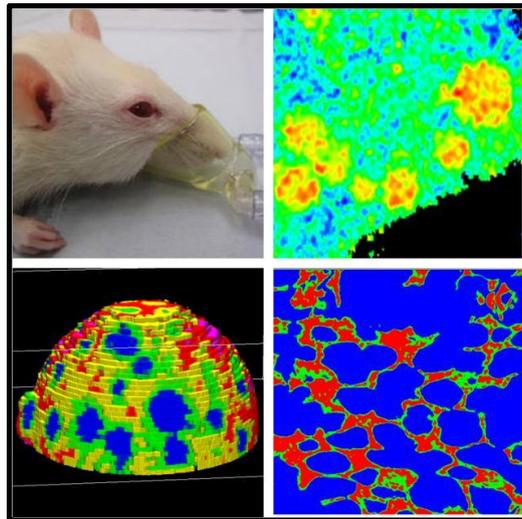


**Universidad de la República
Hospital de Clínicas-Facultad de Medicina
Departamento de Fisiopatología**

Tesis Doctoral PEDECIBA - Biología



**Surfactante Pulmonar durante la Lesión Pulmonar Aguda: desde
la fisiopatología a los aspectos biofísicos de su disfunción**

Leonel Malacrida

Directores: Dres. Ana Denicola y Arturo Briva

Montevideo, 2014

Tabla de contenido

Resumen	4
Agradecimientos	5
Introducción	8
Motivación	52
Objetivos:	53
Materiales y Métodos	54
Resultados:	68
Sección Resultados	69
Capítulo 1: Fasores espectrales y en el tiempo de vida para el estudio de la emisión de LAURDAN en membranas: desde la cubeta al microscopio.	69
Resultados	88
Gráficos de Fasores (phasorplots, PP) para el estudio del tiempo de vida de LAURDAN y PRODAN en membranas modelo	88
Efecto del Colesterol y la temperatura sobre membranas con fase gel (DPPC), fluida (DOPC) y coexistencia gel/fluida (DOPC/DPPC; 1:1) a través de gráfico de fasores (PP) en cubeta	94
Fasores espectrales (spectral phasor, SP) para el estudio de la emisión de LAURDAN y PRODAN en membranas modelo.	100
Efecto del Colesterol y la temperatura sobre membranas con fase gel (DPPC), fluida (DOPC) y coexistencia gel/fluida (DOPC/DPPC; 1:1) por SP en cubeta.	100
Estudio de la coexistencia de fases en vesículas gigantes unilamelares (GUVs) con mezclas binarias/ternarias por SP en microscopia confocal de 2-fotones.	104
Discusión:	114
Capítulo 2: Efectos del Sevoflurano sobre el pulmón in vivo, ex vivo e in vitro.	125
Efecto del sevoflurano sobre la función pulmonar y el metabolismo del surfactante pulmonar.	125
Resultados	130
Discusión:	139
Capítulo 3: Efecto del sevoflurano sobre la funcionalidad y estructura del surfactante pulmonar	144
Resultados:	147

Estudios tensoactivos del surfactante pulmonar expuesto al sevoflurano: experimentos en surfactómetro de burbuja cautiva y balanza de Wilhelmy.	147
Estudios estructurales y termodinámicos del surfactante pulmonar expuesto al sevoflurano: una aproximación espectroscópica y por calorimetría diferencial de barrido (DSC).	152
<i>Discusión:</i>	159
<i>Capítulo 4: Efectos celulares y supramoleculares del sevoflurano sobre el surfactante pulmonar: estudio en células A549 y vesículas gigantes unilamelares.</i>	<i>165</i>
<i>Resultados</i>	<i>168</i>
Efecto del sevoflurano sobre los cuerpos lamelares de células A549: abordaje con fasores espectrales	168
Efecto del sevoflurano sobre las características supramoleculares y dinámicas del surfactante pulmonar: microscopía confocal de fluorescencia.	177
<i>Discusión</i>	<i>183</i>
<i>Conclusiones y Perspectivas</i>	<i>187</i>
<i>Bibliografía</i>	<i>192</i>
<i>Anexos</i>	<i>211</i>

Resumen

El surfactante pulmonar es un componente clave en la función del pulmón. Elementos que puedan afectar su composición o actividad, sin dudas tendrán un efecto sobre la función pulmonar. A partir de su particular composición lipoproteica, el surfactante pulmonar es capaz de disminuir la tensión superficial al final de la espiración, evitando el colapso alveolar en cada ciclo respiratorio. La anestesia inhalatoria es una herramienta de uso médico primaria en la cirugía, sin embargo, la relación entre las hipoxemias mantenidas en el pos-operatorio inmediato y la función pulmonar por el uso de anestésicos inhalatorios, no está completamente comprendida. Cuando un paciente recibe una anestesia inhalatoria, su sistema pulmonar es la primer barrera a los anestésicos y la estructura corporal con mayor concentración del anestésico. La disminución o incapacidad funcional del surfactante pulmonar por la anestesia inhalatoria esta sugerida en la literatura, pero no existe evidencia certera de su relación. En esta tesis nos planteamos un abordaje traslacional que estudia los efectos del sevoflurano desde la fisiopatología pulmonar a los aspectos moleculares de la anestesia en membranas. Nuestros resultados nos permiten relacionar a la disfunción del surfactante pulmonar como elemento clave en el proceso de colapso alveolar y alteración del intercambio gaseoso que los pacientes sufren durante la anestesia. Este mecanismo se relaciona con afectación del orden lateral de las membranas de surfactante pulmonar por la inclusión de los anestésicos, afectando el estado de hidratación y modificando la dinámica de las mismas. Esto se correlaciona con una incapacidad tensoactiva para disminuir la tensión al final de la espiración, que con lleva a inestabilidad alveolar y colapso. Los resultados de la presente tesis son concluyentes y permiten hacer un análisis traslacional entre los aspectos biofísicos y la función pulmonar.

Agradecimientos

Quisiera empezar agradeciendo a mis tutores, los Dres. Ana Denicola y Arturo Briva, ambos personas de una grandísima generosidad para enseñar, para motivar y por sobre todas las cosas para apoyar a un estudiante en todas las etapas por las que debe atravesar durante un posgrado académico en el Uruguay. Con ambos hemos pasado la barrera profesional y son compañeros de la vida que siempre llevaré conmigo.

Luego me gustaría poder agradecer a mi Departamento de Fisiopatología, en el nombre del Profesor Javier Hurtado a todos los compañeros que durante estos últimos diez años hemos compartido grandes momentos y me han permitido desarrollar académica y humanamente. En particular quisiera hacer algunas menciones por personas que se encuentran en el íntimo grupo de trabajo. En primer lugar al Prof. Hector Píriz, quien me dio la posibilidad de graduarme y me puso por delante el tema del surfactante pulmonar y los anestésicos inhalatorios. El “profe” es una fuente de motivación constante y sin lugar a dudas esta tesis es en gran parte un homenaje a su generosidad. Luego quisiera agradecer al Área de Investigación Respiratoria (AIR), que se conformase con el regreso del Dr. Briva al Uruguay y que ha sabido nuclear a un grupo humano y científico muy importante. En particular a Rosina Toledo que se sumo en la última etapa de mi doctorado, pero ha colaborado intensamente en muchos de los experimentos que aquí se presentan.

Por suerte la lista de agradecimientos es extensa, así que a continuación intentare saludar a todos los que han compartido experimentos y experiencia durante esta tesis.

Empiezo saludando a los compañeros de la Universidad Complutense de Madrid, España. Quienes me recibieron de puertas abiertas y brindaron todo su entusiasmo y experiencia en la comprensión de mi problema. La Prof. Cristina Casals y la Dra. Olga Cañadas, merecen sin dudas una destacada mención dado el apoyo que he tenido de ellas durante mi pasantía y luego de ella. Ambas personas de una gran calidez humana que hacen grato el trabajo cuando uno está lejos de casa. También necesito agradecer enfáticamente a la generosidad del Prof. Jesús Pérez-Gil por abrirme las puertas de su laboratorio de par en par y siempre escuchar, analizar y discutir mis experimentos con muchísima disposición. Dentro del grupo de Jesús quisiera destacar la colaboración de dos destacadas investigadoras que han colaborado intensamente en mi trabajo y sin ellas también hubiera sido difícil la concreción de estos resultados, las Dras. Elena López-Rodríguez y Mercedes Echadie. Anhele que este final solamente sea el comienzo de una nueva etapa de colaboraciones con estos colaboradores que siempre estimare.

Luego me gustaría poder destacar la colaboración brindada por el Prof. Luis Bagatolli, sin lugar a dudas Luis cambio las perspectivas de esta tesis tras conocerlo en 2011 durante un meeting de la Sociedad Americana de Biofísica (aún recuerdo vívidamente la sensación que sentí, tras subir las escaleras del Convention Center de Baltimore y al levantar la cabeza a la primera persona que me cruzo y reconozco su cara, era Bagatolli!). Luis ha sido y seguirá siendo un asesor y colaborador de altísimo nivel para nosotros (los que lo consideramos una especie de gurú de las membranas), su bonhomía, generosidad, su don de gente y sin lugar a dudas su nivel académico nos hace sentir orgullosos de poder contar con su colaboración durante estos años y construir una amistad pese a la lejanía.

El Prof. David Jameson, también merece una destacada mención, desde que nos conocimos en Buenos Aires (2011) ha mostrado una generosidad y calidad humana que merecen ser destacadas. Durante mi pasantía por su laboratorio (Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Hawaii en Manoa) hemos podido desarrollar una

amistad que trasciende las fronteras de la ciencia, Dave me ha dado la oportunidad de conocer e intercambiar experiencias con destacadísimos investigadores de todas las ramas de la ciencia, mostrando una generosidad sin igual. A nivel académico sin lugar a dudas Dave es un grande de la Fluorescencia y es completamente innecesaria cualquier consideración que yo pudiera hacer. Seguramente y como a Dave le gusta decir anhelo que nuestra amistad tenga un largo y fluorescente tiempo de vida.

Quisiera destacar nuestra colaboración con el destacado Prof. Enrico Gratton, quien puso en mi camino a los fasores y ha permitido el desarrollo de estas tecnologías para membranas. Enrico es siempre una fuente de inspiración y motivación para todos los que lo conocen. Si algo define a Enrico es su premisa de cabecera. “si uno lo puede pensa, entonces se puede hacer”, eso se aplica en todo momento en el LFD y todos los compañeros contribuyen a esto.

Para finalizar con los agradecimientos internacionales, quisiera destacar la colaboración con el Prof. Steffen Hartel de Universidad de Santiago de Chile, quien me permitiese hacer una pasantía por su laboratorio y aprender el análisis cuantitativo de las fases de membrana con sus aplicaciones en el software IDL. Steffen es una excelente persona de gran humildad y generosidad, por lo cual espero poder continuar con nuestras experiencias comunes sobre dominios y análisis de imágenes.

En el plano local necesito poder destacar tres o cuatro colaboraciones trascendentales en el Institut Pasteur de Montevideo para la tesis. Primero, quiero empezar dando gracias al Dr. Horacio Botti, con quien empezamos haciendo los primeros experimentos con PRODAN y luego de re-analizar todos los experimentos originales de Gregorio Weber, y de proponer nuevas maneras de análisis para los datos de fluorescencia, hemos construido una amistad de gran respeto y gratitud por la dedicación brindada. Creo que el grafico 3.8 debería de llevar el nombre “Plot Botti-Malacrida”, dado que es una de las tantas sugerencias de Horacio y que el tiempo me permito re-interpretar en el contexto del Lateral Pressure Profile.

Para seguir necesito destacar la colaboración brindada por toda la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica, que en el nombre de los Dres. Cerveñansky, Duran y Batthyanny intento resumir. Pero particularmente el Dr. Batthyanny merece un espacio a parte, Carlos me ha dado la posibilidad de desarrollarme con total libertad dentro de la unidad y ha sido apoyo científico, moral y humano, que en algunos momentos de esta tesis fueron necesarios. Carlos espero que la vida nos siga poniendo lipoproteínas en el camino (y sino las buscaremos) para poder continuar nuestra amistad y fraterna colaboración.

El Dr. Pablo Aguilar fue fundamental para el desarrollo de la microscopia de GUV en el país, básicamente he aprendido todo la experiencia por su unidad y todos los compañeros han sido muy amables y generosos para ayudar en la diferentes etapas de frustración que este trabajo llevo. Particularmente quiero además destacar la ayuda brindada por la Lic. Agustina Olivera, con la cual hemos compartido muchísimas horas de discusión.

Para finalizar no me gustaría olvidarme de la importante colaboración del Lic. Gonzalo Obal y el Dr. Otto Pritsch, que abrieron la puertas de su laboratorio de par en par y siempre estuvieron cerca para las consultas que fueran necesarias.

Quisiera agradecer a un grupo de personas que han colaborado en diferentes etapas de la tesis, la MSc. Magdalena San Román, la MSc. Soledad Astrada, al Dr. Martín Angulo, al Dr. Juan Carlos Grignola.

Finalmente, al círculo más íntimo que me acompaña en cada día y que son pilar fundamental para que esto valga la pena, mis padres, mis hermanos y sobre todo a mi mujer e hijo (Mariana y Bautista) que son los que más han padecido todo el esfuerzo que esto implica.

“Dedicated to those who put doubt above belief”

Gregorio Weber

Introducción

2.2. El Pulmón

2.2.1. Origen y Evolución

El origen embriológico del pulmón se encuentra asociado a etapas tempranas de la evolución en la que los primeros tetrápodos abandonan la vida acuática y, a partir de estructuras branquiales, desarrollan un sistema de intercambio de gases adaptado a la vida terrestre. En vertebrados este sistema se encuentra asociado a un repliegue del esófago, por lo que el origen del tejido pulmonar es el endodermo acompañado secundariamente por el mesodermo, del cual se origina la vascularización pulmonar (Wood-1992).

Sin embargo, los "pulmones" de los animales invertebrados presentan diferencias sustanciales a los pulmones de los vertebrados, dado que se forman a partir de una invaginación del ectodermo.

El aparato respiratorio está compuesto de estructuras especialmente adaptadas al medio terrestre y a la respiración aérea. Básicamente, su función esencial es poder movilizar cantidades variables de aire desde y hacia la atmósfera para promover el intercambio de gases (ingreso de oxígeno y eliminación de anhídrido carbónico). Esto debe ocurrir en un espacio que permita la transferencia de los gases entre un entorno líquido y otro gaseoso. Este espacio es el sector alveolar, caracterizado por una estructura multilobulada de distribución fractal que proporcionan una mayor superficie de intercambio gaseoso, con lo cual se logra una mayor eficiencia del intercambio (Weibel-1962). Un dato muy interesante resulta de comparar la eficiencia energética que tienen mamíferos y aves, comparando con la respiración branquial que usan los peces. Mientras los peces destinan aproximadamente un 20% de su energía metabólica en respirar, las aves y mamíferos solamente emplean un 2%, esto denota la relevancia que tiene esta gran superficie de intercambio en la optimización de la energía destinada para ello. Sin embargo, esta eficacia está fuertemente basada en un diseño desafiante: el sector de intercambio (alveolar) es el estructuralmente más frágil debido a la delgadez de sus paredes (una capa de tejido epitelial plano junto a una capa de endotelio

capilar) y, al mismo tiempo, es sometido a un régimen de deformación constante (desde el colapso a la distensión) promovido por el ciclo respiratorio.

En mamíferos, la caja torácica aloja al tejido pulmonar, el cual se encuentra dividido en dos estructuras simétricas (pulmones), conectados a un sistema de transporte desde y hacia la atmósfera (vía aérea). La caja torácica presenta tres componentes básicos: el óseo (columna dorso-lumbar y costillas) para dar soporte, el muscular (fundamentalmente diafragma, pero también músculos intercostales y cervicales) para generar cambios de presión y el pleural (conformado por dos hojas serosas, una visceral y otra parietal que otorgan hermeticidad al espacio intratorácico y menor rozamiento para que el tejido pulmonar se deslice dentro de la caja). La vía respiratoria conformada por la vía aérea central (traquea y bronquios fuente), se bifurca en 23 generaciones de ramos de menor calibre, que finalmente terminan en los sacos alveolares (Figura 1). Estas estructuras se encuentran altamente vascularizadas (casi en un contacto íntimo alveolo-capilar) lo que permite lograr con gran eficiencia el intercambio gaseoso (oxígeno y dióxido de carbono) entre la sangre y el aire alveolar. A este nivel, es importante destacar que el intercambio gaseoso se debe a la diferencia alveolo-capilar de presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono y se realiza por difusión pasiva.

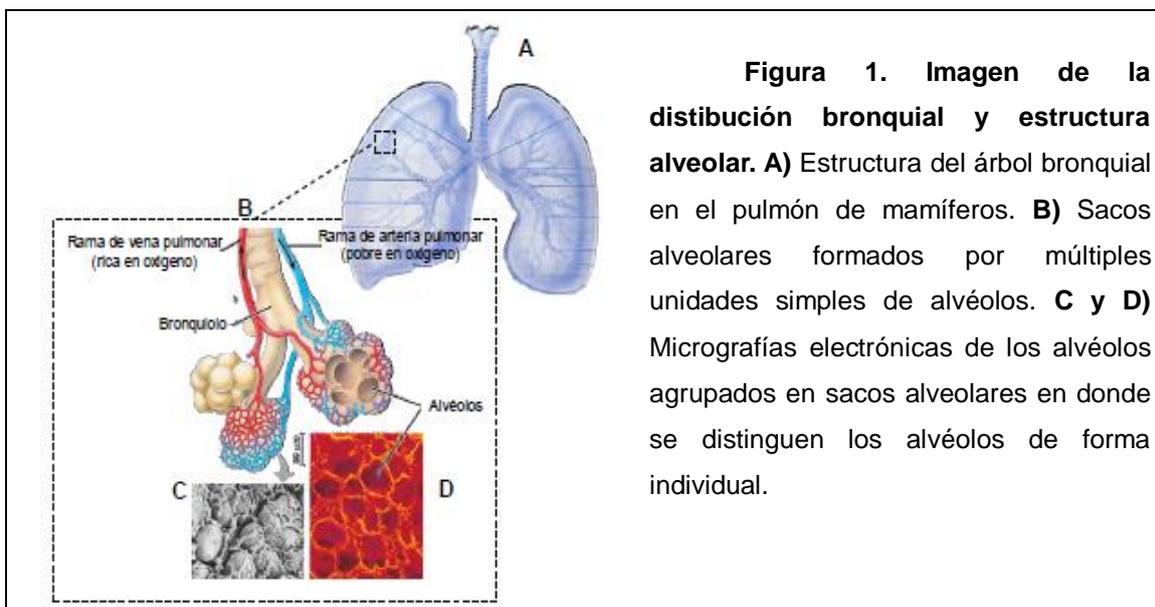


Figura 1. Imagen de la distribución bronquial y estructura alveolar. A) Estructura del árbol bronquial en el pulmón de mamíferos. **B)** Sacos alveolares formados por múltiples unidades simples de alvéolos. **C y D)** Micrografías electrónicas de los alvéolos agrupados en sacos alveolares en donde se distinguen los alvéolos de forma individual.

En el humano se estima que un pulmón puede tener hasta 150 millones de alvéolos, con un tamaño promedio de 75 a 300 micras de diámetro

interno. Por lo cual es posible estimar que la superficie final de intercambio gaseoso es de aproximadamente 70 m² (Daniels y Orgeig-2003; Rogan-2006).

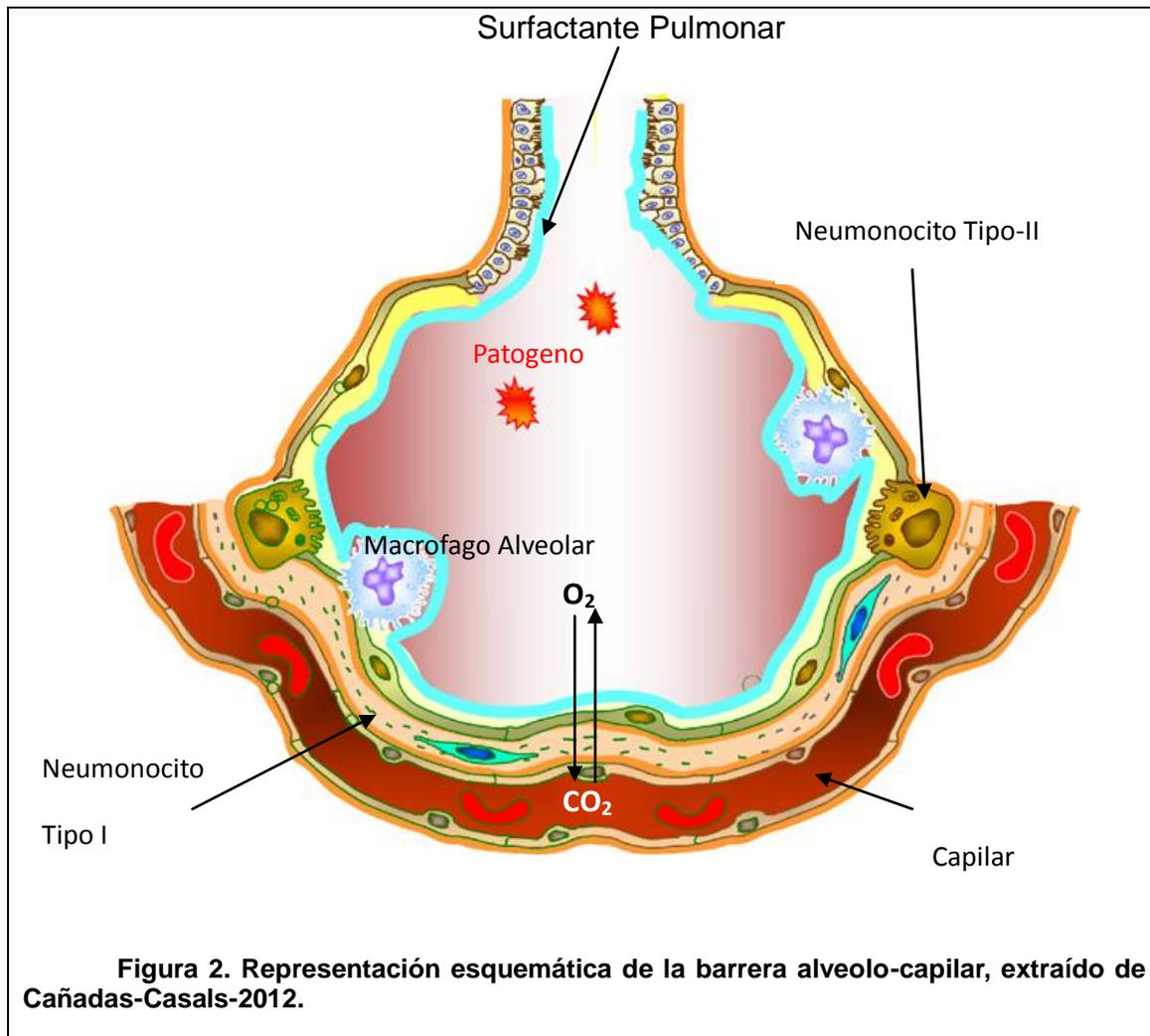
Independientemente de la especie y/o la diversidad morfológica de los pulmones de mamíferos, todos se caracterizan por poseer estructuras alveolares recubiertas por finas películas de fluido (del inglés, epitelial lining fluid), que permiten la difusión de gases mediante cambios cíclicos de volumen. Esta estructura debe de sufrir grandes cambios de presión durante el ciclo respiratorio y maximizar la superficie de intercambio gaseoso con el gasto energético mínimo (Clements-1961).

2.2.2. Fisiología

La función esencial del aparato respiratorio consiste en desplazar volúmenes de aire desde la atmósfera a los pulmones y viceversa. Este proceso es conocido como ventilación y consta de un proceso cíclico de dos etapas: la inspiración, que provoca la entrada de aire a los pulmones; y la espiración, que impulsa su salida. Este proceso sucede en las grandes vías respiratorias como mencionamos anteriormente. Sin embargo, en los sacos alveolares tal como se mencionara anteriormente, los gases contenidos en el aire que ingresa al pulmón difunden a favor de su gradiente de concentración, de lo cual resulta la simultánea oxigenación y detoxificación de la sangre.

El volumen corriente (volumen total de aire que entra al tejido pulmonar durante la respiración tranquila del ciclo respiratorio), está en estricta relación con el trabajo del sistema cardiovascular (dependiendo del estado de actividad del individuo) y también del ritmo circadiano.

Para que se lleve adelante el intercambio gaseoso, es necesario que los gases atraviesen por difusión pasiva una barrera física que se constituye de: una película superficial acuosa, las células epiteliales que forman la pared del alveolo, la capa intersticial, las células endoteliales de los capilares sanguíneos, el plasma y la membrana del eritrocito que capta o libera los gases (Figura 2).



Como podemos ver en la figura 2 en el epitelio alveolar existen dos tipos diferentes de células, las células tipo I o neumocitos de tipo I (N-I, planas) que provienen de la diferenciación de los neumocitos tipo II (N-II, cuboidales). Los N-I no se dividen, cubren el 90 % del epitelio alveolar y son células escamosas, de estructura aplanada y delgada para facilitar la difusión gaseosa.

Los N-II son las más abundantes, sin embargo solo recubren el 10 % del epitelio alveolar, y son células polarizadas con un extremo apical que forma microvellosidades. Los N-II tienen un metabolismo muy activo, pues se encargan de producir y secretar los componentes del surfactante pulmonar. Además están implicados en generar componentes de la matriz extracelular y moléculas mediadoras en los procesos de crecimiento, desarrollo, inflamación, lesión y reparación del tejido pulmonar, como citoquinas y factores de crecimiento. Se han descrito más de 600 genes de expresión diferencial entre neumocitos de tipo I y de tipo II (Gonzalez-2005).

Existen además en el epitelio respiratorio macrófagos alveolares para el mantenimiento de una superficie respiratoria libre de partículas y entidades patógenas que hayan podido entrar por las vías respiratorias.

2.3. Surfactante Pulmonar

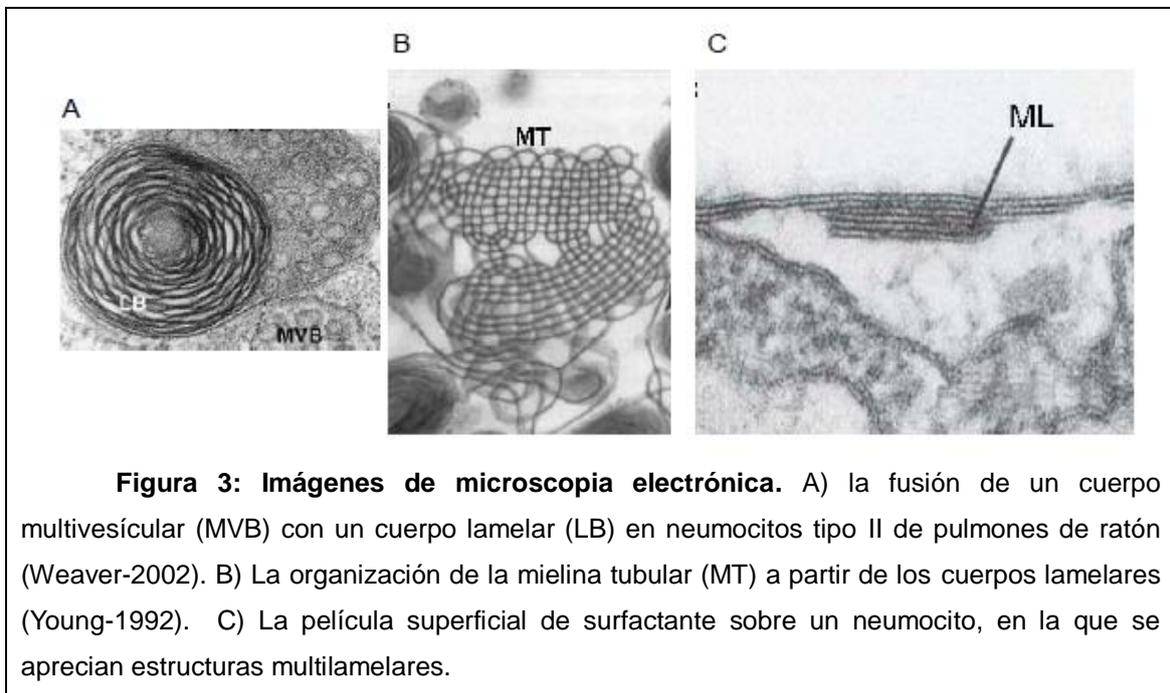
El epitelio alveolar es la primera barrera a contaminantes y patógenos a través de la vía aérea; como mencionamos anteriormente está constituido mayoritariamente por dos grupos de células N-I y N-II. Estas células son responsables de la reabsorción activa del edema pulmonar, síntesis y secreción de surfactante y participan en los procesos de inflamación y reparación pulmonar.

Los N-II se encargan de la síntesis y secreción del surfactante pulmonar al espacio alveolar en la fina capa acuosa que reviste al epitelio, que se conoce como hipofase. Posteriormente luego de su adsorción en la interfase aire/líquido cumple con su función principal de disminuir la presión intra-alveolar al final de la espiración evitando el colapso alveolar (Zuo-2008). Su composición es una mezcla de fosfolípidos (FL) y proteínas, mayoritariamente, siendo muy específica cuando se compara con otras membranas celulares y entre los mamíferos dependiendo de la especie (Postle-2001).

2.3.1. Biosíntesis y transporte de lípidos.

Luego de sintetizado el surfactante es almacenado en estructuras subcelulares denominadas cuerpos lamelares, las cuales son membranas altamente empaquetadas con lípidos y proteínas relacionadas al surfactante pulmonar. Luego de finalizado el proceso de maduración del cuerpo lamelar éstos son almacenados hasta que sea necesaria su secreción al espacio acuoso alveolar por un proceso activo. En la hipofase el cuerpo lamelar sufre diversas transformaciones como la formación de mielina tubular o su adsorción a la interfase aire-líquido para formar una película (monocapa) que es necesaria para llevar a cabo su función tensoactiva (Figura 3). La formación de la mielina tubular depende de una composición lipídica adecuada, la presencia de las proteínas del surfactante (SP-A y -B) y de calcio (Benson-1984; Suzuki-1989; Poulain-1992).

Más allá de formar la monocapa y la mielina tubular luego de la secreción al espacio alveolar, se han podido identificar estructuras membranosas (multi-bicapas) en la hipofase cercana a la monocapa, las cuales se cree están adheridas a la interfase aire-líquido y colaboran como reservorio de material tensoactivo a la monocapa interfacial (Schürch-1998, Bachofen-2005).



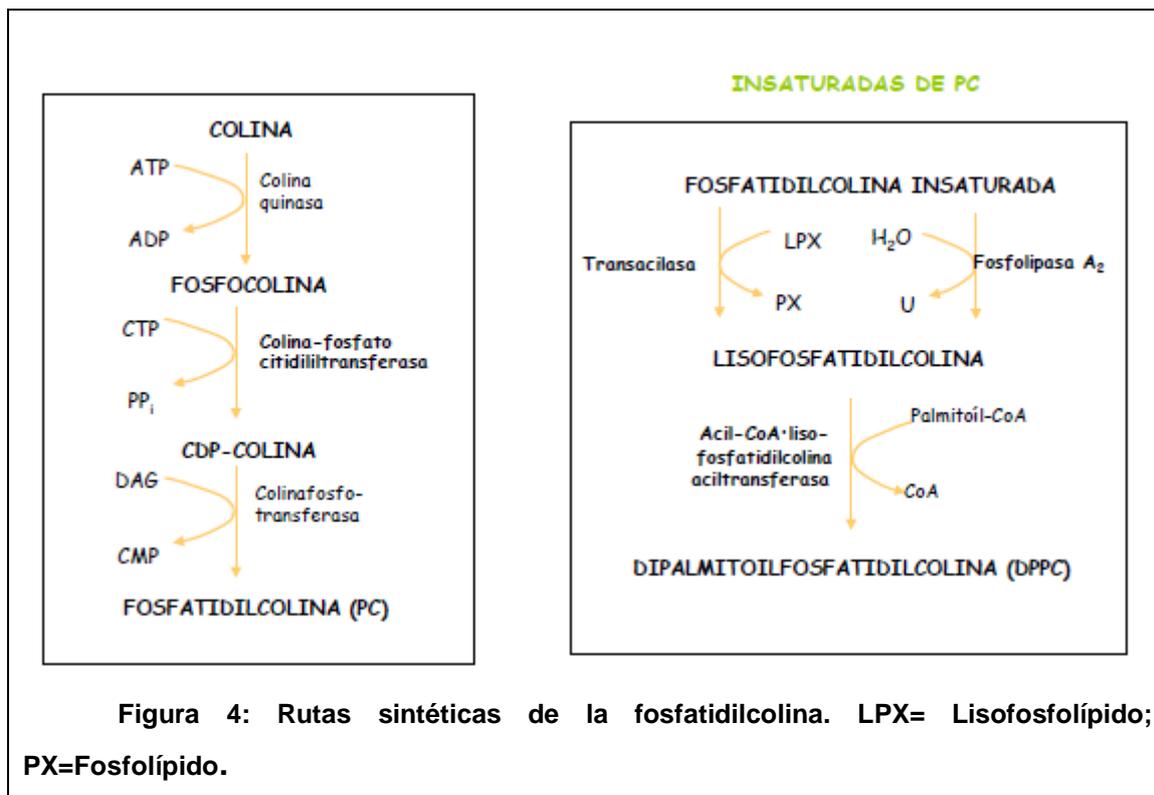
Clásicamente los cuerpos lamelares se conciben en base a los estudios de microscopía electrónica, como estructuras altamente compactadas que requieren un adecuado ensamblaje de elementos de tipo bicapa, lo cual es necesario para la correcta inserción y funcionalidad del material (Figura 3).

Se ha demostrado que el alto grado de compactación se encuentra estrechamente relacionado a la presencia de SP-B madura (Stahlman-2000). Cuando se genera knock-out para la SP-B, estos individuos tienen ausencia de cuerpos lamelares y una acumulación de los cuerpos multivesiculares en los N-II (Nogee-1994; Clark-1995; Wegner-2007), lo cual hace pensar que los cuerpos multivesiculares sean probablemente los precursores inmediatos de los cuerpos lamelares, y que la SP-B, presente algún tipo de actividad esencial para la compactación y almacenamiento de los lípidos del surfactante dentro de los cuerpos lamelares.

En los últimos años se ha identificado como elemento clave de la maduración de los cuerpos lamelares a una proteína de membrana denominada proteína transportadora de unión a ATP A3 (ABCA3, del inglés ATP-binding cassette A3). Esta proteína pertenece a la familia de transportadores de membrana que emplean la hidrólisis del ATP para el bombeo de diferentes moléculas a través de membranas celulares (Hollenstein-2007, Linton-2007). Se piensa que la proteína ABCA3 sería responsable del bombeo de lípidos del surfactante a los compartimentos similares a los de la vía endosomal para dar lugar a la biogénesis de los cuerpos lamelares (Mulugeta-2002, Ban-2007). La actividad de la proteína ABCA3 permite explicar la acumulación de especies saturadas en las membranas de surfactante, y además promovería la acumulación de membranas en el interior de los cuerpos multivesiculares para dar lugar a la formación de estructuras más densamente empaquetadas en los cuerpos lamelares una vez integrada la proteína SP-B madura.

Parte del material es reciclado desde el epitelio alveolar luego de ejercer su función tensoactiva, pero más allá de este reciclado, N-II posee toda la maquinaria enzimática para la síntesis de novo de sus componentes. Pese a ser ésta la célula especializada en la síntesis y secreción de surfactante pulmonar, también las células Clara (células epiteliales bronquiolares), pueden producir las proteínas y lípidos (a excepción de SP-C). Sin embargo, esta síntesis no parece tener relevancia en el pool alveolar del surfactante pulmonar (Weaver-1998).

Los lípidos son sintetizados en el retículo endoplásmico de los N- II, donde la síntesis del lípido mayoritario del surfactante, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), se puede realizar por dos vías: síntesis de novo o reciclado de PC insaturada. Siendo la última de éstas la principal vía de síntesis de la DPPC (aprox. 55%), es necesario la presencia de la fosfolipasas A2 y peroxirredoxina 6 (dependiente e independiente de calcio respectivamente), así como de la lisofosfatidilcolina aciltransferasa.



Para la síntesis de fosfatidilglicerol (PG), es necesaria la enzima fosfatidilglicerofosfato sintasa y tanto PG como el fosfatilinositol tiene como precursor común al CDP-diacilglicerol (Perez-Gil-Weaver-2010). Mientras que para el colesterol se cree que el 90-99% deriva de las lipoproteínas séricas, principalmente VLDL (Guthmann-1997), pese a eso sin embargo, dependiendo de los niveles de lipoproteínas en sangre es posible la síntesis de colesterol en el N-II a partir de acetato o glucosa (Batenburg-Haagsman-1998).

Luego de sintetizado en el retículo endoplásmico y hasta la acumulación como cuerpos lamelares, los lípidos son transportados mediante diferentes vías: i) transporte vesicular (pasando por el aparato de Golgi y los cuerpos multivesiculares), ii) transporte no vesicular y iii) difusión directa entre el retículo y los cuerpos lamelares, por lo cual es de vital importancia la presencia de ciertas proteínas que aseguren el contacto transitorio entre ambas estructuras (Perez-Gil-Weaver-2010).

2.3.2. Biosíntesis de proteínas

El surfactante pulmonar posee 4 proteínas específicas denominadas: SP-A, -B, -C y -D, todas son sintetizadas principalmente en los N-II. Aunque las

proteínas SP (excepto SP-C) son también expresadas en las células no ciliadas del epitelio bronquioalveolar y células clara (Batenburg-Haagsman-1998), más aún, también se han podido identificar en el tracto gastrointestinal (Fisher-Manson-1995). La expresión de SP-A y -D en las mucosas y otros órganos externos se cree que tiene como objetivo la defensa contra microorganismos como es el caso de las glándulas lacrimales, implicadas en la defensa contra infecciones de la superficie del ojo (Brauer-2007b). También se ha identificado a la SP-B y SP-C en el ojo, lo que hace pensar de la existencia de complejos tipo surfactante para estabilizar la interfase aire-líquido ocular (Brauer-2007a).

La SP-A es una colectina con sitio de reconocimiento de azúcares y en el humano se encuentra codificada por dos genes con secuencia muy conservada, SP-A1 y SP-A2, localizados en el cromosoma 10. La importancia fisiológica de la existencia y coexpresión de estos dos genes ha sido puesta en evidencia en los últimos años (Floros-Kala-1998, Wang-2004, Mikerov-2005). El gen para la SP-D humana también se encuentra en el cromosoma 10q, relativamente cerca de los genes de la SP-A (Crouch-1993). Cuando son sintetizadas, estas proteínas poseen un péptido señal que luego de su translocación al retículo endoplásmico es eliminado. En el retículo sufren varias modificaciones postraduccionales, dentro de las que se incluyen: glicosilaciones e hidroxilaciones. En la Figura 8 se resume el proceso de expresión y maduración de ambas colectinas.

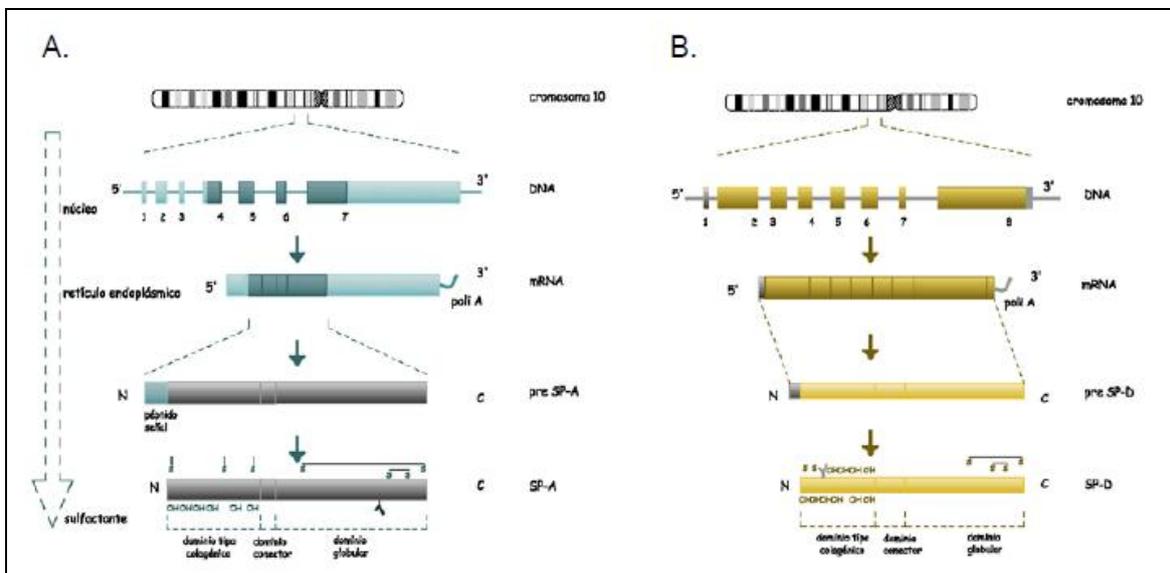


Figura 5: Síntesis y procesamiento de la SP-A (A) y SP-D (B) humanas y su localización intracelular. A) El gen de la SP-A posee 7 exones, que incluyen cuatro regiones codificantes y cinco regiones no traducidas. **B)** El gen de la SP-D está compuesto por 8 exones, 4 regiones

codificantes y 5 regiones no traducidas. En los monómeros de SP-A y SP-D maduras se han representado las prolinas hidroxiladas (OH) y la glicosilación (Y) del dominio colagénico, los puentes disulfuro intramoleculares (-S-S-) así como las cisteínas (S) que estabilizan la estructura oligomérica.

Tanto la SP-B como la SP-C son sintetizadas en forma de precursores (prepro-proteína) y se codifican en el cromosoma 2 y 8, respectivamente. Estos precursores tienen 40-42kDa y 21 kDa, respectivamente. Ambas son sintetizadas en el retículo endoplásmico y en el caso de las SP-C son dipalmitoiladas en el aparato de Golgi (ten Brinke-2002). Para lograr ser funcionalmente activas es necesario que sean procesadas proteolíticamente en varias etapas a lo largo de la ruta de secreción para dar lugar a los polipéptidos maduros activos. En la figura 6 es posible ver los compartimentos intracelulares y las etapas proteolíticas que se conocen para el procesamiento de las proteínas SP-B y -C (Nogee-1998; Brasch-2002; ten Brinke-2002; Brasch-2003; Brasch-2004; Mulugeta-Beers-2006). Se piensa que los segmentos N y C terminal de ambas proteínas están relacionados a una protección de las proteínas maduras de los entornos hidrofílicos y pueden brindar un correcto plegamiento evitando su agregación dada su elevada hidrofobicidad. Es prácticamente desconocido el destino de los segmentos N y C terminal de ambas, pero se conoce que la región C terminal de la proSP-C es fundamental para el correcto plegamiento de la misma y si se realizan mutaciones de la misma puede comprometer el correcto plegamiento de la proteína (Mulugeta-2007). Por lo cual se plantea que tenga alguna función tipo chaperona no solamente relacionado con la maduración de la SP-C, sino que podría ser luego de eliminado este precursor para facilitar el correcto plegamiento de otras proteínas. Para el segmento N terminal de la proSP-B se le ha atribuido alguna actividad antibacteriana dado que posee un dominio estructural de tipo saposina, lo cual le atribuye características citolíticas y antibacterianas (Olmeda-2011, Yang- 2010).

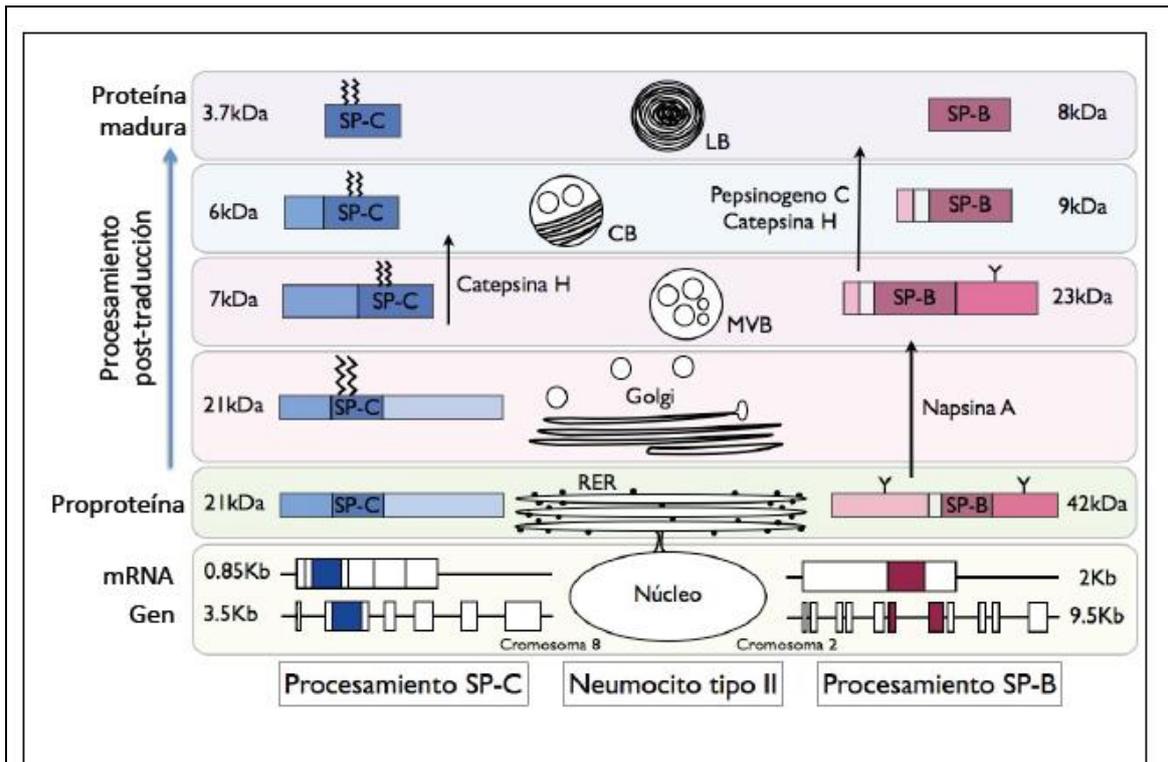


Figura 6: Ruta de procesamiento de las proteínas hidrofóbicas (SP-B y -C) del surfactante pulmonar en el N-II. Figura modificada por la Dra. Elena López-Rodríguez a partir de Noguee-1998, Brasch-2002, ten Brinke- 2002, Brasch- 2004 y Mulugeta-Beers-2006.

Cuando existe algún proceso de alteración en el normal procesamiento de las proteínas (pero particularmente para la SP-B), se produce una insuficiencia respiratoria severa. Por ejemplo, la acumulación de proteínas desplegadas en el retículo endoplásmico, conlleva a una respuesta denominada de estrés que se conoce como UPR (del inglés, unfolded protein response). Dependiendo de la severidad, es posible que se activen las señales para apoptosis, produciendo un daño severo que se conoce como fibrosis pulmonar idiopática (IPF, del inglés idiopathic pulmonary fibrosis) (Günther-2012).

2.3.3. Secreción de surfactante pulmonar

La secreción de todos los componentes del surfactante pulmonar se lleva a cabo por dos vías: i) Secreción asociada a cuerpos lamelares (lípidos y proteínas hidrofóbicas) y ii) Secreción no asociada a cuerpos lamelares (proteínas hidrofílicas). Como mencionamos anteriormente, las proteínas

hidrofóbicas del surfactante, SP-B y SP-C, en encuentran en el espacio subcelular de los N-II en los cuerpos lamelares, y son secretadas en conjunto a los lípidos que son responsables de la actividad tensoactiva (Oosterlaken-Dijksterhuis-1991b). Sin embargo, para las proteínas hidrófilicas (SP-A y SP-D), cuando la secreción es *de novo*, ésta no se encuentra asociada a los cuerpos lamelares (Crouch-1991; Voorhout-1992; Ikegami-1994; Osanai-1998), sino que son secretadas de forma independiente al resto de los componentes lipoproteicos.

a) Secreción asociada a cuerpos lamelares. Como vimos anteriormente las proteínas SP-B y SP-C tienen una vía exocítica dependiente del retículo endoplásmico, aparato de Golgi y los cuerpos multivesiculares, luego de lo cual cuando éstos maduran son acumulados como cuerpos lamelares. Es claro que la SP-B juega un rol fundamental en la biogénesis de los cuerpos lamelares, lo cual se asocia a sus propiedades fusogénicas. Existe una maquinaria enzimática muy importante para el correcto procesamiento temporal y espacial de la proteína destacándose la aspartil proteasa napsina A y la cisteín proteasa catepsina H (Brasch-2003; Guttentag-2003; Ueno-2004) entre el aparato de Golgi y los cuerpos multivesiculares (Brasch-2004). Un detalle interesante resulta de la delección del gen para la SP-B, más allá de que estos ratones transgénicos presentan carencia de los cuerpos lamelares, tienen un procesamiento incompleto del precursor de 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), sin embargo, es posible identificar recurrentes inflamaciones y alteraciones estructurales en los alveolos de humanos y ratones carentes de SP-C (Nogee-2002).

b) Secreción independiente de los cuerpos lamelares. Las proteínas SP-A y SP-D, pertenecen a la familia de las colectinas y se asocian principalmente a la defensa inmune innata (Casals-García-Verdugo-2005; Wright- 2005), sin embargo esto es algo que está cambiando conceptualmente y se discutirá más adelante. Ambas presentan una organización estructural similar, que puede resumirse como un fragmento N-terminal corto, seguido de un segmento colagénico conectado a través de una región conectora helicoidal con un dominio de reconocimiento de carbohidratos (Crouch-Wright- 2001). Estas proteínas forman homotrímeros que además se ensamblan en

estructuras de orden mayor (Kuroki-Voelker-1994). Pese a que la función principal de la SP-A es la eliminación de patógenos de las vías aéreas y también la modulación de la respuesta pro-inflamatoria (Arias-Diaz-2000; Wright-2005; Sano-2005), se ha identificado que esta proteína es clave para la formación de la mielina tubular (Poulain-1992). Además se ha podido demostrar experimentalmente que tiene propiedades de preservación de las propiedades tensoactivas del surfactante (Cockshutt-1990; Casals-2001) frente a agentes inhibidores de la función tensoactiva, como puede ser la proteína C-reactiva (Sanchez-2010). Se conoce que la SP-A regula la secreción del surfactante (Dobbs-1982) y al mismo tiempo promueve el reciclado de los fosfolípidos de la hipofase por parte de los N-II (Bates-1994). SP-A se transporta vía aparato de Golgi donde sufre glicosilaciones y es secretada de forma constitutiva (Osanaí-1998, -2006). Pese a que existe controversia sobre la presencia de SP-A y SP-D en los cuerpos lamelares, es posible afirmar que dicha presencia se debe al reciclado del material tensoactivo desde el epitelio alveolar y no a que sean secretadas por estos orgánulos.

2.3.4. Regulación de la secreción

La secreción de los cuerpos lamelares puede ser desencadenada por diferentes factores, pero por sobre todo, el estímulo más importante para su secreción es la distensión mecánica a la que son expuestos los N-II durante la respiración (Wirtz –Dobbs-1990). El primer suspiro de un recién nacido a término puede desencadenar la secreción masiva de surfactante necesario para las primeras inspiraciones (Massaro-Massaro-1983; Rooney-2001). Pérez-Gil discute sobre la estructura de los cuerpos lamelares, considerándolas como estructuras con un gran contenido energético en su interior (asociado al empaquetamiento de unidades hidrofóbicas), que al llegar a la interfase, de alguna manera liberan su contenido como una “explosión” del organelo (Pérez-Gil 2008b) (ver figura 7).

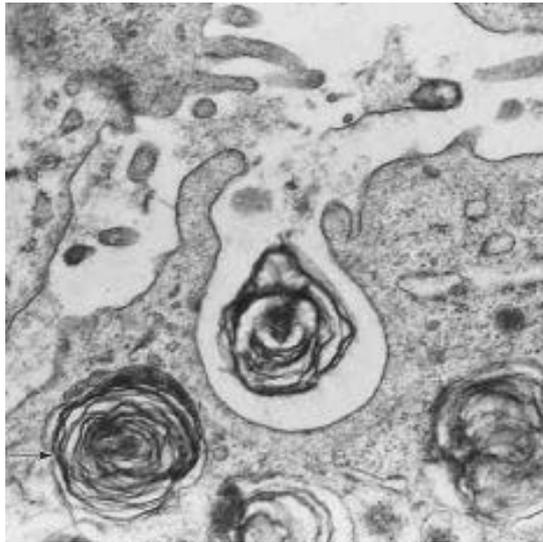


Figura 7: Imagen de microscopía electrónica que permite ver la liberación del contenido de un cuerpo lamelar en la membrana apical (Tomado de Rooney-1994)

El mecanismo descrito para el efecto de la distensión y secreción del surfactante pulmonar es mediado por calcio citosólico, el cual es necesario para la fusión de los cuerpos lamelares con la membrana apical del neumocito (Ashino-2000; Frick-2004). Los receptores β -adrenérgicos, adenosina A2B, y purinérgicos P2Y2, a través de la unión a ATP desde el espacio alveolar, producen la estimulación de estos receptores que desencadena una cascada de señales mediada por la proteína-kinasa A (PKA), la proteína kinasa C (PKC) y la kinasa calcio-calmodulina dependiente (Rooney-2001; Dietl-Haller-2004; García-Verdugo-2008). Cuando se produce una activación simultánea por distintas vías de señalización es posible incrementar la secreción del surfactante pulmonar hasta 12 a 15 veces (Fehrenbach-2001). Los β -adrenérgicos, los factores de crecimiento, las citoquinas y otros mediadores, pueden regular la maduración de los N-II así como inducir la síntesis y secreción del surfactante pulmonar (Andreeva-2007). Dentro de las hormonas más importantes en la regulación de su metabolismo se destacan los glucocorticoides, las hormonas tiroideas, los estrógenos, los andrógenos y la insulina, entre otras. Por otro lado, la diferenciación y actividad biológica de las células del epitelio alveolar puede ser afectada por factores de crecimiento como el EGF, PDGF, IGF, TGF- β o TNF- α , entre otros. También mediadores químicos como el interferón- γ y otras citoquinas pueden influir en la síntesis de surfactante.

