determinado cambio de volumen se denomina *Elastance* (E) y está definida por la ecuación:

$$E = \frac{\Delta P}{\Delta V}$$

Su inverso, define lo que se conoce como *Compliance* (C), capacidad de deformación del sistema ($C = \Delta V / \Delta P$). Aunque se pueden usar indistintamente, en la clínica la Compliance es el término utilizado para expresar las resistencias elásticas. Puesto que el sistema respiratorio está formado por dos estructuras colocadas en serie, el pulmón propiamente dicho y la caja torácica, las variaciones de uno u otro componente producen cambios de la *compliance* total del sistema. Debido a que cada una de estas estructuras tiene una presión relevante (Pva para el sistema respiratorio, Ptp para el parénquima pulmonar y presión pleural para la caja torácica), la distensibilidad de todo el sistema respiratorio estará dada por la relación entre el incremento de volumen y el cambio de presión en las vías aéreas, la distensibilidad pulmonar y la distensibilidad de la pared torácica (Perez & Mancebo-2006, Correger-2012).

En pacientes ventilados mecánicamente la *Compliance* se obtiene a partir del cociente entre el volumen circulante administrado por el ventilador (Volumen corriente, Vc) y la diferencia de presión (P) entre el final de la inspiración (Pmes) y el final de la espiración (PEEP). Según los gradientes de P utilizados la C puede ser dinámica (Cdin) o estática (Cest) y está definida por las ecuaciones:

$$C_{est} = V_c / (P_{mes} - PEEP_T)$$

$$C_{din} = V_c / (P_{mes} - PEEP_T)$$

Donde la PEEP_T es la suma de la PEEP aplicada más la PEEP intrínseca (PEEP_i). La PEEP_i se genera cuando el volumen alveolar al final de la espiración es mayor al volumen de reposo pulmonar (Perez & Mancebo-2006).

2.5.2 Relación presión- volumen

La representación grafica de esta relación está dada por la curva de presión (P)/volumen (V) que puede observarse en la figura 11. Esta relación entre P y V no es lineal, cada punto de la curva representa una medida de P y su V correspondiente y permite calcular la C para ese volumen, sin embargo lo mas importante es la tendencia de esos puntos, para lo que se requiere medidas sucesivas tomadas a diferentes volúmenes y presiones que se representan en forma de segmentos en la curva (Pérez & Mancebo-2006, Correger-2012). La curva se caracteriza por ser sigmoidea y presenta tres zonas o segmentos con diferente pendiente. En el segmento inicial (bajo volumen pulmonar) donde la pendiente de la curva se aplanan existe un

cambio proporcional entre el aumento del V y el aumento de P, en ese segmento hay una C baja. En cambio en el segmento central aumentos casi nulos de volumen generan importantes aumentos de presión en el sistema, por lo que la pendiente es mayor. Se corresponde con los volúmenes pulmonares de una ventilación normal y presenta la mayor C. En el último segmento la C decae por sobredistensión del parénquima pulmonar presentando al igual que el segmento inicial baja C (Hurtado& Santos-2005, Perez & Mancebo-2006, Correger-2012).

Por otro lado, si bien la rama inspiratoria y la rama espiratoria de la curva de P/V comparten casi todas las características básicas, no se comportan de igual forma. Una de las propiedades del tejido pulmonar denominada histéresis hace que el desplazamiento en las ramas inspiratoria y espiratoria sea diferente debido a que la presión generada para cualquier volumen durante la insuflación es mayor a la generada durante la desinsuflación. La curva espiratoria varía dependiendo de las presiones que son alcanzadas durante la insuflación, cuanto mayor es la P y el V insuflados, mayor será la histéresis y por tanto mayor energía perdida en cada ciclo (Briva-2011B). El sistema SP es uno de los componentes implicados en la generación de esta diferencia de presiones, debido a que durante la fase de contracción sus moléculas adoptan una mejor disposición, mejorando sus propiedades tensoactivas y disminuyendo la tensión superficial de manera mas efectiva que durante la insuflación (Figura 11).

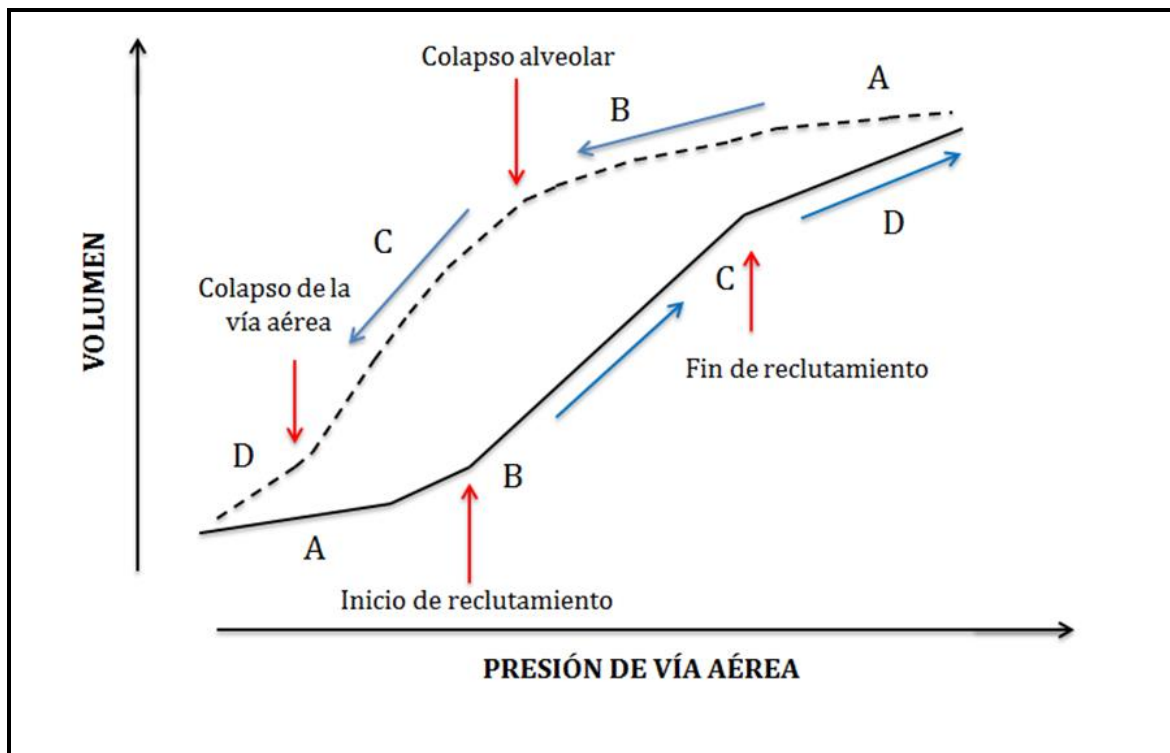


Figura 11. Esquema representativo de una curva P/V donde se ilustra la rama inspiratoria (línea llena) y la rama espiratoria (línea punteada). Rama inspiratoria: A) Refleja la ventilación del tejido aereado (“baby-lung”), en el momento en el que la mayoría del tejido pulmonar está colapsado, B) Luego del primer punto de inflexión en la curva, se produce reclutamiento progresivo de las unidades alveolares que genera un cambio en la pendiente de la curva P/V, C) expansión elástica del tejido pulmonar, D) Luego de finalizado el reclutamiento alveolar, se produce la sobredistensión alveolar, el cambio de presión se incrementa disminuyendo así la compliance. Rama expiratoria: A) sobredistensión, una vez insufladas se necesitan presiones menores para mantener abiertas las unidades alveolares y en consecuencia la relación P/V es diferente en ambas fases, B) retracción elástica del tejido pulmonar, C) el inicio del colapso alveolar marca el comienzo del desreclutamiento de las unidades alveolares, D) Colapso de la vía aérea. (Modificado Hurtado & Santos- 2005).

2.6 Ventilación mecánica

Diversas situaciones pueden afectar el proceso ventilatorio y su principal objetivo, el intercambio gaseoso. La ventilación mecánica (VM) es un método de sostén que suple o complementa la función ventilatoria. La VM actúa de forma distinta a la ventilación espontánea, se genera una presión positiva en la vía aérea durante la inspiración a la que se opone la resistencia al flujo aéreo y las propiedades elásticas del sistema respiratorio, de esta manera se genera un gradiente de presión entre la vía aérea y el alvéolo que desplaza un volumen de gas proporcional al nivel de presión aplicado (Figura 12) (Lovesio-2006, West-2007). Las funciones principales de la VM son proveer gas al paciente según determinadas condiciones de volumen, presión, flujo y tiempo, manteniendo de forma adecuada el intercambio pulmonar de gases y disminuir el trabajo respiratorio asegurando el reposo pulmonar cuando sea necesario (Gutierrez-2011).

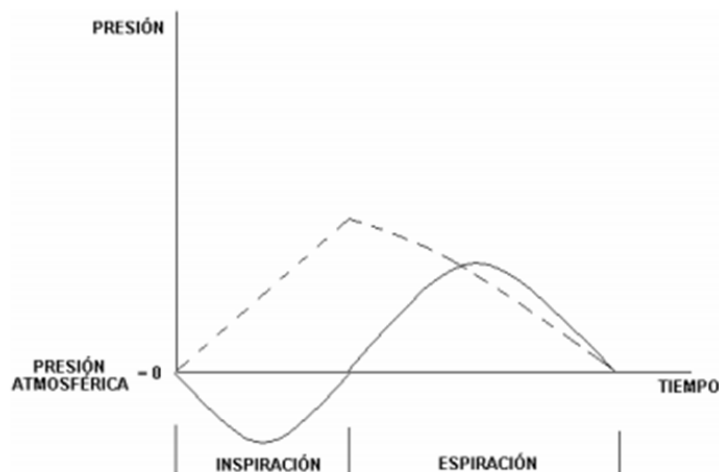


Figura 12. Curva presión-tiempo durante la ventilación espontánea (línea continua) y durante la ventilación mecánica (línea punteada). Obsérvese que en la primera la presión es negativa en fase inspiratoria y positiva en fase espiratoria. Durante la ventilación mecánica la presión es positiva durante todo el ciclo.

La VM es requerida para el tratamiento y soporte vital en múltiples patologías tanto pulmonares como extra pulmonares. Es una alternativa terapéutica, que nos brinda la oportunidad de suministrar un soporte avanzado de vida eficiente a los pacientes que se encuentran en estado crítico padeciendo de insuficiencia respiratoria (IR) (Gutierrez-2011). La lesión pulmonar aguda (LPA) constituye una de las principales causas de insuficiencia respiratoria en pacientes de cualquier edad con una elevada mortalidad. Estudios internacionales estiman que la LPA afecta a más de 300.000 personas cada año en EE.UU, siendo la VM uno de los pilares fundamentales para su tratamiento (Kahn-2006). Sin embargo, la propia VM es capaz de producir injuria pulmonar, situación reconocida como Injuria Pulmonar Inducida por la Ventilación Mecánica (VILI). La lesión del epitelio alveolar juega un rol primario en el desarrollo de VILI, afectando diversas funciones como la secreción de surfactante y la barrera de intercambio gaseoso (Dreyfuss-1994, Sartori-2002). Este fenómeno se produce tanto en pulmones previamente sanos, como en aquellos dañados, pero se ha demostrado, tanto in vivo como en modelos experimentales, que es de mayor intensidad en aquellos pulmones con LPA preexistente, empeorando aún más el pronóstico de estos pacientes. La VILI se produce principalmente por sobredistensión alveolar, proceso relacionado con el riesgo de rotura de la vía aérea y paredes alveolares en los sectores pulmonares no dependientes (barotrauma, asociado a elevada presión positiva inspiratoria

y/o volutrauma asociado a elevado volumen corriente en los espacios aéreos), y por la apertura y colapso cíclicos de las unidades alveolares dependientes, relacionado con la aplicación de un nivel de PEEP insuficiente para evitar el colapso-reapertura alveolar cíclico (atelectrauma)(Slutsky-2013). Esto se corresponde con ambos extremos de la curva de presión-volumen del sistema respiratorio (Donoso-2007, Slutsky-2013).

La VILI se asocia fuertemente a las alteraciones presentes en el SDRA. El SDRA define un daño microvascular pulmonar de carácter difuso con un aumento de la permeabilidad de la membrana alveólo capilar. Se manifiesta como un edema pulmonar, con la consecuente hipoxemia e incremento del trabajo respiratorio producto de una alteración de las fuerzas elásticas del pulmón (Arancibia & Soto -2010). El SDRA es una afección heterogénea, con áreas de colapso, zonas reclutables y regiones normales. La presión hidrostática del pulmón es mucho mayor y el tejido colapsado puede llegar hasta un 70-80%, de este modo el intercambio gaseoso se desarrolla en las zonas ventiladas (no más allá del 30%) y en las posteriormente reclutadas. La disminución de la distensibilidad observada refleja una menor capacidad de ventilación, con una menor superficie de intercambio, siendo ésta la base del concepto de pulmón pequeño o "baby lung"; por el contrario la magnitud de la hipoxemia se asocia fuertemente a la cantidad de tejido no ventilado (fenómeno de shunt). Sólo una pequeña parte del pulmón con SDRA está disponible para el intercambio gaseoso, una ventilación con bajos Vc busca reducir el estrés sobre los alvéolos ventilados, aportando un Vc menor que el tamaño del "baby lung"(Donoso-2007, Tomicic-2010, Slutsky-2013).

La estrategia de VM con un patrón protector intenta reducir la VILI, minimizando la sobredistensión alveolar y evitando las atelectasias cíclicas. Esta modalidad involucra la utilización de presión positiva al final de la espiración (PEEP) para evitar el daño producido por el colapso y apertura alveolar cíclica, y Vc bajos previniendo la sobredistensión alveolar (Slutsky-2013, Hamlington-2018, Marini-2019).

2.6.1 Patrones ventilatorios protectivos

En los últimos años los progresos en la evaluación de la mecánica pulmonar han permitido una mejor comprensión de la fisiopatología pulmonar en el paciente ventilado. La limitación de los volúmenes corrientes aplicados y el uso de PEEP con la intención de reclutar unidades alveolares y evitar el daño por colapso-reapertura alveolar forman parte de la estrategia para disminuir los efectos de la VM (Tomicic-2010, Slutsky-2013). El edema

pulmonar y el colapso alveolar de fin de la espiración caracterizan a varias formas de insuficiencia respiratoria. En estas situaciones, la presión positiva espiratoria final (PEEP) baja puede ser insuficiente para estabilizar alvéolos y mantenerlos abiertos, aumentando así la probabilidad de lesión pulmonar inducida por el respirador por atelectrauma (Donoso-2007). Por otro lado, El uso de niveles excesivos de PEEP tiene sus desventajas, a nivel pulmonar puede ser el punto de partida del barotrauma y puede causar disminución de la distensibilidad. Hoy en día se sabe que la aplicación de PEEP disminuye significativamente las atelectasias cíclicas y en definitiva daño alveolar. Sin embargo no existe una única estrategia para establecer el nivel óptimo de PEEP aplicado ni un valor de referencia universal, por lo que su uso debe ser personalizado a cada caso clínico en particular (Arancibia & Soto-2010). Una estrategia que se utiliza para determinar el nivel de PEEP óptimo es la titulación de PEEP de acuerdo a parámetros de distensibilidad pulmonar. En el mismo se realiza una maniobra inicial de reclutamiento, y se establece la compliance pulmonar bajo un régimen de PEEP alto (20 cmH₂O o más), para luego efectuar una destitución regresiva, con reducciones de 2 cmH₂O cada 20 minutos y midiendo la compliance en cada estación. Se estima que la PEEP superior a aquél en que la compliance empieza a decaer es el óptimo. Las recomendaciones de los expertos y las actuales evidencias indican que la utilización de niveles de PEEP mayores a 5 cm H₂O podría minimizar el estiramiento al final de la inspiración y evitar un posible colapso alveolar (Seiberlich-2011).

En cuanto al volumen corriente (V_t), en el año 2000 se publica un ensayo multicéntrico que marcó un hito en el manejo de los pacientes con SDRA asistidos con VM (ARDS Network-2000). Pacientes fueron ventilados con dos niveles diferentes de V_t (6 y 12 ml por kilo de peso ideal), se demostró una diferencia significativa en la mortalidad y días de necesidad de asistencia respiratoria mecánica (ARM) a favor de los ventilados con V_t bajo. A partir de allí se reconoció el beneficio de la utilización de este volumen corriente tanto en pacientes con o sin lesión pulmonar (Amato-2015). Más recientemente se ha propuesto que en pacientes con SDRA (y probablemente en tejido pulmonar sano también) la diferencia de presión en vía aérea entre el final de la inspiración (presión meseta) y la PEEP (driving pressure) es mejor que el Volumen corriente para determinar un rango de protección o lesión del tejido pulmonar durante la ARM. En teoría la combinación de determinar un límite máximo de distensión (por presión) y el establecimiento de una “driving pressure” en rango protector mitigaría el ciclo sobredistensión/colapso alveolar y el daño pulmonar asociado. En función de los datos publicados se establece una menor mortalidad cuando

los pacientes fueron ventilados con un rango de *driving pressure* menor a 16 cmH₂O (Serpa-2016). Sin embargo el uso de diferentes niveles de driving pressure podría tener efectos muy diferentes dependiendo del nivel de PEEP elegido (Loring & Malhotra-2015), situación que despierta nuestro interés y que abordaremos en este proyecto.

2.6.2 Papel del surfactante pulmonar en la VILI

La lesión del epitelio alveolar juega un rol primario en el desarrollo de VILI, se afectan diversas funciones, entre ellas, la secreción de surfactante pulmonar. Como ya se ha mencionado en detalle el SP cumple diversas funciones que lo hacen un componente indispensable del sistema respiratorio. Su principal función es disminuir la tensión superficial en la interfase líquido-gas de la superficie alveolar, contribuyendo a mantener una adecuada mecánica respiratoria. Aumenta la complacencia pulmonar y disminuye el colapso alveolar durante la espiración. La capacidad de reducción de la tensión superficial se debe a las cantidades relativas como los grados de saturación de los FL e interrelaciones con las proteínas del surfactante (Frerking-2001). Su deficiencia o disfunción causa enfermedad respiratoria severa. Regímenes con alto Volumen Corriente y/o presión inspiratoria, en un breve período de tiempo disminuyen la proporción de surfactante pulmonar funcionalmente activo. Siendo esta disfunción significativa y se correlaciona con la severidad de la VILI (Ito-1997, Zhu-2001, Zhu-2006). Por el contrario la utilización de PEEP y surfactante exógeno pueden restaurar o preservar la composición y función, atenuando la lesión pulmonar, indicando que la inactivación de surfactante puede jugar un importante rol en el desarrollo de VILI (Dreyfuss-1994). Los efectos sobre la mecánica ventilatoria y el colapso alveolar podían ser ocasionados por cambios en la capacidad tensoactiva del surfactante, ya sea por alteraciones en el perfil fosfolipídico, en las interacciones lípido-lípido, lípido-proteína, o por un factor biosintético o metabólico.

2.6 Métodos de cuantificación.

Los métodos más utilizados para la cuantificación de los componentes fosfolipídicos del surfactante pulmonar son la Cromatografía de Capa fina (TLC) y la Cromatografía Líquida de Alta performance (HPLC).

La TLC es una técnica analítica muy utilizada en laboratorios de química orgánica, permite determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar muestras, realizar el seguimiento de una reacción y realizar el análisis tanto cualitativo como semi - cuantitativo de muestras de fosfolípidos (FL) del surfactante pulmonar (DPPC, PC, PI, PE, SM) (Tsai-1979). La separación se basa en el principio de reparto (afinidad diferencial) entre dos fases, una fase estacionaria que consiste en una capa delgada de sílica depositada sobre un soporte plano como una placa de vidrio y una fase móvil líquida que fluye a través de la fase estacionaria. Si bien esta técnica tiene múltiples ventajas y aplicaciones, presenta gran dificultad y limitaciones para realizar cuantificaciones, requiere de un análisis de densitometría de los spot en la placa y es muy dependiente del método de revelado (Henderson-1992).

Por otro lado, el HPLC, es una técnica que permite la separación y cuantificación de los componentes de una muestra de forma rápida y precisa. Consiste en un medio o matriz de soporte que se denomina fase estacionaria y un segundo medio que es inmisible con la fase estacionaria, denominado fase móvil, que circula a través de ésta y arrastra a la muestra a un flujo constante de presión proporcionado por una bomba. Los componentes de la mezcla interactúan de distinta forma con la fase estacionaria y la fase móvil, según la afinidad por una u otra y de este modo, atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se produce su separación. El tiempo que tardan las moléculas desde que son inyectadas en la fase estacionaria hasta que eluyen de la misma se denomina tiempo de retención, este tiempo depende de la composición de las fases utilizadas, del flujo de la fase móvil y de las características de la columna. Existen dos tipos de cromatografía según la polaridad de la fase estacionaria, cromatografía de fase normal, donde la fase estacionaria es polar y la fase móvil apolar y cromatografía de fase reversa, con fase estacionaria apolar y fase móvil polar.

Para la separación y cuantificación de FL se utilizan mayoritariamente dos fases estacionarias, simple (sílica) o reversa (C18 o C8) y las fases móviles más utilizadas contienen mezclas con porcentajes variables de Cloroformo, Metanol, Acetonitrilo, Hexano, Isopropanol, dentro de los solventes orgánicos y un contenido iónico como puede ser amonio, ácido fosfórico, ácido acético, ácido sulfúrico, etc (Henderson-1992, Abidi-1998). El proceso cromatográfico es monitoreado mediante la medición de absorbancia y la presencia de detectores. Dentro de los detectores más utilizados para cuantificar FL se encuentran: detector ultravioleta (UV), índice de refracción

(RI), espectrometría de masas (MS) y light - scattering (LS) (Bunger-1995, Brouwers-1998).

2.8 Datos preliminares

Contamos con resultados de experimentos realizados previamente donde se evaluó la capacidad de generar VILI comparando un grupo con VM convencional (alto VT) y otro con VM protectiva (PEEP y bajo VT) a través de medida de mecánica respiratoria e histología. Se evidenció un claro deterioro en las propiedades viscoelásticas en el grupo con VM convencional al compararlo con el control y el sometido a VM protectiva. El grupo VM protectiva muestra una mejor relación aire/ tejido en todos sus sectores al compararlo con control y VM convencional, corrigiendo el colapso alveolar observado en estos grupos. El espesor de los tabiques alveolares en el grupo PEEP es mayor que en control, reflejo de la generación de edema intersticial, pero menor que en el grupo ventilado a altos VT.

Así, pudimos determinar que en un modelo de ventilación en ratas la utilización de altos Vt durante un período breve de tiempo (30 minutos) promueve la aparición de alteraciones de la mecánica pulmonar (Figura 13 A y B) y de la estructura a nivel histológico (Figura 13 C y D).

