



**Tesina de graduación**  
**Licenciatura en Bioquímica**  
**Facultad de Ciencias - Universidad de la República.**

***Optimización de la transferencia de monocapas lipídicas en una Balanza de Langmuir-Blodgett para el estudio de los efectos de los anestésicos inhalatorios en la interfase alveolar.***

**Bach: María José García**

**Tutor: Dr. Leonel Malacrida**

**Departamento de Fisiopatología –Hospital de Clínicas**

**Montevideo, Uruguay**

**2016**

*A mi padre Miguel por enseñarme el  
valor del trabajo y de la familia .*

## Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mi tutor el Dr. Leonel Malacrida, por haberme brindado la posibilidad de trabajar con él, por su apoyo y gran generosidad no solo en lo que respecta a la tesis y al trabajo en el laboratorio sino en cada cosa que necesite durante el proceso. Por su gran capacidad de trabajo y motivación. Muchas gracias por todo.

Agradecer también al Departamento de Fisiopatología del Hospital de Clínicas por permitirme llevar a cabo mi tesis, brindándome materiales e instrumentos. En particular agradecer al Dr. Arturo Briva por estar dispuesto a ayudarme y a colaborar en lo que necesitara y por abrirme las puertas para participar en proyectos futuros.

Finalmente, quiero agradecer a las personas que me acompañaron no solo durante esta tesis sino durante todo el camino, todos estos años. A mis padres, mis hermanos y amigos, en especial a Miguel, Patrick, Juliana, Valeria y Josiana por su apoyo incondicional y su aliento en los momentos que más lo necesite.

# Tabla de Contenido

Resumen .....	6
Introducción.....	8
1. Surfactante pulmonar .....	8
1.1 Composición del surfactante pulmonar .....	12
1.2 Funciones del surfactante pulmonar .....	18
1.2.1 Reducción de la tensión superficial en la interfase aire- líquido:.....	18
1.2.2 Mantenimiento de la homeostasis del líquido alveolar y rol del SP: .....	23
1.2.3 Defensa del organismo frente a la entrada de patógenos:.....	24
1.3 Metabolismo del surfactante pulmonar .....	24
1.3.1 Síntesis y almacenamiento de surfactante pulmonar.....	24
1.3.2 Secreción de surfactante pulmonar.....	29
1.3.3 Adsorción.....	32
1.3.4 Degradación y reciclaje de surfactante pulmonar .....	35
1.4 Patologías asociadas al surfactante pulmonar .....	35
1.5 Anestesia: efectos sobre membranas y el surfactante pulmonar .....	37
1.5.1 Anestésicos.....	41
1.5.2 Efecto de los anestésicos en modelos in vivo e in vitro sobre el pulmón y el surfactante pulmonar .....	44
1.6 Técnicas para el estudio de la función tensoactiva del surfactante pulmonar .....	46
1.6.1 Balanza de superficie de Langmuir-Blodgett: .....	46
Objetivos.....	52
2.1 Objetivo general .....	52
2.2 Objetivos específicos:.....	52
Materiales y Métodos.....	53
3.1 Obtención del surfactante pulmonar .....	53
3.2 Determinación de la concentración de fosfolípidos .....	54
3.3 Preparación de mezclas lipídicas .....	54
3.4 Ensayos tensoactivos.....	55
3.4.1 Tipo de cubeta .....	56
3.4.2 Limpieza de la cubeta.....	56

3.4.3 Experimento de deposición de monocapas sobre soporte.....	57
3.4.4 Isotermas de compresión.....	58
3.5 Transferencia de Monocapas .....	58
3.6 Observación del orden lateral de las monocapas por microscopia de fluorescencia ..	61
3.7 Cuantificación de la circularidad de los dominios como análisis de los métodos de transferencia y los cambios en la organización de las monocapas.....	63
3.7.1 Procesamiento de las imágenes.....	64
3.7.2 Análisis de los resultados.....	67
Resultados .....	69
4.1 Puesta a punto del funcionamiento de la Balanza .....	69
4.2 Transferencia de monocapas de DPFC sobre vidrio.....	73
4.3 Efectos del sevofluorano sobre las monocapas .....	90
4.4 Transferencia de monocapas tratadas previamente con Anestésicos.....	91
Discusión .....	93
Conclusiones y perspectivas.....	101
Bibliografía .....	103

## Resumen

El surfactante pulmonar (SP) es una mezcla de lípidos y proteínas con actividad tensoactiva alojada en la interface aire/agua alveolar, cuya función principal es disminuir la tensión superficial a cero durante de la espiración. Modificaciones en la cantidad o calidad de la composición del SP pueden ser responsables de causar diferentes patologías respiratorias. Pese a que los anestésicos inhalatorios son seguros y se utilizan ampliamente en la anestesia general durante las cirugías, se ha demostrado que pueden provocar un deterioro en las propiedades tensoactivas y la organización supramolecular del SP. En este trabajo se pretende optimizar la transferencia de monocapas en una balanza de Langmuir-Bludgett con motivo de estudiar los efectos de los anestésicos, sevoflurano, en la actividad tensoactiva y organización supramolecular en membranas modelo (dipalmitoilfosfatidilcolina, DPFC) y extracto orgánico de surfactante pulmonar. Particularmente pensamos correlacionar cómo responden a la compresión dinámica y/o quasi-estática los lípidos de SP así como la DPFC, con los cambios estructurales a partir de la transferencia de monocapas sobre vidrio. Para determinar los cambios estructurales utilizaremos el reparto preferencial que la sonda DiI<sub>C18</sub> posee por la fase líquido expandida ( $L_e$ ) en la DPFC y por la fase  $L_o$  en el SP y correlacionar la información tensoactiva con la organización de las monocapas a diferentes

Como resumen de los resultados más importante podemos decir que en esta tesis hemos podido reproducir los resultados previamente descritos para las isotermas de compresión de una monocapa de DPFC, identificando las transiciones de fase y organización supramolecular de estas monocapas, además de describir un nuevo

método de transferencia en etapas, lo cual facilita y reduce el trabajo de la transferencia.

Nuestros resultados demuestran que el sevoflurano anula completamente la transición de fase Líquido expandida/Líquido condensada (*Le/Lc*) para ambas membranas modificando la tensión basal y máxima, e incrementando el área de las membranas en equilibrio. El aumento en el área molecular de las monocapas por la administración de sevoflurano permite demostrar la incorporación de anestésico en la monocapa de SP.

El método simula las condiciones del espacio alveolar y nos permitirá comprender en el futuro los mecanismos biofísicos de la disfunción del SP durante la anestesia.

# Introducción

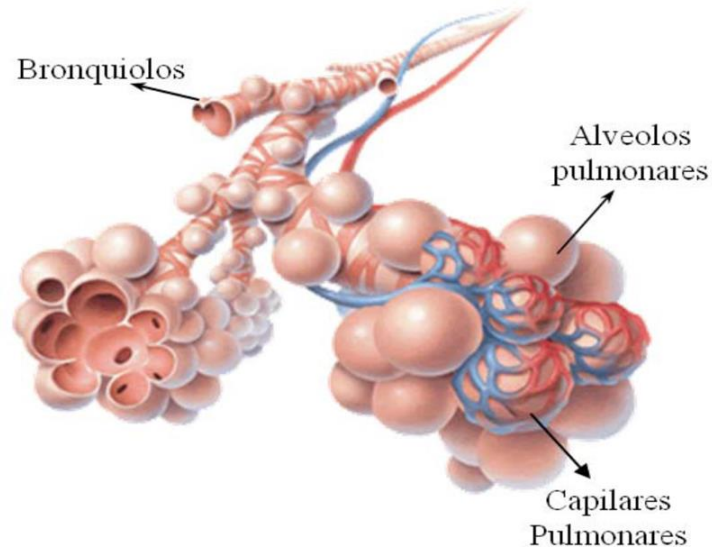
## 1. Surfactante pulmonar

La respiración es un proceso fisiológico esencial para la vida, supone un intercambio gaseoso con el medio ambiente, mediante el cual se capta  $O_2$  proveniente de la atmosfera, necesario para la respiración celular y se elimina  $CO_2$  del metabolismo celular (Jimenez-2009). El órgano encargado de facilitar este intercambio gaseoso y asegurar el aporte de oxígeno necesario para la respiración es el pulmón.

Los pulmones 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 están limitados con el abdomen por el diafragma, musculo que con su distensión y contracción impulsa la entrada y salida de gases. El aire ingresa al organismo a través de la vía aérea superior (fosas nasales, laringe y faringe) y es conducido a través de la tráquea, donde se bifurca en dos bronquios y cada uno alimenta un pulmón. Los bronquios se siguen bifurcando en los bronquiolos y al final de estos se localizan los alveolos, donde efectivamente tiene lugar el intercambio gaseoso mediante difusión pasiva entre el aire y la sangre (Figura 1) (Jimenez-2009).

En el ser humano se estima que existen aproximadamente 150 millones de alveolos de entre 75 y 300  $\mu m$  de diámetro, lo que supone una superficie de gran extensión que permite la captación de grandes cantidades de oxígeno (Daniels-Orgeig-2003, Rogan-2006).



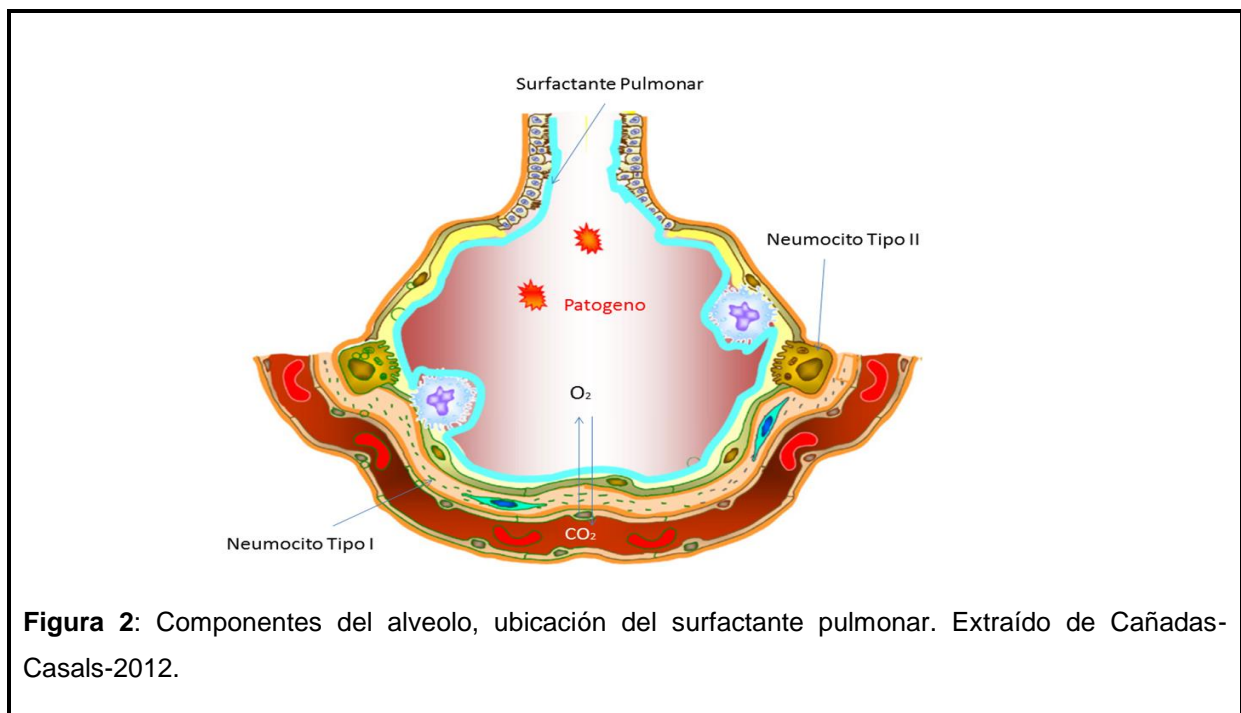


**Figura 1:** Esquema de la terminación de los bronquiolos en los sacos alveolares y la irrigación capilar del tejido pulmonar. Extraído de Pérez Gil-2010.

Luego de que el aire llega al alveolo para que se produzca el intercambio de gases es necesario el movimiento de moléculas de  $O_2$  y  $CO_2$  a través de la membrana alveolo-capilar (Figura 2). Este movimiento se da por difusión simple y depende de la presión parcial de los diferentes gases determinada en parte por: la concentración del gas disuelto, su coeficiente de solubilidad, la distancia entre el alveolo y la membrana capilar, y el tiempo de contacto entre la sangre y los alveolos (Soto-2011). El intercambio de gases se ve favorecido o enlentecido por los cambios en las presiones parciales de los gases.

La membrana alveolo-capilar mide alrededor de  $0.6\mu m$  de diámetro (Maina-West-2005), esta mínima distancia permite la difusión eficiente de gases entre el alveolo y el capilar. La membrana está formada por epitelio alveolar, una fina capa de líquido intersticial y endotelio alveolar. Como podemos ver en la figura 2 el epitelio alveolar está constituido por dos tipos de células que presentan diferencias estructurales y

funcionales denominadas neumocitos tipo I y neumocitos tipo II. Además de estas células estructurales el epitelio alveolar posee otro tipo de células como; macrófagos, que cumplen un rol fundamental en la defensa inmunológica. Los neumocitos tipo I son células escamosas de estructura aplanada y delgadas, dado que ocupan el 90% del espacio alveolar es donde se lleva a cabo mayoritariamente el intercambio gaseoso (Johnson-2006). Mientras que los neumocitos tipo II son células cubicas con microvellosidades apicales que ocupan el 10% de la superficie alveolar, encargadas de la distensión y recuperación del tamaño de los alveolos 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).



**Figura 2:** Componentes del alveolo, ubicación del surfactante pulmonar. Extraído de Cañadas-Casals-2012.

El surfactante pulmonar es un complejo lípoproteico que se produce y almacena en los neumocitos tipo II, como estructuras subcelulares denominados cuerpos lamelares. Los cuerpos lamelares (LBs) son estructuras de alto contenido lipídico, pero además poseen algunas de las proteínas relacionadas al SP. Los LBs están rodeados por membrana y su núcleo central se propone que está organizado como membranas multilamelares altamente compactadas (Perez-Gil-2008). Más recientemente, se ha postulado que los LBs se encuentran altamente deshidratados y esto podría condicionar la organización supramolecular que el organelo presenta *in vivo* (Cerrada-2015). Estos organelos contienen enzimas liposomales y apolipoproteínas que regulan la función de almacenamiento y procesamiento del surfactante pulmonar (Wang-2008). La función principal del surfactante pulmonar es disminuir la tensión superficial a cero al final de la espiración evitando el colapso alveolar. Pero además 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 vez secretados los cuerpos lamelares a la hipofase (ó epithelial lining fluid), como se conoce a esta fina capa acuosa que reviste el epitelio, los LBs sufren diversos cambios estructurales que finalmente permiten a su contenido ser adsorbido en la interfase aire/agua y formar una monocapa (Malacrida-2014). Los cuerpos lamelares pueden sufrir otro tipo de transformaciones como la formación a mielina tubular, la cual depende de una adecuada composición lipídica y la presencia de proteínas del surfactante pulmonar (SP-A y SP-B), así como de calcio (Poulain-1992). La mielina tubular es la forma estructural más importante del surfactante pulmonar extracelular, constituyendo 5-10% del surfactante total (Nag-1999).

El surfactante pulmonar además de brindar estabilidad mecánica al alveolo y su función autoinmune frente a microorganismos, también se ha demostrado que posee actividad antioxidante (Wright-1997). Debido a sus propiedades tensoactivas, el surfactante pulmonar favorece la solvatación de las partículas pequeñas que penetran por las vías aéreas con el agua de la hipofase acuosa, facilitando así su contacto con el epitelio alveolar (Schürch-1990). 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) ó 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).

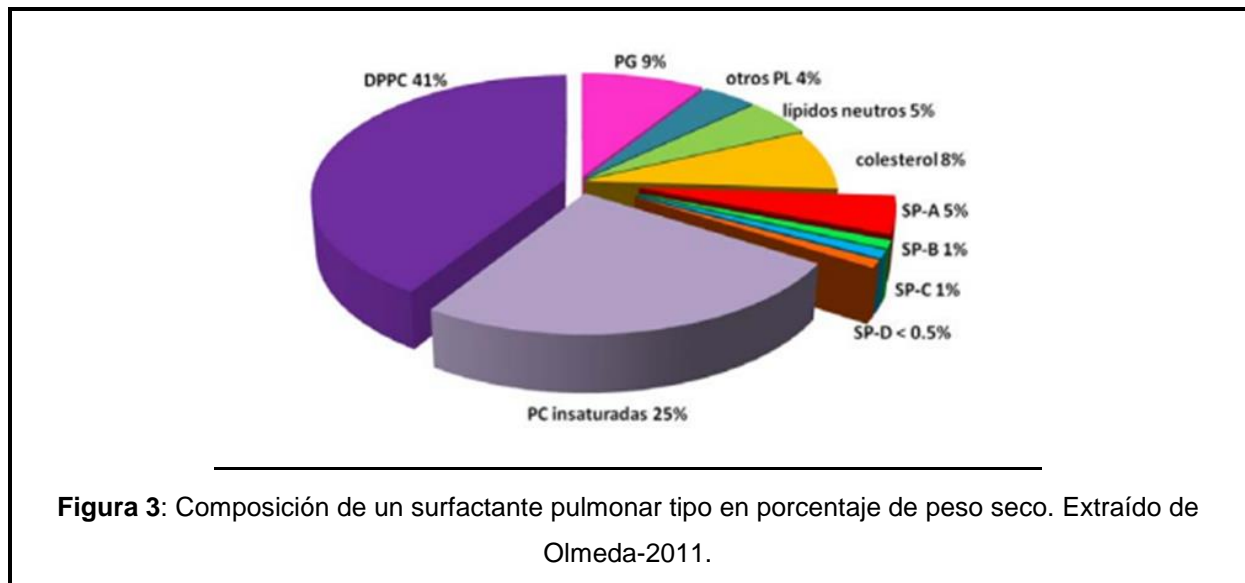
## **1.1 Composición del surfactante pulmonar**

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, que mayoritariamente corresponde a fosfolípidos, 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 constituida fundamentalmente por fosfatidilcolina (FC), esta especie ocupa el 80% de los fosfolípidos totales del surfactante pulmonar. Aproximadamente el 40% de la FC se encuentra disaturada

en forma de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPFC), la cual es una especie inusual en cualquier otro tejido y tiene implicancias muy importantes en la funcionalidad del SP (Hawgood-1997). La DPFC 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 resto de la fracción lipídica está compuesta además por fosfatidilglicerol (FG), segundo fosfolípido en importancia después de la FC, y fosfatidilinositol (PI), ambos son fosfolípidos aniónicos con una cabeza polar conteniendo carga negativa a pH fisiológico, representan el 10% y 2% respectivamente de los fosfolípidos del agente tensoactivo. Además posee fosfatidilserina (FS) y ácido fosfatídico (FA), que se encuentran en baja proporción. En surfactantes provenientes de pulmones del feto los niveles de PI son más altos pero los valores se revierten en la vida adulta (Pérez Gil-2006). La composición de lípidos neutros se encuentra asociada principalmente al colesterol, el cual representa el 8-10% del peso del SP, esto significa una concentración próxima a 20% molar de fosfolípidos totales (de La Serna-2004), esta molécula es fundamental para la dinámica de las membranas del surfactante, y permite la segregación de las fases líquido ordenada ( $L_o$ ) y líquido desordenada ( $L_d$ ) (de la Serna- 2013). Por último es posible encontrar cantidades pequeñas de mono, di, tri acil glicerol y algunos ácidos grasos libres como palmitato. El SP también presenta en baja concentración fosfatidiletanolamina (FE), ácido liso-bis-fosfatídico (l-bis-FA), esfingomielina (SM), liso-fosfatidilcolina (liso-FC) y cardiolipina

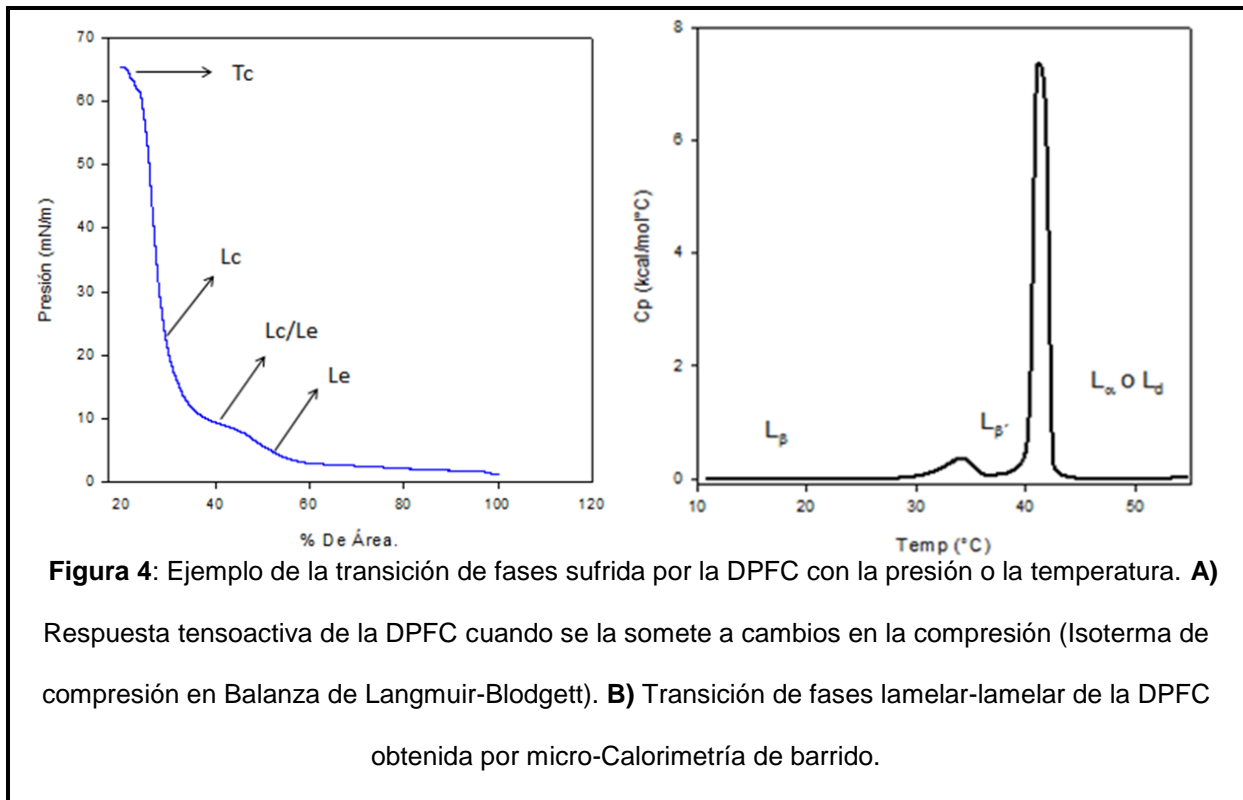
(Possmayer-2001, Agassandian-2013).



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). En estas monocapas los fosfolípidos 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, la presencia de otros lípidos tales como el colesterol y en el caso de la interfase alveolar, el estado de compresión. Básicamente estos 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). Los grados de libertad son los elementos necesarios para definir adecuadamente una fase en membrana, así emulando las propiedades de los cristales líquidos podemos definir una fase gel (sólida,  $L_{\beta}$ ), líquida cristalina (fluida  $L_{\alpha}$  o líquida desordenada,  $L_d$ ) o una

fase líquido ordenada ( $L_o$ ) 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). A bajas temperaturas (temperaturas por debajo de la temperatura de transición de fase,  $t_m$ ) y en ausencia de colesterol las bicapas de fosfolípidos se encuentran en fase gel ( $L_\beta$ ), donde las moléculas de lípidos están muy ordenadas y presentan muy poca movilidad lateral (presentan restricción rotacional y difusional), en el SP dado el porcentaje de colesterol las membranas presentan una coexistencia de fases líquidas conocidas como líquido-ordenado ( $L_o$ )/líquido desordenado ( $L_d$ ) (de la Serna-2009), en particular en la fase  $L_o$  los fosfolípidos presentan restricción difusional pero no rotacional (Eeman-2010). Por encima de la temperatura de transición de fase las bicapas se encuentran en un estado fluido líquido- cristalino ( $L_\alpha$  o  $L_d$ ), las moléculas de lípido están desordenadas y presentan mayor capacidad difusional y rotacional (Eeman-2010). Tal como se menciona anteriormente los FL pueden sufrir una transición de fase no solo por cambios de temperatura, en la interfase alveolar los FL pueden sufrir transiciones de fase por cambios en la compresión asociados 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

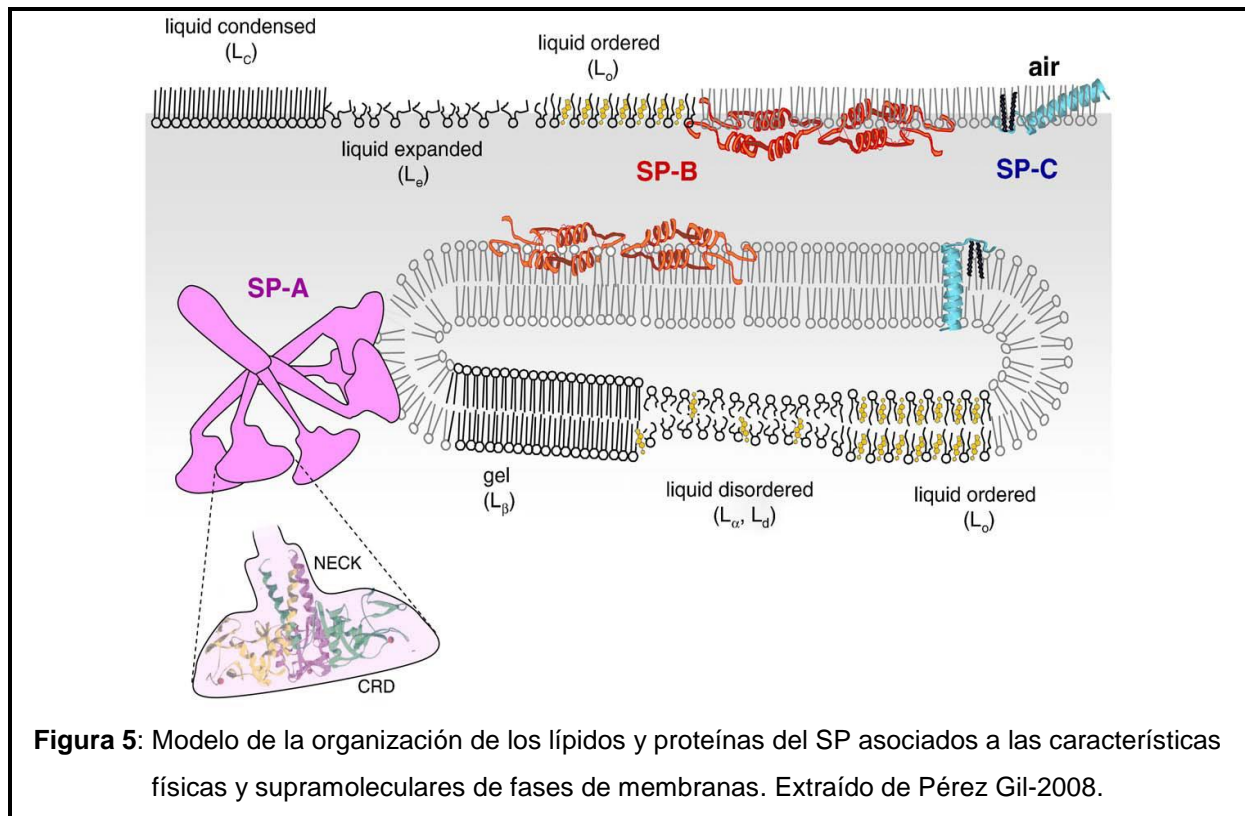
$L_{\alpha}$ . Al aumentar la compresión y disminuir la superficie, los lípidos pierden movilidad y se alcanza la fase liquido condensada ( $L_c$ ), en esta fase las moléculas están altamente ordenadas y presentan similitud con la fase de bicapa  $L_{\beta}$  (Eeman-2010) (Figura 5).



Otro factor determinante de la organización de fosfolípidos en la interfaz es el nivel de colesterol, este modula la fluidez de la membrana, 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  $L_{\beta}$  en bicapas) por lo que la presencia de colesterol define una fase particular denominada liquido ordenada ( $L_o$ ). Esta fase tiene características de viscosidad e hidratación particulares y que se asocian con la capacidad del colesterol de interactuar con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos



(Pérez-Gil-2008).



El surfactante está compuesto también por un grupo de proteínas específicas denominadas SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. Estas pueden clasificarse en dos grupos en función de sus características estructurales y propiedades funcionales (Possmayer 1988). La proteína mayoritaria del SP es SP-A (5%), mientras que la SP-B y C constituyen alrededor del 2% del peso seco del surfactante pulmonar. SP-A y SP-D son proteínas hidrofílicas y forman oligómeros de gran tamaño. Estas proteínas pertenecen a la familia de las colectinas, presentan regiones de tipo colágeno y dominios globulares con actividad lectina, las cuales poseen capacidad de reconocer y unirse a ciertas cadenas de carbohidratos en presencia de calcio. SP-B y SP-C son proteínas hidrofóbicas asociado a su secuencia aminoacídica rica en alanina y glicina. Estas pequeñas proteínas (SP-B y -C) interactúan fuertemente con los lípidos y promueven la formación y el adecuado

comportamiento dinámico de la película tensoactiva en la interfase aire-líquido (Possmayer-2001).

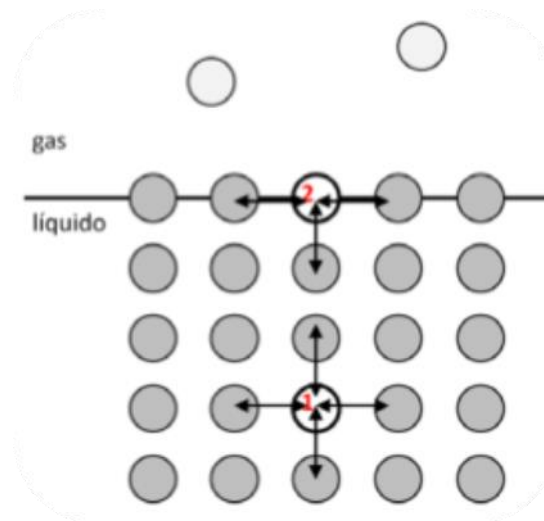
## **1.2 Funciones del surfactante pulmonar**

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 del organismo frente a la entrada de patógenos a partir de una respuesta inmune innata. La principal función y la más importante desde el punto de vista de los intereses de esta tesis es la capacidad que presenta el SP de reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido alveolar, esencial para evitar el colapso alveolar y reducir el trabajo pulmonar (Meyer-Zimmerman-2002). Por lo cual profundizaremos sobre esta característica.