Clásicamente, se ha utilizado por los últimos 30 años, la acción reguladora de los glucocorticoides (cortisol) sobre el metabolismo de los N-II, dado que estimulan la maduración de los cuerpos lamelares y su secreción en el pulmón antes del nacimiento, evitando así el estrés respiratorio del recién nacido por inmadurez (Boggaram-1991; Gonzales-2002). Para poder ser secretados los cuerpos lamelares en la membrana apical de los N-II, es necesario que sean transportados por algunos elementos del citoesqueleto como pueden ser los microtúbulos y microfilamentos; la desorganización de éstos impide su secreción y reciclado (Brown-1985; Miklavc-2009).

2.3.5. Adsorción

Pese a no conocer con claridad todos los mecanismos moleculares que conlleva la desorganización de los cuerpos lamelares en las estructuras antes mencionadas como puede ser la mielina tubular o los componentes multilamelares identificados en la hipofase, existen al día de hoy algunas teorías basadas en elementos experimentales que permiten comprender relativamente bien cómo es el proceso. Haller y colaboradores, han demostrado que es posible transferir directamente de los cuerpos lamelares, material tensoactivo a una interfase aire/agua, independientemente de la existencia de la mielina tubular (Haller-2004). Tal como se mencionara anteriormente, existe un reservorio de material tensoactivo adherido a la monocapa interfacial (ver figura 3), que se cree provee a esta monocapa de material tensoactivo durante el ciclo inspiración/espирación, lo cual impediría la pérdida definitiva del material en el ciclo respiratorio. Los modelos más recientes de la organización del surfactante pulmonar en la interfase e hipofase alveolar, plantean un modelo tridimensional que considera la función tensoactiva desde el punto de vista dinámico (Pérez-Gil-2008b). Esto plantea que durante la compresión, el cambio de volumen alveolar (30-40%) produce un aumento de la tensión intra-alveolar, excluyendo material de la interfase alveolar con escasa capacidad tensoactiva y reservando en la interfase, surfactante con buena performance tensoactiva. Para que en el próximo ciclo inspiratorio no exista la formación de una fase gas (cuando los fosfolípidos están tan separados que no puede interactuar), asociada a la pérdida de material del ciclo anterior y al cambio de volumen inspiratorio, es necesario que se incluya material

tensocativo desde la hipofase como estructuras multilamelares (Pérez-Gil 2008b). Para que todo este proceso funcione de manera dinámica es imprescindible que el surfactante pulmonar cuente con una adecuada composición lipídica y proteica que permita el correcto funcionamiento (ver figura 8).

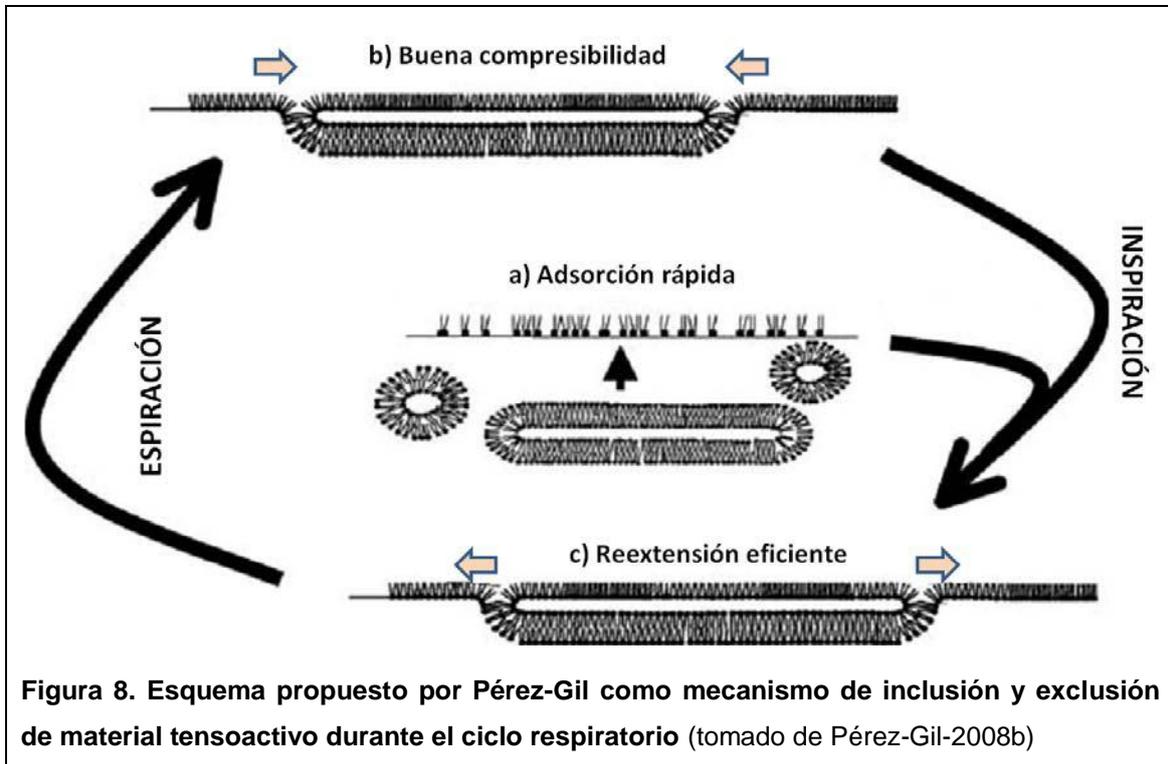


Figura 8. Esquema propuesto por Pérez-Gil como mecanismo de inclusión y exclusión de material tensoactivo durante el ciclo respiratorio (tomado de Pérez-Gil-2008b)

Los detalles de composición y funcionamiento de las proteínas involucradas se detallan en la próxima sección.

2.3.6. Degradación y reciclaje

Luego de secretado y posteriormente a haber cumplido su función, el surfactante pulmonar es reciclado por endocitosis en los N-II (aprox. 90%) y almacenado en los cuerpos lamelares para ser nuevamente secretado (Wright-Clements-1987). Parte del surfactante secretado sin embargo, tiene como destino final la degradación por los macrófagos alveolares, llegando a alcanzar hasta un 10% del total secretado. Se ha medido el tiempo de renovación para el surfactante pulmonar en unas 1 a 3 horas, siendo demostrado para la fracción lipídica (Rider-2000), así como también para las cuatro proteínas (Young-1989; Baritussio-1992; Breslin-Weaver-1992; Ueda-1995; Herbein-2000; Stevens-2001). Sin embargo, en trabajos del grupo de Orgaig con

modelos de pulmón aislado, se ha podido demostrar que cambios del perfil lipídico y proteico pueden ser generados con tan solo 30 minutos de ventilación mecánica, lo que demuestra ser un sistema bien adaptado para los cambios en la actividad física o aún durante la ventilación mecánica (Orgaig-1995).

SP-A, SP-B y SP-C promueven el reciclado de lípidos y proteínas de la hipofase alveolar, pero se ha podido demostrar que para el caso las proteínas hidrofóbicas su acción es independiente de calcio (Sane-Young-1994). SP-D también cumple un rol en el reciclado de los cuerpos lamelares, pero no parte de las células tipo II (Herbein-2000), la ausencia de la proteína produce una acumulación de los componentes del surfactante pulmonar en líquido epitelial y en los cuerpos lamelares (Botas-1998; Korfhagen-1998).

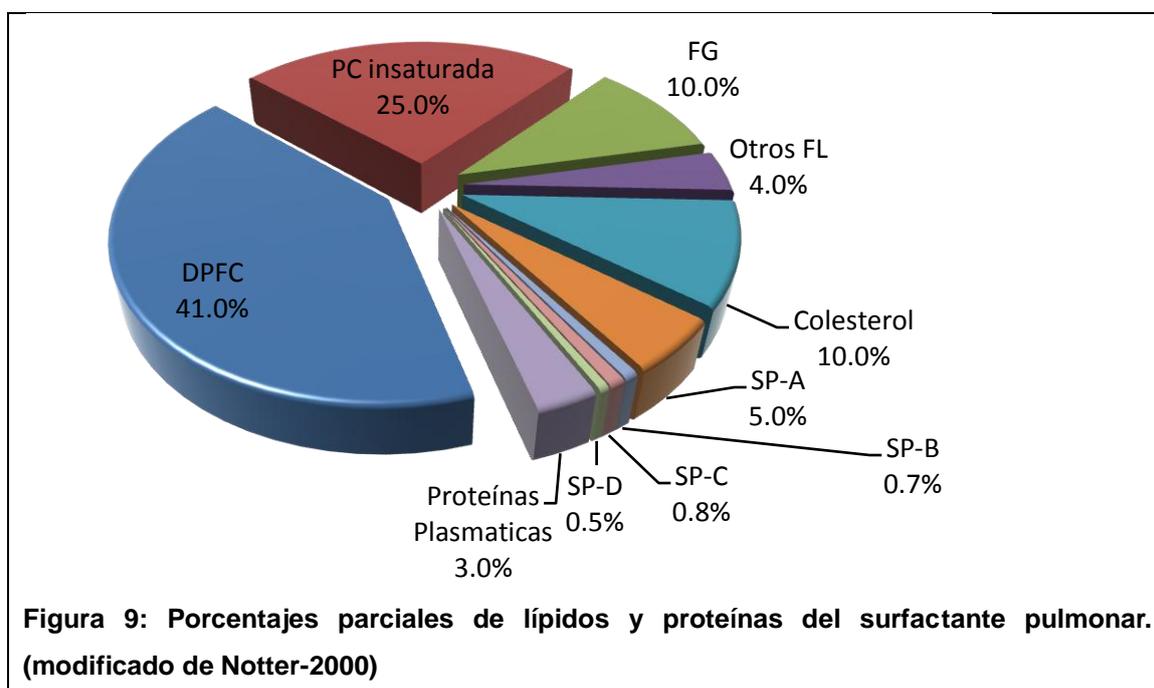
2.4. Surfactante Pulmonar: bioquímica y funcionalidad

2.4.1. Composición del surfactante y funcionalidad de sus componentes

La porción fosfolipídica ocupa el 90-95 % de la fracción lipídica, siendo el 5-10 % restante lípidos neutros, mayoritariamente colesterol. El fosfolípido más importante es la fosfatidilcolina (PC), siendo la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) el 50 % aproximadamente de éste y el resto fracciones insaturadas como palmitoil-oleoilfosfatidilcolina (POPC). DPPC es el responsable más importante de la capacidad tensoactiva del SP. Aparte de la FP otras clases fosfolipídicas cumplen un rol importante en la función del SP, así los FL aniónicos como fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) y ácido fosfático (PA), son responsables en conjunto con la fracciones insaturadas de PC del orden y morfología lateral de la monocapa e hipofase del SP. Además de estos FLs, la fosfatidiletanolamina (PE) pese a ser un fosfolípido menor tiene gran relevancia en la función del SP dado su capacidad de promover la formación de estructuras no-lamelares tipo hexagonales inversas (H_{II}) y cúbicas, las cuales son de gran relevancia para la inclusión/exclusión de material tensoactivo de la interfase alveolar (Serrano-20006; Zuo-2008; Perez-Gil-2008b). Estos lípidos como la FE poseen una forma molecular tipo cónica debido a sus cabezas polares tiene menor volumen que el diámetro de rotación las cadenas acilo (y los últimos grupos metilo) por lo que promueven las formas hexagonales y cubica , en el caso contrario los grupos en los que sus cabezas

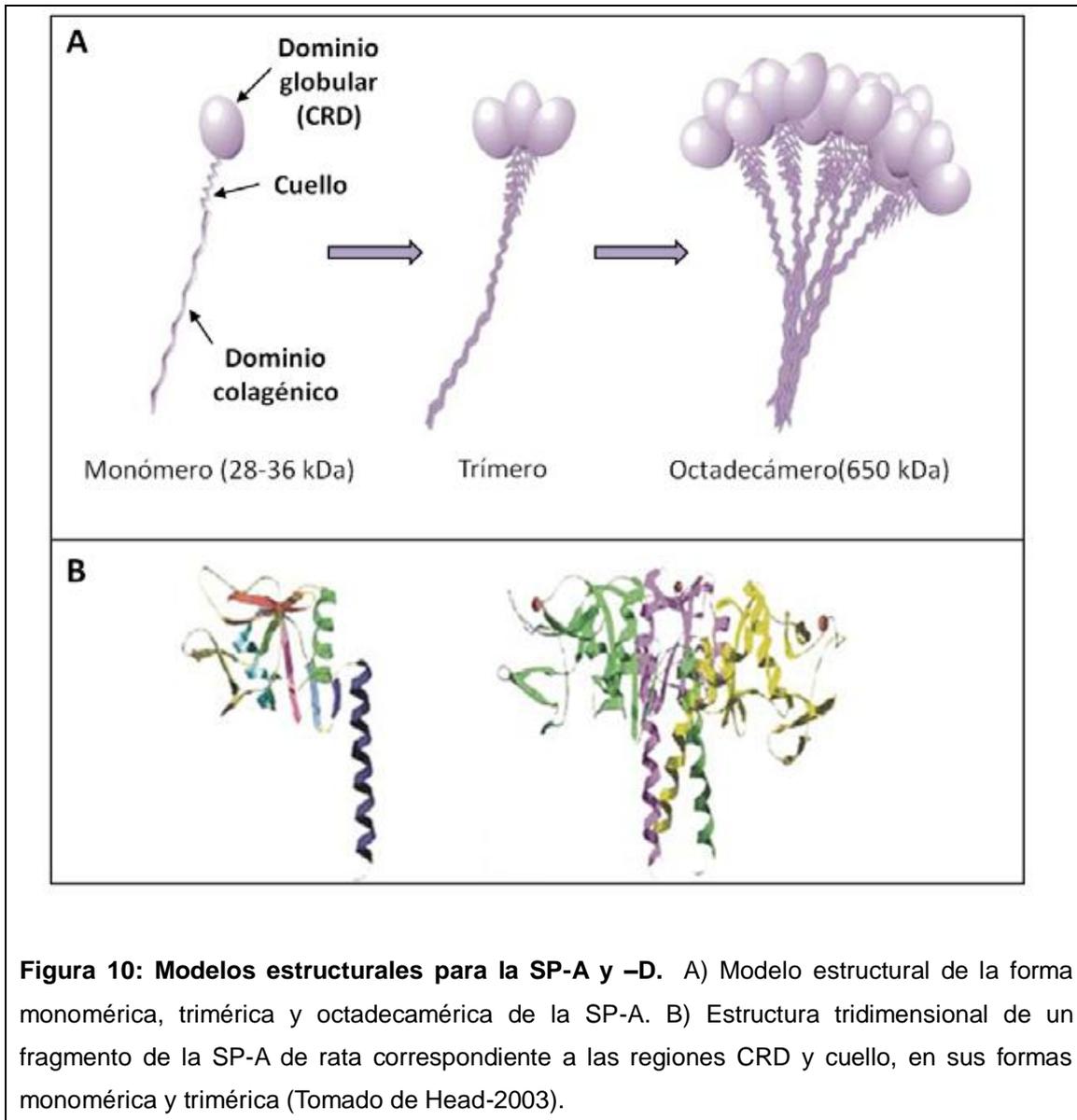
polares poseen el mismo diámetro que sus volúmenes de rotación de sus cadenas acilo, poseen forma cilíndrica y dan lugar a estructuras tipo lamelares (ej: DPPC) (Notter-2000; Tolle-2002). El Colesterol como mencionamos anteriormente tiene valores elevados próximo al 20 % molar con respecto a las fracciones fosfolípídicas (Bernardino de la Serna-2004), ver figura 9.

Las proteínas del surfactante pulmonar fueron denominadas como SP-A, B, C, D (surfactant protein), separándose en hidrofílicas SP-A y D, e hidrofóbicas SP-B y C. Las primeras presentan un rol inmunológico (SP-A también se cree tiene funciones tensoactivas), siendo las segundas las vinculadas a la capacidad tensoactiva, tal como mencionamos anteriormente (ver figura 9).



SP-A es la proteína más abundante del SP, con un punto isoeléctrico entre 4 y 5 en forma de monómero (26-38 kDa), pero puede presentarse multimérica, cuyo rol mayoritario se asocia a su actividad colectina. Posee uno o dos oligosacáridos unidos a asparagina, un sitio de reconocimiento a carbohidratos (CDR, carbohydrate domain recognition) y dos de unión a calcio (Casals-2001). Para su oligomerización necesita de la formación de puentes disulfuro en su extremo N-Terminal para que establezcan su estructura oligomérica. Esta oligomerización es relevante para la función de agregación

de vesículas que tiene la proteína, cuya región se encuentra ubicada en la confluencia entre el dominio globular y el conector coiled-coil (ver figura 10) (Casals-2001; Wright-2005). Animales knock-out para SP-A y D tienen mayor susceptibilidad al desarrollo de infecciones, pese a no mostrar SDRA. (Perez-Gil-2008b).



El monómero de SP-D tiene una masa molecular de 43 kDa, pero se encuentra en forma de dodecámero constituido por 4 trímeros en forma cruciforme (ver figura 11). Tal como en el caso de la SP-A, su región N-terminal estabiliza el oligómero por la formación de disulfuro, y también una región globular CRD (Haagsman-2008).

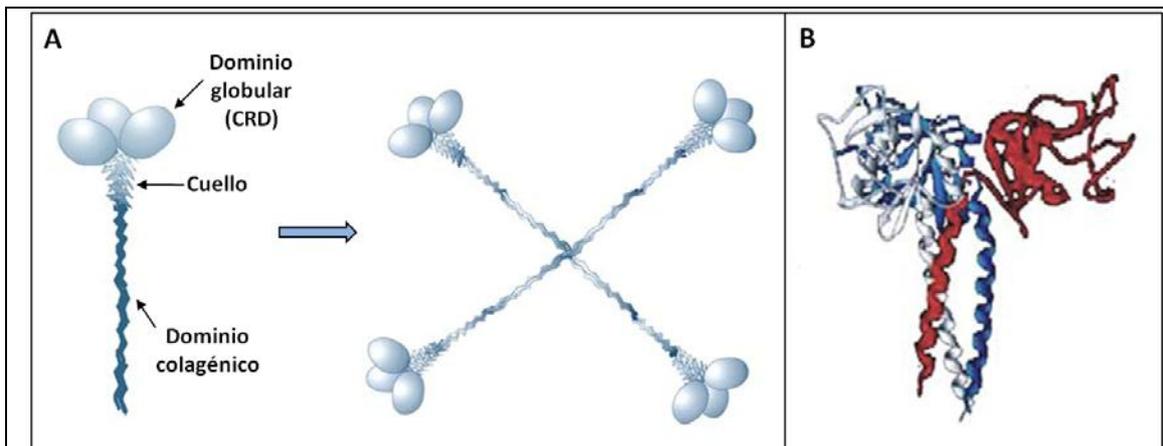


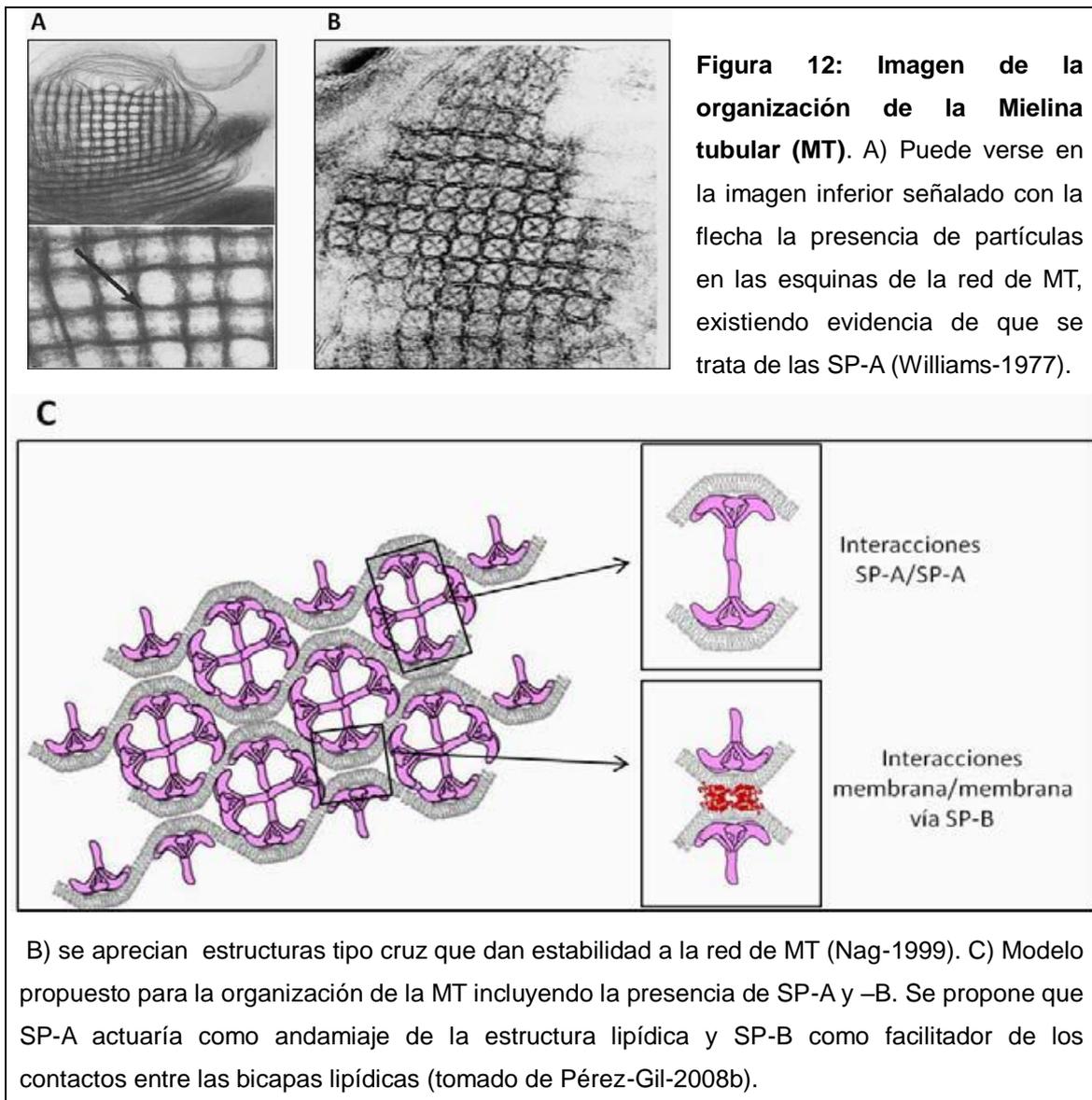
Figura 11: A) Modelo estructural de la forma trimérica y dodecamérica de la SP-D. B) Estructura cristalina de las regiones CRD y cuello del trímero de la SP-D humana (tomado de Hakansson-1999).

SP-A presenta al menos tres actividades esenciales para la función del surfactante pulmonar, se destacan su capacidad de unión a la superficie de patógenos, lo cual facilita la respuesta inmunológica de los macrófagos alveolares; su capacidad de interacción con lípidos y en particular su unión en forma selectiva con DPFC; y la posibilidad de establecer interacciones proteína-proteína, dentro de las que se incluyen la auto-asociación y su interacción con otras proteínas, destacándose la interacción con SP-B.

Se ha demostrado que la SP-A puede modular la inflamación desencadenando eventos pro y antiinflamatorios, así como eliminación de microorganismos de manera directa o indirecta promoviendo la fagocitosis por parte de los macrófagos y monocitos (Wright-2005; Kuroki-2007). La actividad antimicrobiana parece depender de la oligomerización tipo dodecamérica (Orgeig-2010).

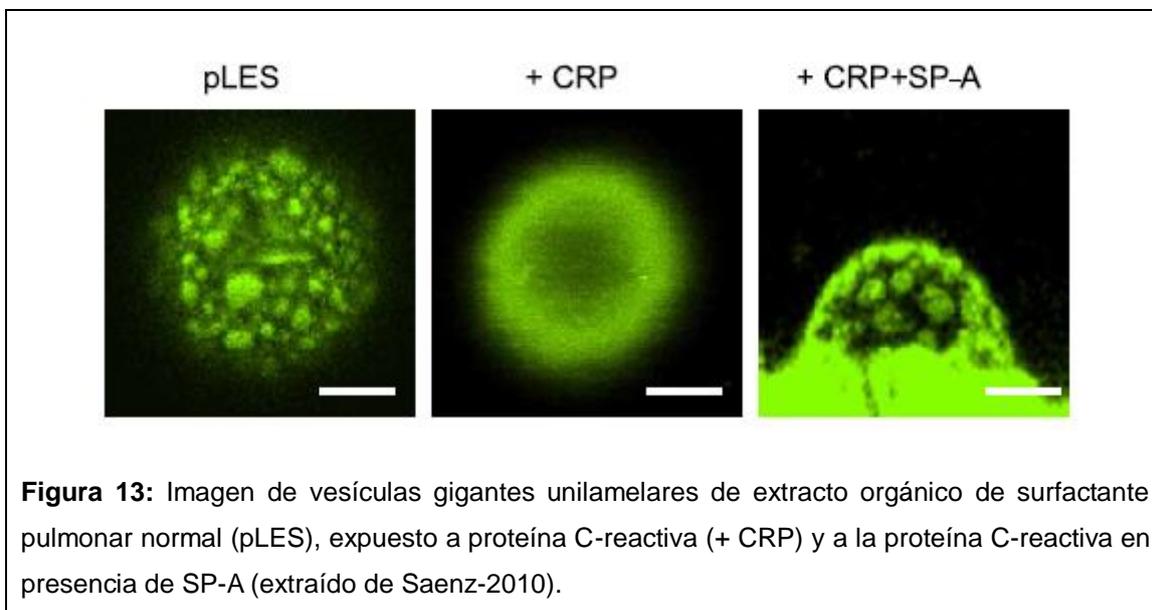
Casals y colaboradores han demostrado que SP-A puede promover la agregación de vesículas lipídicas de manera dependiente de calcio (Casals-2001), se piensa esta característica pueda colaborar en la promoción de los contactos entre las bicapas de la hipofase alveolar y la monocapa, lo cual sería necesario para la transferencia de material tensoactivo desde la interfase en la espiración y desde la hipofase durante la reextensión en la inspiración (Taneva-Keough-2000; Morrow-2007). También para estas características “tensoactivas” de la SP-A se conoce que es necesario la oligomerización tipo dodecámero de la proteína (Sanchez-Barbero-2005).

Se ha propuesto que la SP-A en conjunto con la SP-B, son necesarias para la formación de la mielina tubular (ver figura 12). Esto se ha confirmado a través de la generación de animales “knock-out” para SP-A, los cuales no tienen mielina tubular, sin embargo presentan una función respiratoria normal (Korfhagen-1996), aunque como se mencionó antes, se ve afectada su respuesta inmunológica (Perez-Gil-2008b).



Finalmente, una de las funciones más destacadas de la SP-A se encuentra asociada a la capacidad de reversión de alteraciones tensoactivas del surfactante pulmonar por la presencia de proteínas plasmáticas en el epitelio alveolar cuando la barrera alveolocapilar se encuentra alterada (Holm-

1988; Warriner-2002). Por ejemplo, se ha demostrado que la SP-A puede revertir in vivo e in vitro los efectos deletéreos de la proteína C-reactiva, disminuyendo las alteraciones pulmonares y la organización supramolecular del surfactante pulmonar expuesto a la proteína C-reactiva (ver figura 13)



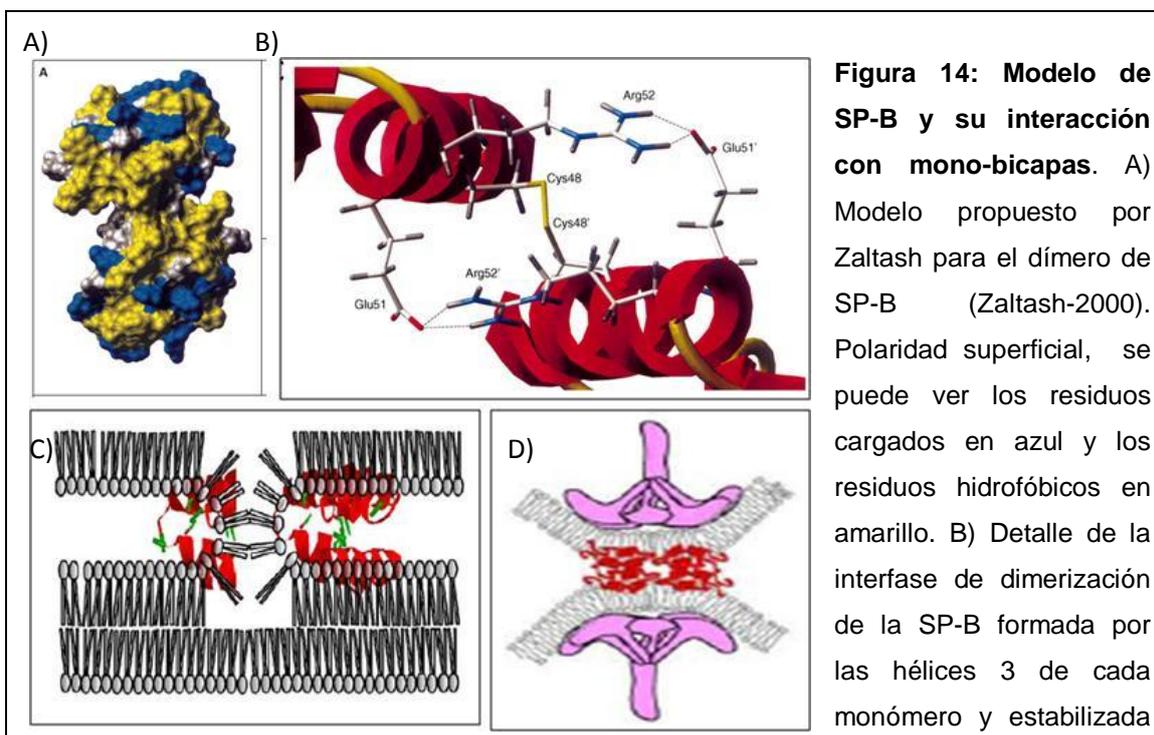
En cuanto a la SP-D, sus funciones se encuentran asociadas a la respuesta inmune del pulmón, lo cual lo realiza en parte mediante la atenuación de la inflamación y claramente la eliminación de los patógenos del tracto respiratorio (Kuroki-2007). Se ha demostrado que la SP-D reconoce el Lipopolisacarido (LPS) de las bacterias mediante su dominio CRD, produciendo la agregación de las mismas o aglutinación (Crouch-Wright-2001).

Sin embargo en los últimos años se ha identificado que la SP-D es importante para el mantenimiento de la homeostasis del surfactante pulmonar. Ratones “knock-out” para SP-D sufren de una acumulación de los lípidos del surfactante y una alteración de la estructura de los agregados grandes (elementos de gran capacidad tensoactiva que se purifican del LBA tras una centrifugación de alta velocidad), lo cual se cree es debido a una alteración del reciclado del surfactante pulmonar por los N-II (Ikegami-2005).

Las otras dos proteínas, denominadas SP-B y C son pequeñas proteínas altamente hidrofóbicas. Sumadas no superan el 2-3 % del peso total del surfactante pulmonar, pero juegan un rol crucial en la formación y estabilización de la monocapa o film tensoactivo. En pacientes con deficiencia de SP-B o

ratones knock-out se desarrolla un distress respiratorio letal, siendo menos grave para ratones deficientes para SP-C, pero aun evolucionando a una neumonitis progresiva (Serrano-2006).

SP-B es la proteína más importante del SP para el correcto funcionamiento durante el ciclo respiratorio, permitiendo una rápida transferencia de especies fosfolípicas tensoactivamente efectivas desde la hipofase a la interfase aire/líquido, así como un colapso ordenado de la monocapa durante la espiración. Su secuencia aminoacídica (80 aa) la incluye en una familia de proteínas denominadas saposinas, las cuales tienen estructura en α -hélice anfifílica, permitiendo a la proteína orientarse de manera paralela a la interfase de membranas. Mayoritariamente se encuentra formando un homodímero a través de una cisteína libre (cys-48), lo cual es muy importante en la promoción e intercambio de FL en la interfase (Cabre-2012). SP-B al igual que SP-C se encuentra asociada a estructuras de membranas desordenadas (bi - Ld y monocapa - Le), interaccionando con FL aniónicos como FG, se plantea que los dímeros colaboran con la formación de estructuras H_{II} y cúbicas, promoviendo la exclusión ordenada de los FL del film durante la compresión evitando el colapso de la monocapa que imposibilita posteriormente la re-expansión (Bernardino de la Serna-2004, Chavarha-2010). (Ver figura 14)

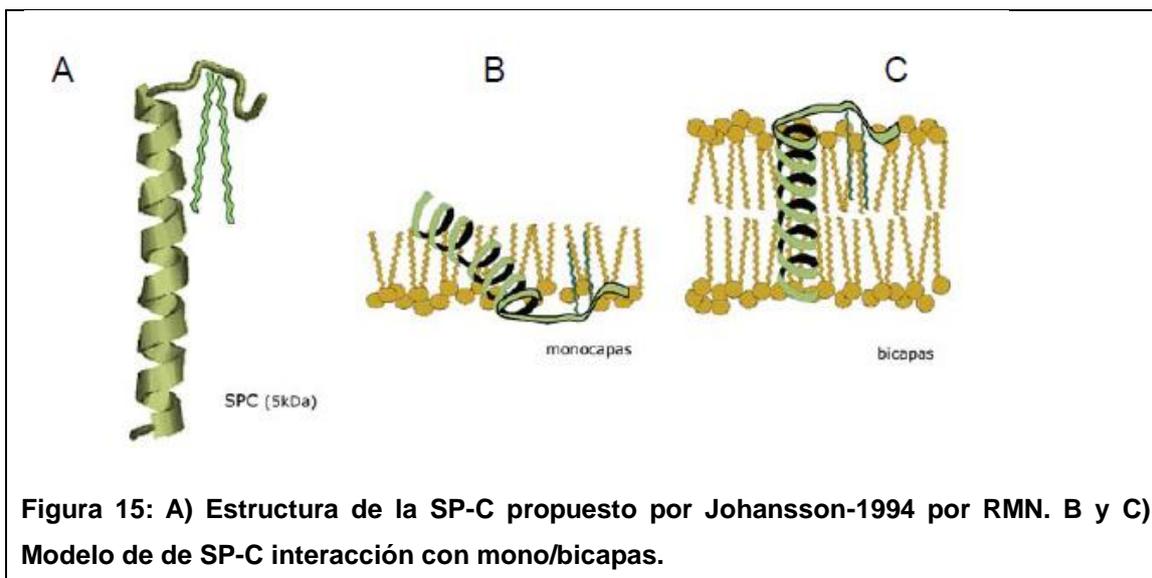


por el puente disulfuro formado por cys48/cys48' y los puentes salinos (líneas discontinuas) de los pares Glu51/Arg52' y Glu51'/Arg52. C y D) modelo de interacción con mono y bicapas propuesto por Perez-Gil-2008b.

En los últimos años se ha empezado a identificar la posibilidad de que SP-B pueda formar oligómeros mayores al dímero (Wustneck-2003). Esto se ha demostrado en la formación de agregados de SP-B en monocapas comprimidas, asociados a los límites de los dominios líquido condensados (Cruz-2004), lo que sugiere las interacciones SP-B/SP-B podrían ser esenciales para la capacidad de la proteína de promover el estrecho empaquetamiento entre las distintas estructuras del surfactante y la formación de estructuras multilamelares (Cabre-2009). Por último, es importante destacar la existencia de interacciones SP-B/SP-C, lo cual se ha demostrado mejora la capacidad tensoactiva entre ambas, mediante experimentos de compresión de monocapas (Taneva-Keough-1994), así como la interacción molecular por ensayos de apagamiento de fluorescencia y de transferencia de energía (FRET) (Cabre-2009).

SP-C es una proteína extremadamente hidrofóbica, se encuentra compuesta por 35-36 aa., mayoritariamente valina, leucina e isoleucina (66% de aminoácidos hidrofóbicos), siendo la única proteína específica del SP (ten Brike-2002). Mezclas de SP-B y SP-C aumentan la velocidad de absorción de los fosfolípidos (Nag-1996a; Schurch-2010). Al igual que SP-B, SP-C tiene características que permiten alterar la recaptación de los fosfolípidos por los N-II (Weaver-Whitsett-1991). Presenta una secuencia transmembrana de 12 aa. y dos cisteínas en las posiciones 5 y 6 que se encuentran palmitoiladas en la mayoría de las especies; este extremo N-terminal presenta una estructura flexible lo que le permite una gran versatilidad en la interacción con estructuras multilamelares. Se plantea un fuerte rol en la promoción de la disponibilidad de estructuras membranosas en bicapa de la hipofase a la monocapa de la interfase aire/líquido. Esto permitiría un mejor intercambio de FL desde la interfase a la hipofase y viceversa durante la compresión/expansión en el ciclo respiratorio (Pérez-Gil-2001). La pérdida de los palmítoilos conlleva a la formación de estructuras beta y fibras amiloides, como las encontradas en la proteinosis alveolar (Johansson-2003). Su función asociada a SP-B permite el

correcto funcionamiento del sistema, mostrando la importancia de las interacciones lípido-proteína en el SP (Serrano-2006; Perez-Gil-2008b). (ver figura 15)



Al igual que SP-B, SP-C podría contribuir además a facilitar la formación de estructuras no lamelares necesarios para la fusión entre bicapas y monocapas (Chavarha-2010).

SP-C estabiliza la película interfacial sometida a ciclos de compresión-expansión dinámica, disminuyendo la histéresis o pérdida de material en los sucesivos ciclos respiratorios. La proteína permitiría la reextensión de la película durante la inspiración, y, a través del mantenimiento de la integridad del reservorio, proporcionaría una mayor estabilidad durante la espiración, lo que explicaría que su ausencia produzca a largo plazo alteraciones debidas a una estabilidad reducida, tales como el enfisema pulmonar (Glasser-2003).

Se propone que SP-C podría interactuar con el colesterol (Taneva-Keough-1997), mejorando las propiedades dinámicas de la monocapa en presencia de concentraciones elevadas de colesterol. Esto se ha demostrado en experimentos de actividad tensoactiva, evidenciándose un incremento de la estabilidad mecánica a elevadas presiones superficiales pese a incluir elevadas concentraciones de colesterol (Gomez-Gil-2009). Un aspecto clave en toda la función de la proteína es la palmitoilación (Baumgart-2010).

2.4.2. Funciones del surfactante pulmonar

El SP se aloja en el espacio alveolar y cumple dos funciones básicas: 1) respuesta inmunológica innata a patógenos que ingresan al sistema respiratorio y 2) disminución de la tensión superficial en la interfase alveolar aumentando la complacencia pulmonar y disminuyendo el colapso alveolar durante el ciclo respiratorio. Sin dejar de lado el importante rol inmunológico, dados los intereses de esta tesis nos abocaremos al estudio de su capacidad tensoactiva.

Desde el punto de vista tensoactivo, el SP cumple con tres funciones básicas que pueden resumirse como:

i) transferencia de material tensoactivo de la hipofase acuosa del epitelio alveolar a la interfase aire/líquido para formar una monocapa (ó film) con acción superficial activa.

ii) reducción de la tensión intra-alveolar cercana a cero mN/m durante la comprensión de la superficie alveolar en la espiración.

iii) permitir la re-expansión de la monocapa en el proceso de inspiración (Serrano-2006).

Como vimos anteriormente estas características muy importantes e imprescindibles para el correcto funcionamiento del sistema pulmonar son debidas a la compleja composición del SP y las propiedades de sus componentes.

2.4.3. Tensión superficial en el contexto del pulmón

La definición de la tensión superficial necesita de pensar en cómo se organizan las moléculas en un líquido. Entonces si cada molécula puede establecer interacciones en todas las direcciones, motivo por el cual puede decirse que todas las interacciones en el espacio tienen una contraparte opuesta que compensa esta interacción. Si pensamos entonces en las moléculas que se encuentran en la interfase líquido/gas, es posible identificar que las moléculas en la interfase no podrán compensar la fuerza que se genera con la capa íntima de contacto por no tener contra par en el espacio aéreo. Por lo cual presentan un componente neto cohesivo hacia la masa de líquido. Termodinámicamente esto hace que la superficie minimice su área, dado que

generar nuevas o expandir esta interfase supone un gasto de energía al trasladar moléculas en equilibrio del líquido a la interfase. La energía necesaria da lugar a una tensión superficial (γ), que es la fuerza necesaria para expandir el área superficial del sistema (ver figura 16).

Un surfactante es toda molécula anfipática con afinidad por una interfase aire-líquido, donde se ubica de manera de formar una monocapa que puede ser capaz de disminuir la tensión superficial. Esto 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).

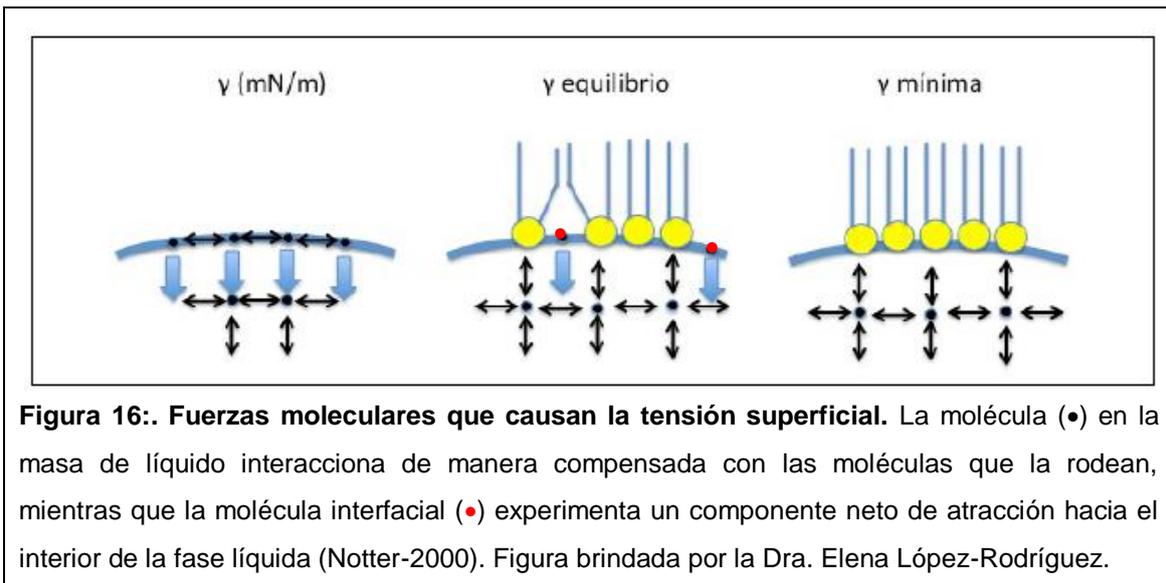


Figura 16: Fuerzas moleculares que causan la tensión superficial. La molécula (•) en la masa de líquido interactúa de manera compensada con las moléculas que la rodean, mientras que la molécula interfacial (•) experimenta un componente neto de atracción hacia el interior de la fase líquida (Notter-2000). Figura brindada por la Dra. Elena López-Rodríguez.

Definiéndose entonces la presión superficial (π) como la reducción de tensión superficial en una interfase agua/aire por la presencia de una película de material surfactante: y se define $\pi = \gamma_0 - \gamma$; donde γ_0 es la tensión superficial del agua y γ es la tensión superficial cuando el surfactante está presente en la superficie (Notter, 2000).

Según la Ley de Laplace, la presión en el interior de una burbuja es directamente proporcional a la tensión superficial e inversamente proporcional al radio de la burbuja. Motivo por el cual cuanto menor es el radio de burbuja, entonces mayor es la presión que soportan sus paredes (ver figura 17).

En el contexto pulmonar la disminución del radio alveolar cuando se produce la espiración ocasionaría que los alveolos más pequeños colapsen dado la alta tensión superficial (≈ 70 mN/m) de la capa de agua que recubre el epitelio alveolar. El surfactante pulmonar reduce la tensión alveolar muy

cercana a cero logrando que el cambio de volumen no incremente las presiones intra-alveolares haciendo colapsar el alveolo. Para esto es imprescindible la DPPC, dado que permite formar una película interfacial muy empacada (que se conoce como “tilt condensed” TC), la cual puede llegar a valores de tensión superficial cercanos a 0 mN/m al ser comprimidas lateralmente por la disminución del área en el alveolo durante la espiración (Possmayer-2001).

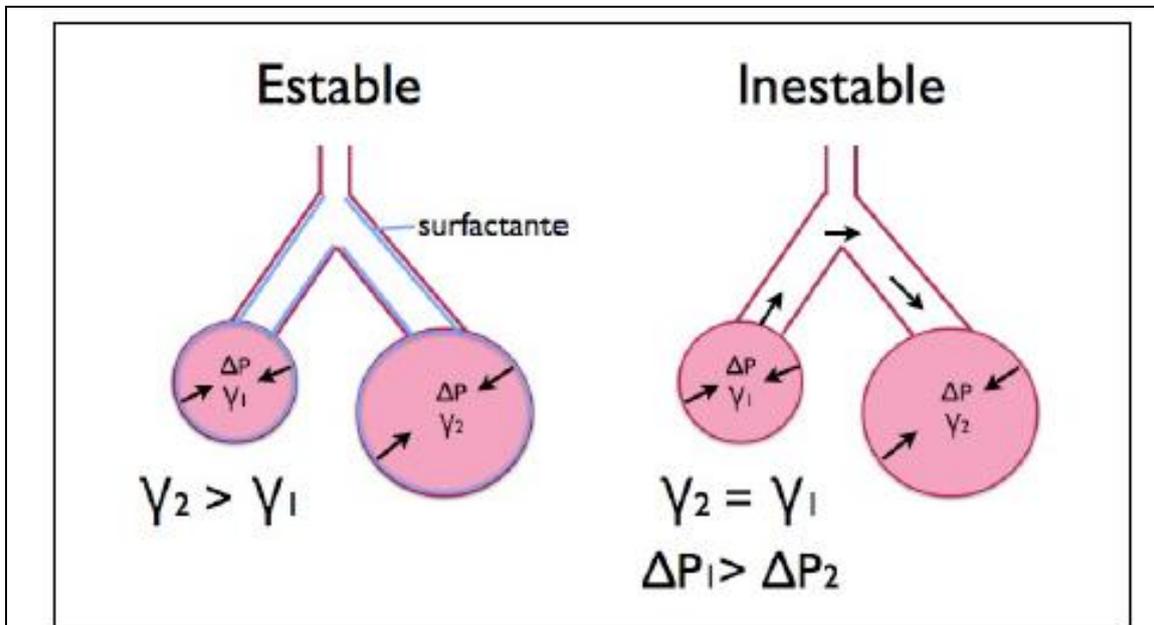


Figura 17: Teoría de Laplace. Según la Laplace, la presión (P) que tiende a cerrar una burbuja es directamente proporcional a la tensión superficial (γ) e inversamente proporcional al radio de la burbuja. Si no existiera el surfactante pulmonar, los alveolos pequeños colapsarían dentro de los mayores durante la espiración, debido a la diferencia de presión entre cámaras interconectadas de diferente tamaño. (Imagen brindada por la Dra. Lopez-Rodriguez)

2.4.4. Relación entre estructura y función del SP

Se ha encontrado una estrecha relación entre el orden lateral de vesículas gigantes reconstituidos de SP nativo y el contenido de colesterol, que a 37°C permite la co-existencia de fase Líquida ordenada y Líquida desordenada (Lo/Ld) necesaria para un correcto funcionamiento en la absorción, colapso ordenado y re-expansión de la monocapa. Específicamente se conoce que el colesterol permite el “scaffold” (andamiaje) para el anclaje de las proteínas hidrofóbicas asociadas del SP en fase Ld (Bernardino de la Serna-2004), ver figura 18.

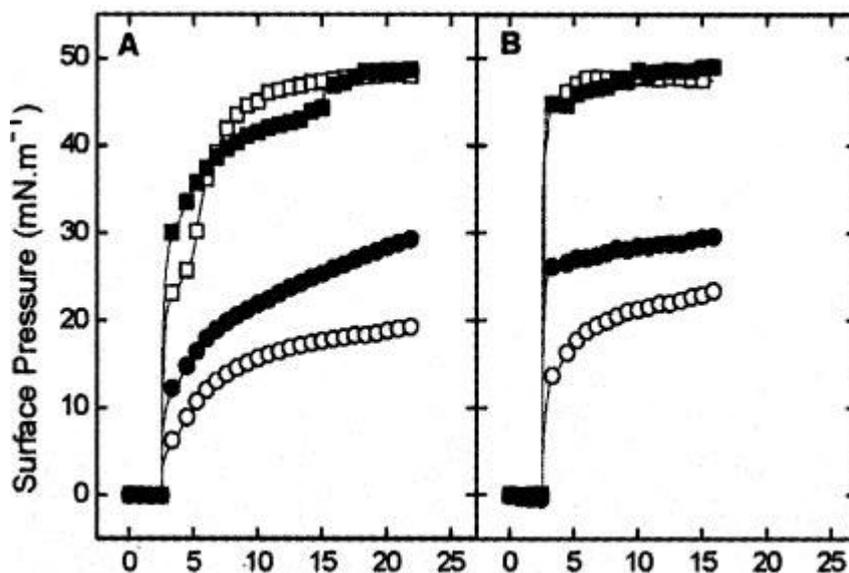
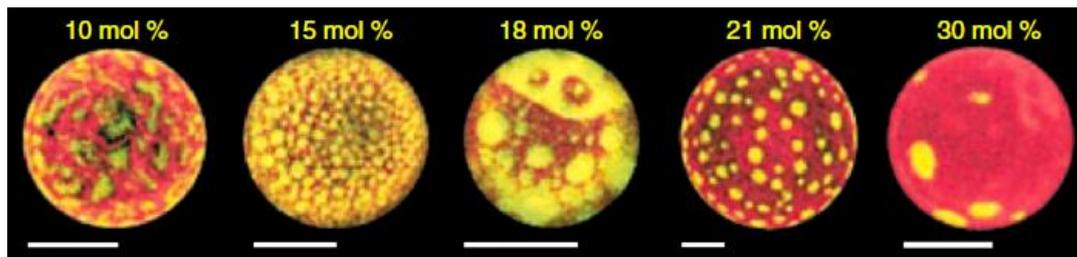


Figure 18: Imágenes de GUVs de surfactante pulmonar con diferente proporciones de colesterol. A y B) Cinéticas de adsorción de diferentes mezclas con y sin colesterol. (extraído de Bernardino de la Serna-2004)

Un dato relevante resulta de comparar la composición del SP entre mamíferos, donde se observa que las diferentes especies ajustan su composición de FL con la saturación adecuada y contenido de colesterol para que se optimice su sistema respiratorio y permita la co-existencia de fase Lo/Ld para el correcto funcionamiento del SP en temperatura, frecuencia ventilatoria, etc. (Perez-Gil-2008, Suri-2012).

La coexistencia de fases Lo/Ld es imprescindible para evitar una pérdida definitiva del material tensoactivo de la interfase alveolar (squeeze-out). Durante la compresión de la monocapa en la interfase alveolar, las membranas logran generar un orden muy compacto conocido como fase sólida (TC). Este orden lateral es responsable de la disminución de la tensión superficial en la interfase al final de la espiración y no es posible seguir comprimiendo esta fase.

La co-existencia de fases Lo/Ld y de proteínas hidrofóbicas asociadas a la fase desordenada permiten una exclusión ordenada del material tensoactivo a la hipofase durante la compresión en la espiración (asociado a la formación de estructuras hexagonales inversas, H_{II}), para luego poder ser re-absorbido durante la inspiración e impedir la formación de una fase gas asociado a la falta de material tensoactivo (Fosfolípidos)(Zang-2011). Como vimos anteriormente las proteínas hidrofóbicas del SP tienen un rol crucial para el correcto funcionamiento del mecanismo de exclusión/inclusión (Perez-Gil-2008).

Por último, nos parece importante destacar un dato relevante en las propiedades del surfactante pulmonar relacionado con su composición y estructura: trabajos recientes del grupo del Dr. Perez-Gil han podido constatar que la presencia de SP en una interfase aire/agua favorece la difusión de O_2 (Olmeda-2010). Se piensa que esto es debido a la oligomerización de las proteínas hidrofóbicas (SP-B y SP-C) y a la formación de canales lipoproteicos que promueven la difusión de moléculas cargadas como no cargadas (Olmeda-2010, Parra-2011,2013).