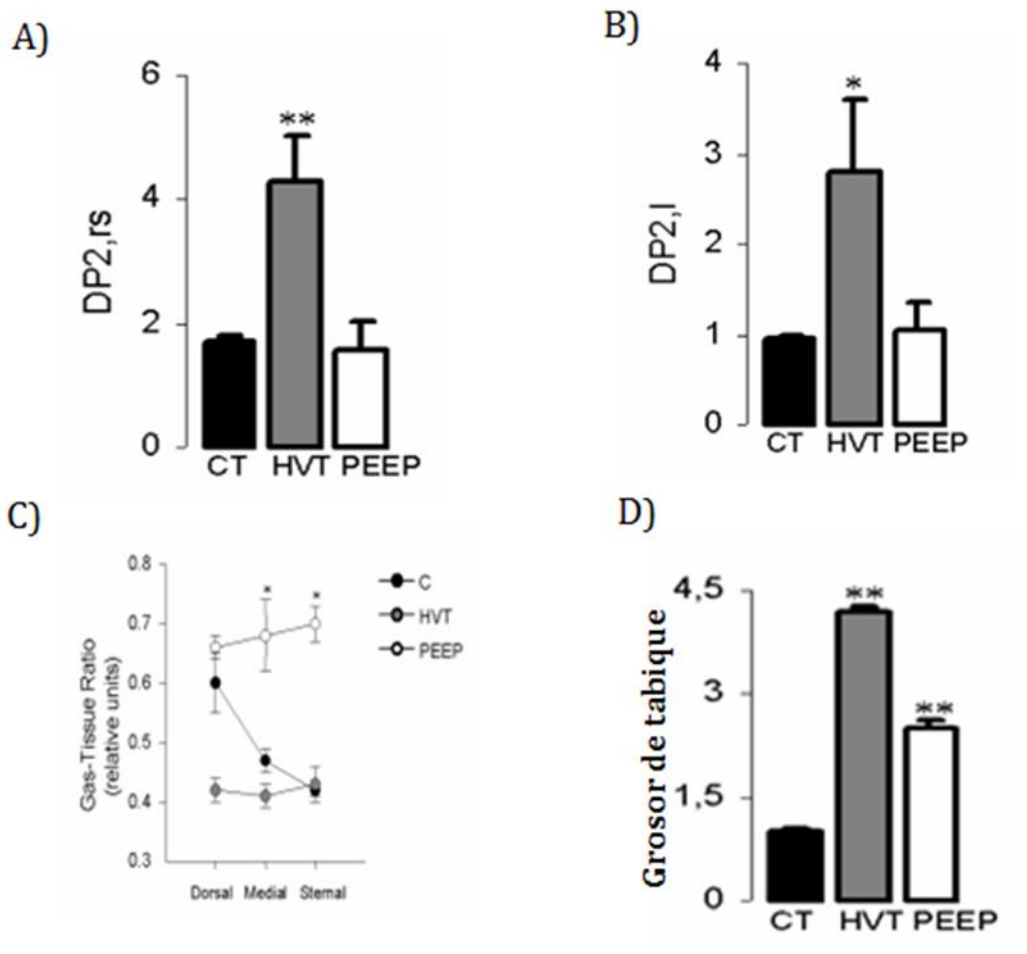


Figura 13. Se compara un grupo con VM convencional (alto VT) y otro con VM protectora (PEEP y bajo VT) a través de medida de mecánica respiratoria (A y B) e histología (B y C). A) Delta P2, rs es una medida que refleja las propiedades visco elásticas de la vía aérea periférica principalmente. B) DeltaP2, l refleja las del pulmón. C) Relación aire/ tejido en los sectores Dorsal, medio y esternal, para el grupo control, el ventilado en condiciones protectoras y el grupo con alto VT. D) Espesor de los tabiques alveolares (mm).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

El propósito de este proyecto es contribuir a dilucidar la repercusión de la ventilación mecánica en la composición y estructura del surfactante pulmonar en un modelo de lesión pulmonar establecido dentro de la lógica del “driving pressure” y no del volumen corriente. Se comparan diferentes patrones de VM, analizando los componentes de las diferentes estrategias que van desde protectiva hasta ventilación mecánica lesiva.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Constitución y puesta a punto del modelo experimental de lesión pulmonar guiado por cambios de presión.
- 3.2.2 Determinar los efectos de las distintas estrategias ventilatorias en la estructura del tejido pulmonar mediante análisis histológico.
- 3.2.3 Desarrollar y poner a punto un método de cuantificación de fosfolípidos mediante HPLC, para poder determinar alteraciones en la composición del surfactante pulmonar.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Modelo animal

Ratas wistar macho fueron distribuidas al azar en 5 grupos de 5 animales cada uno (peso de 300 ± 20 grs. Media $\pm$ SD.). Fueron anestesiados utilizando pentobarbital (50 mg/ml) por vía intraperitoneal. El nivel de anestesia fue comprobado a través de la observación de movimientos reflejos frente a estímulo doloroso mínimo, (Protocolo de experimentación bajo las normas y aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, CHEA). Se le realiza a cada rata una traqueotomía y luego se sacrifica el animal mediante exsanguinación, para luego proceder a la extracción en bloque de pulmón y corazón sin haber sufrido ningún tipo de dolor.

4.2 Ventilación Mecánica

Se induce injuria pulmonar por ventilación mecánica (VILI) utilizando un patrón ventilatorio con sobredistensión inspiratoria y colapso espiratorio. Teniendo en cuenta que hasta la fecha no existe una adecuada correlación entre volumen alveolar y tensión superficial de la interfase aire-líquido, era poco probable que se pudiera identificar un punto de tensión superficial comparable a 6, 8 o 15 ml/k de volumen de trabajo, por lo que decidimos guiar los patrones ventilatorios por presión de trabajo y no por volumen corriente como variable determinante de protección o lesión pulmonar.

De esta manera se plantearon cinco grupos de trabajo definidos por las condiciones mecánicas asociadas a la asistencia ventilatoria:

Grupo 1. Control no ventilado: permite analizar el tejido pulmonar y el surfactante alveolar sin la intervención de la ventilación mecánica.

Grupo 2. Presión de trabajo 10 cmH₂O, PEEP 2 cmH₂O: explora el efecto de presión de trabajo baja con un nivel mínimo de PEEP semejante al cierre glótico.

Grupo 3. Presión de trabajo 10 cmH₂O, PEEP 5 cmH₂O: con iguales condiciones de presión de trabajo que el grupo anterior, pero con el nivel de PEEP habitual que define el límite de lesión pulmonar. Máximo potencial protector pulmonar.

Grupo 4. Presión de trabajo 20 cmH₂O, PEEP 2 cmH₂O: presión de trabajo alta con nivel mínimo de PEEP. Máximo potencial de daño pulmonar.

Grupo 5. Presión de trabajo 20 cmH₂O, PEEP 5 cmH₂O: explora potencial efecto protector de PEEP.

Los grupos con VM se ventilaron durante 30 minutos en las condiciones establecidas para cada grupo.

4.3 Dosificación de Surfactante

Para valorar la repercusión en el surfactante obtuvimos muestras de lavado broncoalveolar (LBA) para cada pulmón aislado. Se obtuvieron introduciendo 15 mililitros de suero fisiológico por la tráquea y vertiendo su contenido en un recipiente, este procedimiento se repitió un total de 5 veces (con motivo de uniformizar la extracción del LBA).

El líquido así obtenido es centrifugado a 1.000 xg a 4°C durante 5 minutos, utilizando una centrífuga Sorvall RC 6 Plus de Thermo Scientific® y un rotor SLC-4000, a fin de separar restos celulares y otros contaminantes. El sobrenadante es guardado a - 20 ° C para su análisis posterior. Del LBA se extrajeron los FL del surfactante por un protocolo para extracciones lipídicas de muestras líquidas (Bligh EG-1959), el procedimiento implica el agregado de un volumen (1:1 (v/v)) de una mezcla de cloroformo - metanol (1:1, v/v) a el LBA, posteriormente se mezcla para homogeneizar y permitir el reparto lipídico y luego se centrifuga por 10 minutos a 400g, quedándonos con la fase orgánica y evaporándola bajo N₂. La muestra se resuspendió con metanol a efectos de no incluir cloroformo en la columna, lo cual genera un aumento de ruido en la señal del detector por la importante absorción del mismo a la longitud de onda de trabajo. Se logró una buena resolución de la extracción lipídica a partir de 4 ml de LBA y re suspensión en 500 µl de metanol.

Las ratas utilizadas para análisis histológico solo fueron ventiladas durante 30 minutos en las condiciones descriptas anteriormente.

4.4 Determinación de la concentración de fosfolípidos

La cuantificación de fosfolípidos se realizó a todas las muestras siguiendo el método de Rouser (Rouser-1966). Este método se basa en la determinación del contenido de fósforo presente en los fosfolípidos previa conversión en fosfato inorgánico. Es necesario preparar una curva estándar con KH₂PO₄, que se coloca en tubos de vidrio, así como las muestras problema y se secaron en un baño de arena a temperatura aprox. 260°C. Luego de que no quedaran resto de solvente se realizó la mineralización del fósforo,

incubando a las muestras con 450 µl de ácido perclórico a 260°C durante 60-90 minutos con los tubos tapados con canicas de vidrio para evitar la evaporación. Una vez mineralizado el fósforo se cuantificó mediante la reacción con 0.5 ml de molibdato de amonio 2.5% (p/v) y 0.5 ml de ácido ascórbico 10% (p/v) y se diluyó con 3.5 ml de agua miliQ. Para revelar el color se incuban los tubos durante 7-10 minutos a 100°C en un baño de agua. Tras parar la reacción con hielo la absorbancia de cada tubo se midió en un espectrofotómetro convencional a 820 nm.

4.5 Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

4.5.1 Determinación del perfil y cuantificación de especies fosfolipídicas

El perfil de fosfolípidos fue caracterizado por cromatografía líquida de alta performance (HPLC), en un equipo Agilent 1100 equipado con una bomba cuaternaria y detector de arreglos de diodos. Se separaron las especies fosfolipídicas con una columna de sílica cuyas dimensiones fueron 250x4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil fue acetonitrilo: metanol: ácido fosfórico en proporciones 100:40:0.4 v/v, cromatografía isocrática, modificación del método de Shafiq (Shafiq -1991) y se utilizó un flujo de 1 ml/min con el horno de columna a 50°C. Los fosfolípidos fueron identificados y cuantificados a través de una curva de calibración para cada especie (Fosfatidilserina FS, fosfatidiletanolamina FE, fosfatidilcolina FC y esfingomielina SM).

4.5.2 Cuantificación de Colesterol

Para cuantificar el nivel de colesterol presente en cada grupo de trabajo se utilizó una columna Hypersil ODS 5µm, 4.0x250 mm Hewlett Packard, y como fase móvil una mezcla de Metanol y 2-Isopropanol en una proporción 70:30 (Ph= 8-8.5) con un flujo de 1ml/min. Los componentes de la muestra fueron identificados por un detector de longitud de onda UV configurado a 212 nm (Essaka-2007).

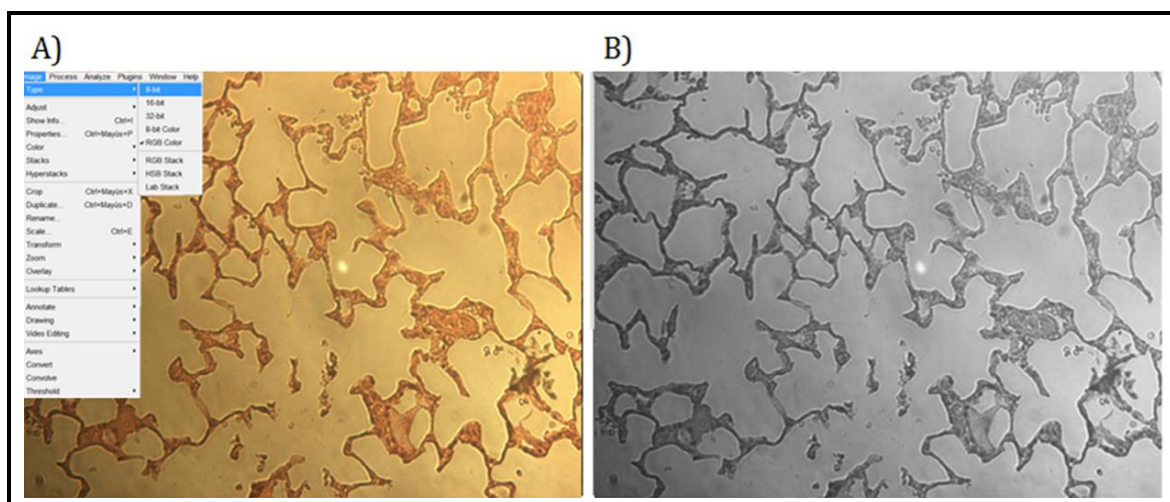
Para identificar el nivel de colesterol en cada especie se utilizó un “pool” de muestras para cada grupo, lo que dio como resultado, una muestra por cada grupo de concentración más elevada, facilitando la medición.

4.6 Análisis Histológico

Los cortes de pulmón se tiñeron con hematoxilina y eosina, se observaron los preparados histológicos de pulmón derecho (Lóbulo superior, medio e inferior) y se tomaron las imágenes de microscopia con un microscopio óptico Nikon Optiphot usando un objetivo 40x/0.60 NA y el software Image-Pro-Plus. El posterior análisis de las imágenes se realizó utilizando dos software. Se midió el grosor de los tabiques, como elemento sugestivo de edema pulmonar, utilizando el software de dominio público ImageJ (1.48v, Wayne Rsband, NIH-USA) y el área del espacio alveolar, como indicio de colapso alveolar, utilizando el software Image-Pro-Plus 4.5.1.

4.6.1 Procesamiento de imágenes para cuantificar grosor de tabique

Para realizar la medición de grosor de tabique se utilizó el software ImageJ (1.48v, Wayne Rsband, NIH-USA). Las imágenes fueron tomadas en formato RGB por lo que el primer paso del análisis consiste en convertir las imágenes RGB a imágenes en escala de gris de 8 bits (Figura 14 A y B). Una vez obtenida la imagen en ese formato, se procede a seleccionar en la barra de herramientas la opción “straight”, función que permite realizar una línea recta en el ancho del tabique (Figura 14-C). Luego de lo cual se selecciona la opción “Analyze-Measure” que me permitirá obtener el valor de ancho del tabique analizado (Figura 14-D). Este procedimiento se realiza para al menos 10 tabiques en una misma imagen, dando como resultado una tabla que expresa los valores de todos los tabiques analizados (Figura 14-E).



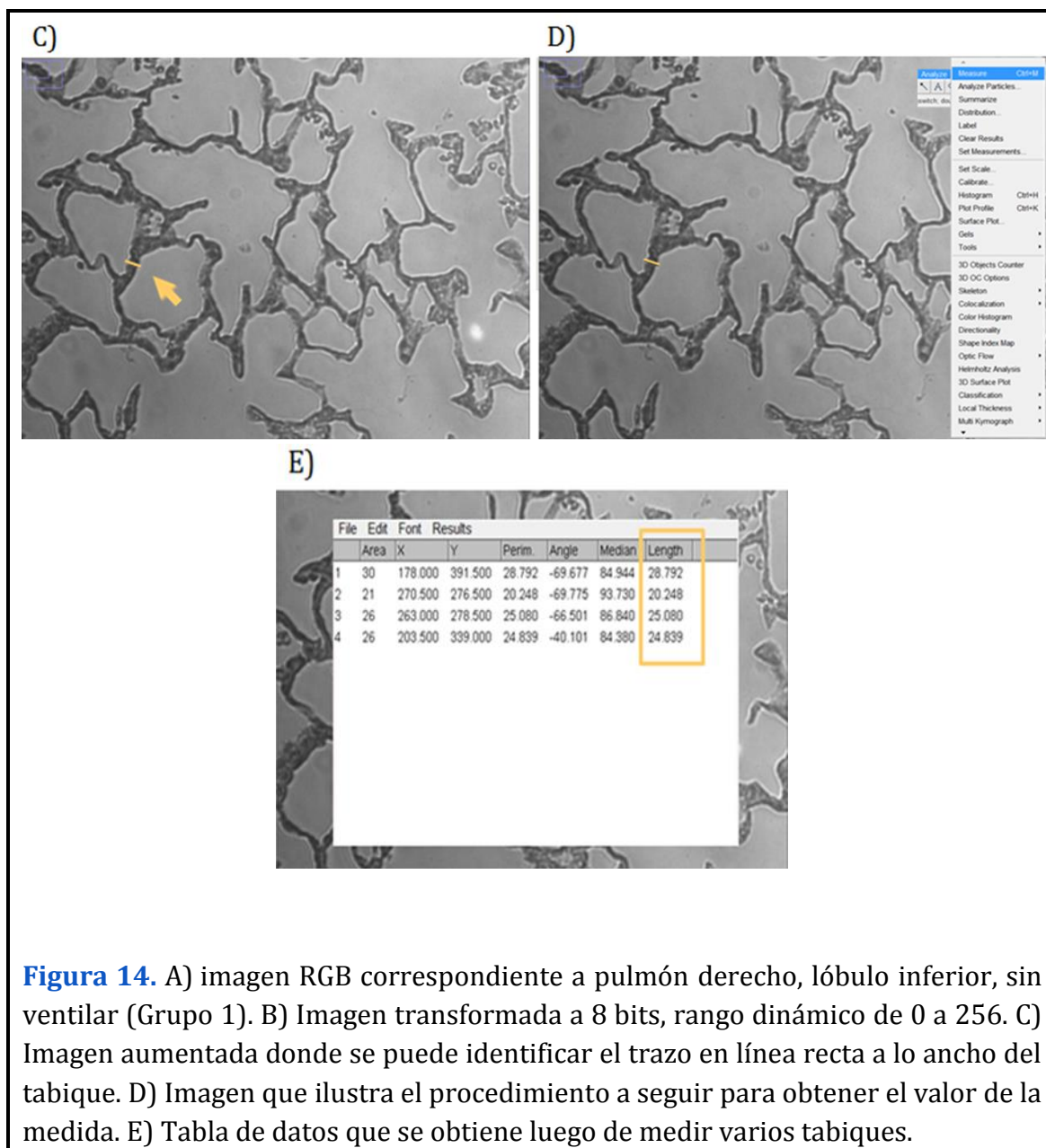
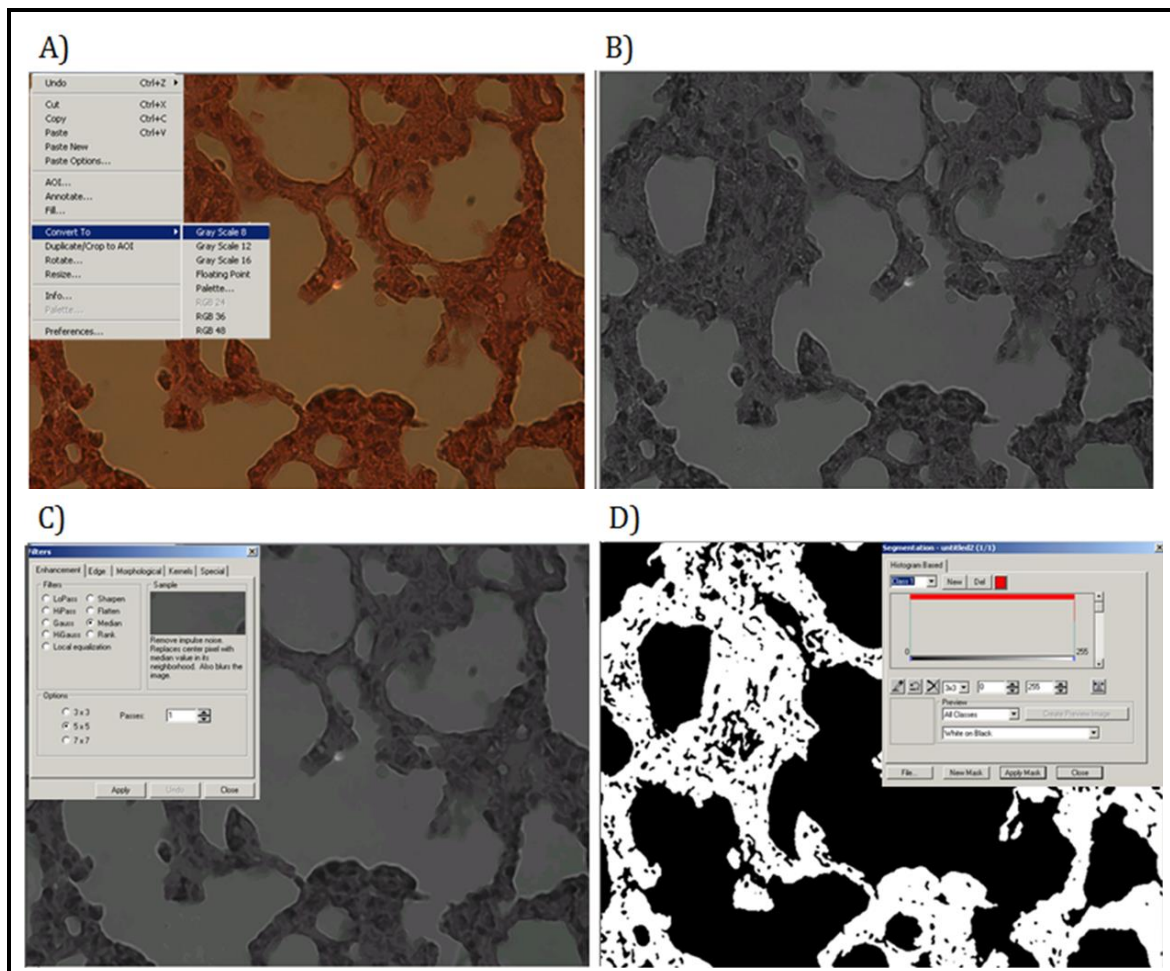


Figura 14. A) imagen RGB correspondiente a pulmón derecho, lóbulo inferior, sin ventilar (Grupo 1). B) Imagen transformada a 8 bits, rango dinámico de 0 a 256. C) Imagen aumentada donde se puede identificar el trazo en línea recta a lo ancho del tabique. D) Imagen que ilustra el procedimiento a seguir para obtener el valor de la medida. E) Tabla de datos que se obtiene luego de medir varios tabiques.

4.6.2 Procesamiento de imágenes para cuantificar área alveolar

Como se mencionó anteriormente se utilizó el software Image-Pro-Plus 4.5.1 para cuantificar área alveolar como medida directa de colapso alveolar. Las imágenes tomadas se encuentran en formato RGB, primeramente necesitamos convertir las imágenes RGB en imágenes en escala de gris (8 bits) (ver figura 15 A y B). Luego de lo cual se procede a ajustar la intensidad de la imagen para lograr una mejor definición, lo que permitirá obtener un mejor ajuste de la máscara (Threshold). Para eso se aplica a la imagen de 8 bits un filtro median de 5x5 que reduce la cantidad de variaciones de

intensidad entre píxeles vecinos logrando una mejor resolución (Figura 15-C). Posteriormente se procede a obtener una máscara de los pixeles de interés, en este caso el espacio alveolar (zonas claras), ajustando el rango de pixeles en el histograma de intensidad. Esto se transforma en una máscara al convertir la imagen intensidad en una binaria (blanco y negro), la cual será la información necesaria para proceder con el análisis. El color negro corresponde a nuestra región de interés (ver figura 15-D). Antes de obtener los datos es necesario eliminar los pixeles de ruido y suavizar. Con este fin se aplica un filtro close 11x11 las veces que sea necesario hasta lograr la mejor imagen (Figura 15-E). Finalmente una vez que tengo bien definida la imagen realizo la medición de área, para eso, vamos a pseudo color, seleccionamos la opción File y dividimos la imagen en 2 colores. La imagen obtenida muestra ahora nuestra zona de interés en color rojo y la opción Áreas nos permite obtener el valor del área de interés (Figura 15-F).