### **1.2.1 Reducción de la tensión superficial en la interfase aire- líquido:**

Las moléculas en un líquido se organizan de modo que pueden establecer interacciones en todas las direcciones, sin embargo las moléculas que se encuentran en una interfase líquido-gas presenta la ausencia de interacciones con la fase gas, esto genera un componente neto cohesivo hacia la masa de líquido (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-20011). Esta energía que se necesita da lugar a lo que se conoce como tensión superficial ( $\gamma$ ), que es la fuerza

necesaria para expandir el área superficial del sistema (Figura 6



**Figura 6:** Fuerzas moleculares que causan la tensión superficial. Las moléculas en una masa líquida (1) interaccionan de manera compensada con las moléculas que la rodean mientras que las que se encuentran en la interfase (2) experimentan un componente neto de atracción hacia la masa líquida (Notter-2000).

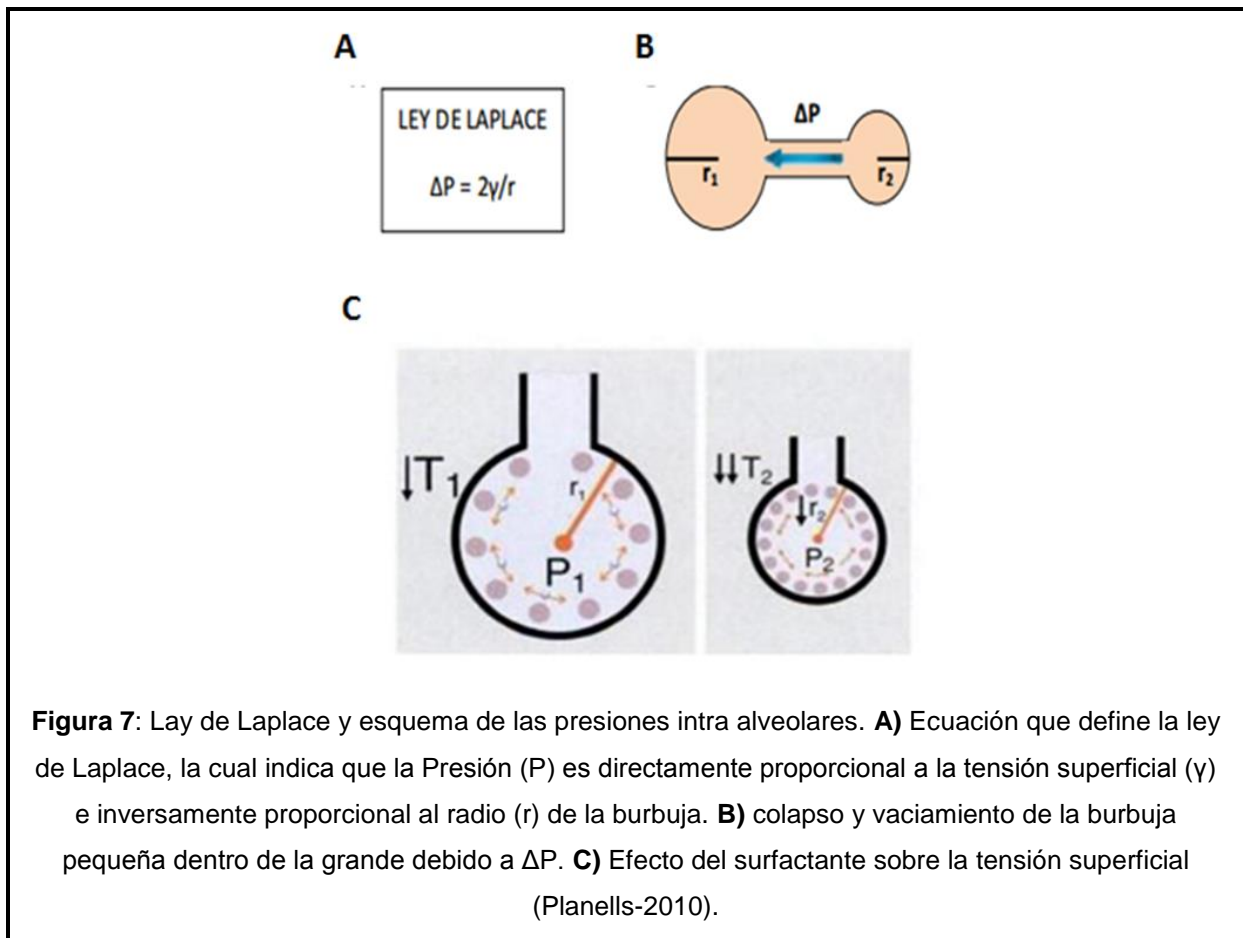
Los agentes activos de superficie (surfactantes) son una amplia clase de moléculas que tienen importancia biológica. Generalmente estas moléculas poseen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica. Esta naturaleza anfílica de los surfactantes es la responsable de su comportamiento de asociación u organización en solución como: miscelas, bicapas, vesículas, etc.; así como de su acumulación en las interfases aire/agua donde se orientan formando películas monomoleculares capaces de disminuir la tensión superficial. Esta propiedad se debe a que las fuerzas atractivas entre las moléculas del surfactante y las del líquido son menores que las del líquido entre sí (Notter-2000).

La presión superficial ( $\pi$ ) se define como la reducción de la tensión superficial en

una interfase aire/agua por la presencia de una película de material surfactante, se describe por la ecuación matemática:  $\pi = \gamma_0 - \gamma$ , siendo  $\gamma_0$  la tensión superficial del agua y  $\gamma$  la tensión superficial cuando el surfactante está presente en la superficie (Notter-2000).

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 (Figura 7A).

Por lo que cuanto menor es el diámetro de 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, las diferencias de presión entre los más pequeños y los más grandes ocasionaría el colapso de los pequeños durante la espiración (atelectasia pulmonar). En ausencia de material tensoactivo los alveolos estarían sometidos a grandes diferencia de presión lo que llevaría al colapso (Schürch-1978, Zuo-Possmayer-2007) (Figura 7B). La presencia de surfactante entre las moléculas de agua impide que sus uniones colapsen el alveolo debido a su capacidad para disminuir la tensión alveolar a valores muy cercanos a cero, haciendo que el cambio de volumen no incremente las presiones intra-alveolares, evitando así el colapso alveolar (Figura 7C)(Planells-2010).



Esta función es llevada a cabo principalmente por la DPFC, que debido a su estructura molecular es capaz de formar monocapas interfaciales estables y compactas cuando se someten a compresión. A pesar de que DPFC es la especie más eficaz del surfactante en lo que refiere a esta función, las membranas de este lípido no presentan una absorción interfacial muy eficiente. La DPFC presenta una cinética de adsorción muy lenta y su re-extensión luego del colapso es poco eficiente durante la expansión. Esto ha permitido demostrar que para un correcto funcionamiento el SP requiere la presencia del resto de los componentes fosfolípidos insaturados (Veldhuizen-1998) y proteínas hidrofóbicas, las cuales facilitan la adsorción y re-expansión de la monocapa evitando el colapso alveolar en los sucesivos ciclos respiratorios. Se piensa que existe un reservorio de material

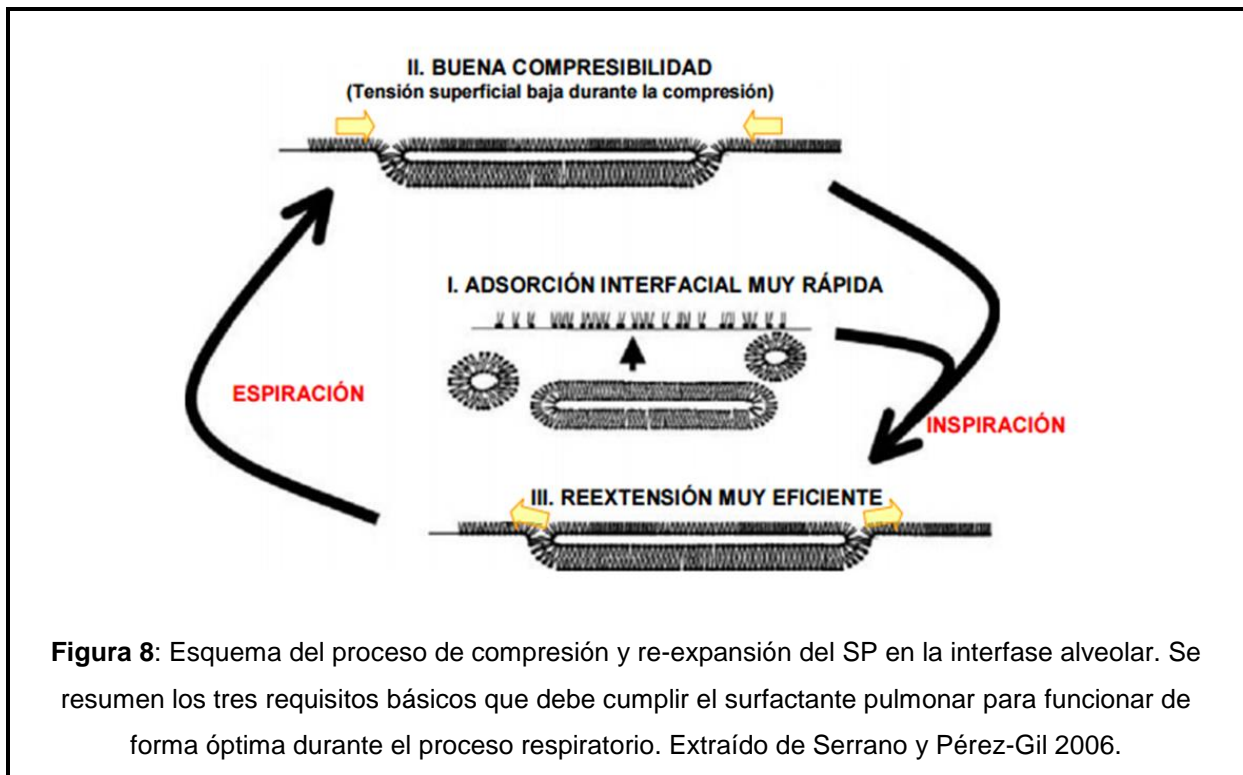
tensoactivo asociado a la monocapa interfacial, donde los fosfolípidos pueden ser re-incorporados rápidamente en cada ciclo de expansión (Schürch-1998, Possmayer-2001).

Para que el surfactante funcione de forma óptima en la interfase durante el proceso respiratorio debe cumplir con tres requisitos que se detallan en la figura 8:

- I) Rápida adsorción del material a la película interfacial desde la hipofase durante la inspiración.
- II) Reducción de la tensión superficial a valores cercanos a 0 mN/m durante la compresión de la superficie respiratoria a lo largo de la espiración.
- III) Rápida re-extensión del material tensoactivo en la hipofase acuosa durante la expansión alveolar en 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). Los procesos de compresión, exclusión del material no-tensoactivo y consecuente enriquecimiento en la interfase del material efectivamente tensoactivo; y la posterior re-extensión de la monocapa durante la expansión, son todos elementos fundamentales para el correcto funcionamiento del SP, asegurando en cada ciclo respiratorio la posibilidad de contener en cada etapa la mejor composición tensoactiva y evitando perder en cada ciclo material tensoactivo y formar una fase gas en la interfase aire/agua (se describirá en más detalle el proceso en la sección Adsorción). Se define a una fase gas cuando los elementos tensoactivos se encuentran tan separados unos de otros

que no permiten mostrar una respuesta tensoactiva (ver Figura 17) (Bagatolli-2014).



**Figura 8:** Esquema del proceso de compresión y re-expansión del SP en la interfase alveolar. Se resumen los tres requisitos básicos que debe cumplir el surfactante pulmonar para funcionar de forma óptima durante el proceso respiratorio. Extraído de Serrano y Pérez-Gil 2006.

### 1.2.2 Mantenimiento de la homeostasis del líquido alveolar y rol del SP:

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), manteniendo la presión hidrostática baja evitando de esa manera la aparición de edema pulmonar (Ganter-2006).

### **1.2.3 Defensa del organismo frente a la entrada de patógenos:**

El pulmón es un órgano vulnerable a las infecciones dado que expone una superficie muy grande al medio externo para permitir el intercambio gaseoso, lo cual supone la exposición a entidades potencialmente patógenas. 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).

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 lipoproteicos (Wright-1997).

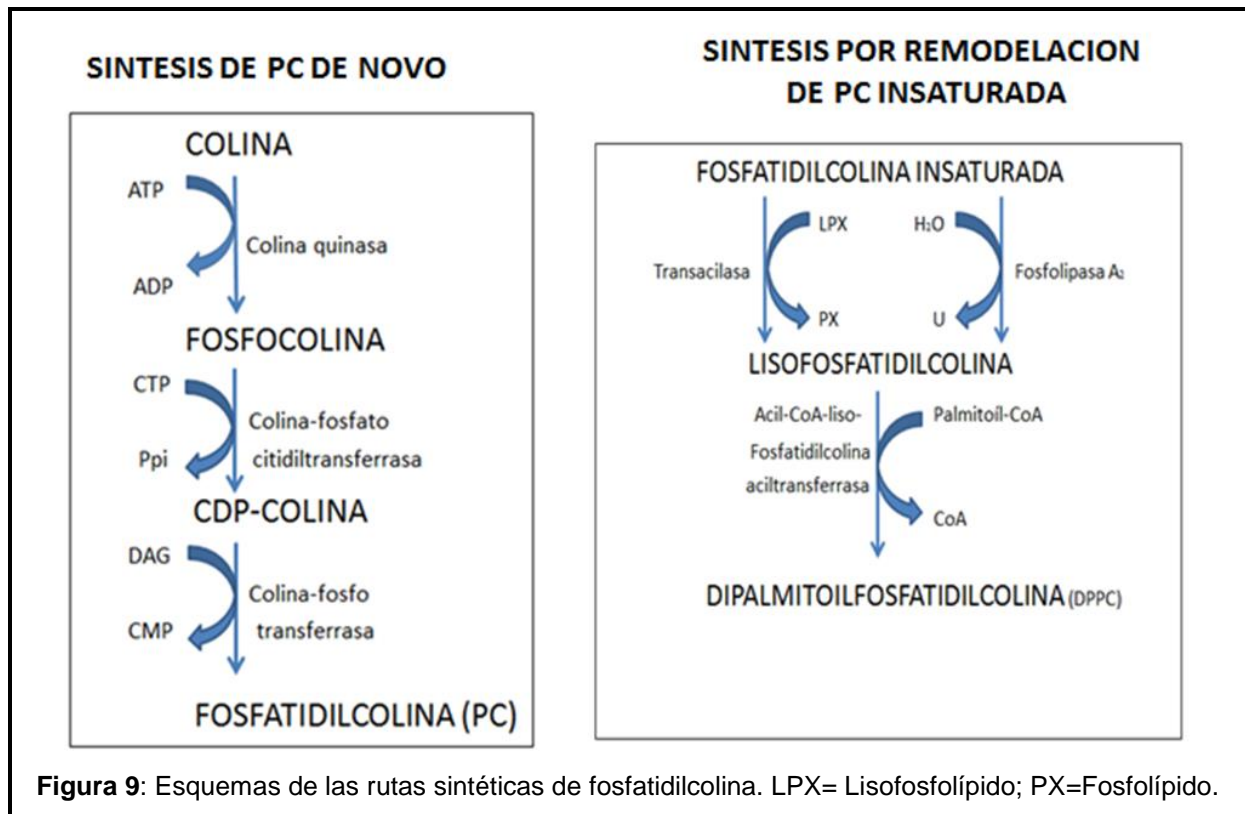
## **1.3 Metabolismo del surfactante pulmonar**

### **1.3.1 Síntesis y almacenamiento de surfactante pulmonar**

El surfactante pulmonar es sintetizado por los neumocitos tipo II, estos se encargan de sintetizar, procesar, empaquetar y secretar todos los componentes del surfactante a la hipofase (Zuo-2008). Los componentes lipídicos del surfactante pulmonar son sintetizados en el retículo endoplásmico de los neumocitos tipo II. La



síntesis se inicia por el fosfolípido más importante del surfactante, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPFC) que se puede llevar a cabo por dos vías: síntesis de novo o mediante remodelación de PC insaturada (Figura 9). La última vía es la principal, y es responsable del 55 % de la DPFC. Esta vía requiere la participación de una serie de enzimas como fosfolipasa A2, peroxirredoxina 6 (dependiente e independiente de calcio, respectivamente) y la lisofosfatidilcolina aciltransferasa (Perez-Gil-Weaver-2010). La síntesis de novo de fosfatidilcolina 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 síntesis de fosfatidilglicerol (FG) depende principalmente de la enzima fosfatidilglicerofosfato sintasa. FG así como FI se sintetizan a partir del precursor común CDP-diacilglicerol (Perez-Gil-Weaver-2010). 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).



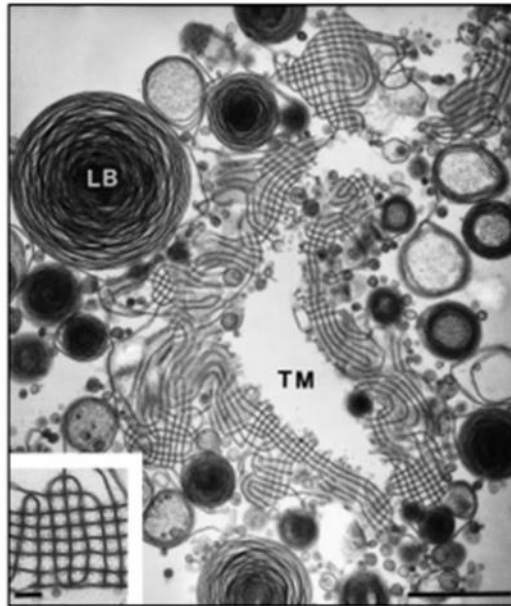
Las proteínas específicas del surfactante pulmonar (SP-A, SP-B, SP-C Y SP-D) se sintetizan en los neumocitos tipo II. A excepción de la proteína SP-C el resto se expresa también en células no ciliadas del epitelio bronquioalveolar, en células Clara (Batenburg-Haagsman-1998), así como también se han podido identificar en el tracto gastrointestinal (Fisher-Manson-1995). SP-A es la proteína más abundante del surfactante y consiste en un oligómero complejo de 18 monómeros ensamblados en forma de hexámero de trímeros. En humanos es codificada por dos genes del brazo largo del cromosoma 10 cuyas secuencias están muy conservadas. Al comienzo de su síntesis esta proteína contiene 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). SP-D al igual que SP-A pertenecen a la familia

de las colectinas y poseen la misma estructura supramolecular, el gen que codifica para SP-D se encuentra en el cromosoma 10 muy cercano a los genes que codifican para SP-A (Crouch-1993) y el proceso de síntesis es muy similar al de SP-A, dando lugar a la proteína madura hidrofílica de 43 KDa. El gen que codifica para SP-B se encuentra en el cromosoma 2, se produce inicialmente como una pre-proteína al igual que SP-C de mucho mayor tamaño que las proteínas maduras. En el extremo N-terminal se encuentra una secuencia señal que media la translocación de SP-B al lumen del RE, desde el RE la proSP-B es transportada al aparato de Golgi y su procesamiento proteolítico tiene lugar más tarde en los cuerpos multivesiculares para dar lugar a una proteína madura y funcional (Pérez Gil-Weaver-2010). El gen en el cromosoma 8 da lugar a una proSP-C de 197 aminoácidos y 21KDa para posteriormente generar una proteína madura pequeña que se dispone de manera transmembrana en el RE de tan solo 35 aminoácidos (Beers-Mulugeta-2005).

Una vez sintetizados todos los componentes del surfactante, estos son empaquetados en los cuerpos lamelares (LB), estructuras con origen lisoendosomal formadas por bicapas concéntricas altamente empaquetadas (Dietl-2001). Los LB poseen en su interior pH ácido y altas concentraciones de calcio (Wadsworth-Chander-2000) así como también enzimas proteolíticas que permiten los procesos de clivaje de SP-B y SP-C que dan lugar a las proteínas en su forma madura (Pérez Gil-2008, Weaver-1998). El transporte de los lípidos del surfactante a través de estos organelos está facilitado por la presencia de una proteína de membrana denominada proteína transportadora de unión a ATP A3 (ABCA3, del inglés ATP-binding cassette A3), pertenece a la familia de transportadores de membrana que

emplean la hidrólisis de ATP para bombear diferentes moléculas a través de membranas celulares (Hollenstein-2007, Linton-2007). ABCA3 transporta DPFC, 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 mielina tubular (MT) se genera por la acción de SP-A , SP-B y calcio, 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 10).

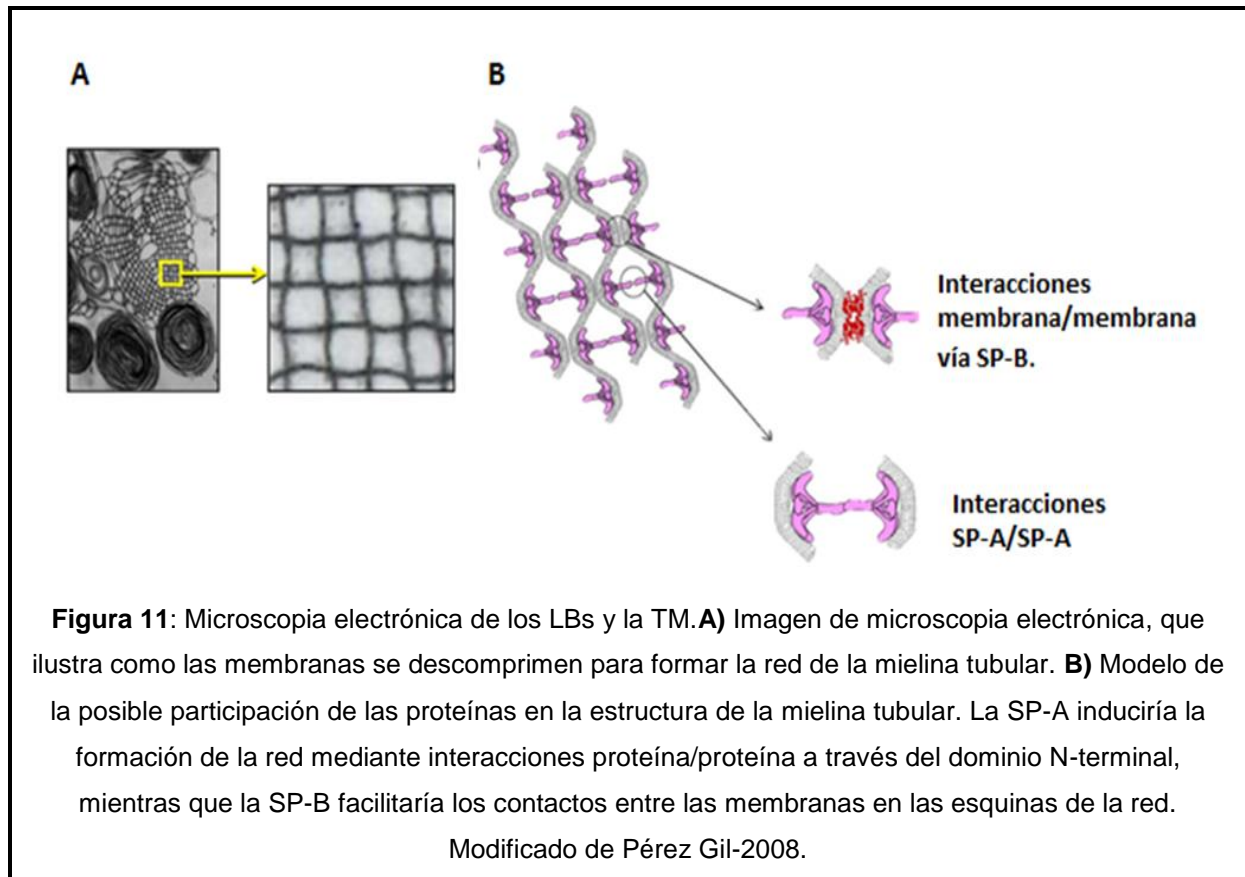


**Figura 10:** Imagen de microscopia electrónica de los Cuerpos lamelares (LB) y formación de mielina tubular (TM) en el espacio alveolar. En la esquina inferior izquierda se encuentra una imagen ampliada de la TM. Extraído de Goerke-1998.

### 1.3.2 Secreción de surfactante pulmonar

Los cuerpos lamelares son secretados por los neumocitos tipo II dando lugar a una serie de estructuras extracelulares de surfactante siendo la más importante la mielina tubular que constituye un 5-10% del surfactante total (Nag-1999). Se produce una conversión directa del material empaquetado a una organización tubular en forma de red, mediante el dominio CRD, SP-A interacciona con las cabezas aniónicas de los fosfolípidos que conforman las membranas empaquetadas en los LBs, para poder curvar la membrana y así formar la cuadrícula; aunque también se cree que este comportamiento esté favorecido por interacciones laterales SP-A/SP-A a través del extremo N-terminal de la misma (Pérez Gil-2008). SP-A es un componente esencial para que se produzca la transformación a TM, su ausencia conlleva a la desaparición de esta estructura. Mediante estudios con

anticuerpos se ha podido localizar a SP-A en la esquina de la red (Voorhout-1991). La proteína SP-B también es importante para la formación de esta estructura, mediante interacciones SP-B/membranas o SP-B/SP-B se cree que produce la fusión de las bicapas cuando se intersectan (Figura 11).



La secreción de los componentes del surfactante se produce por dos 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. 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 (organelos con múltiples vesículas unilamelares que están enriquecidos en lípidos saturados y en las proteínas hidrofóbicas del SP en su

estado inmaduro) y como se mencionó anteriormente el procesamiento de las mismas ocurre en los cuerpos lamelares por la acción de enzimas proteolíticas que permiten su clivaje. La SP-B además está implicada en la biogénesis de los cuerpos lamelares, acción asociada a sus propiedades fusogénicas (Brasch-2004). La ausencia de SP-B además de resultar en la carencia de cuerpos lamelares produce un procesamiento incompleto del precursor para SP-C (Clark-1995, Vorbroker-1995, Weaver-Conkright-2001). Se cree que la SP-C no estaría implicada en la biogénesis de los cuerpos lamelares (Glasser-2001).

La secreción de las proteínas hidrófilas no está asociada a cuerpos lamelares. SP-A está principalmente implicada en la defensa inmune innata (Casals-García-Verdugo-2005), eliminación de patógenos de las vías aéreas y en la modulación de la respuesta pro-inflamatoria (Arias-Díaz-2000, Wright-2005), además SP-A está implicada en la formación de mielina tubular (Poulain-1992) así como también es importante para la preservación de las propiedades del surfactante (Cockshutt-1990, Casals-2001) frente a agentes inhibidores de la función tensoactiva. SP-A se transporta vía aparato de Golgi, es glicosilada y secretada de forma constitutiva, siendo posteriormente recapturada en los cuerpos lamelares (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). Se ha descrito que un suspiro es suficiente para desencadenar la secreción de surfactante (Massaro-1983, Rooney-2001). La secreción de surfactante pulmonar se produce por exocitosis de los cuerpos lamelares mediado por calcio citosólico. La distensión mecánica sobre el

neumocito tipo II incrementa el nivel de calcio citosólico necesario para la fusión de los cuerpos lamelares con la membrana apical del neumocito (Ashino-2000, Frick-2004), pero no es la única manera de estimular la secreción. En el proceso intervienen receptores  $\beta$ -adrenérgicos, adenosina  $A_{2B}$ , y purinérgicos P2Y2, que estimulan la proteína-kinasa A (PKA), la proteína kinasa C (PKC) y la kinasa calcio-calmodulina dependiente (Rooney-2001, Dietl-Haller-2004, Garcia-Verdugo-2008) que sumado a la señal mecánica permiten incrementar la secreción de surfactante entre 12 a 15 veces sobre el basal (Fehrenbach-2001). El metabolismo del surfactante está sujeto a variaciones provocadas por la acción de muchas hormonas, pudiéndose destacar el efecto de los glucocorticoides, hormonas esteroideas, factores de crecimiento, citoquinas y otros mediadores que regulan la maduración de los neumocitos tipo II, la síntesis y secreción del surfactante (Andreeva-2007). Además factores de crecimiento tales como EGF, PDGF, IGF, TGF- $\beta$  o TNF- $\alpha$  se encargan de regular la diferenciación y actividad biológica de las células en las que se produce el surfactante. El interferón- $\gamma$  y otras citoquinas también pueden influir en la síntesis de surfactante (Boggaram-1991).

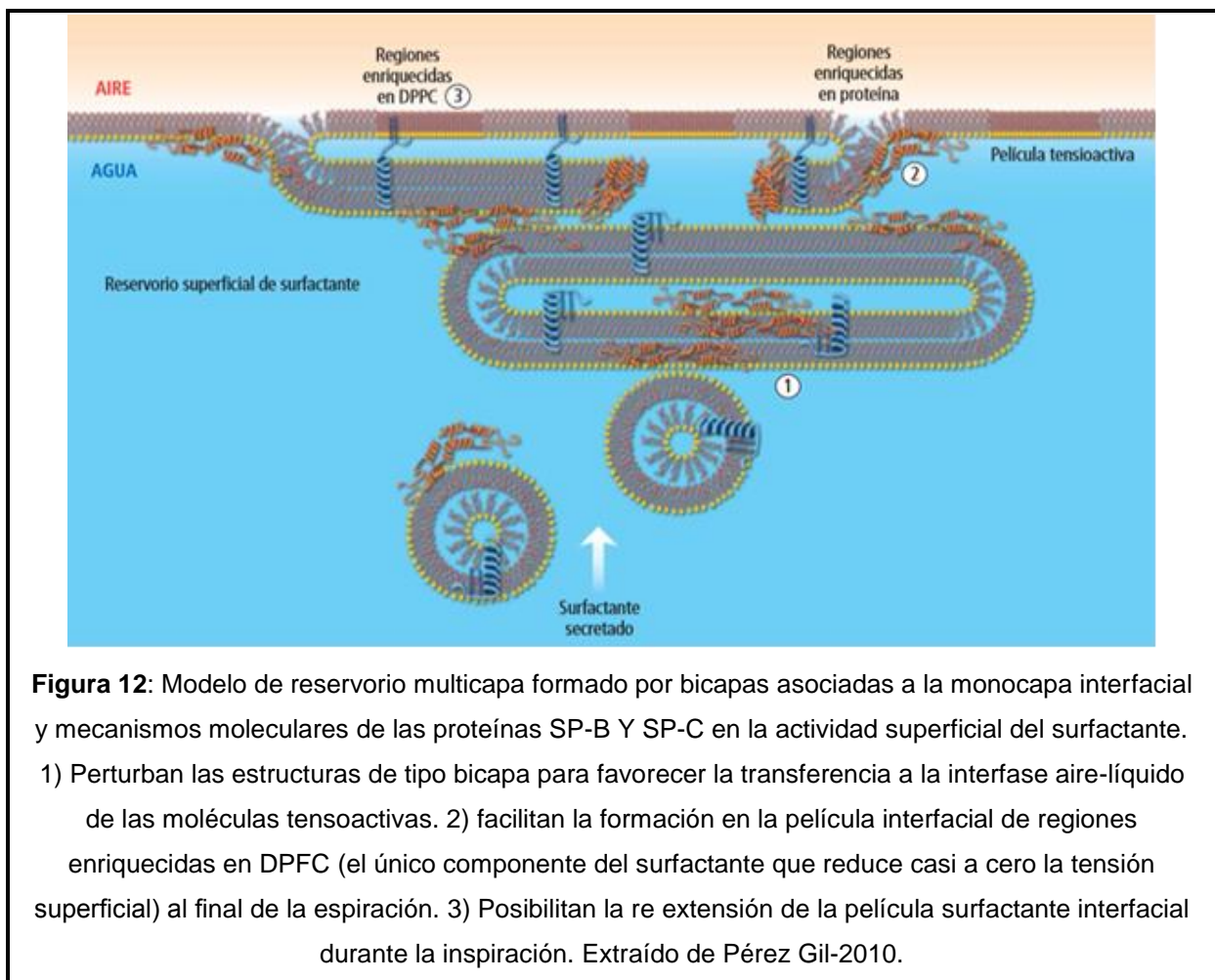
### **1.3.3 Adsorción**

Tal como se menciona anteriormente 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).