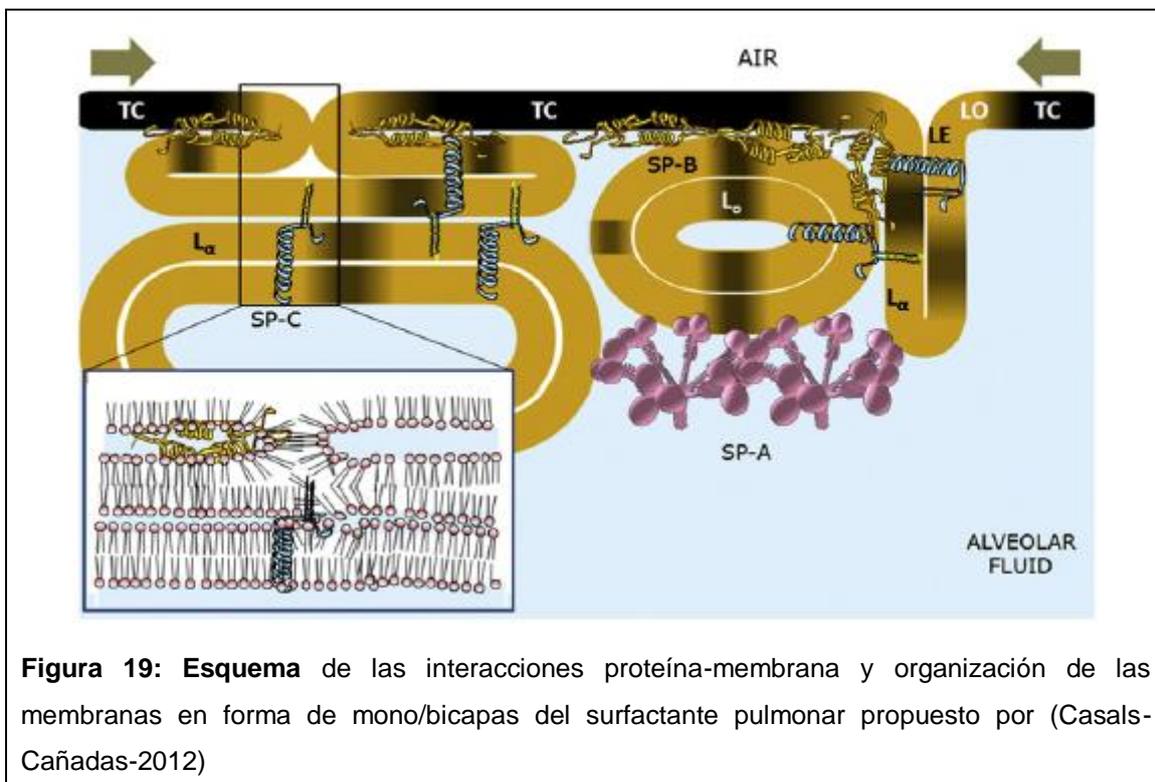


Figura 19: Esquema de las interacciones proteína-membrana y organización de las membranas en forma de mono/bicapas del surfactante pulmonar propuesto por (Casals-Cañadas-2012)

2.5. Lesión Pulmonar y Surfactante Pulmonar

2.5.1. Lesión Pulmonar y patologías respiratorias

Aproximadamente 25.000 pacientes al año ingresan en Uruguay a Unidades de Medicina Intensiva (UMI). De ellos, hasta un 75% pueden requerir Asistencia Respiratoria Mecánica (ARM) debido a múltiples causas.

Uno de los principales motivos para iniciar la ARM es la insuficiencia respiratoria determinada por el Síndrome Distress Respiratorio Agudo (SDRA) y la Lesión Pulmonar Aguda (LPA). En Estados Unidos se estima que estas patologías representan 190.000 casos por año con una mortalidad del 50 %, representando para el sistema de salud un alto costo de tratamiento (Rubinfeld-2007).

Las dos patologías (SDRA y la LPA) tienen en común la presencia de inflamación a nivel pulmonar y sistémico que deterioran característicamente las funciones del epitelio alveolar: barrera de intercambio gaseoso, reabsorción del edema pulmonar y síntesis-secreción-función del surfactante pulmonar (Matthay-2011). Clínicamente, el SDRA va acompañado de un aumento de la permeabilidad alveolo-capilar que conlleva liberación de proteínas del plasma y edema en los espacios alveolares. La consecuencia inmediata es la inactivación del surfactante, la aparición de atelectasia (colapso alveolar) asociado a un aumento de la tensión superficial mínima durante la espiración y la alteración del intercambio gaseoso. En el tiempo, estas alteraciones se agravan por la aparición de fibrosis pulmonar como consecuencia de un aumento de la matriz de colágeno en el espacio alveolar (Gunther-2001).

2.5.2. Patologías asociadas a surfactante pulmonar

Al momento actual, existe abundante evidencia asociada a la estrecha relación entre la alteración del Surfactante Pulmonar y el desarrollo de LPA (Zuo-2008, Bein-2009, Gunther-2001). Se han reportado diversos mecanismos para el deterioro del Surfactante Pulmonar como: acción de especies reactivas del oxígeno (Rodríguez-Capote-2006), poluentes (Stenger-2009) ó gases fluorocarbonados (Gerber-2006), así como marcado incremento de proteínas plasmáticas y proteína C-reactiva en el fluido epitelial (Gunther-2001, Saenz-2010).

En pacientes adultos con SDRA por diferentes causas (Sepsis, Aspiración, Trauma y otras etiologías), se genera un patrón característico en el contenido de ciertas especies lipídicas y proteicas relevantes para la función del surfactante pulmonar. En el lavado bronquio alveolar (LBA) de dichos pacientes la relación PC/Liso-PC se ve alterada pero además existe disminución de PG, PI y PE. SP-A y SP-B también se encuentran disminuidas (Gregory-1991, Panda-2004). Mientras que en modelos de injuria por ventilación mecánica se ha identificado incremento de colesterol en el LBA (Veckeroth-2010). Sin dejar de lado los factores oxidativo e inflamatorios que agravan el panorama (Matthay-2011). Los mediadores inflamatorios alteran el metabolismo del surfactante al afectar la función del N-II, ocasionando una disminución de la fracción activa de surfactante (grandes agregados, LA) y un aumento de los pequeños agregados (SA), lo cual se debe a una disminución de la síntesis y secreción del surfactante y un aumento de la degradación de los LA (Panda-2004).

El efecto de las proteínas plasmáticas como la albúmina, el fibrinógeno o la hemoglobina han sido estudiadas tanto in vivo como in vitro (Venkitaraman-1990, -1991; Martínez Sarrasague-2012, -2013). El mecanismo propuesto es mediado por una competencia por la interfase aire-agua, las proteínas llegan antes y ocupan los espacios impidiendo que el surfactante pueda localizarse en la interfase y llevar adelante su función (Holm-1988; Warriner-2002).

Los recién nacidos cuando tienen presencia de meconio (heces fetales producidas durante estrés prenatal, el cual tiene elevadas concentraciones de colesterol y sales biliares) en el líquido pulmonar antes del nacimiento, condiciona su capacidad tensoactiva provocando una incapacidad para llevar adelante su función (López-Rodríguez-2011).

En estudios recientes de tipo metabólico se ha podido identificar una alteración de los componentes energéticos y de algunos lípidos de las membranas durante la ventilación mecánica con volúmenes corrientes elevados (Izquierdo-García-2014).

2.6. Anestesia, anestésicos y sus efectos sobre membranas y surfactante pulmonar

2.6.1. Anestesia

En 1275 el médico mallorquín Ramón Llull produjo un líquido volátil e inflamable al cual lo llamó vitriolo dulce. Fue en el siglo XVI que Paracelso (médico de origen suizo) que durmió unos pollos al hacerles inhalar vitriolo dulce, y lo más importante es que observó que también perdían la sensibilidad al dolor. Ni él ni Llull experimentaron con seres humanos. El químico alemán August Sigmund Frobenius en Londres le dio a este líquido el nombre por el que lo conocemos actualmente, éter, que en griego significa “cielo”. Sin embargo, no fue hasta marzo de 1844 que se usó éter como anestésico, donde Crawford Williamson Long lo usó para extirparle sin dolor a un paciente un tumor de cuello, sin embargo no publicó sus resultados hasta 1949. Motivo por el cual, parte de los créditos de la primera anestesia pública con el éter son para William Thomas Green Morton en el Hospital de Massachusetts, el cual el 16 de Octubre de 1846 lleva adelante una extirpación de un bulto en la mandíbula de Gilbert Abbott.

Pese a ya haber pasado más de 170 años de su uso médico por primera vez, y a casi 120 años de la introducción de la teoría de los narcóticos por Overton y Meyer, los mecanismos y efectos laterales de la anestesia inhalatoria siguen siendo objeto de debate (ver figura 20).

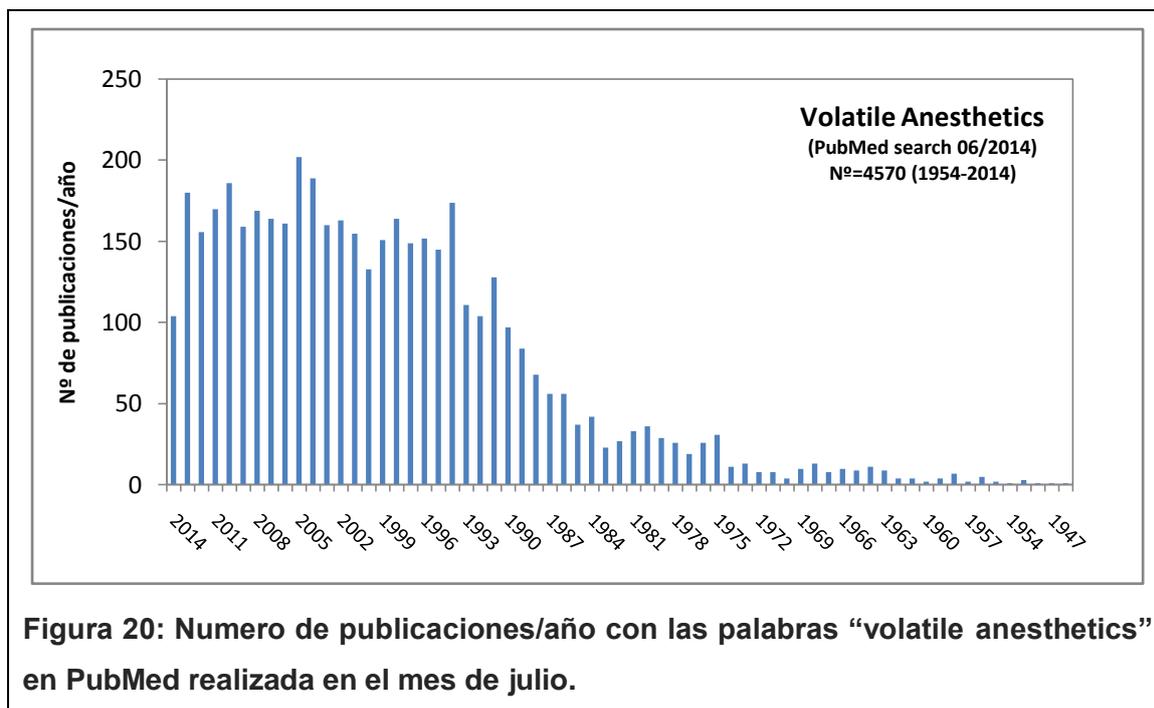


Figura 20: Numero de publicaciones/año con las palabras “volatile anesthetics” en PubMed realizada en el mes de julio.

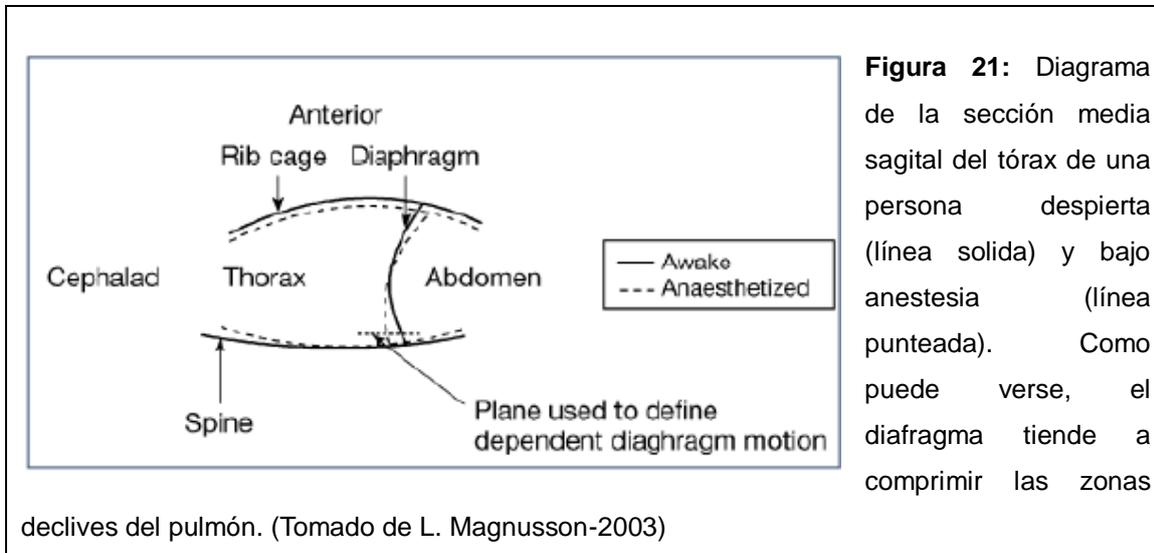
En el mundo occidental se realizan 20 millones de anestésias generales por año. La anestesia general modifica la función pulmonar: altera la mecánica del sistema respiratorio y el intercambio gaseoso. Esta alteración es transitoria y la función normal se recupera un tiempo después de la anestesia y la cirugía. Sin embargo un grupo de estos pacientes pueden desarrollar complicaciones respiratorias en el acto quirúrgico o en el postoperatorio inmediato vinculado a la misma (Stoelting-1999).

La hipoxemia se produce en la mayoría de los sujetos anestesiados, por lo cual se agrega oxígeno al gas inspirado, manteniendo la fracción inspirada por encima de 0.3 a 0.4 (Nunn-1965). En el postoperatorio inmediato, la mitad de los pacientes coordinados para tratamiento quirúrgico presentan una hipoxemia leve a moderada (definida como una saturación de oxígeno arterial entre 85 a 90%) que puede durar de algunos segundos hasta 30 minutos (Moller-1991). Más preocupante es el hecho que alrededor de un 20% de esos pacientes, puede presentar una hipoxemia severa (saturación menor de 81%). En el postoperatorio más de la mitad de los pacientes muestran signos subclínicos de disfunción pulmonar, y del 1 al 3% requiere tratamiento con oxígeno terapia y/o asistencia respiratoria mecánica (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. 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. La relajación del diafragma necesaria para ventilar a los pacientes sometidos a anestesia general lleva a un aumento de la presión transmitida al tórax lo que genera atelectasias en zonas adyacentes por compresión, como puede verse en la figura 21 (Magnusson-2003; Duggan-2005).

Por otro lado las atelectasias por reabsorción de gases se producen por dos mecanismos; la primera ocurre luego de la oclusión total de la vía aérea ya que se genera un bolsillo donde queda atrapado gas que inicialmente se

encuentra a presión cercana a la atmosférica; el lavado de la sangre venosa genera una disminución de la presión parcial que vacía el bolsillo generando un colapso. El segundo mecanismo involucra una disminución en la relación ventilación/perfusión (relación V_A/Q baja) y FIO_2 alta (fracción inspirada de Oxígeno). (Magnusson-2003; Duggan-2005)



El último tipo de atelectasia se genera por daño del surfactante pulmonar, ésta es una de las hipótesis propuestas para la formación de atelectasias en pacientes sometidos a anestesia general. Los mecanismos plantean un deterioro de la barrera epitelial, lo cual puede producir 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 observa in vitro que genera aumento en las presiones intra-alveolares y posterior colapso (Duggan-2005).

En estudios con pacientes y tomografía computarizada, Hedenstierna ha podido demostrar que existe una inestabilidad alveolar en los pacientes durante la anestesia general (90%), la cual provoca colapso alveolar y aparición de atelectasias en parte declives del pulmón (Hedenstierna-Rothen-2000). Esto es revertido por el uso de patrones ventilatorios que intentan abrir el pulmón (alveolo) a partir de parámetros físicos, reclutamiento con presiones inspiratorias elevadas por 7-8 segundos (reclutamiento o maniobras de capacidad vital) o incrementos de la PEEP (presión al final de la espiración). Sin embargo, inmediatamente que se elimina el patrón de apertura física del pulmón (alveolo), este colapsa nuevamente en periodos muy cortos.

2.6.2. Anestésicos

Los anestésicos inhalatorios son moléculas hidrofóbicas que van desde el xenón a los modernos anestésicos que se utilizan en la práctica clínica como: halotano, enflurano, isoflurano y más recientemente, sevoflurano y desflurano (figura 22). Los mecanismos por los cuales los anestésicos halogenados (AH) inducen una depresión selectiva del sistema nervioso central, aun hoy se encuentran bajo debate, y básicamente puede dividirse en dos escuelas: una relacionada con el efecto sobre membranas y la afinidad que estas moléculas tienen por las estructuras hidrofóbicas de membranas, y un segundo grupo de pensamiento que se asocia con efectos sobre proteínas claves en la conducción nerviosa (Campagna-2003).

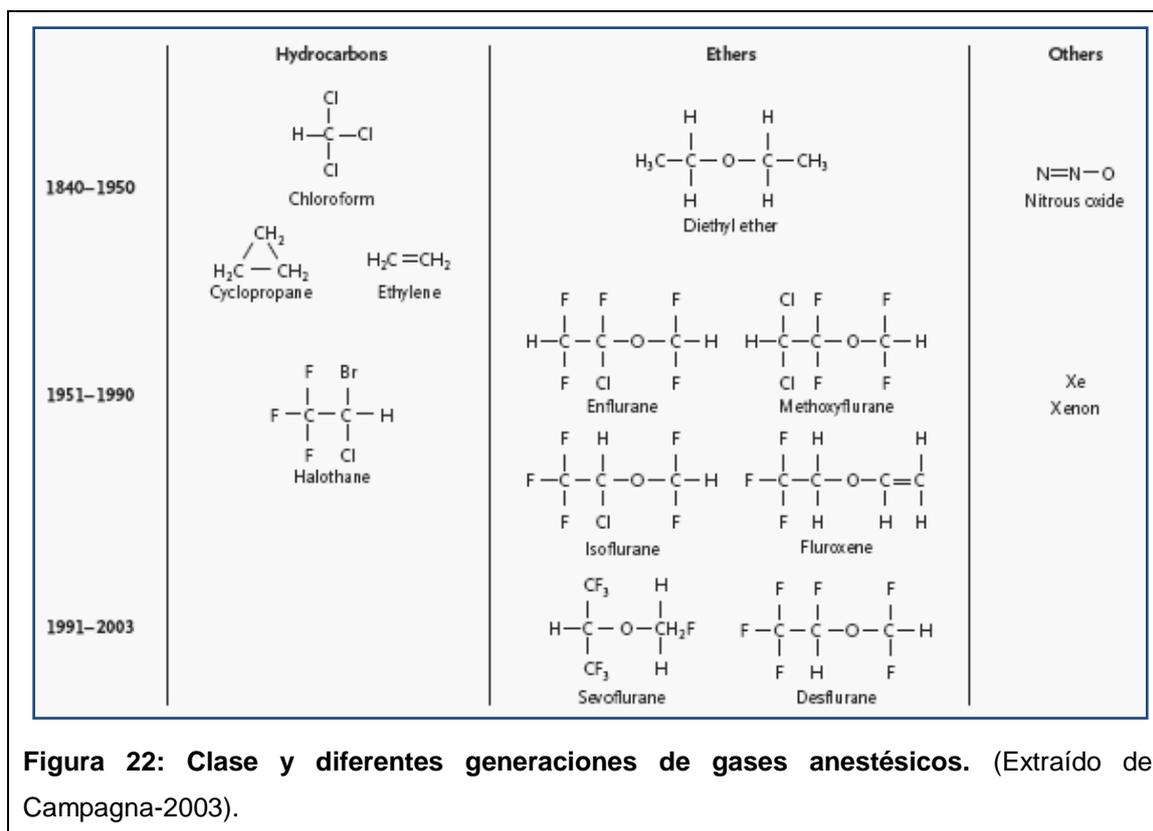
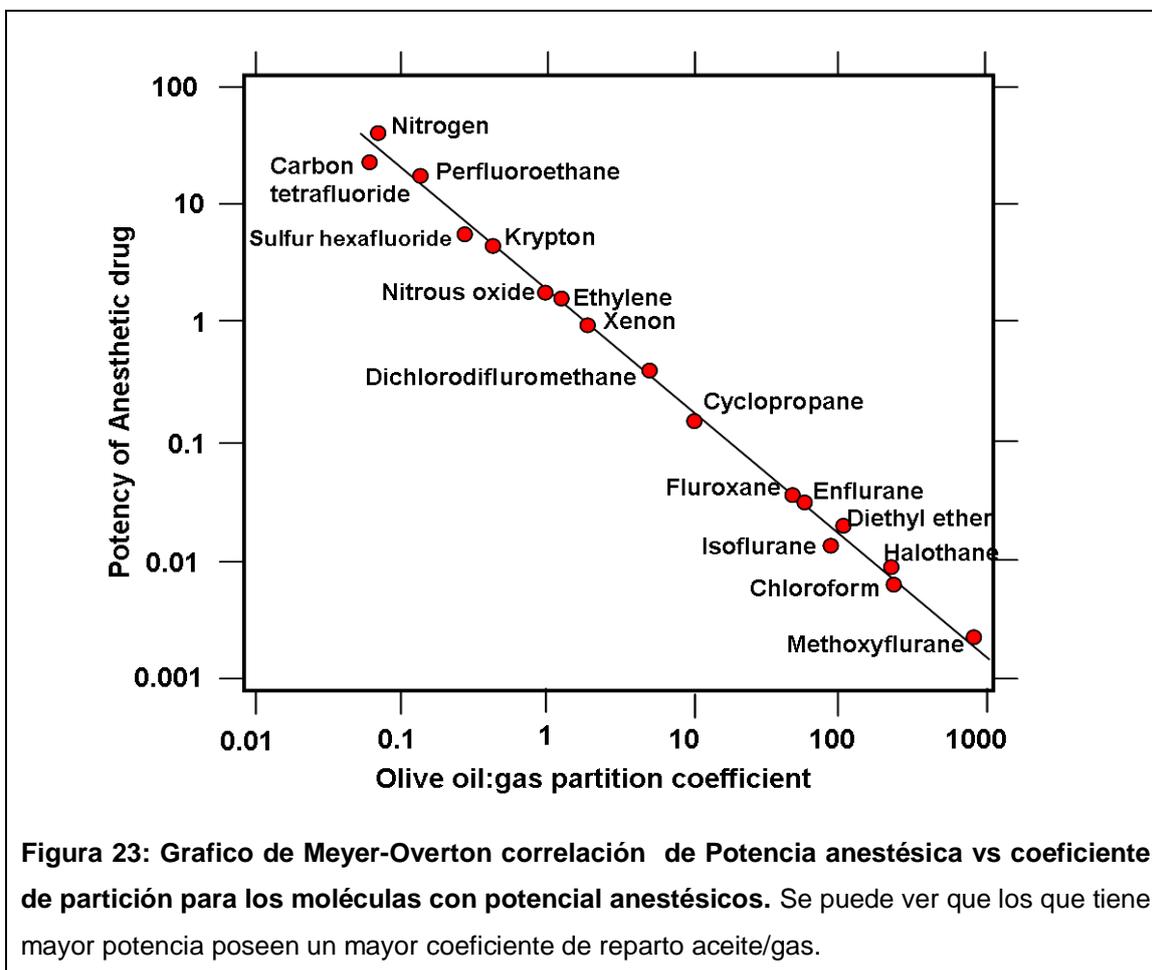


Figura 22: Clase y diferentes generaciones de gases anestésicos. (Extraído de Campagna-2003).

Desde principio del siglo XX, Meyer y Overton (Meyer-1899, Overton-1901) demostraron de manera independiente el efecto de cierto grupo de moléculas hidrofóbicas que tenían la capacidad de paralizar a renacuajos. Lograron identificar una relación inversamente proporcional entre la potencia anestésica (ED_{50} , dosis necesaria para paralizar al 50% de los renacuajos) y su reparto en una mezcla agua/aceite de oliva.

Esto conlleva al resultado de que, independientemente de la naturaleza química del anestésico, lo verdaderamente importante es la concentración crítica de anestésico disuelto en la membrana. Estos hallazgos se resumen para un número de anestésicos en la figura 23 (Heimburg-2007).



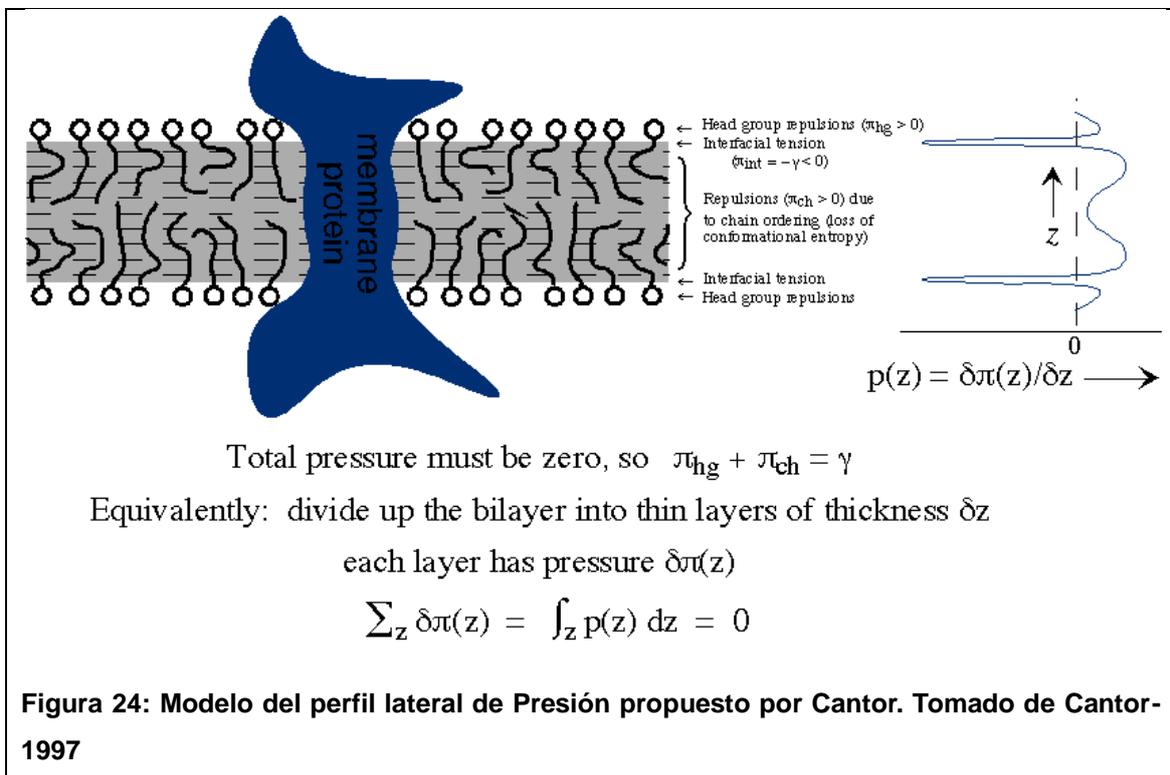
La escuela de la membrana tiene antecedentes en la teoría de la hipótesis expansión (Miller-1973), donde se proponía que el tamaño molecular de los anestésicos se correlacionaba con la potencia de la anestesia y a mayor tamaño mayor efecto. Esto es verdad pero tiene algunas discrepancias con la regla. Por otro lado, años después se demuestra que los anestésicos ocasionaban cambio en la separación de fases de membranas modelo que permitían en ciertos casos disminuir la transición de fases en 2-4°C (lamelar gel/líquido cristalina, $L\beta/L\alpha$) (Trudell-1977). Sin embargo, los defensores de la

escuela de las proteínas han discutido este efecto asociado con el efecto de la temperatura durante la fiebre, del efecto diferencial de los enantiómeros (Franks-Liebs-1980), así como el efecto de cutoff de los alcoholes (para cadenas más largas de 10-12 carbonos)(Katz-2003). Claramente, cuando sufrimos un proceso febril no estamos propensos a dormirnos como en una anestesia, sin embargo es interesante destacar el trabajo de Ueda, en el cual 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 aumento de movimiento molecular. Mientras que los anestésicos despliegan a las proteínas y fluidifican las membranas debido a su unión a las macromoléculas en la interfase. Donde la transición inducida por 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), refiriéndonos palabras de Issaku Ueda, *“Heat is energy; anesthetics are material”*.

Por otro lado, en trabajos previos se ha 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 las membranas. Se conoce que cada fosfolípido está coordinado por una primera esfera de hidratación de unas 30 moléculas de agua. De estas 18 moléculas, 9 están tan fuertemente coordinadas que no son congelables a 0°C (más aún, recién son cristalizables a -100°C). Sin embargo, cuando los anestésicos se localizan en la interfase agua/membrana, éstos afectan la constante dieléctrica local ocasionando una disociación de las estructuras hidrofílicas y el agua, liberando a estas moléculas de agua a temperatura ambiente y volviéndose cristalizables a 0°C (Yoshida-1984). Este efecto es mucho más complejo que la simple liberación de las moléculas de agua en la interfase agua/membrana, esto ocasiona una desorganización de las uniones electrostáticas entre los fosfatos negativos y las cabezas polares de colina, lo cual conlleva a alteración de la transición de fase (core de la membrana) (Kaminoh-1991).

Más recientemente, la teoría del *“Lateral Pressure Profile”*, propuesto por Robert Cantor basado en aspectos de termodinámica estadística y el modelo de superlattice, permite explicar el efecto de los anestésicos a través de los

cambios sufridos por la membrana en la presión lateral sobre las proteínas de membrana (Cantor-1997). Una membrana para ser lamelar debe de tener una suma de sus fuerzas de atracción y repulsión en la interfase de la membrana, más las interacciones hidrofóbicas del core de la membrana igual a cero (ver figura 24). En caso de que una molécula foránea (anestésico) se localice en la interfase de esta membrana (lugar identificado para la localización de los anestésicos halogenados, Koubi-2000), se produce un re arreglo de las fuerzas de repulsión y atracción, provocando un cambio en el perfil lateral de presión que permite explicar el efecto sobre los canales iónicos entre otros (ver figura 24). Esto ha sido testeado en varios trabajos posteriores y actualmente se han extendido los cálculos para las 3 dimensiones mostrando con claridad el potencial de la teoría, que permite explicar estados fuera de la lamelalidad y en la tercera dimensión de la membrana (Terama-2008; Samuli Ollila-2011).



Por último la teoría termodinámica de la anestesia propuesta por Heimburg y Jackson, basada en la depresión del punto de congelamiento, presenta argumentos termodinámicos que detallaremos a continuación (Heimburg-Jackson-2007). La teoría supone que es posible predecir la depresión del punto del congelamiento de una membrana modelo (o de interés)

basado en el reparto de los anestésicos por la fase fluida (esto supone que nada del anestésico en la fase acuosa puede solubilizarse en la fase gel), sabiendo la entalpia de transición y la temperatura de transición de fase.

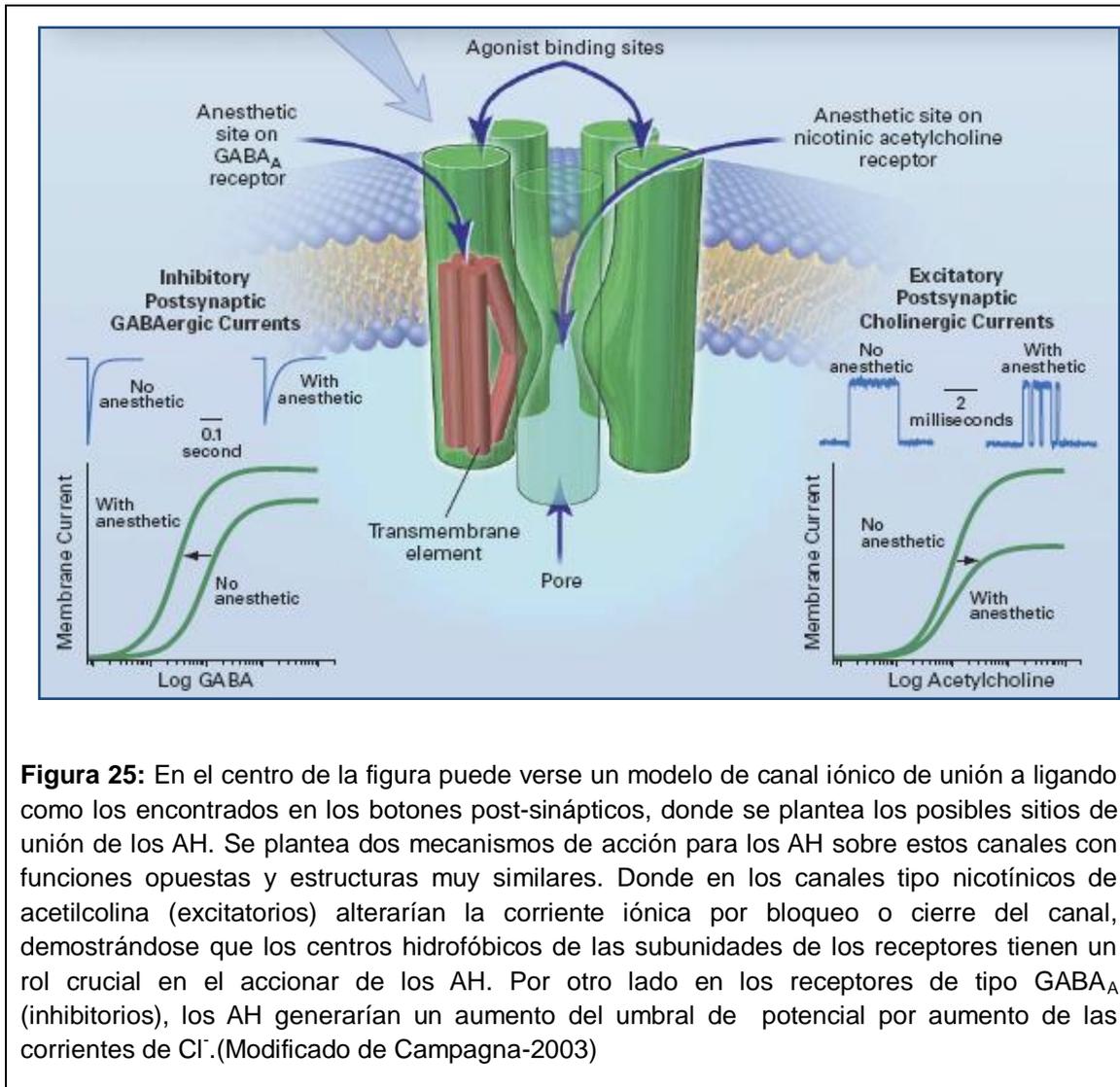
$$\Delta T_m = \left(\frac{RT_m^2}{\Delta H} \right) \chi_A$$

$$\chi_A = P \cdot ED_{50} \cdot V_L$$

Concluyendo que la fracción molar de los anestésicos en la dosis crítica es $\chi_A \approx 0.026$, y que el cambio de la transición de fase correspondiente es $\Delta T_m \approx -0,6$ K, independiente de la naturaleza química del fármaco anestésico. El modelo permite explicar con claridad los efectos de reversibilidad del efecto para la presión y el pH, y ha sido extendida para anestésicos intravenosos y locales en (Heimburg-2007, Graesbøll-2014).

Un dato relevante y que puede limitar los alcances de esta teoría es que se ha podido medir que el halotano tiene una débil solubilidad sobre la fase gel o sólida, reportándose en un 30% del disuelto en la fase fluida (Simon-1979; Kaminoh-1988).

Por otro lado la escuela de las proteínas plantea que los anestésicos pueden producir su efecto asociado a dos mecanismos de acción sobre canales en los botones sinápticos. En los canales tipo nicotínicos de acetilcolina (excitatorios) alterarían la corriente iónica por bloqueo o cierre del canal, demostrándose que los centros hidrofóbicos de las subunidades de los receptores tienen un rol crucial en el accionar de los AH. Por otro lado en los receptores de tipo GABAA (inhibitorios), los AH generarían un aumento del umbral de potencial por aumento de las corrientes de cloruro (Campagna 20-11), ver figura 25.



Se ha observado una alteración dependiente de los anestésicos halogenados en los canales iónicos de la súper familia “cysteine-loop” receptores de neurotransmisores como pueden ser el receptor de acetilcolina, serotonina tipo 3, GABA_A, receptor 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 anestésicos, generado una inhibición de las corrientes iónicas. La hipótesis plantea que exista un aumento de la actividad inhibitoria de los canales postsinápticos (GABA_A y receptores de glicina) e inhiban la actividad excitatoria de los canales sinápticos (nicotinamida acetilcolina, serotonina y glutamato) (figura 24)(Campagna-2011).

Para fundamento de esta teoría se han observado que estas proteínas tienen pequeños bolsillos o cavidades (pockets) que podrían ser consideradas como defectos y que en realidad muchas veces son utilizadas para cargar ligandos y llevar adelante alguna función enzimática, estas cavidades son especialmente de interés en el estudio de las interacciones específicas de los anestésicos con proteínas. Deben poseer un tamaño interior y entorno adecuado para alojar una molécula de anestésico y se ha calculado que 15% de las proteínas cristalizadas en el banco de estructuras PDB, poseen cavidades mayores a 150 Å³ que permiten acomodar una molécula de anestésico. Se ha evaluado en diferentes proteínas modelo (sero albúmina, luciferasa, mioglobina, adenilato kinasa, haloalqueno deshidrogenasa y lizosima T4, son algunos ejemplos) los efectos estéricos que producen, cambios conformacionales, actividades enzimáticas, estabilidad térmica, etc; y en todos estos se ha concluido que esta interacción anestésico-proteína es específica, pudiéndose determinar la estequiometría y las constantes de afinidad (Eckenhoff-2001).

2.6.3. Efecto de los anestésicos en modelos in vivo e in vitro sobre el pulmón y el surfactante pulmonar

Existe escasa y antigua bibliografía que aborde los efectos biofísicos de los anestésicos halogenados (AH) sobre el surfactante pulmonar, además de reportar anestésicos ya en desuso (Miller-1967; Woo-1969; Stanley-1972). Más recientemente Tobin y colaboradores publicaron una revisión donde plantean que alteración de las capacidades tensoactivas del surfactante pulmonar pueden verse comprometidas por el uso de AH, pero sin embargo no ahondan en el mecanismo del proceso (Tobin-2000) y utilizan extrapolaciones de sistemas sintéticos similares al surfactante pulmonar. Existe al momento actual, un solo trabajo del grupo de Enhorning, que reporta el efecto de halotano, cloroformo, enflurano, acetona y dietil éter sobre surfactante pulmonar, identificando afectación de la capacidad tensoactiva para el halotano, pero no a las concentraciones de uso como anestésico (Enhorning-1986).

Se han realizado múltiples estudios sobre los efectos mecánicos de la anestesia inhalatoria y sobre cómo estos agentes anestésicos alteran la fisiología pulmonar normal durante y luego del período anestésico.

El halotano promueve un aumento de la elastancia estática y del componente viscoelástico del pulmón y una disminución del componente viscoso, el isoflorano aumenta la presión viscoelástica, cuando se los compara con un grupo control anestesiado con pentobarbital sódico. El análisis histológico de los pulmones tratados con halotano mostró la existencia de microatelectasias, lo cual explicaría 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).

Correa et al, mostró que el sevoflorano aumenta la presión viscoelástica y la elastancia estática del pulmón (Correa-2001). Estos resultados se explican por modificaciones en las constantes de tiempo regionales dentro del pulmón ("pendelluft") y en el estrés de relajación al modificarse las propiedades viscoelásticas del tejido pulmonar. La diferencia de acción de los distintos agentes sobre la presión viscosa y la elasticidad pulmonar probablemente se vincule a la mayor potencia del halotano sobre el isoflurano y el sevoflurano.

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 N-II expuestos a los halogenados (Molliex-1994).

En 1977 (Morr-Strathmann-1977) estudiando los efectos del halotano y el enflurano en la mecánica respiratoria de sujetos sanos, encontró una disminución de la complacencia estática. Planteó como hipótesis que podría producirse una interferencia en la tensión superficial alveolar o cambios transitorios en el contenido de fluidos intrapulmonares.

El epitelio distal del pulmón previene la acumulación de fluidos dentro de los espacios aéreos manteniendo el transporte de sodio (y de agua) hacia fuera de los mismos (Verbrugge-1998). Saïda Rezaiguia-Delclaux muestra una disminución del clearance de fluidos luego de la exposición al halotano y al isoflurano (Rezaiguia-Delclaux-1998). Y en estudios con halotano se demostró

que inhibe el transporte de sodio in vitro (Molliex-1998). El efecto estaría determinado por la acción de la droga a nivel de los canales de sodio y de la Na,K-ATPasa. Estos dos canales son los mayores determinantes del transporte de sodio en las células epiteliales alveolares. En dicho estudio, el halotano indujo un descenso en la actividad de la Na,K-ATPasa y en el canal de sodio sensible a la amiloride.

Motivación

Permítanme iniciar esta sección con la siguiente reflexión de Claude Bernard:

. . .let us remember that chloroform does not act solely on the nerve tissues. Far from that, it has an action on all the tissues and attacks each one at a time which is a function of its susceptibility. . . An anesthetic is not a special poison for the nervous system. It anesthetizes all the cells, benumbing all the tissues, and stopping temporarily their irritability. . . We can study elsewhere than in the central nerve cells the phenomenon which causes this stoppage of action and. . . It is permissible to assume that something similar happens in the nerve cell.

Claude Bernard-1971

Nuestra motivación está basada en esta reflexión de Claude Bernarde y en la contextualización de que el surfactante pulmonar es la primera barrera a los anestésicos inhalatorios y cualquier sustancia que ingrese al organismo por esta vía. Motivo por el cual, la concentración máxima de los anestésicos en el organismo debería de encontrarse en el epitelio alveolar. Por otro lado, dado el contenido lipoproteico y basado en los antecedentes antes mencionados nos permite plantear la hipótesis de un mecanismo directo/indirecto de los anestésicos halogenados sobre el surfactante pulmonar, mediado por una alteración del contenido de surfactante pulmonar o de las interacción lípido-lípido y/o lípido-proteína (SP-B y/o SP-C con los FL de la fase Ld), que permitan explicar una alteración de su función.

La afectación debería de ser mediada por un incremento de la tensión mínima del surfactante durante la compresión del ciclo respiratorio, produciendo una pérdida de material tensoactivo y el consiguiente colapso alveolar. Esto permitiría explicar la alteración de la mecánica ventilatoria y el estado hipoxémico que se observa en estos pacientes.

Objetivos:

4.1. Objetivo General:

Estudiar parámetros estructurales, dinámicos y funcionales del Surfactante Pulmonar durante la Lesión Pulmonar Aguda.

4.2. Objetivos Específicos:

4.2.1. *Estudiar en un modelo in vivo de rata las alteraciones fisiopatológicas de sistema respiratorio durante la anestesia con sevoflurano.*

4.2.2. *Valorar la capacidad tensoactiva del SP con y sin el uso de sevoflurano.*

4.2.3. *Analizar el comportamiento termodinámico (C_p , ΔH , T_m y $T_{1/2}$), del surfactante pulmonar con y sin el agregado de sevoflurano.*

4.2.4. *Estudiar la solvatación en la interfase de membrana reconstituidas de SP con y sin el uso de sevoflurano.*

4.2.5. *Estudiar la interacción lípido-lípido y lípido-proteína en membranas reconstituidas de SP, valorar la acción de sevoflurano.*

4.2.6. *Determinar alteraciones en la micro y nano estructura del SP durante la Lesión Pulmonar por sevoflurano.*

4.2.7. *Estudio del comportamiento dinámico del orden lateral en membranas reconstituidas de SP durante la Lesión Pulmonar por sevoflurano.*

Materiales y Métodos

5.1. Obtención de Surfactante pulmonar y sus fracciones.

La obtención del LBA se realiza según protocolo autorizado por la CHEA (Exp. N° 071140-001013-11), a pulmones de cerdo luego de su deposición por el Dpto. Básico de Cirugía o provenientes del frigorífico tal como describe (Jimenez-Cabré-2009). Los lavados broncoalveolares de cada par de pulmones se obtuvieron introduciendo por la tráquea aproximadamente 1L/Kg de pulmón de tampón Tris 5mM pH 7, NaCl 150 mM, masajeando los pulmones y vertiendo su contenido en un recipiente con una gasa para filtrar los posibles restos de tejido. El lavado se realizó 2 veces para cada aparato respiratorio. Luego 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) y iii) centrifugación 120.000g x 120 min a 4°C en gradiente discontinuo de NaBr en NaCl 150 mM (0-13-16 %) del pellet obtenido anteriormente (Jimenez-Cabré-2009). Este pellet corresponde a mezclas de vesículas multilamelares (MLVs), cuerpos lamelares, mielina tubular y otros componentes del surfactante pulmonar con gran capacidad tensoactiva (se diluyo en buffer Tris 5 mM, pH 7,4 con 150 mM NaCl a la concentración deseada y se considera como, Surfactante Pulmonar Nativo-SPN. 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, EO-SP), para obtener las proteínas hidrofóbicas es necesario realizar una cromatografía de gel filtración en solvente orgánico (Columna 1.5 x 100 cm de Sephadex-LH-20, GE) con lo que se obtiene el ESP sin Proteínas (ESP_{wp}) y también ESP sin lípidos neutros (s/colesterol-ESP_{wc}) tal como describió (Jimenez-Cabré-2009). 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.

5.2. Determinación de lípidos y proteínas

5.2.1. Determinación de la concentración de fosfolípidos

La cuantificación de fosfolípidos se realizó a todas las muestras de origen animal y mezclas sintéticas siguiendo el método de Rouser (Rouser-1966). Este método se basa en la determinación del contenido de fósforo presente en los fosfolípidos previa conversión en fosfato inorgánico.

Es necesario preparar una curva estándar con KH_2PO_4 , que se coloca en tubos de vidrio, así como las muestras problema y se secaron en un baño de arena a temperatura aprox. 260°C . Luego de que no quedaran resto de solvente se realizó la mineralización del fósforo, incubando a las muestras con 450 μl de ácido perclórico a 260°C durante 60-90 minutos con los tubos tapados con canicas de vidrio para evitar la evaporación.

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

5.2.2. Determinación del perfil de fosfolípidos en el lavado bronquioalveolar (LBA).

El perfil de fosfolípidos fue caracterizado por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), en un equipo Agilent 1100 equipado con una bomba cuaternaria y detector de arreglos de diodos. El método fue una modificación de (Shafiq-1991). Se separaron las especies fosfolipídicas con una columna de sílica cuyas dimensiones fueron 250x4.6 mm y 5 μm de tamaño de partícula. La fase móvil fue acetonitrilo:metanol:ácido perclórico (en proporciones 100:10:1.8 v/v) y se utilizó a flujo de 1.5 ml/min con el horno de columna a 50°C . Los fosfolípidos fueron identificados y cuantificados a través de una curva de calibración para cada especie (Fosfatidilcolina, liso-fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina).

5.2.3. Concentración total de proteínas en el lavado bronquioalveolar

La concentración total de proteínas se estimó a partir del método de Bradford, como previamente se describió (Bradford-1976). Se usaron soluciones de albumina bovina como estándar de calibración y se incubaron las muestras y la curva de calibración con el reactivo de Bradford por 10 min, luego se midió la concentración en un lector de placas (Finstruments® Multiskan Model 349 96 well Microplate Absorbance Reader.) a 595 nm.

5.3. Preparación de mezclas lipídicas

Las suspensiones lipídicas en esta tesis han sido mayoritariamente preparadas a partir de lípidos de origen comercial (DOPC, DPPC, DLPC, SM, Colesterol), adquiridos en Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA) o Sigma (St Louis, MO, USA), o de origen animal tal como se describió anteriormente. Luego de realizadas las mezclas los diferentes sistemas podían ser usados en ensayos de fluorescencia, calorimetría, microscopia, etc. Dependiendo de las necesidades de cada método se generaban diferentes tipos de vesículas.

5.3.1. Preparación de vesículas multilamelares (MLV)

Para obtener las vesículas multilamelares (MLV, del inglés Multi-Lamellar Vesicles), las mezclas de lípidos adecuadas se mezclaron en un frasco de vidrio (vial) en las proporciones deseadas y se secaron bajo corriente de N₂, luego se dejaron durante dos horas en SpeedVac eliminar las trazas de solvente orgánico.

Las MLVs se obtienen de re-hidratar la película de lípidos con agua MiliQ o Buffer a temperatura por encima de T_m dependiendo de la necesidad del experimento, se agita en baño por 1 h a temperatura por arriba de T_m. Las muestras fueron preparadas en el día de experimentación o día previo y se usaron por no más de 28 hs. En nuestros experimentos la concentración final de lípidos fue 0.5 o 1.0 mM.

5.3.2. Preparación de vesículas unilamelares grandes (LUV)

Las vesículas unilamelares grandes (LUV, del inglés Large Uni-lamellar Vesicles), se obtuvieron a partir de las MLV preparadas por el método de evaporación/rehidratación y posterior extrusión en membranas de poro deseado. Para asegurar el correcto tamaño es necesario pasar las vesículas al menos 10 veces a través de un mini-extrusor de alta presión (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) el cual posee membranas de policarbonato con tamaño de poro 200 nm y termostatzado $T > T_m$. La concentración de lípidos utilizada fue 0.5 o 1.0 mM.

5.4. Estudios espectroscópicos en membranas

5.4.1. Experimentos en estado estacionario.

En las MLVs o LUVs de las muestras que se describieron anteriormente se estudio la hidratación y micro-viscosidad de vesículas de SPN, ESP, de cerdo expuesto a anestésicos volátiles, por fluorescencia. Específicamente, con el uso de sondas sensibles a la relajación por solvente (PRODAN o LAURDAN) y anisotropía (difenilhexatrieno, DPH). Las vesículas se usaron a concentración final de 0.5 mM y la concentración de sonda entre 0.5 y 0.1 % (para DPH y LAURDAN o PRODAN). La concentración de las soluciones stock de LAURDAN, PRODAN y DPH fueron determinadas usando los coeficientes de extinción molar siguientes: PRODAN y LAURDAN $\epsilon = 18400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (a 360 nm en etanol) y $20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (a 364 nm en metanol), respectivamente; mientras para el DPH se uso un $\epsilon = 55000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (a 350 nm en metanol). La medidas en estado estacionario fueron realizadas en un fluorímetro Cary Eclipse con un modulo de Peltier para termoestatzación y rack para 4 celdas (Varian, Inc).

La **Polarización Generalizada** (GP) de liposomas unilamelares grandes o multilamelares (LUVs o MLVs) se calcula según (Parasassi-1991):

$$GP = I_{440} - I_{490} / I_{440} + I_{490},$$

Donde, I_{440} e I_{490} son las intensidades de emisión a 440 y 490 nm, cuando se excitaron las sondas a 360 nm y se colectó el espectro de emisión entre 400 y 600 nm.

La **anisotropía** (r) de DPH o TMA-DPH en LUVs se determinará como (Shinitzky-1971):

$$r = I_{||} - G \cdot I_{\perp} / I_{||} + 2G \cdot I_{\perp},$$

donde $I_{||}$ e I_{\perp} son las intensidades de emisión paralela y perpendicular a la fuente de luz polarizada y G es el factor de corrección de monocromadores (Jameson-2013). Se excitó el DPH a 360 nm y se colectó la emisión con polarizadores a 440 o el espectro entre 400-600 nm.

El centro de masa espectral (CM), se realizó según fuera reportado por (Weber-1987), básicamente la sumatoria de la multiplicación de la intensidad de fluorescencia para cada longitud de onda con su respectivo número de onda dividido la sumatoria de la intensidad.

$$CM = \frac{\sum I_{\lambda} \cdot \bar{\nu}}{\sum I_{\lambda}}$$

Gráficos de fasores espectrales (SP), para este análisis en cubeta se ha desarrollado una rutina para MATLAB R2012-b (Matlabworks®), que permite el cálculo del primer y segundo armónico así como los gráficos espectrales, de GP y CM para excitación y emisión. Los códigos y explicación de su uso se proveen en el anexo A₂. No profundizaremos en los cálculos de este método dado que han sido explicados en profundidad en la sección introducción.

5.4.2. Análisis del tiempo de vida por medidas de modulación y fase con multifrecuencia

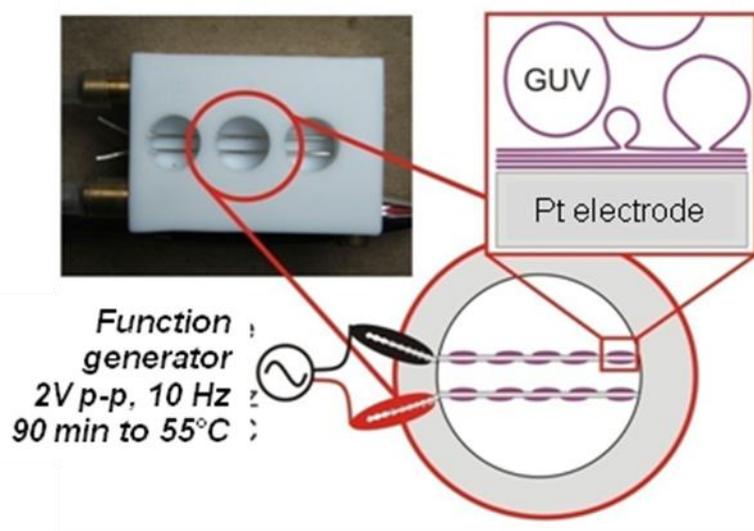
Para las medidas de tiempo de vida se usó un fluorómetro Chronos FD Fluorometer (ISS, Champaign, IL, USA). El PRODAN y LAURDAN fueron excitados usando una laser diodo a 375-nm, se colocaron polarizadores en la excitación y emisión en el ángulo mágico como previamente fuera recomendado por (Jameson-2013). Un set de filtro de pase de banda F01-375/6-25 (Semrock, Rochester, NY, USA) se colocó en la línea de excitación para eliminar la luz espuria. En la emisión se colectaron las fracciones azul y roja de la emisión del LAURDAN o PRODAN usando un set de filtros Schott kv 399+uk404 o mk 500-longpass (Semrock, Rochester, NY, USA), ver figura 1.13. La temperatura se ajustó con un baño con circulación de agua (Fisher

Scientific, Pittsburgh, PA, USA) y el rango de temperaturas usadas fue entre 20-50°C. Una solución en etanol de Dimetil-POPOP se utilizó como estándar de tiempo de vida (1.42 ns). Una detallada descripción del método y análisis de los datos usando fasores puede encontrarse en la sección introducción al capítulo 1 de resultados.

5.5. Preparación y visualización de Vesículas gigantes

Unilamelares

Las GUVs se preparan según el método de electroformación (Angelova-1986). Brevemente, 3-5 μl de las mezclas de lípidos a una concentración final de fosfolípidos ~ 0.25 mg/ml son cargadas sobre los electrodos de Pt de la cámara bajo atmósfera de N_2 y ~ 50 °C. La cámara de electroformación se coloca en un desecador con control de temperatura y vacío por 2 hs y a 50°C. Posteriormente se agrega un volumen de 300-500 μl de solución de Sacarosa 200 mOsmolar (a la temperatura de generación) y aplica un potencial de 2 V y frecuencia sinusoidal de 10 Hz por 120 min a temperaturas $>T_m$ (con un generador de funciones UNIT-T UTG9010A. Luego de finalizado el proceso de crecimiento de las GUVs se disminuye la frecuencia a 1Hz por 5 minutos y se apagan el generador de funciones. Las GUVs se enfrían a la temperatura de trabajo a una velocidad de 0.5 °C/min (Bernardino de la Serna-2004).