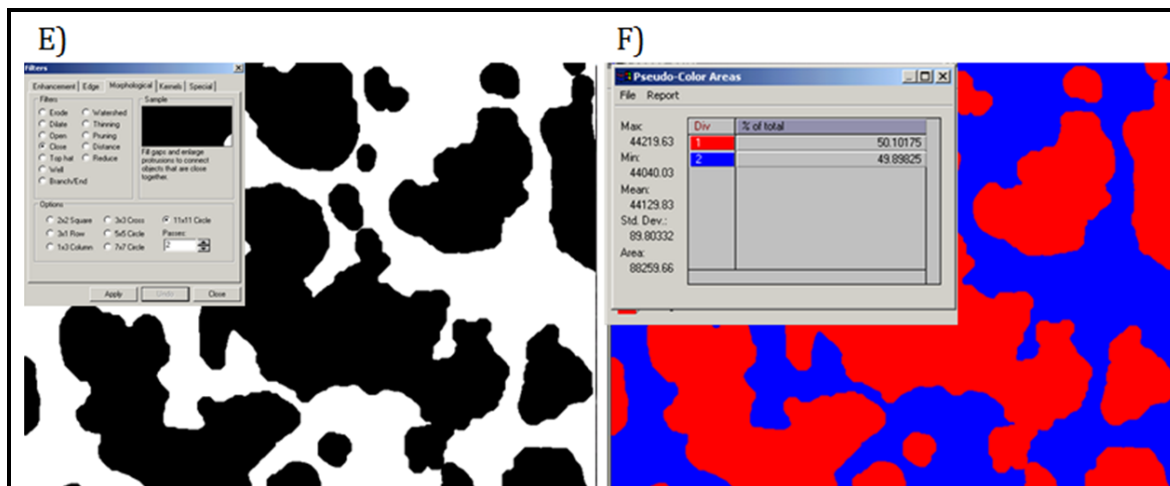


Figura 15. A) imagen RGB correspondiente a pulmón derecho, lóbulo inferior ventilado en condiciones de P20/PEEP10 (Grupo 5). B) Imagen transformada a 8 bits, rango dinámico de 0 a 256. C) Ajuste del histograma de intensidad para incrementar el contraste entre las dos regiones. D) Aplicación de la máscara (Threshold). En negro pueden verse los pixeles que se selecciona para realizar la máscara en nuestra región de interés. E) Imagen obtenida luego de eliminar el ruido y suavizar. F) Imágenes de las zonas analizadas, en rojo se muestra nuestra región de interés. El plugins pseudo color-área permite obtener el valor correspondiente de área para el espacio alveolar.

4.7 Microscopia multi-fotónica, resuelta en el tiempo (FLIM) o espectral con microscopio DIVER

La aplicación de la microscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo (FLIM) ha permitido evaluar los cambios metabólicos celulares o en tejidos por la autofluorescencia proveniente del NADH (Datta-2016). El tiempo de vida de una molécula fluorescente es un rasgo característico y nos permite interrogar que le esta sucediendo a esta molécula durante el tiempo que le lleva emitir su fluorescencia. A través de la excitación por dos fotones a una longitud de onda en el rango de 710-780 nm es posible estudiar la autofluorescencia como herramienta de evaluación metabólica del tejido (Stringari-2019). Para la excitación por dos fotones es necesario utilizar luz pulsada y focalizarla en el tejido a través de la óptica del microscopio. Estos láseres pulsados pueden ser usados para estudiar el decaimiento de una molécula fluorescente a partir de la construcción de un histograma de tiempo de vida (Malacrida-2017, Ranjit-2018). Existen dos maneras de obtener la información de tiempo de vida que se asocian al dominio del

tiempo o de la frecuencia, ambos metodos son comparables y dependen de la instrumentación con la que se cuente en el laboratorio.

Para el análisis de los resultados de FLIM nosotros hemos utilizado los gráficos de fasores (Jameson-1984, Digman-2008) (Figura 16). El método de fasores utiliza la transformada de Fourier para calcular los parámetros G (real, en el eje x) y S (imaginario, en el eje y) y graficarlos en un gráfico polar siguiendo la matemática descriptas por Weber (Weber-1981):

$$G_{\tau} = \frac{\int_0^T I(t) \cos(\omega t) dt}{\int_0^T I(t) dt}$$

$$S_{\tau} = \frac{\int_0^T I(t) \sin(\omega t) dt}{\int_0^T I(t) dt}$$

Donde ω es la frecuencia de modulación angular, igual a $2\pi f$, y $f = 1 / T$ es la frecuencia de repetición del láser y T es el período del láser. El círculo universal se define como un semicírculo con un radio de 0.5 centrado en (0, 0.5) y es universal para todo decaimiento exponencial simple (Figura 16 A) (Malacrida-2018).

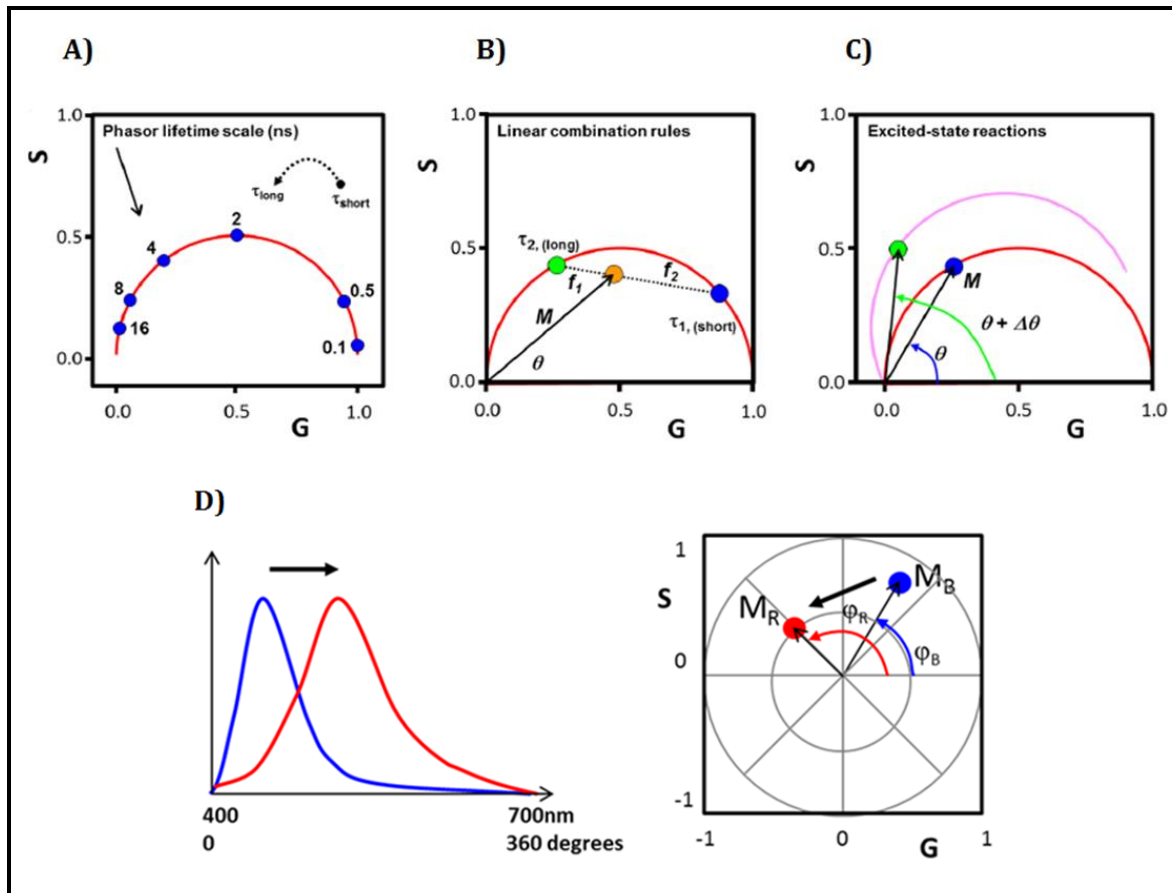


Figura 16: Gráfico de fasor y sus propiedades. A) La escala del gráfico fasor está dada por la tangente del ángulo según la relación $\theta = \tan(\omega t)$ y en un rango relacionado con la frecuencia angular $\omega = 2\pi / T$ (donde $T=12.5$ ns en nuestra configuración experimental). En puntos azules, un decaimiento exponencial único para 0.1, 0.5, 2.0, 4.0, 8.0 y 16.0 ns. Observe que el tiempo de vida aumenta en sentido antihorario hacia la posición (0,0). B) Las reglas de fasores predicen que para un píxel con una combinación lineal de dos tiempos de vida exponenciales simples (a saber, cursores azul y verde, vida corta y larga, respectivamente) la posición medida debe estar en un punto de la línea que une los dos componentes individuales (punto anaranjado). La fracción de cada componente se puede determinar siguiendo la regla de Lever (palanca). C) Para una reacción en el estado excitado se espera una posición fuera del círculo universal debido al retraso en la emisión de la especie excitada, un ejemplo de tal reacción es el efecto de relajación dipolar (Malacrida-2017). D) Gráfico de fasor para datos espectrales. Los movimientos en el eje angular (en sentido anti horario) corresponden a movimientos del espectro desde los valores de λ menores a mayores (del azul al rojo), los movimientos en el eje axial (a medida que se apartan de 0) se corresponden con la disminución del ancho del espectro. Cuando el espectro se hace “más ancho”, el fasor se moverá hacia el centro del gráfico polar, mientras que cuando el espectro se corre hacia mayores longitudes de onda el fasor se mueve en sentido anti horario.

Cada punto en el diagrama fasorial representa un píxel de la imagen que corresponde a un decaimiento. Los movimientos en sentido anti horario en el eje angular corresponden a aumentos en el tiempo de vida ($M \downarrow$, fase $\uparrow$). Los fasores poseen las propiedades de combinación lineal y reciprocidad de los vectores, que son de gran utilidad para el análisis de los datos de FLIM. La combinación lineal significa que si tenemos dos decaimientos exponenciales simples (NADH libre o unido), estos deberían estar en algún lugar del círculo universal. Si mezclamos una fracción de ambos componentes, entonces su posición debería de aparecer en algún lugar de la línea que une ambos componentes (Figura 16 B). La propiedad de reciprocidad nos es útil para elegir una región de interés en los gráficos de fasores y poder reconocer en la imagen donde están estos pixeles con determinada característica. Esta propiedad es válida en ambas direcciones (imagen $\Leftrightarrow$ fasor).

Para la obtención de los datos espectrales utilizamos un método desarrollado en el Laboratory for Fluorescence Dynamics, en el cual en cambio de coleccionar el espectro, se obtienen imágenes utilizando filtros de transmisión con una función seno o coseno para un rango espectral de 400-650nm, más la intensidad total (Dvornikov&Gratton-2018).

$$I_{\cos} = (\sum_{\lambda} F_{\cos}(\lambda) * I_{(\lambda)}) / \sum_{\lambda} (I_{\lambda})$$

$$I_{\text{sen}} = (\sum_{\lambda} F_{\text{sen}}(\lambda) * I_{(\lambda)}) / \sum_{\lambda} (\lambda)$$

$$G = 2(I_{\text{cos}} - F_{\text{cosMIN}}) / (F_{\text{cosMAX}} - F_{\text{cosMIN}}) - 1$$

$$S = 2(I_{\text{sen}} - F_{\text{senMIN}}) / (F_{\text{senMAX}} - F_{\text{senMIN}}) - 1$$

Donde, Fcos es la intensidad de fluorescencia para el filtro coseno, Fsen es la intensidad de fluorescencia para el filtro seno, y I (λ) es la intensidad total.

Los cambios espectrales hacia el rojo se observan como un incremento en la fase, mientras que el ensanchamiento del espectro como un aumento en la modulación (Figura 16 D). Los gráficos de fasores espectrales comparten todas las propiedades descriptas anteriormente.

Para las medidas de tiempo de vida y espectrales se utilizó un microscopio de diseño (DIVER, Deep Imaging Via Emission Recovery). El microscopio DIVER utiliza como fuente de iluminación un láser pulsado InSight DS + (Spectra Physics) para la excitación de dos fotones, sintonizable en el rango espectral de 680–1300 nm. Se utiliza un modulador acústico-óptico (AOM) de AA Opto-Electronics para ajustar la potencia del haz de excitación. El escáner XY (Cambridge Technology), está acoplado a la óptica de escaneo, construido utilizando cuatro dobletes acromáticos en disposición simétrica (lente de escaneo tipo Plössl), para minimizar las aberraciones y permitir un campo de visión amplio. Esta combinación de los espejos del escaner de 15 mm con lentes de 50 mm de diámetro nos permite lograr un campo de visión (FOV) de 2 a 3 veces más amplio en comparación con los microscopios comerciales.

El sistema de imágenes también está equipado con un epi-detector H7422P-40 (Hamamatsu). Tanto el detector DIVER como el epi-detector están conectados a un Fast-FLIMbox 320 (ISS) para permitir mediciones FLIM y análisis fasoriales. (Dvornikov & Gratton-2018, Dvornikov-2019).

4.8 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de la cuantificación de cada fosfolípido en las distintas muestras, así como los obtenidos a partir de la histología (Medida de grosor de tabique y Colapso alveolar) fueron comparados y analizados mediante un análisis de Varianza (ANOVA). Este tipo de análisis permite comparar varios grupos en una variable cuantitativa, es una generalización del test de “t” (student) cuando se quiere comparar más de 2 grupos.

Se utilizó el software GraphPad Prism 4 para el análisis estadístico.

5. RESULTADOS

5.1 Constitución y puesta a punto del modelo experimental

La primera etapa requirió la puesta a punto del modelo experimental de lesión pulmonar guiado por cambios de presión (P). Siguiendo los reportes publicados (Serpa-2016) el tejido pulmonar sano puede ventilarse de manera protectora con presiones de trabajo inferiores a 13 cmH₂O y promovería la lesión con valores superiores a 16 cmH₂O. Si bien esto es cierto para condiciones clínicas y experimentales de trabajo con sistema respiratorio completo (pulmones y caja torácica), debimos establecer condiciones experimentales con pulmón aislado que claramente promovieran protección y daño. De esta manera se establecieron dos presiones de trabajo, una protectora de 10 cmH₂O y una potencialmente lesiva de 20 cmH₂O. A esta condición de trabajo se asoció el componente de PEEP. Una PEEP baja puede ser insuficiente para estabilizar alvéolos y mantenerlos abiertos y está asociada con una mayor probabilidad de lesión pulmonar. Se definieron entonces dos valores de PEEP, uno bajo de 2 cmH₂O y el recomendado en la clínica que es 5 cmH₂O, con el fin de explorar los efectos de la PEEP asociados a diferentes combinaciones de presión.

De este modo, se establecieron 5 grupos con diferencias en sus patrones de presión y PEEP (Tabla 1). El grupo 1, control no ventilado, permite analizar el tejido pulmonar y el surfactante en condiciones normales. El grupo 2, con P10/PEEP2, permite explorar el efecto de una presión de trabajo baja con un nivel mínimo de PEEP. El grupo 3, P10/PEEP5, con baja presión pero con el nivel de PEEP habitual, define el límite de lesión pulmonar y permite analizar el máximo potencial de protección pulmonar. El grupo 4, presión de trabajo alta potencialmente lesiva con nivel mínimo de PEEP, P20/PEEP2, define el máximo potencial de daño pulmonar y el grupo 5, P20/PEEP5, con alta presión pero PEEP habitual permite explorar un posible efecto protector de la PEEP.

Tabla 1. Modelo experimental de lesión pulmonar guiado por cambios en la presión respiratoria.

Grupo	Nombre	Presión (cmH ₂ O)	PEEP (cmH ₂ O)
1	Ctr	-	-
2	P10/PEEP2	10	2
3	P10/PEEP5	10	5
4	P20/PEEP2	20	2
5	P20/PEEP5	20	5

Una vez extraído el pulmón siguiendo el protocolo descrito en la sección 4, se procedió a realizar la ventilación mecánica a altas y bajas presiones de trabajo. Como se observa en la figura 23 a nivel macroscópico se observó un claro deterioro durante la ventilación mecánica con alta presión de trabajo. El pulmón de la derecha ventilado a alta presión (Figura 17-B) muestra claras evidencias de colapso, observable como cambios en la homogeneidad en la coloración del tejido, además una disminución considerable del volumen pulmonar y gran condensación del tejido, mientras que el ventilado a baja presión (Figura 17-A) mantiene una mejor distribución del gas alveolar.

A)



B)



Figura 17. Características macroscópicas del pulmón de rata después de 30

minutos de ventilación mecánica. A) Ventilado a bajas presiones de trabajo (P10/PEEP5), B) Ventilado a altas presiones de trabajo (P20/PEEP2).

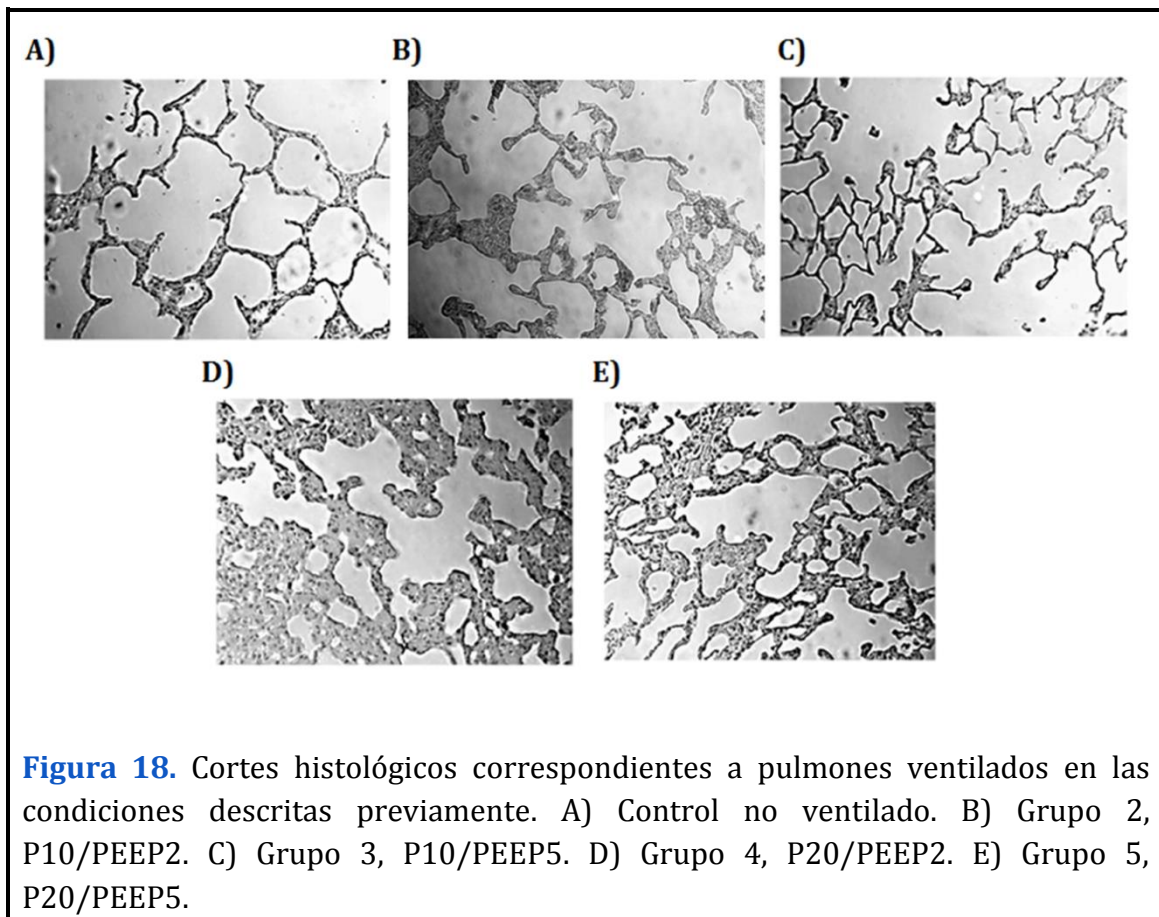
5.2 Análisis Histológico

Los pulmones empleados para el análisis histológico fueron únicamente ventilados en las condiciones descritas, no se les realizó LBA. El análisis histológico se llevó a cabo en pulmón derecho (lóbulo superior, medio e inferior). Se observaron tres preparados, uno por cada lóbulo y se obtuvieron 10 imágenes por cada uno. Se analizaron un total de 150 imágenes por grupo de trabajo.

Se midió el grosor de los tabiques como medida indicativa de edema pulmonar y el área del espacio alveolar como marcador de colapso alveolar.

5.2.1 Medida de Grosor de tabique

Una vez ventilado, se procedió a realizar cortes histológicos del tejido pulmonar. En la Figura 18 se puede observar que los cortes histológicos de pulmones ventilados a altas presiones de distensión muestran diferencias notorias en base a una inspección cualitativa con los ventilados a bajas presiones. Es posible observar la pérdida de la arquitectura alveolar y el engrosamiento de los tabiques como elemento indicativo de la presencia edema pulmonar.



Los resultados del análisis estadístico (Figura 19) muestran que a nivel de pulmón total el grupo 4 (P20/PEEP2) es el grupo con mayor lesión, presenta el mayor grosor de tabique con una media de $7,43 \pm 1,06 \mu\text{m}$ (media $\pm$ desvío estándar). Se observó diferencia estadísticamente significativa cuando se lo comparó con el grupo control (no ventilado) que presentó una media de grosor de tabique de $4.46 \pm 0.67 \mu\text{m}$. El grupo 2 (P10/PEEP2) con media $5,98 \pm 0.62 \mu\text{m}$, mostró también diferencia significativa con el control, mientras que el grupo 3 (P10/PEEP5) máximo potencial protector, se comportó de forma muy similar al grupo control con una media de $4.54 \pm 0.78 \mu\text{m}$. El grupo 5 (P20/PEEP5), con media de $5.4 \pm 0.73 \mu\text{m}$, no mostró diferencia significativa con el control pero si se observó diferencia cuando se lo comparó con el grupo 4, ambos tratados a la misma presión de trabajo (P20) pero diferente PEEP (2 y 5 respectivamente).