Tradicionalmente se consideraba que la película tensoactiva de surfactante se trataba exclusivamente de una monocapa (Clements-1958), pero más recientemente basados en la complementariedad entre herramientas como microscopia electrónica (Bachofen-2005), microscopia de fuerza atómica (Amrein-1997, Diemel-2002) o reflexión de neutrones (Follows-2007) se ha demostrado que el surfactante se encuentra asociado a la interfase de forma más compleja. Se cree que el SP se encuentra en la hipofase formando multicapas que se asocian a la monocapa de la interfase y funcionan como reservorio de surfactante facilitando la reinsertión de material tensoactivo a lo largo de los sucesivos ciclos de inspiración/espriación. Como mencionamos anteriormente este es clave para evitar la pérdida definitiva de material tensoactivo durante la respiración. Por lo cual actualmente se considera el surfactante pulmonar en el espacio alveolar como un arreglo supramolecular con una estructura tridimensional, que se dispone en la superficie respiratoria de forma dinámica permitiendo el correcto intercambio gaseoso, estabilización mecánica y protección de la superficie expuesta del pulmón frente a patógenos (Follows-2007, Pérez-Gil-2008). El material adsorbido en la interfase aire/agua forma una película enriquecida en DPFC y se ha propuesto que este enriquecimiento en DPFC puede deberse a una inserción selectiva de este lípido mediada por la acción de SP-A y SP-B o a una exclusión preferencial de los demás componentes del surfactante (Pérez Gil-Keough-1998, Possmayer-2001). Con cada espriación, al disminuir la superficie interfacial, se produce la salida de parte del material desde la interfase hacia el reservorio, por otro lado, con cada inspiración, al aumentar la superficie interfacial, el material eliminado se reinserta en la película tensoactiva desde el reservorio. Este proceso puede realizarse sin

pérdidas significativas de material surfactante si SP-B y SP-C están presentes (Pérez-Gil-Keough 1998, Possmayer-2001, Veldhuizen-Haagsman-2000). SP-C está vinculada a la mantención del material tensoactivo cerca de la monocapa, ya que sus palmitoilos permiten que exista un estrecho contacto entre las bicapas de la hipofase y la monocapa en el proceso de inclusión y exclusión de material. Mientras que SP-B facilitaría el flujo de moléculas de lípido hacia la interfase por la formación de estructuras no lamelares (Pérez Gil-2010, Veldhuizen-2000), ver esquema de Figura 12.



### **1.3.4 Degradación y reciclaje de surfactante pulmonar**

Los sucesivos ciclos respiratorios conllevan a una pérdida parcial del material adsorbido a la interfase durante la espiración, de modo que parte de este surfactante es reciclado mediante endocitosis por los neumocitos tipo II y almacenado en los cuerpos lamelares para ser reutilizado (Wright-Clements-1987). 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 (Weaver-2001). La purificación de productos de lavados broncoalveolares muestran la presencia de agregados grandes de SP de mayor densidad que contienen cuerpos lamelares, mielina tubular, vesículas grandes y proteínas del surfactante a partir de los cuales y mediante transformación extracelular probablemente se formen los agregados pequeños (Putman-1996). 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-A, SP-B y SP-C generan un aumento en la captación de lípidos del SP por los neumocitos tipo II (Weaver-Whitsett-1991). SP-D también cumple un rol en el reciclado de los cuerpos lamelares, pero no por parte de las células tipo II (Herbein-2000).

## **1.4 Patologías asociadas al surfactante pulmonar**

Algunos de los procesos degenerativos del sistema respiratorio están asociados a la deficiencia, falta o inactivación del surfactante pulmonar, las patologías más

importantes asociadas a la disfunción del surfactante son la lesión pulmonar aguda (LPA) (Hallman-2001, Zimmermann-2005) y el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (ARDS). Ambas patologías se relacionan con daño pulmonar, inflamación y colapso alveolar por aspiración, sepsis u otras etiologías (Seeger-1993). SDR afecta al 10% de los niños de países desarrollados y se produce con frecuencia en niños nacidos antes de las 36 semanas gestacionales a causa de la deficiencia de surfactante pulmonar (Meyer-Zimmerman-2002), constituyendo la primera causa de muerte de estos niños prematuros. Esta patología se caracteriza por una disminución de la cantidad de fosfolípidos totales, principalmente FG (Obladen-1983), disminución de las cantidades de SP-A, SP-B y SP-C y por consiguiente ausencia de mielina tubular (Weaver-Whitsett-1991). En estos pacientes se ha reporta un aumento de la tensión superficial mínima en el SP extraído. El ARDS es una forma severa de daño pulmonar agudo que describe una reacción inflamatoria generalizada en todo el pulmón causada por múltiples factores, se caracteriza por generar una alteración en el perfil de lípidos del surfactante, disminución de los fosfolípidos totales, disminución del contenido de DPFC, disminución de la cantidad de FG y aumento de los fosfolípidos minoritarios (FI, FS, FE, SM), identificándose 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). Se ha descrito una disminución de las proteínas SP-A, SP-B y SP-C, y de la fracción activa del surfactante (agregados grandes), y un aumento de los agregados pequeños. Se produce 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).

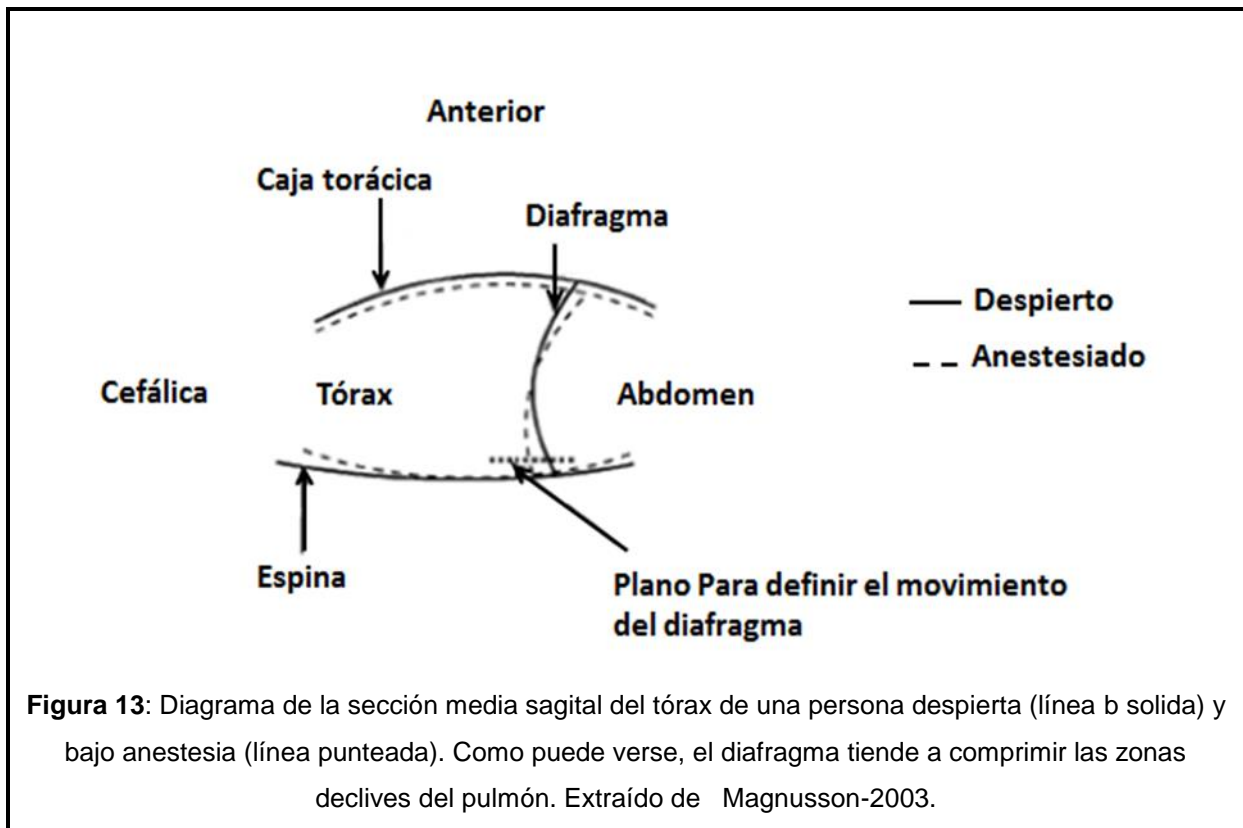
En 1959 Avery y Mead demostraron por primera vez la relación que existía entre deficiencias de surfactante y las enfermedades pulmonares (Avery-Mead-1959), desde entonces se ha tratado de desarrollar surfactantes exógenos (SPE) para el tratamiento de este tipo de patologías. Se ha visto que la utilización de SPE mejora la función pulmonar (Anzueto-1997), pero pese a que los resultados han sido más alentadores en el SDR, no lo han sido lo suficiente en el ARDS. El tratamiento de este último requiere la utilización de surfactantes de máxima actividad tensoactiva y resistentes a la inhibición, con mayor contenido de proteínas y lípidos, mayor concentración de fosfolípidos entre otras cosas como consecuencia del edema pulmonar que suele acompañar a esta patología (Taeusch-2005) que hace que su tratamiento sea de mayor complejidad.

### **1.5 Anestesia: efectos sobre membranas y el surfactante pulmonar**

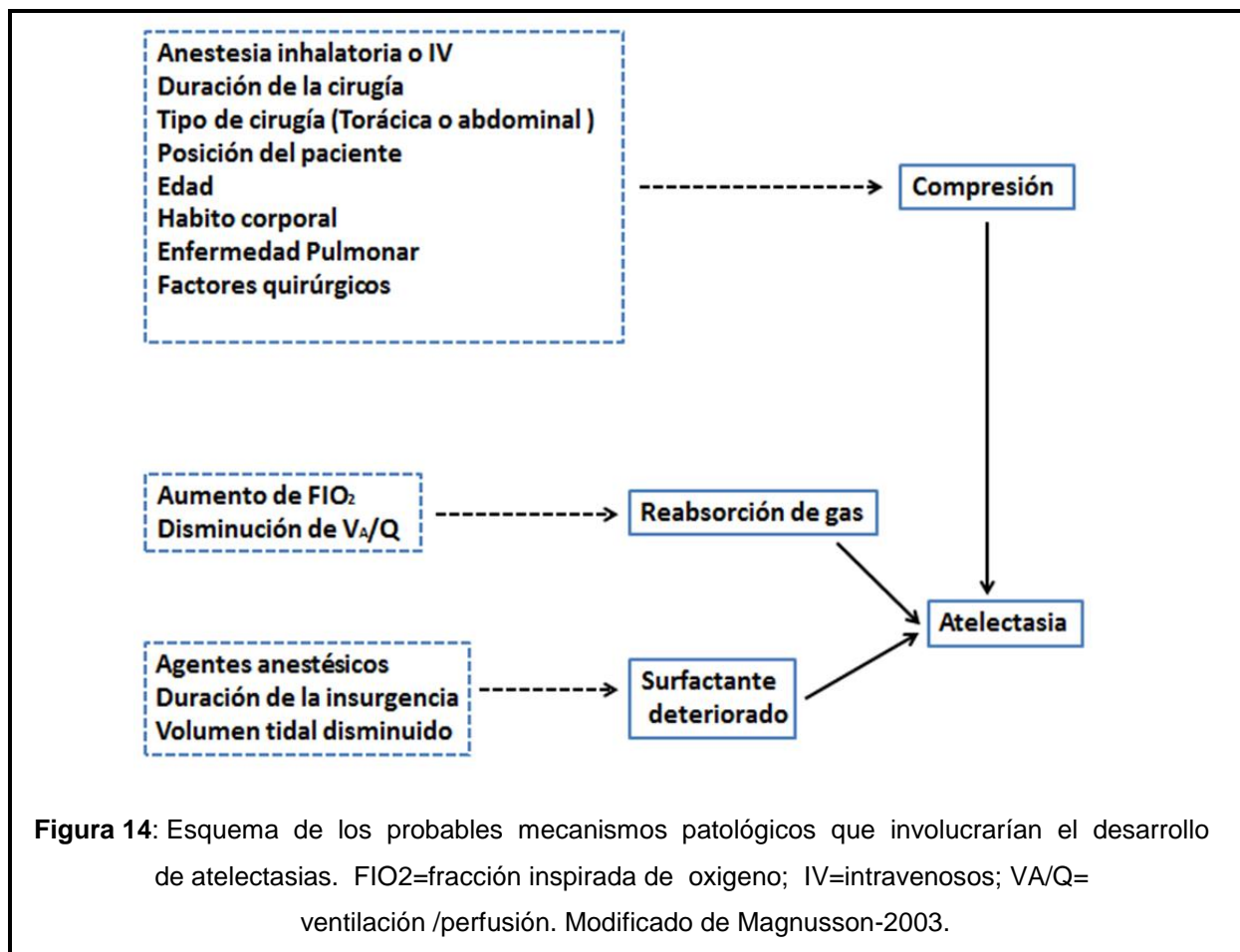
En el mundo occidental se realizan 20 millones de anestésias generales por año (Enckenhoff-2004). La anestesia general modifica la función pulmonar: altera la mecánica del sistema respiratorio y el intercambio gaseoso (Stoelting-1999). Esta alteración es transitoria y la función normal se recupera tiempo después de la anestesia y la cirugía. Pese a esto algunos pacientes pueden desarrollar complicaciones respiratorias en el acto quirúrgico o en el periodo postoperatorio vinculado a la misma (Stoelting-1999). En el postoperatorio inmediato, la mitad de los pacientes coordinados para tratamiento quirúrgico presentan una hipoxemia leve a moderada que está definida como una saturación de oxígeno arterial entre 85 a 90% que puede durar de algunos segundos hasta 30 minutos (Moller-1991). Lo más

preocupante es el hecho que alrededor de un 20% de esos pacientes, puede presentar una hipoxemia severa, saturación menor de 81% (Celli-1984, Pedersen-1992, Kroenke-1993).

Los mecanismos que determinan la disminución de los niveles sanguíneos de oxígeno se encuentran asociados a la aparición de atelectasias, lo cual explica la disminución en la transferencia de gases asociado a modificaciones de la compliance pulmonar y aumento de la resistencia vascular que termina por generar injuria pulmonar (Malacrida-2014). Se pueden identificar tres mecanismos que contribuyen al desarrollo de esta injuria pulmonar: compresión del tejido pulmonar, reabsorción de gases y deterioro de la función del surfactante (Malacrida-2014). Los pacientes sometidos a anestesia general requieren una relajación del diafragma, como consecuencia de ello aumenta la presión transmitida al tórax y por lo tanto se genera atelectasia en zonas adyacentes por compresión, como puede verse en la figura 13 (Magnusson-2003, Duggan-2005).



La atelectasia por reabsorción de gases se puede producir por dos mecanismos: El primer mecanismo se genera luego de la oclusión total de la vía aérea debido a la generación de un bolsillo donde queda atrapado gas que inicialmente se encuentra a una presión cercana a la atmosférica; el lavado de la sangre venosa genera una disminución de la presión parcial generando el vaciamiento del bolsillo llevando al colapso. El segundo mecanismo involucra una disminución en la relación ventilación/perfusión (relación VA/Q baja) y FIO<sub>2</sub> alta (fracción inspirada de Oxígeno) (Magnusson-2003, Duggan-2005).



El último tipo de atelectasia se genera por daño del surfactante pulmonar. La alteración de surfactante a causa de los anestésicos halogenados es una hipótesis propuesta para la generación de atelectasia en pacientes sometidos a anestesia general, los mecanismos plantean un deterioro de la barrera epitelial, lo cual puede producir una inhibición del surfactante por proteínas plasmáticas o cambios en la capacidad tensoactiva del mismo, así como un cambio en la secreción del surfactante tal como se observó *in vitro* lo que genera aumento en las presiones intra-alveolares y posterior colapso (Duggan-2005). En la figura 14 se pueden identificar los factores que generan atelectasia y a qué mecanismo se encuentran asociados.



### 1.5.1 Anestésicos

Los anestésicos inhalatorios que se utilizan en la práctica clínica son el halotano, enflurano, isoflurano y más recientemente, sevoflurano y desflurano (Figura 15). Los mecanismos por los cuales los anestésicos halogenados inducen una depresión selectiva en el sistema nervioso central aún no están del todo claros, se postula que los halogenados podrían generar inmovilidad a un estímulo nocivo y amnesia por dos mecanismos moleculares distintos. Los anestésicos producen inmovilidad por un efecto sobre la espina dorsal, mientras que la amnesia podemos decir que resulta de la acción sobre sitios supraespinales, que involucra entornos apolares representados por las bicapas lipídicas o estructuras hidrofóbicas en el interior de las proteínas. Los mecanismos que permiten una supresión del estímulo nocivo (analgesia), estaría asociado a la liberación de endorfinas que actuarían sobre receptores opioides (Stoelting-1999).

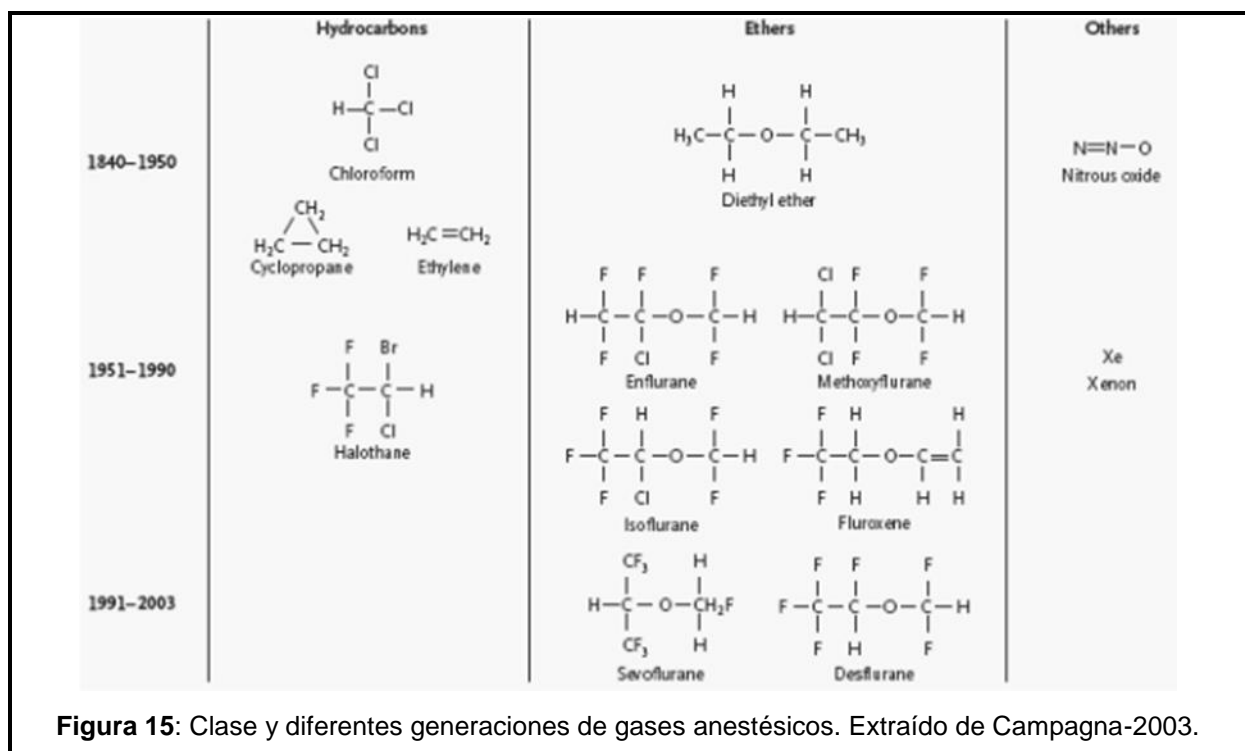


Figura 15: Clase y diferentes generaciones de gases anestésicos. Extraído de Campagna-2003.

La potencia de los anestésicos es medida por el reparto de los mismos en una

interfase aceite/gas como un coeficiente definido por Meyer y Overton a principios del siglo XX y plantea que los gases más lipo-solubles poseen una mayor potencia anestésica (Campagna-2003). Se ha demostrado que independientemente de la naturaleza química del anestésico lo verdaderamente importante es la concentración crítica de anestésico disuelto en la membrana (Heimburg-2007). Miller en 1973 propuso la teoría de la expansión, donde se proponía que el tamaño molecular de los anestésicos se correlacionaba con la potencia de la anestesia y a mayor tamaño mayor efecto, esto es en parte verdad pero se han demostrado excepciones a la regla.

El agregado de grandes cantidades de agentes lipofílicos (como los anestésicos halogenados) a membranas produce cambios físicos que pueden generar alteraciones en la función de las proteínas que se encuentran embebidas en ella, sin embargo esto han sido muy discutidos debido a que las cantidades de anestésico que se necesitan sobrepasan los límites del uso clínico (Eckenhoff-2001). Estudios biofísicos demostraron que concentraciones de uso clínico producen una disminución de la temperatura de transición de fase de las membranas de 2-4°C (Trudell-1977). Este efecto se ha discutido en el contexto del efecto de la temperatura durante la fiebre. Si bien cuando sufrimos un proceso febril no estamos propensos a dormirnos como en una anestesia se han llevado a cabo trabajos en donde se discute el efecto de la temperatura y de la adición de los anestésicos (Ueda-Yoshida-1999). La temperatura despliega proteínas y fluidifica membranas mediante un mecanismo que está relacionado con el movimiento molecular, mientras que los anestésicos producen el mismo efecto pero como resultado de su unión a las macromoléculas su interfase. La transición inducida por

el calor es altamente cooperativa y de primer orden, mientras que la transición isoterma inducida por la anestesia es gradual e incluye estados intermedios (Yokono-1981, Tsai-1990, Chiou-Ueda-1994).

Por otro lado trabajos previos han podido demostrar que los anestésicos pueden modificar el estado de hidratación y coordinación del agua unida o no a la primera capa de hidratación de la membrana (Yoshida-1984). Así como también se ha planteado recientemente que la distribución de anestésicos en bicapas lipídicas pueden ocasionar cambios en la composición de las proteínas que integran la membrana, las cuales podrían “censar el status de presión” en la bicapa, este mecanismo llamado “Perfil de Presión Lateral” permite explicar cómo afectaría a canales iónicos y otro tipo de proteínas de membrana (sistema fosfolípido-proteína) (Cantor-1997). Se basa en la distribución específica de los anestésicos en una bicapa fosfolipídica donde se observó que mayoritariamente se concentran en la región anfifílica (Eckenhoff-2001).

Se ha observado una alteración dependiente de los anestésicos halogenados en los canales iónicos de la familia “cysteine-loop” receptores de neurotransmisores como pueden ser el receptor de acetilcolina, serotonina tipo 3, GABA<sub>A</sub>, receptores de glicina y por otro lado los receptores de glutamato que se activan por NMDA y AMPA. Los canales iónicos voltaje dependientes como los de sodio, potasio y calcio también son sensibles a altas concentraciones de anestésico. La hipótesis plantea que exista un aumento de la actividad inhibitoria de los canales postsinápticos (GABA<sub>A</sub> y receptores de glicina) e inhiban la actividad excitatoria de los canales sinápticos (nicotinamida acetilcolina, serotonina y glutamato) (Campagna-2003).

### **1.5.2 Efecto de los anestésicos en modelos in vivo e in vitro sobre el pulmón y el surfactante pulmonar**

Los anestésicos modifican la función pulmonar, habiéndose demostrado que el halotano promueve un aumento de la elastancia estática y del componente viscoelástico del pulmón y una disminución del componente viscoso, mientras que el isoflorano aumenta la presión viscoelástica, cuando se los compara con un grupo control anestesiado con pentobarbital sódico (Cowley-1997). Pulmones tratados con halotano mostraron existencia de microatelectasias, lo que permite explicar el aumento de la presión viscoelástica. Esta presión se relaciona con la porción distal del pulmón donde el componente del surfactante pulmonar tiene un rol fundamental, lo que permitiría relacionar un cambio en el contenido y/o calidad de FL del surfactante pulmonar con la aparición de colapso alveolar que lo observamos como un aumento de la presión viscoelástica (Reta-1998, -2000). Se ha demostrado que el sevoflurano también aumenta la presión viscoelástica y elastancia estática del pulmón, lo que se asocia con la aparición de colapso y modificación del perfil fosfolipídico del surfactante colectado tras la anestesia por 30 min (Malacrida-2014). La diferencia de acción de los distintos agentes anestésicos sobre la presión viscosa y la elasticidad pulmonar probablemente se vincule a la mayor potencia del halotano sobre el isofluorano y sevofluorano.

En cuanto a los estudios in vitro se ha encontrado una disminución de la biosíntesis de surfactante y de fosfatos de alta energía en cultivos primarios de neumocitos tipo-II expuestos a los halogenados (Molliex-1994). Esta disminución en la biosíntesis podría también aumentar la tensión superficial en el alveolo, produciendo colapso alveolar y formación de atelectasias. La consecuencia mecánica sería el aumento del componente viscoelástico y de la elastancia estática del pulmón. La pérdida de

surfactante, con el aumento de la tensión superficial sobre las paredes del alveolo en la interfase aire-liquido, favorece la acumulación de fluidos y proteínas en el pulmón. Basándose en esta observación, se postula que el efecto de la presión positiva al final de la espiración (PEEP) reduce el edema pulmonar (Verbrugge-1998).

Enhorning y colaboradores, reportan el efecto de halotano, cloroformo, enflurano, acetona y dietil éter sobre la respuesta tensoactiva del surfactante pulmonar, identificando inhibición de la capacidad tensoactiva para el halotano durante la compresión dinámica pero a concentraciones superiores a las de uso médico (Enhorning-1986). Nuestro grupo más recientemente ha demostrado de manera directa la incorporación del sevoflurano a las membranas de surfactante pulmonar y los efectos sobre la función y estructura (Malacriada-2014). Particularmente, se ha podido demostrar que tras la incorporación en bicapas de SP el sevoflurano modifica la hidratación de las membranas y afecta a micro-viscosidad de las mismas. Esto asociado a la reorganización en la organización supramolecular de la coexistencia de fases Lo/Ld, nos ha permitido explicar en parte los mecanismos de la inhibición del SP por el sevoflurano en la respuesta tensoactiva dinámica en un surfactometro de burbuja cautiva (Malacriada-2014). Los mecanismos están asociados a una reorganización de las fuerzas de cohesión y repulsión entre los fosfolípidos por la incorporación del anestésico a la interfase de las membranas y que se evidencia por un cambio en la presión lateral de la membrana.

## **1.6 Técnicas para el estudio de la función tensoactiva del surfactante pulmonar**

Para evaluar la actividad tensoactiva del surfactante pulmonar se utilizan varios métodos físicos con variantes de equipos que se han diseñado con el fin de medir la tensión superficial de forma dinámica con la variación del área. Estos métodos permiten determinar parámetros importantes que definen la actividad interfacial de complejos lipídicos y lipoproteicos (Zuo-2008). Clements en 1957 fue el primero en medir la variación de la tensión superficial del surfactante pulmonar por el método de balanza de Langmuir. Observo que en las películas interfaciales de surfactante pulmonar se producía una disminución de la tensión superficial al comprimirse (reducir el área). Los dispositivos utilizados actualmente con este fin son por ejemplo: Surfactometro de burbuja pulsátil (PBS), Surfactometro de burbuja cautiva (CBS), Gota sésil restringida (CSD) y Balanza de superficie de Langmuir-Blodgett (LB) (Zuo-2008). Nos enfocaremos particularmente en describir las ventajas y limitaciones de Balanza de Langmuir-Blodgett, dado que será el instrumento que emplearemos en la presente tesis.