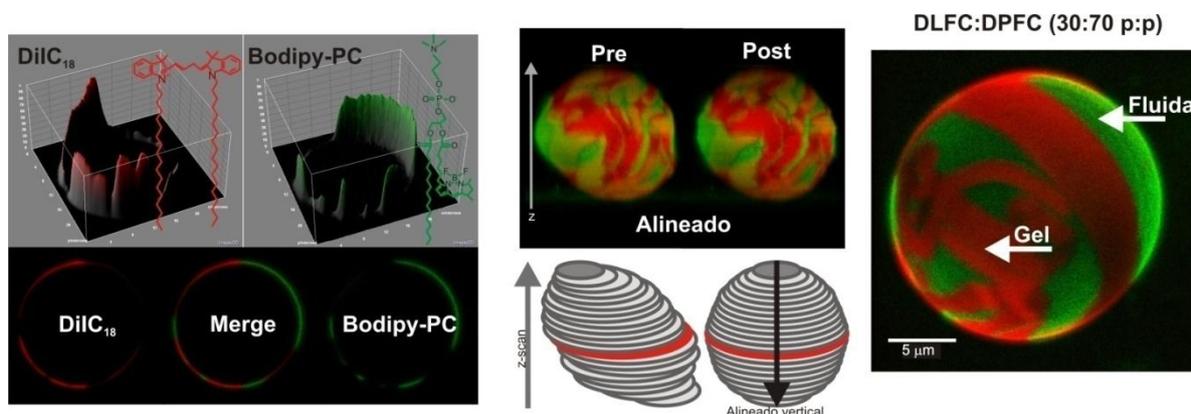


5.6. Microscopía Confocal de fluorescencia de las GUVs y células

A549:

Alícuotas de 50-100 μl del stock de GUVs son cargadas en discos de plástico de 35 mm con fondo de vidrio y 4 reparticiones (Lab-Tek Brand Products, Naperville IL), sobre 250-350 μl de una solución de glucosa 200 mOsmolar (es importante que la Osmolaridad sea medida y no simplemente calculada). Para las GUVs cargadas con sondas por afinidad fisicoquímica a los dominios se usó un microscopio confocal Leica TCS SP5 II con resolución espectral, las sondas fueron excitadas usando los láseres de Argón a 488 y HeNe a 543nm (Bodipy-PC/DiIC₁₈, respectivamente). Las λem se colectan con un detector de espectros en un rango de 498-533nm y 592-691nm (Bodipy-PC/DiIC₁₈, respectivamente), usando una objetivo de inmersión en Agua x60/1.2 NA. Se toman imágenes en el eje z de entre 0.500-1.0 μm de manera de poder realizar las reconstituciones posteriores en ImageJ 1.46d (Wayne Rasband, NIH-USA), con una velocidad de escaneo de 5-10 seg. y resolución de imagen 512 x 512 píxeles (de la Serna-2004).

A continuación se muestra un ejemplo del procesamiento que se realiza para cada vesícula usando el software libre ImageJ (mezcla de los canales, alineación si existiera corrimiento y reconstitución 3 de de las imágenes).



Para el caso de las medidas de LAURDAN con células se utilizó el láser UV a 405 nm y la emisión se colectó con dos canales en la emisión. El canal azul usado fue entre 415-460 y el canal verde entre 460-530. Para el análisis espectral se usaron 32 canales con un rango de 400-650 nm y un ancho de banda ~ 5 nm y saltos de banda ~ 5.97 nm, el tiempo promedio de una imagen fue ~ 30 segundos. Las imágenes de GP se procesaron usando el plugin

desarrollado por Jesper Søndergaard Hansende. Mientras que las imágenes espectrales analizaron con el software SimFCS (desarrollado por Enrico Gratton, Laboratory for Fluorescence Dynamics, LFD).

Para los experimentos de co-localización de LAURDAN y Lyso-Tracker o Mito-Tracker en células A549 se utilizó el mismo equipamiento que antes. Se excitaron a las sondas usando un laser HeNe 543nm y se colectó la emisión en un rango 550-700 para Lyso-Tracker y Mito-Traker, para el LAURDAN se usaron los mismo parámetros antes descriptos. Se realizaron z-stacks a 0.25um y con el plugin TransformJ del ImageJ 1.49d se hizo la corrección para la diferencia en el foco entre el láser 405 y 543 (~ 500 nm), para los renders 3D se uso la herramienta 3D VTK viewer del Icy v1.5.3.1.

Para todas las imágenes la resolución fue de 512x512, el tamaño de pixel dependió del zoom utilizado (0-6). La temperatura del sistema se mantiene por el sistema de calefacción del equipo Leica TCS SP5 II y un sistema de anillo conductor construido por nosotros para discos de 35 mm. Para medir la temperatura de los experimentos se uso una termocupla digital dentro de la placa de análisis con una precisión de ± 0.1 °C. En el caso de los experimentos con células se utilizo 5% CO₂ en la cámara del microscopio.

5.7. Microscopía Confocal de fluorescencia por dos fotones de GUVs por fasores espectrales

Las imágenes de GUVs fueron tomadas con un microscopio Zeiss 710 con resolución espectral de 32 canales en todo el espectro de emisión (400-700 nm), sistema de detección de fotodiodo de avalancha y laser de 2-fotones sintonizable MaiTai (SpectraPhysics) y un objetivo de inmersión en agua Plan-Apochroma x40/1.2 NA. Las GUVs se prepararon tal como se describió anteriormente, pero cargadas con LAURDAN en una concentración menor a 0.5% (Bagatolli-2006). Los espectros se tomaron entre 416-724 nm con saltos de 9.732 nm de ancho de banda. Se utilizó un pixel dwell time de 25,21 μ seg y resolución de 256x256. El tiempo total de escaneo de una imagen fue ~ 3.9 seg. El LAURDAN se excitó con una longitud de onda de 780 nm, según recomendaciones de (Golffeto-2013). Para controlar la temperatura se uso el

mismo anillo de control de temperatura construido por nosotros, la temperatura fue medida con una micro-sonda y un termómetro digital.

5.8. Experimentos con cultivos de células A549

Se utilizó una línea inmortalizada de células epiteliales pulmonares humanas, su origen es un cultivo de adenocarcinoma (ATCC® CCL-185™) (Giard-1972). Las células se cultivan en monocapa y se mantienen en medio DMEM-F12 (Sigma) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, a atmósfera húmeda de CO₂ al 5%, 37°C. El medio se renueva 2 veces por semana y las células son subcultivadas (tripsina 0.25 % + EDTA 0.03%) al 80% de confluencia y no más allá del pasaje 15. Para el congelamiento de las células (- 80°C) se utiliza dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% en SBF. Para el experimento las células se incuban con el anestésico y las sonda 2 horas antes del comienzo y se utiliza un medio mínimo sin colorante para evitar inconvenientes con la micorscopia.

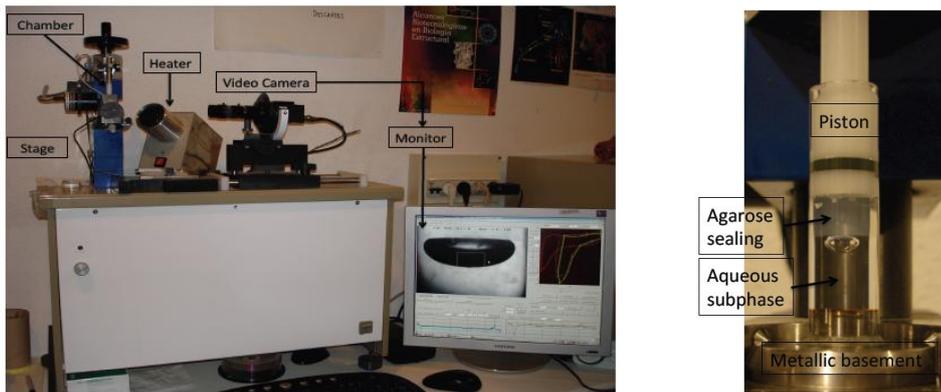
5.9. Estudios Tensoactivos

Para evaluar los efectos de sevoflurano sobre la capacidad tensoactiva del surfactante pulmonar, se han utilizado dos métodos tensoactivos. El primero utiliza la compresión dinámica para estudiar la respuesta tensoactiva (CBS), mientras el segundo usando un sensor de tensión permite calcular los cambios de presión como ($\pi = \gamma_{\text{agua}} - \gamma_{\text{surfactante}}$).

5.9.1. Surfactometro de burbuja cautiva (CBS)

Este método fue desarrollado por Schurch en los 80` y permite calcular la tensión de una burbuja atrapada en un dispositivo que resiste los cambios de presión durante la compresión dinámica del sistema por un pistón (Schurch-1989). El CBS no mide la tensión sino que la calcula a partir de la ecuación de Young-Laplace y midiendo la relación de diámetro y altura de la burbuja en la cámara. Esta cámara se llena con una solución amortiguadora Tris 5mM pH 7, NaCl 150 mM y 10% sacarosa, y en ella se crea una burbuja de aire que se deposita sobre la parte superior de la cámara, siendo el techo un tapón de agarosa. La sacarosa otorga la densidad necesaria para que el material tensoactivo flote hacia la burbuja. El volumen de la burbuja se controla variando

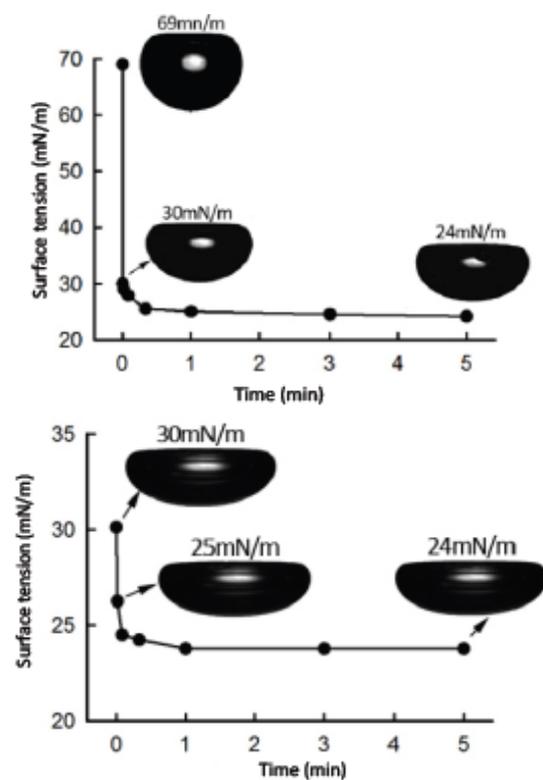
la presión en la cámara con un pistón, registrándose los cambios de tensión superficial inducidos por los ciclos de compresión y expansión por una video cámara de alta velocidad (Schurch-2001). Cuando la interfase es de aire/agua, es posible ver que en los ciclos de compresión colapsan la burbuja con un cambio relativo del área total en todas las direcciones. Mientras cuando se coloca una sustancia tensoactiva pese a que la burbuja se deforma (se observa un aplastamiento de la burbuja), el largo total de la burbuja no se ve modificado (lo que indica que no existe colapso y se debe a un efecto tensoactivo en la interfase aire/liquido).



A continuación se presentan los cuatro protocolos más relevantes para la evaluación de la performance tensoactiva de una sustancia (López-Rodríguez-2011).

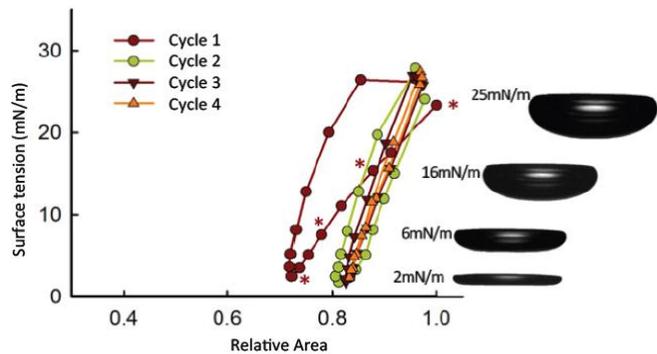
Absorción inicial (AI): se aplica el material tensoactivo y se sigue la cinética de adsorción en el tiempo. Los experimentos duran aproximadamente 5 minutos y permiten estudiar la capacidad del surfactante para adsorberse en una interfase aire agua.

Adsorción pos-expansión (APE): en este caso se expande la burbuja luego del equilibrio (a volumen máximo 150 cm³) y permite estudiar la capacidad del surfactante para reorganizarse y

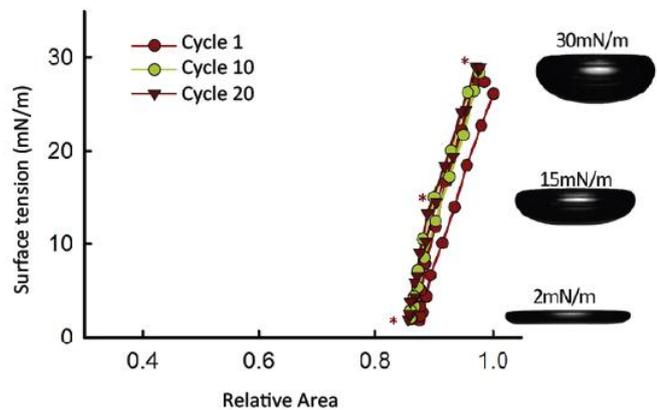


transferir nuevamente material a la interfase.

Ciclos Q-Estáticos: en 4 ciclos de compresión/expansión a baja velocidad y con detención de 1 segundo luego de comprimir un 20% del volumen del que se parte, se estudia la capacidad del surfactante para disminuir la tensión cuando se le permite en cada paso cierta relajación y reorganización.



Ciclos Dinámicos: en este protocolo la burbuja es comprimida/expandida en ciclos rápidos (2 ciclos/min, remedando la respiración). Los surfactantes con buena capacidad funcional no presentan histéresis. Y con solamente un 10-20% de compresión se logra disminuir la tensión a cero.

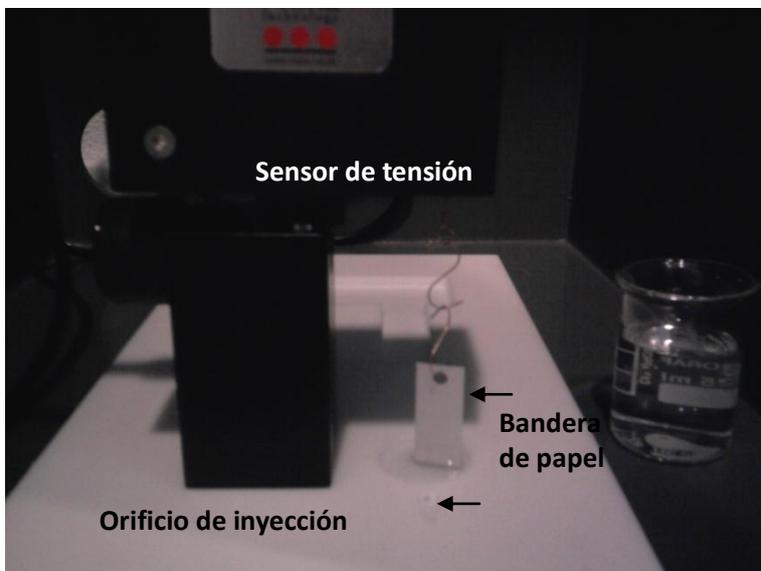


(Las imágenes fueron generosamente brindadas por la Dra. Elena López-Rodríguez).

En nuestros experimentos hemos usado siempre una solución de SPN con concentración ~ 10 mg/ml y fueron inyectados ~ 100-150 nl. Los experimentos se hicieron a temperatura 37°C. Cuando se utilizó sevoflurano, este fue administrado en forma líquida (~80-100 nl) sobre la burbuja e inmediatamente fue nebulizado.

5.9.2. *Balanza de Wilhelmy*

Los ensayos de adsorción con balanza de Wilhelmy, permiten evaluar la cinética de adsorción de una sustancia tensoactiva a una interfase aire/agua. Una balanza de Wilhelmy está compuesta por una cubeta de teflón en la que se introduce una subfase acuosa y que tiene la posibilidad de introducir material desde el fondo de la cubeta (ver figura). Un sensor de tensión detecta los cambios en la tensión superficial (γ) a medida que se produce la adsorción de material en la interfase. Se usa como sonda para medir la tensión una bandera de papel o una



dyne de Pt. En las isothermas de adsorción (π -t) se representa normalmente la presión superficial (π) calculada como la diferencia entre la tensión superficial de la subfase acuosa antes y después de aplicar las muestras (Barnes-Gentle-2011).

Para nuestros experimentos se inyectó en la hipofase 10 μ l de una solución 1 mM de EO-SP, el rango de concentraciones de sevoflurano fue entre 1-5 mM. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (\sim 23°C).

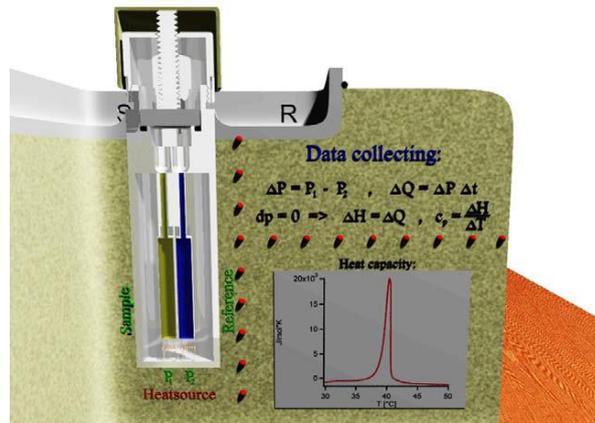
5.10. *Calorimetría diferencial de Barrido*

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es un poderoso método para investigar el comportamiento de las fases de las membranas lipídicas. Las propiedades termodinámicas obtenidas con este método son el punto de fusión T_m , la cooperatividad evaluada como $T_{1/2}$, el cambio en calor específico Δc_p y el cambio de entalpía ΔH durante una transición de fases.

El punto de fusión y el cambio en la entalpía se pueden utilizar para calcular el cambio en la entropía, ΔS , durante la transición de fusión como la

energía libre $\Delta G = \Delta H - T_m\Delta S$ es igual a cero en la transición de fusión. Esto da un cambio en la entropía igual a $\Delta S = \Delta H/T_m$.

El calorímetro básicamente tiene dos compartimentos metálicos que están protegidos con una chaqueta adiabática (ver figura). Una celdas se llena con la solución de la muestra y la celda de referencia se llena con el buffer en el que fue preparada la muestra. El equipo controla la temperatura con dispositivos de efecto Peltier y el instrumento se programa para mantener la diferencia de temperatura entre ambos celdas igual a cero.



Durante un experimento convencional la temperatura en ambos compartimentos se sube o baja con una velocidad de barrido definida por el usuario (habitualmente grados/horas). Si los procesos de fusión de la muestra se a delante, la energía suministrada a la celda que contiene la muestra es diferente a la de la celda de referencia (debido a que tiene que mantener la diferencia de temperatura constante entre ambas). A partir de esta diferencia en la potencia suministrada, el Δc_p se obtiene como:

$$\Delta Q = \int_{\bar{t}}^{\bar{t} + \Delta t} \Delta P dt \cong \Delta P \Delta t$$

$$\Delta c_p = \left(\frac{dQ}{dT} \right)_p \cong \frac{\Delta Q}{\Delta T} \cong \frac{\Delta P \Delta t}{\Delta T \Delta}$$

ΔQ es el calor aplicado a las celdas, mediante una potencia ΔP en un intervalo de tiempo $\bar{t} + \Delta t$, mientras que se mantiene la diferencia de temperatura a cetro entre las celdas durante el cambio de temperatura ΔT (Cañadas-2013).

Para los ensayos de calorimetría DSC, tal como describe (Bernardino de la Serna-2004), MLVs son cargadas en la celda de trabajo en un Microcalorímetro VP-DCS MicroCal, en un buffer Hepes 10 mM, pH 7.4, 150 mM de NaCl y 2mM de CaCl₂ a concentración final de 1 mM de concentración

de lípidos. Se realizan 5 ciclos de adquisición luego de tener registros estables con buffer a una velocidad de escaneo de 20°C/h. Los datos son procesados con el software de VP-DSC MicroCal.

5.11. Estudios con animales *in vivo* y *ex vivo*

Los detalle sobre el diseño experimental y precisiones sobre los métodos que se enumera a continuación pueden ser leído en la sección Methods del paper L. Malacrida et al. / Pulmonary Pharmacology & Therapeutics (2014)

5.11.1. Modelo animal

5.11.2. Ventilación mecánica

5.11.3. Análisis histológico

5.11.4. Reabsorción de fluido alveolar

5.12. Análisis estadísticos

Para todos los experimentos anteriores se realizan análisis estadístico por test de t en caso de comparar una muestra contra un grupo control y ANOVA con un post test de Tukey para muestras múltiples. Los análisis de GUVs y células se realizaron sobre un grupo de 10 vesículas ó campos en cada experimento (3 por grupo). Los detalles del análisis estadístico de los modelos animales se pueden leer en el paper Malacrida-2014. Para los experimentos en cubeta, DSC, CBS y plato de Wilhelmy se realizaron 3 experimentos independientes por cada grupo. Todos los experimentos en los que se uso algún diluyente para el sevoflurano (ej: DMSO), luego fueron testeados DMSO vs el grupo control no encontrándose efectos significativos. Los resultados se expresan como Media \pm error estándar medio. Se consideran como valores significativamente diferentes a $p < 0.05$, los análisis se realizan en GraphPad Prism 4.01 (GraphPad Software, Inc.) ó Sigma Plot 11.0 (Systat Software, Inc.).

Resultados:

Sección Resultados

Capítulo 1: Fasores espectrales y en el tiempo de vida para el estudio de la emisión de LAURDAN en membranas: desde la cubeta al microscopio.

El uso de fluorescencia para el estudio de las propiedades dinámicas y estructurales de membranas modelo y nativas ha mostrado ser un método de gran potencia para resolver aspectos espacio-temporales de las mismas (Mely-2013). Particularmente, el uso de sondas sensibles al estado de hidratación de las membranas, tiene algunas ventajas por sobre las que tienen afinidad fisicoquímica por las fases, debido a que estas últimas solo entregan información estructural pero no de tipo físico de la membrana (Bagatolli-2004).

Desde su introducción por Weber y Farris en 1979, la serie de sondas basadas en la introducción en la posición 2 y 6 de un naftaleno de un grupo dimetilamino y un grupo propionilo, respectivamente (PRODAN, 2-(Dimethylamino)-6-Propionyl-naphthalene), genera un arreglo electrón donador /aceptor, que en el estado excitado alcanza la separación de cargas y la formación de un gran dipolo (~ 7 debye) sensible a la polaridad del entorno (Farris-Weber-1979).

Como resultado de este gran dipolo, estas sondas tienen la posibilidad de interaccionar con su entorno y dependiendo de la polaridad del mismo relajar su estado excitado a uno de menor energía, con el consiguiente corrimiento espectral de su emisión (red shift). El corrimiento espectral que estas sondas pueden tener entre dos solventes como ciclohexano y agua son de aproximadamente 130 nm, lo cual da una gran ventana para el estudio de la polaridad de microentornos macromoleculares (ver figura 1.1, corrimiento espectral original del paper de Weber 1979).

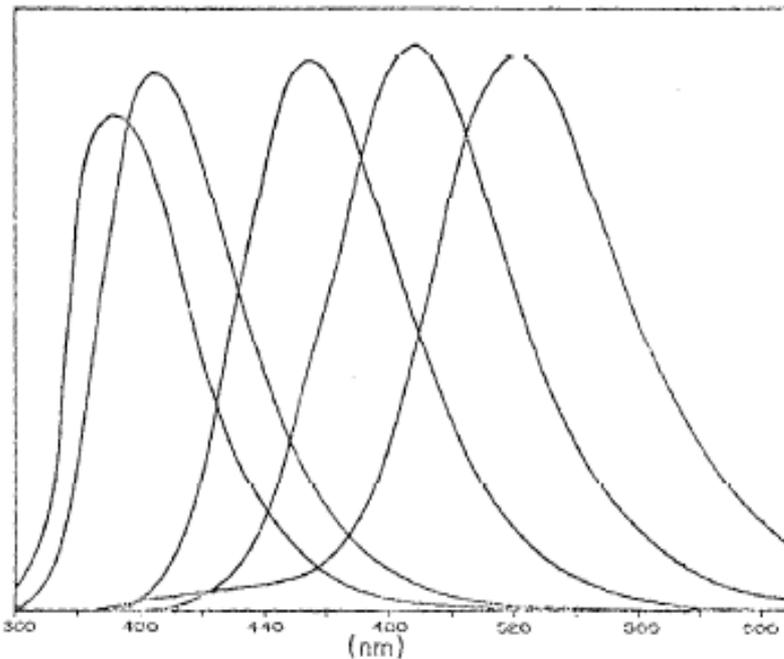
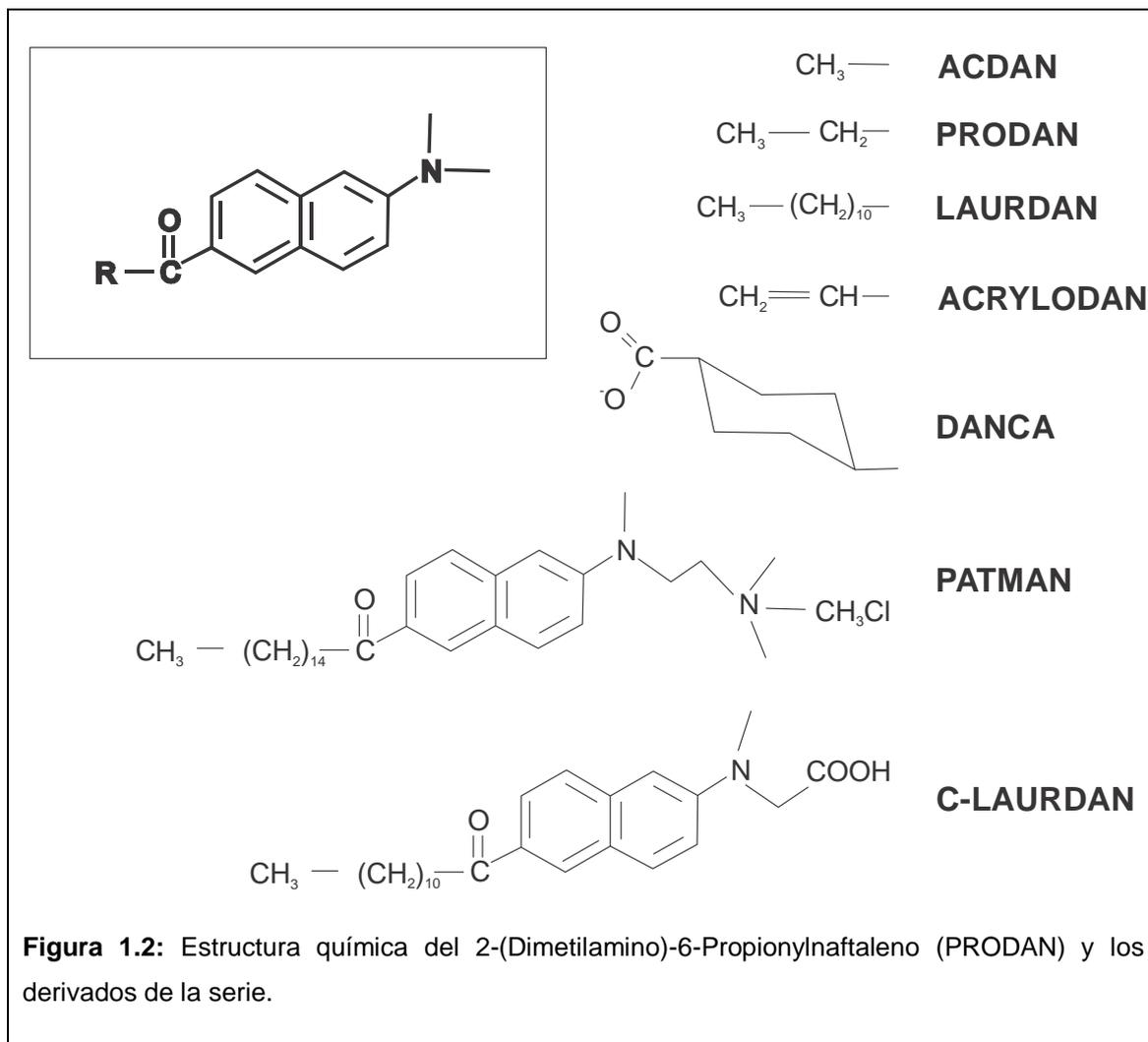


Figura 1.1: Espectro de emisión de PRODAN en diferentes solventes con excitación a 350 nm. De izquierda a derecha los espectros corresponden a PRODAN en ciclohexano, clorobenceno, dimetilformamida, etanol y agua. Extraído de Weber and Farris-1979.

Esta familia de moléculas incluye diferentes sustituciones en el grupo carbonilo, lo que les permite ser afín a diferentes estructuras macromoleculares (ver figura 1.2). Particularmente, para los intereses de los estudios de membranas, las más utilizadas han sido PRODAN y LAURDAN, sin embargo el ACDAN (con un grupo metilo en la posición 6) y el PATMAN (con un grupo palmitoilo en la posición 6), también han demostrado ser útiles para estudios de inter-digitación de membranas expuestas a etanol y relajación dipolar en membranas por fluorescencia resuelta en el tiempo (Zeng-19955, Lakowicz-1983).



Dependiendo del largo de la cadena hidrocarbonada sustituida en el grupo carbonilo la sonda tiene una localización más profunda en la membrana (asociado al incremento en la tensión hidrofóbica por el centro de la membrana de la cola acilo). Por lo cual, si organizamos las sondas de menor a mayor en la posición transversal de membranas encontramos que ACDAN tiene muy poca afinidad por membrana y una emisión máxima cercana a 530 nm (lo cual refleja su relajación dipolar en agua), luego viene PRODAN el cual se localiza a la altura de la interfase de las membranas (grupos fosfatos y colina), luego LAURDAN la cual se centra en la región de los grupos glicerol a $\approx 10\text{\AA}$ del centro de la membrana, por ultimo PATMAN que se encuentra $\approx 1\text{\AA}$ por debajo de la posición del LAURDAN (Figura 1.3).

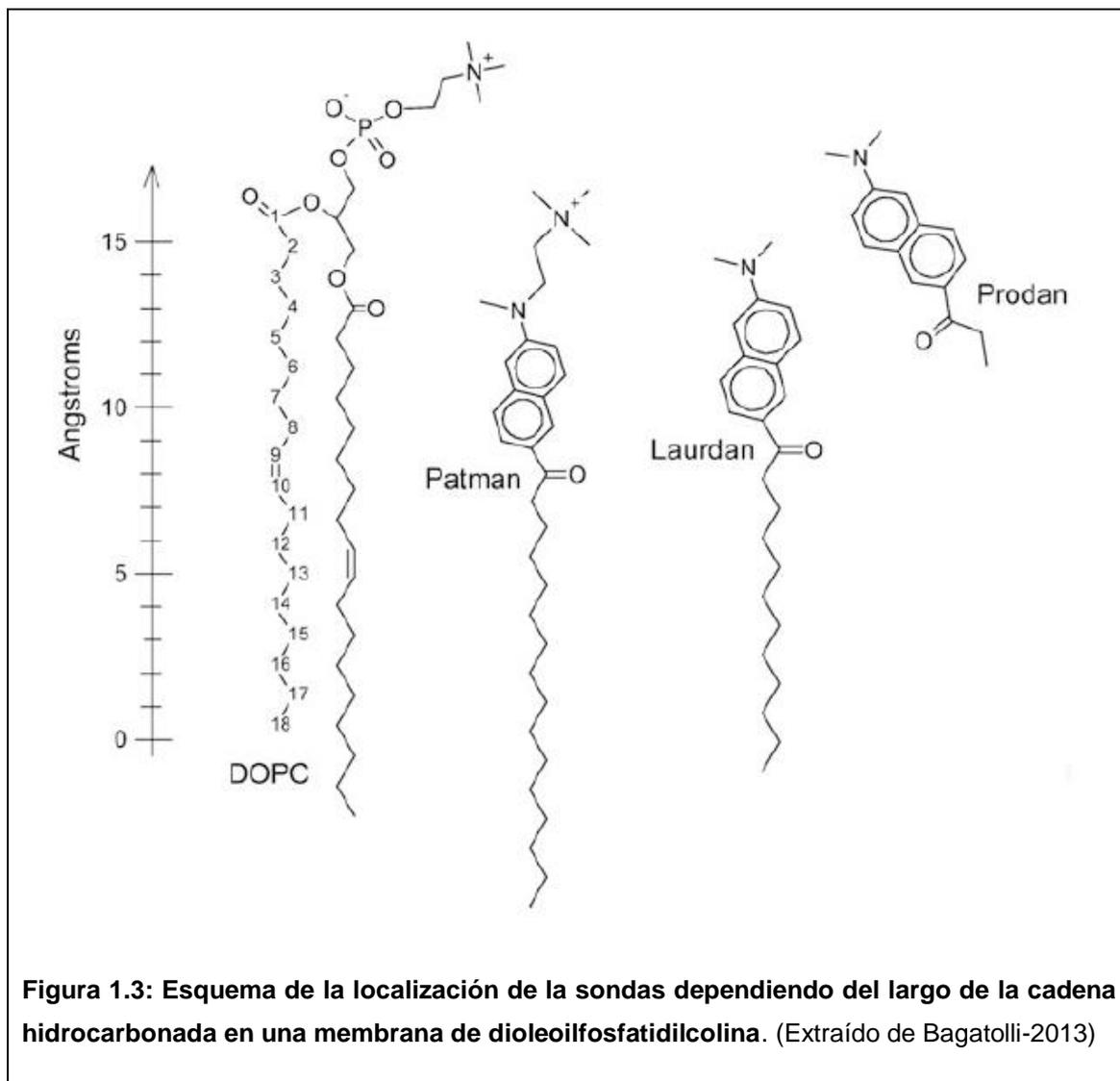
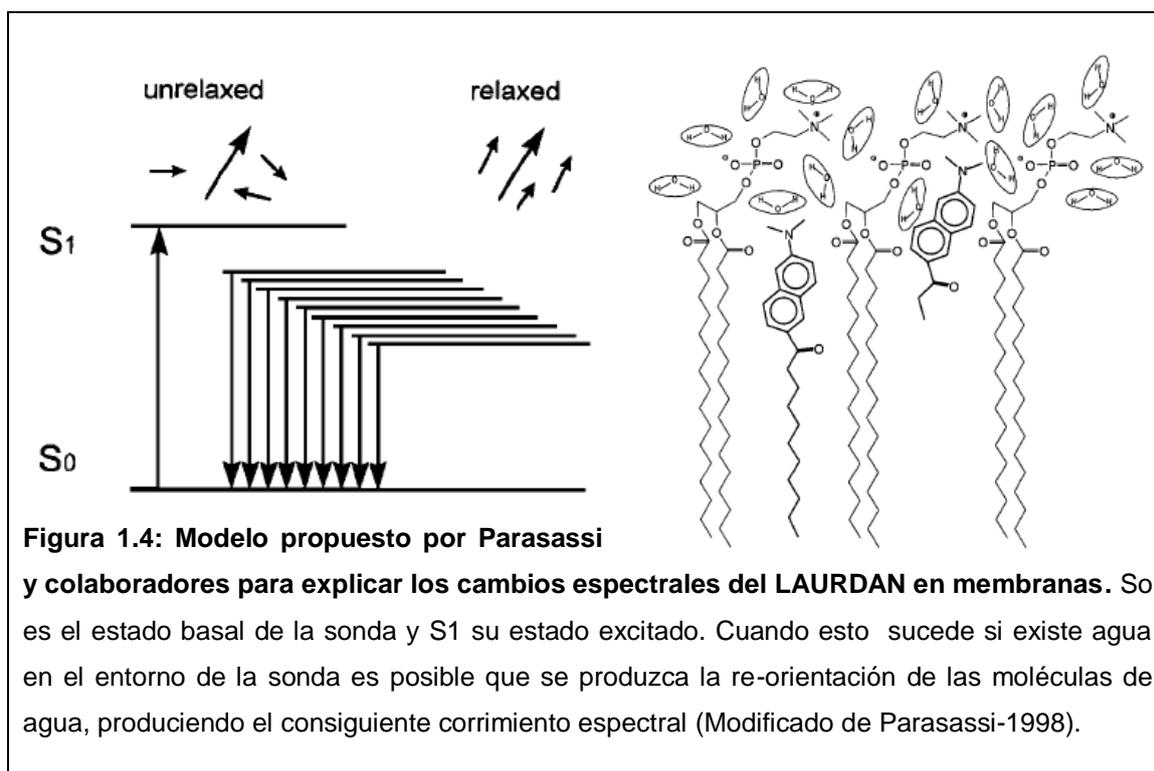


Figura 1.3: Esquema de la localización de la sondas dependiendo del largo de la cadena hidrocarbonada en una membrana de dioleoilfosfatidilcolina. (Extraído de Bagatolli-2013)

Una propiedad interesante del LAURDAN es que su reparto es homogéneo en las membranas, independiente de la segregación de fases existente, carga de los fosfolípidos y pH (Parasassi-1991). Lo cual la transforma en una sonda muy interesante porque no es necesario el uso de sondas complementarias para reportar la segregación entre dos fases, en este caso esta sonda discrimina el orden lateral de membranas en base a su estado de hidratación (lo cual se correlaciona con el grado de compactación). El corrimiento espectral que sufre esta sonda cuando está en membranas con fase gel ($L\beta$ o s_0) o fluida ($L\alpha$ o L_d) es de 50 nm. Sin embargo, en membranas con coexistencia gel/fluida la posición espectral está centrada en el medio. El modelo que explica las propiedades de LAURDAN para censar el agua en la interfase de las membranas y con esto el orden lateral de membrana, implica la presencia

de cavidades donde la sonda se aloja y el tamaño de estas cavidades depende del número de moléculas de agua que puedan ser relajadas por el dipolo de la sonda. Esta agua es peculiar porque tiene restricciones en su movilidad con un tiempo rotacional aproximado a $2.5 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ para la $L\alpha$ y $4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ para $L\beta$, relativamente bajo si se compara con el del agua bulk ($<1\text{ps}$) (Bagatolli-1998). Este hecho es crucial para que se produzca la relajación de la sonda dado que el tiempo de vida (τ) de la sonda en su estado excitado es de $\sim 4\text{-}5 \text{ ns}$ para la fase fluida y $\sim 1\text{-}2 \text{ ns}$ para la fase gel.

Se ha calculado que el número de moléculas de agua en el entorno del LAURDAN no es mayor a 2 o 3. Parasassi et al, considerando una distribución de Poisson ha estimado los valores para las cavidades LAURDAN-Agua, identificando la siguiente serie de una a 5 moléculas de agua en el entorno de LAURDAN: $0 \rightarrow 0.135$, $1 \rightarrow 0.270$, $2 \rightarrow 0.270$, $3 \rightarrow 0.203$, $4 \rightarrow 0.090$, $5 \rightarrow 0.031$ y para más de 5 $\rightarrow 0.020$ (Parasassi-1997). En este trabajo los autores concluyen que cuanto mayor número de moléculas de agua en el entorno del LAURDAN, mayor es la cavidad que el LAURDAN ocupa y menor será el valor esperado de GP (polarización generalizada, se explicara más adelante el concepto) (ver figura 1.4).



Más recientemente este grupo ha estudiado este mismo problema pero usando un nuevo método de análisis, espectroscopia de correlación de fluctuación (FCS, Fluctuation correlation spectroscopy), en la cual usando fluctuación de la función GP de LAURDAN a escala de unos pocos pixeles en microscopía confocal de dos fotones, han podido demostrar que el agua en una membrana simple (en fase líquida cristalina) no se encuentra heterogeneamente distribuida. Las variaciones de GP permiten demostrar que incluso para este sistema es posible identificar estructuras estables que se organizan no heterogeneamente (Celli- 2008).

A principios de la década del '90, Parassasi y colaboradores propusieron, basados en la clásica fórmula de Polarización para fluorescencia, el cálculo de una medida radiométrica de la emisión del LAURDAN entre dos estados (fases gel y fluida de membranas modelo), llamada Polarización Generalizada (GP, ver fórmula 1.1) (Parassasi-1991). Una de las ventajas de usar la medida de GP para el análisis de los cambios espectrales de LAURDAN en membranas (ver figura 1.5) es explotar una de las propiedades más interesantes de la función de polarización, es que la unidad contiene información de la interconversión dinámica entre diferentes estados; definiendo como estados para este caso, a la emisión del dipolo respecto a los ejes axiales del laboratorio. Para el caso de la GP, la orientación de estos dipolos es transformada al uso de dos sets de filtros que identifican el corrimiento espectral (por lo cual no se usa luz polarizada) y operado según la fórmula 1.1:

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \quad (1.1)$$

Siendo I_B e I_R en caso de los experimentos en fluorímetro la intensidad de fluorescencia a 440nm (cerca al máximo de emisión en una membrana en fase gel) y 490nm (cerca al máximo de emisión en una membrana en fase fluida), respectivamente. Rápidamente, se puede identificar que los valores máximos y mínimos que puede tomar la función son +1 y -1. Una detallada revisión del desarrollo matemático de la función y de las propiedades de ésta, pueden encontrarse en el trabajo original de (Parassasi-1990).

Estos estados están relacionados con la relajación de la sonda, por lo cual podemos decir que en el estado no-relajado tenemos a la sonda dentro de membranas en fase $L\beta$ o $L\alpha$ y en el estado relajado a la sonda en entornos de membranas con fase $L\alpha$ o Ld .

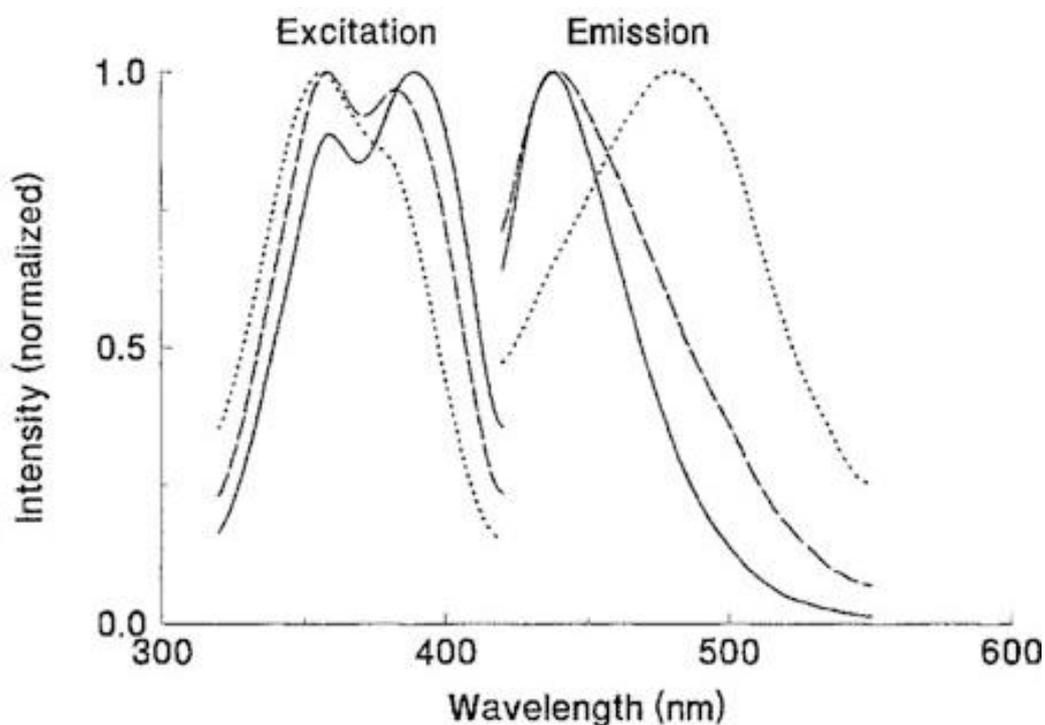


Figura 1.5: Espectro de excitación y emisión normalizado de LAURDAN en vesículas multilamelares con fases S_o (línea continua, DLPC a 40°C), Ld (línea punteada, DPPC a 5°C) y coexistencia de S_o/Ld (línea discontinua, DLPC:DPPC en proporción equimolar a 20°C). Extraído de Parasassi-1990.

El estado basal de la sonda también nos permite estudiar propiedades físicas de las membranas donde se encuentra. Esto se debe a que la sonda, dependiendo del estado de la membrana en la que se encuentre, posee diferentes estados basales relacionados con el estado de hidratación (ver figura 1.5). Para solventes polares (con grupos dadores próticos), es posible identificar dos bandas o poblaciones de estados basales del LAURDAN y PRODAN centrados alrededor de 350nm y 390nm. La banda de excitación a 390 es denominada la banda de excitación roja, cierto grupo de moléculas similares al LAURDAN, pero sin el grupo dimetilamino (LAURMEN y LAURNA), no poseen esta banda de excitación lo que hace pensar que depende de la

generación de una separación de cargas parciales (Parasassi-1998). Esta banda en la excitación del LAURDAN es interpretada como una forma estabilizada de la sonda por los dipolos del entorno en el estado basal cuando se encuentra en fases $L\alpha$. Sin embargo, respecto a solventes polares, la banda de excitación en el rojo es particularmente intensa en membranas con fase $L\beta$ y es el máximo de excitación, no sucediendo lo mismo para el caso de membranas en fase líquida cristalina. Este efecto es menos significativo en membranas compuestas por fosfolípidos con enlace éter (derivados de fosfolípidos) y aún menor con enlace amida (esfingomielina), lo cual soporta la idea de que la estabilización del estado basal en $L\alpha$ responde diferente a los cambios dependiendo del entorno químico que rodea la sonda (Bagatolli-1999a). Cuando se trata de membranas con coexistencia de fase gel/fluida, la excitación del LAURDAN en el rojo selecciona particularmente a las moléculas de sonda rodeadas por fosfolípidos en fase gel (Parasassi-1990). Lo cual puede ser muy útil para estudiar membranas con coexistencia de fases. Al realizar un espectro de excitación de GP (GP_{ex}), es posible seguir la respuesta en la GP dependiendo de la longitud de onda de excitación (ver figura 1.6). Esto es, mover la longitud de onda de excitación y calcular el valor de GP para las longitudes de onda de emisión antes descritas (ecuación 1.1). Es posible identificar que la GP no se modifica para las membranas en fase gel cuando se incrementa la λ_{ex} , asociado a que se selecciona un estado basal no-relajado ó sin agua en su entorno. Para el caso de una membrana en una fase fluida la GP toma una pendiente negativa, lo cual se debe al estado relajado del LAURDAN desde el estado basal. Por último, para membranas con coexistencia de fases gel/fluida la GP toma una pendiente positiva, lo que se explica asociado a la selección creciente por la banda roja del estado basal de la fase gel (ver figura 1.6). Con este análisis es muy sencillo discriminar sistemas con coexistencia de fases de los sistemas homogéneos.

El mismo procedimiento puede realizarse para la GP_{em}, en la cual se modifica la λ_{em} y se calcula, tal como se describe en la figura 1.6, el valor de GP_{em}. En este caso se puede observar que los resultados son opuestos a la GP_{ex} para las membranas con coexistencia de fases y fluida, e idéntica para la fase gel (Parassasi-1998).

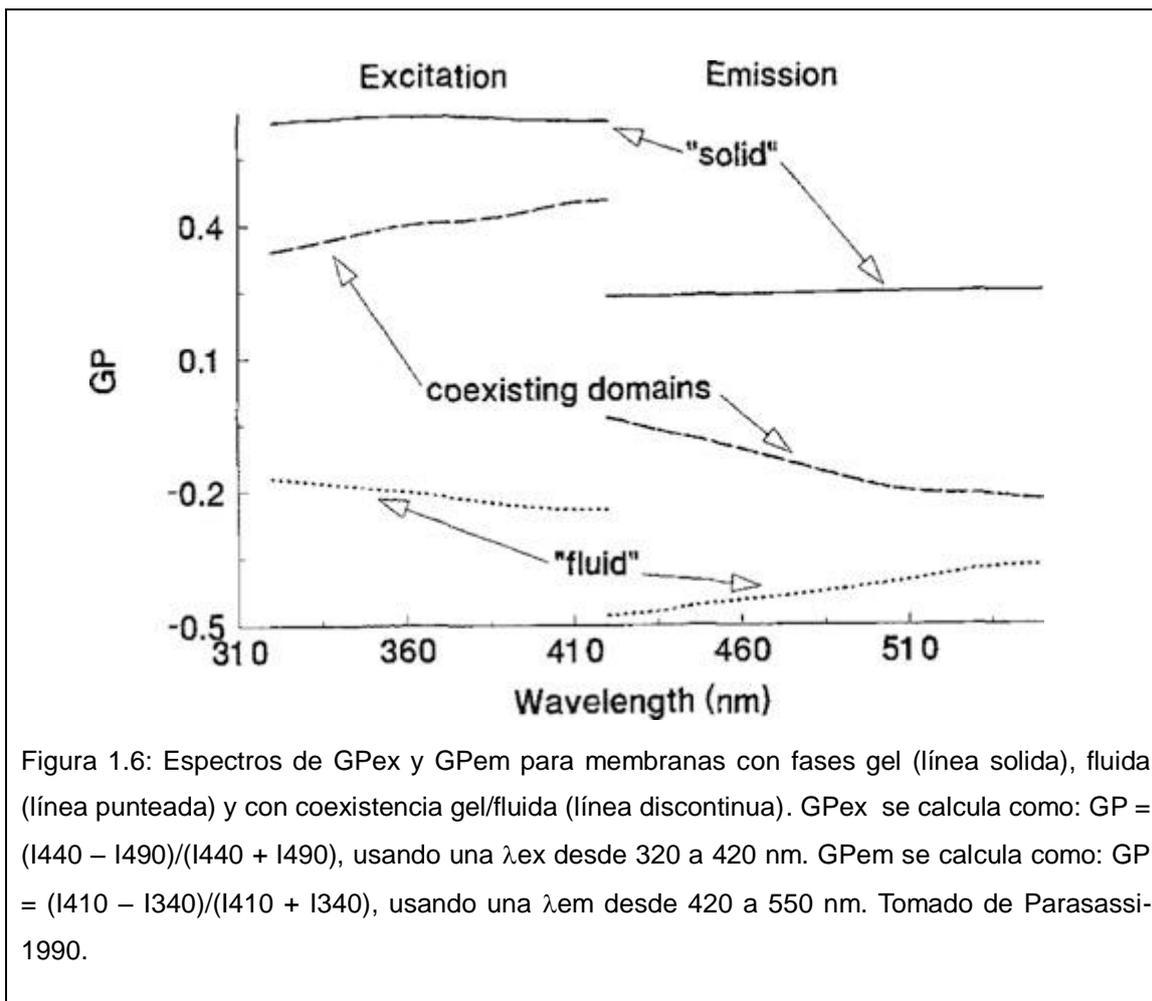


Figura 1.6: Espectros de GPex y GPem para membranas con fases gel (línea sólida), fluida (línea punteada) y con coexistencia gel/fluida (línea discontinua). GPex se calcula como: $GP = (I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$, usando una λ_{ex} desde 320 a 420 nm. GPem se calcula como: $GP = (I_{410} - I_{340}) / (I_{410} + I_{340})$, usando una λ_{em} desde 420 a 550 nm. Tomado de Parasassi-1990.

Una aplicación interesante del uso de la GP es estudiar la transición de fase de membranas. Aplicando la función de GP es sencillo seguir la transición de fases (T_m) de membranas modelos y nativas en un estudio termotrópico de GP vs temperatura. Esta resulta una herramienta muy potente para identificar el efecto de moléculas foráneas en membranas sobre la transición de fase (gel/líquida cristalina o Lo/Ld), tal como puede ser el efecto del colesterol sobre la T_m (Parasassi-1994a, 1994b, -1995).

Hacia finales de la década del '90, empezaron a aparecer los primeros trabajos de aplicación de GP con resolución espacial en sistemas de membranas sintéticos y nativos, así como células (Yu-1996, Parasassi-1997, Bagatolli-1999b). El primer trabajo reportado por Yu et al, muestra la adaptación de la función de GP para microscopía confocal por 2-fotones, mostrando los valores medios de GP y tiempos de vida de LAURDAN para las membranas plasmática y nuclear de fibroblastos de ratón (Yu-1996).

Posteriormente, Parasassi y colaboradores utilizan la función de GP para estudiar vesículas multilamelares de diferente composición así como membranas de eritrocitos y de células tubulares de riñón (Parasassi-1997). La inclusión de las vesículas gigantes unilamelares (GUVs) con LAURDAN permitió el estudio con vesícula única de sistemas sintéticos y nativos que otorgo un nuevo nivel de comprensión espacial que no es posible de obtener con las medidas en cubeta (Bagatolli-1999, 2000a,b, 2001).

Más recientemente se ha propuesto un nuevo método de análisis para el tiempo de vida de LAURDAN en sistemas complejos como membranas celulares, demostrando el potencial de resolver la presencia de coexistencia de fases (Lo/Ld) independientemente de las limitaciones en la resolución espacial, basada en el análisis de fasores (Owen-2012). Antes de ahondar en la descripción y alcances de esta nueva metodología, nos gustaría poder describir brevemente las metodologías para la determinación del tiempo de vida (τ).

Para la medida del τ existen dos métodos: uno basado en luz pulsada y el segundo en luz modulada. En el dominio del tiempo (como suele conocerse la utilización de luz pulsada) el τ se determina a partir de obtener la curva de decaimiento de fluorescencia en el tiempo con un sistema de detección de fotones muy sensible en la resolución temporal, tras la excitación del fluoróforo con un laser pulsado de muy corta duración (en el rango de picosegundos) (Jameson-2014 Libro). Mientras que para las medidas en el dominio de la frecuencia (como suele conocerse la utilización de luz modulada), un haz de luz es modulado sinusoidalmente a altas frecuencias (KHz-GHz) y el cálculo del τ es determinado por la demodulación y delta fase de la luz emitida por el fluoróforo (Jameson-2014) (ver figura 1.7).