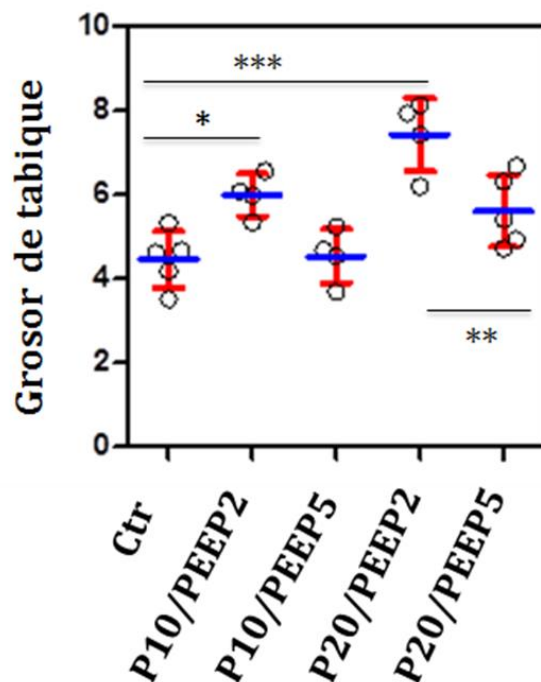


Figura 19. Análisis estadístico de la medida de grosor de tabique (µm) de los diferentes grupos de trabajo en pulmón total.

Por otro lado se analizaron los resultados obtenidos para cada lóbulo por separado. Se realizó un análisis estadístico entre grupos e intra grupo. A nivel del lóbulo superior, los grupos 2 (P10/PEEP2) y 4 (P20/PEEP2) mostraron diferencia estadísticamente significativa con el grupo control (no ventilado). El grupo 2 aumentó 27,5% el grosor de tabique y por lo tanto el daño con respecto al grupo control, pasando de un grosor de tabique medio de $4,55 \pm 0,71$ a uno de $5,80 \pm 0,54$ µm, mientras que el grupo 4 mostró un aumento considerable, el daño se incrementó un 73,6% en relación al grupo control. En este lóbulo también se observaron diferencias entre los grupos 2 y 4, donde el daño se vio aumentado en 36,2% cuando se aumentó la presión de 10 a 20 cmH₂O en el grupo 4 y diferencias entre los grupos 4 y 5 (P20/PEEP5), donde el grupo 5 disminuyó el daño un 30% comparado con el grupo 4 (ver figura 20-A).

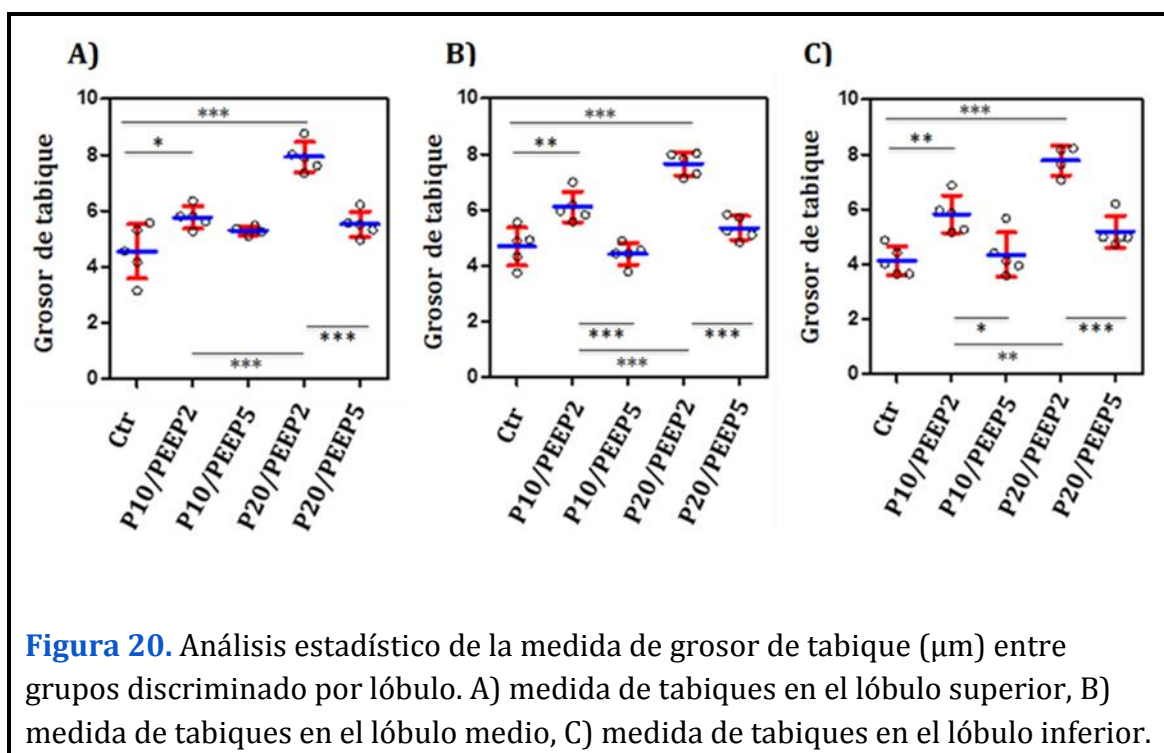
En el lóbulo medio el grupo 2 aumentó 32% el daño en relación al control y el grupo 4 lo hizo en un 57,9%. El lóbulo medio mostró además diferencia significativa entre los grupos 2 y 3 (P10/PEEP5), donde el daño cayó 28,3% en el grupo 3 pasando de un grosor medio de $6,18 \pm 0,73$ a uno de $4,43 \pm 0,56$ µm. Por otro lado, se observaron diferencias cuando se compararon los grupos 2 y 4 y los grupos 4 y 5, donde se observó un incremento del daño en

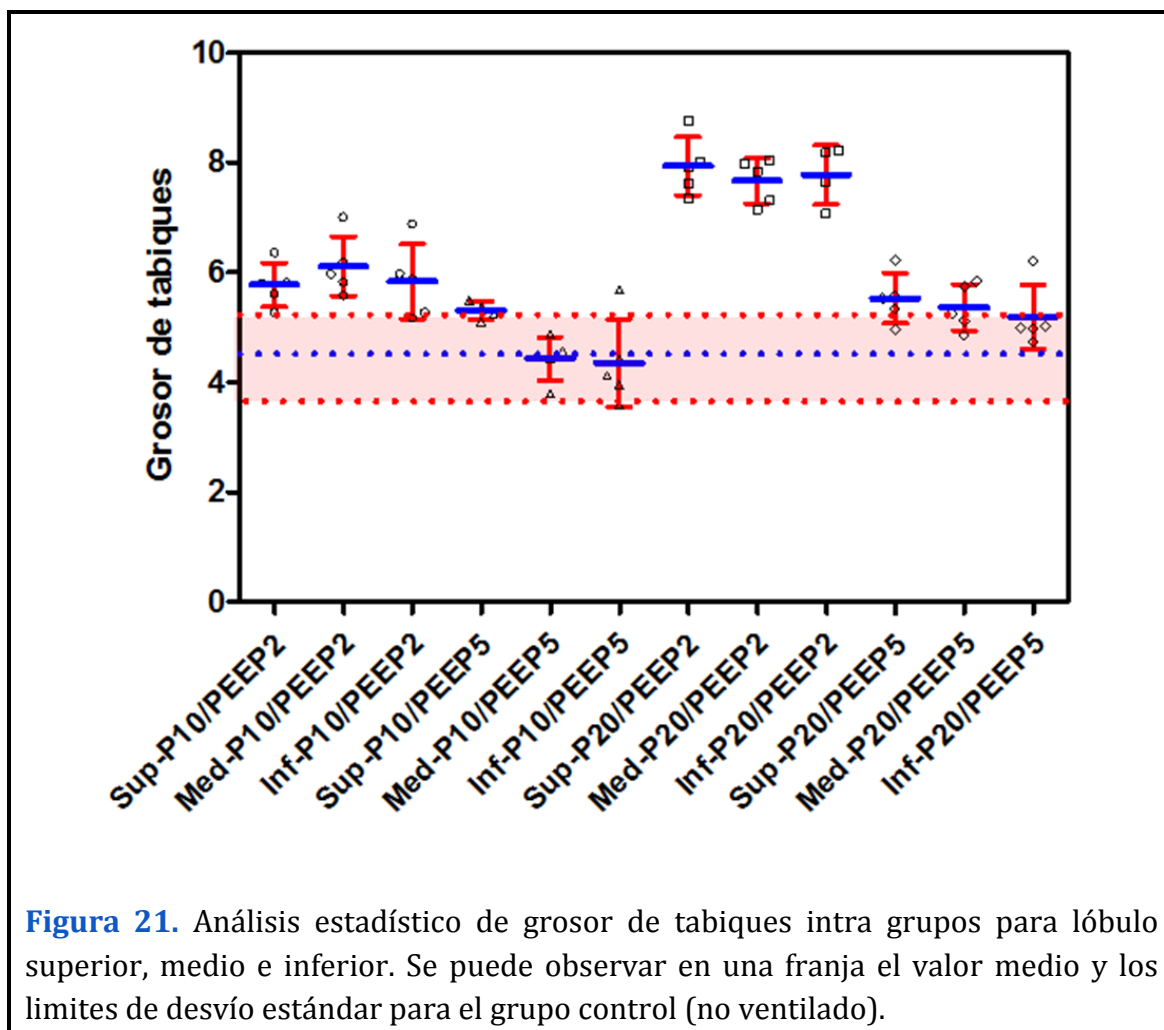
el grupo 4 de 19,6% en comparación al grupo 2 y 28,9% en referencia al grupo 5 (Figura 20-B).

El lóbulo inferior mostró diferencias significativas entre el control y los grupos 2 y 4 aumentando el daño en 43,7 % y 71,6% respectivamente y entre los grupos 2 y 3 y 2y 4. El grupo 3 disminuyó el daño 26,3% mientras que el grupo 4 lo aumentó en 18,4%. Además se observaron diferencias entre los grupos 4 y 5 , donde el grupo 5 disminuyó el grosor de tabique en 30% en comparación con el grupo 4 (Figura 20-C). El análisis de los pulmones en sus lóbulos con un incremento significativo del grosor de los tabiques tanto en el lóbulo superior como en el medio e inferior confirma nuevamente el carácter lesional del grupo 4 ventilado a altas presiones y con nivel mínimo de PEEP.

Para el análisis intra grupo presentamos los datos comparados contra el grupo control (1). Para esto generamos una gráfica en el que el valor medio y el desvío estándar de las tres regiones se graficó como referencia para comparar en un análisis global la lesión a lo largo del pulmón (Figura 21).

Los resultados no mostraron diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes lóbulos para ninguno de los grupos de estudio.





5.2.2 Medida de colapso alveolar

Para el análisis de colapso alveolar se tomaron nuevas imágenes. La luz e intensidad no homogénea en las imágenes utilizadas para la medida de grosor de tabique inhibieron la posibilidad de aplicar los algoritmos de procesamiento de imágenes necesario para segmentar y cuantificar el colapso. Las imágenes fueron tomadas en las mismas condiciones, en un microscopio óptico invertido, usando un objetivo 40x. Se obtuvieron 150 imágenes por grupo que fueron procesadas utilizando el software image-pro-plus 4.5.1.

La figura 22 muestra las imágenes obtenidas a partir de los cortes histológicos de hematoxilina-eosina de pulmón para el análisis de colapso alveolar, separadas por lóbulo (superior, medio e inferior).

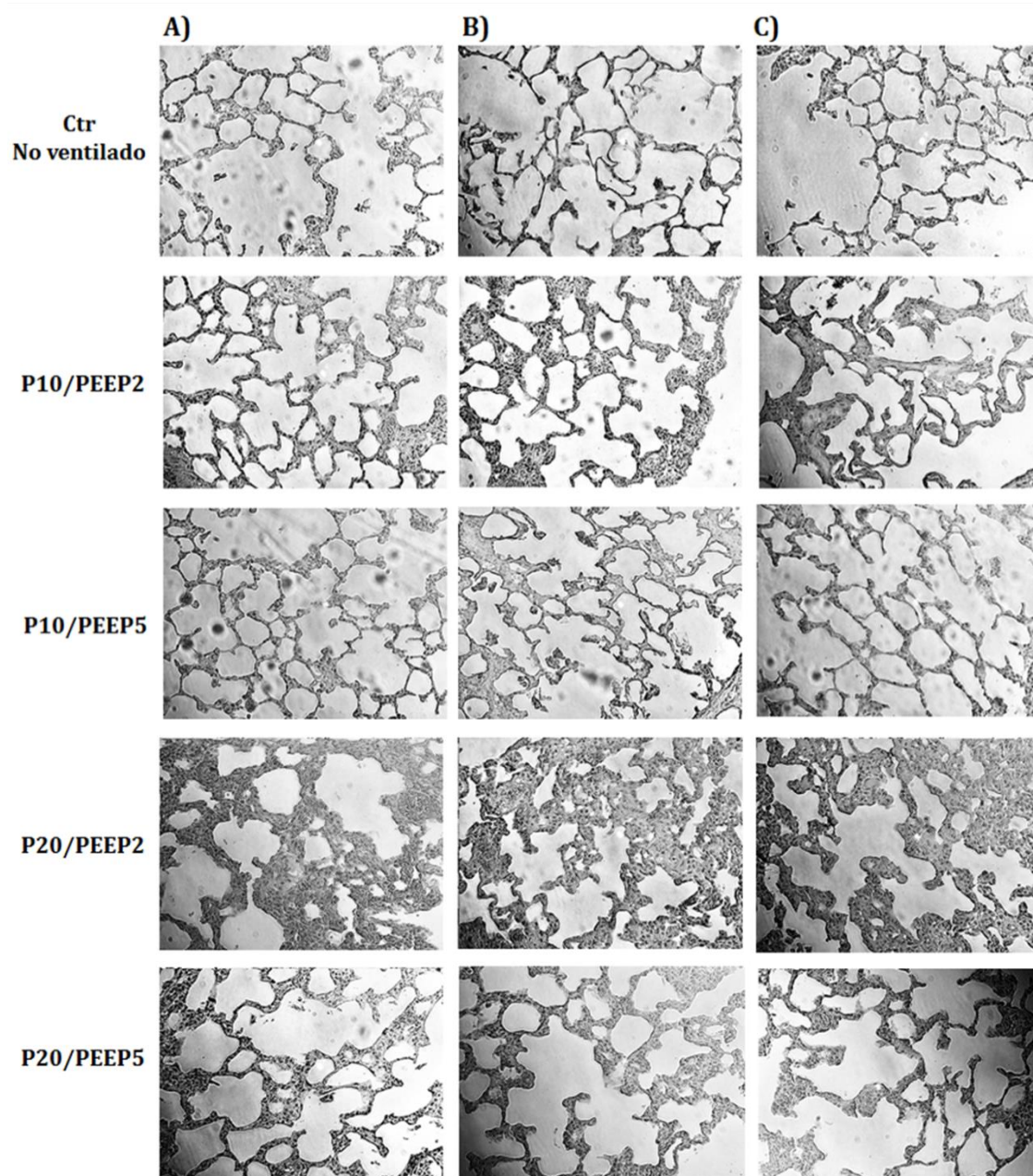


Figura 22. Cortes histológicos correspondientes a pulmones tratados en las condiciones descritas anteriormente separados por lóbulo. A) Lóbulo superior, B) lóbulo medio, C) lóbulo inferior.

Se midió área del espacio alveolar y se realizó un análisis estadístico para pulmón total y para cada lóbulo por separado. La figura 23 muestra los resultados del análisis obtenido para pulmón total donde se puede observar que todos los grupos de estudio mostraron diferencias significativas con el grupo control. El grupo 2 (P10/PEEP2) mostró una disminución del área

alveolar media de 12,6% con respecto al grupo control (no ventilado). Para el grupo 3 (P10/PEEP5) la disminución fue menor, el área se redujo un 8,4% y el grupo 5 (P20/PEEP5) mostró una disminución de 13,6%. Sin embargo, el grupo 4 (P20/PEEP2) mostró una disminución del tamaño alveolar notablemente mayor con respecto al grupo control y al resto de los grupos, se observó una reducción del 60% del área. Se observa además diferencia significativa entre los grupos 2 y 4, ventilados ambos con mínimo nivel de PEEP. El grupo 2 tratado a baja presión mostró un colapso alveolar 53,10 % menor que el grupo 4 ventilado a alta presión. Los grupos 4 y 5 también mostraron diferencias significativas, el aumento de la PEEP en los grupos tratados a altas presiones permitió observar disminución del colapso en al menos un 52,5%.

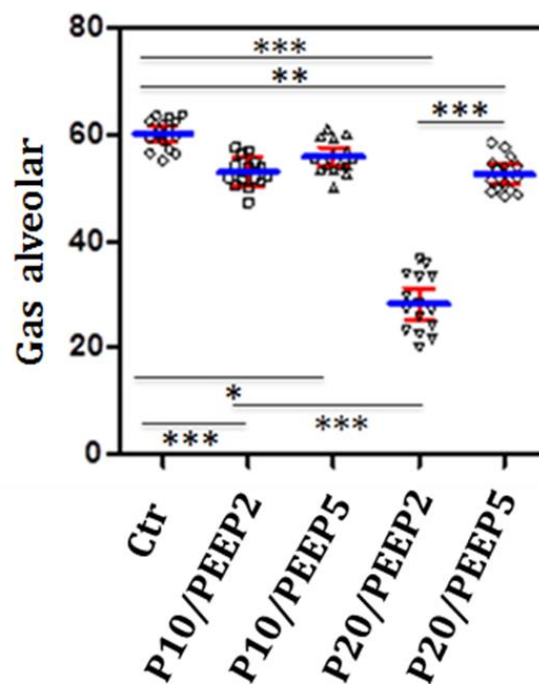
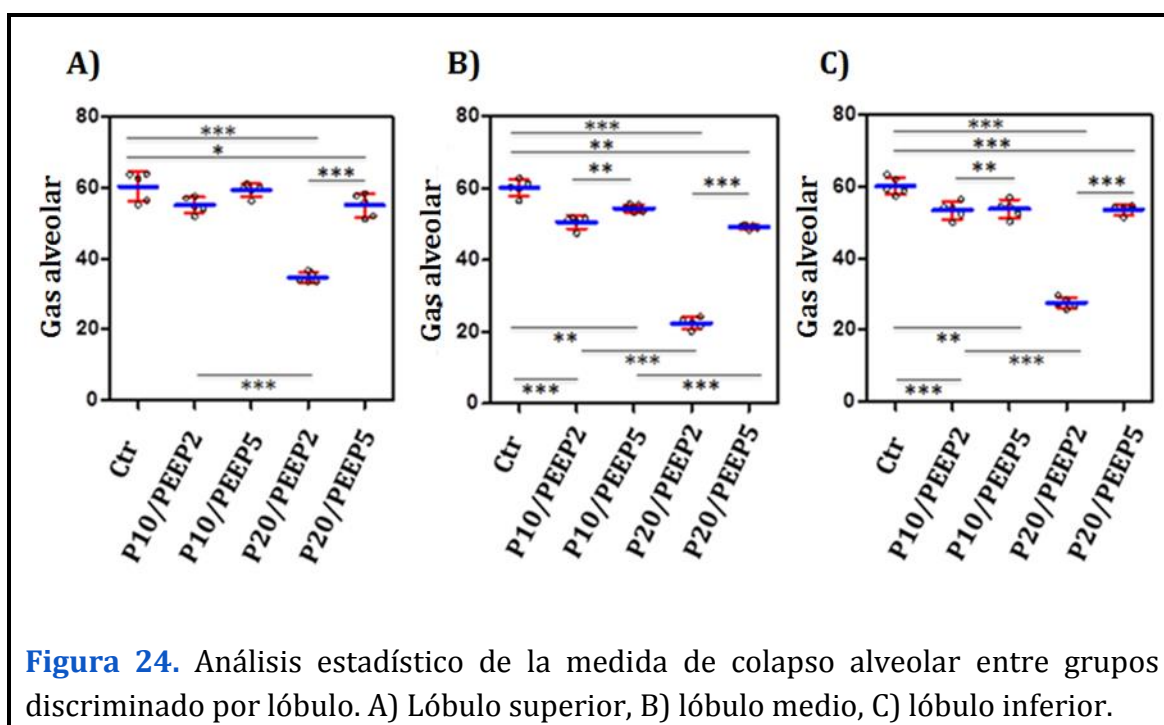


Figura 23. Análisis estadístico de la medida de colapso alveolar de los diferentes grupos de trabajo en pulmón total.

La figura 24 muestra los resultados obtenidos para el análisis estadístico entre grupos discriminado por lóbulo. El análisis mostró para el lóbulo superior diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los grupos 4 (P20/PEEP2) y 5 (P20/PEEP5), con un aumento del colapso de 42,5% y 8,8% respectivamente. Se observó además en este lóbulo diferencias entre los grupos 2 (P10/PEEP2) y 4 (P20/PEEP2), donde el

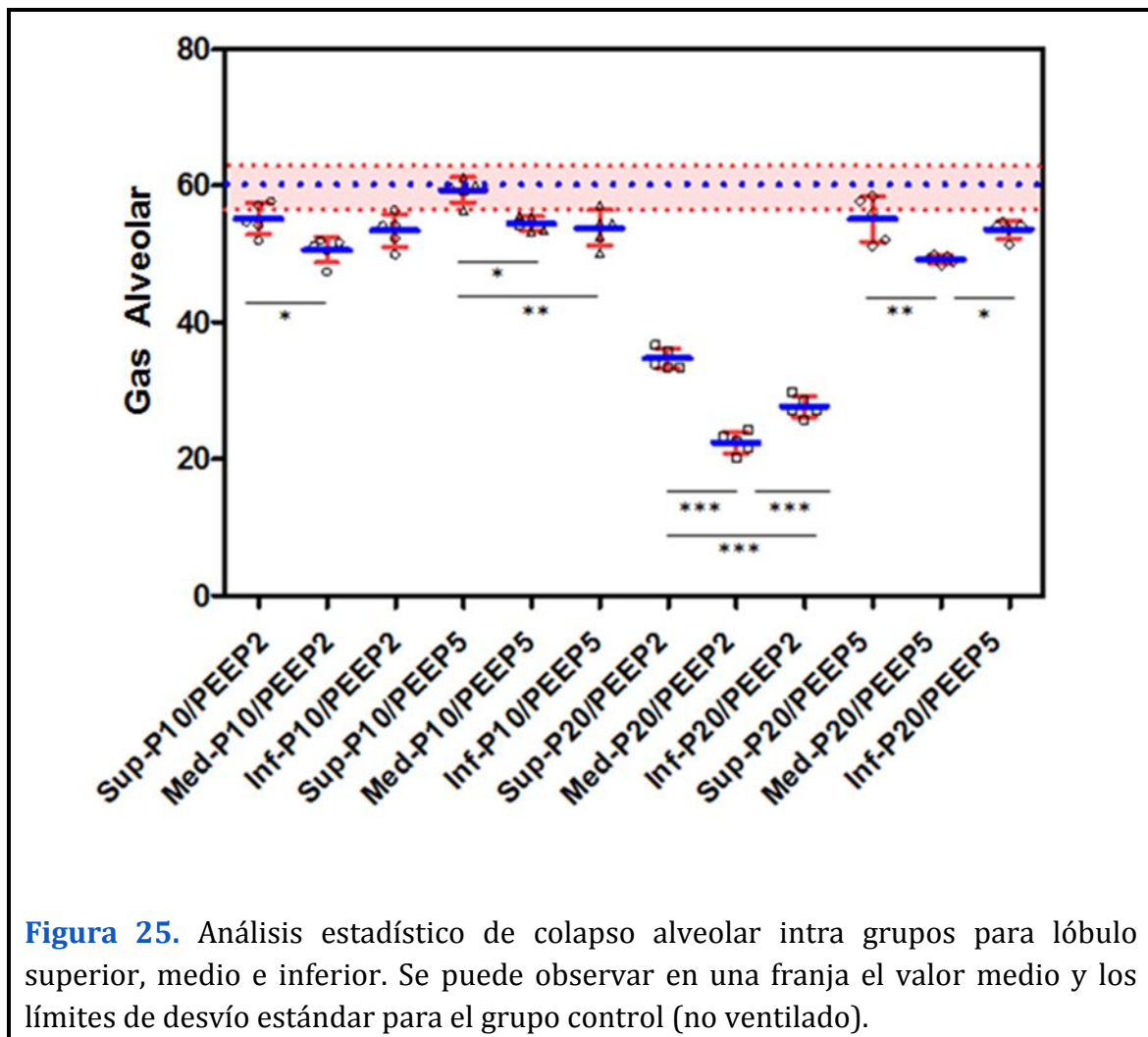
colapso pasó de 8,72% a 42,5% al aumentar la presión y entre los grupos 4 y 5. El grupo 5 disminuyó 37% el colapso alveolar comparado con el grupo 4. En el lóbulo medio todos los grupos mostraron incremento significativo del colapso en relación al control. El grupo 2 aumentó 15,9% el colapso, el 3 (P10/PEEP5) lo hizo en un 9,5% y el grupo 4 y 5 incrementaron su colapso 63% y 18,7% respectivamente con respecto al grupo control. El grupo 3 mostró una disminución significativa del colapso de 7,1 % y 10,2% cuando se lo comparó con los grupos 2 y 5 respectivamente. En el grupo 4 se observó un aumento del colapso de 55,6% en relación al grupo 2 y de 53,9% en comparación con el grupo 5.