### **1.6.1 Balanza de superficie de Langmuir-Blodgett:**

La balanza de Langmuir-Blodgett fue propuesta originariamente en 1917 por Irving Langmuir y posteriormente modificada por la asistente y colaboradora de Langmuir, Katherine Blodgett. Esta tecnología se basa en las propiedades particulares de moléculas orgánicas como lípidos, fosfolípidos o glicolípidos para orientarse en una

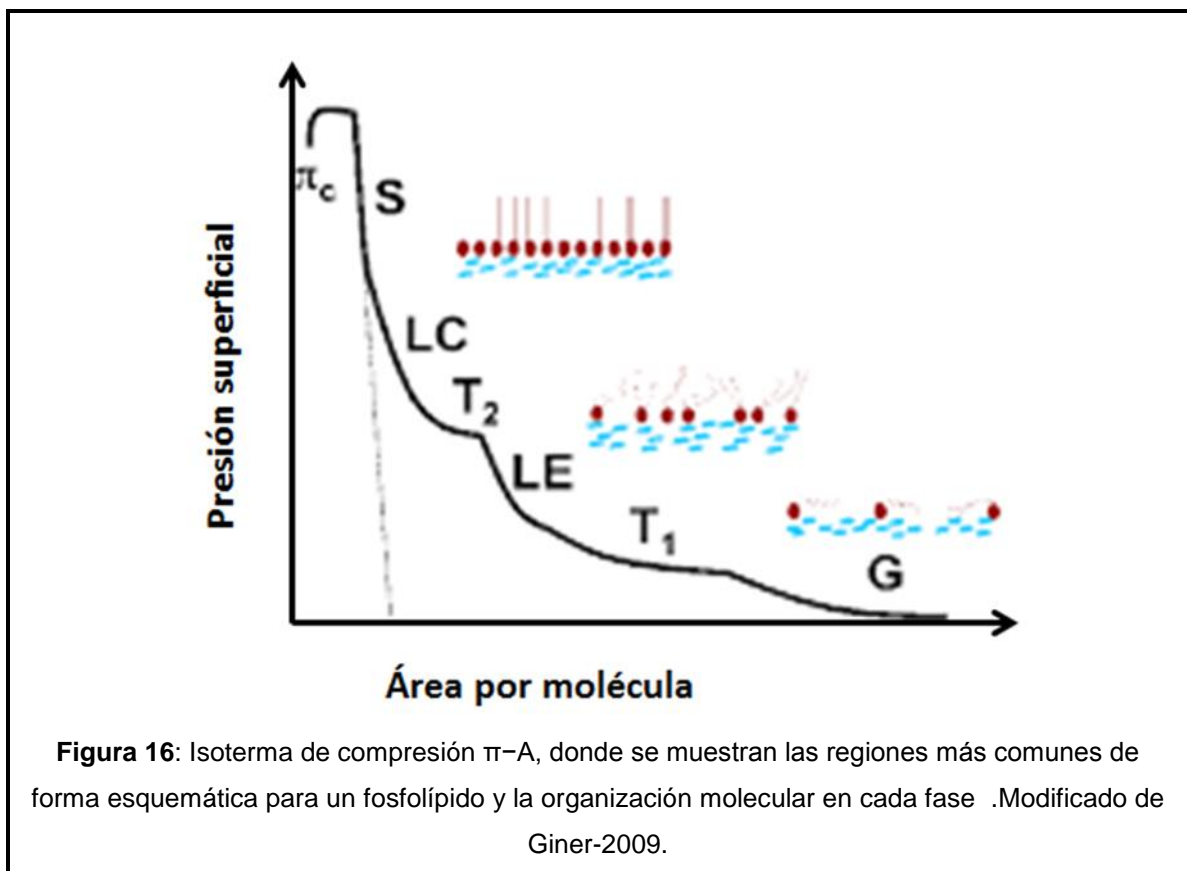
interfase aire/agua entre la fase gaseosa y líquida para minimizar su energía libre y formar una monocapa insoluble llamada monocapa de Langmuir (Agnes-2007). Los materiales que forman monocapas de Langmuir son anfifílicos insolubles que contienen un grupo de cabeza hidrofílica que es soluble en agua, y una cola hidrofóbica que es soluble en disolventes no polares. Cuando se aplica una solución diluida de material anfifílico en un disolvente volátil como cloroformo a una superficie de agua pura rápidamente se reparte en la interfaz para cubrir toda el área disponible, luego de la evaporación del disolvente se forma la película interfacial disolviendo sus grupos polares en la subfase acuosa, mientras que sus cadenas hidrofóbicas quedan expuestas al aire (Ulman-1991). La balanza de Langmuir-Blodgett posee un sistema compuesto por barreras móviles que permite la compresión y la expansión de la monocapa a través de reducir o incrementar el área molecular disponible para la monocapa. Mediante un sensor de tensión se mide la fuerza de tensión con una dina de platino adaptado al extremo del sensor y que se sumerge parcialmente. Los cambios de tensión se hacen evidentes por los cambios de fuerza asociados a las variaciones en el área molecular que se modifica a través de las barreras. El resultado de la adición del material tensoactivo a la interfase es la formación espontánea de una monocapa sobre una superficie líquida, la cual afecta la tensión superficial medida por nuestro tensiómetro, la explicación termodinámica es la reducción de la energía libre del sistema debido a la generación de interacciones entre el grupo polar hidrofílico y las moléculas de la superficie del agua, reduciendo así la tensión superficial (Agnes-2007). Si el área de superficie disponible es lo suficientemente grande y la composición de agente tensoactivo es baja como para limitar las interacciones entre moléculas adyacentes, entonces la

monocapa tendrá un efecto mínimo en la tensión de la superficie del líquido. Si el área de superficie disponible para la monocapa se reduce mediante la compresión de las barreras, la distancia intramolecular disminuye y la tensión superficial también. Las moléculas de agente tensoactivo comienzan a interactuar y a ejercer un efecto repulsivo el uno por el otro, esta fuerza ejercida por la película por unidad de longitud se llama presión superficial (Agnes-2007) y está definida por la ecuación:  $\pi = \gamma_0 \text{ agua} - \gamma \text{ surfactante}$ .

La máxima presión de la superficie de una monocapa sobre la superficie del agua a una temperatura de 25°C es de 72,8 mN/m. La formación de una monocapa en una interfase aire/agua se controla mediante la realización de una isoterma, una gráfica a partir de la variación en la presión superficial ( $\pi$ ) en función del área ocupada por molécula (Möhwald-1995, Kaganer-1999). El área ocupada por cada molécula se calcula dividiendo el área de la película (determinado por la posición de la barrera durante la compresión) por el número total de moléculas que se colocan en la superficie del agua. En la isoterma se pueden identificar diferentes fases que corresponden a las distintas conformaciones que adoptan las moléculas en la monocapa como resultado de la compresión, las cuales corresponden a diversas organizaciones moleculares en la que las moléculas poseen distintos grados de libertad. A bajas densidades moleculares se encuentra primero una fase gaseosa (G), en la que se observa una gran área por molécula y no existiendo interacción entre las moléculas tensoactivas. Al aumentar la densidad molecular por disminución del área molecular con las barreras, el sistema sufre una transición a la fase líquido expandida ( $L_E$ ), donde las moléculas interaccionan unas entre otras, pero no poseen restricciones rotacionales o difusionales. Posteriormente a la

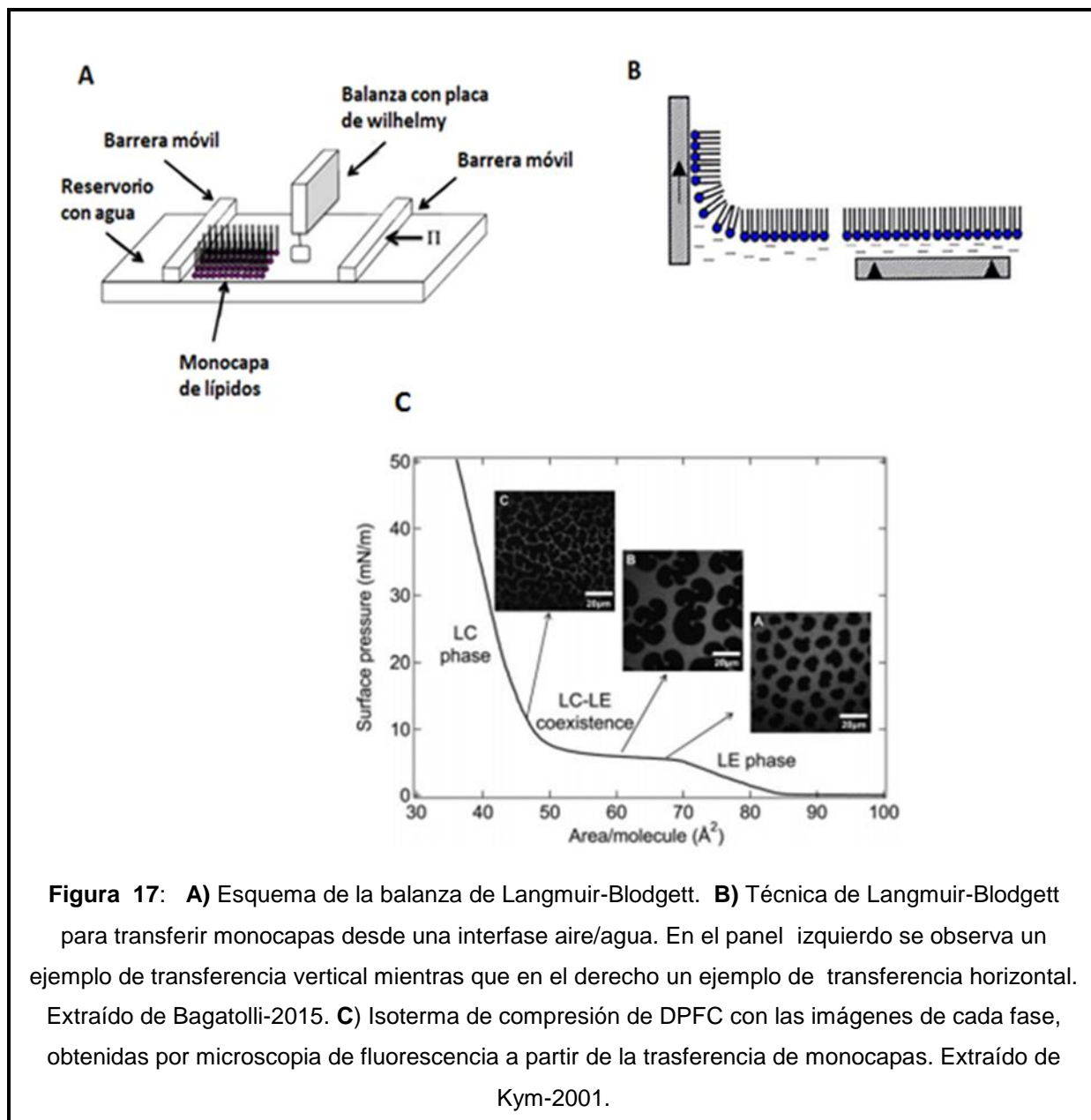


transición  $G/L_E$  el sistema sufre una nueva transición a la fase líquido condensada ( $L_C$ ), la cual posee restricciones rotacionales y difusionales. A muy altas tensiones algunos lípidos pueden experimentar un estado de ordenamiento más importante aún que la fase  $L_C$  la cual se conoce como altamente condensada ( $T_C$ , tight condensed), la cual ocurre por ejemplo en la DPFC por encima de 55 mN/M y este estado es sólido (Möhwald-1995) (Figura 16).



Por otro lado la Balanza Langmuir-Blodgett permite que la monocapa sea transferida mediante fijación a la superficie de un soporte sólido (Figura 17B). Esta técnica fue desarrollada por Katherine Blodgett y consiste en colocar un soporte sólido perpendicular a la interfase aire/agua cubierta por la monocapa que se va a transferir mediante inmersión y/o emersión a una velocidad constante. Las moléculas se van depositando sobre el sustrato sólido, como se

muestra en la Figura 17B. Dependiendo de la naturaleza del soporte sólido, es decir su carácter hidrofóbico o hidrofílico, la interacción se establecerá a través de la cola o de la cabeza de los lípidos respectivamente (Bagatolli-2014). Esta característica del soporte define además la dirección del movimiento vertical que se debe utilizar, si la superficie es hidrofílica el soporte debe moverse desde la subfase acuosa hacia el aire. Durante la transferencia se hace avanzar la barrera móvil para compensar la pérdida de moléculas y un mecanismo de retroalimentación entre el sensor de tensión y el motor de las barreras mantiene constante la presión superficial (Goner-2009). Esta técnica en combinación con microscopia de fluorescencia permite estudiar los cambios en la organización supramolecular del material tensoactivo durante el proceso de compresión y en las distintas fases en las que se encuentra la monocapa (Figura 18 C).



**Figura 17:** **A)** Esquema de la balanza de Langmuir-Blodgett. **B)** Técnica de Langmuir-Blodgett para transferir monocapas desde una interfase aire/agua. En el panel izquierdo se observa un ejemplo de transferencia vertical mientras que en el derecho un ejemplo de transferencia horizontal. Extraído de Bagatolli-2015. **C)** Isotherma de compresión de DPFC con las imágenes de cada fase, obtenidas por microscopía de fluorescencia a partir de la transferencia de monocapas. Extraído de Kym-2001.

# Objetivos

## 2.1 Objetivo general

Optimizar la transferencia y análisis de la distribución de los dominios de membrana en monocapas generadas en una Balanza de Langmuir-Blodgett. Estudiar los efectos del sevoflurano sobre la capacidad tensoactiva y la organización estructural de membranas modelo y del surfactante pulmonar.

## 2.2 Objetivos específicos:

1. Puesta a punto de la balanza de Langmuir con monocapas estandares.
2. Puesta a punto de la transferencia de monocapas de DPFC utilizando distintos métodos de transferencia.
3. Análisis de los resultados de las transferencias por diferentes métodos por comparación en las distribuciones en la circularidad de los dominios ( $P^2/A$ ).
4. Estudiar mediante las isothermas de compresión y ciclos dinámicos la respuesta tensoactiva de monocapas de DPFC y surfactante pulmonar con y sin anestésico.
5. Análisis de los efectos estructurales del anestésico sobre las monocapas de SP transferidas por microscopia de epifluorescencia.

## Materiales y Métodos

### 3.1 Obtención del surfactante pulmonar

Se realizaron lavados broncoalveolares de los pulmones de cerdo obtenidos de la industria cárnica, introduciendo por la tráquea aproximadamente 1Litro/Kg de pulmón de una solución de NaCl 150 mM, luego de lo cual se colecta el líquido en un recipiente con una gasa para filtrar contaminantes y partículas de gran tamaño. El lavado se realizó 2 veces para cada pulmón. Luego se realizan tres centrifugaciones: i) 500 g x 5 min a 4°C (elimina restos celulares), ii) 105.000g x 60 min a 4°C (pellet de fracción de grandes agregados del SP) y iii) centrifugación del pellet de la centrifugación anterior a 120.000g x 120 min a 4°C en un gradiente discontinuo de NaBr en NaCl 150 mM (0-13-16 %), el anillo en la interfase de 13/16% corresponde a mezclas de vesículas multilamelares (MLVs), cuerpos lamelares, mielina tubular y otros componentes del surfactante pulmonar con gran capacidad tensoactiva (Jimenez-Cabré-2009). Luego de obtenido el SP se procedió a diluir en buffer Tris 5 mM, pH 7,4 con 150 mM NaCl a la concentración deseada. Esta mezcla se considera como Surfactante Pulmonar Nativo (SPN). De cada 1.5L de lavado broncoalveolar se obtienen aproximadamente 7-10mL de una suspensión blanquecina y densa que es el surfactante pulmonar con una concentración fosfolipídica aproximada de 20mg/mL, este material se almacena a -80°C (Malacrida-2014). A una porción de las muestras se le realiza una extracción orgánica según el método (Bligh & Dyer-1969), de manera de obtener los componentes apolares (lípidos y proteínas hidrofóbicas, denominado EO-SP).

### **3.2 Determinación de la concentración de fosfolípidos**

La determinación del contenido de fosfolípidos de las muestras se realizó mediante la determinación de fósforo por el método de Rouser ( Rouser et al., 1966). Este método valora el contenido de fósforo presente en los fosfolípidos previa conversión en fosfato inorgánico.

Para la cuantificación se preparó una curva patrón con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Los tubos de vidrio de la curva así como las muestras problema se secaron en un baño de arena a una temperatura aproximada de  $260^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Posteriormente se realizó la mineralización del fosforo incubando las muestras con  $450\ \mu\text{l}$  de ácido perclórico a  $260^\circ\text{C}$  durante 60-90 minutos, los tubos se taparon con bolitas de vidrio para evitar la evaporación, pero permitir la eliminación de humos.

Una vez mineralizado el fósforo se cuantificó mediante una reacción colorimétrica añadiendo  $0.5\ \text{ml}$  de molibdato de amonio  $2.5\%$  (p/v) y  $0.5\ \text{ml}$  de ácido ascórbico  $10\%$  (p/v) y se diluyo con  $3.5\ \text{ml}$  de agua miliQ. Esta mezcla se incubo por 7 minutos a  $100^\circ\text{C}$  en un baño de agua para desarrollar color. Tras parar la reacción con hielo, se cuantifico la determinación a través de la medida de la absorbancia a  $820\ \text{nm}$ .

### **3.3 Preparación de mezclas lipídicas**

Las suspensiones lipídicas han sido preparadas a partir de lípidos de origen comercial dipalmitoilfosfatidilcolina (DPFC) adquiridos en Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA), así como a partir de extractos orgánicos de origen animal (surfactante pulmonar).

Las suspensiones de DPFC y extracto orgánico de surfactante pulmonar porcino se utilizaron a una concentración de 1mg/ml y 1,35 mg/ml respectivamente. La concentración de estas soluciones fue ajustada para optimizar los volúmenes a incluir en la interfase aire/agua en la balanza de Langmuir y al mismo tiempo disminuir los tiempos de evaporación del disolvente. Las concentraciones mayores que 2 mg/ml dificultan la aplicación con precisión del volumen adecuado y aumentan los errores experimentales en la realización de las isotermas.

Las muestras se prepararon en cloroformo:metanol (3:1), esta mezcla resulto un disolvente óptimo para las mezclas utilizadas y redujo los inconvenientes de evaporación y adición de la muestra. Para los experimentos de transferencia con la técnica de Blodgett, a las mezclas lipídicas se les adicionó la sonda fluorescente DiI<sub>C<sub>18</sub></sub> 1,1'-dioctadecil-3,3,3', 3'-tetrametilindocarbocianina perclorato (Molecular probes, Inc) en una proporción 0.01% molar. Esta sonda tiene afinidad fisicoquímica por la fase  $L_e$  en la DPFC y  $L_o$  en el extracto orgánico del surfactante pulmonar (de La Serna-2004).

### **3.4 Ensayos tensoactivos**

Para los ensayos tensoactivos se utilizó una balanza de Langmuir-Blodgett MicroTrough-XL (Kibron Inc.), este instrumento permite ver la respuesta tensoactiva de las soluciones en función del cambio en el área molecular de los fosfolípidos y los efectos del sevoflurano sobre la capacidad tensoactiva del surfactante pulmonar. Utilizando la compresión dinámica permite estudiar la respuesta tensoactiva a la compresión utilizando un sensor de tensión que permite calcular cambios de presión

como  $\pi = \gamma_{\text{agua}} - \gamma_{\text{surfactante}}$ .

### 3.4.1 Tipo de cubeta

La balanza permite la utilización de diferentes tipos de cubetas que en su mayoría están fabricadas de politetrafluoroetileno (PTFE). Este material hidrofóbico e inerte permite que la cubeta pueda ser limpiada fácilmente mediante la utilización de disolvente orgánicos o ácidos inorgánicos. Para los experimentos de transferencia se utilizó una cubeta que contiene un orificio en el centro que permite introducir un soporte sólido para la extracción de la monocapa (Ver Figura 18).



### 3.4.2 Limpieza de la cubeta

Para la limpieza de la cubeta así como para la de las barreras se utilizó alcohol etílico 95%. El procedimiento requirió que se cubriera la superficie de la cubeta y de



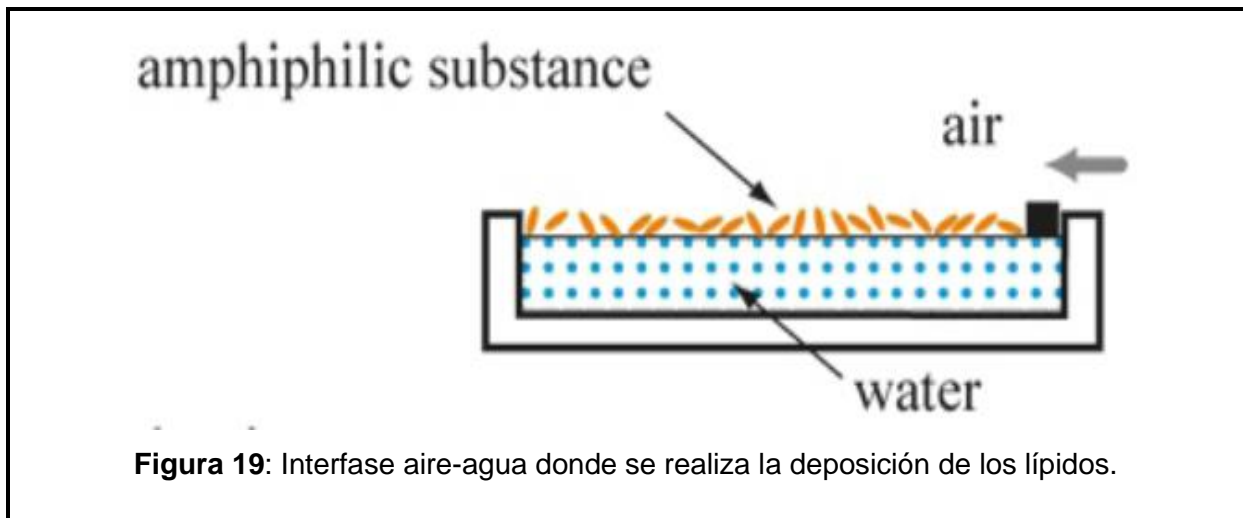
las barreras con un volumen de alcohol etílico, y posteriormente se lavó al menos dos veces con agua destilada.

### **3.4.3 Experimento de deposición de monocapas sobre soporte**

Inicialmente se llena la cubeta con agua destilada y previamente filtrada con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ . La sonda de platino (dina) se limpia previo a cada medida a partir de calentarlo a rojo con un mechero de buteno y posteriormente se procede a la calibración del instrumento utilizando como referencias la tensión 0 mN/m de la sonda en el aire y 72.8 mN/m sumergida en a hipofase. Posteriormente, se realiza un procedimiento de rutina que consiste en comprimir la interfase del agua sin el agregado de otro elemento tensoactivo. Esto es útil para identificar la pureza de la interfase y en caso de encontrarse completamente limpia no debería de presentar respuesta al cambio del área molecular, si existe un cambio, entonces se procede a aspirar la interfase hasta que se reduce la tensión a cero nuevamente. Este procedimiento debe llevarse a cabo tantas veces como fuera necesario, para asegurar que al incluirse los lípidos no existe ningún otro elemento que presente una respuesta tensoactiva (Cruz- Pérez-Gil 2007).

Las soluciones cloroformicas fueron depositadas en la interfase aire/agua, (10  $\mu\text{l}$  de solución en el caso de DPFC y 3,5  $\mu\text{l}$  para surfactante pulmonar) gota a gota utilizando una pipeta Hamilton, luego se esperó entre 15-20 min para permitir la evaporación del disolvente. Siempre se corrobora que no existiera tensión inicial antes de iniciar los experimentos de compresión, lo cual denota una alta concentración inicial de lípidos. En caso de que existiese se aspira la interfase y se

comienza nuevamente con una concentración de lípidos menor.



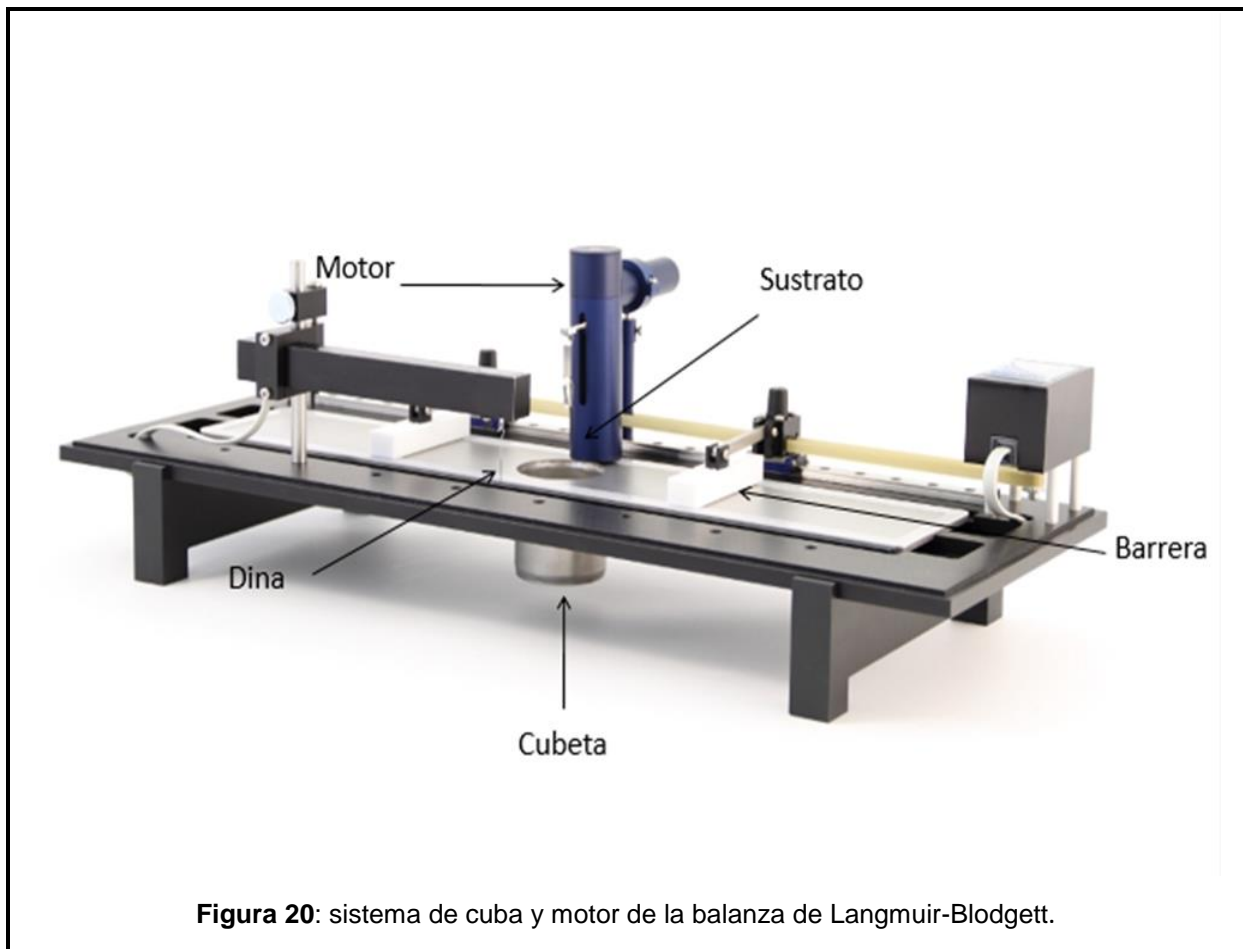
#### 3.4.4 Isotermas de compresión

Posteriormente se procedió a realizar las isotermas de compresión. Las barreras de la balanza de Langmuir-Blodgett están controladas un sistema electrónico que permite seleccionar la posición de inicio y fin, así como la velocidad de la barrera. Se realizaron isotermas de compresión para el modelo de membrana DPFC a una velocidad de barrera de 50 mm/min 90 mm/min y 140mm/min y para el surfactante pulmonar porcino, a una velocidad de barrera de 140 mm/min. Esto fue necesario para optimizar la velocidad de compresión que permitiera reproducir los experimentos previamente reportados para nuestro sistema estándar, la DPFC (Cruz-Perez Gil-2007).

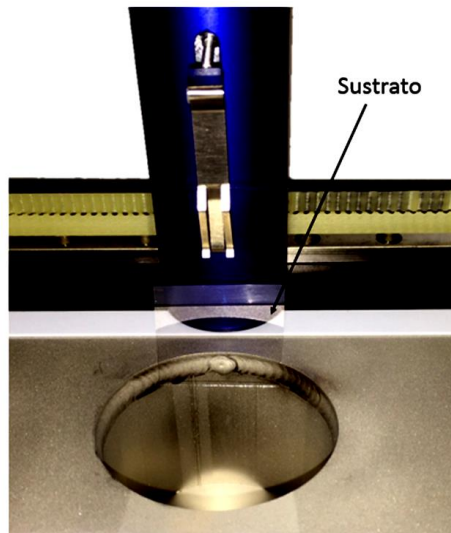
### 3.5 Transferencia de Monocapas

Para la deposición de las monocapas se utilizó un sistema especial de cuba y motor

de transferencia que permite adsorber mono/multicapas sobre un soporte sólido.

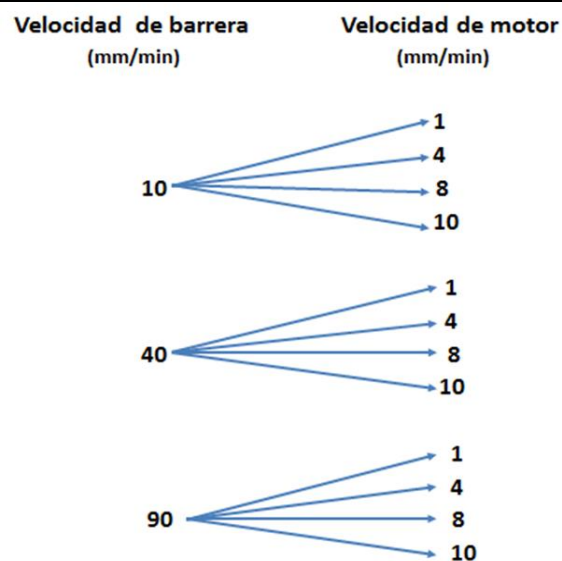


Se utilizó como soporte sólido un cubre objetos de vidrio de 23x23 mm y 0.22 mm de espesor. Los soportes fueron sonicados previamente en una solución de cloroformo durante 15 min para eliminar cualquier contaminante sobre la superficie. Posteriormente son introducidos en la interfase con las barreras en la posición de apertura máxima. El motor posee un controlador que permite descender y subir el soporte a la velocidad deseada, la cual se elige en base a la mejor combinación de velocidad en la compresión de las barreras y de levantado del soporte. Para comprobar que no existan contaminantes en la superficie luego de incluido el soporte en la hipofases se sigue el procedimiento descrito en la sección 3.4.3.



**Figura 21:** Sustrato solido (vidrio) utilizado para la extracción de la monocapa.

Para determinar la mejor combinación en la velocidad de compresión de las barreras y levantado del soporte se realizaron experimentos de extracción de monocapas a distintas velocidades de barrera y motor.



**Figura 22:** Esquema de velocidades de barrera y motor utilizadas en el experimento.

Una vez que se llegó a la presión deseada se esperó 5 minutos para la estabilización de la presión y llegar a un equilibrio del sistema y se procedió a la extracción de la monocapa a las velocidades de elevación indicadas arriba.

Una vez que fue extraído el soporte sólido conteniendo la monocapa que se deseaba estudiar a la presión definida previamente, este se colocó en un porta objeto, y para evitar la oxidación de los lípidos se almacenó en una atmosfera inerte. Debido a que las películas contienen sonda fluorescente sensible a la luz, se las protege en un ambiente oscuro.