La tasa de decaimiento de un fluoróforo por un pulso de luz puede ser descripta por:

$$dN(t)/dt = -(\gamma + k) N(t) \quad (1.2)$$

Donde $N(t)$ es el número de moléculas aún excitadas en el tiempo t , γ la constante de emisión radiativa y k la constante de emisión no-radiativa. Para $t=0$ tenemos que $N(t)=N_0$, y si integramos la ecuación es posible ver que:

$$N(t) = N_0 e^{(-t/\tau)} \quad (1.3)$$

con

$$\tau = 1/(\gamma + k)(1.4)$$

Así la intensidad fluorescencia tendrá un decaimiento exponencial y es posible obtener directamente el τ a partir de determinar la reducción de la fluorescencia inicial en un factor $1/e$, o linealizando este gráfico para decaimientos mono-exponenciales como $\log I(t)$ vs t y determinando la pendiente de la gráfica (Jameson-2014).

$$I(t) = I_0 e^{(-t/\tau)} (1.5)$$

En caso de que se tenga un sistema con N componentes que decaen exponencialmente, la emisión estará dada por la siguiente expresión:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{(-t/\tau_i)} (1.6)$$

Siendo $I(t)$, la intensidad de fluorescencia para el tiempo t después de la excitación; α_i , factor preexponencial que representa la contribución fraccionaria del decaimiento del fluoróforo i con un τ_i ; y τ_i el tiempo de vida para el i -ésimo componente.

Para el método de modulación y fase, el tiempo de vida es calculado de manera independiente por dos vías: la demodulación de la luz y el cambio de fase. Por lo cual siempre vamos a tener dos τ , que en el caso de decaimientos simple exponenciales deberán ser iguales (τ_M y τ_P , tau modulación y fase respectivamente). Si tenemos una haz de luz incidente con una relación (AC/DC) $_{ex}$ y una fase determinada, debido al retardo asociado del estado excitado el fluoróforo, es posible medir la onda de modulación en la emisión (AC/DC) $_{em}$ y el ángulo de desfasaje de la luz incidente θ (ver figura 1.7). Por lo cual es posible escribir a la modulación relativa como:

$$M = (AC/DC)_{em} / (AC/DC)_{ex} (1.7)$$

Para este método, entonces, se toman medidas de demodulación y delta fase a diferentes frecuencias y se calcula el τ_M y τ_P como se describe a continuación.

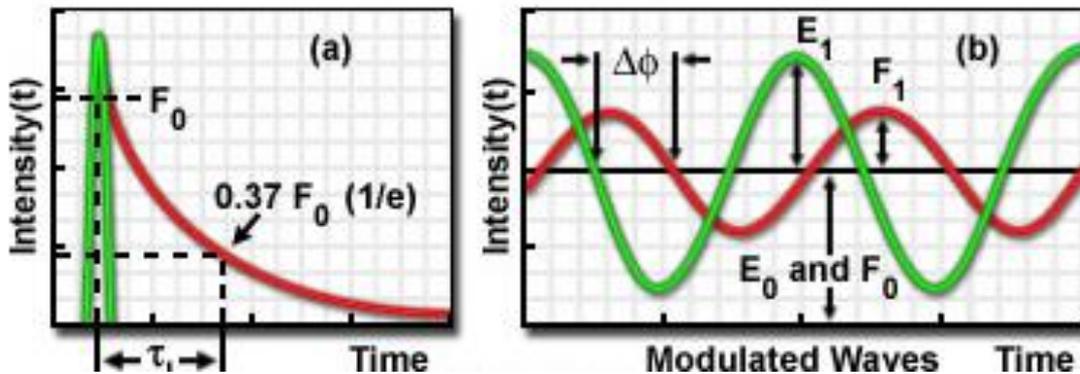


Figura 1.7: Esquema representativo de la adquisición de datos para los métodos del dominio del tiempo y de la frecuencia. Modificado de Jameson-2014

Para un fluoróforo excitado con luz modulada con una frecuencia angular ω (igual a $2\pi f$, donde f es la frecuencia de modulación lineal de la luz), si tiene un decaimiento mono-exponencial, la siguiente expresión describe con precisión su demodulación y desfase:

$$F(t) = F(0)[1 + M_F \sin(\omega t + \theta)] \quad (1.8)$$

siendo $F(0)$ la intensidad de fluorescencia promedio, M_F la modulación relativa de la emisión (AC/DC)em y θ el ángulo de desfase de la onda.

Dushinsky en 1933 desarrolló la base matemática que permite describir las relaciones entre el tau y la demodulación y delta fase para un decaimiento mono-exponencial, como se describe a continuación:

$$\tan \theta = \omega \tau_p \quad (1.9)$$

y,

$$M = \frac{1}{\sqrt{1+(\omega \tau_M)^2}} \quad (1.10)$$

Sin embargo, para el caso de sistema con multi-componentes en la emisión, la relación entre el ángulo de desfase y el cuadrado de la modulación estará dada por:

$$\tan \theta = \frac{\sum_i f_i M_i \sin \theta_i}{\sum_i f_i M_i \cos \theta_i} \quad (1.11)$$

y,

$$M^2 = (\sum_i f_i M_i \text{sen } \theta_i)^2 + (\sum_i f_i M_i \text{cos } \theta_i)^2 \quad (1.12)$$

Usando la notación descrita por Weber, es posible reducir la siguiente expresión como:

$$\tan \theta = \frac{S}{G} \quad (1.13)$$

y,

$$M^2 = S^2 + G^2 \quad (1.14)$$

donde,

$$G = \sum_i f_i M_i \text{cos } \theta_i \quad (1.16)$$

$$S = \sum_i f_i M_i \text{sen } \theta_i \quad (1.17)$$

Esta descripción conocida como el Algoritmo Weber, permite la descripción y estudio de n-componentes como la sumatoria de componentes simples basado en la utilización de las propiedades de la transformación de Fourier y el cálculo de los valores reales e imaginario de la transformada (G y S, respectivamente) (Weber-1981).

El método de aplicación de gráficos de fasores para la representación gráfica de los tiempos de vida medidos y la substracción del background por demodulación y delta fase fue propuesto originalmente en 1984 por Jamenson y colaboradores (Jameson-1984).

Propone una representación gráfica de las medidas de demodulación y delta fase en un gráfico vectorial, el vector M está incluido en una circunferencia con radio 0.5 y centrado en (0.5, 0) para x (Jameson-1984). La fórmula que describe la representación está basada en la notación propuesta por Weber, tal como se describió anteriormente, para sistemas de emisión heterogénea(Weber-1981).

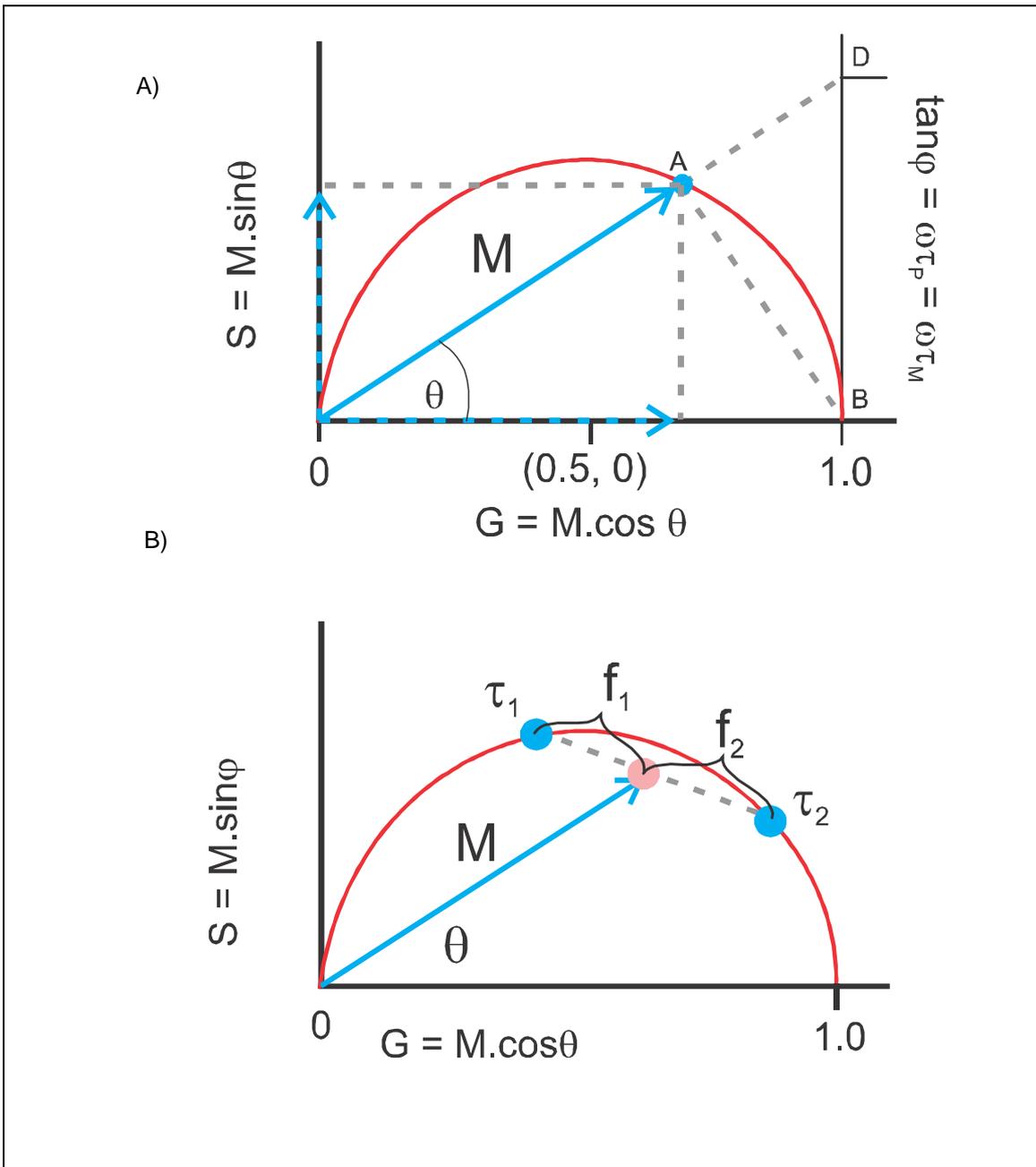
$$x = G = M \cdot \cos\theta \quad (1.18)$$

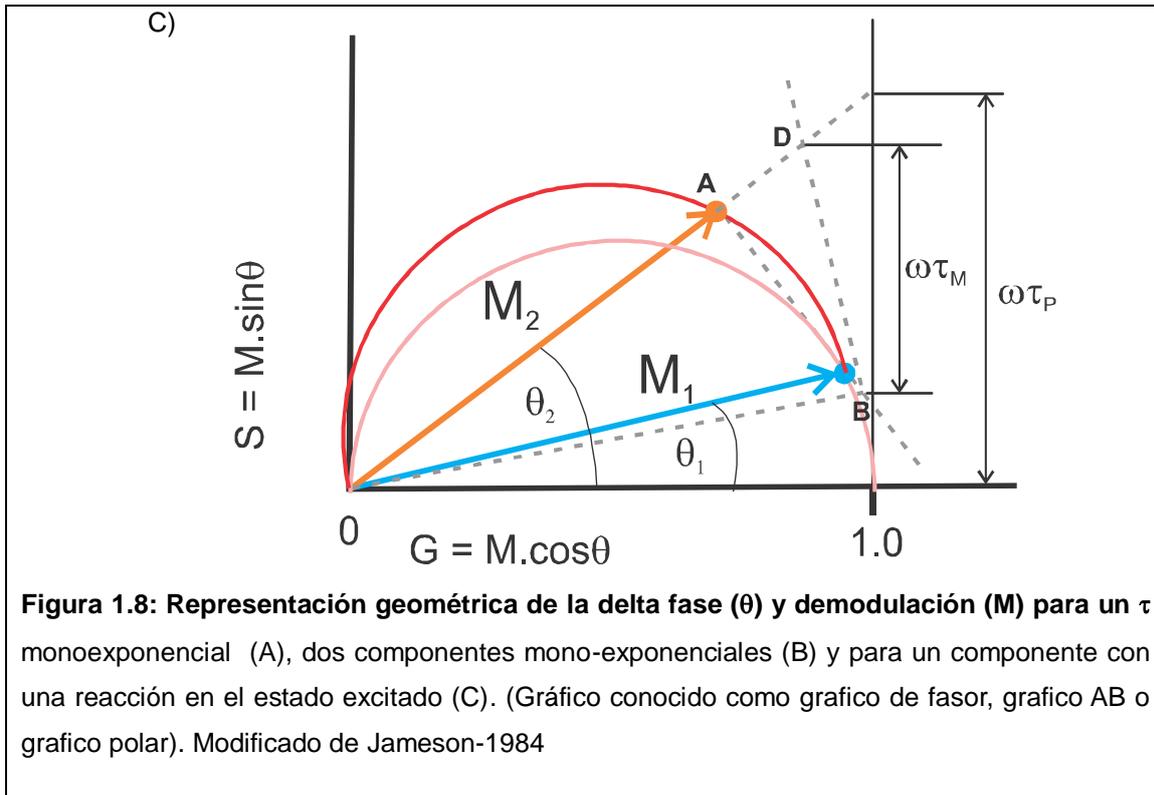
y

$$y = S = M \cdot \sin\theta \quad (1.19)$$

donde M es la demodulación y θ la delta fase.

Es fácil ver que si se grafica la demodulación en un gráfico vectorial para una función mono-exponencial, todos los valores del vector M deberían de estar en el semicírculo de radio 0.5 con mínimo 0 y máximo 1 (círculo universal), independientemente de la frecuencia que se use (ver figura 1.8).





Si prolongamos el vector M hasta la intersección con $x = 1$, obtenemos la tangente al ángulo θ y por definición $\tan\theta = \omega\tau_P$. Por lo cual se obtiene el tiempo de vida por el delta fase o τ_P . Mientras si se reordena la ecuación 1.10 se puede ver que:

$$\omega\tau_M = \frac{\sqrt{(1-M^2)}}{M} \quad (1.20)$$

En la figura 1.8A podemos observar que se forman dos triángulos rectángulos ($0AB$ y $0DB$), que si operamos por la razón de catetos pueden escribirse como:

$$AB/0A = DB/0B \quad (1.21)$$

con $0A = M$, $0B = 1$ y $AB = \sqrt{(1-M^2)}$, podemos rescribir la ecuación como:

$$\sqrt{\frac{(1-M)}{M}} = DB/1 \quad (1.22)$$

Y el segmento DB corresponde a $\omega\tau_M$ y que como mencionamos anteriormente para una función mono-exponencial coincide con $\tan\theta$.

Sin embargo, cuando tenemos una combinación lineal entre dos decaimientos mono-exponenciales, la posición del vector debería de

encontrarse en la recta que une estos dos puntos en el círculo universal. Y para este caso el τ_M es mayor que el τ_P (figura 1.8B).

Por último, para el caso de reacciones en el estado excitado de la sonda (FRET, relajación dipolar, etc), la posición del vector debería de estar fuera del círculo universal, asociado a un retardo en la emisión por el proceso que sufre la sonda en el estado excitado (ver figura 1.8C). Para esta situación el τ_M es menor que el τ_P . Para la situación de múltiples fluoróforos o procesos en el estado excitado, existe una dependencia con la frecuencia utilizada, por ende los tiempos de vida obtenidos no son iguales y cambian con la frecuencia, seleccionando con frecuencias altas a los fluoróforos con tiempos de vida cortos y lo opuesto para frecuencias bajas.

Pese a que se piensa que la aplicación de fasores es únicamente para ensayos con luz modulada, es posible representar de la misma manera a los datos de decaimientos de luz pulsada tal como se describió originalmente (Weber-1981):

$$G(\omega) = \int_0^{\infty} I(t) \cos(\omega t) dt / \int_0^{\infty} I(t) dt \quad (1.23)$$

$$S(\omega) = \int_0^{\infty} I(t) \sin(\omega t) dt / \int_0^{\infty} I(t) dt \quad (1.24)$$

Estas propiedades fueron explotadas inicialmente para el análisis masivo de datos en microscopia de tiempo de vida (FLIM) por (Digman-2008). Golfetto y colaboradores revisaron la aplicación de esta metodología para estudiar, basados en las propiedades de relajación dipolar y sensibilidad a la polaridad de LAURDAN, la movilización de colesterol en membranas celulares (Golfetto-2013).

Por último, recientemente se ha propuesto una extensión de este tipo de análisis por una transformación en el espacio de Fourier de los datos espectrales de microscopia para desmezclar la emisión de varios fluoróforos en células (Fereidouni-2012). Esta aproximación provee una nueva posibilidad de análisis de los datos de microscopía sin la necesidad de tener un sistema de microscopia especial para la realización de FLIM y con las ventajas por sobre

los métodos clásicos de análisis de poder cuantificar sistemas complejos en la emisión del LAURDAN como la combinación de estados discretos.

$$G = \frac{\sum_{\lambda} I(\lambda) \cdot \cos\left(\frac{2\pi n \lambda}{L}\right)}{\sum_{\lambda} I(\lambda)} \quad (1.25)$$

$$S = \frac{\sum_{\lambda} I(\lambda) \cdot \sin\left(\frac{2\pi n \lambda}{L}\right)}{\sum_{\lambda} I(\lambda)} \quad (1.26)$$

Siendo $I(\lambda)$ la intensidad de fluorescencia, n el número de armónico, λ longitud de onda para la $I(\lambda)$ y L la longitud del espectro. En la figura 1.9 es posible ver un ejemplo de cómo se comporta el sistema para una simulación con tres espectros con diferente máximo y ancho de pico, en el primer y segundo armónico.

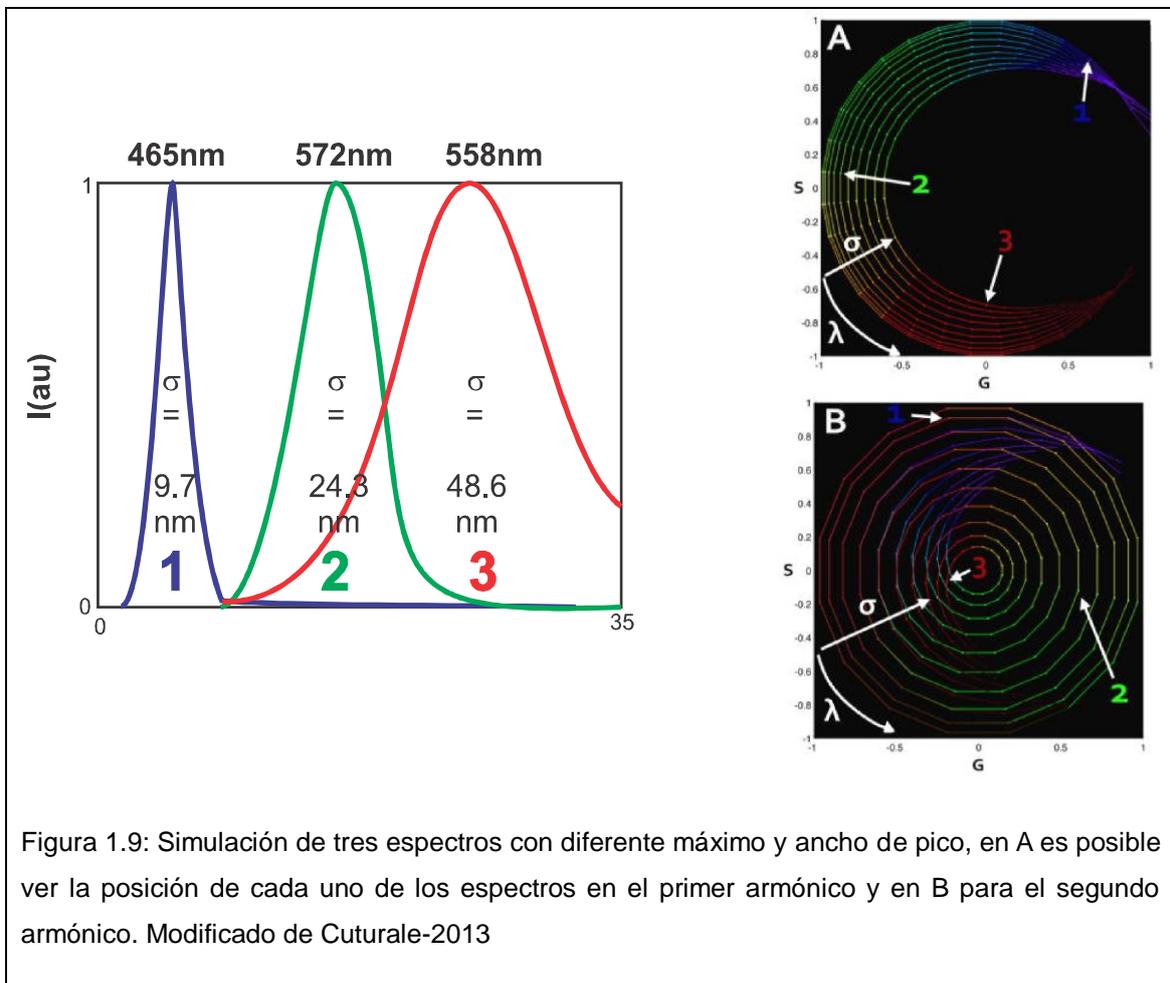


Figura 1.9: Simulación de tres espectros con diferente máximo y ancho de pico, en A es posible ver la posición de cada uno de los espectros en el primer armónico y en B para el segundo armónico. Modificado de Cuturale-2013

En la figura anterior es posible ver cómo el gráfico de fasor espectral es capaz de separar correctamente los tres espectros y puede observarse que los cambios en la longitud de onda generan corrimiento en la posición angular (en sentido anti-horario), mientras que los incrementos en el ancho de pico mueven la posición del espectro hacia el centro del gráfico (radial). Cuando se calcula los valores de G y S para el segundo armónico se logra una mejor resolución de la función que se está ajustando. Sin embargo, la posición en el gráfico de fasor espectral puede rotar y avanzar sobre un segundo ciclo anti-horario para la posición angular (complicando en parte el análisis), pero logrando mucho mayor resolución radial.

Una propiedad muy importante del uso de la transformación de Fourier es que es posible estudiar emisiones complejas como combinaciones lineales de emisiones simples (independientemente del número de armónico).

Proponemos entonces la aplicación de estos dos nuevos métodos de análisis (gráficos de fasores para el tiempo de vida y espectral) para los datos de emisión del LAURDAN y PRODAN en sistemas de membranas sintéticos y complejos discutiendo las ventajas y limitaciones cuando se comparan con los clásicos métodos de GP y centro de masa del espectro (CM). Se evaluará el efecto del colesterol y la temperatura para sistemas sintéticos de manera de comprender la performance de los nuevos métodos. Se pretende el desarrollo de estas nuevas herramientas con el objetivo de una mejor comprensión de los efectos de moléculas foráneas (sevoflurane por ejemplo) en sistemas complejos (surfactante pulmonar). Los resultados presentados en esta sección fueron obtenidos gracias a una pasantía de dos semanas por el Laboratorio del Prof. David Jameson (Universidad de Hawaii en Manoa) entre los meses de Noviembre y Diciembre de 2012, donde se obtuvieron todos los datos de tiempo de vida en cubeta. Los resultados de estado estacionario en cubeta fueron obtenidos con la instrumentación para estado estacionario de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Institut Pasteur de Montevideo, gracias a la generosidad de los Dres. Rosario Duran y Carlos Bathyanny. Y los experimentos de fasores espectrales con resolución espacial por microscopía de dos fotones fueron obtenidos en colaboración con el Prof. Enrico Gratton en

el Laboratory for Fluorescence Dynamics, LFD, de la Univeridad de California en Irvine, durante una pasantía de dos semanas en el mes de junio de 2014.

Resultados.

Gráficos de Fasores (phasor plots, PP) para el estudio del tiempo de vida de LAURDAN y PRODAN en membranas modelo

Primeramente nos focalizaremos en los resultados obtenidos para los gráficos de fasores para el tiempo de vida.

Inicialmente fue necesario calibrar nuestro sistema de adquisición de trabajo, un Fluorometro de modulación y fase marca ISS (Chronos-FD, ver detalle de la instrumentación en materiales y métodos) en el Laboratorio del Prof. David Jameson en la Universidad de Hawaii.

Se utilizó dimetil-POPOP (1,4-Bis(4-methyl-5-phenyl-2-oxazolyl)benzene, DM-POPOP) como estándar de tiempo de vida y se evaluó el efecto de la temperatura para el tiempo de vida de nuestro estándar usando un estándar primario con tiempo de vida cero asociado a la dispersión de la luz (glicógeno) (Tabla 1.1).

Temperatura (°C)	τ_1 (ns) [†]	χ^2
20	1.430 ± 0.003	0.88
30	1.420 ± 0.003	1.12
35	1.420 ± 0.003	1.01
40	1.420 ± 0.003	1.13
45	1.420 ± 0.003	1.14

* (estandar: glicogeno, 0.0 ns).
† $\langle \tau \rangle$ (Promedio): 1.42 ns

La temperatura no muestra un efecto significativo sobre el tiempo de vida del DM-POPOP, se puede identificar un solo componente con una $\langle \tau \rangle \sim$ a 1.42 ns y un χ^2 (chi-cuadrado) de ~ 1.06 . Por lo cual, para todos los análisis se utilizará como tiempo de vida de referencia al DM-POPOP con un valor de 1.42 ns (similar a previamente reportado por Aguilar-2012). Es interesante ver que cuando se grafica el PP para el DM-POPOP a 20°C (se comporta igual para el resto de las temperaturas) y con multifrecuencia, la posición del tiempo de vida en el gráfico se encuentra siempre sobre el círculo universal y simplemente

varía la posición hacia valores más cercanos a cero cuando se incrementa la frecuencia (ver figura 1.10).

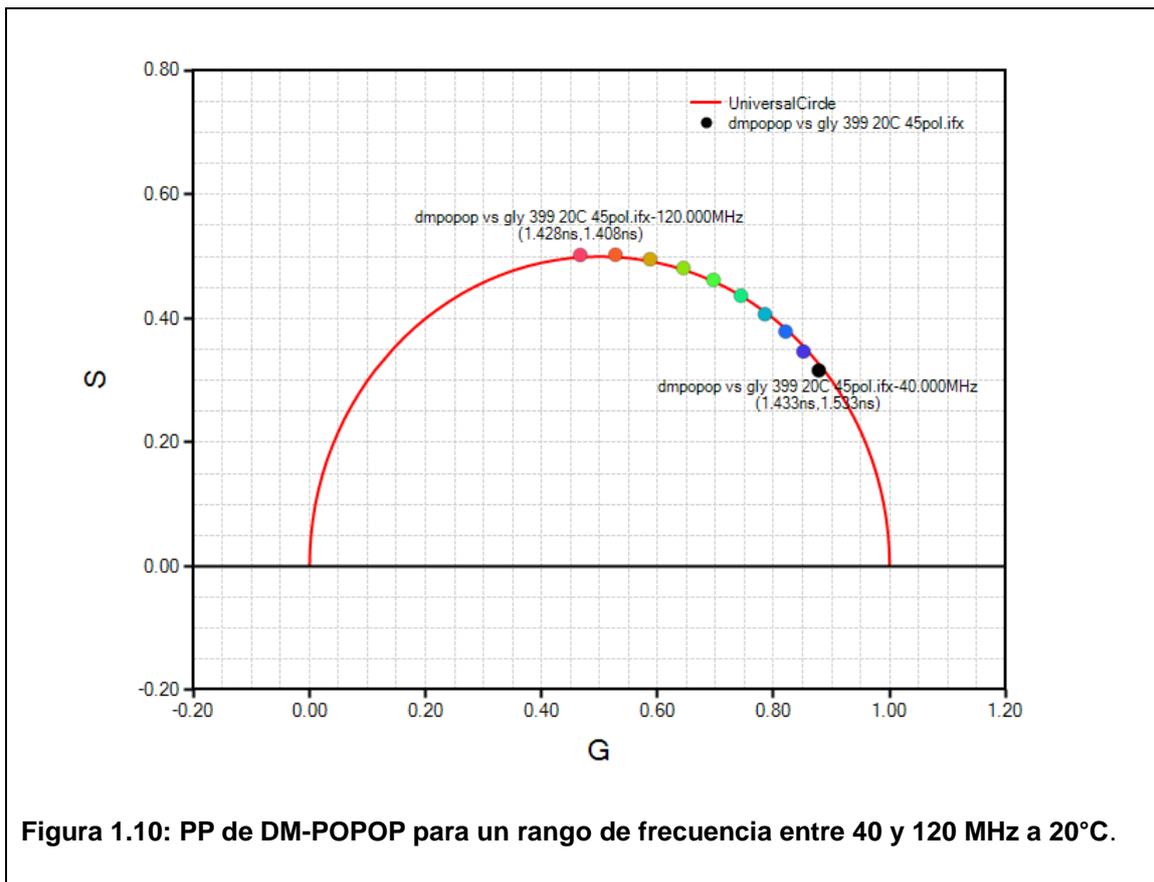


Figura 1.10: PP de DM-POPOP para un rango de frecuencia entre 40 y 120 MHz a 20°C.

El PRODAN en agua presenta dos componentes para todas las temperaturas siendo sus valores para 20°C: $\tau_1 \sim 2.06$ y $\tau_2 \sim 0.77$ ns. La temperatura disminuye el τ de ambos componentes y también el $\langle \tau \rangle$ (ver tabla 1.2). No evaluamos el efecto de la temperatura para el LAURDAN en agua dado que no presenta fluorescencia.

Tabla 1.2: Tiempo de vida para el PRODAN en agua a diferentes temperaturas.						
Temperatura (°C)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	$\langle \tau \rangle$	f_1	f_2	χ^2
20	2.06±0.07	0.77±0.02	1.37	0.46	0.55	0.763
30	1.74±0.06	0.64±0.02	1.18	0.49	0.51	0.847
40	1.47±0.06	0.53±0.03	1.00	0.50	0.50	0.969
45	1.37±0.05	0.48±0.03	0.93	0.51	0.49	0.609

$\langle \tau \rangle = \tau$ medio
 $f_i =$ fraccional de la exponencial

En el siguiente gráfico es posible ver cómo la posición del $\langle \tau \rangle$ para el PRODAN en agua, se encuentra dentro el círculo universal y se acerca a cero cuando se incrementa la frecuencia y a uno cuando se incrementa la temperatura.

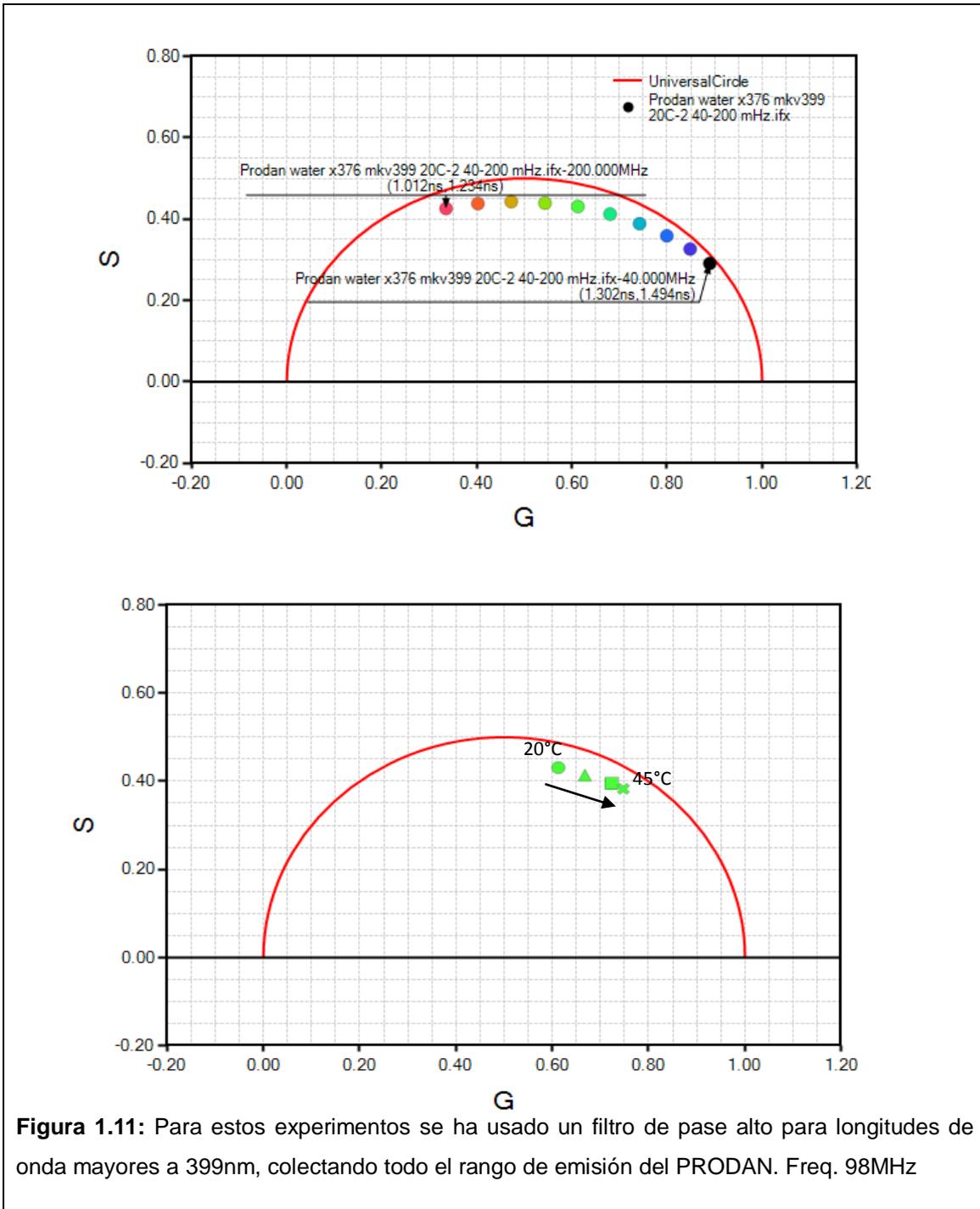


Figura 1.11: Para estos experimentos se ha usado un filtro de pase alto para longitudes de onda mayores a 399nm, colectando todo el rango de emisión del PRODAN. Freq. 98MHz

Como hemos visto en la introducción, PRODAN así como LAURDAN tiene la capacidad de censar la polaridad del entorno y relajar su estado excitado

dependiendo de la existencia de dipolos alrededor de la sonda. En la siguiente tabla vemos los valores de tiempo de vida para el PRODAN en diferentes solventes y sistemas lipídicos.

Tabla 1.3: Tiempo de vida para el PRODAN en diferentes solventes.

Solvente	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	$\langle\tau\rangle$	f_1	f_2	χ^2
Agua	2.06±0.07	0.77±0.02	1.37	0.46	0.55	0.763
Etanol	3.27±0.01	----	----	1.00	----	2.552
Acetonitrilo	3.46±0.03	0.84±0.30	2.15	0.96	0.04	0.358
DPPC	5.70±0.03	1.80±0.02	3.75	0.67	0.28	1.984
DPPC*	3.03±0.01	0.01±0.03	3.03 [♦]	0.98	0.02	2.023
LAURDAN/etanol	3.28±0.01	----	----	1.00	----	1.179

$\langle\tau\rangle = \tau$ medio
 f_i = fraccional de la intensidad
[♦], valor sin promediar.
 Todas la medidas fueron tomadas a 20°C y con un filtro de paso alto mkv- 399, a excepción de DPPC* a 54°C.

Tabla 1.4: Tiempo de vida para el PRODAN en DPPC usando filtros de pase alto mkv-399 (azul) y kv-500 (rojo)*.

Filtro	Temperatura (°C)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	$\langle\tau\rangle$ (ns)	f_1	f_2	χ^2
mkv-399	20	5.70±0.10	1.80±0.10	3.75	0.67	0.28	1.984
kv-500	20	3.76±0.06	0.98±0.02	2.37	0.56	0.40	2.648
mkv-399	54	3.03±0.05	0.01±0.03	3.03	0.99	0.01	2.02
kv-500	54	3.06±0.05	-----	3.06	1.00	----	1.490

Tiempo de vida para el LAURDAN en DPPC usando filtros de pase alto mkv-399 (azul) y kv-500 (rojo)*

mkv-399	20	6.71±0.01	0.54±0.09	3.62	0.99	0.01 ⁺	1.165
kv-500	20	7.06±0.02	-----	----	1.00	----	1.743 [♦]
mkv-399	40	6.45±0.20	4.18±0.50	5.32	0.83	0.17	0.720
kv-500	40	7.86±2.00	5.69±0.30	4.93 [^]	0.13	0.986	9.1 ^{**}

* ver grafico de trasmisión para los filtros(figura x12A)
[♦]ajustado únicamente por demodulación
^{**} para lograr el ajuste fue necesario incluir 3 componentes discretos ($\tau_3 = 1.25\pm 0.02$ y $f_3 = -0.117$).
[^] considerando al tercer componente.

A través del uso de filtros de pase alto o de banda es posible seleccionar diferentes poblaciones de fluoróforos en su estado excitado. En la siguiente tabla se presentan los resultados del análisis de los tiempos de vida para el PRODAN y LAURDAN en DPPC con diferentes filtros y temperatura.

Por último, se puede ver en la figura 1.12 el gráfico de la emisión de PRODAN y LAURDAN en DPPC con el uso del set de filtros antes mencionados, el cual permite coleccionar la emisión de diferentes poblaciones del estado excitado. También se estudia el efecto de los filtros sobre la posición del tiempo de vida medio en el PP para PRODAN y LAURDAN en DPPC. Es claro que el filtro que selecciona la parte roja del espectro de emisión, promueve el desplazamiento en la posición del vector hacia fuera del círculo universal.

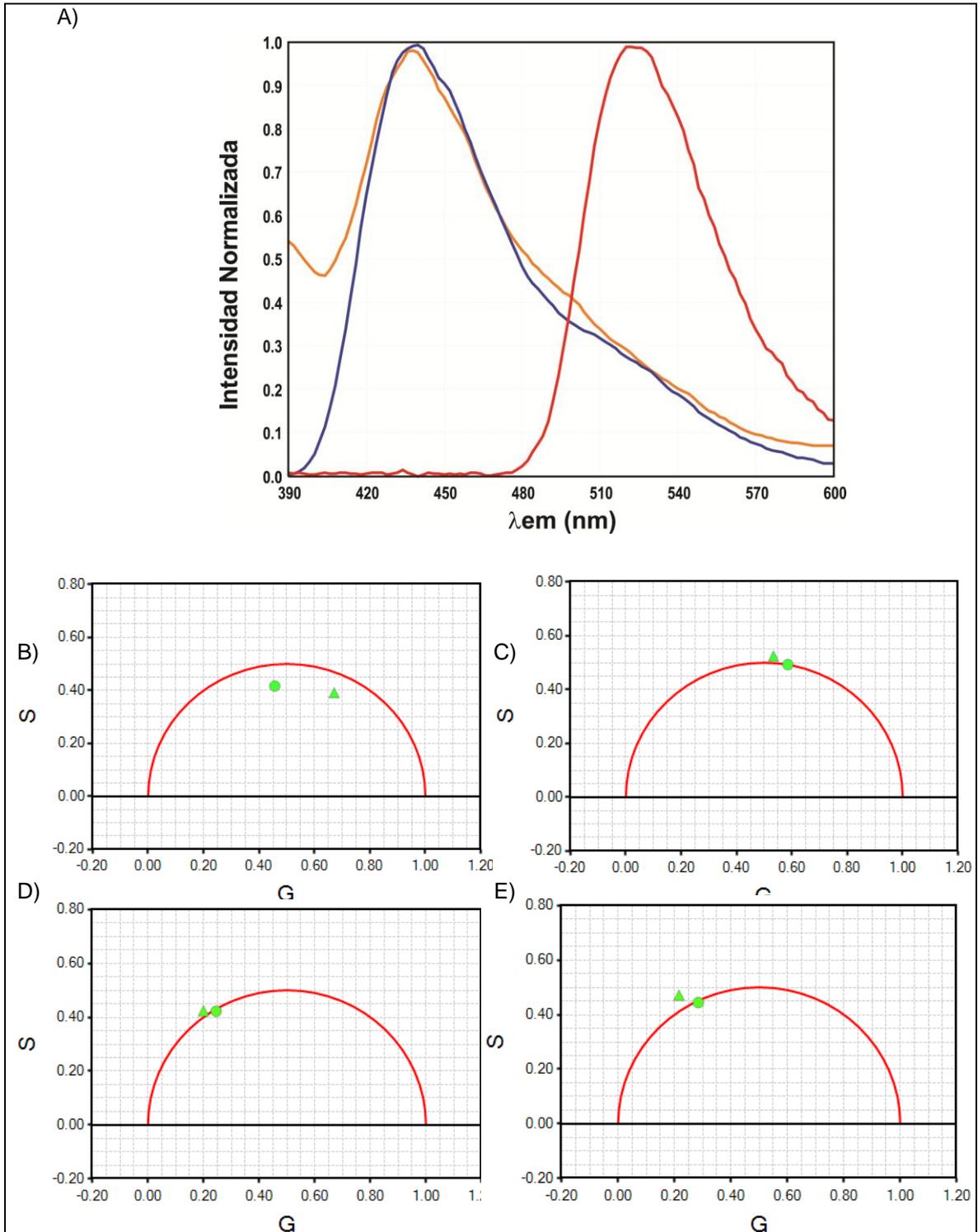
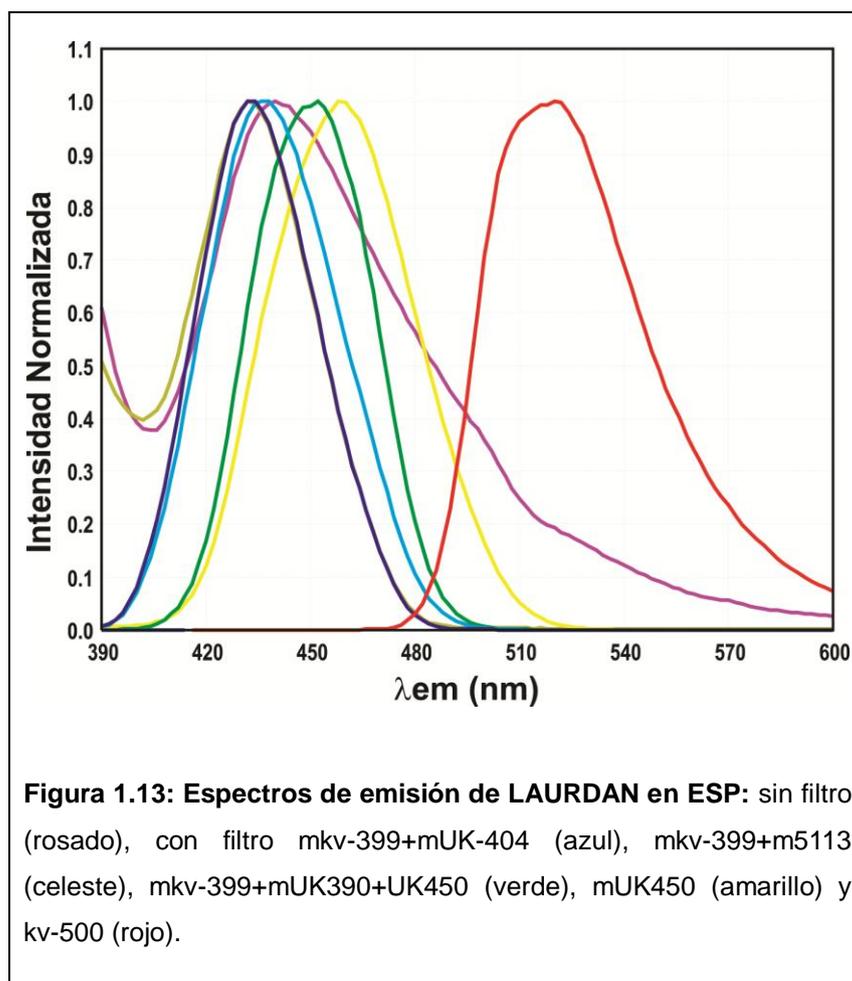


Figura 1.12: A) Espectros de emisión normalizados del PRODAN en DPPC a 20°C sin filtros en la emisión (naranja), con filtro mkv-399 (azul) y kv-500 (rojo). B y C) Posición en el PP del tiempo de vida media del PRODAN en DPPC usando una frecuencia de 45 MHz para el filtro mkv-399 (circulo) y kv-500 (triangulo) a 20°C y 54°C, respectivamente. D y E) Posición en el PP del tiempo de vida media del LAURDAN en DPPC usando una frecuencia de 42 MHz para el filtro mkv-399 (circulo) y kv-500 (triangulo) a 20°C y 40°C, respectivamente.

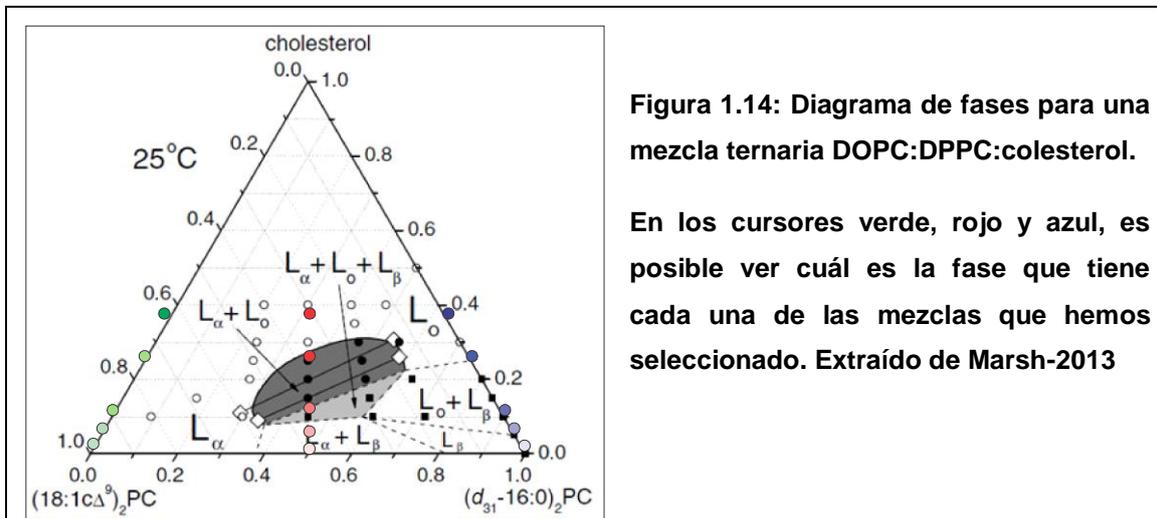
Efecto del Colesterol y la temperatura sobre membranas con fase gel (DPPC), fluida (DOPC) y coexistencia gel/fluida (DOPC/DPPC; 1:1) a través de gráfico de fasores (PP) en cubeta.

Para poder estudiar cómo se afectan la fracción relajada y no relajada de la sonda en las membranas, fue necesario tomar medidas de tiempo de vida con un set de filtro que permitiera seleccionar los estados excitados de cada población. A continuación se muestra un grupo de espectros de emisión normalizados de LAURDAN en extracto orgánico de surfactante pulmonar (ESP) a temperatura ambiente, el cual presenta coexistencia de fases Lo/Ld.



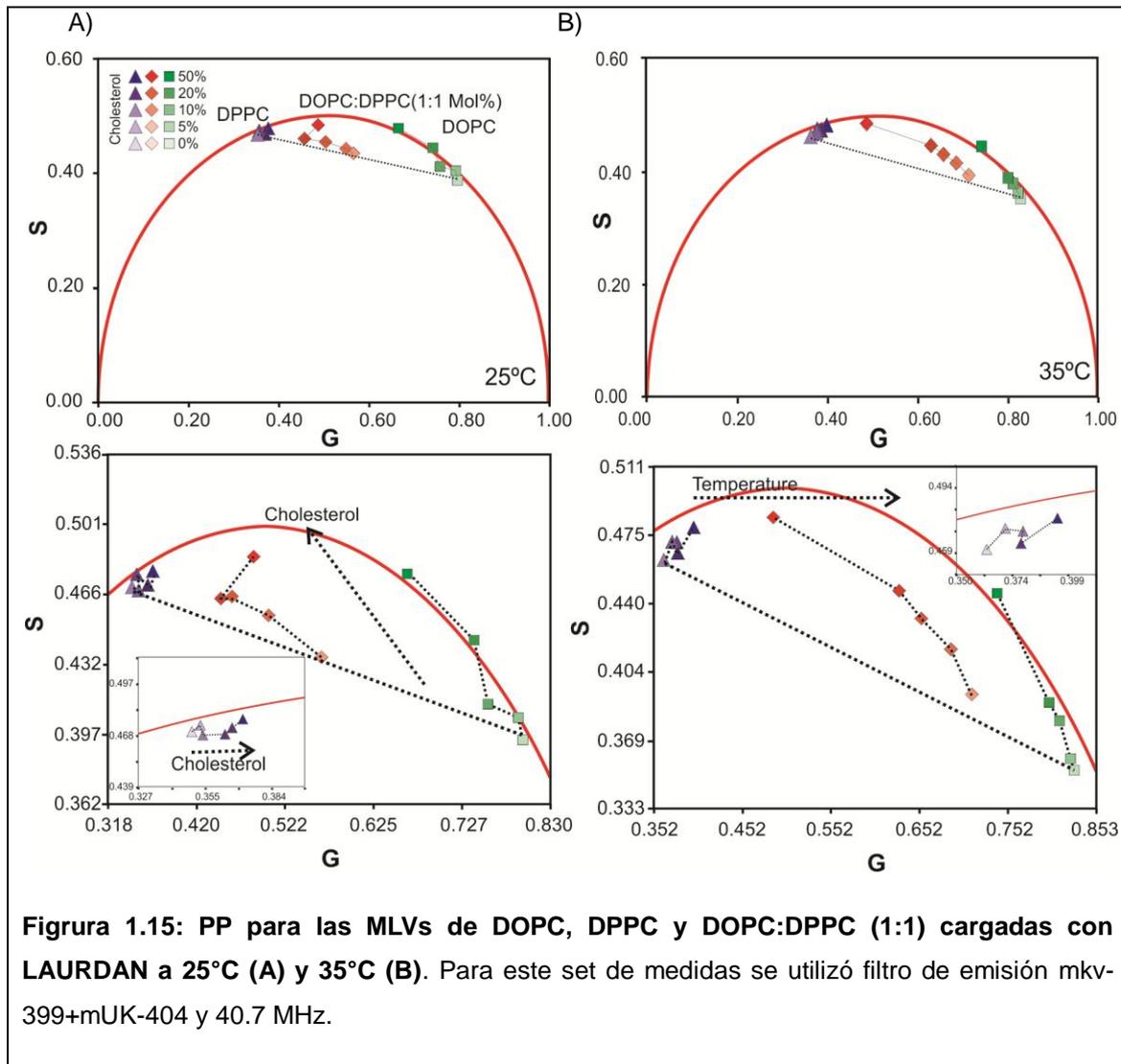
Para el análisis del efecto de la temperatura y colesterol se seleccionó el set: mkv-399+mUK-404 (como filtro o canal azul) y kv-500 (como filtro o canal rojo).

Se prepararon vesículas multilamelares con los lípidos de fase gel (dipalmitoilfosfatidicolina, DPPC), fluida (dioleilfosfatidilcolina, DOPC) y una mezcla eequimolar, a los que se le agregaron concentraciones crecientes de colesterol (Chol: 0, 5, 10, 20 y 50 % molar de colesterol por mol de fosfolípido). Como puede verse en la figura 1.14, el diagrama de fases para estos fosfolípidos muestra cuál es el estado de la membrana dependiendo de la concentración de colesterol.



A continuación puede verse un set de resultados para 25 y 35°C de las mezclas con concentración creciente de colesterol en la fracción sin relajar y relajada del LAURDAN (azul y roja).

Filtro azul:



El primer resultado a destacar de la fases puras (gel, DPPC y fluida, DOPC), es que se encuentran muy cercano al círculo universal en el canal azul y la posición para la fase fluida se asocia a tiempos de vida menores que para la fase gel. Es posible trazar una línea recta que una estos dos estados discretos y en el medio puede verse que se encuentra la mezcla de ambas fases en una proporción 1:1. Esta característica se pierde para el mismo sistema a mayor temperatura. La inclusión de colesterol provoca que los lípidos en fase simples (DPPC y DOPC) tiendan a moverse cercano al círculo universal y en sentido contrario. Mientras que para la DOPC el incremento de colesterol corre la posición del PP a valores más cercanos a (0,0), para la DPPC el incremento de colesterol corre la posición para valores más cercanos

a (1,0). Para la mezcla 1:1 de ambos fosfolípidos (con coexistencia gel/fluida) se puede ver en el gráfico 1.15 que tiene un comportamiento similar a la fase fluida, moviendo su posición hacia valores más cercanos a (0,0) con el incremento de colesterol. Los desplazamientos netos en la posición del PPson mayores para las membranas compuestas con DOPC y DOPC/DPPC, observándose un desplazamiento discreto para las membranas compuestas de DPPC.

Un resultado interesante es que la linealidad que encontramos en el método para las fases puras (sin colesterol), no se puede identificar para el sistema con colesterol (independiente de la concentración).

La temperatura, independientemente de la composición de la membrana, siempre mueve la posición en el gráfico a valores más cercanos a (1,0) o tiempos de vida más cortos.