El análisis en el lóbulo inferior mostró diferencias entre el grupo control y todos los grupos. Aumentó el colapso 9,7% en el grupo 2, 10,3% en el grupo 3, 54% en el 4 y en el grupo 5 hubo un aumento de 9,6%. Se observaron diferencias entre los grupos 2 y 3 donde aumentó el colapso, aunque en muy poca proporción (0,6%) cuando se aumentó la PEEP a 5 en el grupo 3. El grupo 4 aumento el colapso alveolar 49% en relación al grupo 2 y 49,1 % en comparación con el grupo 5.



Finalmente, tal como realizamos para el engrosamiento de tabique se realizó un análisis intra grupo de los diferentes lóbulos. Para esto también desarrollamos una gráfica en la que comparamos todos los datos contra el control (Figura 25). El grupo 2 (P10/PEEP2) mostró diferencia significativa entre el lóbulo superior y medio, el lóbulo medio presenta un colapso 9%

mayor que el lóbulo superior. En el grupo 3 (P10/PEEP5) se observó diferencias entre el lóbulo superior y medio, el colapso pasó de 1,8% (lóbulo superior) a 9,5% (lóbulo medio). En este grupo también se observaron diferencias entre lóbulo superior e inferior, en el lóbulo inferior se observa un colapso 10,3% mayor que el del lóbulo superior. El grupo 4 (P20/PEEP2) mostró grandes diferencias entre el lóbulo superior y medio y lóbulo medio e inferior, donde el lóbulo medio aumento el colapso 20,4% respecto al superior y 9% con respecto al lóbulo inferior. El lóbulo superior e inferior también mostró diferencias significativas, el inferior aumentó el colapso 11,4% con respecto al lóbulo superior. El grupo 5 (P20/PEEP5) presenta diferencias entre el lóbulo superior y medio y el lóbulo medio e inferior. Al igual que en el resto de los grupos, el lóbulo medio es el que presenta mayor colapso, aumentando 12,8% y 10,9 % con respecto a los lobulos superior e inferior respectivamente. El lóbulo que presenta mayores diferencias es el lóbulo medio, aumentando el colapso considerablemente en todos los grupos pero especialmente en el grupo 4.



5.3 Cuantificación de fosfolípidos.

Una vez obtenido el lavado broncoalveolar, se procedió a realizar la purificación del surfactante mediante sucesivas centrifugaciones con el fin de eliminar contaminantes. Se realizó una extracción orgánica y una vez obtenido el extracto orgánico de surfactante pulmonar para cada una de las muestras se re-suspendieron en un volumen final de 500 μl de metanol.

5.3.1 Cuantificación de fósforo

Se realizó la cuantificación de fósforo a todas las muestras mediante la construcción de una curva de calibración con KH_2PO_4 (0,05 mg/ml), se utilizó como estándar una muestra de DPPC (1mg/ml). En el grupo control (no ventilado) la concentración fue de $9 \pm 0,7 \times 10^{-2}$ al igual que en el grupo 5 (P20/PEEP5). Para el grupo 2 (P10/PEEP2) se obtuvo una concentración de $8 \pm 1 \times 10^{-2}$ y los grupos 3 (P10/PEEP5) y 4 (P20/PEEP2) mostraron las mayores concentraciones, $12 \pm 0,7 \times 10^{-2}$ y $11 \pm 0,8 \times 10^{-2}$ respectivamente. La curva de calibración se puede observar en la figura 26 y los resultados obtenidos de la cuantificación se muestran en la tabla 2.

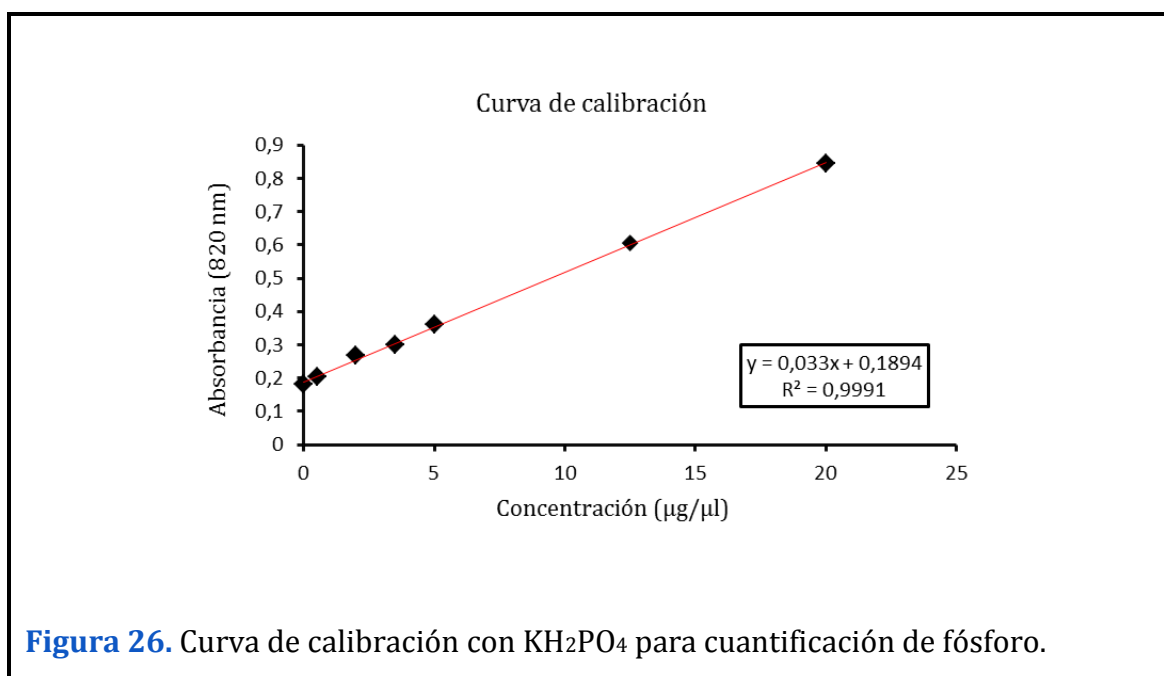


Tabla 2. Cuantificación de fósforo

Grupo	Nombre	[PO ₄] ²⁻ (mg/ml)	DS
1	Ctr	9 x 10 ⁻²	0,7 x 10 ⁻²
2	P10/PEEP2	8 x 10 ⁻²	1 x 10 ⁻²
3	P10/PEEP5	12 x 10 ⁻²	0,7 x 10 ⁻²
4	P20/PEEP2	11 x 10 ⁻²	0,8 x 10 ⁻²
5	P20/PEEP5	9 x 10 ⁻²	0,7 x 10 ⁻²

5.3.2 Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

La primera etapa consistió en la elección y puesta a punto del método cromatográfico. Se exploraron dos métodos cromatográficos de separación de especies fosfolípídicas descritos por Safiq (Safiq- 1991). Ambos métodos con fase móvil acetonitrilo: metanol: ácido fosfórico en dos proporciones 100:10:1.8 v/v y 100:40:04 v/v, con flujo de 1 ml/min y en condiciones isocráticas.

Se corrieron los estándares de cada fosfolípido (fosfatidilserina PS, fosfatidiletanolamina PE, Fosfatidilcolina PC y esfingomielina SM) y una mezcla de estándares para determinar cuál método de corrida era el más adecuado. Al realizar las corridas con el método de proporciones 100:10:1.8 v/v se observó que los tiempos de retención de los lípidos eran muy distintos a los reportados en la bibliografía (Safiq-1991). Cuando se sustituyó el método por el de proporciones 100:40:0.4 v/v, se pudo ver que los tiempos de retención mejoraban notoriamente, el método número 2 permitía reproducir los datos reportados en la bibliografía.

Al mismo tiempo, cuando se analizaron muestras control (no ventilado) de surfactante pulmonar se pudo observar que eluyeron en tiempos muy similares a los tiempos de retención de la mezcla de estándares, indicio de que las muestras obtenidas de LBA eran buenas y que estábamos pudiendo recuperar los fosfolípidos de interés.

El cromatograma de la mezcla de estándares, así como el de la muestra control se pueden observar en la figura 27.

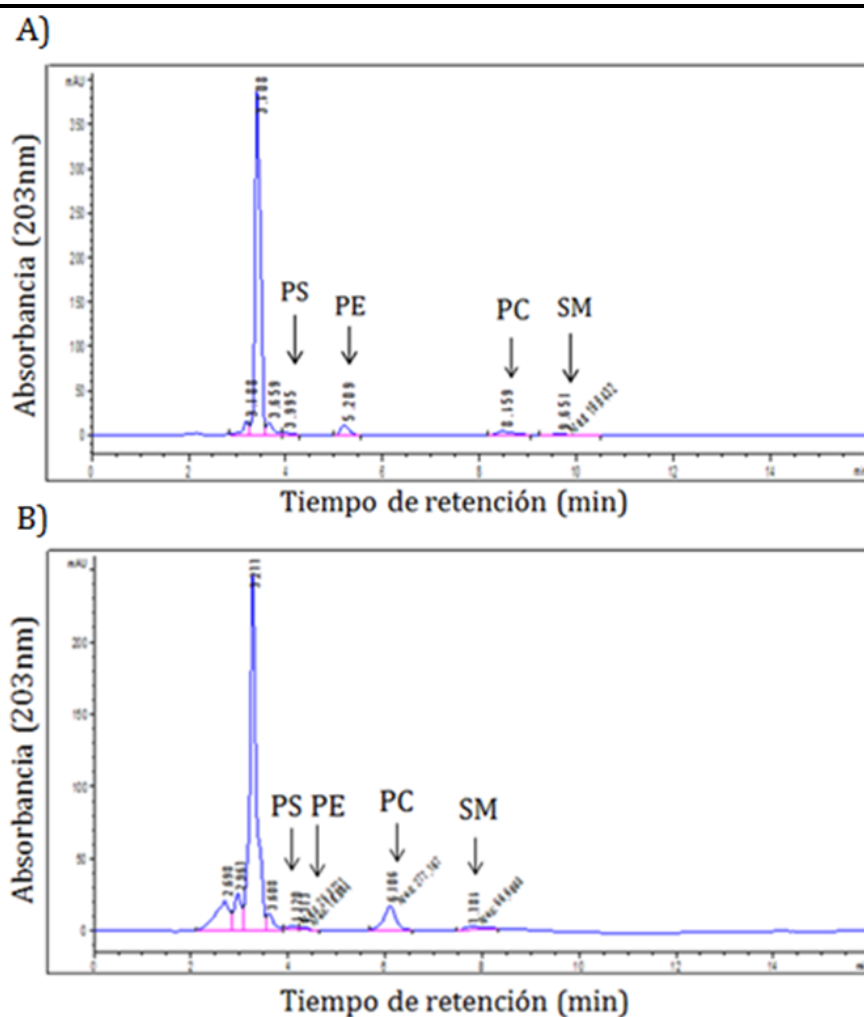
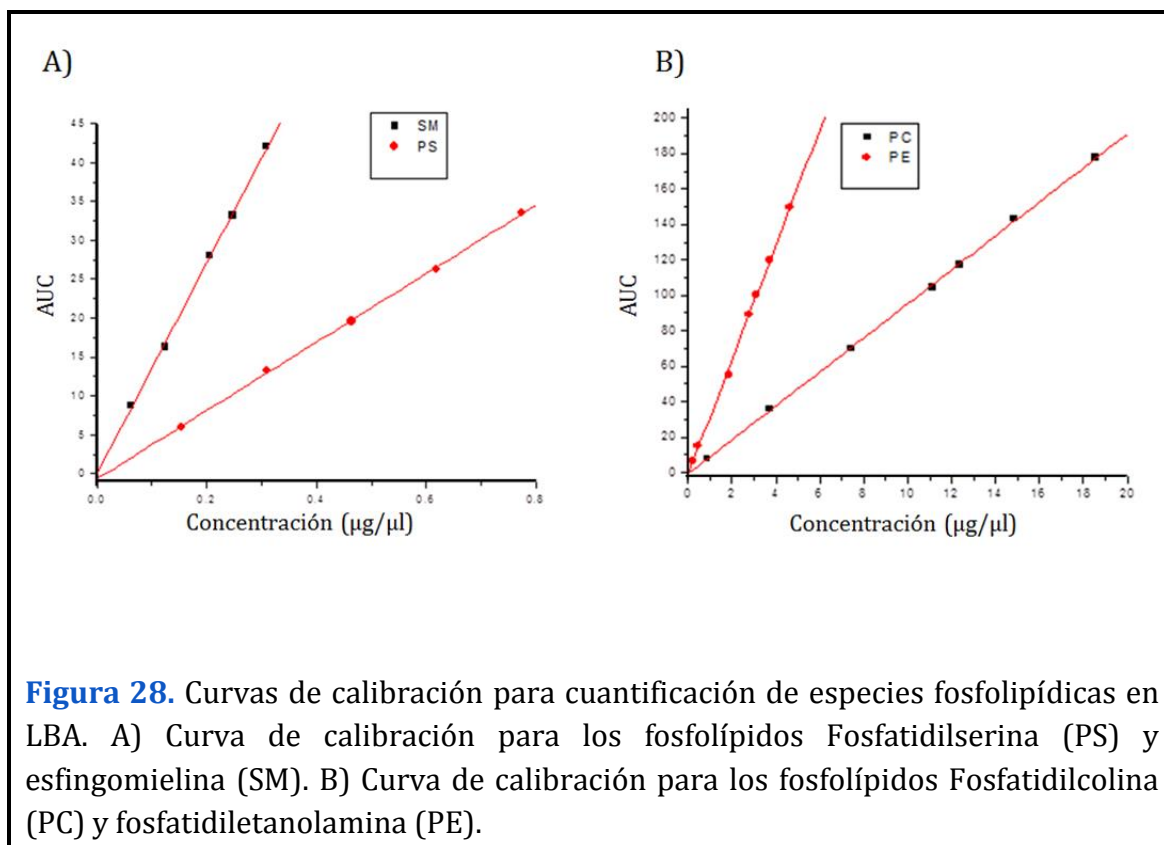


Figura 27. Cromatogramas que ilustran la separación de fosfolípidos utilizando el método con fase móvil acetonitrilo: metanol: ácido fosfórico en proporciones 100:40:04 v/v y en condiciones isocráticas. A) Separación de fosfolípidos de una mezcla de estándares comerciales. B) Separación de fosfolípidos en una muestra de LBA de grupo control (no ventilado).

- Cuantificación de especies fosfolipídicas

Una vez identificado el método cromatográfico a utilizar se procedió a realizar la cuantificación de fosfolípidos en las muestras de LBA, para eso, se realizaron curvas de calibración para cada fosfolípido mediante la utilización de estándares comerciales por triplicado. Se graficó promedio de área del pico en función de la concentración de estándar (Figura 28).



Los resultados obtenidos de la cuantificación de cada fosfolípido se pueden observar en la tabla 3. Los valores se representan como valor medio $\pm$ Desvío estándar y las concentraciones están expresadas en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados para todos los grupos. Se observó para la PC, diferencia significativa entre el grupo control (no ventilado) y los grupos 4 (P20/PEEP2) y 5 (P20/PEEP5). Su concentración pasó de $0,9 \pm 0,02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ a $2,38 \pm 0,22 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ en el grupo 4, lo que supone un aumento de 167%. En el grupo 5 se observó un aumento de 33,3% en la concentración de PC. Por otro lado se encontró diferencia significativa cuando se comparó los grupos 4 (P20/PEEP2) y 5 (P20/PEEP5), ambos ventilados a la misma presión pero con diferente PEEP, en donde se pudo observar que el grupo 5 presenta una disminución en la concentración de 49,5% en relación al grupo 4. Los grupos 2 y 3 y los grupos 2 y 4 también mostraron diferencias. En el grupo 3 aumentó la concentración de PC en 36,2% respecto al grupo 2 mientras que en el grupo 4 el aumento fue mucho mayor, 197,5% pasando de una concentración de $0,8 \pm 0,08 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ a una de $2,38 \pm 0,22 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Para la PE los grupos ventilados a altas presiones 4 y 5 mostraron incrementos significativos en las concentraciones. La concentración pasó de $0,02 \pm 0,01$ a $0,13 \pm 0,02$ en el grupo 4 aumentando 550% y a $0,06 \pm 0,01$ en

el grupo 5 observándose un incremento en la concentración de 200%. Los grupos 2 y 4 y los grupos 3 y 5 también mostraron diferencias, la concentración aumentó en el grupo 4 y en el grupo 5 respecto de los grupos 2 y 3 respectivamente. Cuando se comparó a los grupos 4 y 5 se pudo observar que el grupo 5 disminuyó notoriamente su concentración, se observa una disminución de 116% en relación al grupo 4.

Para la PS también se observó el mismo comportamiento, hay un aumento significativo de las concentraciones en los grupos ventilados a altas presiones y el cambio en el nivel de PEEP de 2 a 5 permite una disminución de las mismas. La SM mostró en cambio, un aumento significativo en su concentración en el grupo 2 que no se había observado en los demás FL y si bien en los grupos ventilados a altas presiones hubo aumento de las concentraciones, este no fue tan importante comparado con el aumento observado en los demás FL. Se destaca un incremento en la concentración de SM de 100% para el grupo 4 en relación al control contra aumentos observados de 165% en la concentración de PC y de 550% y 300% para PE y PS respectivamente.

Los resultados estadísticos antes mencionados para cada fosfolípido se pueden observar en la figura 29, además se ilustra en la figura 30 un gráfico de estrella en donde se puede observar a todos los fosfolípidos y las diferencias entre grupos en forma más global.

Tabla 3. Cuantificación de fosfolípidos en muestras de LBA mediante HPLC.

Grupo	PC	PE	PS	SM
Ctrl	0,90 ± 0,02	0,02 ± 0.01	0,01 ± 0.10	0,01 ± 0.10
P10/PEEP2	0,80 ± 0,08	0,02 ± 0.01	0,01 ± 0.10	0,04 ± 0.01 ***
P10/PEEP5	1,09 ± 0,04 ¥¥	0,04 ± 0.01	0,01 ± 0.01	0,01 ± 0.01 ¥¥
P20/PEEP2	2,38 ± 0,22 *** ¶¶¶	0,13 ± 0.02 *** ¶¶¶	0,04 ± 0.01 *** ¶¶¶	0,02 ± 0.01 ** ¶¶¶
P20/PEEP5	1,20 ± 0,13 ** ▲▲▲	0,06 ± 0.01 *** ■ ▲▲▲	0,03 ± 0.01 *** ■■ ▲▲▲	0,01 ± 0.01 ▲▲

- N=5 para cada grupo.
- Los valores se representan como media ± Desvío estándar.
- Las concentraciones se expresan en µg/µl.
- ***p<0.001 Ctrl vs P20/PEEP2 o Ctrl vs P10/PEEP2 y **p<0.01 Ctrl vs P20/PEEP5 o Ctrl vs P10/PEEP2
- ¥¥ p<0.01 P10/PEEP2 vs P10/PEEP5 o ¥¥¥ p<0.001 P10/PEEP2 vs P10/PEEP5
- ¶¶¶ p<0.001 P10/PEEP2 vs P20/PEEP2
- ■ p<0.05 P10/PEEP5 vs P20/PEEP5 y ■■ p<0.01 P10/PEEP5 vs P20/PEEP5
- ▲▲▲ p<0.001 P20/PEEP2 vs P20/PEEP5 o ▲▲ p<0.01 P20/PEEP2 vs P20/PEEP5

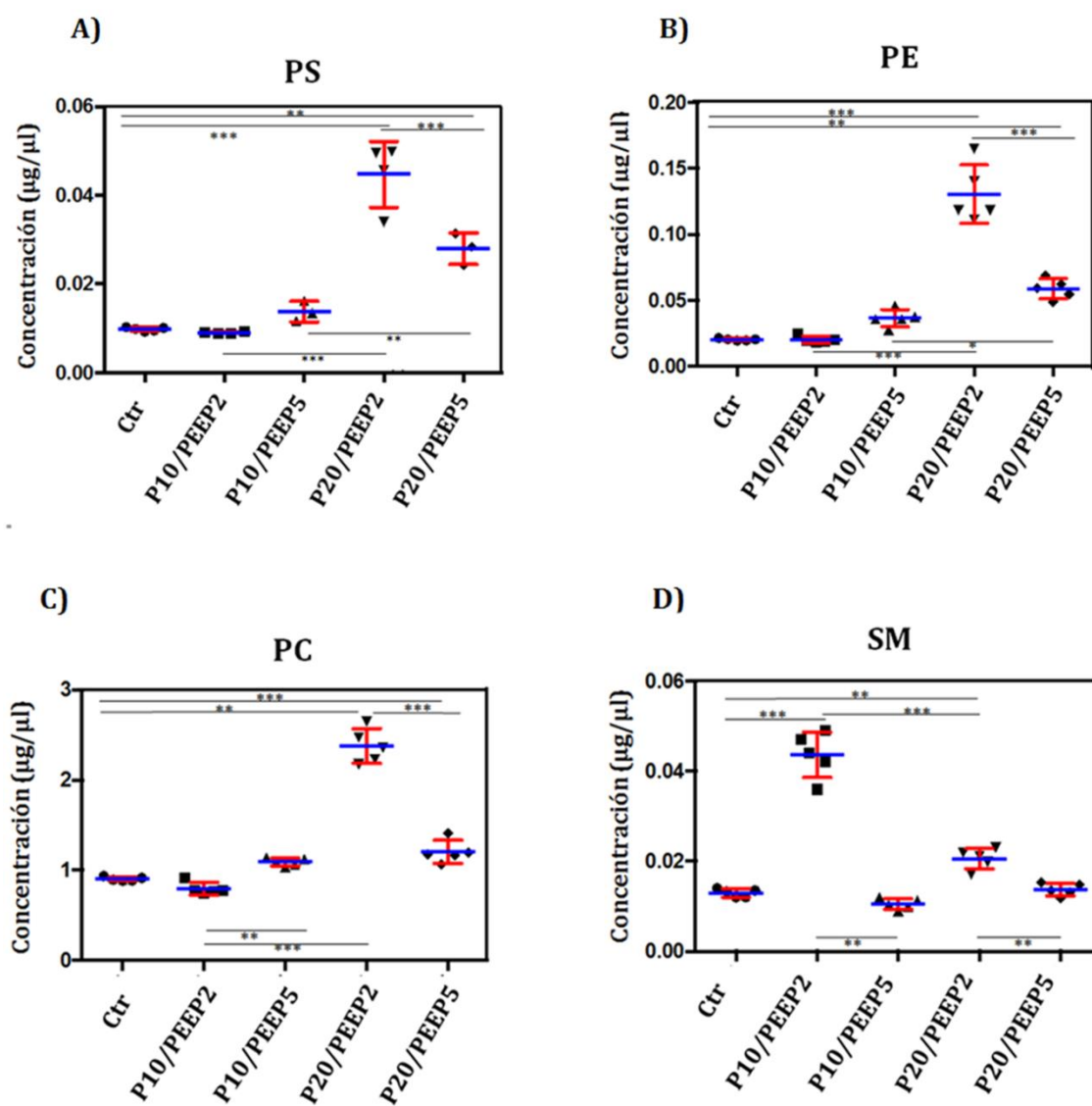


Figura 29. Cuantificación y análisis estadístico de cada fosfolípido en los diferentes protocolos de ventilación. A) Fosfatidilserina (PS), B) Fosfatidiletanolamina (PE), Fosfatidilcolina (PC) y D) esfingomielina (SM).
 *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$.