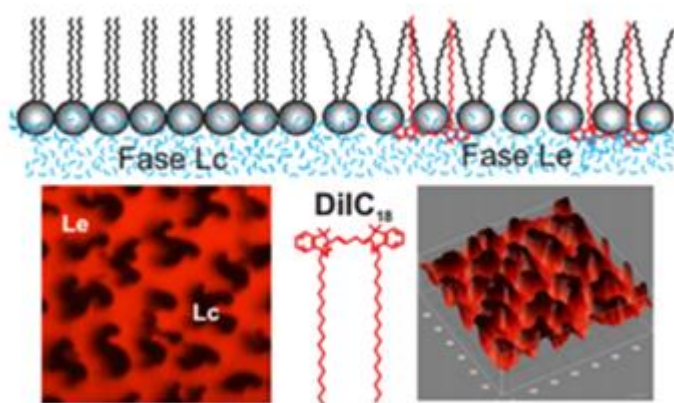
Además de la estrategia seguida anteriormente para la transferencia de las monocapas, en esta tesis hemos desarrollado una nueva estrategia de transferencia que combina la transferencia convencional y la una continua (Ver esquema de la transferencia en la Figura 40). Esta estrategia se realiza en etapas y permite la extracción en un mismo soporte de al menos 3 presiones diferentes. El soporte utilizado fue vidrios de 24x50 mm y 0.22mm de espesor. Las tres presiones definidas fueron antes, durante y después de la transición de fase  $L_E - L_C$ , la velocidad de barrera utilizada fue de 25 mm/min, mientras que la velocidad de motor de la transferencia fue 5 mm/min. Las monocapas de cada una de las presiones son extraídas durante aproximadamente 2 min, lo cual equivale a aproximadamente 10 mm de monocapa para cada tensión.

En el caso de DPFC las presiones de extracción fueron 4 mN/m, 7,5mN/m y 15 mN/m y para surfactante pulmonar las presiones fueron 15mN/m, 49mN/m y 55mN/m.

### **3.6 Observación del orden lateral de las monocapas por microscopia de fluorescencia**

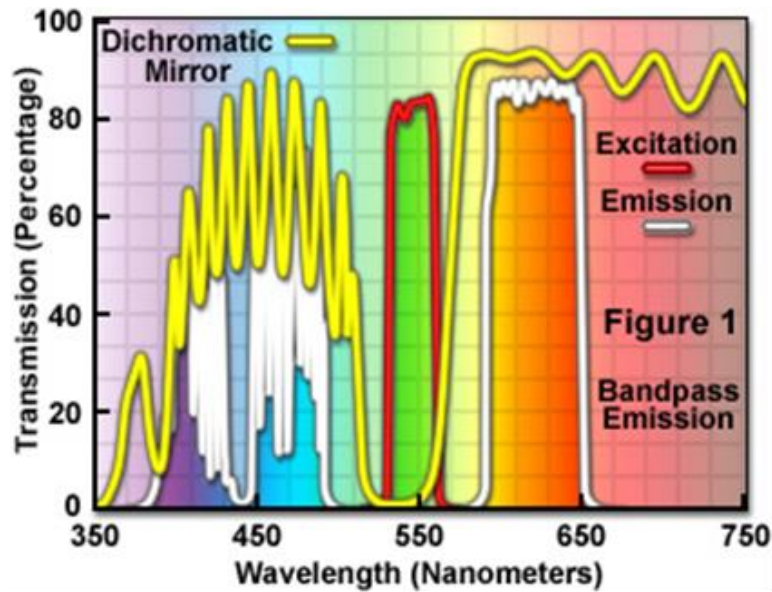
Para identificar las fases de membranas se utilizó la sonda DiI<sub>C18</sub> que tiene una

afinidad fisicoquímica preferencial por la fase  $L_E$  en las monocapas de DPFC, mientras que para el SP tiene afinidad por la fase  $L_O$ . Esto significa que la sonda debería de verse enriquecida en las fases que mencionamos anteriormente (zonas brillantes), mientras que el reparto por la otra fase debería ser bajo (zonas opacas, ver Figura 23).



**Figura 23:** Esquema del reparto de la sonda DiIC<sub>18</sub> por una fase Le y las imágenes de fluorescencia de las monocapas de DPPC durante la transición de fases Le/Lc.

Las imágenes de microscopía fueron tomadas en un microscopio de epifluorescencia Nikon TiF LC, usando un objetivo 40x/0.60 NA y el software NIS-Elements Microscope Imaging Software. El filtro utilizado para la excitación y emisión de la sonda DiIC<sub>18</sub> fue TRITC HYQ (Bandpass Emission) con un rango de excitación de 530-560 nm, una emisión entre 590-650 nm y un espejo dicróico para separar la excitación y emisión con un filtro paso alto de 570 nm (Ver Figura 24). La cámara del microscopio es una Nikon Digital Sight DS-Fi1c, posee una resolución de 2560 x 1290 píxeles.

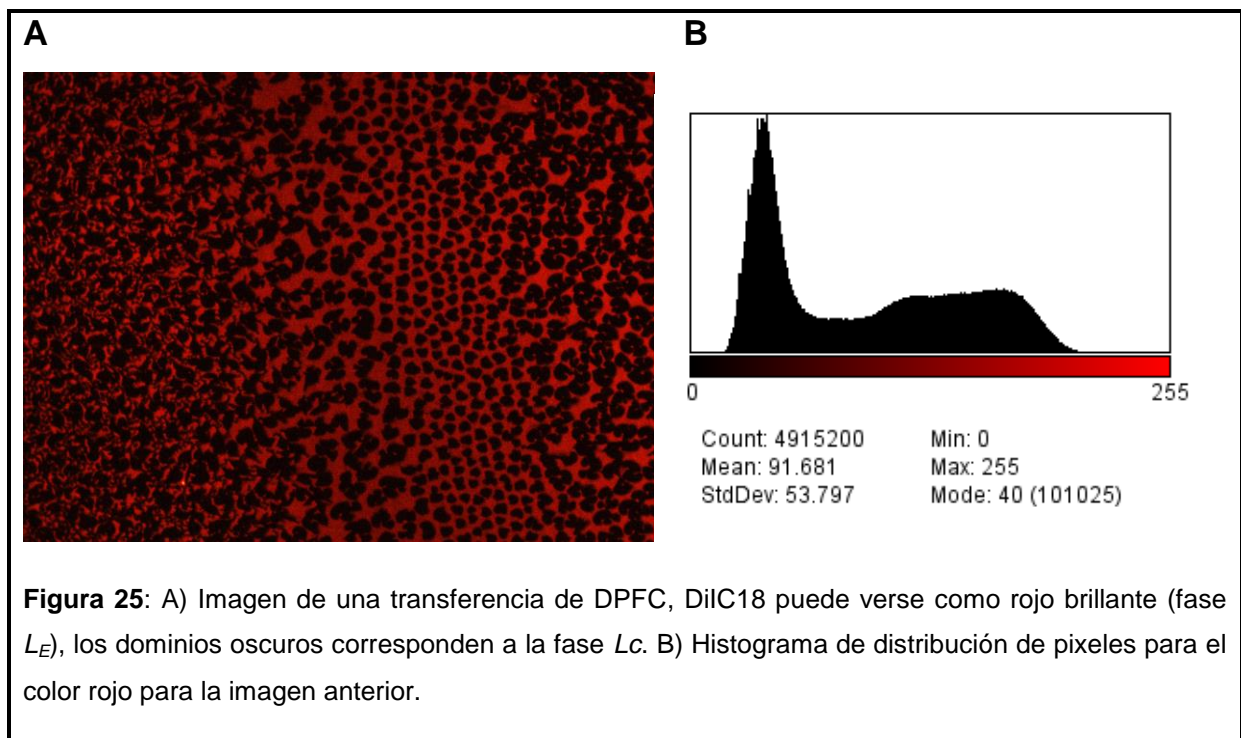


**Figura 24:** Espectro de Excitación y emisión del filtro TRITC HYC utilizado en la adquisición de las imagen de monocapas con el microscopio Nikon TiF LC. (Imagen tomada de Cita web 1).

### **3.7 Cuantificación de la circularidad de los dominios como análisis de los métodos de transferencia y los cambios en la organización de las monocapas.**

Las imágenes fueron adquiridas a una resolución de 2560x1920 píxeles en formato RGB y optimizando siempre el tiempo de exposición o la intensidad de la lámpara para obtener una adecuada distribución de píxeles (ver ejemplo en Figura 25). La escala de intensidad utilizada fue de 8 bits para cada color, lo cual nos permite obtener un rango dinámico de 0-256 puntos de brillo (Figura 25). Luego fueron procesadas usando el software ImageJ 1.48v, Wayne Rsband, NIH-USA.



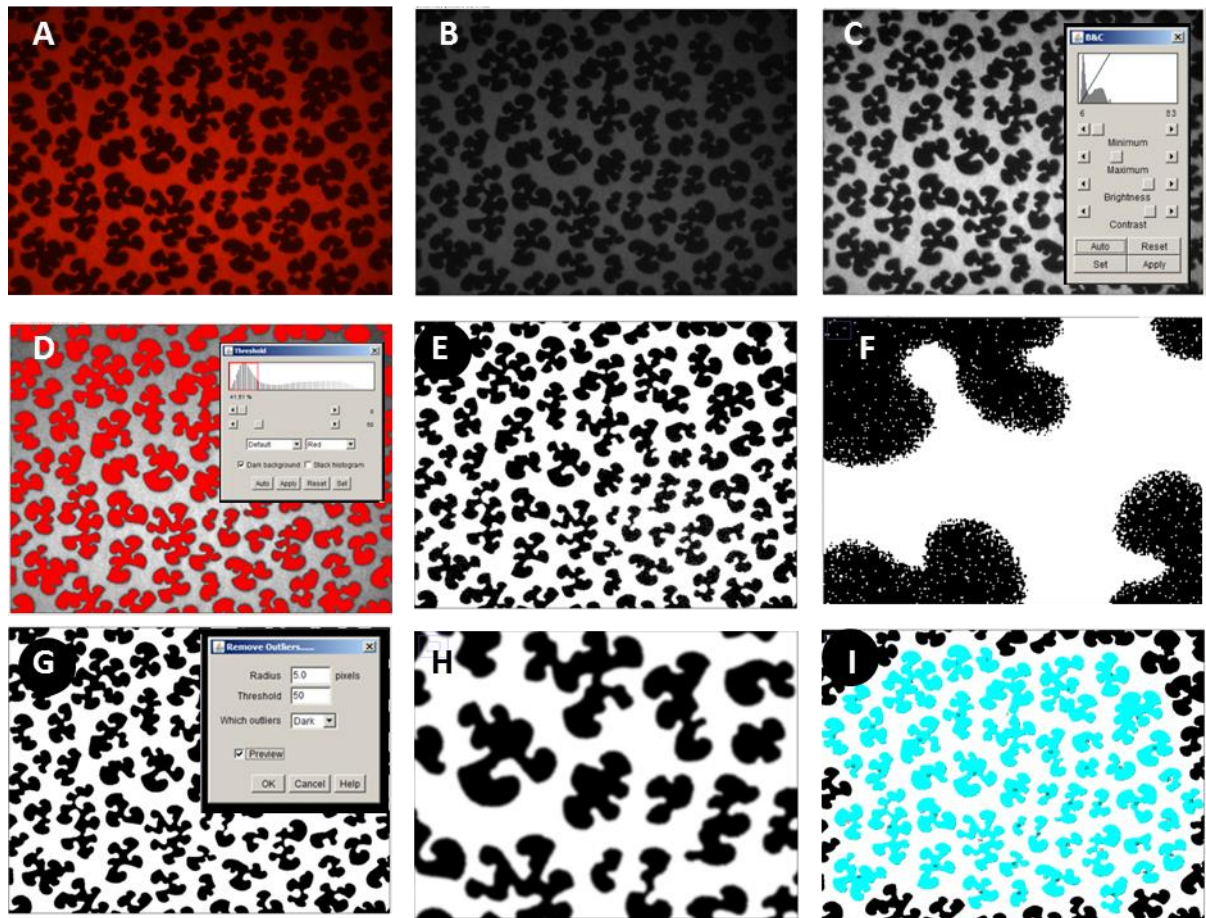


### 3.7.1 Procesamiento de las imágenes

Tal como se mencionó anteriormente utilizando el software de dominio público ImageJ (1.48v, Wayne Rsband, NIH-USA), primeramente necesitamos transformar las imágenes RGB en imágenes en escala de gris (8 bits, ver Figura 26A). Luego de lo cual se procede a ajustar el brillo y contraste para lograr una buena definición de los dominios, lo que permitirá obtener un mejor ajuste de la máscara (Threshold). Posteriormente se procede a obtener una máscara de los píxeles de interés (región de interés, ROI), en este caso los dominios oscuros, ajustando el rango de píxeles en el histograma de intensidad (ver Figura 26B). 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 de las formas de los dominios (ver Figura 26C, D y E). Antes de obtener los datos métricos de perímetro y área de los dominios, es necesario eliminar los píxeles de ruido y suavizar. Para esto



aplicamos un grupo de plugins como el filtro de tamaños “remove outliers” (elimina objetos por número de píxeles), para el cual utilizamos valores entre 1 y 2 píxeles como máximo y aplicamos el filtro en ambos colores (ósea para el color negro y el blanco, ver figura 26E y F). Finalmente, se procede a realizar un suavizado de los perímetros de los dominios al aplicar un filtro “Gaussian Blur”, lo cual elimina la rugosidad introducida en el ajuste de la mascarará al seleccionar el umbral del histograma (Cita web 2). Esto es un paso clave dado que si no eliminaran esta rugosidad artefactual introducida en procedimiento anterior incrementaríamos el perímetro y por lo tanto el valor de circularidad que nos permitirá estudiar la forma de los dominios. El filtro gaussiano aplica un cálculo de entorno que suaviza los valores los píxeles extremos considerando los valores de los píxeles del entorno. En nuestro caso nunca utilizamos valores de número de radio de píxeles mayor a 5 (ver Figura 26G y H).



**Figura 26:** **A)** Imagen RGB de dominios de DPFC obtenidos a una tensión de 7.5 mN/m, la sonda DilC18 se denota como rojo. **B)** Imagen transformada a 8 bits, rango dinámico de 0 a 256. **C)** Ajuste del histograma de intensidad para incrementar el contraste entre los dominios  $L_C$  (negro) y la fase  $L_E$  (blanco), en el inserto puede verse el histograma y la selección utilizada. **D)** En rojo puede verse los pixeles que se selecciona para realizar la máscara de los dominios utilizando el rango de intensidad en el histograma que se denota por cuadrante rojo. **E y F)** Mascara obtenida luego de la selección anterior, en el zoom es posible identificar el ruido y la rugosidad en los límites de los dominios por el uso de los del threshold. **G y H)** Imagen de los dominios luego de eliminado el ruido y aplicado el filtro "Gaussian Blur". **I)** Imagen de los dominios analizados en celeste, el plugin "Analyse Particles", permite determinar contar el número de elementos, su perímetro y el área de cada uno de los objetos identificados para el tamaño de pixeles seleccionado. Es posible ver que los dominios de los bordes no son considerados para el análisis, esto se selecciona para evitar el desvío ocasionado en las medidas de circularidad por el cambio en la forma de los dominios en los límites de la imagen.

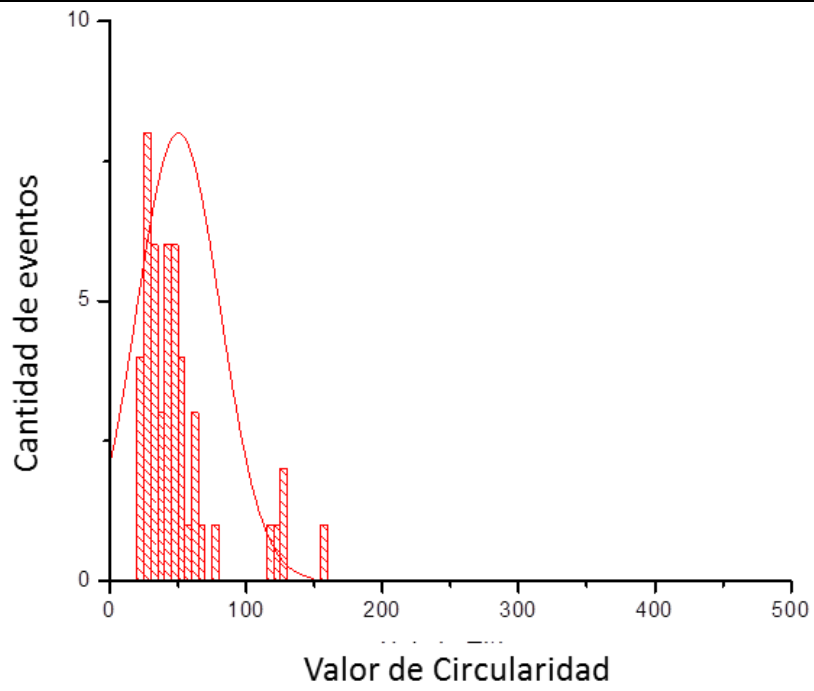
### 3.7.2 Análisis de los resultados

Luego de obtenida la máscara en condiciones para el análisis de las formas de los dominios, procedemos a utilizar un plugin (“Analyze Particles”, <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/guide/146-30.html>) que permite contar el número de objetos en nuestra imagen indicando el rango de tamaño en píxeles, el cual en nuestro caso fue mayor a 2 e infinito como máximo. Definimos que no mida los objetos que están limitando con los bordes de la imagen, lo cual incluiría un desvío en nuestras medidas Área y Perímetro de cada objeto (ver Figura 26I), los cuales los utilizaremos para calcular el parámetro conocido como circularidad descrito previamente por Hartel y colaboradores (Hartel-2005), y que se calcula como:

$$\text{Circularidad (C)} = P^2/A$$

Este parámetro es sensible a los cambios de forma y además es independiente del zoom aplicado, lo cual evita inconveniente en caso que fuera necesario modificar el zoom o magnificación utilizada. Los resultados de simulación y discusión del método pueden encontrarse en la sección resultados.

Posteriormente al cálculo del valor C para cada dominio, procedemos a realizar el análisis de los resultados a partir de calcular el histograma de distribución del valor C en nuestra imagen. Con esto obtenemos el valor medio y un ancho a la mitad del máximo (o Full Width at the Half Maximum, FWHM), lo que nos permite comparar las distribuciones en cada tipo transferencia o protocolo de estudio (ver Figura 27). El ajuste de los datos de distribución de C se realizó a partir de una función Gauseana y todos los análisis fueron realizados utilizando el Software Origin 9.2 (OriginLab Corporation, USA).

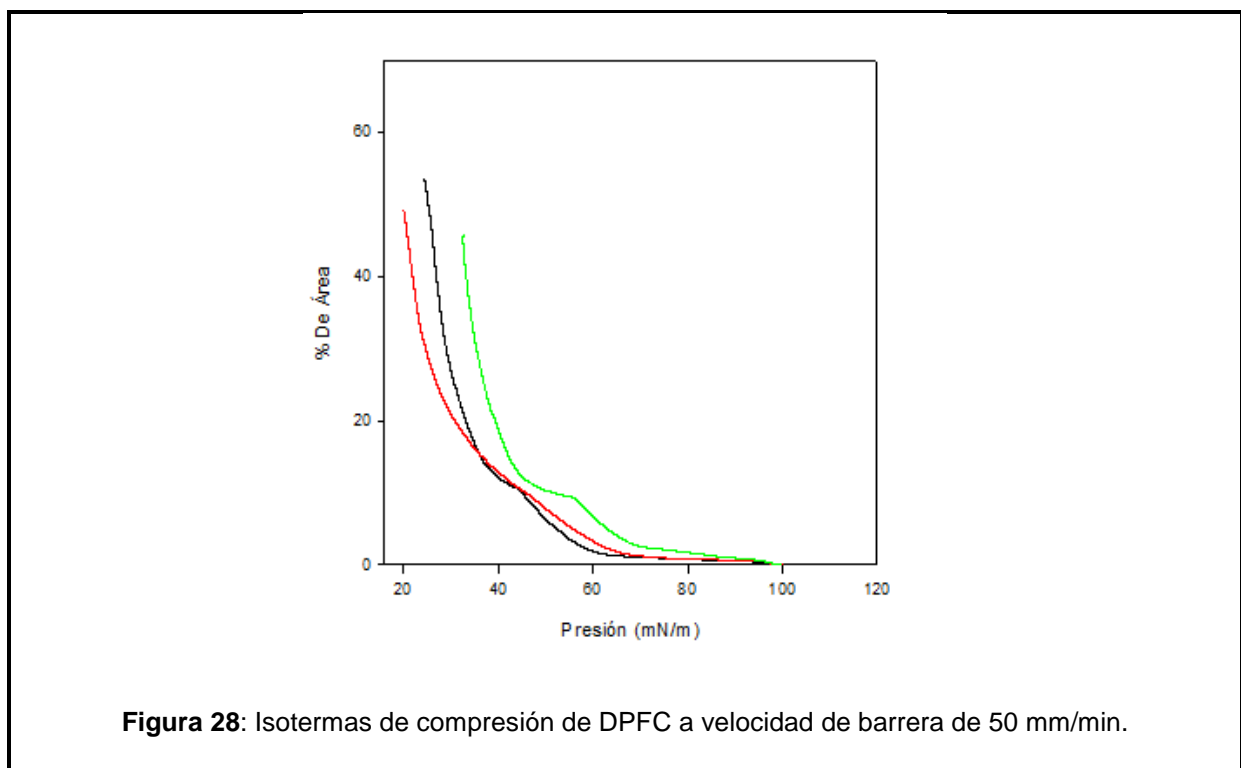


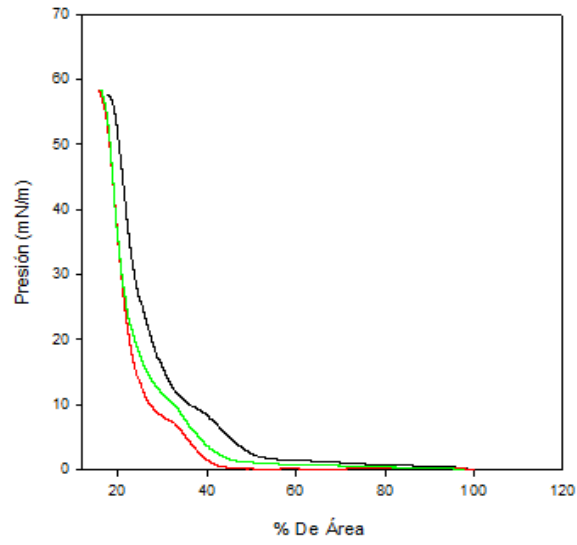
**Figura 27:** Histograma de distribución de la los datos procedentes de la Figura 28I.

## Resultados

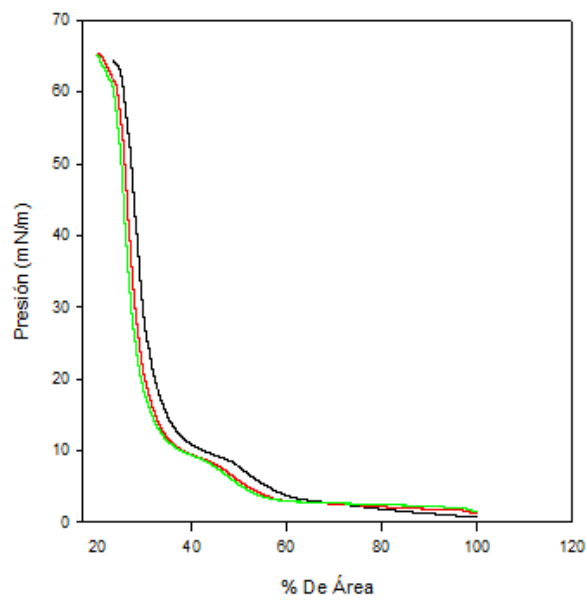
### 4.1 Puesta a punto del funcionamiento de la Balanza

Se realizaron isotermas de compresión para el modelo de membrana DPFC a distintas velocidades de barrera: 50, 90 y 140 mm/min con el fin de seleccionar la mejor velocidad a la cual obtener reproducibilidad en los resultados. Las isotermas de compresión a velocidad de 50 mm/min llegan a valores de tensión máxima de 45-55 mN/m, con velocidad de barrera de 90 mm/min se llega a valores de tensión de 57-60 mN/m y a velocidad máxima se obtienen valores de 64 mN/m e incluso superiores logrando además una mejor reproducibilidad de los experimentos (ver Tabla 1 y las Figuras 28, 29, 30, respectivamente).





**Figura 29:** Isotermas de compresión de DPFC a una velocidad de barrera de 90 mm/min.



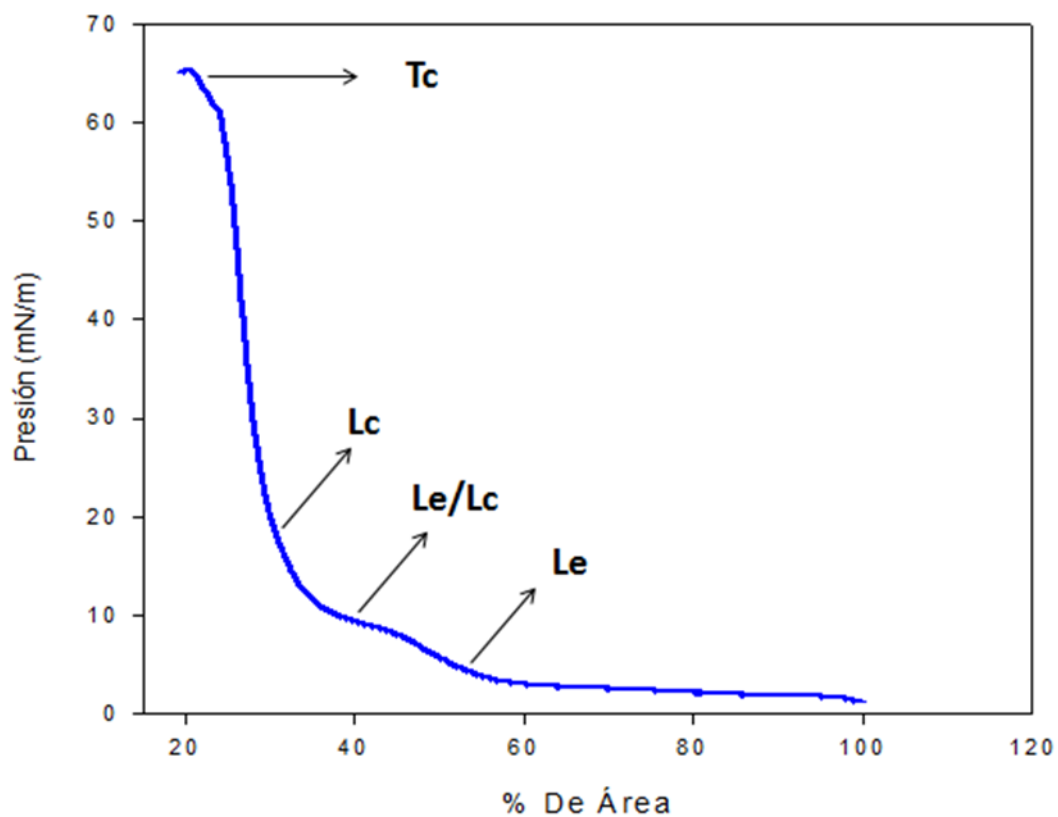
**Figura 30:** Isotermas de compresión de DPFC a una velocidad de barrera de 140 mm/min.

**Tabla 1: Resumen de resultados de los valores tensoactivo de la DPFC a diferente velocidad de compresión.**

<b>Velocidad de Barrera (mm/min)</b>	<b>Tensión de transición (mN/m)</b>	<b>Tensión máxima (mN/m)</b>
50	7.5±0.9	51.5±3.1
90	7.8±0.4	58.5±0.4
140	7.5±0.0	65.0±0.2

Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente y en tres muestras independientes. Los valores representan la media ± el desvío estándar.

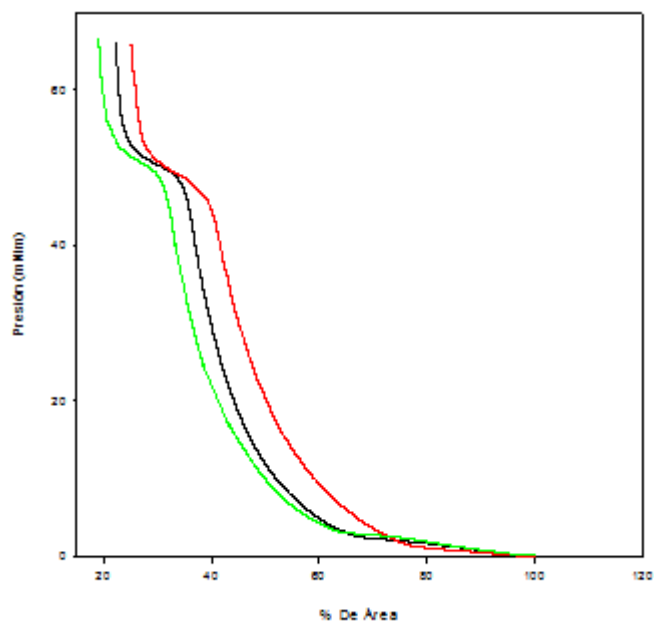
Una vez determinada la velocidad de barrera a la cual se obtienen las mejores curvas, hemos podido identificar las tensiones máximas alcanzadas y las regiones de transición, Liquida expandida- Liquida condensada (Le-Lc) así como las regiones de fases “puras”, liquido expandida (Le), liquido condensada (Lc) y altamente condensada (tight condensed, Tc). La Figura 31 muestra que las tensiones máximas alcanzadas para el modelo de membrana DPFC son de aproximadamente 65 mN/m. La transición de fase Le-Lc ocurre a 7,5 mN/m aproximadamente por debajo de la cual se encuentra la fase Le y por encima la fase Lc.



**Figura 31:** Isoterma de compresión de DPFC a una velocidad de 140 mm/min, las flechas denotan las diferentes regiones correspondientes a las fases, líquido expandida (Le), líquido condensada (Lc), altamente condensada (tight condensed, Tc).

Posteriormente, visto que hay reproducibilidad en los ensayos realizados con DPFC y habiendo comprobado que el instrumento funciona correctamente se procedió a realizar isotermas de compresión con surfactante pulmonar. Todas las isotermas se realizaron a velocidad de barrera de 140 mm/min. Los resultados muestran una transición de fase en el entorno de 46 mN/m y tensiones máximas de 65 mN/m aproximadamente (ver Figura 32 y Tabla 2).