Filtro rojo:

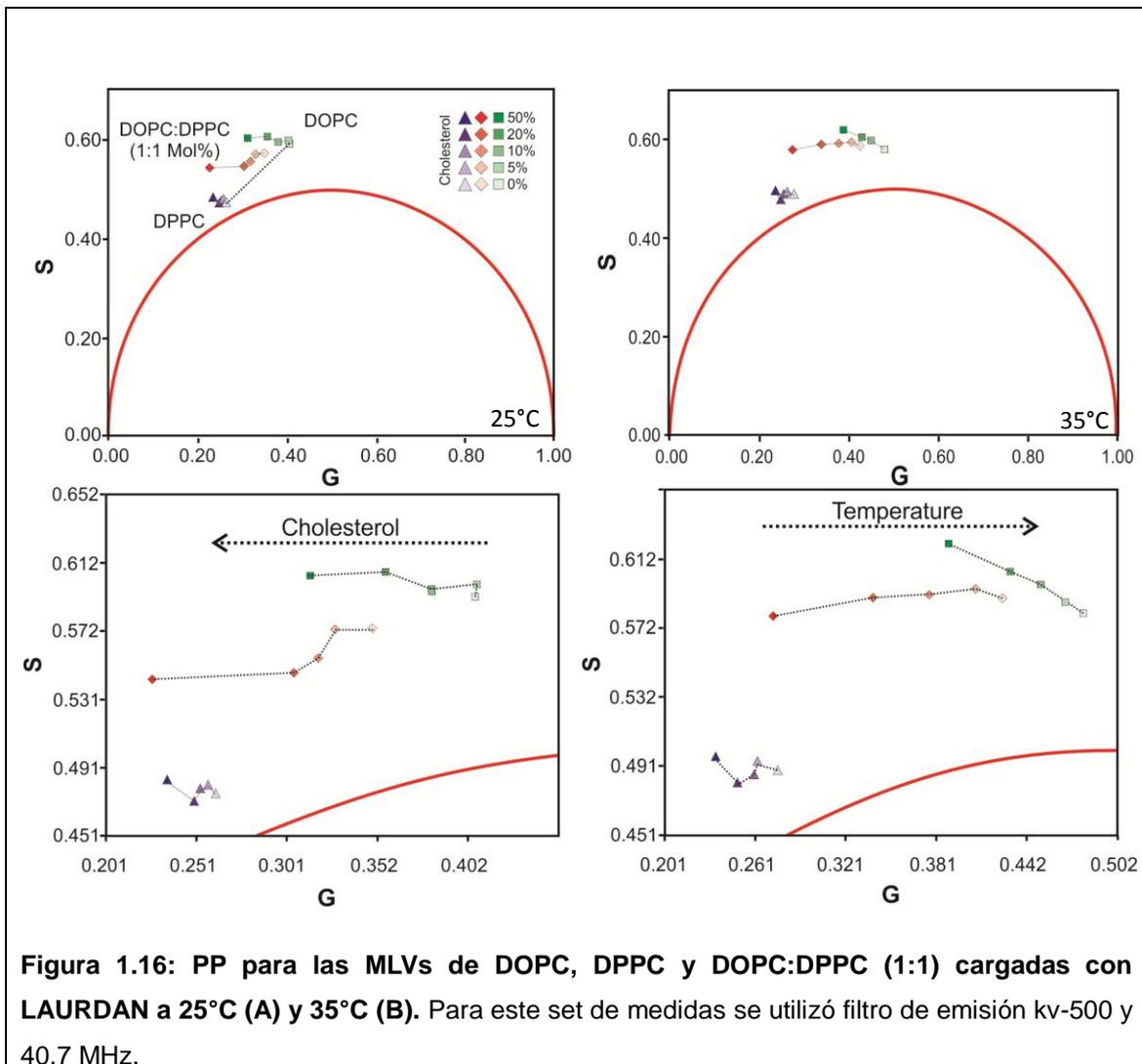


Figura 1.16: PP para las MLVs de DOPC, DPPC y DOPC:DPPC (1:1) cargadas con LAURDAN a 25°C (A) y 35°C (B). Para este set de medidas se utilizó filtro de emisión kv-500 y 40.7 MHz.

Cuando miramos la fracción roja de la emisión, lo primero que podemos destacar es que, independientemente de la fase, todos los valores de tiempo de vida medios están fuera del círculo universal, asociado a la fracción relajada de la sonda. La posición de la fase gel está más cercana a la posición (0,0) y la fase fluida más cercana a la posición (1,0). El colesterol mueve la posición de las diferentes mezclas en sentido horizontal hacia (0,0), independiente de la fase. Y la temperatura mueve en sentido contrario, o sea hacia (1,0). No es posible establecer una relación lineal entre los fosfolípidos puros y la mezcla de ambos.

Un resultado interesante resulta de mirar cómo responden las diferentes mezclas a un análisis de multifrecuencia. En la siguiente figura (figura 1.16) puede verse cómo se modifica la distancia entre las posiciones en el canal azul y rojo (dentro y fuera del círculo universal, respectivamente), encontrándose la distancia máxima para valores de frecuencia ~ 40-50 MHz. Con el cambio en la frecuencia, en un sistema heterogéneo como el que estamos estudiando, se podría seleccionar diferentes poblaciones de tiempos de vida del estado excitado de la sonda; por ejemplo excitando preferentemente tiempos de vida cortos con frecuencias altas y lo opuesto con frecuencias bajas.

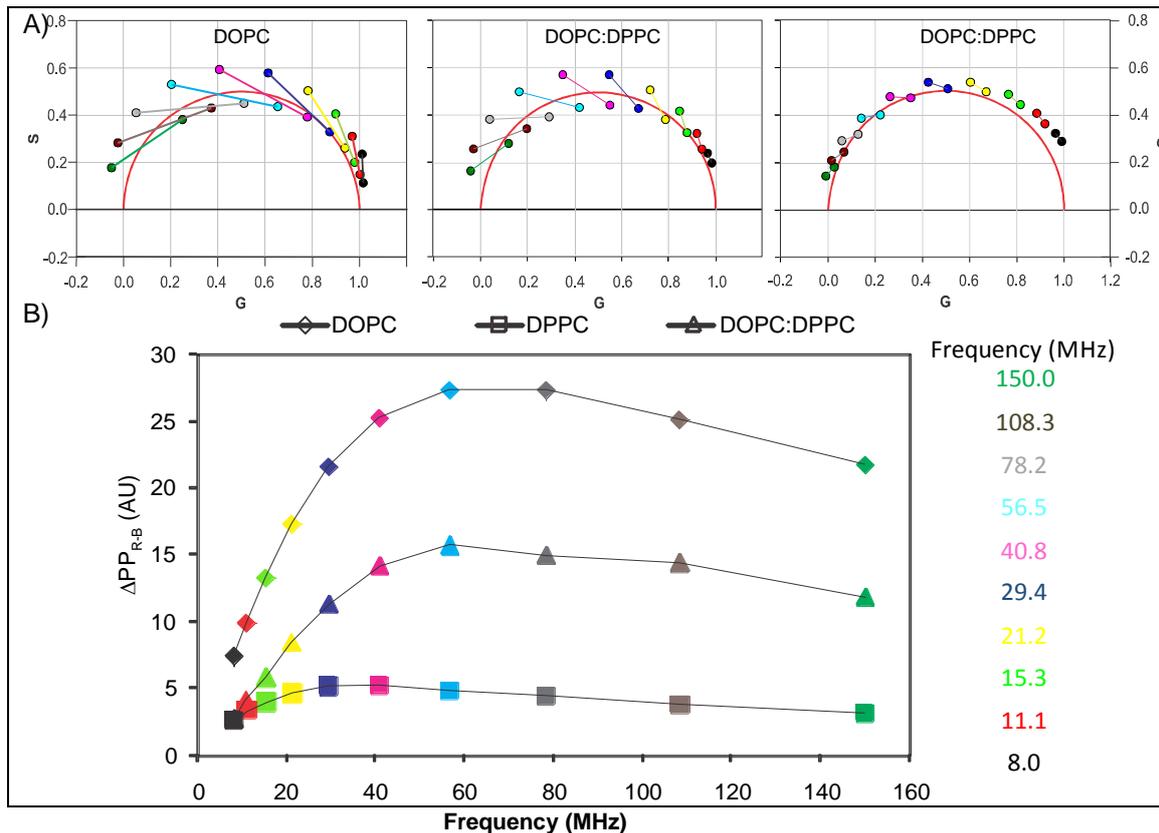


Figura 1.16: A) Gráficos de fasores para los diferentes fosfolípidos (DOPC, DPPC) y la mezcla 1:1 (DOPC:DPPC) mostrando la posición en el canal azul y rojo para un rango de frecuencias 8-150 MHz. Se midió con unidades relativas la distancia entre estas posiciones, $\Delta PP_{R-B}(B)$. Es posible ver la influencia en la selección de los estados excitados con la variación en la frecuencia.

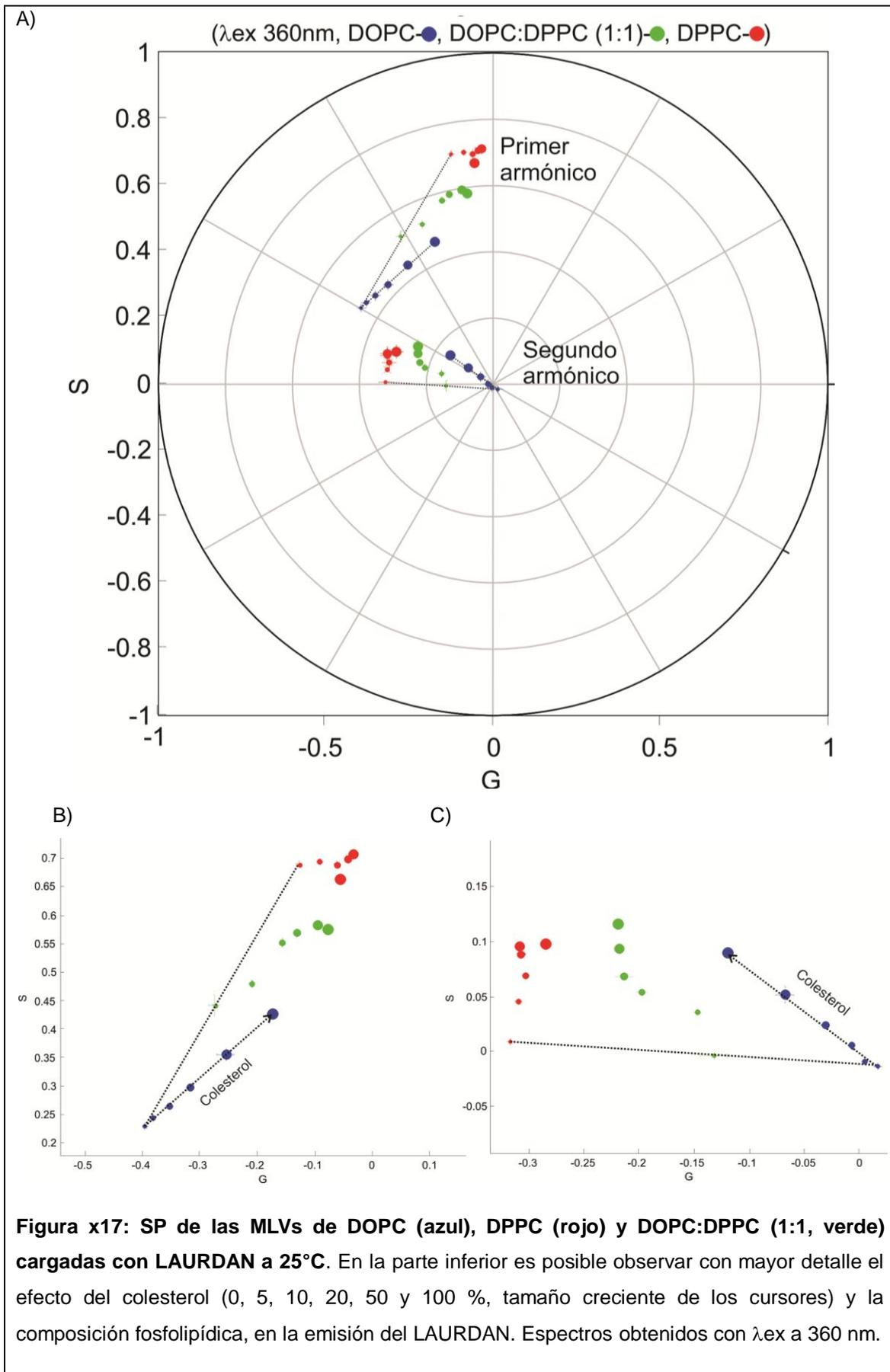
Fasores espectrales (spectral phasor, SP) para el estudio de la emisión de LAURDAN y PRODAN en membranas modelo.

Efecto del Colesterol y la temperatura sobre membranas con fase gel (DPPC), fluida (DOPC) y coexistencia gel/fluida (DOPC/DPPC; 1:1) por SP en cubeta.

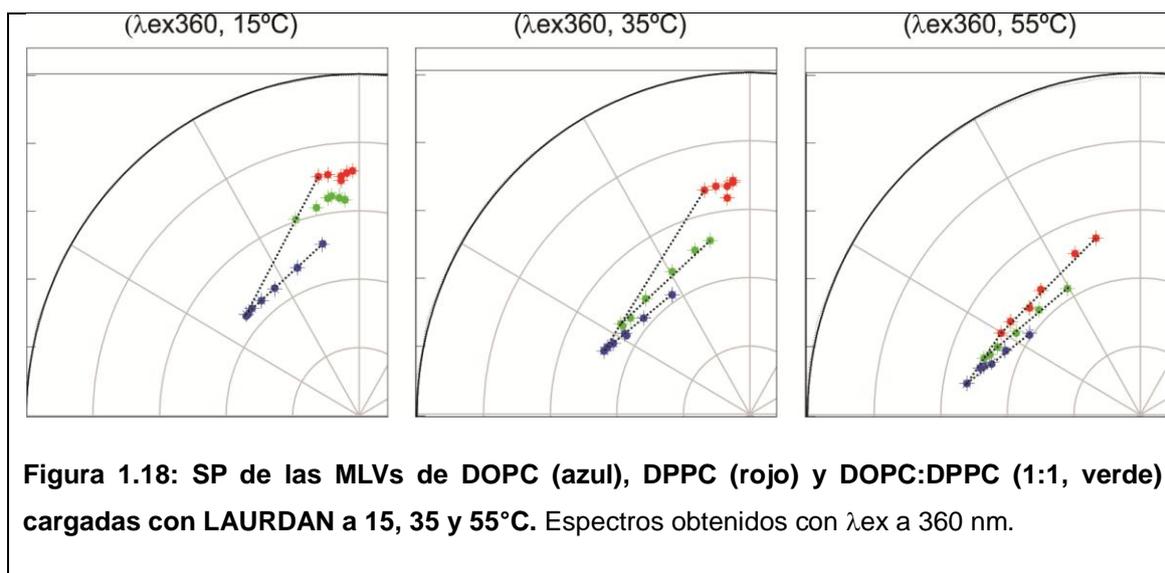
El mismo set experimental que se utilizó para el estudio de la emisión de LAURDAN y PRODAN por tiempo de vida, se evalúa para el análisis espectral con la transformación de Fourier.

En el siguiente gráfico (figura 1.17) puede verse el primer y segundo armónico de la emisión de LAURDAN en los diferentes grupos de vesículas multilamelares. Es posible identificar una relación lineal en el primer y segundo armónico para las vesículas sin colesterol, encontrándose la mezcla 1:1 de DOPC/DPPC en el medio de la trayectoria lineal que une los dos grupos de vesículas con fosfolípidos puros. También existe una trayectoria lineal para la DOPC con el incremento de colesterol, sin embargo no sucede lo mismo para la DPPC y la mezcla equimolar de DOPC:DPPC.

El colesterol mueve la posición de las diferentes mezclas hacia longitudes de onda menores (en sentido horario en la resolución angular) y dependiendo de la fase se ven comportamientos diferenciales en la resolución radial. Mientras que se observa un sutil corrimiento hacia valores mayores en la posición radial para el primer armónico de las vesículas de DOPC y DOPC:DPPC con el incremento del colesterol, este efecto es muy claro en el segundo armónico. El efecto del colesterol para la posición radial de la DPPC es opuesto, y tal como en el caso anterior, el segundo armónico otorga una mejor resolución (figura 1.17).

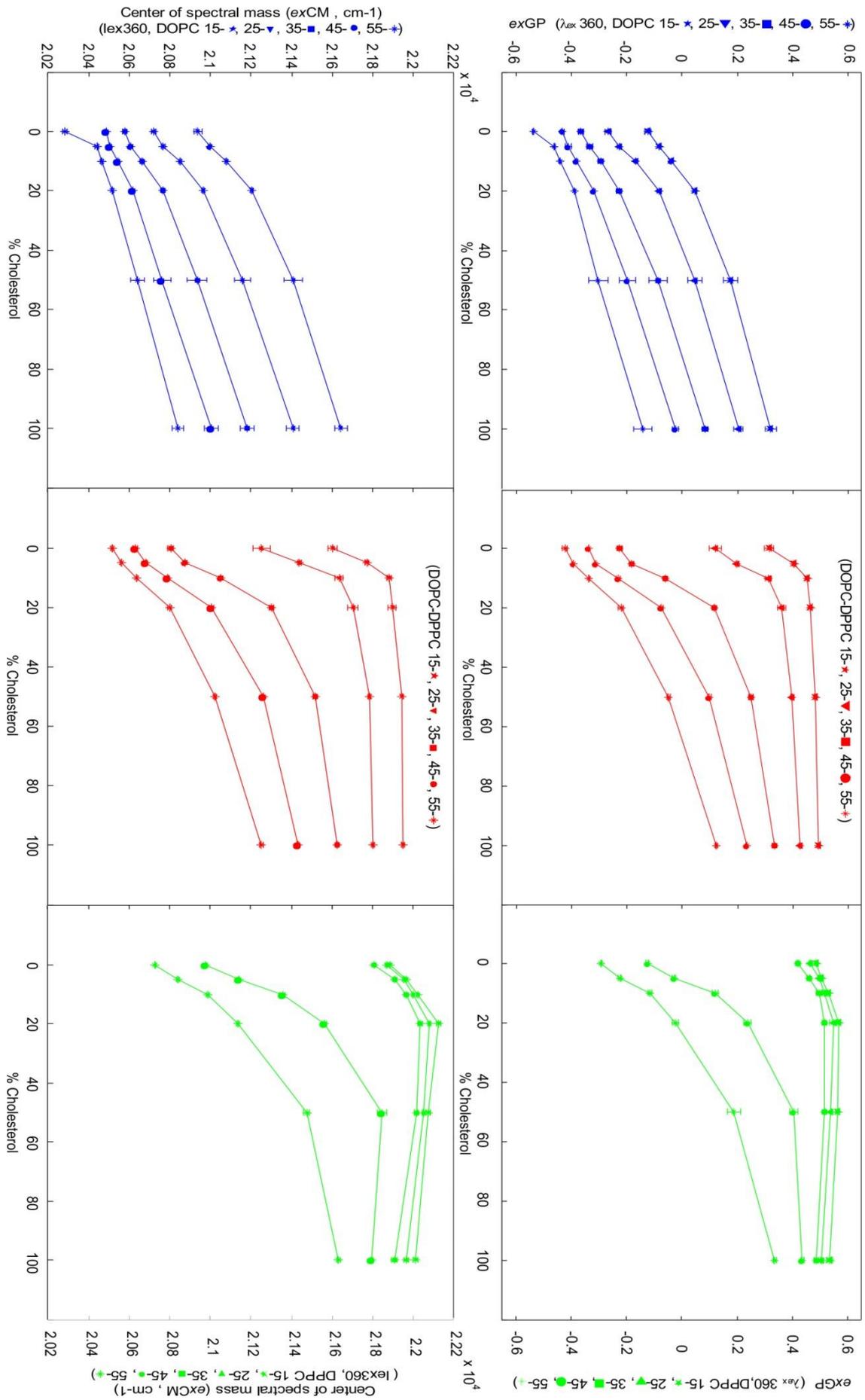


La temperatura, independientemente de la composición de la membrana, mueve la posición del SP a valores de longitud de onda mayores (gira en sentido anti-horario en la resolución angular) y modifica la posición radial hacia valores menores (más cercano al centro). Un dato relevante es que, a medida que se incrementa la temperatura, es posible ver cómo los diferentes grupos de vesículas con valores crecientes de colesterol, logran alcanzar una relación lineal independiente del grado de saturación de la fosfatidilcolina y/o si existe una mezcla equimolar de fosfatidilcolina de alto y bajo punto de fusión (Figura 1.18).



A continuación se muestran el análisis de GPex y CMex para el mismo diagrama de mezclas. Puede verse que la adición de colesterol produce un incremento en los valores de GP y CM para las vesículas con DOPC y DOPC:DPPC (1:1), alcanzando un valor estable para concentraciones mayores de 20% molar en el caso de la mezcla equimolar. Mientras que para la DPPC se observa que el colesterol produce un aumento de la GP y CM para concentraciones inferiores a 20% molar a 15, 25 y 35°C, luego de lo cual el incremento en la concentración produce una disminución de la GP y CM. El efecto de la temperatura, independientemente de la composición de las membranas, produce una caída de la GP y CM (ver figura 1.19).

Figura 1.19x: GP de LAURDAN en vesículas multilamelares de DOPC (azul), DPPC (verde) y DOPC:DPPC (rojo, 1:1), con valores crecientes de colesterol (0,5, 10, 20, 50 y 100 % molar) y temperatura (15, 25, 35, 45 y 55°C; estrella, triangulo inverso, cuadrado, círculo y rombo, respectivamente). Se utilizó como λ_{ex} 360 nm.



Estudio de la coexistencia de fases en vesículas gigantes unilamelares (GUVs) con mezclas binarias/ternarias por SP en microscopia confocal de 2-fotones.

A través del método descrito por Angelova y colaboradores (Angelova-1984) se generaron vesículas gigantes unilamelares con mezclas de lípidos que permitieran generar diferentes tipos de fases (ver diagrama de fases figura 1.14). Las imágenes espectrales fueron tomadas en un microscopio Zeiss 710 con resolución espectral y un laser Mai-Tai (SpectraPhysics) sintonizable de 2-fotones (ver descripción detallada en materiales y métodos). Los experimentos fueron realizados con luz polarizada y circularmente polarizada, para evaluar el efecto de fotoselección.

En la siguiente figura podemos ver el primer y segundo armónico del espectro de emisión del LAURDAN en GUVs con fase gel (DPPC) o fluida (DOPC) a 24°C y el efecto del colesterol. A través del uso de cursores podemos definir grupos de pixeles de interés en el gráfico del primer armónico y visualizar su posición en la figura (figura 1.20).

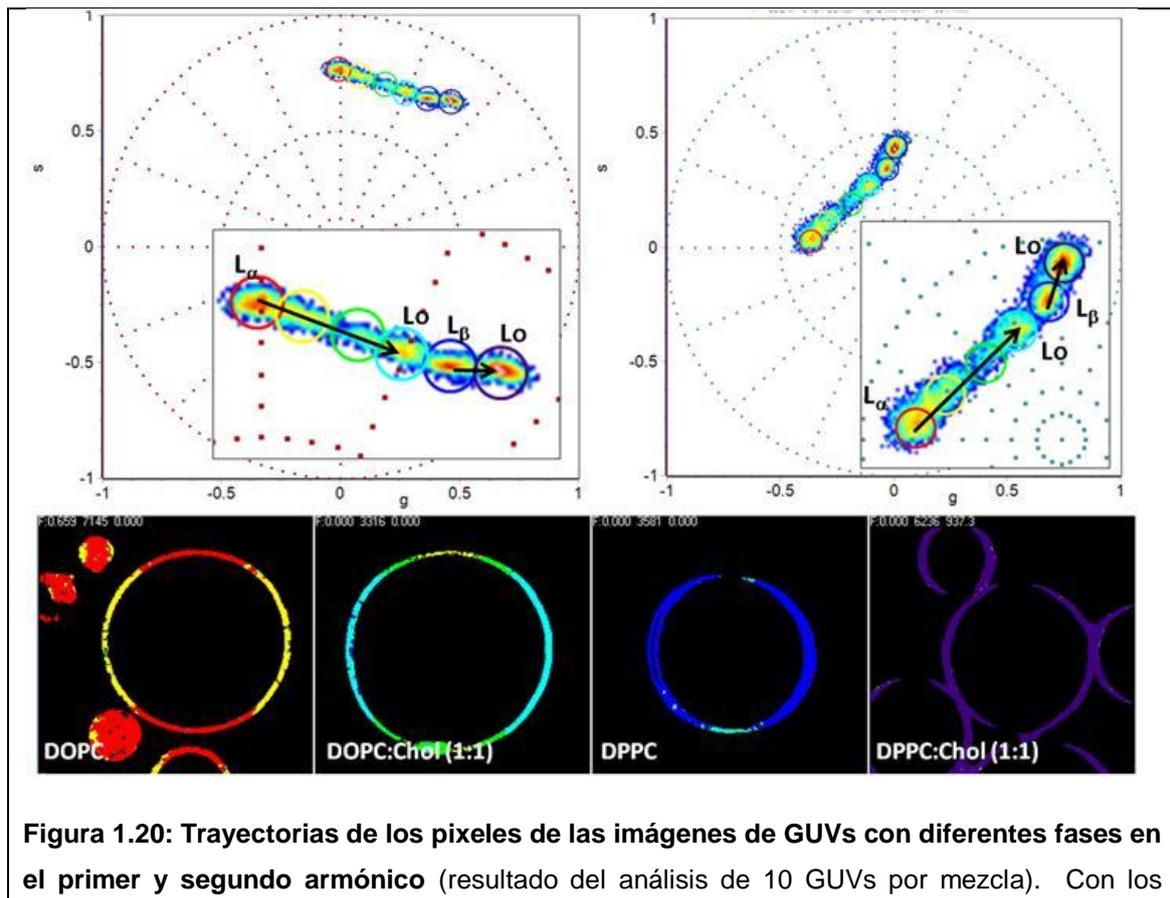


Figura 1.20: Trayectorias de los pixeles de las imágenes de GUVs con diferentes fases en el primer y segundo armónico (resultado del análisis de 10 GUVs por mezcla). Con los

cursores de diferentes colores es posible seleccionar grupos de píxeles y ver su ubicación en la figura. En el zoom es posible ver la selección de los píxeles con diferentes fases definidas a partir de las mezclas seleccionadas de los diagramas de fases (figura 1.14), así como las trayectorias generadas por la inclusión de colesterol en las membranas con fases simples (se definió un código según el corrimiento espectral del violeta al rojo, como los píxeles de menor a mayor corrimiento espectral). En la parte inferior es posible ver las imágenes representativas de los diferentes grupos de GUVs (imágenes tomadas a resolución de 512x512).

Tabla 1.5: Posición de los cursores en los gráficos de fasores de la figura xx.

Cursor	Primer armónico*		Segundo armónico*	
	centro	ancho	centro	ancho
Rojo	495	16.6	491	74.9
Amarillo	489	17.8	484	114.3
Verde	481	18.6	473	138.0
Cian	474	18.9	465	118.2
Azul	468	18.1	457	80.0
Violeta	462	15.3	455	51.0

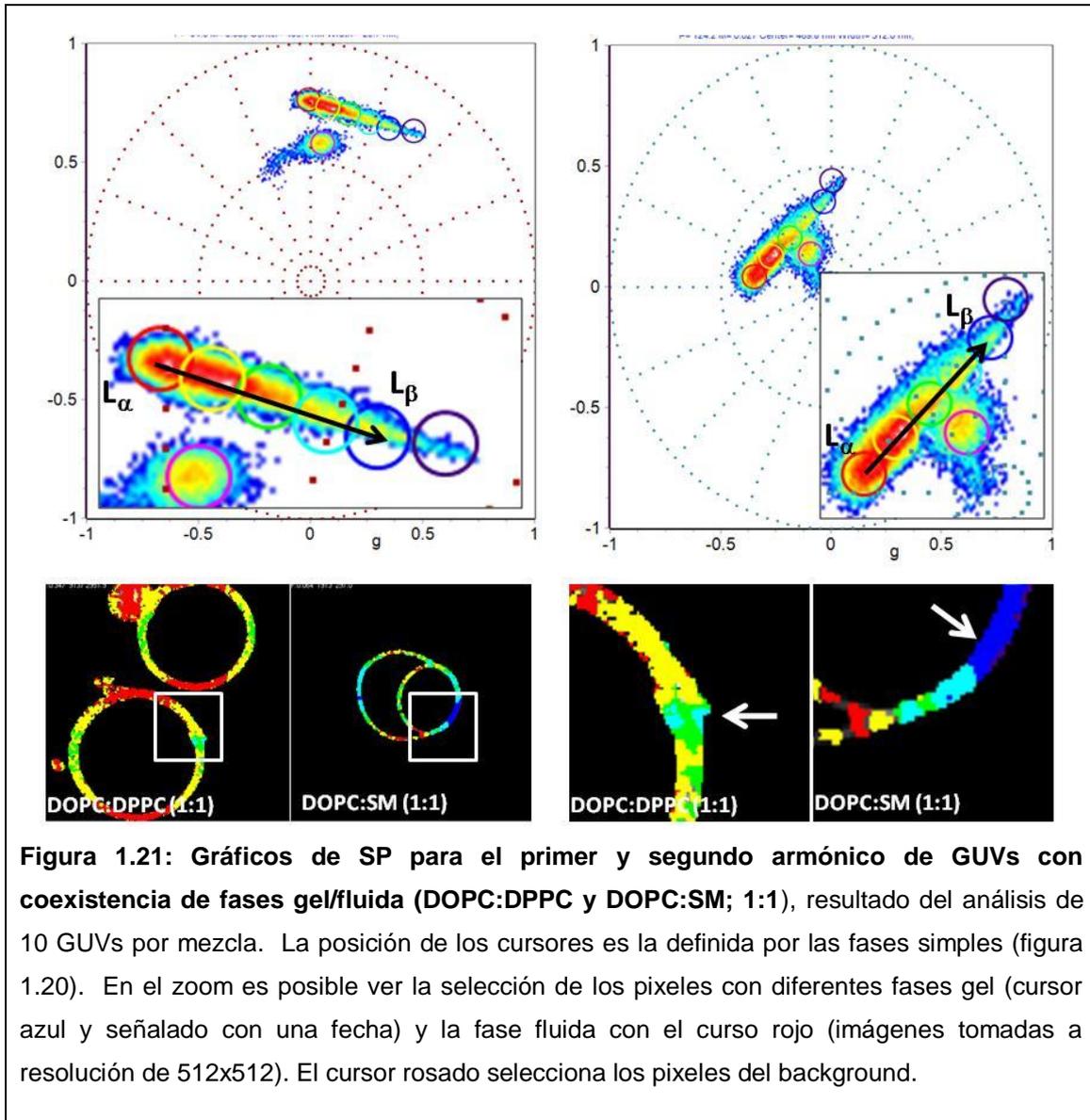
*Valor medio en nm.

Se seleccionaron en el gráfico SP del primer armónico los píxeles que pertenecen a cada tipo de fase a partir de un código de colores (ver figura 1.19). Se definen primeramente las fases simples (gel y fluida, $L\beta$ y $L\alpha$ respectivamente) y posteriormente se identifica el grupo de píxeles que pertenece a la mezcla de DPPC y DOPC más colesterol (Lo). Es posible ver que en ambos casos el colesterol mueve la posición espectral del LAURDAN hacia longitudes de onda menores (ver figura 1.20 y tabla 1.5). Sin embargo, cuando se analiza el ancho del espectro, para ambos casos el efecto es inverso; para el caso de la DPPC el colesterol disminuye el ancho del espectro y lo opuesto sucede para la DOPC.

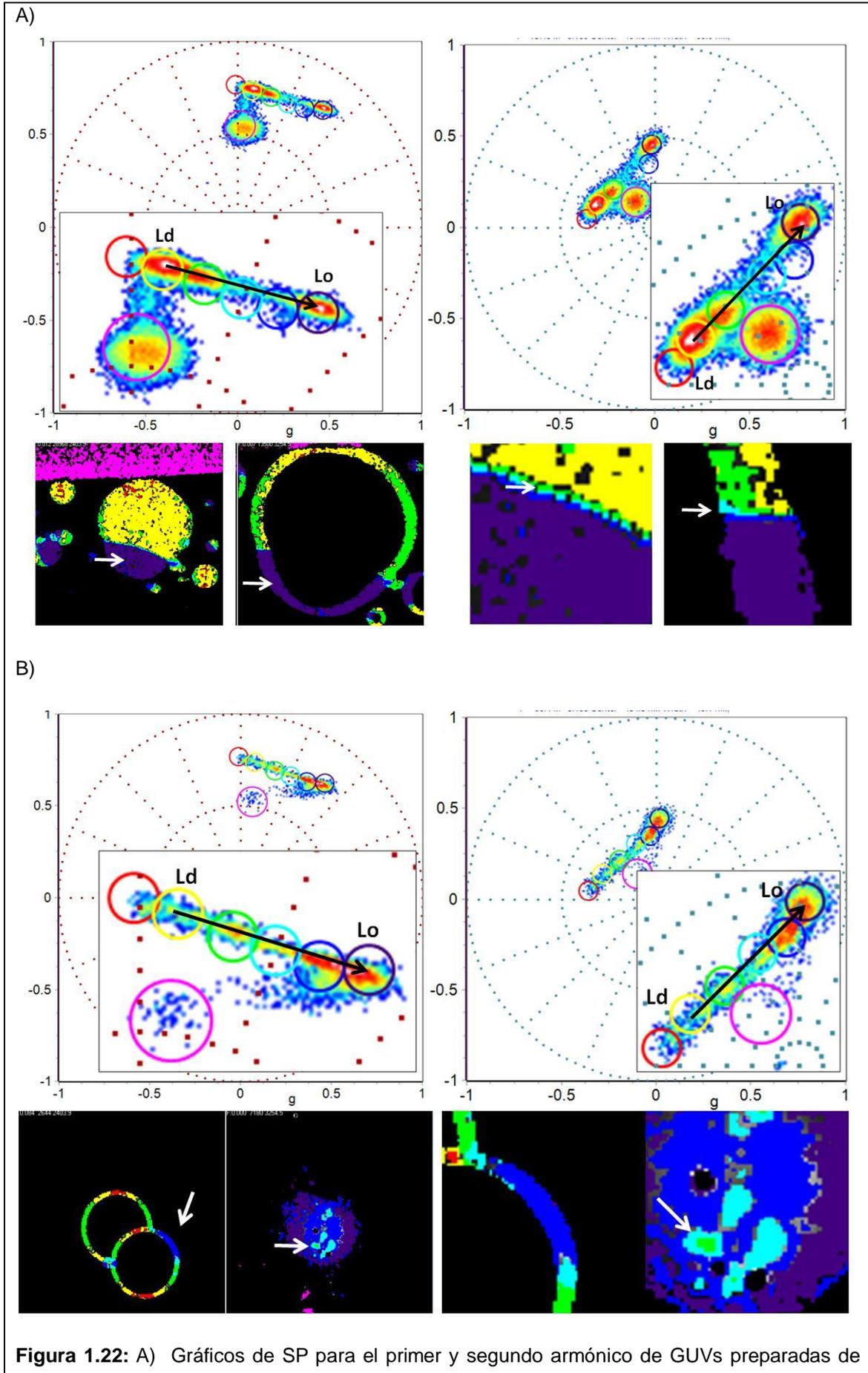
Es posible identificar trayectorias lineales para: $L\alpha \rightarrow L\beta$, $L\beta \rightarrow Lo$ y $L\alpha \rightarrow Lo$. La presencia de píxeles con una combinación lineal de dos fases se pueden identificar en la trayectoria que une a estas (cursores amarillo y verde).

La mezcla equimolar de DOPC:DPPC no muestra una clara coexistencia de fase gel/fluida, sin embargo puede verse que existen píxeles que poseen una mezcla de ambas fases definidos por los cursores amarillo, verde y cian. Cuando se realiza el mismo análisis para una mezcla equimolar de DOPC:SM,

puede verse con claridad que se identifican dominios de membrana con fase gel (cursor azul), ver figura 1.21.



Finalmente se realizaron mezclas ternarias con coexistencia de fases Lo/Ld (DOPC:DPPC:Chol y DOPC:SM:Chol, ver diagrama de fases en figura 1.14), se identificaron las fases siguiendo la posición de los cursores definidos en la figura 1.20. Puede verse que ambas mezclas presentan dominios con fase Lo (cursor violeta/azul) y fase Ld (cursor amarillo). La figura 1.21A muestra una imagen representativa de una GUV con un mezcla DOPC:DPPC:Chol (relación molar 2:2:1), es posible ver que los límites de los dominios presentan



DOPC:DPPC:Chol (relación molar 2:2:1), resultado del análisis de 10 GUVs por mezcla. La posición de los cursores es la definida por las fases simples (figura 1,20). En el zoom es posible ver la selección de los pixeles con diferentes fases: Lo (cursor violeta/azul) y Ld (curso amarillo/rojo). B) Gráficos de SP para el primer y segundo armónico de GUVs preparadas de DOPC:SM:Chol (relación molar 1:1:1), resultado del análisis de 10 GUVs por mezcla. En el zoom es posible ver la selección de los pixeles con diferentes fases: Lo (cursor violeta/azul) y Ld (curso amarillo/rojo). (Imágenes tomadas a resolución de 512x512). El cursor rosado selecciona los pixeles del background.

una interfase de pixeles con diferente proporción de las fases Lo/Ld (cursores azul, cian y verde). La fase fluida “pura” definida por el cursor rojo parece desaparecer por completo, y el centro de la fase Ld se define por el cursor amarillo que muestra una centro espectral menor y con un ancho mayor. Sin embargo es claro que la posición de la fase Lo para cada una de las mezclas es sutilmente diferente.

Para el mismo grupo de vesículas se procedió a incluir un filtro de polarización circular (quarter-wave plate), para disminuir el efecto de fotoselección asociado a la excitación del LAURDAN con luz polarizada. Fue necesario determinar la correcta orientación angular del filtro que permita disminuir la polarización en una mezcla de DPPC. Como puede verse en la siguiente figura 1.23, se rotó el filtro hasta conseguir desaparecer el efecto de polarización, identificando como mejores ángulos: 300° y 332°.

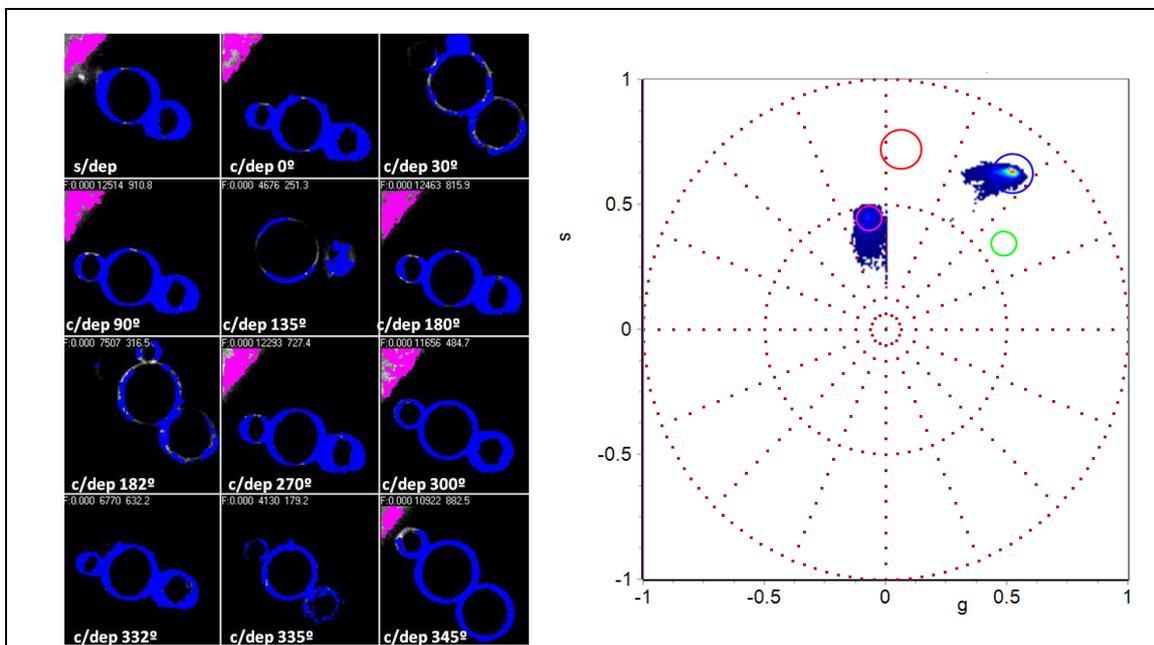


Figura 1.23: Imágenes de GUVs de DPPC tomadas con el mismo set experimental pero variando la posición del filtro de polarización circular. Al pie de cada imagen es posible identificar el ángulo utilizado. El cursor azul se posicionó en el centro espectral para la población de pixeles de todas las vesículas. El cursor rosado selecciona los pixeles del background.

Posteriormente se realizó el mismo análisis espectral para las vesículas con fases simples y la combinación de éstas. En la figura 1.24, se puede ver la posición en el primer y segundo armónico de SP para el LAURDAN en las vesículas de DOPC y DPPC. Como puede verse, la adición de colesterol modifica la posición espectral del LAURDAN dependiendo de la fase en la que se encuentre. Para las vesículas de DOPC existe un corrimiento significativo hacia longitudes de onda menores y con un ancho espectral mayor (ver figura 1.24 y tabla 1.6). Mientras que para el caso de la DPPC, el colesterol apenas modifica la posición espectral, cambiando mayoritariamente el ancho del espectro.

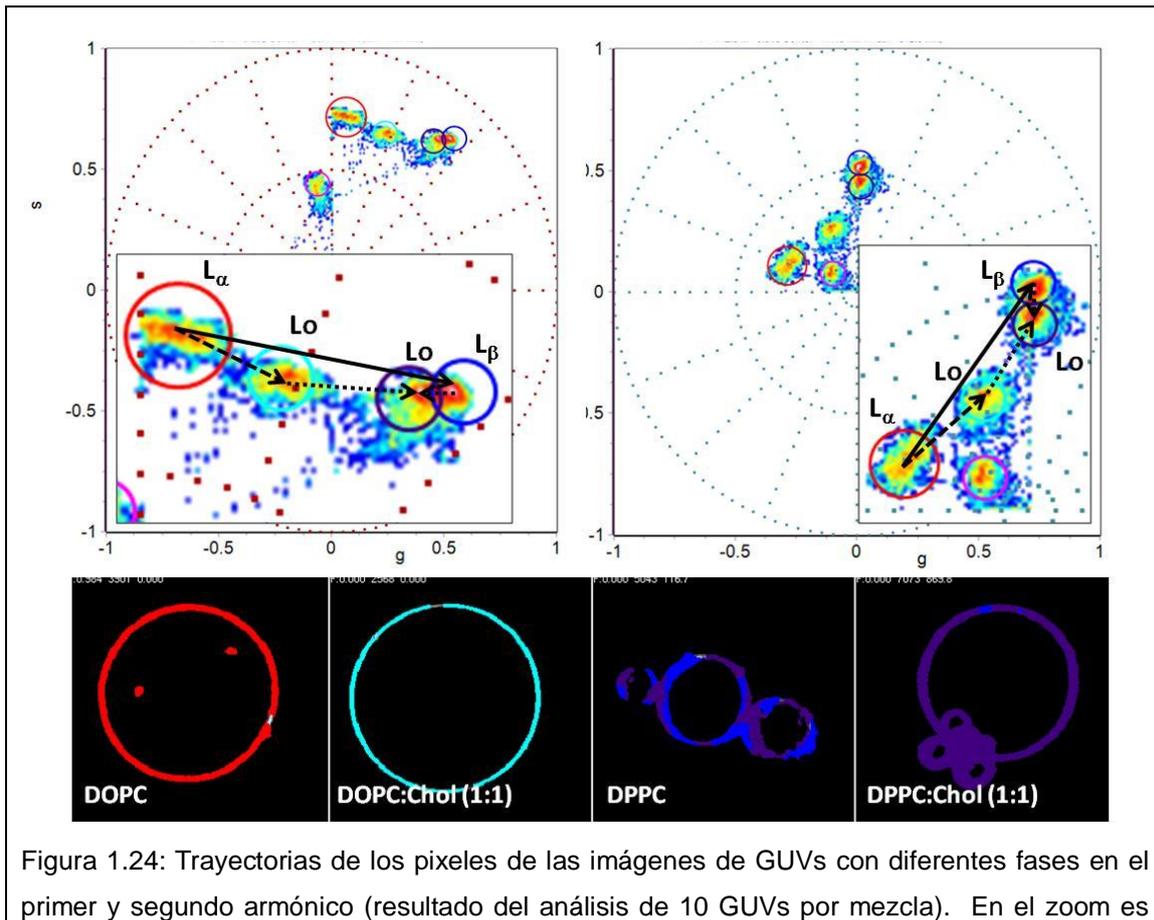


Figura 1.24: Trayectorias de los pixeles de las imágenes de GUVs con diferentes fases en el primer y segundo armónico (resultado del análisis de 10 GUVs por mezcla). En el zoom es

posible ver la selección de los píxeles con diferentes fases definidas a partir de las mezclas seleccionadas de los diagramas de fases (figura 1.14), así como las trayectorias generadas por la inclusión de colesterol en las membranas con fases simples (se utilizó el mismo código de corrimiento espectral definido para la figura 1.20). En la parte inferior es posible ver las imágenes representativas de los diferentes grupos de GUVs (imágenes tomadas a resolución de 256x256 y con el filtro de polarización circular a 330°). El cursor rosado selecciona los píxeles del background.

Tabla 1.6: Posición de los cursores en los gráficos de fasores de la figura 1.24.

Cursor	Primer armónico*		Segundo armónico*	
	centro	ancho	Centro	ancho
Rojo	490	18.3	484	99.5
Cian	475	20.1	465	118.5
Azul	459	14.4	455	36.4
Violeta	462	16.0	455	49.4

*Valor medio en nm.

Fue necesario modificar sutilmente la posición de los cursores utilizados para el análisis con luz polarizada (figura 1.20) dado que existieron pequeños corrimientos espectrales asociados a la polarización de la luz (ver tabla 1.5 y 1.6).

Cuando se genera una mezcla binaria con coexistencia de fases gel/fluida (DOPC:SM, en proporción equimolar 1:1) es posible identificar una relación lineal entre fases “simples” (gel y fluida). En los límites de los dominios gel/fluido se pueden ver píxeles con coexistencia gel/fluida en diferentes proporciones (amarillo/cian), ver figura 1.25.

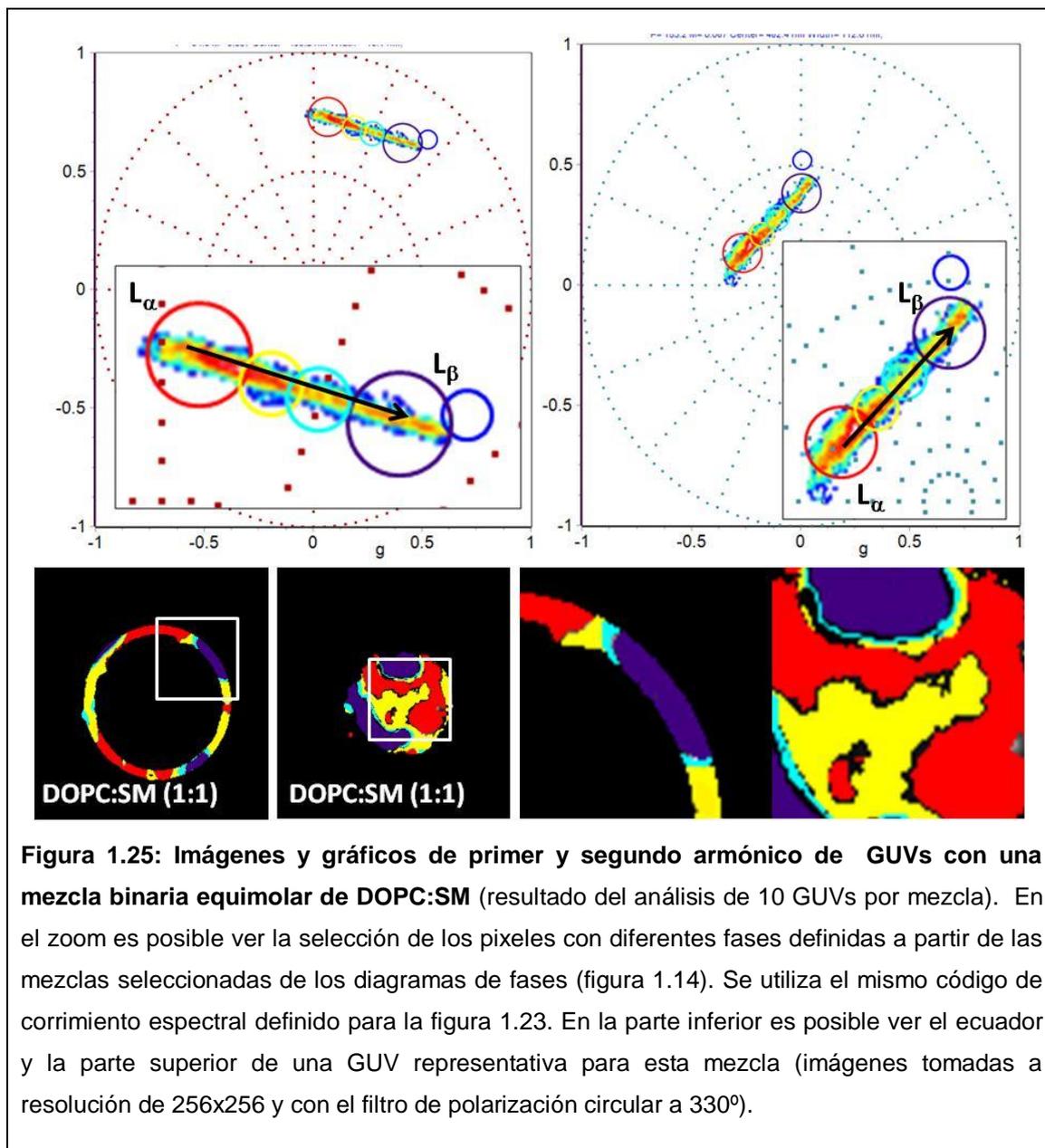
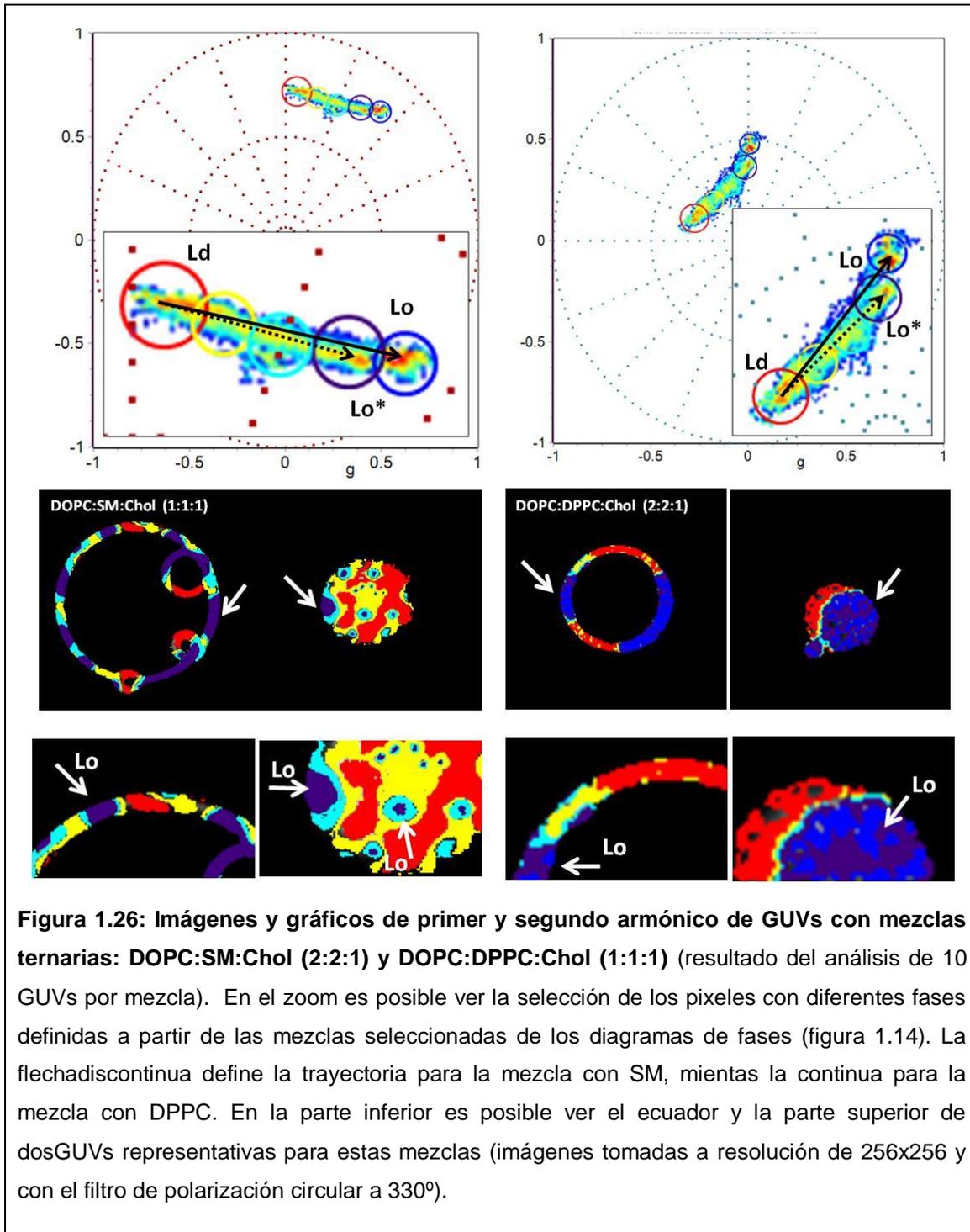


Figura 1.25: Imágenes y gráficos de primer y segundo armónico de GUVs con una mezcla binaria equimolar de DOPC:SM (resultado del análisis de 10 GUVs por mezcla). En el zoom es posible ver la selección de los pixeles con diferentes fases definidas a partir de las mezclas seleccionadas de los diagramas de fases (figura 1.14). Se utiliza el mismo código de corrimiento espectral definido para la figura 1.23. En la parte inferior es posible ver el ecuador y la parte superior de una GUV representativa para esta mezcla (imágenes tomadas a resolución de 256x256 y con el filtro de polarización circular a 330°).