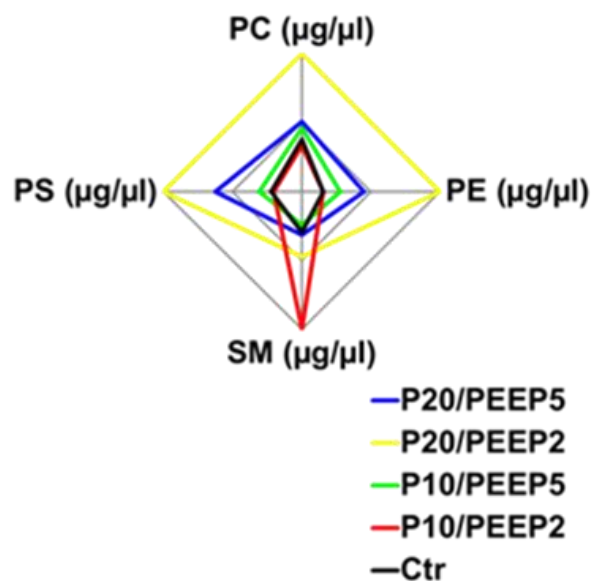


Figura 30. Gráfico de estrella que ilustra la distribución de cada fosfolípido cuantificado en los distintos grupos de estudio, en función de la cantidad de lípidos totales cuantificados. Cada eje representa un fosfolípido. Para la confección del gráfico se utilizaron los datos de la tabla 3.

- **Cuantificación de colesterol**

Dado que la cuantificación de fosfolípidos en cada una de las muestras de LBA dio como resultado concentraciones muy bajas, para cuantificar el nivel de colesterol presente se realizó un “pool” de muestras para cada grupo de trabajo, de modo que la medición en HPLC siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.5.2, se llevó a cabo en una muestra por cada grupo. Se realizó una curva de calibración mediante la utilización de un estándar de colesterol con concentraciones 0.25, 0.625, 1.25, 1.875, 2.5 mg/ml (Figura 31).

Se observó un aumento de la concentración de colesterol en el grupo 4 (P20/PEEP2) con respecto al resto de los grupos. Los resultados se muestran en la tabla 4 y en la figura 32.

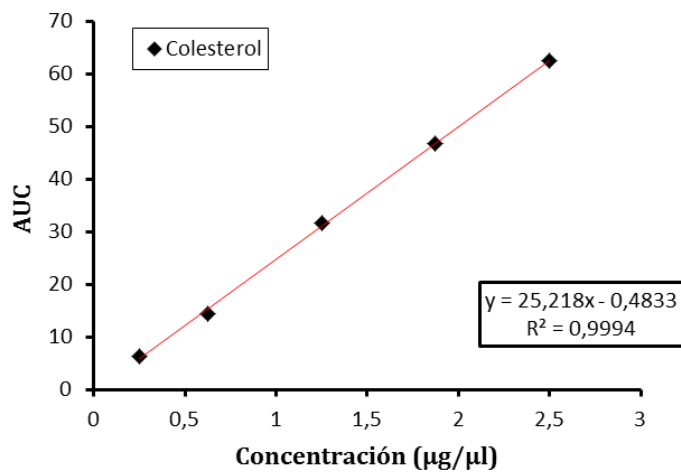


Figura 31. Curva de calibración para cuantificación de colesterol mediante HPLC.

Tabla 4. Cuantificación de Colesterol

Grupo	Nombre	Conc. (mg/ml)
1	Ctr	0,71
2	P10/PEEP2	0,86
3	P10/PEEP5	0,83
4	P20/PEEP2	1,17
5	P20/PEEP5	0,93

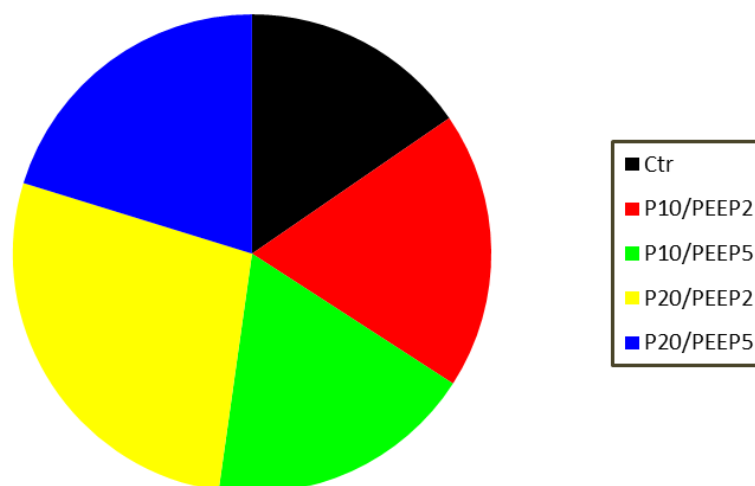


Figura 32. Representación gráfica de la cuantificación de colesterol en cada grupo de trabajo, en función de la concentración total. Para la confección del gráfico se utilizaron los datos de la tabla 4.

5.4 Experimentos explorativos - Microscopia multi-fotónica, resuelta en el tiempo (FLIM) y espectral con microscopio DIVER

Como método de análisis novedoso del efecto de los diferentes tipos de ventilación mecánica sobre el tejido pulmonar se propuso utilizar las medidas de fluorescencia endógena del tejido como herramienta de valoración del daño pulmonar. Para eso se realizaron dos tipos de medidas en cortes de tejidos pulmonares sin tinción: 1) decaimiento de fluorescencia del NADH, y 2) información espectral de la fluorescencia endógena (autofluorescencia del NADH y FAD). Para el caso de FLIM, cada pixel en la imagen corresponde a un decaimiento de fluorescencia y su color se asocia a cambios en las fracciones de NADH libre o unido a enzimas (púrpura a rojo, respectivamente) (Figura 33 B). Los resultados del análisis de autofluorescencia del NADH en los pulmones en estudio muestran que el tejido pulmonar ventilado a presiones elevadas presenta un mayor nivel de NADH libre (Correspondiente al color púrpura) en relación al control y al grupo tratado a baja presión, en los que se puede observar un mayor nivel de NADH unido (Figura 33 C).

El segundo tipo de análisis se realizó colectando información espectral del tejido pulmonar (Figura 33 D, E y F). El FAD, forma oxidada del dinucleótido de flavina y adenina es una molécula autofluorescente también utilizada como marcador metabólico. El FAD y el NADH pueden ser separados

espectralmente, por lo que, a través de colectar información de intensidad de fluorescencia con filtros de transmisión con función seno/coseno y transformando los datos en dominio de la frecuencia podemos obtener el gráfico de fasor espectral donde se encuentra la información espectral de nuestra muestra. La relación entre FAD y NADH se utiliza como índice redox. En nuestro caso, lo utilizamos como un “fingerprint” del daño pulmonar. Para los datos espectrales cada pixel de la imagen corresponde a un espectro.

El análisis de los pulmones en estudio mediante los datos espectrales muestra que no hay grandes diferencias entre los distintos grupos (Figura 33 F). Sin embargo, vale la pena indicar que la distribución espacial de la información muestra diferencias que podrían servir para análisis más complejos con algoritmos de reconocimiento de patrones como los utilizados en algunas herramientas de inteligencia artificial.

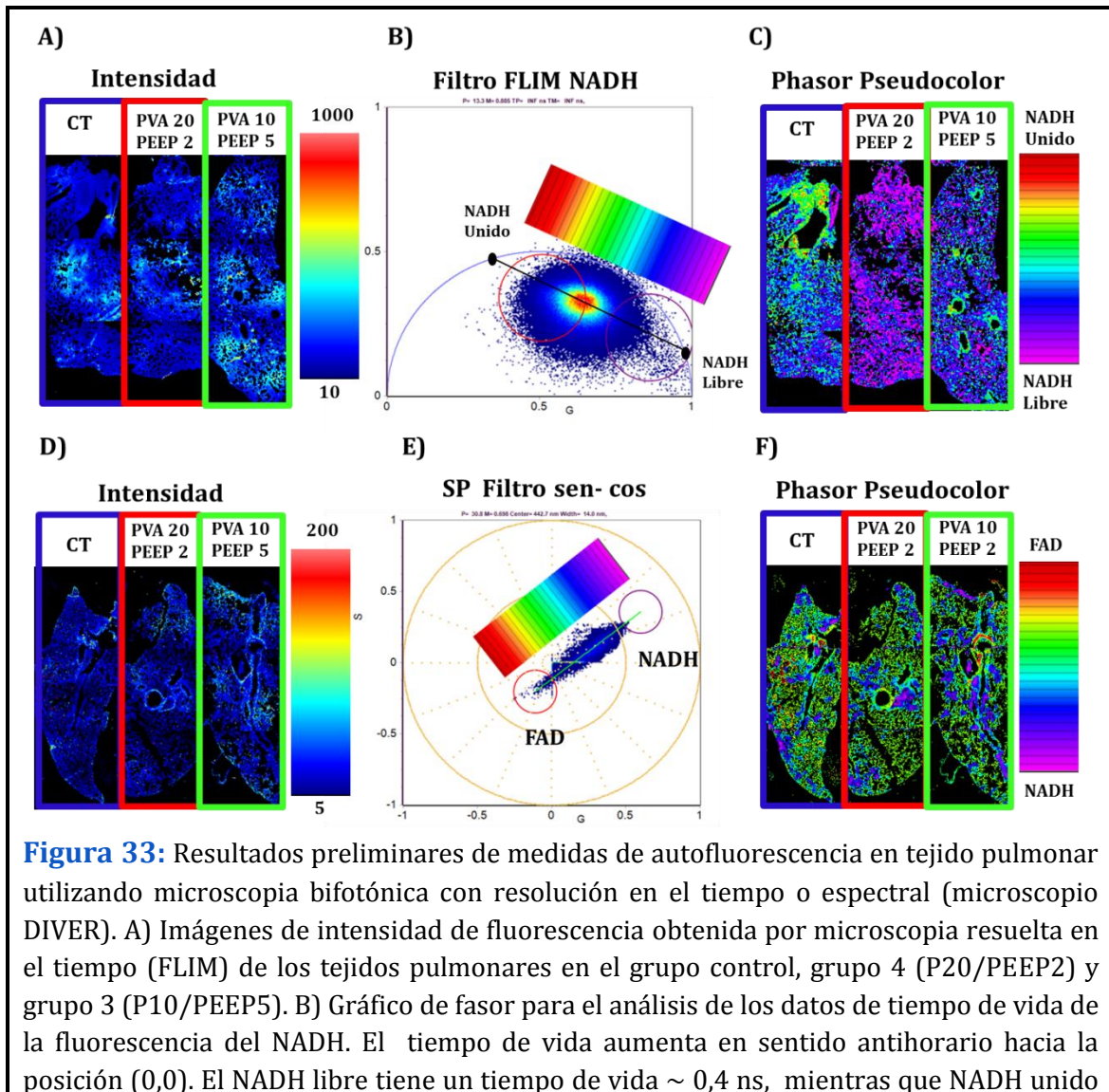


Figura 33: Resultados preliminares de medidas de autofluorescencia en tejido pulmonar utilizando microscopia bifotónica con resolución en el tiempo o espectral (microscopio DIVER). A) Imágenes de intensidad de fluorescencia obtenida por microscopia resuelta en el tiempo (FLIM) de los tejidos pulmonares en el grupo control, grupo 4 (P20/PEEP2) y grupo 3 (P10/PEEP5). B) Gráfico de fasor para el análisis de los datos de tiempo de vida de la fluorescencia del NADH. El tiempo de vida aumenta en sentido antihorario hacia la posición (0,0). El NADH libre tiene un tiempo de vida $\sim 0,4$ ns, mientras que NADH unido

posee un tiempo de vida más largo ($\sim 3,4$ ns). La línea que une ambos puntos representa la combinación lineal de diferentes fracciones del NADH libre o unido. La escala de color representa las diferentes fracciones del NADH libre y unido (del púrpura al rojo, respectivamente). F) Imagen de pseudocolor generada a partir de la escala de color elegida en el gráfico de fasor (B) del tejido pulmonar en los grupos control, 3 y 4.

D) Imágenes de intensidad de fluorescencia promedio para el análisis espectral por filtros de seno/coseno de los tejidos pulmonares en el grupo control, grupo 4 (P20/PEEP2) y grupo 3 (P10/PEEP5). E) Gráfico de fasor espectral a partir del uso de filtros seno-coseno-intensidad total de la autofluorescencia proveniente del FAD y NADH. Los corrimientos espectrales se visualizan como un cambio en la fase (aumento desde la posición (1,0) = espectro más rojo) en sentido antihorario y el ensanchamiento de los espectros como un cambio en la modulación (distancia al centro del fasor, mayor modulación = espectro más angosto). F) Imagen de pseudocolor generada a partir de la escala de color elegida en el gráfico de fasor (E), grupo control, 3 y 4. La escala indica la fracción de fluorescencia proveniente del FAD y NADH, rojo o púrpura respectivamente.

6. DISCUSIÓN

La ventilación mecánica ha sido el motor generador de daño pulmonar elegido para este modelo experimental. Al mismo tiempo, todos los avances que se obtienen a partir de nuestra aproximación tienen como objetivo aportar elementos para comprender el rol del surfactante pulmonar y, en último término mejorar la calidad de la asistencia ventilatoria que se ofrece a los pacientes.

Por este motivo es que intentaremos responder algunas preguntas clave para comprender en qué contexto obtenemos los datos experimentales y su potencial traslación futura a la práctica clínica.

¿Cómo genera daño este modelo de VILI?

Una de las principales virtudes de utilizar la ventilación mecánica como mecanismo generador de daño pulmonar es que replica condiciones muy similares a las que se utilizan en clínica, lo que lo convierte en un modelo valioso. Sin embargo, la deformación mecánica de un sistema complejo como es el respiratorio genera múltiples estímulos a estructuras, vías y mecanismos que muchas veces escapan al control del investigador y por lo tanto limitan la identificación unívoca de una respuesta a la hipótesis planteada.

Por ese motivo hemos definido una estrategia de experimentación con algunas características: desarrollo de un diseño experimental simplificado (4 grupos de estudio con patrones de ventilación precisos), selección de un vector de lesión claro (cambio cíclico de presión en vía aérea representado por la driving pressure y la PEEP) y determinar un contexto de mecánica pulmonar que permita analizar un objetivo principal (análisis estructural y funcional del surfactante pulmonar como pieza clave del daño pulmonar generado).

Independientemente de estas consideraciones previas existen determinadas condiciones inherentes al modelo de pulmón aislado que deben ser claramente establecidas para comprender alguno de los resultados obtenidos.

En primer lugar, al tratarse de un modelo de ventilación en pulmón aislado todo el sistema tiende al colapso debido al retroceso elástico pulmonar sin el contrapeso de la caja torácica. Esto implica que el nivel de apertura alveolar conseguido dependerá básicamente de la actividad del surfactante pulmonar y del nivel de PEEP aplicado.

En segundo lugar, el modelo de ventilación se desarrolla con los pulmones “colgados” y no suspendidos en líquido, por lo que el gradiente gravitacional

se dirige de vértice a base (y no antero posterior). Esto diferencia a este modelo del utilizado por nuestro grupo de trabajo en el año 2011 (Briva-2011A) donde la ventilación mecánica se desarrolló con el tórax cerrado y los animales en decúbito supino. En esa ocasión se observó independientemente del protocolo de ventilación aplicado la tendencia al colapso en los sectores dorsales (área dependiente con mayor efecto gravitacional y la corrección con la aplicación de PEEP) (Figura 34 en Anexo).

En este modelo se trabaja con pulmones exanguinados por lo que no hay un componente vascular dentro del efecto gravitacional y se reduce la participación de activación inflamatoria sistémica y endovascular notoriamente. Partimos de pulmones todos iguales y los sometemos a diferentes condiciones de estrés mecánico que formalmente se mantienen en el tiempo (presión en vía aérea, frecuencia respiratoria, etc), pero que progresivamente deterioran el surfactante, por lo que la mecánica pulmonar va necesariamente variando a lo largo de los 30 minutos. Esto agrega un componente “temporal” (el tiempo mínimo de ventilación mecánica lesiva para generar cambios en la mecánica) y la aparición del deterioro “regional” gracias al componente gravitacional (permanente) sumado a la disfunción del surfactante (progresivo). El gradiente de distribución vertical que se genera se superpone al estiramiento mecánico inducido por el ventilador. De ahí la importancia de comparar las tres regiones (superior, media e inferior) dentro de cada grupo y como se modifica (o no) cada región desde el inicio hasta el final de los 30 minutos de VM. Este concepto de deterioro regional ha sido previamente estudiado como respuesta a determinadas combinaciones de volumen corriente y PEEP (Albaiceta-2011) (Figura 35 anexo) pero poco se sabía hasta el momento acerca de este concepto en VM guiadas por presión.

El análisis del tejido pulmonar luego de la VM muestra que efectivamente hay diferencias entre las tres regiones. Además estas diferencias se acentúan en los grupos donde los pulmones fueron ventilados a altas presiones de trabajo. Cada sector tiene una dinámica diferente, el lóbulo superior está más abierto y tiene una respuesta lineal; el sector medio es de transición y se observa un punto de apertura alveolar claro y el inferior sufre mayoritariamente el efecto de la gravedad y su respuesta de apertura es más errática. Se puede observar que los grupos ventilados a altas presiones de trabajo (grupos 4 y 5, Con VM a presión de 20 mmH₂O) muestran claras evidencias de edema pulmonar y colapso alveolar en relación al resto de los grupos, además el daño está mayoritariamente localizado en el lóbulo inferior lo que confirma el gran efecto gravitacional que presenta el modelo.

El efecto de la *driving pressure* como principal responsable de lesión confirmaría lo expuesto por autores como Das (Das-2019). Del análisis aportado por Das a través de su modelización, se observa como mantener PEEP constante con VT creciente conduce a aumento del estiramiento del tejido, reclutamiento por volumen y potencia mecánica. Todas estas variables se han asociado con aumento de la morbilidad y mortalidad de pacientes y de manera esquemática reflejan lo que se genera en nuestro modelo con los grupos 4 y 5. Sin embargo si observamos más detenidamente el comportamiento de estos dos últimos grupos “de lesión” en su capacidad de homogeneizar la distribución del gas alveolar podríamos concluir que el agregado de PEEP, incluso con un *driving pressure* elevado es altamente protector. Por otro lado, los resultados obtenidos de las medidas de grosor de tabique, indicador de edema pulmonar, muestran un comportamiento similar, se confirma el efecto protector de la PEEP en VM tanto a bajas como altas presiones.

Este efecto protector de la PEEP en cuanto al tejido no es tan evidente cuando observamos las alteraciones del perfil y composición del surfactante. El análisis por HPLC permitió la separación y cuantificación de todos los fosfolípidos del surfactante. La cuantificación muestra que todos los fosfolípidos aumentaron considerablemente sus concentraciones en el grupo 4 ventilado a altas presiones y mínimo nivel de PEEP. Sobre todo si tenemos en cuenta a la fosfatidilcolina, fosfolípido más abundante del surfactante y principal responsable de su función tensoactiva, el cual aumentó su concentración más del doble en relación al grupo control y a los grupos ventilados a bajas presiones. Los fosfolípidos minoritarios PE, PS y SM que poseen características estructurales muy importantes para el correcto funcionamiento del SP también muestran aumentos en sus concentraciones. La SM particularmente muestra concentraciones variables entre los grupos, estas variaciones pueden asociarse a características fisiológicas de los animales en estudio, peso, frecuencia cardíaca, temperatura corporal. El análisis también permitió identificar diferencias en las concentraciones de colesterol entre los distintos patrones ventilatorios. Al igual que los fosfolípidos se observó aumento del colesterol en los grupos lesivos, lo que confirmaría que hay una fuerte correlación entre los fosfolípidos y el colesterol y que la VM con distintos patrones altera en gran medida la composición del surfactante. Estos resultados se correlacionan con estudios previos.

En el año 1995 Orgeig y colaboradores habían demostrado por primera vez que la composición del surfactante alveolar en mamíferos puede cambiar rápidamente en respuesta a un estímulo fisiológico y que la

naturaleza de ese cambio en la composición depende del patrón de respiración. En ese caso un aumento de la frecuencia respiratoria aumentó notablemente las concentraciones de colesterol y fosfolípidos en el espacio alveolar (Orgeig-1995). Datos anteriores ya informaban acerca del aumento en la secreción de surfactante como respuesta a volúmenes corrientes altos en pulmones aislados de rata (Nicholas-1982). Nuestros resultados ponen en evidencia que además patrones de VM con altas presiones producen alteraciones de la composición del surfactante.

El aporte de PEEP si bien muestra un efecto positivo en los valores, no logra corregirlos completamente. Cuando se aumentó la PEEP en el grupo 5, el patrón ventilatorio fue mas cercano al de lesión máxima que al protector. Esta aparente discordancia se puede comprender ya desde trabajos pioneros (Nieman-2017) donde se establece que la utilización de un nivel adecuado de PEEP no aleja de la posibilidad de daño pulmonar. En ese caso la utilización de PEEP no evita la posibilidad de daño pulmonar si esta se asocia a un Volumen corriente elevado que promueve la ventilación por encima del Punto de Inflexión Superior de la relación P-V.