**Figura 32:** Isotermas de compresión del extracto orgánico de surfactante pulmonar porcino (EO-SP).

**Tabla 2: Resumen de resultados de los valores tensoactivo del EO-SP a una velocidad de barrada de 140 mm/min.**

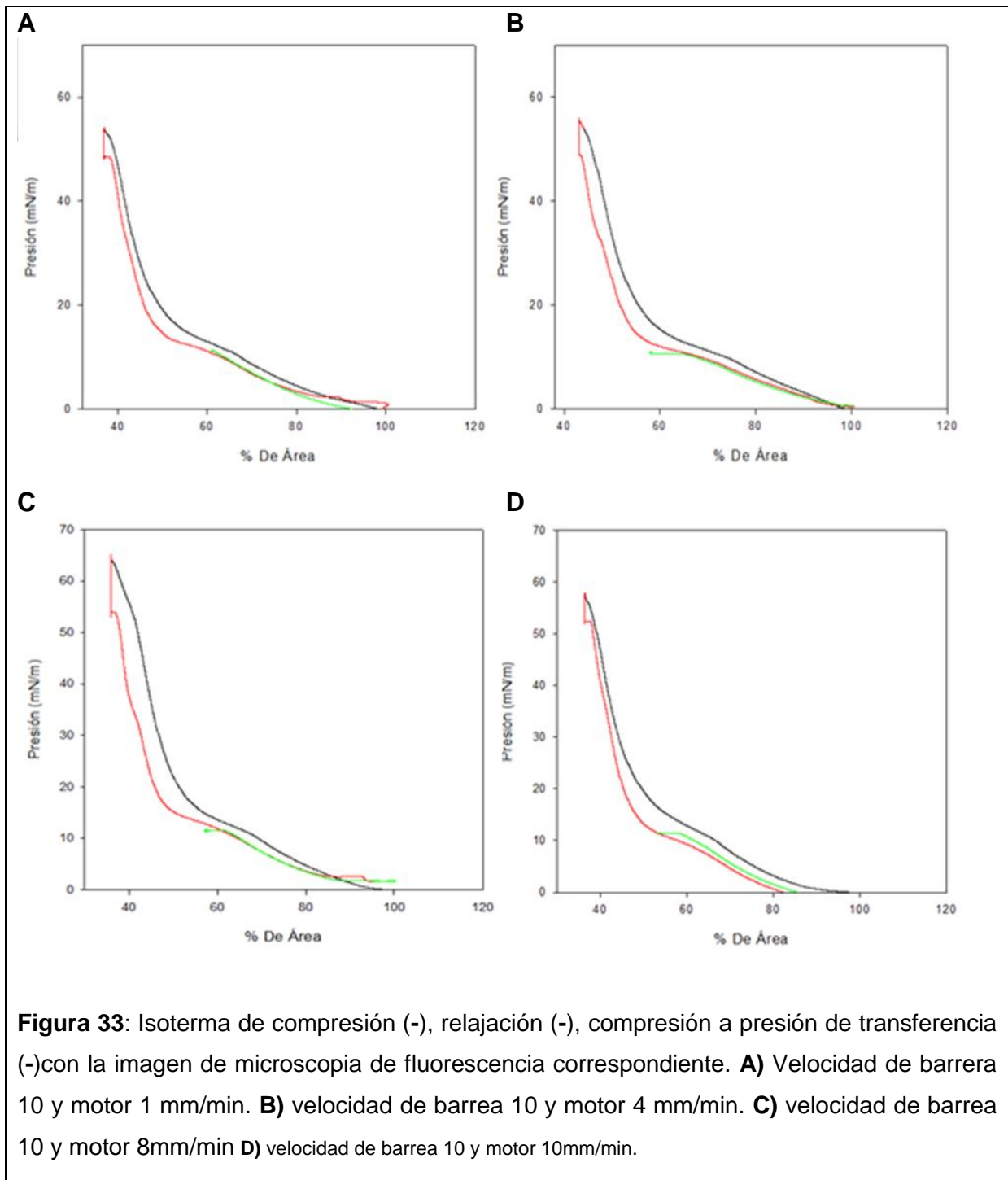
Tensión de transición (mN/m)	Tensión máxima (mN/m)
46.2±0.3	65.4±0.4

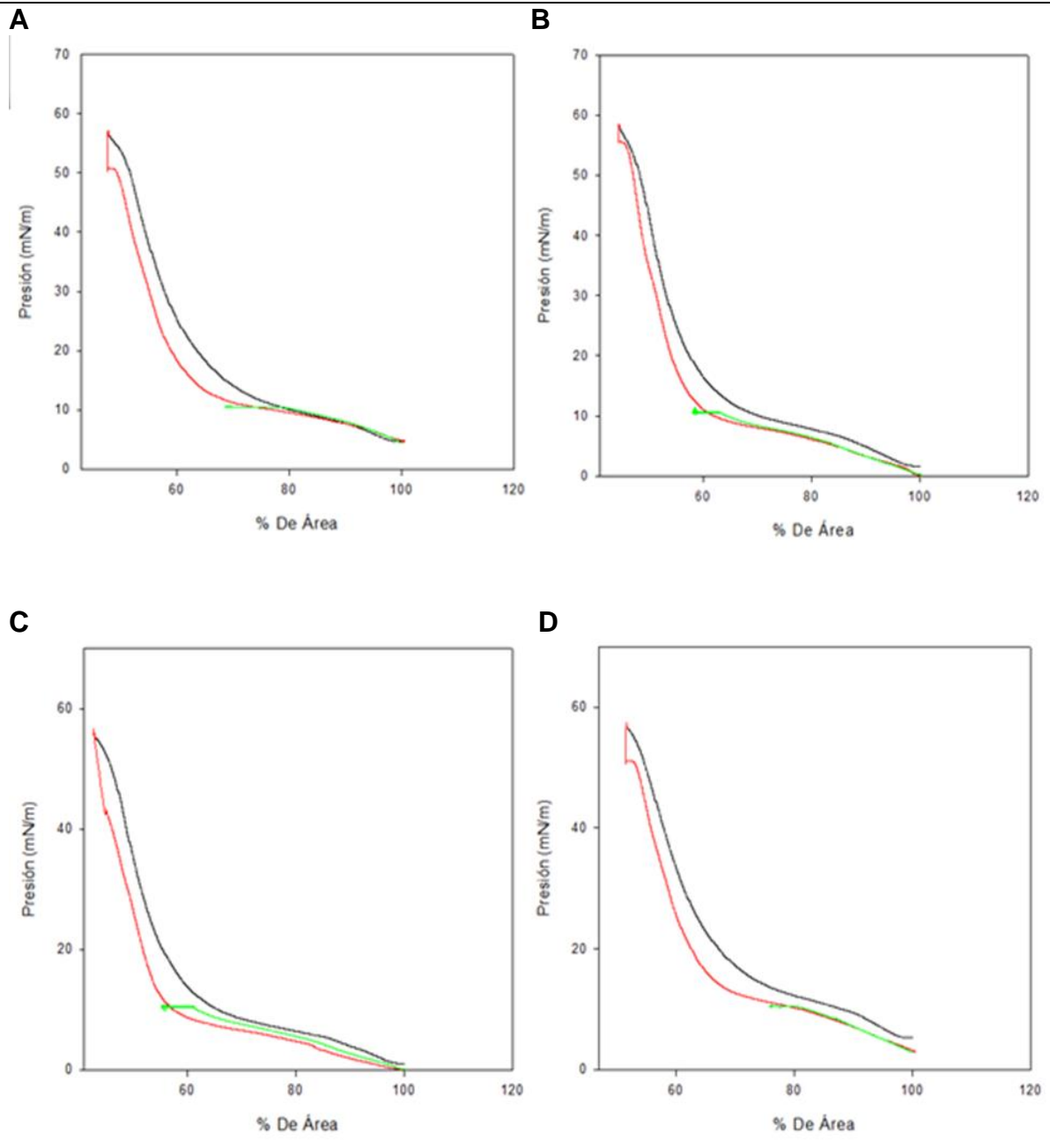
Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente y en tres muestras independientes. Los valores representan la media ± el desvío estándar.

## 4.2 Transferencia de monocapas de DPFC sobre vidrio

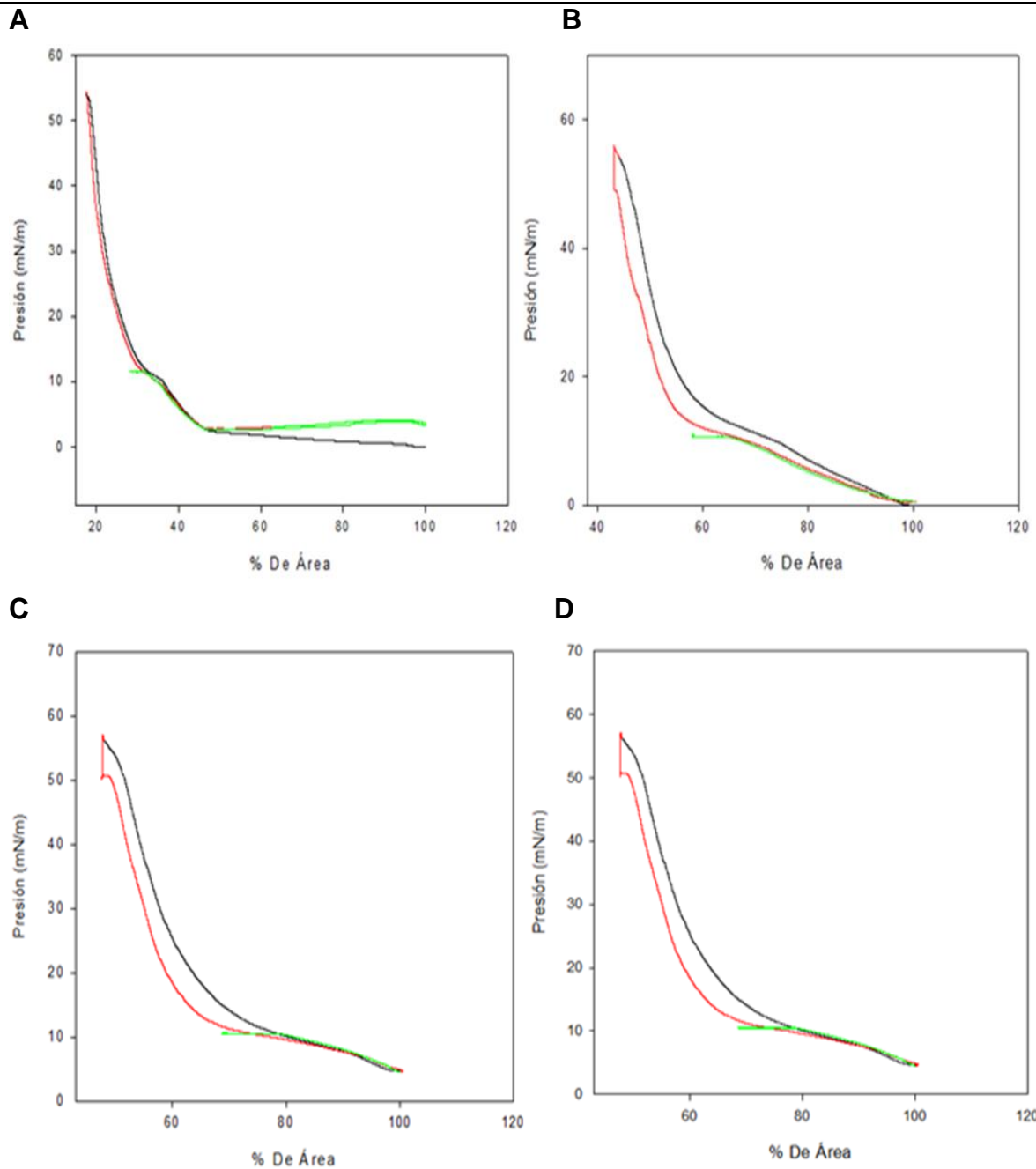
Se realizaron transferencias de monocapas a una presión definida (presión de transición) modificando en los ensayos la velocidad de barrera o la velocidad de motor a la cual se realiza la extracción de la monocapa. Las velocidades de barrea fueron 10mm/min (Figura 33), 40 mm/min (Figura 34) y 90 mm/min (Figura 35) y para cada una de esas velocidades se transfirieron monocapas a velocidades de

motor de 1, 4, 8 y 10 mm/min (A, B, C y D de cada Figura). Una imagen representativa de cada transferencia puede ser observada en la Figura 36.

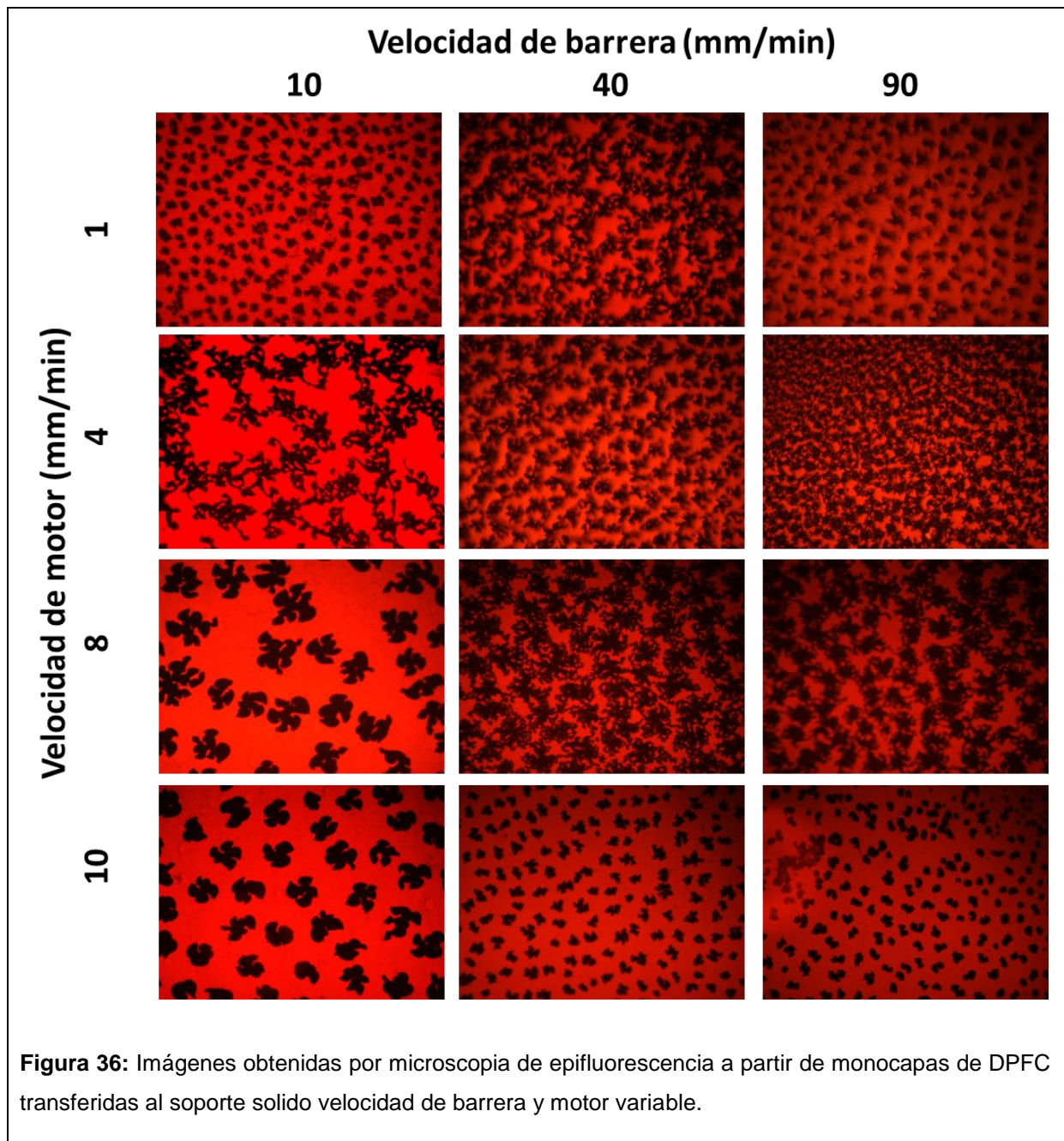




**Figura 34:** Isoterma de compresión (-), relajación (-), compresión a presión de transferencia (-) con la imagen de microscopia de fluorescencia correspondiente. **A)** Velocidad de barrera 40 y motor 1 mm/min. **B)** velocidad de barra 40 y motor 4 mm/min. **C)** velocidad de barra 40 y motor 8mm/min. **D)** velocidad de barra 40 y motor 10mm/min.

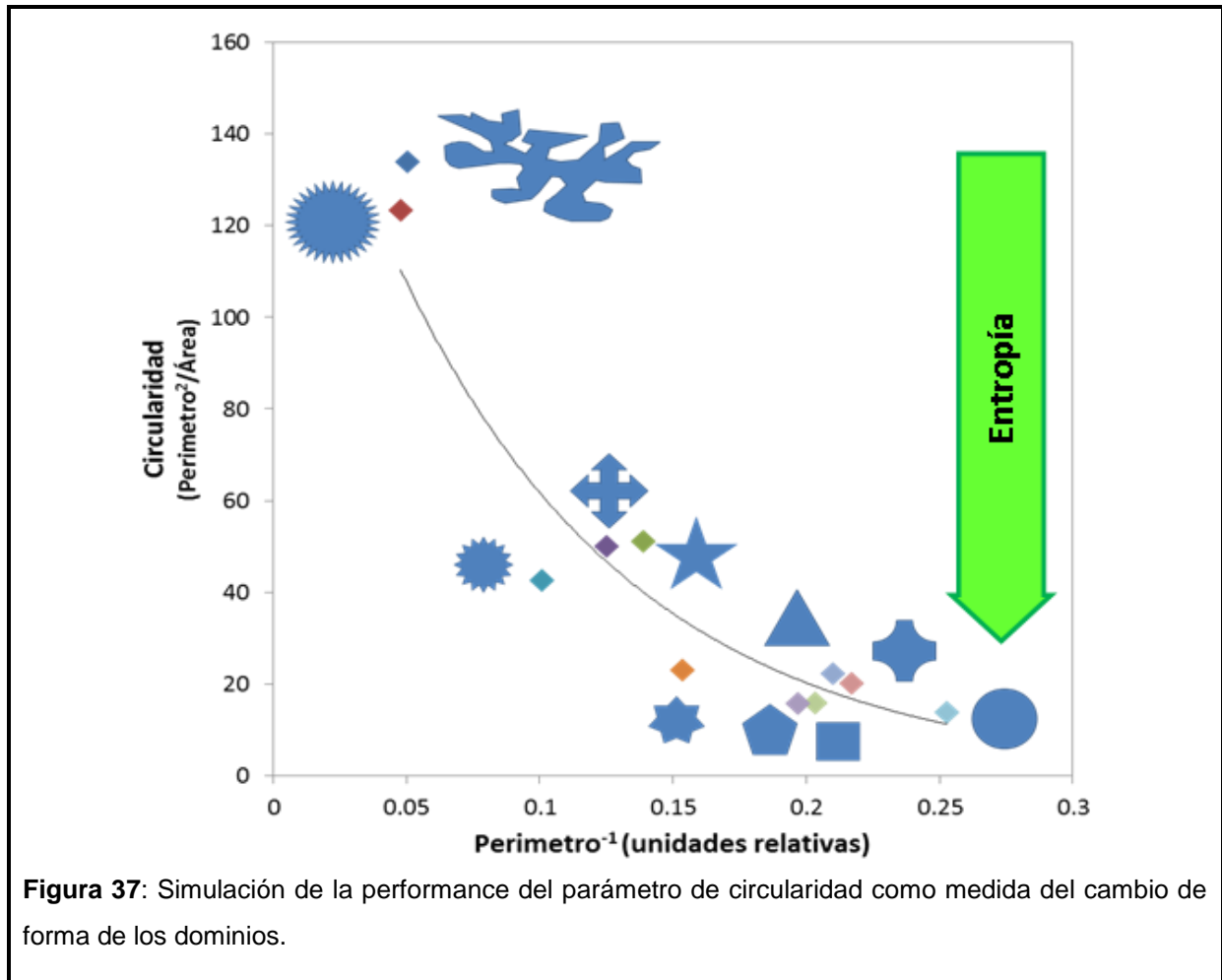


**Figura 35:** Isotherma de compresión (-), relajación (-), compresión a presión de transferencia (-) con la imagen de microscopia de fluorescencia correspondiente. **A)** Velocidad de barrera 90 y motor 1 mm/min. **B)** velocidad de barra 90 y motor 4 mm/min. **C)** velocidad de barra 90 y motor 8mm/min. **D)** velocidad de barra 90 y motor 10mm/min.



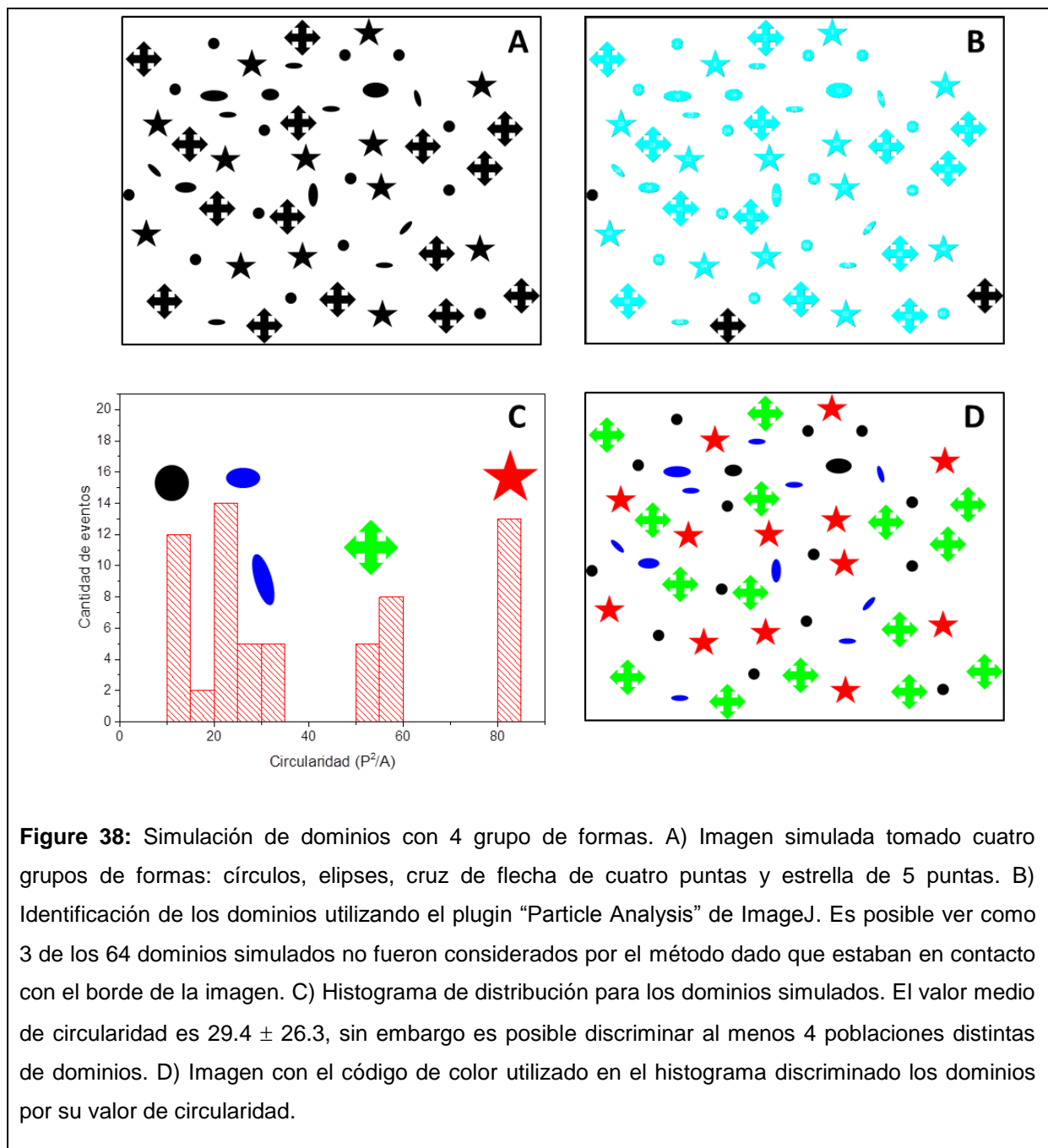
Tal como se describió en la sección 3.7 de materiales y métodos, la medida de circularidad es extremadamente útil para identificar cambios en la forma de objetos. En la Figura 37 puede observarse el grafico de la dependencia en la circularidad en función del inverso del perímetro para una simulación con diversos objetos tomados de formas disponibles en la herramienta la herramienta de dibujo en el procesador

de texto Word. En este grafico se observa como la circularidad decrece a medida que disminuye el perímetro, es simple identificar como la figura cuyo menor  $P^2/A$  es el círculo.



Para comprobar la performance del valor de circularidad y su perfil de distribución como herramienta de evaluación de los diferentes protocolos de transferencia, realizamos una simulación combinamos diferentes formas (ver Figura 38). Si evaluamos el valor medio de circularidad para el total de las formas en la imagen, se puede identificar que el valor y su error están en el mismo orden de magnitud ( $29.4 \pm 26.3$ ). Sin embargo si estudiamos en más detalle el histograma surge inmediato la

presencia de al menos 4 poblaciones de dominios con valores medios de 10.8, 22.4, 56.5 y 83.3 (círculos, elipses, flecha de cuatro puntas y estrella de cinco puntas, respectivamente). Los resultados muestran que el protocolo permite separar correctamente las diferencias entre las cuatro figuras (círculos, elipses, flecha de cuatro puntas y estrella de cinco puntas), sin embargo es posible ver que resulta difícil discriminar entre los subgrupos de elipses.





Posteriormente se realizó el procesamiento y el análisis de las imágenes obtenidas a partir la microscopia de epifluorescencia para las diferentes combinaciones de velocidad de barrera (10, 40 y 90 mm/min) y motor de vidrio (1, 4, 8 y 10 mm/min) (Figura 36). El análisis de los histogramas de distribución del  $P^2/A$  nos permite identificar desde el punto de vista cuantitativo cual es la mejor combinación en la velocidad de barrera y motor para que la transferencia de las monocapas presente una heterogeneidad menor en la forma de los dominios. La Tabla 3 muestra el análisis de distribución de los valores  $X_c$  y  $W$  para el ajuste a una función Gaussiana del histograma de distribución de  $P^2/A$ . El primer elemento a destacar es que varias de las combinaciones en la velocidad barrera y motor de vidrio no permitieron una transferencia limpia que permitan realizar un análisis correcto (es el caso de las combinaciones 4-40 y 4-90), ver Tabla 3.

El análisis cuantitativo nos indica que basados en la distribución más homogénea para el valor de  $P^2/A$  (valor de  $W$  menor), la transferencia que presento una distribución más semejante en las formas de los dominios fue la que corresponde a la velocidad de barrera de 90 mm/min y de motor de 1 mm/min. Sin embargo, el análisis cualitativo inmediatamente nos permite concluir que los resultados de forma de estas monocapas no corresponden con las formas esperadas para la transición de DPFC (Kym-2001). Volviendo a las imágenes y desde el punto de vista cualitativo es posible identificar cuáles de las imágenes tiene similitud con los resultados previamente descritos por otros autores. Siguiendo esta selección podemos definir que las combinaciones de velocidad de barrera y motor más relevantes desde el punto de vista cualitativo son: 8-10, 10-10. Considerando en particular estas dos combinaciones y refiriéndonos nuevamente a la Tabla 3,



podemos ver que la combinación 10-10 posee un menor valor de W ( $13.8 \pm 5.6$  vs  $22.8 \pm 8.2$ ).

**Tabla 3: Resumen de resultados del ajuste Gaussiano al histograma<sup>†</sup> de distribución para el valor de circularidad ( $P^2/A$ ) de los dominios de DPFC en los experimentos de transferencia de monocapas a diferente velocidad de barrera y motor de vidrio.**

Velocidad de motor*												
$V_B$	1			4			8			10		
	Xc	W	n	Xc	W	n	Xc	W	n	Xc	W	n
10	19.4	2.9	1	$75.4 \pm 0.1$	$45.4 \pm 2.4$	2	$38.4 \pm 0.4$	$22.8 \pm 8.2$	3	$34.9 \pm 6.5$	$13.8 \pm 5.6$	5
40	$38.8 \pm 0.5$	$28.1 \pm 0.7$	2	---	---	-	$46.9 \pm 2.2$	$33.4 \pm 26.5$	4	22.3	12.7	1
90	21.4	10.1	1	---	---	-	37.7	26.1	1	17.8	9.8	1

Los valores representan el valor medio de circularidad  $\pm$  el desvío estándar.

<sup>†</sup>El histograma se construyó a partir de la división del rango de valores de circularidad en unidades de 5 y la acumulación de eventos en cada paso.

n= número de imágenes analizadas.

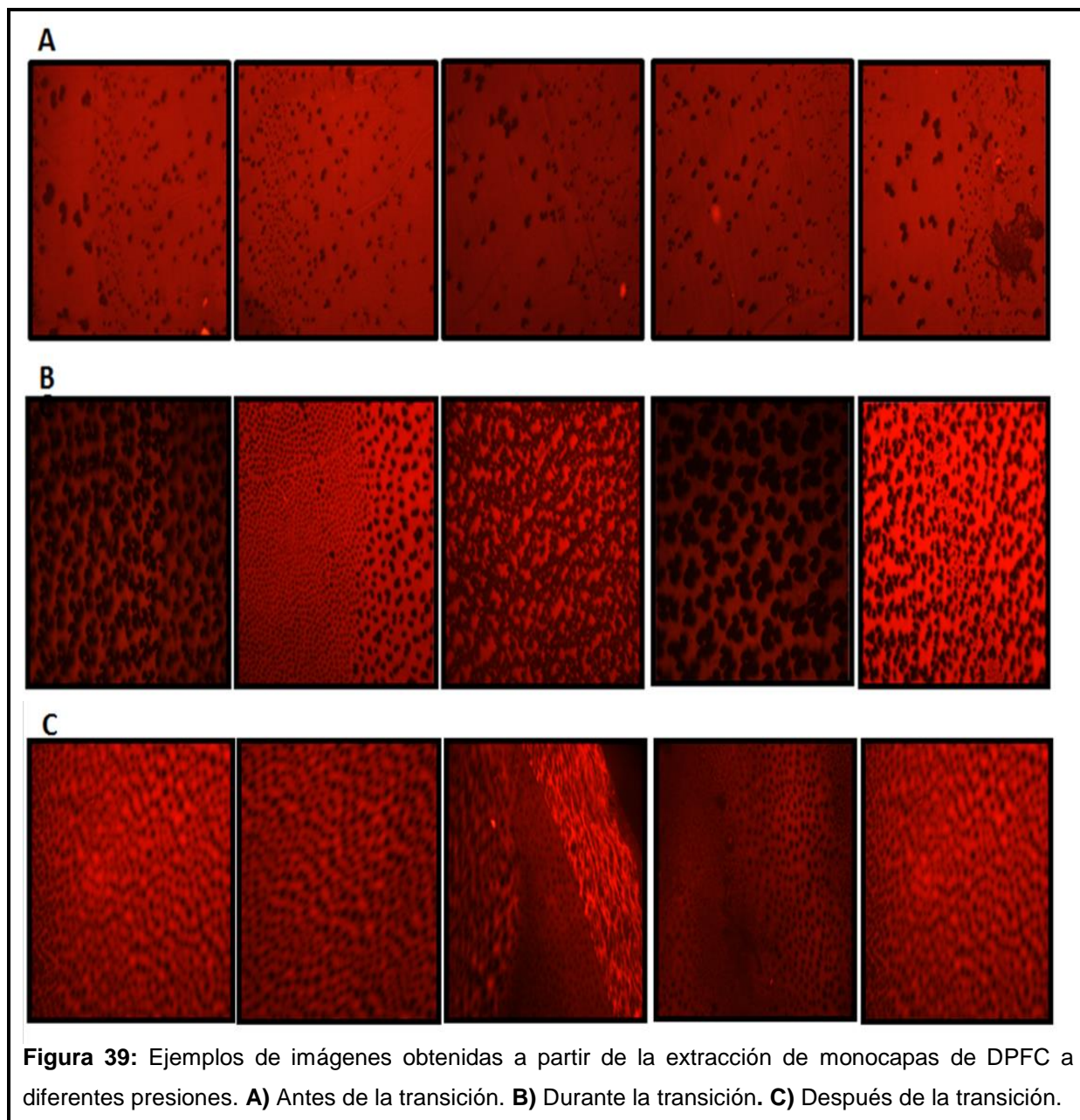
$V_B$ : velocidad de barrera (mm/min)

\*: velocidad de motor (mm/min)

Xc = valor medio de distribución.