Las mezclas ternarias DOPC:SM:Chol (1:1:1) y DOPC:DPPC:Chol (2:2:1) mostraron coexistencias de fase Lo/Ld, identificándose una relación lineal para la mezcla con SM, mientras que no del todo para la DPPC (figura 1.26). En los dominios de la mezcla con DPPC se puede ver que existe mayor heterogeneidad en los pixeles que para la mezcla con SM, sin embargo para ambos casos los límites de los dominios siempre poseen pixeles con combinaciones lineales de las fases Lo/Ld (amarillo y cian), ver figura 1.26 y 1.27.



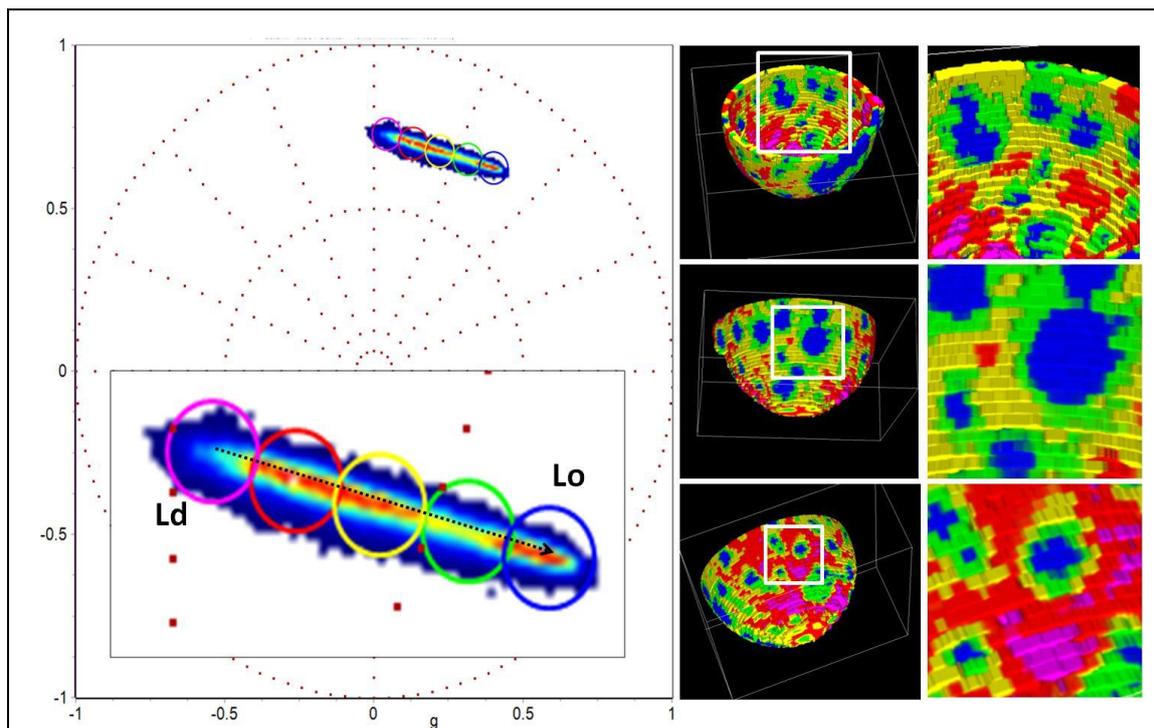


Figura 1.27: Primer armónico de la emisión de LAURDAN en una GUV compuesta por DOPC:SM:Chol (2:2:1). Reconstitución 3D de una GUV, en el zoom es posible ver en detalle los dominios Lo (seleccionados con el cursor azul), rodeados de pixeles con combinación de fases Lo/Ld en diferentes proporciones (cursores verde y amarillo) y finalmente la fase Ld seleccionada con los cursores rojo y rosado. La flecha discontinua define la trayectoria para la mezcla (imágenes tomadas a resolución de 256x256 y con el filtro de polarización circular a 330°).

Discusión:

Los efectos del colesterol en membranas modelo han sido ampliamente estudiados en las últimas dos décadas, utilizándose una variedad de métodos biofísicos como resonancia magnética nuclear (RMN) (Vist-Davis-1990; Sankaram-Thompson-1990a), resonancia electrónica de espín (EPR) (Subczynski-1990; Sankaram-Thompson-1990b), calorimetría diferencial de barrido (Vist-Davis-1990, Tampé-1991; Keough-1989), dilatometría (Melchior-1980), difracción de neutrones de ángulo bajo (SAXS) (Mortensen-1988) y fluorescencia (van Langen-1989; Schroeder-1991; Ben-Yasar y Barenholz-1989; Nemezc y Shroeder, 1988; Parassasi-1994a, -1994b y -1995).

El colesterol es una molécula ubicua en las membranas de mamíferos, donde genera modificaciones estructurales y dinámicas en las propiedades de los fosfolípidos. Pese a la mala reputación que el colesterol tiene asociada con la promoción de diferentes enfermedades como arteriosclerosis o Alzheimer (Bendtzen-2014; Matsuzaki-2014), éste es imprescindible para el correcto funcionamiento de las membranas celulares y se ha asociado a la regulación de procesos de señalización a través de membranas (Adebiyi-2014; Agarwal-2014; Lee-2014).

Pese al esfuerzo dedicado en las últimas dos décadas al estudio de los efectos del colesterol en modelos de membranas sintéticas, el estudio de sistemas de membrana celulares sigue siendo un problema todavía de desarrollo metodológico a resolver. Con el advenimiento de las nuevas tecnologías de microscopía confocal de fluorescencia, el uso de sondas de relajación por polaridad del entorno demostraron ser muy importantes para comprender aspectos estructurales y dinámicos de las membranas celulares con resolución espacio-temporal (Yu-1996, Parasassi-1987, Dietrich-2001).

En este trabajo proponemos el uso de dos nuevas herramientas de análisis de los resultados de la emisión del LAURDAN y PRODAN en estado estacionario y en el tiempo de vida (gráficos de fasores espectrales y en el tiempo de vida, SP y PP, respectivamente).

Se ha caracterizado el corrimiento de PRODAN en sistemas con diferente polaridad y temperatura para comprender como se comporta el tiempo de vida promedio en el PP. Los resultados muestran que la temperatura así como la polaridad mueven la posición del tiempo de vida media en el PP a valores más cercanos a (1,0), lo cual significa a tiempos de vida menores (tabla 1.2 y 1.3, figura 1.11). Mientras que, cuando se mide el tiempo de vida para el PRODAN y LAURDAN en vesículas de DPPC a temperaturas por debajo y arriba de la transición de fase (T_m), puede verse que el PRODAN pasa de un sistema de dos componentes a básicamente un sistema simple (tabla 1.3), identificándose una disminución del τ_1 y la desaparición aparente del τ_2 . Esto se asocia con el reparto de PRODAN entre la membrana y el agua. Se ha demostrado que para temperaturas superiores a la T_m de la DPPC (fase líquida cristalina o fluida) el PRODAN tiene una afinidad hacia la membrana 35 veces mayor (Krasnowska-1998). Los tiempos de vida son comparables con valores previamente reportados por otros autores (Krasnowska-1998).

El componente de tiempo de vida 0,01 para la temperatura superior a la T_m puede estar asociado a la dispersión de luz, lo cual se debe a que los experimentos fueron realizados en vesículas multilamelares (MLVs). La inclusión de filtros de pase alto en la emisión, permite seleccionar diferentes poblaciones de tiempos de vida, asociados a diferentes estados de relajación de la sonda en la membrana. En la figura 1.12 y tabla 1.4, se puede ver que si se seleccionan porciones de la emisión más cercanas al rojo, los tiempos de vida tiene una disminución del valor medio para 20°C, pero no para la temperatura por arriba de la T_m . Esto es debido a que en el caso de la DPPC para temperaturas por arriba de 41.5°C la membrana se encuentra en fase líquida cristalina, por lo cual el uso de filtros de emisión para el rojo o azul no tiene ningún efecto significativo en la selección de estados excitados.

Para PP a 20°C es posible ver, que tanto para el filtro en el azul como para el rojo, los valores están dentro del círculo universal (figura 1.12B), lo que significa que el tiempo de vida medio debería estar compuesto por combinaciones lineales de al menos dos componentes. Sin embargo, a 54°C se identifica que el filtro azul posiciona el cursor sobre el círculo universal (denotando un componente mono-exponencial), mientras que el filtro rojo

permite identificar la presencia de relajación dipolar del PRODAN en DPPC en fase líquida cristalina.

Para el caso del LAURDAN es posible ver en los PP que su posición siempre se encuentra hacia valores más cercanos a (0,0), lo que significa que su tiempo de vida promedio es mayor que el del PRODAN. El filtro rojo siempre posiciona al cursor fuera del círculo universal, indicando la presencia de relajación dipolar y el filtro azul muestra un componente mono-exponencial que responde a la temperatura moviendo su posición hacia tiempos de vida más cortos (ver figura 1.12D y E).

Cuando analizamos los efectos del colesterol sobre membranas con fase gel (DPPC), fluida (DOPC) y con existencia gel/fluida (DOPC:DPPC) por PP, en la fracción azul de la emisión de LAURDAN (figura 1.15), es posible ver que el método predice con claridad la posición de las fases simples (cursor azul y verde) cercano al círculo universal (mostrando la presencia un componente mono-exponencial para cada fase simple) y la mezcla equimolar en el medio de la trayectoria que une los cursores de las fases simples. Además, es posible identificar rápidamente que el tiempo de vida medio del LAURDAN en DPPC es mayor que el tiempo de vida del LAURDAN en DOPC, lo cual está en línea con los resultados antes descritos por diferentes autores (Parassasi-1986).

Cuando se incluye colesterol en las membranas, vemos que para las vesículas con fases fluida y coexistencia gel/fluida, el tiempo de vida medio para el LAURDAN sufre un corrimiento para posiciones más cercanas a (0,0), lo que se corresponde con tiempos de vida mayores. Esto se encuentra asociado al efecto del colesterol sobre las propiedades físicas de membranas en fase líquida cristalina descrito por (Thewalt-Bloom-1992), el colesterol promueve el orden de la membrana para concentraciones mayores a 6% (aparición de fase L_d para concentraciones de colesterol entre 6-25%) y la aparición de fase L_o para concentraciones mayores al 30% molar. La fase L_d tiene restricciones en la rotación axial de los fosfolípidos, mientras que para la fase L_o a esto se suma la disminución en la difusión lateral de los fosfolípidos (Ipsen-1987, Mouritsen-1991), y se asocia a cambios en el estado de hidratación y polaridad de la interfase de las membranas (Parassasi-1995).

Cuando analizamos los resultados para la DPPC, vemos que el colesterol tiene un efecto opuesto al que se observó para la fase líquida

cristalina. El colesterol mueve la posición de la emisión del LAURDAN hacia tiempos de vida media menores. Este efecto se debe a un incremento en el desorden de la membrana inducido por la presencia del colesterol, promoviendo la rotación axial y difusión lateral de los fosfolípidos, previamente descrito por (Ipsen-1987).

Podemos ver que los cambios en los tiempos de vida medios son mucho menores para la DPPC que para las vesículas con fase líquida cristalina y gel/líquida cristalina. Esto es debido al tiempo rotacional del agua en el entorno del LAURDAN. Como se discutió en la introducción de este capítulo, el agua que tiene la potencialidad de ser re-orientada en el entorno del LAURDAN, tiene restricciones rotacionales cuando se compara con el agua bulk (la cual tiene una tasa de relajación aproximadamente de ps). Los valores estimados de la tasa de relajación del agua para la fase gel y líquida cristalina son aproximadamente $0.66 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ y $1.26 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$, respectivamente (Parasassi-1986). Es fácil darse cuenta que es difícil poder ver cambios significativos en la posición del PP para la fase gel dado que el tiempo rotacional es mucho menor que el tiempo de vida del estado excitado (aproximadamente 6-7 ns). Mientras que para el caso de la fase líquida cristalina, el tiempo rotacional está en el entorno del tiempo de vida (aproximadamente 3-4 ns).

Independientemente de la composición de la membrana original (DOPC, DPPC o DOPC/DPPC), es posible ver que con la adición de colesterol no es posible establecer una relación lineal para cada sistema, ni tampoco entre los sistemas para la misma concentración de colesterol. Esto denota que los sistemas binarios y ternarios en una emisión promedio (debido a los estudios realizados en cubeta) tienen una emisión compleja con múltiples estados, que hacen imposible resolver el problema simplemente como la combinación lineal de dos estados. Parte de este problema podría ser resuelto cuando a partir de la resolución espacial de la microscopía confocal se puedan separar las fases.

La temperatura produce un corrimiento de las posiciones en el PP de las diferentes mezclas para tiempos de vida menores (independiente de la mezcla), indicando un aumento en el desorden de las membranas producido por el incremento en la entropía.

Cuando analizamos los resultados de la fracción roja de la emisión del LAURDAN en membranas, vemos que este filtro permite ver la fracción

relajada de la sonda. La primer conclusión importante a destacar es que independientemente de la fase (gel, líquido ordenada, líquido desordenada, líquido cristalina, ordenadas de menor a mayor fluidez), todas tienen una fracción con relajación parcial de su estado excitado. Esto ha sido discutido previamente por Parasassi y colaboradores (Parasassi-1997), y se encuentra asociado a la presencia de cierta heterogeneidad de la organización de las membranas que permiten que existan arreglos de fosfolípidos de una particular organización supramolecular en la otra (llámese líquido ordenada con líquido desordenada, por ejemplo). Las vesículas de fosfolípidos sin colesterol no presentan una relación lineal, así como tampoco cuando se introduce colesterol a los sistemas, denotando que el sistema no puede ser explicado con un sistema lineal simple de dos componentes.

El colesterol, en la fracción roja de la emisión del LAURDAN, produce una disminución del tiempo de vida medio independientemente de la composición (inclusive para la DPPC), lo que se explica como una disminución en el contenido de agua en la membrana y polaridad.

El desplazamiento por la relajación dipolar (dentro y fuera el círculo universal) en la posición del PP, ha sido explotado por Golfetto et al, como una medida de la presencia de colesterol y el cambio en la polaridad en membranas complejas con resolución espacial por microscopia confocal de fluorescencia (Golfetto-2013). En este trabajo los autores proponen que la rotación en el gráfico de fasores se debe a un retardo en la emisión del estado excitado asociado al proceso de la relajación dipolar que conlleva a un aumento en la "delta fase" en la emisión. Este código de desplazamiento fue establecido a partir de soluciones de LAURDAN con diferentes mezclas de agua y glicerol, o con el incremento de colesterol soluble. Claramente es difícil de comprender la extrapolación de estos resultados a sistemas de membrana, donde la fracción de agua que el LAURDAN puede sentir tiene las características antes descritas (restricción rotacional) y la solución heterodispersa de colesterol (colesterol soluble) no permite ver el efecto que se genera por la interacción colesterol-fosfolípido y la organización supramolecular de membranas. Los autores proponen que el colesterol incrementa la relajación dipolar (observado en el faser del filtro rojo, ó verde como lo llaman los autores) y aumenta la

polaridad lo que se relaciona como mayor fluidez de la membrana (fasor del filtro azul) (Golfetto-2013).

Nuestros resultados permiten discriminar cómo se afectan las fases simples (DOPC, DPPC o DOPC/DPPC) con la inclusión de colesterol y la temperatura. Esta última produce una combinación del desplazamiento horizontal (incremento en la polaridad con disminución del tiempo de vida) y vertical (relacionado con aumento de la relajación dipolar). El colesterol produce un efecto dual dependiendo de la fase en la membrana en la que se encuentre, lo que concuerda con los efectos esperados para fase gel y líquido cristalina. Sin embargo, resulta difícil poder proponer una regla que permita discriminar su efecto sobre la polaridad y relajación dipolar para sistemas complejos, con nuestros resultados.

Pese a esto, es importante destacar que los PP permiten discriminar con precisión los efectos del colesterol y la temperatura ofreciendo un sistema de análisis libre de modelos y de fácil interpretación, lo cual es muy útil para el estudio de sistemas complejos donde la composición lipídica no está del todo definida.

Un dato interesante que permite el trabajo con un fluorómetro de multifrecuencia por sobre los experimentos en microscopia confocal de tiempo de vida, se asocia a la limitación que esta última tiene para el uso de frecuencias definidas. Esto puede ser relevante para el análisis, dado los resultados que se presentan en la figura 1.16, donde puede verse que el incremento en la frecuencia permite la selección de diferentes poblaciones de tiempo de vida. Esto debe de ser tenido en cuenta cuando se utiliza esta aproximación en microscopia, tal como es el caso de los trabajos de Owen y Golfetto (Owen-2012; Golfetto-2013). En estos trabajos usan en la repetición un laser UV (405 nm) a 40 MHz y un laser de dos fotones a 80 MHz, respectivamente, para estudiar el tiempo de vida de LAURDAN en membranas celulares en imágenes, siendo significativa la diferencia observada en el gráfico de distancia entre la posición del curso para el filtro azul y rojo para cada mezcla de fosfolípidos.

La aplicación de la transformación de Fourier a los espectros de emisión de LAURDAN otorga una nueva dimensión al análisis de los resultados en estado estacionario basado en las propiedades de la función. Las propiedades

han sido descritas anteriormente y en la figura 1.17. Es posible ver cómo los corrimientos espectrales y los cambios en la heterogeneidad en la emisión pueden ser discriminados en el gráfico de fador espectral. Las vesículas puras de DPPC y DOPC poseen una relación lineal, encontrándose la mezcla equimolar en el medio de la trayectoria que une a éstas. Las vesículas de DPPC muestran el menor corrimiento y ancho espectral, cuando se compara con la mezcla equimolar de DOPC:DPPC y con DOPC. Esta última posee el mayor corrimiento y ancho espectral asociado a la emisión heterogénea del LAURDAN desde estados relajados y no relajados. El colesterol modifica la posición espectral de manera diferencial dependiendo de la composición y estado físico de la membrana. Para las vesículas compuestas de DOPC (fase líquida cristalina) el incremento en la concentración de colesterol en el primer armónico promueve el orden de la membrana (corrimiento horario de la posición angular) sin una modificación significativa de la posición radial, lo que significa que mantiene la heterogeneidad de la emisión. Para este caso, es posible ver una relación lineal entre la vesículas con fase líquida cristalina (DOPC), Ld (DOPC+colesterol entre 5 y 25%) y Lo (DOPC+colesterol mayor a 30% molar), denostando una disminución en la polaridad del LAURDAN y de la dinámica e hidratación de la membrana. Sin embargo, cuando analizamos los resultados del segundo armónico, vemos que además del cambio en el centro espectral, se puede ver un cambio dramático en el ancho espectral (posición radial), tal como se describiera previamente por Parasassi y colaboradores (Parasassi-1994b). Esto significa que disminuye la relajación dipolar y la polaridad asociado al efecto de orden que induce el colesterol en membranas con fase líquida cristalina, limitando la rotación axial y la difusión lateral (Ipsen-1987). También es más claro que pese a poseer un ancho espectral distinto, la adición de colesterol (100%) acerca los valores del centro espectral a los de DPPC+Colesterol, mostrando el efecto que éste tiene sobre la hidratación y dinámica de las membranas.

Para el caso de las vesículas compuestas de DPPC, el colesterol creciente no muestra una combinación lineal, pero además muestra un quiebre en el ancho espectral para concentraciones mayores a 20% molar. Esto ha sido reportado anteriormente para estudios del efecto de colesterol con LAURDAN y análisis de GP (Parasassi-1995). Esto es debido a concentraciones críticas de

colesterol para ordenar/desordenar las membranas donde se encuentra (Parassasi-1995). Pero puede verse que pese a ser sutil, se observa un corrimiento espectral, mostrando cierta disminución en la polaridad del entorno del LAURDAN. Esto se asocia a una disminución en la relajación dipolar por disminución del contenido de agua de la membrana o en tal caso a un cambio en los parámetros dinámicos de la membrana por la adición del colesterol y la movilidad del agua en el entorno del LAURDAN (Parasassi-1995).

La mezcla equimolar mostró un comportamiento similar al observado por las vesículas compuestas por DOPC; un aumento de colesterol incrementa el orden y polaridad de las membranas, asociado a los corrimientos espectrales en centro y ancho que se observan. En este caso, primer y segundo armónico muestran básicamente la misma interpretación.

La temperatura (figura 1.18) mueve la posición de las diferentes mezclas para valores de centro y ancho espectral mayor, denostando el incremento en la polaridad inducido en las membranas. Esto se asocia al incremento en la relajación dipolar y aumento de la heterogeneidad de las membranas asociado a la presencia de colesterol.

Un detalle interesante es que a medida que se incrementa la temperatura, independientemente de la composición de la membrana, se logra alcanzar relaciones lineales entre los componentes simples y las mezclas con colesterol, lo que posiblemente se explique por un efecto de orden dinámico en membranas con fase líquida cristalina independiente de la saturación de la fosfatidilcolina.

Estos resultados están en excelente concordancia con los descriptos para el PP y a su vez son complementarios, dado el análisis espectral que se puede hacer. Cuando comparamos con los clásicos métodos de GP (Parasassi-1990) y el centro de masa espectral (Weber-1992), vemos que los resultados que se obtienen son similares pero los sistemas propuestos poseen un nivel mayor de descripción asociado a las propiedades de la transformación de Fourier. Parece interesante destacar que pese a que los valores de GP indicaran en algunos casos un estado de hidratación y polaridad similar para las diferentes mezclas con elevados niveles de colesterol (>50%), los resultados de PP y SP, muestran que existen diferencias sutiles en la hidratación y polaridad de las membranas con DOPC+Colesterol 50%,

DOPC:DPPC+Colesterol 50% y DPPC+Colesterol 50%, pese a que todas poseen un orden L_0 según diagrama de fases (figura 1.14).

Parece interesante destacar que cada uno de los métodos de análisis tiene sus limitaciones por lo cual un abordaje global pensamos podría favorecer la comprensión de sistemas complejos como las membranas celulares.

Por último pensamos discutir el alcance del uso de SP con resolución espacio-temporal en microscopía confocal de dos-fotones. Las bondades del uso de los gráficos de SP han sido detalladas en los párrafos anteriores, pero como sucede en el caso de PP, la posibilidad de discriminar las propiedades espectrales del LAURDAN con resolución espacial creemos puede mejorar la comprensión de sistemas complejos y suplir las deficiencias que los métodos de medidas promedio tienen.

Se ha utilizado luz polarizada y luz circularmente polarizada (lo que disminuye el efecto de fotoselección, Bagatolli-2004), para estudiar la performance de los SP en sistemas de vesículas gigantes unilamelares. Las mismas mezclas lipídicas (a excepción de las mezclas con SM) fueron analizadas con resolución espectral. En la figura 1.20 puede verse un grupo de GUVs con fase gel (DPPC), líquida cristalina (DOPC) y L_d (DOPC:colesterol 1:1 y DPPC:colesterol 1:1): Es posible ver en el gráfico de primer y segundo armónico que existe una relación lineal entre la DOPC y la DPPC, y que para ambos grupos de vesículas, el colesterol modifica la posición espectral promoviendo una disminución de la polaridad, reflejado como un corrimiento del centro a longitudes de onda menores. Sin embargo, el ancho espectral se ve modificado en sentido opuesto para las GUVs compuestas de DOPC y DPPC. Mientras que para la DOPC existe un ensanchamiento del espectro, lo opuesto sucede para la DPPC; es claro que posición y el ancho de la DOPC:Chol es diferente a la DPPC:Chol (ver tabla 1.5). Un dato interesante radica de observar que pueden observarse saltos discretos de las posiciones de los cursores asociados a los centros de intensidad en el gráfico de SP. Esto podría ser explicado por la teoría de las cavidades de LAURDAN con diferente número de moléculas de agua (Parasassi-2001), identificándose al menos 4 estados discretos (0, 1, 2 y 3, como DPPC:Chol, DPPC, DOPC:Chol y DOPC). Como puede verse, los cursores intermedios entre las fases discretas (L_α y L_0 , por ejemplo), muestran pixeles con diferentes proporciones de ambas fases

como una combinación lineal estimable. Esto es muy interesante dado que, independientemente de la resolución óptica, con el uso de luz polarizada es posible ver si existe o no coexistencia de fases y también la combinación lineal entre estados discretos de las membranas.

Las mezclas binarias de fase gel/liquida cristalina se encuentran en el medio entre las posiciones de las fases discretas, pudiéndose detectar la presencia de dominios gel (cursor azul) en el caso de las GUVs compuestas de DOPC:SM (1:1) y lo que parece ser un grupo de pixeles con combinación lineal de $L\beta/L\alpha$ (radio 80/20) para la mezcla DOPC:DPPC (1:1). Es posible que el efecto de la fotoselección por la luz polarizada impida ver con claridad los dominios, dado el orden que generan los dominios gel, es imposible poder excitar al LAURDAN. Esto se puede ver con mejor claridad en la figura 1.25, donde se observan con detalle los dominios gel en vesículas con coexistencia de fase gel/liquido cristalina compuestas por DOPC:SM.

Las mezclas ternarias de DOPC:DPPC:Chol (2:2:1) y DOPC:SM:Chol (1:1:1), muestran que se genera una relación lineal entre los cursores que señalan las fases L_d/L_o , desapareciendo en parte los pixeles de las fases $L\alpha$ y $L\beta$. En los límites de los dominios es posible ver pixeles con diferentes proporciones de la combinación lineal entre la fase L_d y L_o , lo que puede explicarse como una gran heterogeneidad de la emisión de LAURDAN en estas regiones asociado a diferentes entornos de polaridad de la sonda por el estado de hidratación.

Cuando comparamos los resultados con los de luz circularmente polarizada, vemos que esta última ofrece algunas ventajas por sobre la luz polarizada para identificar los dominios L_o y $L\beta$.

Pese a que se cambian sutilmente los centros y anchos de emisión, el dato más relevante surge de ver el efecto del colesterol sobre la fase gel. Para el primer armónico el colesterol modifica a la inversa el centro espectral de las vesículas de DPPC cuando se compara con los resultados de luz polarizada. Mientras que para el segundo armónico (el cual tiene mejor resolución axial y angular), el cambio en el centro no es tan aparente y solo se observa el cambio del centro. En cualquier caso, esto significa que el colesterol está modificando la organización de la membrana, promoviendo la desorganización de las

mismas con el consiguiente cambio de hidratación, tal como (Ipsen-1987) previamente describió. La incongruencia entre los resultados de microscopía y cubeta para este caso particular puede deberse a la incapacidad de discriminar los aspectos espaciales que la microscopía otorga, y que para el caso de la cubeta básicamente son la sumatoria de todos los estados.

Tanto para el caso de las mezclas binarias (DOPC:SM) como ternarias (DOPC:DPPC:Chol y DOPC:SM:Chol), vemos que los límites de los dominios L_0 o L_β poseen regiones de píxeles con LAURDAN emitiendo desde una fracción parcial de los estados discretos. Resulta interesante destacar que los dominios L_0 de las vesículas compuestas DOPC:SM:Chol poseen una combinación de píxeles asociados al cursor violeta y azul, demostrando al menos dos entornos de polaridad para la sonda. Esto puede deberse a que el entorno del LAURDAN en esta mezcla tiene alguna peculiaridad dado el tipo de enlace amida que los esfingolípidos poseen, modificando las propiedades del entorno del LAURDAN y cambiando las propiedades dinámicas del sistema (Bagatolli-2013).

Finalmente, la reconstitución 3D de las máscaras generadas a partir de tomar imágenes en la sección z de una vesícula, permite su composición y análisis en la tercera dimensión. En el ejemplo de la figura 1.27, podemos ver la cara interna y externa de una GUV, observándose una buena correlación espacial.

Las ventajas de los SP con resolución espacial por sobre las medidas en cubeta son relacionadas con la posibilidad de estudiar certeramente la pureza de las fases discretas y los límites entre las mismas, permitiendo un estudio exhaustivo de los aspectos supramoleculares de la organización de las membranas.

Capítulo 2: Efectos del Sevoflurano sobre el pulmón *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.

Efecto del sevoflurano sobre la función pulmonar y el metabolismo del surfactante pulmonar.

La anestesia inhalatoria fue introducida hacia mediados del siglo XVII, donde el éter (sintetizado mucho antes por Ramón Llull) fue nebulizado para extirpar un tumor de cuello sin dolor. Sin embargo no fue hasta principios del 1900, que Meyer y Overton, de manera independiente propusieron la teoría de los narcóticos (Mayer-1899, Overton-1901). Esta predice que la potencia anestésica está relacionada con la constante de reparto que el anestésico tiene en una mezcla agua/aceite de oliva.

A diferencia de los primeros solventes utilizados como anestésicos (éter, cloroformo, ciclopropano, metoxiflurano (ver figura 22 donde se detallan los diferentes anestésicos), los anestésicos modernos son moléculas orgánicas no inflamables y con menor toxicidad para el organismo. El primer anestésico volátil no inflamable fue el halotano (ver figura 22), el cual se usó a partir de la década del 50 y se dejó de utilizar hacia la década del 90 dado su hepatotoxicidad. Más recientemente, el isoflurano (1971) y sevoflurano (1990) (cuyas estructuras orgánicas son: metil-etil-éter y metil-isopropil-éter, respectivamente) son ampliamente utilizados en el mantenimiento e inducción de la anestesia, en el caso del sevoflurano dado su baja irritabilidad de la vía aérea y agradable olor.

El coeficiente de partición en sangre/gas del sevoflurano es relativamente bajo, mientras que su constante de reparto en aceite/gas reportada es de 47 (Strum-1987), lo que lo hace muy buen candidato para inducir y revertir la anestesia con facilidad (aproximadamente 0.69), lo que se denota con la elevada CAM (Concentración alveolar mínima para pérdida del reflejo de dolor en el 50% de los pacientes) necesaria para inducir la anestesia (aproximadamente 2 %).

Esta elevada constante de reparto en aceite hace estimar que la constante de reparto en membranas celulares y también en el surfactante pulmonar, sea aproximadamente 10 (cinco veces menor), por lo cual se espera encontrar una alta concentración de los anestésicos inhalatorios en las membranas del surfactante pulmonar durante la anestesia (valores estimados de las tablas de Feirestone-1986).

Los anestésicos generales pueden producir diferentes grados de hipoxemia en el pos-operatorio inmediato (ver datos de introducción), lo cual ha sido explicado por diferentes efectos que los anestésicos pueden producir sobre la función pulmonar. Particularmente, Magnusson propone que la compresión del tejido pulmonar, reabsorción de gases y deterioro de la función del surfactante, podrían explicar esta afectación de la función pulmonar (Magnusson-2003).

Nuestro trabajo se inicia en la década del 90 con las primeras observaciones del grupo del Prof. Píriz sobre la aparición de atelectacias en partes declives del pulmón durante la anestesia general con agentes inhalatorios (ver figura 22).

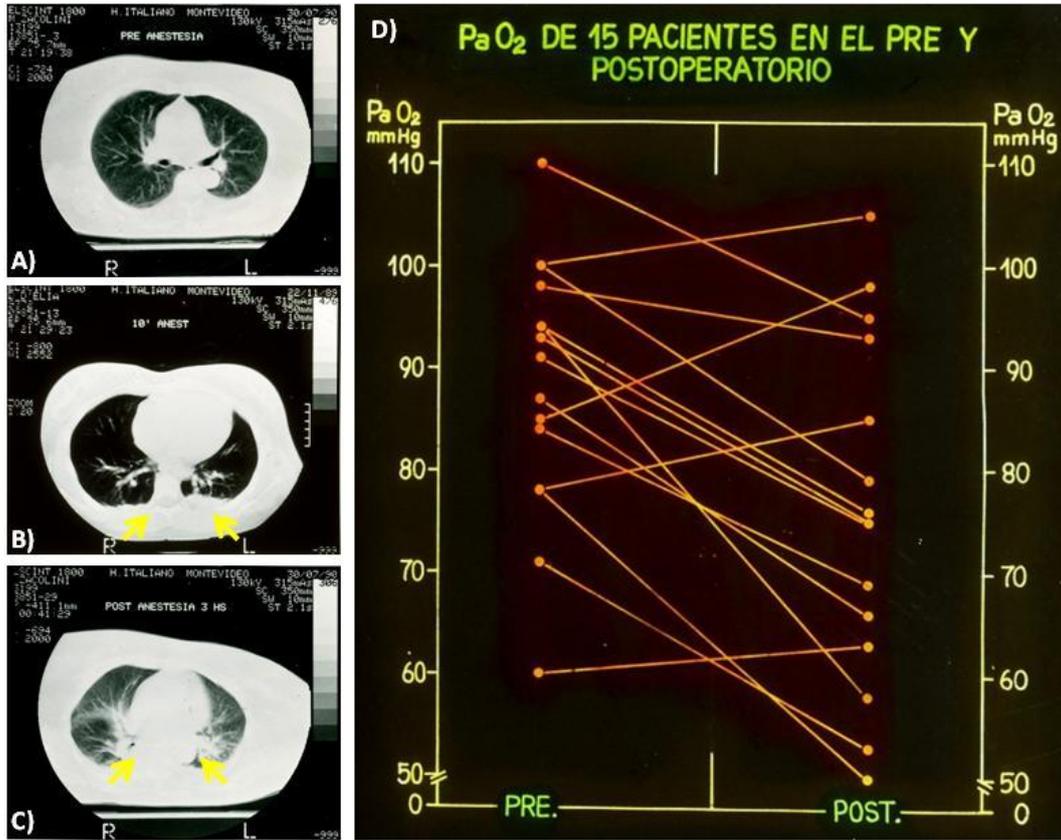


Figura 2.1: Tomografía computarizada (CT) de paciente durante la anestesia general. A-C) imagen representativa de CT de un paciente durante la anestesia general a 0, 10 minutos y 3 horas pos-anestesia, respectivamente. Con las flechas amarillas se denota la aparición de atelectacias en la parte dorsal del pulmón. D) Resultados de los valores de PaO₂ para 15pacientes, puede observarse una disminución significativa en los valores de PaO₂ para 11 de los 15 pacientes. Resultados no publicados Píriz-1990.

Es interesante destacar que estos resultados no publicados del grupo del Dr. Píriz son anteriores a los publicados posteriormente por el grupo del Dr. Moller en 1991. En ambos casos se observa que la anestesia genera colapso alveolar (atelectacias) en las porciones dorsales del pulmón para tiempos posteriores a 10 minutos de inducción de la anestesia, produciendo una caída promedio de la hipoxemia de 15-20% para la mayoría de los pacientes (Moller-1991).

Posteriormente, Reta y colaboradores (Reta-2000) demostraron que la anestesia con halotano altera la mecánica pulmonar estudiada por la técnica de oclusión al final de la inspiración (Bates-1985), promoviendo el aumento de la elastancia estática y del componente viscoelástico del pulmón, con disminución

del componente viscoso, cuando se los compara con un grupo de ratas control anestesiado con pentobarbital sódico (Reta-2000). La histología del pulmón de estos animales mostró la existencia de microatelectasias, lo que se asocia a presión viscoelástica pulmonar. En este trabajo se relaciona por primera vez la posible vinculación entre estos resultados y la función/biosíntesis del surfactante pulmonar como mecanismo de afectación primaria. Resultados similares fueron encontrados posteriormente para el sevoflurano por (Correa-2001).

Molliex y colaboradores demostraron que la exposición por 4 h a halotano en cultivos primarios de N-II disminuye la biosíntesis de surfactante pulmonar y depleciona los niveles de ATP (Molliex-1994). Además, inhibe el transporte de sodio in vitro (Molliex-1998), lo que se relacionó con una caída del clearance de fluido a nivel del tejido alveolar (Rezaiguia-Delclaux-1998). Esto podría estar relacionado con una afectación directa de la Na,K-ATPasa (Molliex-1998), así como de la regulación génica de la endotelina-1 (Sakamoto-2005), el cual es un potente vasoconstrictor que ha demostrado poder afectar la reabsorción de fluido alveolar (Comellas-2009).

Pese a no identificarse afectaciones estructurales por el uso de sevoflurano en células alveolares (Takala-2002), se han podido reportar incrementos en los niveles pro-inflamatorios a nivel sistémico (Kotani-1999, Takala-2004, Sakamoto-2005, Kelimeris-2011). Recientemente, se ha reportado que el sevoflurano en combinación con nucleótidos de adenosina pueden provocar la muerte celular por piroptosis dependiente de caspasa-1 a partir de la modulación en la producción de especies reactivas del oxígeno (Jin-2013).

La vinculación entre los efectos de los anestésicos sobre la función pulmonar y la actividad tensoactiva fueron postulados originalmente por (Morr-Strathmann-1977) y más recientemente revisados por (Enhoring-1986), demostrando que a concentraciones elevadas, los anestésicos (en este trabajo muchos de ellos fueron solventes, a excepción del halotano) afectaban de manera reversible al capacidad tensoactiva del surfactante pulmonar.

Basado en la bibliografía existente y los antecedentes de nuestro grupo, nos planteamos estudiar los efectos de un anestésico de uso rutinario en la práctica clínica (sevoflurano) sobre las propiedades mecánicas, estructurales y funcionales del pulmón de ratas ventiladas durante 30 minutos. El corto

periodo de ventilación ha demostrado no afectar la función celular y estructural del pulmón impidiendo que se sumen mecanismos a los del objetivo de estudio. Por último, se analiza la bioquímica del lavado bronquiolar, cuantificando los componentes mayoritarios del surfactante pulmonar y evaluando los efectos in vitro del sevoflurano sobre una mezcla sintética de fosfolípidos que remeda la composición del surfactante pulmonar, a partir de donde se postula un mecanismo de afectación del surfactante pulmonar durante la anestesia con ventilación mecánica.

A continuación se presenta un grupo de resultados que han sido publicados en la revista *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* en el número 28, Issue 2, August 2014, Pages 122–129, titulada:

Sevoflurane anesthesia deteriorates pulmonary surfactant promoting alveolar collapse in male Sprague–Dawley rats

Leonel Malacrida, Germán Reta, Héctor Piriz, Fabiana Rocchiccioli, Horacio Botti, Ana Denicola, Arturo Briva

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2013.12.005>

Resultados



Contents lists available at ScienceDirect

Pulmonary Pharmacology & Therapeutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ypupt

Sevoflurane anesthesia deteriorates pulmonary surfactant promoting alveolar collapse in male Sprague–Dawley rats

Leonel Malacrida^a, Germán Reta^a, Héctor Piriz^a, Fabiana Rocchiccioli^a, Horacio Botti^b, Ana Denicola^c, Arturo Briva^{a,*}^a Área de Investigación Respiratoria (AIR), Departamento de Patopatología, Hospital de Clínicas, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay^b Unidad de Criobiología de Proteínas – Instituto Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay^c Laboratorio de Fisiología Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2013

Received in revised form

6 December 2013

Accepted 24 December 2013

Keywords:

Volatile anesthetics

Lung injury

Pulmonary phospholipids

Mechanical ventilation

Ratemia

ABSTRACT

General anesthesia is frequently associated to transient hypoxemia and lung atelectasis. Although volatile anesthetics are safe and widely used, their potential role on anesthesia-induced pulmonary impairment has not been fully explored. In this study, we investigated the effect of volatile anesthetic sevoflurane on pulmonary surfactant composition and structure that could contribute to atelectasis. After 30 min of sevoflurane anesthesia, Sprague–Dawley rats showed increased levels of lyso-phosphatidylcholine and decreased levels of phosphatidylcholine associated with significant impairment in lung mechanics and alveolar collapse, but showed no deterioration of alveolar fluid reabsorption when compared to control group of rats anesthetized with pentobarbital. Exposure to sevoflurane altered the thermotropic profile of surfactant model membranes, as detected by fluorescence anisotropy. In this sense, sevoflurane promoted fluidification of condensed phases could potentially impair the ability of surfactant films to sustain the lowest surface tensions.

In conclusion, the observed changes in surfactant composition and viscosity properties suggest a direct effect of sevoflurane on surfactant function, a factor potentially involved in aesthetic-induced alterations in lung mechanics.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

More than a century ago Meyer [1] and Overton [2] proposed a strong correlation between the potency of anesthetics and their solubility in olive oil. Despite its elegance, certain exceptions to the Meyer–Overton correlation apply to volatile anesthetics based on their interaction with lipid bilayers [3]. Although volatile anesthetics are safe and widely used in general anesthesia, pulmonary surfactant and the alveolar epithelium are exposed to its highest concentrations and thus, potentially affecting their biophysical properties and structure.

General anesthesia is frequently associated with a transient deterioration of lung mechanics and blood oxygenation [4,5] secondary to atelectasis [6] and ventilation–perfusion mismatch [7]. In this sense, a direct effect of sevoflurane on the alveolar epithelium

and pulmonary surfactant has been suggested [8–10] in order to explain those clinical findings.

Sevoflurane, is a fluorinated halogenated anesthetic considered a better option than halothane [11,12], which has been associated with cell damage and lung impairment [13]. Although sevoflurane does not affect the alveolar epithelial structure [14], several reports suggested a pro-inflammatory role leading to different degrees of lung injury [15–17]. Moreover, sevoflurane promoted an early gene up-regulation [18] of endothelin-1, a potent vasoconstrictor recently involved in the inhibition of alveolar fluid reabsorption (AFR) [19].

The aim of our study was to determine whether sevoflurane affects lung surfactant composition and viscosity properties. Particularly, an experimental animal model of short time exposure (30 min) to sevoflurane anesthesia (one minimum alveolar concentration, 1 MAC) is proposed, in order to discriminate the early effect of this anesthetic on alveolar epithelial functionality as well as the biochemical and structural properties of pulmonary surfactant.

* Corresponding author. Área de Investigación Respiratoria, Hospital de Clínicas, Departamento de Patopatología, Av Italia 2870 piso 15, sala 1, Uruguay. Tel./fax: +39 598 2 4819161.

E-mail addresses: albriva@ic.edu.uy, arturo_briva@yahoo.com (A. Briva).

2. Methods

2.1. Animal preparation

Experimental protocol and animal care were approved by the Animal Research Committee of the School of Medicine, Montevideo, Uruguay. Seventy-two male Sprague-Dawley rats weighing 310 ± 4.6 g were used in our protocol with free access to food/water and maintained on a 12-h light/12-h dark cycle. Animals were housed in polycarbonate ventilated cages and were handled according to international standards.

2.2. Experimental design

Animals were randomly assigned to one of four groups:

Group 1: Pentobarbital-anesthetized, mechanically-ventilated rats ($n = 18$).

Group 2: Sevoflurane-anesthetized, mechanically-ventilated rats ($n = 18$).

Group 3: Colchicine-treated, pentobarbital-anesthetized, mechanically-ventilated rats ($n = 18$).

Group 4: Pentobarbital-anesthetized, spontaneously breathing rats ($n = 18$).

Once rats were anesthetized with either inhaled sevoflurane (one minimum alveolar concentration, 2–3% sevoflurane) or intraperitoneal pentobarbital (35 mg/kg). Groups 1–3 animals were then supplemented with oxygen (60%) via a T-tube until muscle paralysis was achieved with 0.3 ml intravenous administration of 10 mg/ml atracurium. Once muscle paralysis was achieved, animals were mechanically ventilated for 30 min, under the following conditions: tidal volume (VT) of 8 ml/kg, respiratory rate (RR) of 25 breaths/min, and positive end-expiratory pressure of 0 cm H₂O. To evaluate effect of anesthesia on alveolar fluid reabsorption [20] and surfactant secretion [21], pentobarbital-anesthetized rats (Group 3) were dosed with intraperitoneal colchicine (0.25 mg/100 g body weight) 15 h before start of experimental manipulation. Finally, to examine the role of inhaled sevoflurane and mechanical ventilation on lung surfactant lipid profile, Group 4 animals were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital (25 mg/kg) and allowed to breathe spontaneously while receiving supplemental oxygen for 30 min via the T-tube.

2.3. Lung mechanics

A tracheal cannula (a polypropylene tube of 50 mm length and 1.5 mm internal diameter) was placed by tracheotomy, inserted 10 mm into the trachea and secured by a lace (2.0 silk suture). Analgesia was achieved by lidocaine hydrochloride (0.3 ml of 2% solution) in the area of incision. Following surgery, pentobarbital or sevoflurane anesthesia was maintained for 30 min. A pneumotachograph with a differential pressure transducer (PNEU01 World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) was connected to the tracheal cannula in order to measure airflow and lung volume changes. A second differential pressure transducer (PNEU05 World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA) was used at the side port of the tracheal cannula in order to measure tracheal pressure (Ptr). For the esophageal pressures (Pes) measurements, to separate lung and chest wall compliance, a 30 cm-long water-filled catheter PE-25 was used, with side holes at the tip connected to another differential pressure transducer (Statham P23BC, Hato Rey, Puerto Rico, U.S.A.).

Muscle relaxation was achieved in all ventilated animals with atracurium (0.3 ml of 10 mg/ml solution, Iv.) and mechanical ventilation was performed with 60% oxygen by means of a time-cycled rodent ventilator (SAMAY VR-15, Uruguay) and all data were analyzed using ANADAT data analysis software (RHT Infodat, Montreal, CANADA).

Respiratory mechanics were measured from end-inspiratory occlusions after constant flow inflations as previously described [22]. Briefly, after end-inspiratory occlusion, there is an initial fast decrease in tracheal pressure of the respiratory system ($\Delta P1_{res}$) from the pre-occlusion value down to an inflection point (P_{inf}). $\Delta P1_{res}$ reflects the pressure required to overcome the combination of airway, pulmonary and chest wall resistances. Slow pressure decrease ($\Delta P2_{res}$) ensues until a plateau is reached. This plateau corresponds to the elastic recoil pressure of the respiratory system ($P_{el_{res}}$). $\Delta P2_{res}$ reflects the pressure spent on viscoelastic properties of lung and chest wall tissues. Transpulmonary pressure obtained by an esophageal catheter allowed us to differentiate lung (L) and chest wall (W) components from the total respiratory system. Measurements were performed 10 times on each animal and then averaged. Equipment flow resistance (tracheal cannula included) was 0.032 cm H₂O ml⁻¹ s. The equipment resistive pressure was subtracted from respiratory system and pulmonary resistive pressures and equals the product of flow resistance by airflow. Equipment dead space was 0.4 ml.

Fig. 1 shows a representative scheme of an end-inspiratory occlusion record.

2.4. Histological analysis

At the end of the MV period, the lungs were extracted and quickly frozen by immersion in liquid nitrogen to perform morphometric analysis, as previous described [23,24]. Briefly, tissues were fixed in Carnoy's solution (ethanol:chloroform:acetic acid, 70:20:10 v/v) at -70 °C for 24 h and then increasing concentrations of ethanol at -20 °C were successively substituted for Carnoy's solution until

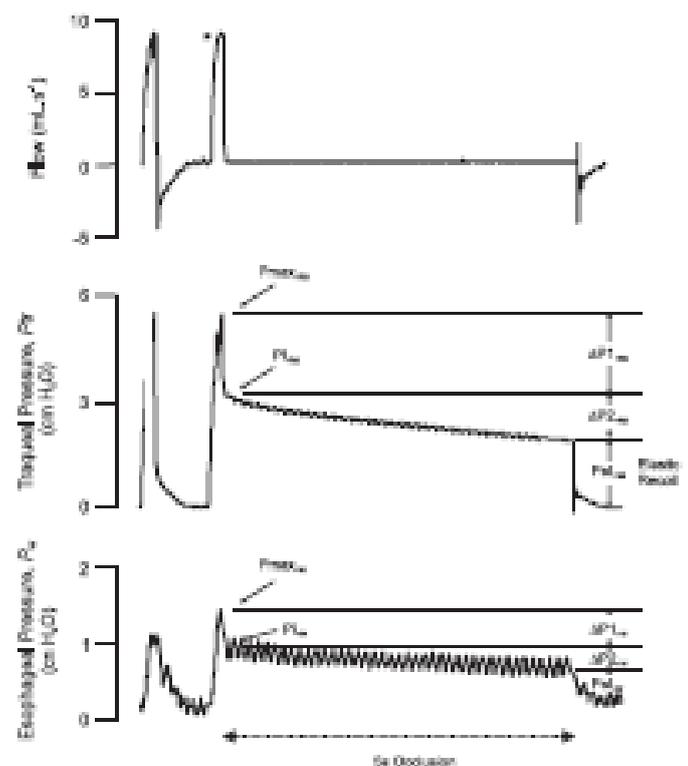


Fig. 1. Lung mechanics. Typical record of end-inspiratory occlusion. The figure shows (from top to bottom) flow, tracheal pressure and esophageal pressure. Tracheal pressure record shows, after occlusion, a sudden decrease from peak value (P_{trmax}) followed by a gradual decrease until plateau pressure was reached (P_{trpl}). Occlusion, P_{trmax} = Maximal tracheal pressure, P_{trinf} = tracheal pressure at inflection point, P_{el} = Elastic recoil pressure, $\Delta P1$ = Viscoelastic pressure decay, $\Delta P2$ = viscoelastic pressure decay. Transpulmonary pressure (Lung) is obtained from the difference between Tracheal and Esophageal pressure.

100% ethanol was reached. After fixation, three blocks were performed from midsagittal slices at the level of upper lobe, axial bronchus and lower lobe and they were embedded in paraffin and hematoxylin-eosin stained. One hundred eighty images per study group were obtained by a Nikon Optiphot microscope with a Plan $\times 40$ DIC NA0.65 objective. Images were processed in Image Pro-Plus software (Media Cybernetics, Inc. Bethesda, MD, USA) and masked for any empty areas, blood vessels and large airways by pseudo-coloring [23]. The same image analysis software was used to threshold images for air spaces and alveolar wall thickness; and expressed in relative units (RU). Areas for air spaces were calculated as a percentage of white/total image area minus masked areas. Alveolar wall thickness was randomly evaluated in those images rejecting measurements associated to full-collapsed alveoli in order to avoid double-sized septae. The histological analysis was performed by an investigator unaware of the sample origin.

2.5. Isolated perfused rat lung model

A second set of animals was distributed among the same subgroups (G1, G2 and G3) as described above. After MV, lungs and heart were removed in block and the isolated lung preparation was performed as previously described [19,23]. Lungs were filled with 5 ml of Bovine Serum Albumin (BSA) solution containing 0.1 mg/ml Evans blue dye (EBD; Sigma). Alveolar fluid reabsorption (AFR) was measured as the differences in concentrations of Evans blue dye-albumin among samples taken from the instilled solution added to the alveolar space.

Mathematical calculations to determine AFR were fully described previously [25].

$$V_0[\text{EBD}]_0 = V_t[\text{EBD}]_t$$

$$V_t = V_0([\text{EBD}]_0/[\text{EBD}]_t)$$

$$j = \frac{V_t - V_0}{t}$$

where, V_0 is the initial known volume instilled into rat air spaces containing a known concentration of Evans blue dye-albumin $[\text{EBD}]_0$. V_t and $[\text{EBD}]_t$ are the alveolar fluid volume and EBD concentration in the instillate at time t respectively. j is the volume flux during a time period (t).

The perfusate solution was adjusted in normocapnia, 40 mmHg CO_2 , bubbled in the perfused liquid, with or without 1 MAC sevoflurane by adding to the perfusate solution the specific amount of sevoflurane (0.3 mM, to avoid any unintended gas dissolution during the perfusate circulation). Fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled-albumin was also added to the perfusate to check the capillary barrier integrity along the experiment. Evans blue dye concentration was quantified by its absorbance at 620 nm (Spectrophotometer UV-Vis Shimadzu 160) and FITC concentration by its emission fluorescence at 521 nm (Picofluor fluorometer, Turner Biosystems, CA, USA), in samples obtained at 0 and 60 min from the beginning of the experiment.

Levels of pH, pO_2 , and pCO_2 were monitored in the perfusate by a Phox Plus blood gas analyzer (Nova Biomedical; Waltham, MA.)

2.6. Lung lavage procedure

In a third set of animals, after mechanical ventilation and lung mechanics analysis (G1, G2 and G3), the lungs were instilled with one bolus of 5 ml (saline solution, 150 mM NaCl) at room temperature. The lavage was repeated five times with the same initial volume (final recovery ~ 3.5 – 4.0 ml). The bronchoalveolar lavage fluid

(BALF) collected was centrifuged for 10 min at 1000 g and 4°C to remove cell debris. The supernatant was stored at -20°C until total protein and phospholipids content was performed.

2.6.1. BALF phospholipids profile

2.6.1.1. Phospholipid (PL) content of BALF was determined by high performance liquid chromatography (HPLC – Agilent 1100, Hewlett-Packard, CO, USA, equipped with diode array detector) as previously published with minor modifications [26]. Prior to the analysis, organic extraction of the phospholipids was performed as previously described [27]. The separation was achieved on a silica-based column 250 mm \times 4.6 mm I.D. with $5\ \mu\text{m}$ spherical particles and 80 Å pore (Phenomenex, CO). The mobile phase was acetonitrile-methanol-85% phosphoric acid (100:10:1.8, v/v), previously degassed and delivered to the column at a flow-rate of 1.0 ml/min and at 50°C . The detection wavelength was set at 204 nm and a calibration curve was performed with standard phospholipids samples (Sigma–Aldrich). Total PL content was determined as the algebraic sum of the relative measured components: phosphatidylcholine (PC), lyso-phosphatidylcholine (lyso-PC), phosphatidylserine (PS) and phosphatidylethanolamine (PE).

2.6.2. BALF total protein

Total protein content in BALF samples was estimated by the Bradford method, previously described [28]. BSA solution was used as standard protein; absorbance at 595 nm was measured in samples incubated with Bradford reagent after 10 min of mixing (HiInstruments® Multiskan Model 349 96 well Microplate Absorbance Reader.). The protein sample concentration was estimated as the concentration of BSA.

2.7. Thermotropic profile of membranes by diphenylhexatriene anisotropy

Vesicles were made with a selected mix of lipids intended to mimic a pulmonary surfactant sample [29], the mixture were dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) : phosphatidylcholine (yolk egg) : cholesterol, 1:1 phospholipid molar ratio and 20% molar of cholesterol with a final concentration of 0.6 mM of total phospholipids. Lipids in methanol-chloroform (1:1 v/v) solution were dried in a CentriVap Concentrator (Labconco, CO), for 1 h at 30°C . Three independent dispersions of multi lamellar vesicles (MLVs) were prepared by adding Tris buffer 5 mM, pH 7.01 with 150 mM NaCl at 45°C . At the end, samples were heated at 50°C and vortexed for 1 h. Finally, the MLVs were extruded through a $1\ \mu\text{m}$ pore membrane eleven times in order to obtain the desired diameter vesicles (Avanti Polars Lipids, Inc). The vesicles were loaded with 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (Sigma–Aldrich) in a 1/500 ratio. Empty vesicles (without probe) were prepared for background solution. Anisotropy measurements were determined as the fluorescence emission intensity in parallel (IVV) and perpendicular (IVH) orientations from the exciting beam (vertical orientation), the data was collected 10 times each and then averaged [30]. The probe was excited at 360 nm and the emission was collected at 430 nm.