¿EL patrón ventilatorio protege/lesiona al tejido pulmonar o al surfactante? Todos los investigadores coinciden en que la apertura y colapso alveolar cíclicos conducen invariablemente a diferentes grados de lesión pulmonar. Al mismo tiempo está bastante bien establecido que la magnitud de ese daño además está relacionado con la intensidad del estímulo (en valores absolutos o a lo largo del tiempo).

Profundizando el análisis, nuestros resultados están alineados con el trabajo de autores como Retamal (Retamal-2014) que en un modelo experimental de heterogeneidad pulmonar en rata ha propuesto que las zonas de transición micromecánica generan “concentradores de estrés”. Estos gradientes a través de las paredes alveolares promueven la aparición de atelectasias no lobares que amplifican a nivel tisular el efecto estresor y conducen a la alteración ostensible de la mecánica pulmonar. El concepto general de concentradores de stress es altamente compatible con la repercusión alveolar, la generación de microgradientes y la alteración progresiva del surfactante pulmonar como origen de la transición entre el stress mecánico provocado por la ventilación mecánica y el biotrauma propuesto hace ya varios años (Serpa-2012, Cressoni-2014, Retamal-2014, Wellman-2014).

Por otro lado nos planteamos identificar con herramientas de fluorescencia y microscopia esas zonas de transición generadas por concentradores de estrés. La autofluorescencia o fluorescencia endógena se ha utilizado durante mucho tiempo como marcador molecular para estudiar cambios

metabólicos en células y tejidos (Stringari-2012, Datta-2016, Ranjit-2017). El NADH y FAD son las moléculas autofluorescentes más importantes en la célula y se convirtieron en herramientas muy útiles como huellas metabólicas en fisiología y patología. Se ha demostrado que los cambios en el metabolismo celular se correlacionan con la relación NAD^+/NADH en la célula, conocida como índice metabólico (Winkler-2015, Köhler-2018). Los cambios en el metabolismo provocan variaciones en la relación de NAD^+/NADH y que se correlacionan con la proporción de NADH libre o unido (Stringari-2011, Wright-2012). Cuando el NADH libre es alto, esto es indicativo de un metabolismo más glucolítico (efecto Warburg). Por el contrario, si el NADH unido a enzimas aumenta, esto es indicativo de un incremento en la fosforilación oxidativa (Digman-2008, Ma-2016). Las mediciones basadas en intensidad de fluorescencia son un sistema complejo y dependen de los rendimientos cuánticos de las especies contribuyentes en el sistema. Sin embargo las medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo son independientes de la concentración, por lo que, la microscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo (FLIM) se ha convertido en una de las técnicas no invasivas más utilizadas para estudiar el metabolismo celular (Stringari-2012, Datta-2016, Ma-2016, Ranjit-2019). Debido a la resolución espacial y temporal única que posee permite estudiar el metabolismo celular en gran detalle y correlacionar los cambios del metabolismo en diferentes partes de la célula con resolución de píxeles (Ranjit-2019). Para el análisis de los datos de FLIM se utilizan gráficos de fasores lo cual tiene varias ventajas sobre las medidas utilizando ajustes de decaimientos.

Las primeras mediciones de tiempo de vida por autofluorescencia del NADH en los tejidos pulmonares en estudio permitieron identificar diferencias en los tiempos de vida del NADH entre el grupo control y el grupo ventilado a altas presiones y baja PEEP. Hay mayor proporción de NADH libre mientras que el grupo control muestra un mayor nivel de NADH unido. El grupo 3 (P10/PEEP5) mostró resultados intermedios, indicando algún tipo de daño pero disminuyendo la severidad con respecto al grupo con más presión y menor PEEP. Esto concuerda y robustece los datos anteriormente discutidos, dado que además de identificar cambios estructurales, también existen bases bioquímicas y funcionales no visibles con microscopía convencional. Vale destacar que el valor metabólico en muestras fijadas es discutible, dado que el proceso de fijación puede afectar la relación NADH libre o unido (Braber-2010). Sin embargo, en nuestro caso hemos podido identificar un fingerprint característico para el grupo de lesión más importante. Los resultados espectrales no fueron tan significativos como los obtenidos por FLIM. Esto puede deberse a varias circunstancias como discutíamos

anteriormente. Pese a eso, es interesante puntualizar los cambios en la organización de los clusters de NADH libre en los diferentes tratamientos. Pensamos que un análisis más detallado de la distribución espacial de los cambios espectrales en combinación con algoritmos de inteligencia artificial podrían ayudarnos a revelar patrones que no son sencillos de identificar simplemente con los datos absolutos. Un punto importante a destacar y discutir a cerca del valor de esta tecnología es su valor cuantitativo y la posibilidad de estudiar aspectos funcionales sin renunciar a estudios de cambios patognomónicos de estructura como el engrosamiento de tabique o colapso alveolar. Es interesante hacer notar una vez más el carácter de microscopia sin marca, lo cual en nuestra opinión es otro punto a destacar. Aunque estos resultados no son concluyentes constituyen una primera aproximación a las medidas de tiempos de vida que el grupo seguirá desarrollando. Estos resultados son los primeros indicios de que podrían producirse cambios a nivel metabólico como consecuencia de diferentes patrones ventilatorios.

Tanto las medidas de tiempo de vida como la correlación de las variaciones en las concentraciones de los componentes del surfactante con posibles efectos funcionales a través de las medidas de tensoactividad constituyen nuestros próximos desafíos con el fin de optimizar estrategias ventilatorias que protejan al tejido pulmonar en etapas tempranas impidiendo el deterioro funcional y estructural del surfactante.

7. CONCLUSIONES

Hemos podido desarrollar un modelo de injuria pulmonar aguda utilizando pulmones aislados bajo protocolos de VILI. Abordamos las repercusiones de los diferentes patrones ventilatorios sobre la estructura del tejido pulmonar, así como sobre la composición del surfactante pulmonar y la bioquímica. Los análisis histológicos mostraron engrosamiento de los tabiques y disminución del área alveolar durante la ventilación a altas presiones. El engrosamiento de los tabiques y la disminución del área alveolar pueden estar relacionados a la aparición de edema pulmonar y al aumento del colapso alveolar respectivamente, por lo que, constituyen medidas indirectas de daño pulmonar. La utilización de niveles de PEEP mas elevados disminuyó notoriamente el daño, lo que pone de manifiesto el efecto protector de la PEEP. Por otro lado, el análisis del tejido pulmonar discriminado por lóbulo permitió identificar un incremento del daño en los lóbulos medio e inferior.

El análisis mediante HPLC permitió la separación y cuantificación de todos los fosfolípidos del surfactante. El perfil de fosfolípidos se modificó en los pulmones bajo los protocolos VILI, el efecto de la presión y la PEEP fue diferencial. Se observó aumento en las concentraciones de fosfolípidos en los grupos tratados a altas presiones y baja PEEP. Al igual que los fosfolípidos se observó aumento del colesterol en los grupos lesivos, lo que confirmaría que existe correlación entre los fosfolípidos y el colesterol y que los protocolos VILI generan alteraciones en la composición del surfactante pulmonar.

Por último, se valoró el daño pulmonar mediante la utilización de fluorescencia endógena del NADH y FAD. Esta nueva herramienta nos brindó la oportunidad de investigar los efectos metabólicos en los pulmones bajo diferentes protocolos de Ventilación Mecánica. En una primera aproximación, se observó diferencia en los tiempos de vida del NADH. Los resultados mostraron un incremento de NADH libre en los grupos tratados a altas presiones lo que se traduce en un metabolismo mucho más glucolítico en el tejido con protocolo VILI.

Como desafíos y perspectivas a futuro creemos que sería importante continuar con la caracterización y el estudio metabólico de los tejidos pulmonares mediante esta nueva tecnología que permite identificar aspectos bioquímicos y funcionales que escapan en microscopia convencional. Nos planteamos además correlacionar los hallazgos

histológicos y bioquímicos con el análisis funcional del surfactante pulmonar mediante mediciones de tensoactividad en balanza de Langmuir-Blodgett.

8. ANEXO

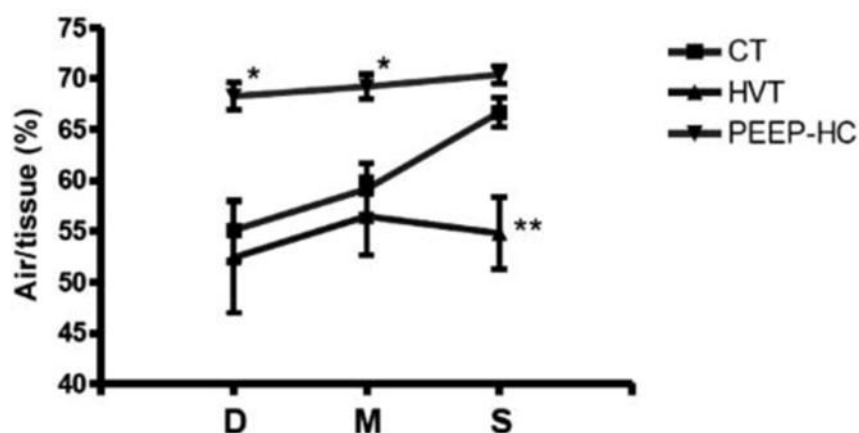


Figura 34: Representación gráfica de la distribución de la relación gas/tejido en cortes histológicos de pulmones de rata ventiladas. La ventilación mecánica se desarrolló con el tórax cerrado y los animales en decúbito supino.

Independientemente del protocolo de ventilación aplicado se observa la tendencia al colapso en los sectores dorsales (área dependiente con mayor efecto gravitacional y la corrección con la aplicación de PEEP). CT= Control, HVT= high tidal volumen = PEEP+HC = PEEP con hipercapnia. D = dorso, M = medio, = S = Eterna. (Imagen tomada de Briva-2011A).

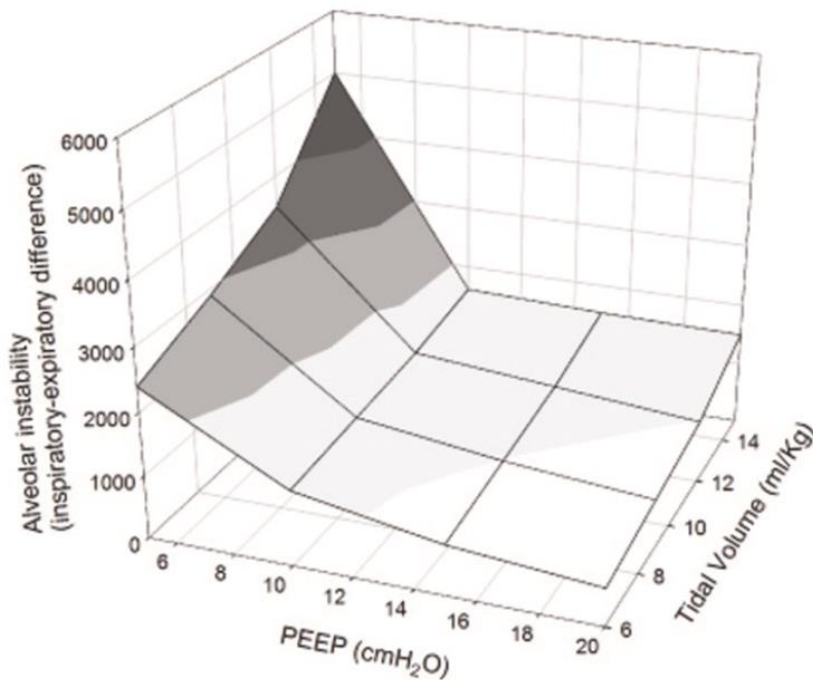


Figura 35: Influencia del patrón ventilatorio en la estabilidad alveolar. Se puede observar que la combinación de alto volumen corriente con bajo nivel de PEEP genera el mayor daño pulmonar, la inestabilidad alveolar aumenta a mayor volumen corriente pero disminuye con el aporte de PEEP. Se puede observar además que una serie de combinaciones de esas dos variables generarían un “gradiente” de lesión o daño. (Imagen extraída de Albaiceta-2011).

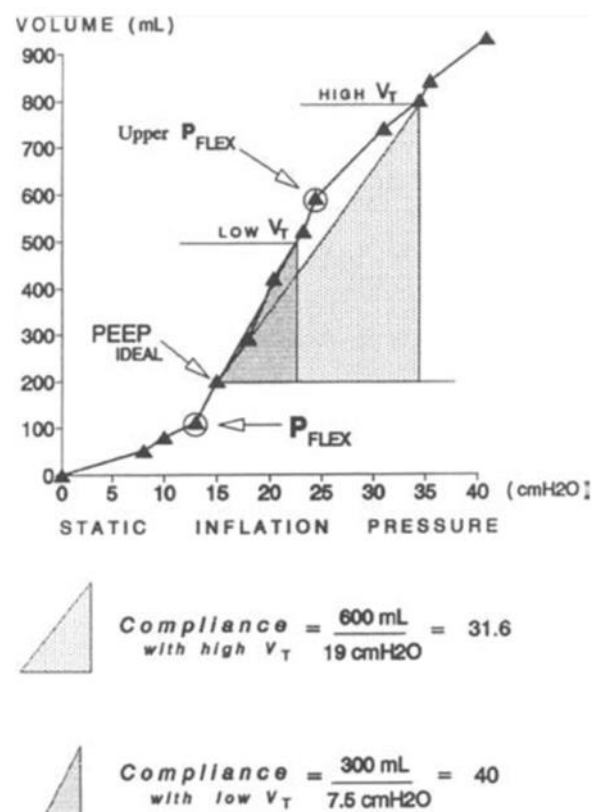


Figura 36: Curva de presión / volumen (P / V) de un paciente con SDRA que muestra los puntos de inflexión superior e inferior (P_{FLEX}). En este paciente la ventilación con un volumen corriente alto ($V_t = 10 \text{ ml / kg}$ más PEEP ideal = 15 cmH₂O) causaría una distensión excesiva ya que la ventilación está muy por encima del P_{FLEX} superior. La ventilación con bajo V_t y PEEP ideal estaba por debajo del P_{FLEX} superior. La utilización de un nivel adecuado de PEEP no aleja de la posibilidad de daño pulmonar si esta se asocia a un V_t elevado que promueve la ventilación por encima del Punto de Inflexión Superior de la relación P-V. (Imagen tomada de Das-2019).

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aberg, C., E. Sparr, M. Larsson y H. Wennerstrom (2010). "A theoretical study of diffusional transport over the alveolar surfactant layer." J R Soc Interface 7(51): 1403-10.
- Amato MBP, et al. Driving Pressure and Survival in the Acute Respiratory Distress Syndrome N Engl J Med 2015; 372:747-755.
- ARDS Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med. 2000 May 4;342(18):1301-8.
- Arancibia, F & Soto, R. (2010). Daño pulmonar inducido por la ventilación mecánica. Revista chilena de medicina intensiva; Vol 25(4): 205-210.
- Anzueto, A. (1997). "Effects of aerosolized surfactant in patients with stable chronic bronchitis: a prospective randomized controlled trial." J.Am.Med. Assoc. 278: 1426-1431.
- ARDS Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med. 2000 May 4;342(18):1301-8.
- Ashino, Y. Ying, X. Dobbs, L. G. and Bhattacharya, J. (2000). "[Ca(2+)](i) oscillations regulate type II cell exocytosis in the pulmonary alveolus." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279(1): L5-13.
- Bagatolli, L. Mouritsen, O. Vida ¿una cuestión de grasas? Una perspectiva desde la biofísica de membranas. Ecuador: Yachay; 2014.
- Balcells J. (2003). "Monitorización de la función respiratoria: curvas de presión, volumen y flujo". An Pediatr (Barc); 59(3):252-85.

- Baritussio, A., Pettenazzo, A., Benevento, M., Alberti, A. and Gamba, P. (1992). "Surfactant protein C is recycled from the alveoli to the lamellar bodies." *Am J Physiol* 263(5 Pt 1): L607-11.
- Batenburg J.J. (1995). Biosynthesis, secretion, and recycling of surfactant components. en *Surfactant Therapy for Lung Disease*, ed. by Robertson, W. Tacuseh (serie Lung Biology in Health and Disease, New York: Marcel Dekker) 84: 47. 73.
- Batenburg, J.J. and Haagsman, H. P. (1998). "The lipids of pulmonary surfactant: dynamics and interactions with proteins." *Prog Lipid Res* 37(4): 235-76.
- Bates SR, Beers M.F., Fisher A.B. (1992). Binding and uptake of surfactant protein C by alveolar type II cells. *Am. J. Physiol.* 263: L333-L341.
- Benson, B., Hawgood, S. and Williams, M. (1984). "Role of apoprotein and calcium ions in surfactant function." *Exp Lung Res* 6(3-4): 223-36.
- Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959 Aug;37(8):911-7.
- Botas, C., Poulain, F., Akiyama, J., Brown, C., Allen, L., Goerke, J., Clements, J., Carlson, E., Gillespie, A. M., Epstein, C. and Hawgood, S. (1998). "Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20): 11869-74.
- Braber S, Verheijden KA, Henricks PA, Kraneveld AD, Folkerts G. A comparison of fixation methods on lung morphology in a murine model of emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;299(6):L843-L851.
- Briva A, Santos C, Malacrida L, et al. Adenosine triphosphate-dependent calcium signaling during ventilator-induced lung injury is amplified by hypercapnia. *Exp Lung Res.* 2011;37(8):471 - 481. (A)
- Briva A, Malacrida L, Amarelle L. (2011). Mecánica ventilatoria. En FEFMUR. (Ed.), *Fisiopatología: Mecanismos de las disfunciones*

orgánicas. (pp. 95-122). Montevideo, Uruguay: Oficina del libro FEFMUR. (B)

- Brouwers J, Gadella B, van Golde L, Tielens AG. Quantitative analysis of phosphatidylcholine molecular species using HPLC and light scattering detection. *J Lipid Res* 1998 Feb;39(2):344 - 53.
- Bunger H, Pison U. Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high - performance liquid chromatography and lightscattering detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1995 Oct 6;672(1):25 - 31.
- Casals, C. (2001). "Role of surfactant protein A (SP-A)/lipid interactions for SP-A functions in the lung." *Pediatr Pathol Mol Med* 20(4): 249-68.
- Casals, C. and García-Verdugo, I., Eds. (2005). Molecular and functional properties of surfactant protein A. . In *Developments in Lung Surfactant Dysfunction in Lung Biology in Health and Disease*. New York, Marcel Dekker.
- Chen SH, Kou A . Improved procedure for the separation of Phospholipids by high- performance liquid chromatography. *Joun of Chromatography*, 227 (1982). p 25-31.
- Cheong, N., Zhang, H., Madesh, M., Zhao, M., Yu, K., Dodia, C., Fisher, A. B., Savani, R. C. and Shuman, H. (2007). "ABCA3 is critical for lamellar body biogénesis in vivo." *J Biol Chem* 282(33): 23811-7.
- Correger E, Murias G, Chaconc E, Estrugac A, Sales B, Lopez J, Montanya J, Lucangelof U, Garcia O, Villagra A, Villar J, Kacmarek R, Burgueno M, Blanch L. (2012). Interpretation of ventilator curves in patients with acute respiratory failure. *Medicina Intensiva*. Volume 36, Issue 4, Pages 294-30.
- Cressoni M, Cadringer P, Chiurazzi C, Amini M, Gallazzi E, Marino A, Brioni M, Carlesso E, Chiumello D, Quintel M, Bugedo G, Gattinoni L (2014) Lung inhomogeneity in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 189:149–158

- Cristancho W. Fisiología respiratoria. Lo esencial en la práctica clínica. Editorial El Manual Moderno. Primera edición, Bogotá 2004.
- Crouch, E., Persson, A., Chang, D. and Parghi, D. (1991). "Surfactant protein D. Increased accumulation in silica-induced pulmonary lipoproteinosis." *Am J Pathol* 139(4): 765-76.
- 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).
- Crouch, E. and Wright, J. R. (2001). "Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense." *Annu Rev Physiol* 63: 521-54.
- Cruz, A. Pérez-Gil, J. Langmuir Films to Determine Lateral Surface Pressure on Lipid Segregation. In A. M. Dopico.(ed), *Methods in Molecular Biology: Methods in Membrane Lipid*. Vol. 400. Madrid;2007.p 439-457.
- Curstedt T., Halliday H, Speer C. A unique story in neonatal research: the development of a porcine surfactant. *Neonatology*, 2015. 107(4): p. 321-329.
- Daniels, C. B., O. V. Lopatko y S. Orgeig (1998). "Evolution of surface activity related functions of vertebrate pulmonary surfactant." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25(9): 716 - 21.
- Das, A., Camporota, L., Hardman, J. G., & Bates, D. G. (2019). What links ventilator driving pressure with survival in the acute respiratory distress syndrome? A computational study. *Respiratory research*, 20(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-0990-5>.
- Datta R., Heylman C., George S. C., Gratton E., "Label-free imaging of metabolism and oxidative stress in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes," *Biomed. Opt. Express* 7(5), 1690–1701 (2016).
- 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).

- De la Serna J.B, Orädd 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. *Biophys J.* 2009 Sep 2;97(5):1381-9.
- De la Serna J.B, Hansen S, Berzina Z, Simonsen A.C, Hannibal-Bach H.K, Knudsen J, Ejlsing 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).
- Dietl P., Haller T., Mair N. and Frick M. 2001. "Mechanism of surfactant exocytosis in alveolar type II cells in vitro and in vivo." *News Physiol Sci* 16:238-243.
- Digman MA, Caiolfa VR, Zamai M, Gratton E. The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis. *Biophys J.* 2008 Jan 15; 94(2):L14-6.
- Dreyfuss D, Saumon G. 1998. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med*; 157:294-323.
- Dong Q., Wright J. (1998). Degradation of surfactant protein D by alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* 274: L97-L105.
- Donoso A, Cruces P. (2007). Pulmonary damage produced by mechanical ventilation and conventional protective ventilatory strategy. *Revista chilena de pediatría*, 78(3), 241-252.
- Dvornikov, A., Malacrida, L., & Gratton, E. (2019). The DIVER Microscope for Imaging in Scattering Media. *Methods and protocols*, 2(2), 53.
- Eeman M, D. M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14, 719–736 (2010).