W = FWHM: full width at the half maximum, ancho a la mitad del máximo de la distribución.

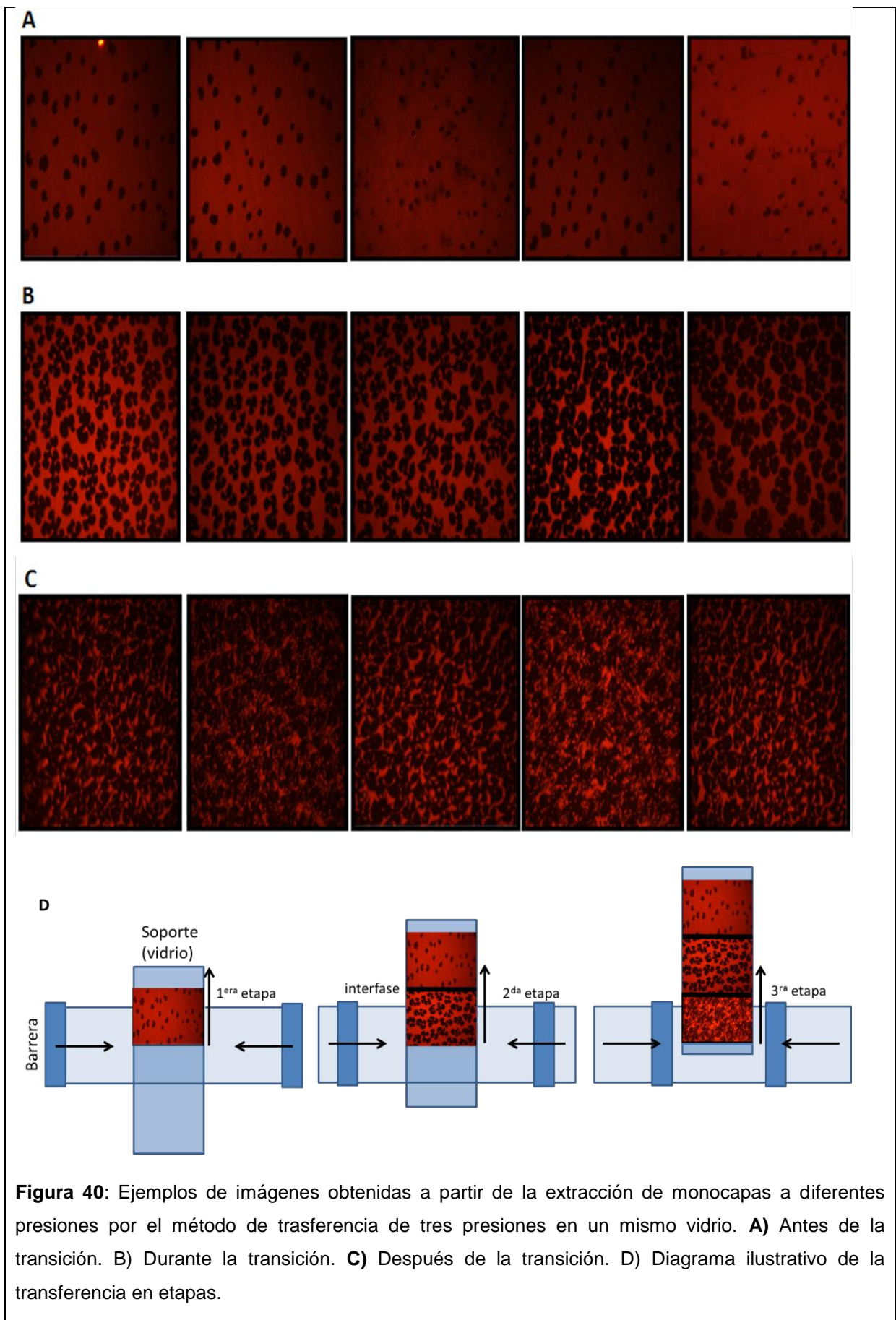
Tras identificar la mejor combinación de velocidades para la extracción del soporte, se transfirieron monocapas de DPFC con la combinación en las velocidades 10-10 mm/min para presiones antes (Figura 39A), durante (Figura 39B) y después de la transición (Figura 39C).



La heterogeneidad en la distribución de los dominios impide una correcta estimación cuanti/cualitativa, lo cual es indicativo de que el método de transferencia sigue siendo poco reproducible.

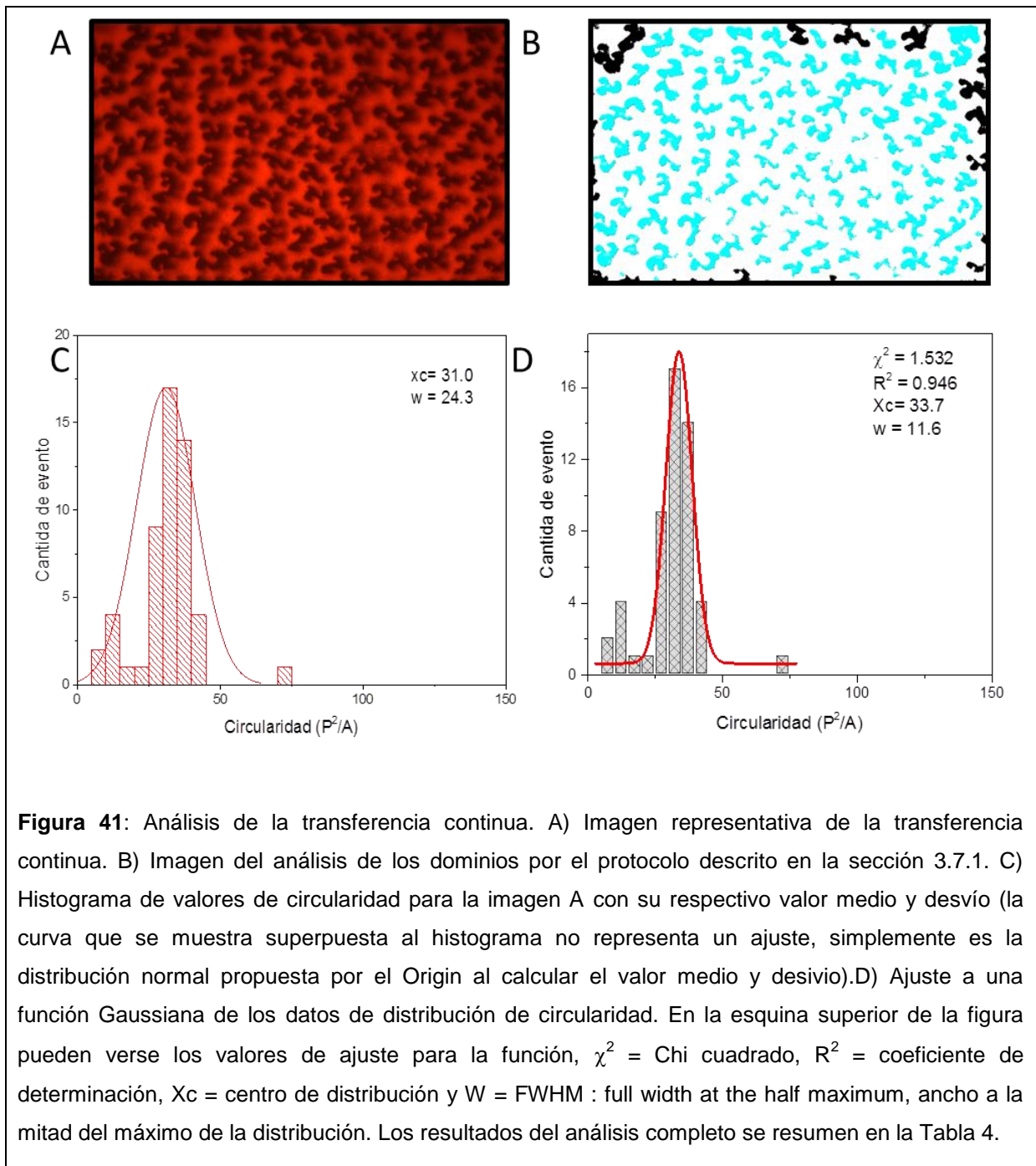
Nos propusimos la puesta a punto de un nuevo protocolo de transferencia, la cual combina la transferencia clásica un método continuo. En este caso el protocolo que

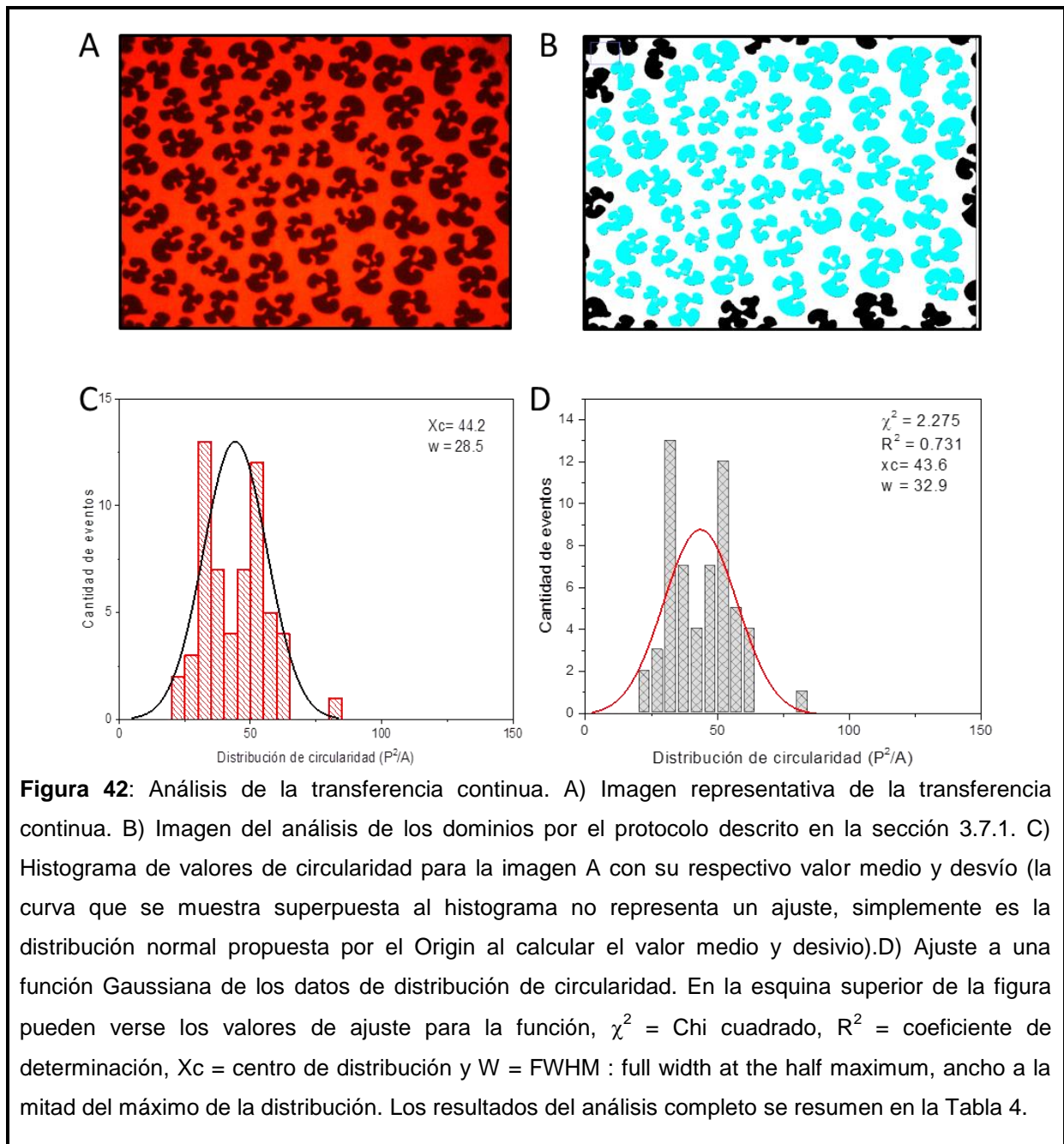
se propone consiste en la transferencia en etapas a 3 presiones sobre un mismo vidrio (Figura 40). Esto aumenta el rendimiento de cada experimento, disminuye el tiempo y permite estudiar en un solo experimento el efecto de los anestésicos sobre la pre-transición, transición y post-transición, lo que en principio debería de disminuir la variabilidad de los resultados.



Para determinar el mejor método de transferencia y analizar los cambios en la organización de las monocapas, se procesaron y analizaron las imágenes obtenidas a partir de los dos métodos utilizando en el procedimiento descrito en la sección 3.7. El método de transferencia de tres presiones mostró mayor reproducibilidad en el análisis cualitativo de las imágenes, pudiéndose observar una distribución más homogénea de las formas y tamaño de los dominios. En la Figura 41 se puede observar el procesamiento de las imágenes del método de una presión por vidrio y en la figura 42 el método de transferencia por tres presiones.







En la Tabla 4 se resumen los resultados del análisis de la distribución de formas (basados en el valor de circularidad) para la transferencia convencional y la nueva propuesta en la presente tesis. Los resultados permiten ver que la transferencia simple presenta una distribución de valores más homogénea y también un centro menor. Pese a que el valor de  $W$  es menor en este caso para la transferencia

simple, una inspección visual de las formas y el valor del centro de distribución, nos indica que poseemos un importante componente de dominios con un valor de circularidad bajo (similar a un círculo). Mientras que para el caso de los datos de la transferencia en etapas no es posible identificar una contribución significativa dominios circulares y una observación más detenida del histograma de distribución nos permite identificar posiblemente dos grupos de dominios, uno centrado en 32.5 y otro en 52.5

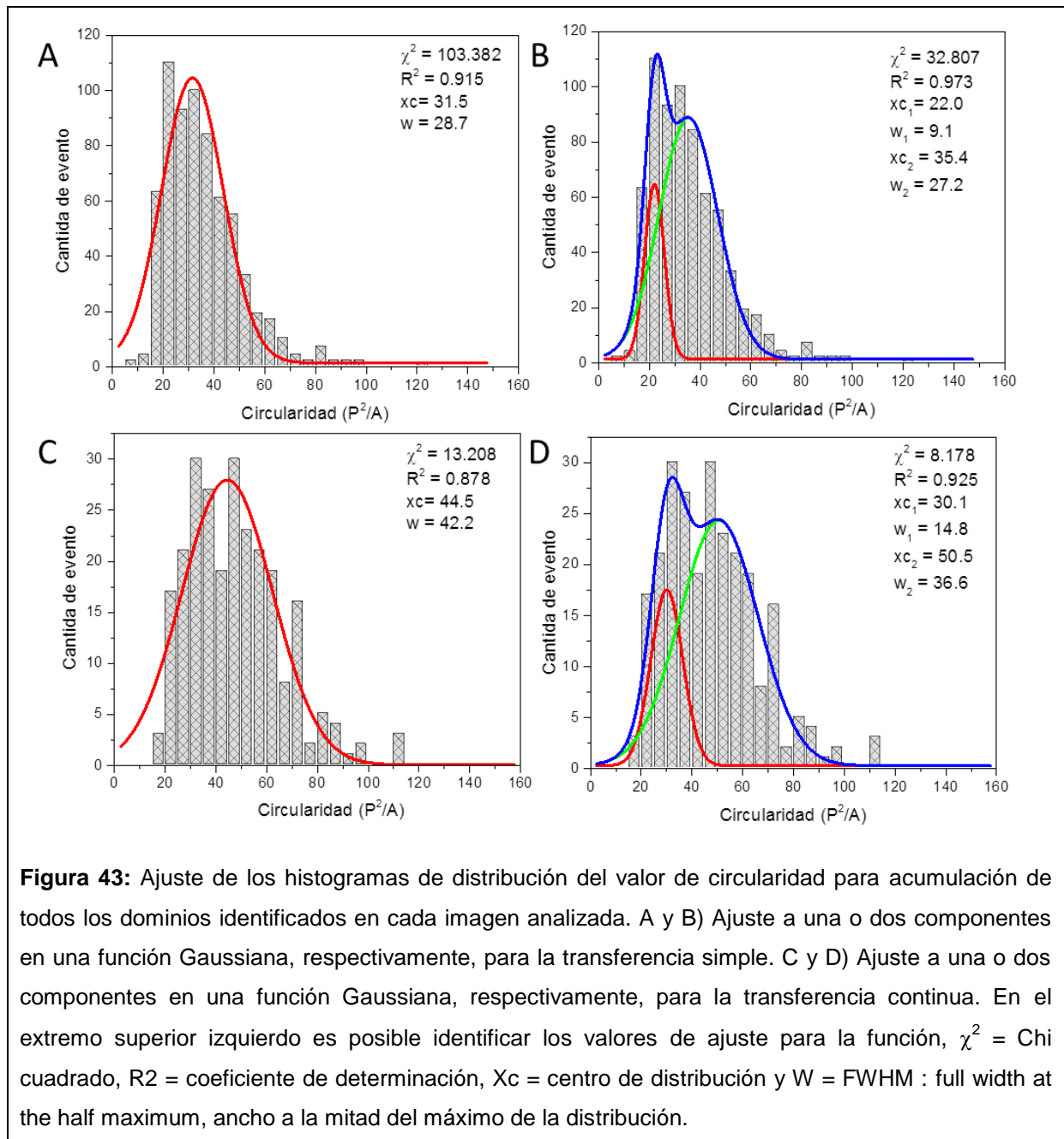
<b>Tabla 4: Resumen de resultados del análisis de los histogramas de distribución en los valores de circularidad para los dominios de DPFC utilizando los protocolos de transferencia simple y continua.</b>		
<b>Transferencia</b>	<b>Xc</b>	<b>W</b>
Simple	36.4± 10.9	29.8 ± 13.5
Continua	44.9 ± 4.9	37.0 ± 5.7

Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente y en tres muestras independientes, se analizaron entre 5-10 imágenes por experimento. Los valores representan la media ± el desvío estándar.  
Xc = centro de del histograma de distribución.  
W = FWHM: full width at the half maximum, ancho a la mitad del máximo de la distribución.

En la figura 43, se presentan el histograma de distribución del total de valores individuales de circularidad para todas las imágenes con las que se practicó el análisis que da lugar a la Tabla 4. Se procedió a realizar un ajuste por un componente o dos componentes Gaussianos (Figura 43 A/C y B/C, respectivamente). El resultado indica que para ambos casos (transferencia simple o continua) el ajuste a dos componentes es mejor (ver valores de  $\chi^2$  y  $R^2$  inserto en extremo superior de cada figura). Los valores de Xc para la transferencia simple muestran un componente de circularidad relativamente bajo, aproximadamente 22, y

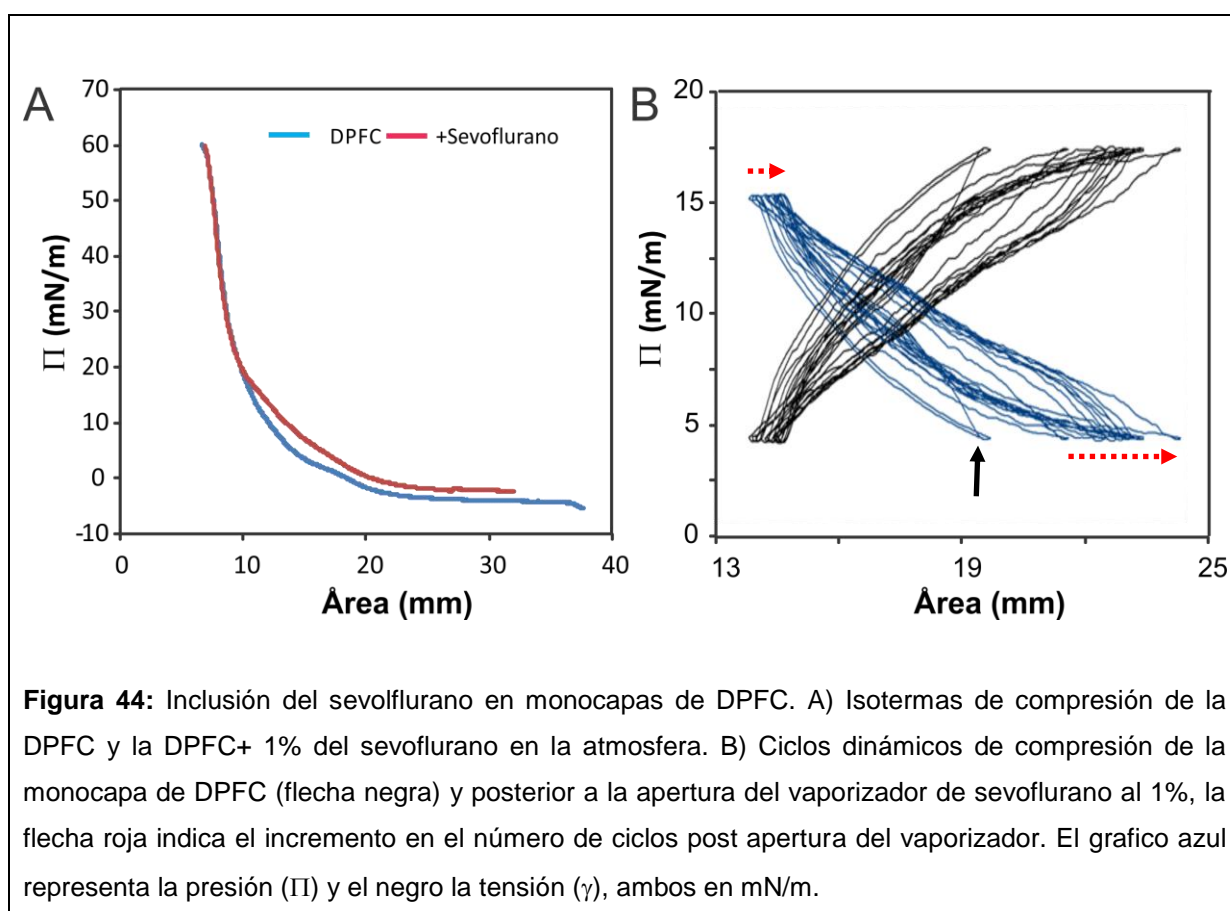


uno mayor en torno a 35. Mientras que el nuevo protocolo de transferencia muestra dos poblaciones de dominios con valores de circularidad de 30 y 50.



### 4.3 Efectos del sevoflurano sobre las monocapas

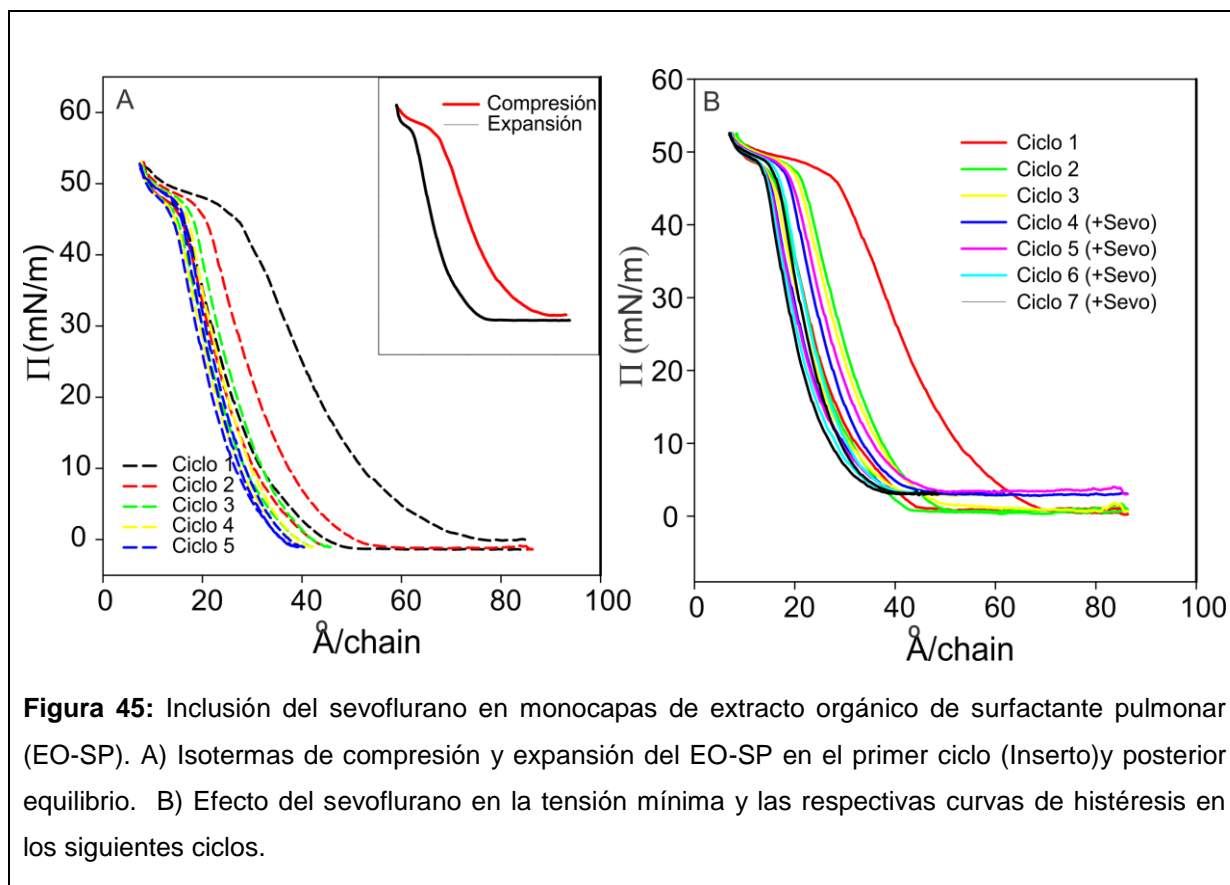
Primeramente evaluamos la incorporación del anestésico (sevoflurano) en monocapas preformadas de DPFC y EO-SP, siguiendo los cambios en la respuesta tensoactiva. En la Figura 44A puede observarse el efecto del sevoflurano sobre la transición de fases de la DPFC, el anestésico inhibe completamente la transición Le – Lc. En la Figura 44B puede verse los ciclos dinámicos en la región de la transición Le – Lc de la DPFC, la incorporación del anestésico se evidencia como un incremento en el área molecular necesaria para alcanzar las tensiones máximas y mínimas que de definieron en este estudio.



**Figura 44:** Inclusión del sevoflurano en monocapas de DPFC. A) Isothermas de compresión de la DPFC y la DPFC+ 1% del sevoflurano en la atmosfera. B) Ciclos dinámicos de compresión de la monocapa de DPFC (flecha negra) y posterior a la apertura del vaporizador de sevoflurano al 1%, la flecha roja indica el incremento en el número de ciclos post apertura del vaporizador. El grafico azul representa la presión ( $\Pi$ ) y el negro la tensión ( $\gamma$ ), ambos en mN/m.

Se realizó el mismo procedimiento para el EO-SP y los resultados pueden verse en

la figura 45. El EO-SP presenta una histéresis en el primer ciclo que posteriormente se reduce en los ciclos siguientes. Cuando se incorpora el anestésico se produce un incremento en el valor mínimo de tensión, sin evidenciarse un cambio significativo en el área molecular.



#### 4.4 Transferencia de monocapas tratadas previamente con Anestésicos

Siguiendo el protocolo antes descrito hemos incorporado el anestésico a las monocapas de DPFC y EO-SP, y posteriormente practicado la transferencia al soporte. Dentro de las variables practicadas se encuentran: velocidad en barrera y motor, transferencia simple y continua, concentración final de la sonda (utilizando como máximo hasta 1% por mol de lípidos), así como tiempo y concentración de

anestésico (1, 3, 5% y 15, 30 y 30 min). En todos los casos no hemos sido capaces de visualizar en el microscopio la presencia de dominios a tensiones por debajo, durante y posterior a la transición. Los motivos por los cuales no ha sido posible transferir y/o visualizar la coexistencia de fases en las monocapas se discutirán en la próxima sección.

## Discusión

El método de balanza de Langmuir-Blodgett ha sido ampliamente utilizado para entender el papel y la organización de membranas biológicas (Vollhardt-2002). Las isothermas permiten estudiar la respuesta tensoactiva del surfactante pulmonar y de membranas modelos como la DPFC frente a la compresión, esta compresión se genera por la disminución del área de la interfase por un sistema de barreras. La puesta a punto de nuestro método consistió en determinar la velocidad de barrera que nos permitiera obtener isothermas de compresión capaces de reproducir valores previamente reportados en la bibliografía. Hemos podido determinar que la velocidad más adecuada para los estudios de la respuesta tensoactiva del EO-SP y la DPFC fue 140 mm/min, los resultados para DPFC (Figura 30) muestran una tensión de transición de 7.5 mN/m y una tensión máxima de 65 mN/m (ver Tabla 1). Los resultados están de acuerdo con los valores antes descritos en la bibliografía (Kim-2011). Con este protocolo ha sido posible identificar las distintas fases que adopta la DPFC durante la compresión gas, Le, Le/Lc, Lc y Tc, lo cual es claro en la Figura 31. Utilizando el mismo protocolo que para la DPFC el EO-SP mostró una respuesta tensoactiva similar a los descritos en la bibliografía (de la Serna-2013), obteniendo una tensión de transición de 46.2 mN/m y alcanzando una tensión máxima de 65.4 mN/m, ver Figura 32 y Tabla 2. La Balanza demostró ser suficientemente estable para reproducir los comportamientos tensoactivos descritos anteriormente por otros autores y nos permite validar la metodología para plantearnos nuevos desafíos con el instrumento.

Seguidamente nos planteamos la optimización de la transferencia de monocapas sobre una superficie sólida y al cargar nuestras membranas con una sonda

fluorescentes con afinidad fisicoquímica por lo arreglos de membrana particulares, estudiar la organización supramolecular de las mismas. Esto es posible por la combinación de la herramienta de Langmuir con la transferencia de Blodgett y posterior análisis por microscopia de fluorescencia. Pero resulta imprescindible antes de plantearse desafíos complejos como el efecto de los anestésicos, la optimización de las condiciones del método para obtener los mejores resultados.

En el sistema que poseemos en el laboratorio (Langmuir-Blodgett MicroTrough-XL, Kibron), los factores a tener en cuenta durante la transferencia son la velocidad de barrera para llegar a la presión deseada y la velocidad de motor a la cual es extraída la monocapa. Existen otros sistemas que poseen un sistema de control por retroalimentación entre los motores de barrera, vidrio y la respuesta tensoactiva que permiten corregir con exactitud la deriva que se produce al alcanzar la tensión deseada y disminuir la oscilación de las barreras, lo cual aumenta la heterogeneidad de los dominios. Particularmente nuestro sistema no posee estas características así que nos propusimos evaluar la mejor combinación de velocidad en los motores. La Figura 33, 34 y 35 muestran las isothermas representativas de la compresión inicial y la transferencia al vidrio. En todos los casos es posible ver en el trazo verde como durante la transferencia la presión se mantiene constante, pero el área disminuye. Esto se debe a la respuesta del motor de las barreras por la pérdida de material tensoactivo que se transfiere al vidrio. La inspección visual de los dominios (Figura 36) muestra inmediatamente que la velocidad de barrera y motor de vidrio son muy relevante para obtener un resultado reproducible y comparable con la bibliografía. Basándonos solamente en los aspectos cualitativos de las formas de los dominios podemos decir que las formas más similares a los descritos por Kim (ver Figura 17),

son los asociados a la transferencia de 10/8 y 10/10 (representando velocidad de barrera y motor de vidrio, respectivamente) (Kim-2001).

Como evaluación cuantitativa nos propusimos usar la bondad del valor de la circularidad de un objeto como herramienta cuantitativa de las modificaciones y la performance de la transferencia. Este valor definido en la sección Materiales y Métodos ha sido previamente utilizado para estudiar los efectos de la adición de ceramidas o fosfolipasas en monocapas y demostró una gran potencia de discriminación (Hartel-2005).

Primeramente hemos analizado la discriminación del valor de circularidad sobre formas elegidas de la herramienta de dibujo del editor de texto Word, en la Figura 37 puede verse que el valor  $P^2/A$  disminuye a medida que los objetos se parece más a un círculo. Es también posible inferir que los dominios más redondos presentan una energía libre menor, asociado a la disminución de la superficie de contacto entre las dos fases inmiscibles (Lc-Le, Ld/Lo), proceso que se correlaciona directamente con la entropía del sistema.

Para el análisis del valor de circularidad entre los protocolos se planteó el estudio de los histogramas de distribución de las formas de los dominios. Esto nos permite calcular un valor centro ( $X_c$ ), y por otro lado describir la campana de distribución ( $W$ , FWHM). En principio si la transferencia fuera exitosa la distribución de formas debería de ser homogénea y por lo cual el histograma de distribución muy angosto, mientras en el caso que la transferencia fuera heterogénea, por variación de las barreras, el histograma debería de ser más ancho. Para validar esto hemos simulado una situación simple donde elegimos cuatro figuras de la herramienta de dibujo del editor de texto Word (círculos, elipses, cruz de flecha de cuatro puntas y

estrella de 5 puntas, ver Figura 38) y hemos procesado los datos utilizando el plugin “Particle Analysis” del software libre para análisis de imágenes ImageJ, el cual calcula el perímetro y área de los objetos en la imagen. Respecto a las características del procesamiento de las imágenes y las consideraciones para obtener un resultado evaluable volveremos unos párrafos posteriores. El histograma de distribución muestra cuatro poblaciones, mientras que el valor medio se encuentra cercano a 30. Resulta también simple ver como el método presenta dificultades para discriminar las diferencias entre las poblaciones de elipses, pero de todos modos pondera el número de eventos por sobre la forma. Un elemento interesante a destacar del método es que el protocolo es escala invariante, lo que quiere decir que es independiente de la magnificaciones utilizada. En la Figura 38D hemos representado las formas con diferentes colores a modo de ejemplificar lo sencillo que resulta identificar las formas luego de calcular su circularidad.

Antes de referirnos a los resultados obtenidos en el análisis de las transferencias a diferente velocidad de motor y barrera, quisiéramos reparar en algunos conceptos importantes al momento del procesamiento de las imágenes. Un elemento clave en el posterior éxito del análisis de las formas es la calidad de las imágenes, elementos como objetos fuera de foco, contacto entre múltiples objetos, definición en los bordes de los dominios, inclusión de las formas de los dominios que se encuentran en contacto con el borde de la imagen, puede ocasionar artefactos en la medida que impidan el correcto análisis. En la Figura 26 de Materiales y Métodos se hace un resumen de los pasos claves en el procesamiento de las imágenes previo a la determinación de los valores de perímetro y circularidad.

El análisis cuantitativo permite ver que pese a que los valores de  $W$  son menores



por ejemplo para las transferencias 10/1, 90/10 o 40/10, cualitativamente estos dominios no corresponden a una transición de DPFC. Sin embargo, en las transferencias 10/8 o 10/10 se puede visualizar el patrón antes descrito y el valor de  $W$  permite inferir que la segunda sería mejor (ver Tabla 3). Es posible reparar en la figura que en algunos casos el análisis es producto de una imagen y en algunas de las imágenes no fue posible realizarlo. Esto es debido a que existieron combinaciones a que pese fuimos capaces de obtener imágenes, estas por su calidad o su distribución fue imposible de analizar por el método propuesto.

Los motivos por los cuales el match entre velocidad de barrera y velocidad de motor de vidrio influyan tanto en la distribución final de dominios se encuentra asociado al diseño de nuestra balanza. Si se usan velocidades de barrera que excedan la capacidad del motor del vidrio para extraer la monocapa, el motor de las barreras comienza a oscilar para intentar mantener constante la tensión. Si por el contrario la velocidad de las barreras es demasiado lenta con respecto al motor de vidrio, no es posible alcanzar a tensión deseada cuando se está llevando adelante la transferencia.

Utilizando el protocolo antes descrito intentamos reproducir los resultados para la DPFC antes, durante y posterior de la transición Le-Lc, como puede verse en la Figura 39, los resultados son bastante heterogéneos y particularmente hay tensiones que son imposible de analizar por el método propuesto.

Dado este inconveniente nos propusimos implementar un nuevo protocolo que extraiga las monocapas de manera continua, en tres etapas definidas para antes durante y posterior a la transición. Pensamos que además de optimizar el uso del balanza, también disminuye el tiempo de los experimento (dado que pueden

hacerse tres tensiones en un experimento simple). La Figura 40D, muestra un esquema de como es el protocolo, en la Figura 40A, B y C se muestran los resultados de la transferencia pre, durante y post-transición. El análisis cualitativo permite decir que los experimentos son más reproducibles y la forma de los dominios es más homogénea y similar a lo reportado por (Kim-2004). Sin embargo los resultados cuantitativos en primera instancia no indican lo mismo (ver Tabla 4). Los resultados de los histogramas de distribución en las formas de los dominios permiten ver que las dos transferencias más allá de las diferencias en los valores absolutos de  $W$ , poseen dos distribuciones visualmente distinguibles (Figura 41 y 42). Si juntamos toda la información de los dominios de cada imagen y las agrupamos por tipo de transferencia y realizamos un nuevo histograma de distribución (ver Figura 43), es posible analizar entonces el comportamiento global de los datos. Los ajustes a una única distribución Gaussiana muestran valores elevados de  $\chi^2$  y  $R^2$ , pero si proponemos un modelo de dos poblaciones de dominios, los valores mejoran sustancialmente y es posible identificar claramente dos poblaciones para cada transferencia. Es interesante reparar en los valores obtenidos para la transferencia simple, dado que uno de los valores  $W$  es cercano a 20, este valor denota una circularidad muy baja (ver Figura 37) y eso es indicativo de dominios redondos asociado a etapas pre-transición (ver Figura 17). Mientras que el segundo valor es similar al menor de las distribuciones de la transferencia continua (cercano a 30). Como discutimos anteriormente, el análisis cuantitativo indica que la transferencia propuesta por este trabajo presenta dominios más semejantes a los encontrados en la bibliografía, sin embargo es evidente que no resulta sencillo obtener una distribución suficientemente estrecha para ajustar

nuestros datos a una función Gaussiana simple.

Esto evidentemente limita la potencia del análisis para estudiar los efectos de sustancias en la transición de fases en las monocapas, pero independientemente de ello sigue siendo un método valedero para estudiar las distribuciones de los dominios.

Pasando al estudio de los efectos del sevoflurano en la interfase de surfactante pulmonar, primeramente intentamos identificar los efectos sobre la transición Le-Lc bien estudiada de la DPFC. Previamente nuestro grupo había podido demostrar el efecto del sevoflurano en una interfase de EO-SP utilizando una surfactómetro de burbuja cautiva (Malacrida-2014). Sin embargo esta herramienta no permite la combinación con la microscopia para correlacionar los efectos tensocativos con la organización supramolecular.

La inclusión del anestésico en la atmosfera de la balanza incrementó el área de ciclado para la interfase de DPFC durante un experimento con ciclos dinámicos (Figura 44B) y la presencia del anestésico en la monocapa impide ver la transición de fase Le-Lc en la isoterma de compresión (Figura 44A). Estos dos resultados son indicativos de la incorporación del anestésico y resulta interesante discutir, que para producir un efecto el anestésico sobre la interfase es necesario que se cicle la interfase entre las fases gas y altamente condensada. Esto remeda la situación del SP en el espacio alveolar durante el ciclo respiratorio y permite pensar que el eliminar la transición pueda generar problemas en la exclusión de material tensoactivo y/o respuesta tensoactiva del material que permanece en la interfase alveolar.

Para el EO-SP los resultados son un poco más confusos y no fue posible ver un incremento en el área molecular de la interfase que se pueda asociar con la presencia de las moléculas de anestésico. Sin embargo, el anestésico produjo un incremento en la presión de inicio, lo cual indica que no es posible alcanzar la fase gas. Esto podría ser indicativo de la presencia del anestésico en la interfase pero no es del todo concluyente.

Desafortunadamente no fue posible lograr la transferencia y/o imagen de monocapas con anestésico, los motivos son discutible, pero podríamos argumentar que evidentemente la situación con anestésico complejiza el sistema y es probable que tanto la transferencia así como el reparto de nuestro marcador por las fases pueda verse modificado con la presencia del anestésico.

## Conclusiones y perspectivas

Como conclusiones generales podemos decir que en la presente tesis hemos sido capaces de reproducir en parte los comportamientos tensoactivos de la DPFC y el EO-SP y correlacionar en parte estos con la organización supramolecular de las monocapas. Este proceso conllevó la puesta a punto y aprendizaje de diversas herramientas en el campo de la fisicoquímica de membranas, algunas completamente nuevas para nuestro país. Algunos de los desafíos más importantes creemos han sido vencer las limitaciones del sistema que nuestro grupo ha adquirido para los estudios tensoactivos, dado que el instrumento ha mostrado inestabilidades mecánicas que puede colaborar en la dispersión de los resultados. De todas maneras la tesis ha aportado a la disciplina proponiendo un nuevo método de transferencia que sería interesante poder ser testado con otros instrumentos para comparar la performance en el utilizado en esta tesis. Por último, este trabajo ha realizado por primera vez un análisis cuantitativo y estadístico de las distribuciones de formas en los dominios de DPFC, que pensamos necesitaría ser completado para estudiar de manera completa la distribución de formas en cada paso de la transición de sistemas simple hasta complejos.

Como perspectivas futuras, este trabajo permite definir con claridad las posibilidades y limitaciones de este instrumento para el análisis de monocapas de SP en diversas patologías pulmonares, lo cual es de suma importancia para nuestro grupo. Además, pensamos que con la experiencia adquirida durante la presente tesis podremos en el futuro continuar con los objetivos planteados al inicio de la tesis y extenderlos aún más al combinar esta herramienta con otras como el uso de

vesículas gigantes unilamelares y microscopia confocal de fluorescencia.

## Bibliografía

- Agassandian M, M. R. K. Surfactant phospholipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 612–625(2013).
- Amrein M., von Nahmen A. and Sieber M. 1997. "A scanning force- and fluorescence light microscopy study of the structure and function of a model pulmonary surfactant." *Eur Biophys J* 26:349-357.
- Andreeva, A. V., Kutuzov, M. A. and Voyno-Yasenetskaya, T. A. (2007). "Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293(2):L259-71.
- 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.
- Arias-Diaz J, Garcia-Verdugo I, Casals C, Sanchez-Rico N, Vara E, Balibrea JL. Effect of surfactant protein A (SP-A) on the production of cytokines by human pulmonary macrophages. *Shock*. 2000 Sep; 14(3):300-6.
- 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.
- Avery, M. E. and Mead, J. (1959). "Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease." *AMA J Dis Child* 97(5 Part 1): 517-23.
- Bachofen H., Gerber U., Gehr P., Amrein M. and Schürch S. 2005. "Structures of pulmonary surfactant films adsorbed to an air-liquid interface in vitro." *Biochim Biophys Acta* 1720:59-72.
- Bagatolli, L. Mouritsen, O. Vida ¿una cuestión de grasas? Una perspectiva desde la biofísica de membranas. Ecuador: Yachay; 2014.
- Batenburg J.J. (1995). Biosynthesis, secretion, and recycling of surfactant components. en *Surfactant Therapy for Lung Disease*, ed. Robertson, 11W. 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. Baumgart, F., Ospina, O. L., Mingarro, I., Rodríguez-Crespo, I. &

Pérez-Gil, J. Palmitoylation of pulmonary surfactant protein SP-C is critical for its functional cooperation with SP-B to sustain compression/expansion dynamics in cholesterol-containing surfactant films. *Biophys. J.* 99, 3234–43 (2010).

- Beers, M. F. & Mulugeta, S. Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 663–96 (2005).
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37(8): 911-7
- Boggaram, V., Smith, M. E. and Mendelson, C. R. (1991). "Posttranscriptional regulation of surfactant protein-A messenger RNA in human fetal lung in vitro by glucocorticoids." *Mol Endocrinol* 5(3): 414-23.
- Brasch, F., Johnen, G., Winn-Brasch, A., Guttentag, S. H., Schmiedl, A., Kapp, N., Suzuki, Y., Muller, K. M., Richter, J., Hawgood, S. and Ochs, M. (2004). "Surfactant protein B in type II pneumocytes and intra-alveolar surfactant forms of human lungs." *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(4): 449-58.
- Campagna JA, Miller KW, Forman SA. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* 2003 May 22;348(21):2110-24.
- Cantor RS. The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry.* 1997 Mar 4;36(9):2339-44.
- 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.
- Casals C, Cañadas O. Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Nov; 1818(11):2550-62.
- Celli BR, Rodriguez KS, Snider GL. A controlled trial of intermittent positive pressure breathing, incentive spirometry, and deep breathing exercises in preventing pulmonary complications after abdominal surgery. *Am Rev Respir Dis* 1984 Jul;130(1):12-5.



- Cerrada A, Haller T, Cruz A, Pérez-Gil J. (2015) Pneumocytes Assemble Lung Surfactant as Highly Packed/Dehydrated States with Optimal Surface Activity.
- Biophys J. 109(11):2295-306.
- 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
- Chiou, J.S., Ueda, I., 1994. Ethanol unfolds firefly luciferase while competitive inhibitors antagonize unfolding: DSC and FTIR analyses. J. Pharm. Biomed. Analys. 12, 969–975.
- Cita web 1: Scordato, A. Stanley, S. Fluorescence Filter Combinations [Internet], New York, Bioscience Department, Nikon Instruments, Inc. Disponible desde: <<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/green/tritchyq/tritchqindex.html>> [29 de enero, 2016].
- Cita web 2: Wikimedia. Gaussian blur [Internet], Wikimedia Foundation, Inc. Disponible desde: <[https://en.wikipedia.org/wiki/Gaussian\\_blur](https://en.wikipedia.org/wiki/Gaussian_blur)> [29 de enero, 2016].
- Clark, J. C., Wert, S. E., Bachurski, C. J., Stahlman, M. T., Stripp, B. R., Weaver, T. E. and Whitsett, J. A. (1995). "Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice." Proc Natl Acad Sci U S A 92(17): 7794-8.
- Clements J.A., Brown E.S. and Johnson R. P. 1958. "Pulmonary surface tension and the mucus lining of the lungs: some theoretical considerations." J Appl Physiol 12:262-268.
- Correa FC, Ciminelli PB, Falcão H, Alcântara BJ, Contador RS, Medeiros AS, Zin WA, Rocco PR. Respiratory mechanics and lung histology in normal rats anesthetized with sevoflurane. J Appl Physiol (1985). 2001 Aug;91(2):803-10
- Crouch, E., Rust, K., Veile, R., Donis-Keller, H. and Grosso, L. (1993). "Genomic organization of human surfactant protein D (SP-D). SP-D is encoded on chromosome 10q22.2-23.1." J Biol Chem 268: 2976-83.
- 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.

- Cockshutt, A. M., Weitz, J. and Possmayer, F. (1990). "Pulmonary surfactant-associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro." *Biochemistry* 29(36): 8424-9
- 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.
- Daniels, C. B. and Orgeig, S. (2003). "Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing." *News Physiol Sci* 18: 151-157.
- 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, Ejsing C.S, Bagatolli L.A. Compositional and structural characterization of monolayers and bilayers composed of native pulmonary surfactant from wild type mice. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828: 2450-2459 (2013).
- Diemel R.V., Snel M.M., Waring A.J., Walther F.J., van Golde L.M., Putz G., Haagsman H.P. and Batenburg J.J. 2002. "Multilayer formation upon compression of surfactant monolayers depends on protein concentration as well as lipid composition. An atomic force microscopy study." *J Biol Chem* 277:21179-21188.
- 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
- Dietl, P. and Haller, T. (2004). "Exocytosis of Lung Surfactant: From the

Secretory Vesicle to the Air-Liquid Interface." *Annu Rev Physiol*.

- Duggan M, Kavanagh BP. Pulmonary atelectasis: a pathogenic perioperative entity. *Anesthesiology* 2005 Apr;102(4):838-54.
- Eckenhoff RG. Promiscuous ligands and attractive cavities: how do the inhaled anesthetics work. *Mol Interv* 2001 Dec;1(5):258-68.
- Eckenhoff RG, Johansson JS, Wei H, Carnini A, Kang B, Wei W, et al. Inhaled anesthetic enhancement of amyloid-beta oligomerization and cytotoxicity. *Anesthesiology* 2004 Sep;101(3):703-9.
- Eeman M, D. M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 14, 719–736 (2010).
- Enhorning G, Pototschnik R, Possmayer F, Burgoyne R. Pulmonary surfactant films affected by solvent vapors. *Anesth Analg.* 1986 Dec;65(12):1275-80
- Fehrenbach, H. (2001). "Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited." *Respir Res* 2(1): 33-46
- 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.
- Frick, M., Bertocchi, C., Jennings, P., Haller, T., Mair, N., Singer, W., Pfaller, W., Ritsch-Marte, M. and Dietl, P. (2004). "Ca<sup>2+</sup> 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.
- Garcia-Verdugo, I., Ravasio, A., de Paco, E. G., Synguelakis, M., Ivanova, N., Kanellopoulos, J. and Haller, T. (2008). "Long-term exposure to LPS enhances the rate of stimulated exocytosis and surfactant secretion in alveolar type II cells and upregulates P2Y<sub>2</sub>.
- 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.
- Gómez-Gil L., Schürch D., Goormaghtigh E. and Pérez-Gil J. 2009. "Pulmonary surfactant protein SP-C counteracts the deleterious effects of cholesterol on the activity of surfactant films under physiologically relevant compression-expansion dynamics." *Biophys J* 97:2736-45
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- Hallman, M., Glumoff, V. and Ramet, M. (2001). "Surfactant in respiratory distress syndrome and lung injury." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129(1): 287-94.
- Härtel, S. Fanani, ML. Maggio, B. Shape transitions and lattice structuring of ceramide-enriched domains generated by sphingomyelinase in lipid monolayers. *Biophys J*. 2005 Jan; 88(1):287-304. Epub 2004 Oct 15.
- Hawgood, S. (1997). *Surfactant: composition, structure and metabolism*. Philadelphia, W.J. Crystal RG, Weibel ER, Barnes PJ. Lippincott-Raven. Publishers.

- 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.
- Heimburg T, Jackson AD. The thermodynamics of general anesthesia. *Biophys J.* 2007 May 1;92(9):3159-65.
- 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.
- Jimenez-Cabré E. Tesis Doctoral "Determinantes y efectos de la integración de la proteína SPB del surfactante pulmonar en membranas lipídicas". Madrid 2009.
- Johnson, M. D., Bao, H. F., Helms, M. N., Chen, X. J., Tigue, Z., Jain, L., Dobbs, L. G. and Eaton, D. C. (2006). "Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport." *Proc Natl Acad Sci US A* 103(13): 4964-9.
- Kaganer, V. M.; Möhwald, H.; Dutta, P. (1999) Structure and phase transitions in Langmuir monolayers, *Reviews of Modern Physics* 71, 779-779.
- Kim, K. Choi, S. Zasadzinski, J. Squires, T. Interfacial microrheology of DPPC monolayers at the air–water interface. *Soft Matter*, 2011(7) 7782.
- Kroenke K, Lawrence VA, Theroux JF, Tuley MR, Hilsenbeck S. Postoperative complications after thoracic and major abdominal surgery in patients with and without obstructive lung disease. *Chest* 1993 Nov;104(5):1445-51.
- Magnusson L, Spahn DR. New concepts of atelectasis during general anaesthesia. *Br J Anaesth* 2003 Jul;91(1):61-72.
- 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. Tesis doctoral "Surfactante Pulmonar durante la Lesión

Pulmonar Aguda: desde la fisiopatología a los aspectos biofísicos de su disfunción”. Montevideo 2014.

- Malacrida L, et al. Sevoflurane anesthesia deteriorates pulmonary surfactant promoting alveolar collapse in male Sprague Dawley rats. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* (2014).
- Massaro, G. D. and Massaro, D. (1983). "Morphologic evidence that large inflations of the lung stimulate secretion of surfactant." *Am Rev Respir Dis* 127(2): 235-6.
- Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol.* 2011 Feb 28; 6:147-63.
- Meyer, K. C. and Zimmerman, J. J. (2002). "Inflammation and surfactant." *Paediatric Respiratory Reviews* 3: 308-314.
- 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.
- Moller JT, Johannessen NW, Berg H, Espersen K, Larsen LE. Hypoxaemia during anaesthesia--an observer study. *Br J Anaesth* 1991 Apr;66(4):437- 44.
- Molliex S, Crestani B, Dureuil B, Bastin J, Rolland C, Aubier M, et al. Effects of halothane on surfactant biosynthesis by rat alveolar type II cells in primary culture. *Anesthesiology* 1994 Sep;81(3):668-76
- Nag, K., J. G. Munro, S. A. Hearn, J. Rasmusson, N. O. Petersen y F. Possmayer (1999). "Correlated atomic force and transmission electron microscopy of nanotubular structures in pulmonary surfactant." *J Struct Biol* 126(1): 1-15
- 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.

- 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.
- Panda, A. K., K. Nag, R. R. Harbottle, K. Rodriguez-Capote, R. A. Veldhuizen, N. O. Petersen y F. Possmayer (2004). "Effect of acute lung injury on structure and function of pulmonary surfactant films." *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(5): 641-50
- Pedersen T, Viby-Mogensen J, Ringsted C. Anaesthetic practice and postoperative pulmonary complications. *Acta Anaesthesiol Scand* 1992 Nov;36(8):812-8.
- Perez-Gil, J. and Keough, K. M. (1998). "Interfacial properties of surfactant proteins." *Biochim Biophys Acta* 1408(2-3): 203-17.
- 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.
- 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.
- Possmayer, F. (1988). "A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins." *Am Rev Respir Dis* 138(4): 990-8.
- Possmayer, F., Nag, K., Rodriguez, K., Qanbar, R. & Schurch, S. Surface activity in vitro: role of surfactant proteins. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129, 209–220 (2001).
- Poulain, F. R., Allen, L., Williams, M. C., Hamilton, R. L. and Hawgood, S. (1992). "Effects of surfactant apolipoproteins on liposome structure: implications for tubular myelin formation." *Am J Physiol* 262(6 Pt 1): L730-9
- Putman, E., L. A. Creuwels, L. M. van Golde y H. P. Haagsman (1996). "Surface properties, morphology and protein composition of pulmonary surfactant subtypes." *Biochem J* 320 ( Pt 2): 599-605.



- Reta GS, Riva JA, Briva A, Castromán P, Baz M, Piriz H, et al. Efecto del isoflorano sobre la mecánica ventilatoria en ratas ventiladas artificialmente. *Anesteisa, Analgesia, Reanimación* 1998;14(1):25-33.
- Reta GS, Riva JA, Piriz H, Medeiros AS, Rocco PR, Zin WA. Effects of halothane on respiratory mechanics and lung histopathology in normal rats. *Br J Anaesth* 2000 Mar;84(3):372-7.
- Rogan, M. P., Geraghty, P., Green, C. M., O'Neill, S. J., Taggart, C. C. and McElvaney, N. G.(2006). "Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence." *Respiratory Research* 7(29): 1-11.
- Rooney, S. A. (2001). "Regulation of surfactant secretion." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129(1): 233-43.
- 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.
- Schürch S., Goerke J. and Clements J.A. (1978). Direct determination of volume- and time dependence of alveolar surface tension in excised lungs. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:3417-3421.
- Schürch, S., Gehr, P., Im Huí y., Geisor, M., Groen E. (1990). Surfactant displaces particles towards the epithelium in arways and alveoli. *Respir. Physiol.* 80: 17-32.
- 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.
- Serrano, A. G. & Pérez-Gil, J. Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system. *Chem. Phys. Lipids* 141, 105–18 (2006).
- 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
- Somaschini, M., Noguee, L. M., Sassi, I., Danhaive, O., Presi, S., Boldrini, R., Montrasio, C., Ferrari, M., Wert, S. E. and Carrera, P. (2007). "Unexplained neonatal respiratory distress due to congenital surfactant deficiency." *J Pediatr* 150(6): 649-53, 653 e1



- Soto, J., Lopez, A., Baz, M., Hurtado, J. Insuficiencia Respiratoria. En Boggia, J., Bianchi, S., Noboa, O., Gadola, L., Briva, A., Hurtado, J., Grignola, J., Rodriguez, M.(ed), Fisiopatología: Mecanismo De Las Disfunciones Fisiológicas. 2<sup>ed</sup>.Montevideo: Oficina del libro FEFMUR; 2011.p 11-50.
- 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.
- Stoelting MD. Inhaled Anesthetics. In: Johannessen NW, editor. *Pharmacology and Physiology in Anesthetics Practice*. 3 ed. Philadelphia-New York: Lippincott -Raven; 1999. p. 36-76.
- Taeusch, H. W., J. Bernardino de la Serna, J. Perez-Gil, C. Alonso y J. A. Zasadzinski (2005). "Inactivation of pulmonary surfactant due to serum-inhibited adsorption and reversal by hydrophilic polymers: experimental." *Biophys J* 89(3): 1769-79
- Trudell JR. A unitary theory of anesthesia based on lateral phase separations in nerve membranes. *Anesthesiology*. 1977 Jan;46(1):5-10
- Tsai, Y.S., Ma, S.M., Kamaya, H., Ueda, I., 1987. Fourier transform infrared studies on phospholipid hydration: Phosphate-oriented hydrogen bonding and its attenuation by volatile anesthetics. *Mol. Pharmacol.* 31, 623–630.
- Ueda I, Yoshida T. Hydration of lipid membranes and the action mechanisms of anesthetics and alcohols. *Chem Phys Lipids*. 1999 Aug;101(1):65-79.
- Ulman, A. (1991) *An introduction to Ultrathin Organic Films: from Langmuir-Blodgett to SelfAssembly*, Academic Press Inc., San Diego.
- Van Golde, L. M. G. and Casals, C. (1997). *Metabolism of lipids in the lung*. Philadelphia, R.G. Crystal, West, J.B., Barnes, P.J., Weibel, E.R. LippincottRaven, Publishers.
- 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. andmHaagsman, 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.

- Verbrugge SJ, Vazquez de AG, Gommers D, Neggers SJ, Sorm V, Bohm SH, et al. Exogenous surfactant preserves lung function and reduces alveolar Evans blue dye influx in a rat model of ventilation-induced lung injury. *Anesthesiology* 1998 Aug;89(2):46774
- Voorhout W.F., Veenendaal T., Haagsman H.P., Verkleij A. J., van Golde L.M. and Geuze H.J. 1991. "Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice." *J Histochem Cytochem* 39:1331-1336.
- 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. E. Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochim. Biophys. Acta.* 1408, 173–179 (1998).
- Weaver, T. E. and Conkright, J. J. (2001). "Function of surfactant proteins B and C." *Annu Rev Physiol* 63: 555-78.
- 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.
- Yokono, S., Shieh, D.D., Ueda, I., 1981. Interfacial preference of anesthetic action upon the phase transition of phospholipid bilayers and partition equilibrium of inhalation anesthetics between membrane and deuterium oxide. *Biochim. Biophys. Acta* 645, 237–242.
- Yoshida, T., Okabayashi, H., Takahashi, K., Ueda, I., 1984. A proton nuclear magnetic resonance study on the release of bound water by inhalation anesthetic in water-in-oil emulsion. *Biochim. Biophys. Acta* 772, 102–107.
- Zimmermann, L. J., Janssen, D. J., Tibboel, D., Hamvas, A. and Carnielli, V. P. (2005). "Surfactant metabolism in the neonate." *Biol Neonate* 87(4): 296-307.
- 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.