- Fereidouni F, Bader A, Gerritsen H. Spectral phasor analysis allows rapid and reliable unmixing of fluorescence microscopy spectral images. *Optic express*, 2012. 20(12): p. 12729-12741.
- Fisher, J. and Manson, R. (1995). "Expression of pulmonary surfactant protein D in rat gastric mucosa." *Am J Respir Cell Moll Biol* 12(1): 13-8.
- Follows D., Tiberg F., Thomas R.K. and Larsson M. 2007. "Multilayers at the surface of solutions of exogenous lung surfactant: direct observation by neutron reflection." *Biochim Biophys Acta* 1768:228-235.
- Fredes S, Steinberg¹ E, Tiribelli N, Santa Maria A, Berté M, Segura N Noval D, Ilutovich S. Effect of PEEP on inspiratory resistance components in patients with acute respiratory distress syndrome ventilated at low tidal volumen. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2019; 31(4):483-489.
- Frick, M., Bertocchi, C., Jennings, P., Haller, T., Mair, N., Singer, W., Pfaller, W., Ritsch-Marte, M. and Dietl, P. (2004). "Ca²⁺ entry is essential for cell straininduced lamellar body fusion in isolated rat type II pneumocytes." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(1): L210-20.
- Ganter, C. C., S. M. Jakob y J. Takala (2006). "Pulmonary capillary pressure. A review." *Minerva Anesthesiol* 72(1 - 2): 21 - 36.
- Giner, J. Tesis doctoral "Organización molecular en películas de Langmuir. Estudios por simulación y aplicación en dispositivos orgánicos electroluminiscentes". Cordoba 2009.
- Goerke, J. (1998). "Pulmonary surfactant: functions and molecular composition." *Biochim Biophys Acta* 1408(2 - 3): 79 - 89.
- Gonzalez, R., Yang, Y. H., Griffin, C., Allen, L., Tigue, Z. and Dobbs, L. (2005). "Freshly isolated rat alveolar type I cells, type II cells, and cultured type II cells have distinct molecular phenotypes." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288(1): L179-89.

- Grace K, The Ventilador: selection of mechanical ventilators. Critical Care Clinics, Volumen 14. Numero 4. Octubre 1988. W.B. Saunders Company. Ph. Pennsylvania. USA.
- Grieco, D. L., Chen, L., & Brochard, L. (2017). Transpulmonary pressure: importance and limits. *Annals of translational medicine*, 5(14), 285. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.07.22>.
- Gunasekara, L., S. Schurch, W. M. Schoel, K. Nag, Z. Leonenko, M. Haufs y M. Amrein (2005). "Pulmonary surfactant function is abolished by an elevated proportion of cholesterol." *Biochim Biophys Acta* 1737(1): 27 - 35.
- Gunther A, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walmrath D, et al. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res* 2001;2(6):353-64.
- Guthmann, F., Harrach-Ruprecht, B., Looman, A. C., Stevens, P. A., Robenek, H. and Rustow, B. (1997). "Interaction of lipoproteins with type II pneumocytes in vitro: morphological studies, uptake kinetics and secretion rate of cholesterol." *Eur J Cell Biol* 74(2): 197-207.
- Gutiérrez Muñoz, Fernando. (2011). Ventilación mecánica. *Acta Médica Peruana*, 28(2), 87-104.
- Haagsman H, Van Golde L. Synthesis and assembly of lung surfactant. *Annu Rev Physiol*, 1991. 53(441-464).
- Hakansson, K., Lim, N. K., Hoppe, H. J. and Reid, K. B. (1999). "Crystal structure of the trimeric alpha-helical coiled-coil and the three lectin domains of human lung surfactant protein D." *Structure* 7(3): 255-64.
- Haller, T., Dietl, P., Stockner, H., Frick, M., Mair, N., Tinhofer, I., Ritsch, A., Enhorning, G. and Putz, G. (2004). "Tracing surfactant transformation from cellular release to insertion into an air-liquid interface." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(5): L1009-15.

- Hamlington K, Smith B, Dunn C, Charlebois C, Roy G, Bates J.(2018). Linking lung function to structural damage of alveolar epithelium in ventilator-induced lung injury. *Respir Physiol Neurobiol.* 255: 22-29.
- Hawgood S. (1997). *Surfactant: composition, structure and metabolism.* Philadelphia W.J. Crystal R.G., Weibel E.R., Barnes P.J. Lippincott-Raven. Publishers.
- Hawgood, S., Derrick, M. and Poulain, F. (1998). "Structure and properties of surfactant protein B." *Biochim Biophys Acta* 1408(2-3): 150-60.
- Head, J. F., Mealy, T. R., McCormack, F. X. and Seaton, B. A. (2003). "Crystal structure of trimeric carbohydrate recognition and neck domains of surfactant protein A." *J Biol Chem* 278(44): 43254-60.
- Henderson RJaTDR. Thin Layer Chromatography. In: R.J.Hamilton & S.Hamilton, editor. *Lipids Analysis. A Practical Approach.*Oxford: IRL Press; 1992. p. 65 - 111.
- Herbein, J. F., Savov, J. and Wright, J. R. (2000). "Binding and uptake of surfactant protein D by freshly isolated rat alveolar type II cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(4): L830-9.
- Herzog, E. L., A. R. Brody, T. V. Colby, R. Mason y M. C. Williams (2008). "Knowns and unknowns of the alveolus." *Proc Am Thorac Soc* 5(7): 778 - 82.
- Horowitz A.O., Muussavian 13., Han E.D., Baatz J.E., Whitsett J.A. (1997a). Distinet effects uf SP-A and SP-B on endocytosis of SP-C by pulmonary epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 273: L159-L271
- Hurtado J & Santos C., (2005). *Medicina intensiva respiratoria,* Montevideo, Uruguay: Oficina del libro FEFMUR.
- Ikegami, M., Elhalwagi, B. M., Palaniyar, N., Dienger, K., Korfhagen, T. R., Whitsett, J. A. and McCormack, F. X. (2001). "The collagen-like region of surfactant protein A (SP-A) is required for correction of

surfactant structural and functional defects in the SP-A null mouse." J Biol Chem 276: 38542-8.

- Izquierdo-García JL, Naz S, Nin N, Rojas Y, Erazo M, Martínez-Caro L, García A, de Paula M, Fernández-Segoviano P, Casals C, Esteban A, Ruíz-Cabello J, Barbas C, Lorente JA. A Metabolomic Approach to the Pathogenesis of Ventilator-induced Lung Injury. *Anesthesiology*. 2014 Mar; 120(3):694-702.
- Jameson, D. M., Gratton, E. & Hall, R. D. The Measurement and Analysis of Heterogeneous Emissions by Multifrequency Phase and Modulation Fluorometry. *Applied Spectroscopy Reviews* 20, 55–106 (1984).
- Jimenez-Cabré E. Tesis Doctoral "Determinantes y efectos de la integración de la proteína SPB del surfactante pulmonar en membranas lipidicas". Madrid 2009.
- Johansson, J., T. Szyperski, T. Curstedt y K. Wuthrich (1994). "The NMR structure of the pulmonary surfactant - associated polypeptide SP - C in an apolar solvent contains a valyl - rich alpha - helix." *Biochemistry* 33(19): 6015 - 23.
- Johnson, M. D. (2007). "Ion transport in alveolar type I cells." *Mol Biosyst* 3(3): 178 - 86.
- Köhler, S., Winkler, U., Sicker, M. & Hirrlinger, J. NBCe1 mediates the regulation of the NADH/NAD + redox state in cortical astrocytes by neuronal signals. *Glia* 1–13 (2018). doi:10.1002/glia.2350
- Korfhagen, T. R., Sheftelyevich, V., Burhans, M. S., Bruno, M. D., Ross, G. F., Wert, S. E., Stahlman, M. T., Jobe, A. H., Ikegami, M., Whitsett, J. A. and Fisher, J. H.(1998). "Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo." *J Biol Chem* 273(43): 28438-43.
- Kuroki, Y., M. Takahashi y C. Nishitani (2007). "Pulmonary collectins in innate immunity of the lung." *Cell Microbiol* 9(8): 1871 - 9.
- Lang, C. J., Postle, A. D., Orgeig, S., Possmayer, F., Bernhard, W., Panda, A. K., Jurgens, K. D., Milsom, W. K., Nag, K. and Daniels, C. B. (2005).

"Dipalmitoylphosphatidylcholine is not the major surfactant phospholipid species in all mammals." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289(5):R1426-39.

- Lopez-Rodriguez E. et al. Meconium impairs pulmonary surfactant by a combined action of cholesterol and bile acids. *Biophys J*, 2011. 100(3): p. 646-55.
- Loring, SH y Malhotra, A. (2015). Driving Pressure and Respiratory Mechanics in ARDS. *The New England journal of medicine*, 372 (8), 776-777. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1414218>.
- Lovesio C. Capitulo Ventilación Mecánica. *Medicina Intensiva*, Enero 2006, Editorial El Ateneo, Buenos Aires, Argentina.
- Ma N, Digman MA, Malacrida L, Gratton E. Measurements of absolute concentrations of NADH in cells using the phasor FLIM method. *Biomed Opt Express*. 2016 Jun 1;7(7):2441-52
- Maina, J. N. y J. B. West (2005). "Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood - gas barrier." *Physiol Rev* 85(3): 811 - 44.
- Malacrida L. Perfil fosfolipídico del surfactante pulmonar de ratas anestesiadas con Sevofluorano in Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias, UdelaR: Montevideo. 2009.
- Malacrida, L. Tesis doctoral "Surfactante Pulmonar durante la Lesión Pulmonar Aguda: desde la fisiopatología a los aspectos biofísicos de su disfunción". Montevideo 2014.
- Malacrida L, Jameson DM, Gratton E. A multidimensional phasor approach reveals LAURDAN photophysics in NIH-3T3 cell membranes. *Sci Rep*. 2017 Aug 23;7(1):9215.
- Malacrida L, Gratton E. laurdan de fluorescencia y de faser parcelas revelan los efectos de un H₂O₂ bolo en NIH-3T3 de fibroblastos membranas dinámica y la hidratación. *Radic Biol Med* . 2018; 128: 144-156.

- Marini J. (2019). Evolving concepts for safer ventilation. *Critical Care*, 23(Suppl 1):114.
- Martín MT, Prieto I, Camacho L, Möbius D. Partial Stacking of a Water-Soluble Porphyrin in Complex Monolayers with Insoluble Lipid. *Langmuir* 1996, 12, 6554.
- Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment..*Annu Rev Pathol*. 2011 Feb 28;6:147-63.
- Mead J, Takishima T, Leith D. Stress distribution in lungs: A model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol*. 1970;28:596-608.
- Melton, K. R., Nessler, L. L., Ikegami, M., Tichelaar, J. W., Clark, J. C., Whitsett, J. A. and Weaver, T. E. (2003). "SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(3): L543-9.
- Meyer, K. C. and Zimmerman, J. J. (2002). "Inflammation and surfactant." *Paediatric Respiratory Reviews* 3: 308-314.
- McCormack, F. X. and Whitsett, J. A. (2002). "The pulmonary collectins, SP-A and SPD, orchestrate innate immunity in the lung." *J Clin Invest* 109(6): 707-12.
- Möhwald, H. (1995) Phospholipid monolayers, in *Structure and Dynamics of Membranes - From Cells to Vesicles* (Möhwald, H., Lipowsky, R., and Sackmann, E., Eds.), pp 161-211, North-Holland.
- Nicholas TE, Power JHT, Barr HA. The pulmonary consequences of a deep breath. *Respir Physiol*. 1982; 49:3 15-324.
- Noguee, L. M., Garnier, G., Dietz, H. C., Singer, L., Murphy, A. M., deMello, D. E. and Colten, H. R. (1994). "A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds." *J Clin Invest* 93(4): 1860-3.
- Noguee LM. Genetics of the hydrophobic surfactant proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19;1408(2-3):323-33.

- Noguee, L. M. (2002). "Abnormal expression of surfactant protein C and lung disease." *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(6): 641-4.
- Notter, R. H. (2000) Lung surfactant: basic science and clinical application. New York, Marcel Decker.
- Obladen, M., D. Popp, C. Scholl, H. Schwarz y F. Jahnig (1983). "Studies on lung surfactant replacement in respiratory distress syndrome. Rapid film formation from binary mixed liposomes." *Biochim Biophys Acta* 735(2): 215 - 24.
- Olmeda Lozano, B. Tesis doctoral "Relaciones estructura-función del sistema surfactante pulmonar: detección de complejos multiproteicos nativos y participación del surfactante en la difusión interfacial del oxígeno". Madrid 2011.
- Orgeig, S., P. S. Hiemstra, E. J. Veldhuizen, C. Casals, H. W. Clark, A. Haczku, L. Knudsen y F. Possmayer (2010). "Recent advances in alveolar biology: evolution and function of alveolar proteins." *Respir Physiol Neurobiol* 173 Suppl: S43 - 54.
- Orgeig S, Barr HA, Nicholas TE. Effect of hyperpnea on the cholesterol to disaturated phospholipid ratio in alveolar surfactant of rats. *Experimental Lung Research*. 1995 Jan-Feb; 21(1):157-174.
- Osanai, K., Mason, R. J. and Voelker, D. R. (1998). "Trafficking of newly synthesized surfactant protein A in isolated rat alveolar type II cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(6): 929-35.
- Osanai, K., Tsuchihara, C., Hatta, R., Oikawa, T., Tsuchihara, K., Iguchi, M., Seki, T., Takahashi, M., Huang, J. and Toga, H. (2006). "Pulmonary surfactant transport in alveolar type II cells." *Respirology* 11 Suppl: S70-3.
- Osterlaken-Dijksterhuis, M. A., van Eijk, M., van Buel, B. L., van Golde, L. M. and Haagsman, H. P. (1991b). "Surfactant protein composition of lamellar bodies isolated from rat lung." *Biochem J* 274 (Pt 1): 115-9.

- Panda AK, Nag K, Harbottle RR, Rodriguez-Capote K, Veldhuizen RA, Petersen NO, Possmayer F. Effect of acute lung injury on structure and function of pulmonary surfactant films. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 May;30(5):641-50.
- Parker J, Hernández L, Peevy K. Mechanisms of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med*. 1993;21:131-43.
- Pedrosa JM. Pérez M. Prieto I. Martín MT. Möbius D. Camacho L. Aggregate formation in mixed monolayers at the air–water interface of metal-complex tetracationic water-soluble porphyrins attached to a phospholipid matrix. *Phys. Chem. Chem. Phys*. 2002, 4, 2329.
- Pérez-Gil, J. (2008). "Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions." *Biochim Biophys Acta* 1778(7-8): 1676-95.
- Perez-Gil J1, Weaver TE. Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology (Bethesda)*. 2010 Jun; 25(3):132-41.
- Pérez, M., & Mancebo, J.. (2006). Monitorización de la mecánica ventilatoria. *Medicina Intensiva*, 30(9), 440-448.
- Pinto RA., Flawgoud S. Cleinents J, A. Benson B, J. Naidu A. Hainiltoix R.L. Wnglxt J.R. (1995). Association of surfactant protein C with isolated alveolar Type II cells. *Biochim, Biophys. Acta* 1255: 16-22
- Planells, F. Vasallo, J. Cernadas, C. Mecánica de ventilación. En Dvorkin, M. Cardinali, D. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. 14a(ed). Editorial médica panamericana; 2010.p 149-167.
- Poulain, F. R., Nir, S. and Hawgood, S. (1996). "Kinetics of phospholipid membrane fusion induced by surfactant apoproteins A and B." *Biochim Biophys Acta* 1278(2): 169-75.
- 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).

- Ranjit S, Malacrida L, Stakic M, Gratton E. Determination of the metabolic index using the fluorescence lifetime of free and bound nicotinamide adenine dinucleotide using the phasor approach. *J Biophotonics*. 2019; 12(11):e201900156.
- Ranjit S, Malacrida L, Gratton E. Differences between FLIM phasor analyses for data collected with the Becker and Hickl 830 BH card and with the FLIMbox card. 2018. Manuscripto aceptado en *Microscopy Research and Technique* (ID MRT-18-141).
- Retamal J, Bergamini BC, Carvalho AR, Bozza FA, Borzone G, Borges JB, Larsson A, Hedenstierna G, Bugedo G, Bruhn A (2014) Non-lobar atelectasis generates inflammation and structural alveolar injury in the surrounding healthy tissue during mechanical ventilation. *Crit Care* 18:505
- Rimensberger PC, Pristine G, Mullen BM, Cox PN, Slutsky AS. Lung recruitment during small tidal volume ventilation allows minimal positive end-expiratory pressure without augmenting lung injury. *Crit Care Med*. 1999;27:1940–5.
- Rooney, S. A. (2001). "Regulation of surfactant secretion." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129(1): 233-43.
- Rouby JJ. Lung overinflation: The hidden face of alveolar recruitment. *Anesthesiology*. 2003;99: 2–4.
- Rouser, G., Siakotos, A. N. and Fleischer, S. (1966). "Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots." *Lipids* 1(1): 85-6.
- Sartori C, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. *Eur Respir J* 2002;20: 1299–1313.
- Schurch, D., O. L. Ospina, A. Cruz y J. Perez - Gil (2010). "Combined and independent action of proteins SP - B and SP - C in the surface behavior and mechanical stability of pulmonary surfactant films." *Biophys J* 99(10): 3290 - 9.

- Seeger, W., Gunther, A., Walmrath, H. D., Grimminger, F. and Lasch, H. G. (1993). "Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome. Pathogenetic role and therapeutic prospects." Clin Investig 71(3): 177-90.
- Seiberlich E, Santana JA, Chaves RA, Seiberlich RC. (2011) Ventilación Mecánica Protectora, ¿Por qué utilizarla? . Rev Bras Anesthesiol; 61: 5: 361-365.
- Serpa Neto A, Cardoso SO, Manetta JA, Pereira VG, Esposito DC, Pasqualucci Mde O, Damasceno MC, Schultz MJ (2012) Association between use of lung-protective ventilation with lower tidal volumes and clinical outcomes among patients without acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis. JAMA 308:1651–1659.
- Serpa Neto A, et al. Association between driving pressure and development of postoperative pulmonary complications in patients undergoing mechanical ventilation for general anaesthesia: a meta-analysis of individual patient data. The Lancet Volume 4, No. 4, p272–280, April 2016.
- Serrano, A. G. and Perez-Gil, J. (2006). "Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system." Chem Phys Lipids 141(1-2): 105-18.
- Shafiq R, Rapid isocratic method for the separation and quantification of major phospholipid classes by high-performance liquid.1991, Jul. DOI: 10.1016/0378-4347(91)80306-W.
- Sharick JT, Favreau PF, Gillette AA, Sdao SM, Merrins MJ, Skala MC. Protein-bound NAD(P)H Lifetime is Sensitive to Multiple Fates of Glucose Carbon. Sci Rep. 2018 Apr 3; 8(1):5456.
- Shulenin, S., Noguee, L. M., Annilo, T., Wert, S. E., Whitsett, J. A. and Dean, M. (2004). "ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency." N Engl J Med 350(13): 1296-303.
- Slutsky AS, Ranieri VM. (2013). Injuria pulmonar inducida por el respirador. N Engl J Med; 369: 2126-2136.

- Stevens, P. A., H. Wissel, S. Zastrow, D. Sieger y K. P. Zimmer (2001). "Surfactant protein A and lipid are internalized via the coated - pit pathway by type II pneumocytes." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(1): L141 - 51.
- Strange C, Shans S. The definitions and epidemiology of pleural space infection. *Semin Respir Infect* 1999; 14:3-8.
- Stringari, C. et al. Phasor approach to fluorescence lifetime microscopy distinguishes different metabolic states of germ cells in a live tissue. *Nat Acad Sci Proc* 108, 13582–13587 (2011).
- Stringari, C., Nourse, J. L., Flanagan, L. A. & Gratton, E. Phasor Fluorescence Lifetime Microscopy of Free and Protein-Bound NADH Reveals Neural Stem Cell Differentiation Potential. *PLoS One* 7, (2012).
- Suzuki, Y., Fujita, Y. and Kogishi, K. (1989). "Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant." *Am Rev Respir Dis* 140(1): 75-81.
- Tomicica V, Fuentealba A, Martinez A, Grafa J, Batista J. (2010). Fundamentos de la ventilación mecánica en el síndrome de distrés respiratorio agudo. *Med Intensiva*; 34(6):418–427.
- Tsai MY, Marshall JG. Phosphatidylglycerol in 261 samples of amniotic fluid from normal and diabetic pregnancies, as measured by one-dimensional thin-layer chromatography. *Clin Chem* 1979 May;25(5):682-5.
- Ulman, A. (1991) An introduction to Ultrathin Organic Films: from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly, Academic Press Inc., San Diego.
- Veldhuizen, R., K. Nag, S. Orgeig y F. Possmayer (1998). "The role of lipids in pulmonary surfactant." *Biochim Biophys Acta* 1408(2 - 3): 90 - 108.
- 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).

- Veldhuizen, E. J. and Haagsman, H. P. (2000a). "Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics." *Biochim Biophys Acta* 1467(2): 255-70.
- Veldhuizen, E. J., Waring, A. J., Walther, F. J., Batenburg, J. J., van Golde, L. M. and Haagsman, H. P. (2000b). "Dimeric N-terminal segment of human surfactant protein B (dSP-B(1-25)) has enhanced surface properties compared to monomeric SP-B(1-25)." *Biophys J* 79(1): 377-84.
- Voorhout, W. F., Veenendaal, T., Kuroki, Y., Ogasawara, Y., van Golde, L. M. and Geuze, H. J. (1992). "Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung." *J Histochem Cytochem* 40(10): 1589-97.
- Wang, P. et al. Proteomic analysis of lamellar bodies isolated from rat lungs. *BMC Cell Biol.* 9, 34 (2008).
- Weaver, T. E. y J. A. Whitsett (1991). "Function and regulation of expression of pulmonary surfactant - associated proteins." *Biochem J* 273(Pt 2): 249 - 64.
- Weaver T. Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1408: p. 173-179.
- Weaver, T. E. y J. J. Conkright (2001). "Function of surfactant proteins B and C." *Annu Rev Physiol* 63: 555 - 78.
- Wellman TJ, Winkler T, Costa EL, Musch G, Harris RS, Zheng H, Venegas JG, Vidal Melo MF (2014) Effect of local tidal lung strain on inflammation in normal and lipopolysaccharide-exposed sheep*. *Crit Care Med* 42:e491–500
- West J. Fisiología respiratoria. Editorial Médica Panamericana. Sexta edición, Buenos Aires, 2004.
- West, J. Fisiología Respiratoria, 7a Edición. Editorial Panamericana, 2007. Buenos Aires, Argentina.

- Williams MC., Hawgood S., Hamilton R. 1.(1991). Changes in lipid structure produced by, surfactant proteins SP-A, SP-B and SP-C. *Am. J. Respir. Cell mol. Biol.* 5: 41-50.
- Winkler, U. & Hirrlinger, J. Crosstalk of Signaling and Metabolism Mediated by the NAD⁺/NADH Redox State in Brain Cells. *Neurochem. Res.* 40, 2394–2401 (2015).
- Wright, J. R. and Clements, J. A. (1987). "Metabolism and turnover of lung surfactant." *Am Rev Respir Dis* 136(2): 426-44.
- Wright, J.R. (1997). Immunomodulatory functions surfactant. *Physiol. Rev.* 77:931-962.
- Wright, J. R. (2003). "Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense." *J Clin Invest* 111: 1453-1455.
- Yukitake, K., Brown, C. L., Schlueter, M. A., Clements, J. A. and Hawgood, S. (1995). "Surfactant apoprotein A modifies the inhibitory effect of plasma proteins on surfactant activity in vivo." *Pediatr Res* 37(1): 21-25.
- Zuo Y.Y. and Possmayer F. (2007). How does pulmonary surfactant reduce surface tension to very low values? *J Appl Physiol* 102:1733-1734.
- Zuo YY, Veldhuizen RA, Neumann AW, Petersen NO, Possmayer F. Current perspectives in pulmonary surfactant--inhibition, enhancement and evaluation. *Biochim Biophys Acta* 2008 Oct; 1778(10):1947-77.