Anisotropy, r , was calculated as:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{HH}}{I_{VV} + 2GI_{HH}}$$

and,

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

where G is the monochromator grating correction factor (obtained by setting the excitation polarizer to the horizontal position). The

background was subtracted in each component of the polarized emission (IVV and IVH) before calculation of the anisotropy. The thermotropic behavior between 10 and 50 °C was measured in a Cary Eclipse Fluorimeter (Varian, CO) equipped with four-position cell holder, and with a pettier system for temperature control.

2.8. Data analyses

Data are expressed as means \pm SEM; "n" represents the number of rats in each group. Data were compared using analysis of variance adjusted for multiple comparisons with the Tukey test. When comparisons were performed between two groups of values, significance was evaluated by the Student's *t*-test.

For anisotropy experiments, we performed analysis of variance (ANOVA) test to compare groups at each temperature level. In addition, a fitting-curve analysis based on Boltzmann's equation (which describes the statistical behavior of a thermodynamic system) was performed to determine if curves are statistically different. In order to identify if the samples were in a normal distribution a Kolmogorov–Smirnov test was performed. A *p* value ≤ 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Lung mechanics

To evaluate whether sevoflurane modifies the energy dissipation in the airways compared to an intravenous anesthetic, we determined the lung mechanics of rats ventilated and anesthetized with sevoflurane or pentobarbital sodium as a control group. Compared to control (G1), animals exposed to sevoflurane (G2) showed a decrease in lung compliance with a significant increase in the viscoelastic pressure, static and dynamic elastances in the lung component (Table 1). The chest wall component was unaffected by sevoflurane anesthesia, suggesting that modifications of the respiratory system are a direct consequence of lung tissue modifications. In opposition, lung mechanics of rats pre-treated with colchicine (G3) showed a decrease in respiratory compliance predominantly by a significant impairment of non-tissular components (Table 1).

3.2. Lipid profile and protein content in BALF

Despite other factors, the mechanical properties of lung tissue are directly affected by pulmonary surfactant modifications. Following this reasoning we determined whether the observed alterations in lung mechanics were related to changes in pulmonary surfactant composition.

Phospholipids distribution in BALF was affected by sevoflurane anesthesia. Total content of PLs showed a 1.5 times decrease in G2 group compared to G1 ($p < 0.05$, Table 2).

A significant decrease in PC levels was observed (1.4 and 1.7 times lower, $p < 0.05$) associated with an increase in lyso-PC levels (2.7 and 1.7 times higher, $p < 0.01$) in the G2 group compared to the G4 and G1 groups, respectively.

It was confirmed that mechanical ventilation alone did not alter the total phospholipids content nor the profile of its components (G4 vs. G1) but the changes in BALF phospholipids distribution were due to sevoflurane exposure.

Total protein content although subtly lower in G2 was not significantly different compared with G1 and G4 groups (Table 2).

Based on these results, a direct effect of sevoflurane on pulmonary surfactant metabolism cannot be discarded; therefore, we evaluated the effect of colchicine on pulmonary surfactant as a general inhibitor of cell metabolism.

Table 1

Lung mechanics in ventilated anesthetized animals.

	Ventilatory settings		
	Animals group (n = 13)		
	Group 1	Group 2	Group 3
Flow (mL min ⁻¹)	10.10 \pm 0.04	10.02 \pm 0.03	10.04 \pm 0.01
Volumes (mL)	2.05 \pm 0.03	2.04 \pm 0.03	2.04 \pm 0.01
Respiratory system (RS)			
Pmaw _{RS} (cmH ₂ O)	11.39 \pm 0.63	15.13 \pm 0.89**	15.05 \pm 1.10*
Plaw _{RS} (cmH ₂ O)	8.12 \pm 0.64	12.73 \pm 0.94**	11.52 \pm 1.00
Pelaw _{RS} (cmH ₂ O)	6.93 \pm 0.49	9.40 \pm 0.80*	10.44 \pm 0.87*
Δ Ptot _{RS} (cmH ₂ O)	4.60 \pm 0.43	5.98 \pm 0.33*	4.61 \pm 0.35
Δ P1 _{RS} (cmH ₂ O)	2.41 \pm 0.43	2.73 \pm 0.28	2.53 \pm 0.18
Δ P2 _{RS} (cmH ₂ O)	2.19 \pm 0.16	3.25 \pm 0.23**¶¶	2.31 \pm 0.17
Eltaw _{RS} (cmH ₂ O mL ⁻¹)	3.40 \pm 0.21	4.66 \pm 0.39*	5.13 \pm 0.45*
Edynaw _{RS} (cmH ₂ O mL ⁻¹)	4.47 \pm 0.32	6.26 \pm 0.46*	5.85 \pm 0.53
Δ Etaw _{RS} (cmH ₂ O mL ⁻¹)	1.07 \pm 0.08	1.60 \pm 0.12**¶¶	1.15 \pm 0.09
Lung (L)			
Pmaw _L (cmH ₂ O)	8.76 \pm 0.45	12.29 \pm 0.89**	10.88 \pm 0.30*
Plaw _L (cmH ₂ O)	6.67 \pm 0.46	10.06 \pm 0.83**	8.90 \pm 0.22
Pelaw _L (cmH ₂ O)	5.13 \pm 0.37	7.38 \pm 0.70*	7.23 \pm 0.50*
Δ Ptot _L (cmH ₂ O)	3.65 \pm 0.45	5.10 \pm 0.40*	3.75 \pm 0.40
Δ P1 _L (cmH ₂ O)	2.11 \pm 0.47	2.41 \pm 0.29	2.18 \pm 0.15
Δ P2 _L (cmH ₂ O)	1.54 \pm 0.11	2.68 \pm 0.31*	1.67 \pm 0.30
Eltaw _L (cmH ₂ O mL ⁻¹)	2.52 \pm 0.19	3.63 \pm 0.34*	3.57 \pm 0.30
Edynaw _L (cmH ₂ O mL ⁻¹)	3.27 \pm 0.23	4.95 \pm 0.47*	4.26 \pm 0.30
Δ Etaw _L (cmH ₂ O mL ⁻¹)	0.75 \pm 0.05	1.32 \pm 0.15*¶	0.96 \pm 0.04
Chest wall (W)			
Pmaw _W (cmH ₂ O)	2.63 \pm 0.32	2.85 \pm 0.15	3.97 \pm 0.50*
Plaw _W (cmH ₂ O)	2.45 \pm 0.30	2.67 \pm 0.14	2.71 \pm 0.29
Pelaw _W (cmH ₂ O)	1.80 \pm 0.22	2.10 \pm 0.16	3.22 \pm 0.86
Δ Ptot _W (cmH ₂ O)	0.95 \pm 0.15	0.88 \pm 0.12	0.85 \pm 0.30
Δ P1 _W (cmH ₂ O)	0.30 \pm 0.07	0.31 \pm 0.04	0.11 \pm 0.02¶
Δ P2 _W (cmH ₂ O)	0.65 \pm 0.11	0.57 \pm 0.12	0.63 \pm 0.11
Eltaw _W (cmH ₂ O mL ⁻¹)	0.88 \pm 0.11	1.03 \pm 0.07	1.53 \pm 0.07**§§
Edynaw _W (cmH ₂ O mL ⁻¹)	1.20 \pm 0.15	1.31 \pm 0.06	1.98 \pm 0.05**§§
Δ Etaw _W (cmH ₂ O mL ⁻¹)	0.32 \pm 0.05	0.28 \pm 0.06	0.43 \pm 0.50

Values represent mean \pm SEM.

* $p < 0.05$ Group 2 and 3 compared to Group 1.

** $p < 0.01$ Group 2 and 3 compared to Group 1.

‡ $p < 0.05$ Group 3 compared to Group 1 and 2.

§ $p < 0.01$ Group 3 compared to Group 1 and 2.

¶ $p < 0.05$ Group 2 compared to Group 3.

¶¶ $p < 0.05$ Group 2 compared to Group 3.

Animals pre-treated with colchicine showed a significant decrease in total phospholipids content ($p < 0.05$), as well as in PS and PE ($p < 0.01$) with a significant increment in lyso-PC levels ($p < 0.01$) compared to the G1 and G2 groups.

Total phospholipids and proteins in BALF were statistically decreased in G3 compared to G4 groups ($p < 0.05$, Table 2).

Table 2

Phospholipids and Protein values in BAL.

	Animals group ^a			
	G1	G2	G3	G4
Phospholipids, µg/ml				
PL _{total}	11.53 \pm 81	79.0 \pm 11.0*	83.9 \pm 3.9¶	90.6 \pm 14.8
PC	90.1 \pm 9.8	51.3 \pm 8.8*	66.0 \pm 3.8	72.8 \pm 12.4
Lyso-PC	4.7 \pm 1.9	7.8 \pm 0.2**	1.53 \pm 1.0§	2.9 \pm 0.8
PC/lyso-PC	21.0 \pm 4.0	6.6 \pm 0.6**§	4.3 \pm 0.1**§§	25.6 \pm 1.7
PE	13.7 \pm 202	10.4 \pm 1.9	2.5 \pm 0.3**§§	7.7 \pm 1.5
PS	3.0 \pm 0.8	2.4 \pm 0.3	1.8 \pm 0.1**§§	1.8 \pm 0.2
Proteins, mg/ml				
	0.38 \pm 0.10	0.22 \pm 0.07	0.14 \pm 0.03§	0.36 \pm 0.02

Values represent mean \pm SEM.

* $p < 0.05$ compared to G1 and G4.

** $p < 0.01$ compared to G2.

‡ $p < 0.01$ compared to G2.

¶ $p < 0.05$ compared to G4.

§ $p < 0.01$ compared to G4.

^a n = 8 per group.

3.3. Lung histology

Gas distribution was achieved through a histological pattern analysis of alveolar collapse and septum thickness. Animals anesthetized with sevoflurane showed an increase in alveolar collapse (gas/tissue ratio) compared to G1 (Fig. 2a and b). Septum thickness was also significantly higher in animals exposed to sevoflurane compared to G1 (Fig. 2a and b).

Animals pre-treated with colchicine showed significant alveolar collapse expressed by gas/tissue ratio and more septum enlargement than the G1 group (Fig. 2a and b). Compared to G2, the G3 group showed less alveolar collapse and similar degrees of septum enlargement (Fig. 2a and b).

3.4. Alveolar fluid reabsorption (AFR)

To evaluate whether sevoflurane could promote alveolar collapse by inhibiting the ability of lungs to clear pulmonary edema, we evaluated the AFR in different groups of rats. AFR was not statistically different in lungs exposed to sevoflurane compared to control rats (Fig. 3a). Alveolar capillary permeability, evaluated by FITC-BSA flux, was not significantly affected by sevoflurane compared to control (Fig. 3b). A significant reduction in AFR was observed in rats pre-treated with colchicine, compared to G1 and G2, without significant differences in FITC fluxes comparing the same groups (Fig. 3a and b).

3.5. Thermotropic profile of membranes by diphenylhexatriene (DPH) anisotropy

To evaluate whether the *in vivo* effects of sevoflurane could be explained by changes in pulmonary surfactant membrane fluidity,

lipid vesicles were made with a lipid mixture imitating pulmonary surfactant, exposed to sevoflurane and analyzed by DPH anisotropy in a thermotropic study. The vesicles in control condition (no sevoflurane exposure) showed a broad ordered-to-disordered transition with an estimated melting point around 33 °C (Fig. 4) (estimated by calculating the second derivative). Sevoflurane (1 and 3 MAC, 0.3 and 0.9 mM) promoted a significant decrease in anisotropy at temperatures below 33 °C, with significant increase in anisotropy above 40 °C (Fig. 4). As expected, anisotropy changes during the estimated melting transition (T_m) were not identified, however, clear changes in the lateral order phases below (Liquid order, L_o) and above (Liquid disorder, L_d) the T_m were observed.

4. Discussion

Clinical and experimental data have previously demonstrated that sevoflurane anesthesia promotes alveolar collapse and transient hypoxemia [5,10], but the mechanisms underneath are not clearly identified. Based on its biochemical properties, sevoflurane has poor solubility in water [31] and high lipid affinity which promotes its interaction with surfactant and cellular membrane in the alveolar space. In the other hand, pulmonary surfactant and the alveolar epithelium are exposed to the highest anesthetic concentration during general anesthesia. Thus, we exposed rodent lungs to sevoflurane to elucidate whether its effects on lung mechanics are associated to lung edema formation or biochemical/biophysical changes of pulmonary surfactant. Our results show that changes in pulmonary surfactant composition and structure promote the alveolar collapse observed in ventilated animals anesthetized with sevoflurane while maintaining lung fluid reabsorption.

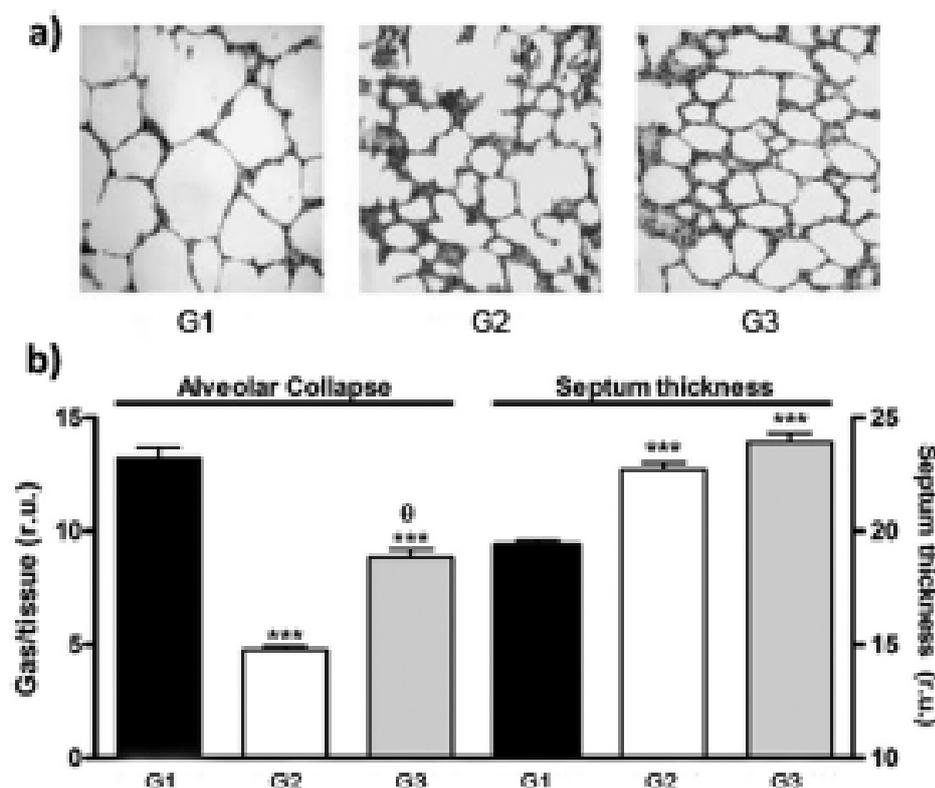


Fig. 2. Histological pattern. (a) Mechanical ventilation with sevoflurane and colchicine administration, both generates lung edema and alveolar distortion compared to control group (representative images). (b) Collapse and septum thickness values were significantly different for sevoflurane and colchicine groups compared to control rats. Bars represent mean \pm SEM. G1 = control-pentobarbital-mechanical ventilation group. G2 = sevoflurane-mechanical ventilation group. G3 = colchicine-pentobarbital mechanical ventilation group. *** $p < 0.001$ compared to G1. # = $p < 0.001$ compared to G2 ($n = 5$).

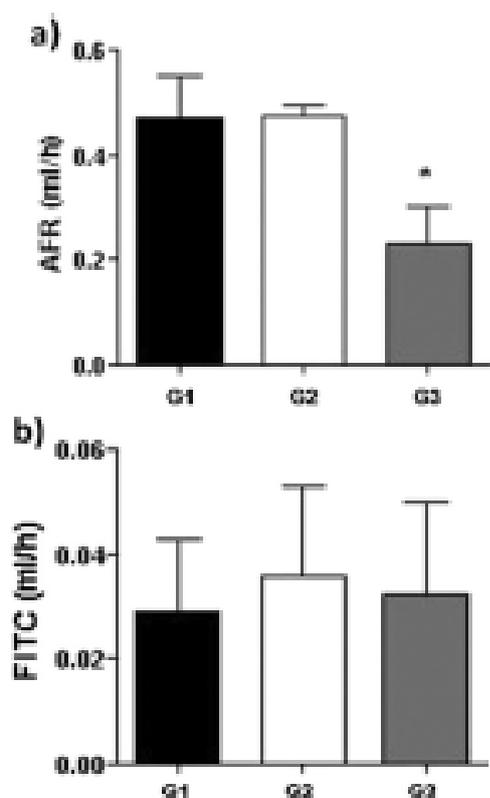


Fig. 3. Alveolar fluid reabsorption (AFR) in isolated lungs. (a) Alveolar fluid reabsorption is not affected by sevoflurane and (b) do not impairs alveolar capillary permeability (right) compared to control group. Colchicine reduces significantly AFR compared to control and sevoflurane. Bars represent mean \pm SEM. G1 = control-pentobarbital-mechanical ventilation group, G2 = sevoflurane-mechanical ventilation group, G3 = colchicine-pentobarbital mechanical ventilation group. * $p < 0.05$ ($n = 5$).

Sevoflurane appears as a better volatile anesthetic [14] than halothane and isoflurane, which have been associated with an *in vitro* reduction in surfactant phospholipids synthesis [13,32] and alveolar fluid reabsorption [33]. However, a recent report indicates that sevoflurane increases atelectatic regions and lung inflammation [17], reflecting a potentially induced alveolar instability.

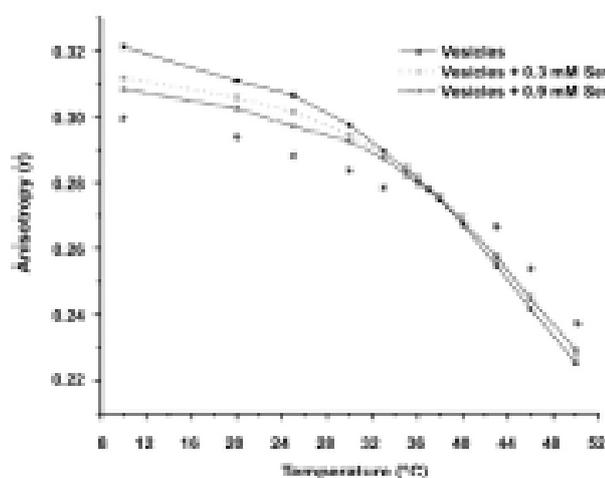


Fig. 4. Thermotropic behavior of vesicles by diphenylhexatriene (DPH) anisotropy. Anisotropy decay of DPH in vesicles during the thermotropic transition study was observed. A significant decrease in the anisotropy is observed by the addition of sevoflurane (1 and 3 MAC, 0.3 and 0.9 mM) at temperatures below 33 °C; and for temperatures above to 40 °C the anisotropy show an increase. However, there are not changes in the anisotropy over the estimated melting transition (T_m) of the membrane. * $p < 0.01$ ($n = 3$).

Based on our results, the animals anesthetized with sevoflurane showed a significant increase on viscoelasticity and lung inhomogeneity expressed by changes in viscoelastic pressure, static and dynamic elastances compared to control and colchicine pretreated rats (Table 1). Since sevoflurane did not modify the pulmonary resistive pressure dissipation, our data reflects changes induced at the peripheral lung tissue and not on airway resistance, as was previously published [10]. Moreover, the observed lung tissue stiffening and the alteration of energy dissipation against the viscoelastic components could be explained by changes in the alveolar environment, as was suggested in a previous report with halothane [8].

Interestingly, after only 30 min of exposure to sevoflurane in a clinical dose, we observed increased levels of lyso-PC associated to a decrease in PC levels (Table 2). This finding is remarkable because increased levels of lyso-PC have been associated with lung injury and abnormal surfactant tensioactive properties secondary to DPPC degradation [34,35].

Indeed, the specific profile of surfactant lipids is fundamental in order to define its ability to lower surface tension [36]. As previously reported, even a modest increase on lyso-PC levels can modify the whole leaflet curvature and inhibit the pulmonary surfactant adsorption capacity by itself [37,38], impairing lung mechanical properties [39].

Considering PC as the most abundant surfactant phospholipid, the accumulation of lyso-PC could reflect an imbalance of surfactant turnover as was suggested also for isoflurane anesthesia [40]. Thus, we decided to evaluate the effect of colchicine, a well-known inhibitor of surfactant phospholipids release by microtubule disruption [41] on a separate group of animals. Colchicine inhibits both the slow surfactant turnover and its rapid release by lung distention [42] and this effect is clearly observed in BALF samples (Table 2).

Animals treated with colchicine showed a typical pattern of cell arrest characterized by low protein secretion and degradation of surfactant lipids, different from that of animals exposed to sevoflurane. However, colchicine promoted alterations of the pulmonary resistive pressure dissipation and less collapse than sevoflurane (Fig. 2a and b) with the highest levels of Lyso-PC in BALF and the lowest PC/Lyso-PC (Table 2) ratio, suggesting that sevoflurane is compromising alveolar stability besides its effect on lipid profile.

In the other hand, halothane promotes the inhibition of active sodium transport across the alveolar epithelium [43] and sevoflurane induces endothelin-1 up-regulation [18] suggesting a potential mechanism of AFR impairment [19]. Thus, alveolar instability induced by lung edema formation secondary to sevoflurane anesthesia could not be excluded.

Interestingly, sevoflurane do not affect AFR or the epithelial integrity in the isolated lung model (Fig. 3), in opposition to the effect of halothane [43]. This is an extremely relevant result because it indicates that the architectural changes observed at the lung tissue by sevoflurane are not related to alveolar edema. Even though colchicine combines the inhibition of surfactant turnover and lung edema reabsorption, G3 rats had less alveolar collapse compared to animals exposed to sevoflurane (Fig. 2b) suggesting a second mechanism besides the increment of lyso-PC.

Volatile anesthetics are lipophilic compounds [44] that can interact with surfactant lipids [45] and promote its dysfunction by a biophysical impairment in a short period of time.

In the selected lipid mixture, sevoflurane promoted a dual change of micro-viscosity: decreased it up to the mean transition point (from 10 to 33 °C) and increased it above the T_m (Fig. 4). In this sense, anisotropy changes should be interpreted as a differential behavior in the pulmonary surfactant structure as a membrane below and above the melting transition point. From 10 to 33 °C the low melting component is disorganized by weakening Van der Waals forces in the

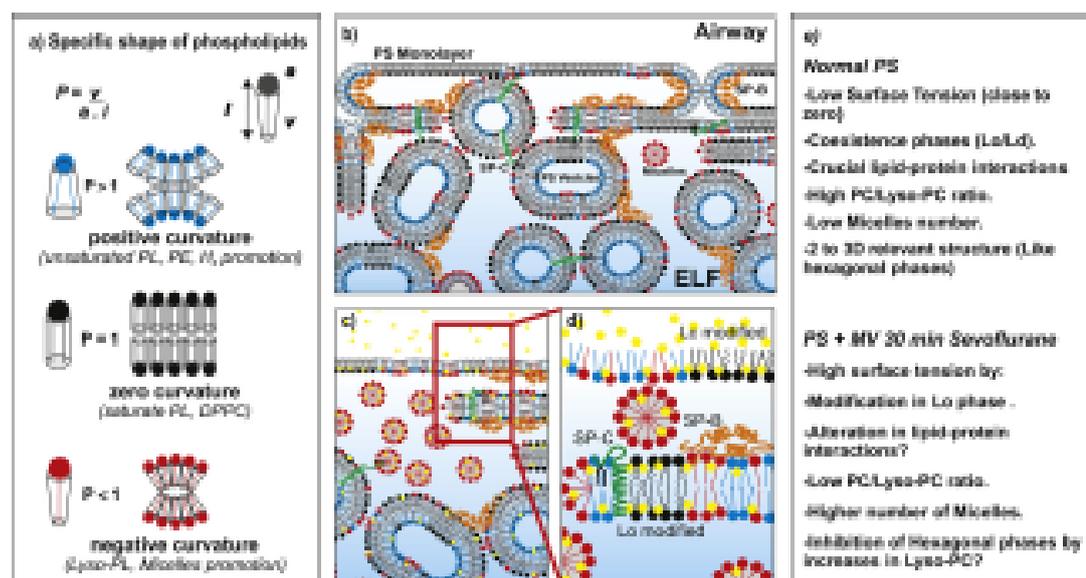


Fig. 5. Proposed scheme of the surfactant dysfunction induced by sevoflurane in the alveolar space (not to scale). (a) Specific shapes of phospholipids (modified from Ref. [53]) determine the development of complex re-arrangements in 2 or 3D of membranes such as bi or monolayers, micelles or inverted hexagonal phases (H_2), among others. (b) Normal Surfactant. Schematic view of the pulmonary surfactant at the alveolar air/water interface. By their lipid–protein interactions the pulmonary surfactant promotes the film curvature (monolayer at the interface and multilayers at the biphasic) adsorption (promoting curvature and hexagonal phases) and tensoactive capacity (forming a tight condensed phase). These are related in part to the average shape of the phospholipids mixture (in order to simplify the picture we decided exclude the cholesterol). (c) and d) Proposed effect of Sevoflurane and Mechanical Ventilation to the pulmonary surfactant. By the addition of sevoflurane, the lateral order of mono (Liquid condensed phase) and bilayers (Liquid order phases) membranes are altered most likely by weakening lipid–lipid and lipid–protein interactions (associated to changes in the microviscosity), promoting alveolar collapse. Mechanical ventilation aggravates the surfactant dysfunction by an accumulation of lyso-PC, which promotes the appearance of micelles instead of functional structures. Lyso-PC accumulation could inhibit 3D structures affecting the hexagonal phases organization. (e) Summary of properties of native pulmonary surfactant and the effect of 30 min mechanical ventilation with sevoflurane anesthesia. $P =$ specific shape equation, $a =$ area, $v =$ volume and $l =$ length, SP-B = Surfactant Protein B, SP-C = Surfactant Protein C, ELF = Epithelial Lining Fluid, yellow circles = sevoflurane, Lc = Liquid Condensed Phase, Lo = Liquid Order Phase, $H_2 =$ hexagonal phase. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

liquid order phase (Lo), which is relevant for surface tension reduction. However, the increased anisotropy from 43 to 50 °C reflects the stabilization of the liquid disorder membrane (Ld) relevant for the inclusion/exclusion cycle of tensoactive material.

The coexistence of Lo/Ld structures *in vitro* are in accordance with our *in vivo* studies and fairly related with pulmonary surfactant tensoactive properties [46]. Even though a straightforward association between surfactant micro-viscosity and surface tension is not fully established, there is strong evidence supporting that alterations in the lateral structure of the pulmonary surfactant mono/bilayer lead to its dysfunction [47].

Following this reasoning, it is plausible to propose that sevoflurane induces alveolar collapse secondary to a significant surfactant dysfunction by direct biophysical impairment. This effect is magnified by the subsequent mechanical ventilation period that further extends the alveolar collapse by increasing lyso-PC levels [48] (Fig. 5). However, mechanical ventilation and the lack of PEEP in our experimental design is a confounding factor in our study. It is generally accepted that low tidal volume ventilation and zero PEEP promotes alveolar collapse [49], the same evidence suggests that the addition of PEEP did not modify the compliance decay in a rodent model and only periodical lung inflation maneuvers could avoid the unintended alveolar collapse. Since mechanical ventilation itself could affect surfactant turnover, we selected a ventilatory pattern of low tidal ventilation with zero PEEP in order to reduce its secretion [50]. Moreover, the same ventilatory pattern was also protective for AFR [51] and alveolar instability [52] which are present at the onset of lung injury.

In summary, this is the first time where the effects of sevoflurane anesthesia are evaluated in terms of modifications in surfactant lipid profile, lipid–lipid interactions, lung mechanics and histology. Further research should be promoted to fully understand the specific mechanisms of sevoflurane–lipids interactions.

Acknowledgments

The authors acknowledge the collaboration of Javier Hurtado Anahí Perlas, David Jameson and Jesús Pérez-Gil in the critical reading of the manuscript and valuable suggestions. This work was supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica, CSIC Universidad de la República (UdelAR) (CSIC-I-2004 and I+D-2006 LM and A.B. respectively) and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, Uruguay (PEDECIBA, L.M., A.D. and A.B.). L.M. was supported by Comisión Académica de Posgrado (CAP), UdelAR Uruguay.

The authors have no conflicts of interest.

References

- [1] Meyer H. Zur Theorie der Alkoholverkoster. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 1899;42:109–18.
- [2] Overton E. Studien über die Narkose zugleich ein Beitrag zur Allgemeinen Pharmakologie. Jena, Germany: Verlag von Gustav Fischer; 1901.
- [3] Cantor RC. Breaking the Meyer-Overton rule: predicted effects of varying stiffness and interfacial activity on the intrinsic potency of anesthetics. *Biophys J* 2001;80:2284–97.
- [4] Hedenstierna G, Edmark L. Mechanisms of atelectasis in the perioperative period. *Int J Pract Res Clin Anesthesiol* 2010;24:157–69.
- [5] Hedenstierna G. Effects of anesthesia on respiratory function. *Br J Anaesth* 1988;10:1–16.
- [6] Gunnarsson I, Tokics I, Gustavsson H, Hedenstierna G. Influence of age on atelectasis formation and gas exchange impairment during general anesthesia. *Br J Anaesth* 1991;68:423–32.
- [7] Rottem HU, Sporn B, Engberg G, Wegman G, Hedenstierna G. Airway closure, atelectasis and gas exchange during general anesthesia. *Br J Anaesth* 1988;61:581–6.
- [8] Bata GS, Riva JA, Pitts H, Medeiros AS, Rocca FR, Zin WA. Effects of halothane on respiratory mechanics and lung histopathology in normal rats. *Br J Anaesth* 2000;84:372–7.
- [9] Tobin WR, Kauter HE, Grogger AM, Lema MJ. The effects of volatile anesthetic agents on pulmonary surfactant function. *In Vivo* 2000;14:557–63.

- [10] Coma FC, Cirinelli PB, Falcao H, Alcantara BJ, Costadoe RS, Medeiros AS, et al. Respiratory mechanics and lung histology in normal rats anesthetized with sevoflurane. *J Appl Physiol* 2001;91:303–10.
- [11] Gogji Y, Nork CM, Poynt D. Redistribution of halothane and sevoflurane under simulated conditions of acute airway obstruction. *Anaesthesia* 2001;56:813–5.
- [12] Valcheva B, Stefanova E, Jordanova A, Panov B, Altanov G, Ischev Z. Effect of halothane on lung carcinoma cells A 549. *Chem Biol Interact* 2003;146:191–200.
- [13] Mollex S, Costantini B, Dussault B, Bestin J, Rolland C, Aubier M, et al. Effects of halothane on surfactant biogenesis by rat alveolar type II cells in primary culture. *Anesthesiology* 1994;41:668–76.
- [14] Takala RK, Soukka HR, Kirvela OA, Rajati HF, Pelliniemi LJ, Kaapa PO, et al. Alveolar integrity and ultrastructure in pigs remains undamaged after exposure to sevoflurane. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2002;46:1137–43.
- [15] Kotani N, Takahashi IS, Senoh D, Hashiba I, Kubota T, Hashimoto H, et al. Volatile anesthetics augment expression of proinflammatory cytokines in rat alveolar macrophages during mechanical ventilation. *Anesthesiology* 1998;1:187–97.
- [16] Takala RS, Soukka HR, Saito MS, Kirvela OA, Kaapa PO, Rajamäki AA, et al. Pulmonary inflammatory mediators after sevoflurane and thiopentone anaesthesia in pigs. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2004;48:40–5.
- [17] Kakimoto K, Chino-douzaki K, Kasahara F, Kubotani A, Leika M, Bai M, et al. Influence of propofol and volatile anaesthetics on the inflammatory response in the ventilated lung. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2011;55:740–8.
- [18] Sakamoto A, Jun-ichi I, Nishikawa A, Banno H, Endo I, Yamaguchi Y, et al. Influence of inhalation anesthesia assessed by comprehensive gene expression profiling. *Gene* 2005;358:39–48.
- [19] Cornelias AP, Briva A, Dada LA, Batti ML, Torjo HE, Yáñez C, et al. Endothelin-1 impairs alveolar epithelial function via endothelial ETB receptor. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:113–22.
- [20] Saldaña JF, Lacuena E, Cornelias AP, Ridge KM, Sznajder J. Dopamine restores lung ability to clear edema in rats exposed to hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:628–33.
- [21] Andrieva AV, Kutuzov MA, Voyno-Yasenetskaya TA. Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:C259–71.
- [22] Bates JHT, Bassi A, Milic-Emili J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J Appl Physiol* 1983;55:1840–8.
- [23] Briva A, Santos C, Malacrida L, Rocchiccioli F, Soto J, Angulo M, et al. Adenosine triphosphate-dependent calcium signalling during ventilator-induced lung injury is amplified by hypercapnia. *Exp Lung Res* 2011;37:471–8.
- [24] Barbutian SM, Xiao DG, Ferreira HC, Riva-Doria R, Corvalán GM, Zin WA, et al. Lung mechanics and histology during sevoflurane anesthesia in a model of chronic allergic asthma. *Anesth Analg* 2007;104:631–7.
- [25] Kutuzov MA, Oliveira W, Sznajder J. Active transport and passive liquid movement in isolated perfused rat lungs. *J Appl Physiol* 1983;75:1574–80.
- [26] Shalizi UR. Rapid isocratic method for the separation and quantification of major phospholipid classes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1991;587:29–37.
- [27] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911–7.
- [28] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [29] Malacrida L, Batti H, Rocchiccioli F, Denicola A, Briva A. Halogenated anesthetics impair biophysical properties of a membrane model of pulmonary surfactant. *Biophys J* 2011;100:505a–6a.
- [30] Shinkley M, Simonsen AC, Giller C, Weber G. Microviscosity and order in the hydrocarbon region of micelles and membranes determined with fluorescent probes. I. Synthetic micelles. *Biochemistry* 1971;25:2108–13.
- [31] Wlataczek N, Wlataczek B, Pison U, M Szwald. On the dissolution of vapour and gases. *Langmuir* 2007;23:1815–23.
- [32] Mollex S, Costantini B, Dussault B, Rolland C, Aubier M, Demonts JM. Differential effects of isoflurane and iv. anaesthetic agents on metabolism of alveolar type II cells. *Br J Anaesth* 1989;63:767–9.
- [33] Bernagula-De-laux S, Jaye C, Luo DF, Sidi NE, Meignan M, Davaldestin P. Halothane and isoflurane decrease alveolar epithelial fluid clearance in rats. *Anesthesiology* 1988;88:751–60.
- [34] Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CE, Fowler II AA, et al. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1991;88:1976–81.
- [35] Arshife L, Koumarov K, Vial D, Rougeot C, Fauce G, Havel N, et al. Generation of lysophospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase A2 and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A2 protein interaction. *J Clin Invest* 1988;81:152–60.
- [36] Perez-Gil J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:1676–85.
- [37] Gruner SM. Stability of lyotropic phases with curved interfaces. *J Phys Chem* 1989;93:7562–70.
- [38] Brown SC, Rosenzweig SB, Hall SB. Differential effects of lysophosphatidylcholine on the adsorption of phospholipids to an air/water interface. *Biophys J* 2007;92:493–501.
- [39] Formulier M, Prud'homme F, Barrois B, Acherif D, Bougazzi S, Verstra P. Evaluation of potentially injurious effects of exogenous surfactant lysophospholipids on the alveolar epithelium and pulmonary mechanics. *Respiratory* 1997;7:337–44.
- [40] Yang T, Li Y, Liu Q, Tao J, Wu W, Huang H. Isoflurane aggravates the decrease of phosphatidylcholine synthesis in alveolar type II cells induced by hydrogen peroxide. *Drug Metabol Drug Interact* 2001;18:243–9.
- [41] Brown IA, Pasquale SM, Longmore WJ. Role of microtubules in surfactant secretion. *J Appl Physiol* 1983;55(5):1868–73.
- [42] Corbet AJ, Voelker RM, Murphy PM, Owens ML. Inhibition by calcitriol of phospholipid secretion induced by lung distension. *J Appl Physiol* 1983;55(4):1710–5.
- [43] Mollex S, Dussault B, Aubier M, Friedlander G, Demonts JM, Clerici C. Halothane decreases Mg^{2+} -ATPase, and Na^{+} channel activity in alveolar type II cells. *Anesthesiology* 1998;88:1806–13.
- [44] Saccardi Y, Silbats A, Carraya H, Ueda I. Atypical Langmuir adsorption of inhalation anesthetics on phospholipid monolayer at various compressional states: difference between alkane-type and ether-type anesthetics. *Biochim Biophys Acta* 1985;817:139–46.
- [45] Stefanova E, Valcheva-Sarber B, Topuzova-Hristova T, Likhov Z. Influence of volatile anesthetics on lung cells and lung surfactant. *Biochem Biotechnol Equip* 2007;21:383–8.
- [46] Bernardino de la Serna J, Perez-Gil J, Simonsen AC, Saguto LA. Cholesterol rules: direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures. *J Biol Chem* 2004;279:40715–22.
- [47] Casals C, Calhadas O. Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818:2550–62.
- [48] Nar S, Garcia A, Franco M, Ruiz-Cabello J, Esteban A, Lorenza JA, et al. A novel non-targeted metabolomic approach in ventilator induced lung injury: mass spectrometric characterization of fatty acids, sphingamine and lysophosphatidylcholine. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:A6724.
- [49] Reiss IC, Revallek A, Uhlig S. Recurrent recruitment manoeuvres improve lung mechanics and minimize lung injury during mechanical ventilation of healthy mice. *PLoS ONE* 2011;6:e24527.
- [50] Savov J, Silbajevs B, Young SL. Mechanical ventilation of rat lung: effect on surfactant films. *Am J Physiol* 1998;277:L320–6.
- [51] Lacuena E, Saldaña J, Cornelias A, Ridge K, Guerrero C, Sznajder J. Ventilator-associated lung injury decreases lung ability to clear edema in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:603–8.
- [52] Allen CB, Pavone LA, DiMarco JD, Bates JH, Nieman GF. Pulmonary impedance and alveolar instability during injurious ventilation in rats. *J Appl Physiol* 2003;94(2):723–30.
- [53] Mountain OC. Lipids, curvature, and nano-medicine. *Eur J Lipid Sci Technol* 2011;113(10):1174–87.

Discusión:

Para iniciar la discusión sería importante primero discutir en detalle el diseño experimental a manera de poder explicar los alcances de cada grupo de animales y los objetivos de los mismos.

De manera randomizada se separaron animales en cuatro grupos como se detalla en la sección de diseño experimental (2.2). En el grupo 1, los animales fueron anestesiados con pentobarbital intraperitoneal y se ventilaron por 30 minutos; en el grupo 2 los animales fueron anestesiados con sevoflurano y ventilados por el mismo periodo de tiempo; a los animales del grupo 3 previo a ser anestesiados y ventilados tal como en grupo 1 se les administró una dosis intra-peritoneal de colchicina (0.25 mg/100g de peso corporal)~15 horas antes del experimento; por último, el grupo 4 fue anestesiado con pentobarbital intraperitoneal pero no fue ventilado.

El grupo 1 ya ha sido reportado como grupo control por otros autores (Reta-2000, Correa-2001), dado que la anestesia con pentobarbital cuando se compara con denervación, muestra que no tiene efectos sobre la histología pulmonar. Por otro lado, se incluye el grupo 4 (sin ventilación mecánica) debido al reportado efecto que tiene la distensión pulmonar sobre la secreción del surfactante pulmonar (Savov-1999), por lo cual es necesario evaluar este efecto. Cabe destacar que también previamente se ha demostrado que la ventilación con volumen corriente bajo y sin PEEP (Presión al final de la Espiración), no afecta la histología pulmonar (Reta-2000). Por lo cual, el grupo 1 se utiliza como control para la anestesia y se compara con los respectivos grupos 2 y 3. Sin embargo, el grupo 3 tiene como objetivo discriminar la potencialidad del sevoflurano para afectar la biosíntesis y/o turnover del surfactante pulmonar. La colchicina es un disruptor de la polimerización de los microtúbulos, por lo cual inhibe el transporte de vesículas intracelulares y con esto la secreción y re-captación del surfactante pulmonar (Corbet-1988, Andreeva-2007). Además, compromete la reabsorción de fluido alveolar a través de la inhibición del transporte de la Na,K-ATPasa, promoviendo la aparición de edema pulmonar (Saldias-1999). Este grupo entonces intenta evaluar los efectos deletéreos de los anestésicos sobre dos importantes

procesos en la función pulmonar: biosíntesis del surfactante y reabsorción de líquido alveolar (Molliex-1994; Rezaiguia-Delclaux-1998).

La tabla 1 muestra los resultados de la mecánica ventilatoria para los tres grupos ventilados. El sevoflurano mostró una disminución de la complacencia con incremento de la presión viscoelástica y de la elastancia estática y dinámica del componente pulmonar. Esto se asocia a un mayor trabajo para la distensión pulmonar, el cual parece ser exclusivo del tejido pulmonar dado que la fracción torácica no presenta modificaciones. Los animales tratados con colchicina muestran disminución de la complacencia respiratoria asociada predominantemente a los componentes no tisulares (pared torácica). Por lo cual, la rigidez del tejido pulmonar y la alteración de la disipación de energía de los componentes viscoelásticos, sin cambios en la disipación de la presión resistiva, pueden explicarse por cambios en la estabilidad alveolar tal como se propusiera anteriormente por (Reta-2000).

La histología pulmonar soporta estos resultados (figura 2), dado que el grupo que fue expuesto a la anestesia con sevoflurano (grupo 2) mostró un aumento del colapso alveolar y engrosamiento de tabiques cuando se compara con el grupo control (grupo 1). Un dato interesante resulta de confrontar los perfiles de colapso y engrosamiento de tabique entre el grupo 2 y 3. El grupo que recibió colchicina muestra un mayor nivel de colapso alveolar y engrosamiento de tabique que el grupo control, pero cuando se compara con el grupo sevoflurano, vemos que el grupo que recibió colchicina, pese a mostrar mayor engrosamiento de tabique, tiene menor colapso que el grupo con sevoflurano.

El engrosamiento de los tabiques puede deberse en parte a la aparición de edema pulmonar debido a la afectación en la reabsorción de fluido alveolar previamente descrita (Saldías-1999), sin embargo el colapso alveolar debería de estar asociado a una inestabilidad alveolar por incapacidad del surfactante pulmonar.

Cuando analizamos los resultados de la reabsorción de fluido alveolar (figura 3), podemos ver que el sevoflurano no altera el clearance y la barrera alveolo-capilar cuando se compara con el grupo control. Esto resulta interesante dado que si ha sido reportado para el halotano y el isoflurano (Rezaiguia-Delclaux-1998). Por otro lado, los animales que fueron tratados con

colchicina muestran una significativa disminución de la reabsorción del fluido alveolar. Estos resultados permiten demostrar que el engrosamiento de tabique del grupo con sevoflurano no es debido a la presencia de edema.

El perfil fosfolipídico y proteico del surfactante pulmonar de ratas anestesiadas con sevoflurano y ventiladas durante 30 minutos mostró un patrón diferencial cuando se compara con el grupo control (grupo 1). Particularmente, se identifica una caída en la concentración de fosfolípidos totales y específicamente de la fosfatidilcolina (PC) (tabla 2). Como hemos discutido en la introducción, este fosfolípido reúne al menos el 80 % en peso del total de componentes del surfactante pulmonar, por lo cual éste parece ser un dato muy relevante que soporta la aparición de colapso alveolar y alteración de la mecánica ventilatoria. Pero algo aun más importante es el incremento en los niveles de liso-fosfatidilcolina (Liso-PC) por la anestesia con sevoflurano y ventilación mecánica. Este fosfolípido tiene actividad detergente e inhibe la capacidad tensoactiva del surfactante pulmonar normal en proporciones muy bajas (Fornasier-1997; Biswas-2007). Su efecto se encuentra asociado a la forma específica del mismo (ver figura 5) la cual promueve la formación de estructuras no lamelares (cúbicas y micelas), inhibiendo la capacidad de absorción y compresión del surfactante pulmonar (Biswas-2007, Mouritsen-2011). Por lo tanto es posible plantear que el anestésico podría inducir la disminución en la síntesis y/o secreción del surfactante pulmonar (Yang-2001), así como la acumulación de liso-PC por afectación en el turnover (Corbet-1988) y/o aumento de los procesos degradativos (Arbibe-1998). Motivo por el cual pensamos que el grupo con colchicina permitiría discriminar en parte los mecanismos.

Los animales tratados con colchicina muestran un claro perfil de arresto celular, con bajos niveles de fosfolípidos totales así como de proteínas en el lavado bronquioalveolar (tabla 2). Mirando en detalle la composición del perfil fosfolipídico vemos que este grupo tiene una disminución de todos los fosfolípidos medidos (neutros y aniónicos), así como un incremento en los niveles de liso-PC por más de dos veces cuando se compara con el grupo control y 1.5 veces más que el grupo con sevoflurano. Estos resultados en parte dejan de lado la hipótesis de afectación de la secreción del surfactante pulmonar por el sevoflurano y abren un nuevo debate asociado a que el grupo

colchicina, pese a la gran acumulación de liso-PC muestra menor colapso alveolar que el grupo con sevoflurano. Esto hace pensar que el colapso presente en los animales anestesiados con sevoflurano además de deberse a la acumulación de la liso-PC debería ser explicado por un segundo mecanismo de inhibición. Resulta interesante destacar que el grupo 4 (anestesiado con pentobarbital, sin ventilación mecánica) no mostró diferencias significativas en el perfil de surfactante pulmonar cuando se compara con el grupo control ventilado (grupo 1), lo cual muestra que no vemos ningún efecto por la ventilación mecánica.

Como discutimos en la introducción, los anestésicos halogenados son moléculas lipofílicas con constante de reparto relativamente alta para las membranas celulares. Resulta interesante en la discusión del proceso de anestesia inhalatoria el análisis de la difusión de gases y vapores de gases en una interfase aire/agua (Wüstneck-2007). Mientras los primeros no tienen restricciones en la difusión (N_2O y Xe) y no se adsorben en la interfase (denotando que atraviesan la interfase sin ninguna restricción termodinámica), los gases (vapores) anestésico se adsorben en la interfase y difunden lentamente a la fracción acuosa (sevoflurane, isoflurane, halotano, cloroformo y dietieter, ordenados de menor a mayor coeficiente de disolución, 0,66 a 10.99 cm^2/s). Este proceso se debe en parte al costo termodinámico de hidratar moléculas hidrofóbicas en entornos polares. Esto significa que de no existir el surfactante pulmonar en la interfase e hipofase alveolar es probable que no existiera la anestesia inhalatoria dado los bajos coeficientes de difusión y disolución que los anestésicos tienen.

Con esto en mente y los antecedentes de (Enhorning-1986), es posible plantear que el mecanismo más significativo en la inhibición del surfactante pulmonar como evento clave en la promoción de colapso alveolar y afectación del intercambio gaseoso es la interacción directa de los anestésicos en las membranas del surfactante pulmonar.

Evaluamos entonces los efectos del sevoflurano en dosis de inducción y mantenimiento en la microviscosidad de vesículas unilamelares grandes (LUVs) por espectroscopia de fluorescencia (figura 4). La anisotropía de las mezclas lipídicas con una composición que remeda al surfactante pulmonar, mostraron que el sevoflurano modifica la coexistencia Lo/Ld , promoviendo la

desaparición de las fases Lo y la formación de fases Ld, lo cual se asocia con peor capacidad tensoactiva del surfactante pulmonar (Bernardino de la Serna-2004).

Finalmente podemos resumir que los resultados antes presentados permiten explicar en parte los efectos de los anestésicos sobre la mecánica e histología pulmonar por una afectación en la composición y funcionalidad del surfactante pulmonar (ver figura 5). Esto debería estar asociado primariamente a una inhibición de su capacidad tensoactiva por una afectación biofísica directa (asociado a la alteración en la coexistencia de fases Lo/Ld), lo que determina el colapso alveolar, y que la ventilación mecánica agrava provocando acumulación de liso-PC (Naz-2012).

Capítulo 3: Efecto del sevoflurano sobre la funcionalidad y estructura del surfactante pulmonar

Como se detalló en la Introducción, existe escasa bibliografía que se encuentre relacionada al estudio de los efectos de los anestésicos inhalatorios sobre la estructura y funcionalidad del surfactante pulmonar. En nuestro conocimiento, Miller y colaboradores (Miller-1967) fueron los primeros en estudiar la estabilidad tensoactiva de extractos lipídicos de biopsias pulmonares de pacientes en cirugía que recibían gases anestésicos (dietiléter o halotano). En este trabajo, con la clásica balanza de Langmuir, estudiaron las tensiones máximas y mínimas durante la compresión dinámica, así como un índice de estabilidad (calculado como el cambio en la tensión/la tensión media, $\bar{S} = 2(\gamma_{\max} - \gamma_{\min}) / (\gamma_{\max} + \gamma_{\min})$). No se demostró ningún cambio significativo para los parámetros estudiados en las muestras de pulmón provenientes de las biopsias de pacientes en anestesia. Sin embargo, resulta claro que la metodología utilizada para la extracción del surfactante pulmonar no es la más adecuada y por otro lado un enmascaramiento de los resultados puede ser considerado dado que las muestras de agente tensoactivo poseían una mezcla de lípidos de surfactante y de tejido pulmonar. Además, no fue considerado el proceso de eliminación de los gases durante el procesamiento de las muestras. Unos años más tarde, Woo y colaboradores basados en estudios de curvas presión volumen (y la reducción del volumen máximo pulmonar, %MLV) de pulmones aislados de perros con % creciente de anestésico, proponen que el efecto sobre la mecánica y función pulmonar es debido a la afectación del surfactante pulmonar. En este trabajo se observó que el %MLV con una presión transpulmonar de 10 cm H₂O, era dependiente de la concentración de anestésico, mostrando una reducción para los anestésicos estudiados (Woo-1969). Un resultado interesante del trabajo, es que los efectos se revertían luego de mantener los pulmones 30 min a 37°C sin la anestesia.

Pattle y colaboradores (Pattle-1972), usando el método de la estabilidad de la burbuja (estabilidad de burbujas en una solución con agente tensoactivo

en el tiempo, método cualitativo usado en la práctica clínica para medir madurez fetal en el nacimiento) demostraron que existía una caída en la estabilidad de las burbujas cuando se incluían vapores de éter, cloroformo y halotano. Sin embargo, las concentraciones de gases utilizadas eran mayores a las utilizadas en la clínica.

En el mismo año Stanley y colaboradores (Stanley-1972) usando una versión modificada de la balanza de Langmuir-Wilhelmy, estudian la tensión superficial de las secreciones traqueo-bronquiales obtenidas de pacientes en cirugía previo y posterior a la anestesia general (halotano, ciclopropano y óxido nitroso). Identifican un aumento de la tensión mínima para las secreciones expuestas a halotano y ciclopropano, pero no para las que estuvieron expuestas a óxido nitroso. Esto es discutido en el contexto de la solubilidad en grasas de los anestésicos, el halotano y ciclopropano (solubilidad en grasa/sangre 60 y 14.7, respectivamente) tienen un alto coeficiente de reparto lo que determina una gran acumulación de los anestésicos en la membranas del surfactante pulmonar, mientras la solubilidad para el óxido nitroso es aproximadamente 2.3 (Stanley-1972).

Con un elegante diseño experimental Enhorning y colaboradores demuestran por primera vez el efecto directo *in vitro* de vapores de solventes sobre la tesoactividad de surfactante pulmonar proveniente de lavado bronquioalveolar de conejos. Se demuestra que con la vaporización en el aire de la burbuja pulsátil de halotano y enflurano, la tensión mínima del surfactante pulmonar se incrementa de 0 a 20 mN/m, y esto es revertido cuando el gas en la burbuja es remplazado por aire atmosférico (Enhorning-1989). Sin embargo, es discutida la relevancia en los usos clínicos dado que los porcentajes necesarios para ver efecto son elevados (no encontrando cambios en el índice de estabilidad para % de halotano menores al 20%).

Finalmente Tobin y colaboradores (Tobin-2001) en una detallada revisión abordan el problema, revisando algunos de los resultados antes mencionados y valiéndose de la comparación de resultados *in vitro* de varios autores con membranas modelo (DPPC, DMPC, DPPC:Chol, entre otras) y diferentes anestésicos.

Es claro que los anestésicos inhalatorios deben de atravesar la barrera alvéolo-capilar para producir la anestesia, y como discutimos anteriormente,

esto depende en gran medida de la presencia de los lípidos en la interfase alveolar. Sin embargo, los efectos sobre la funcionalidad y estructura supramolecular del surfactante pulmonar siguen siendo inexplorados.

El advenimiento de nuevas tecnologías en el área de la biofísica de membranas permite reabordar el problema con modernas aproximaciones que incluyen nuevos equipamientos para estudiar aspectos tensoactivos del surfactante pulmonar, así como aspectos estructurales y fisicoquímicos de las membranas por espectroscopia o microscopia confocal de fluorescencia.

Planteamos entonces un abordaje biofisicoquímico para estudiar los efectos del sevoflurano sobre las propiedades tensoactivas, termodinámicas y estructurales del surfactante pulmonar *in vitro*.

Los resultados de esta sección fueron obtenidos, en parte, a través de una pasantía de un mes por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid-España, con apoyo de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación en su programa de Movilidad Académica (proyecto nº BE_MOV_2010_1913). Los experimentos fueron realizados en colaboración con los grupos de los Dres. Cristina Casals y Jesús Pérez-Gil.

Los estudios con espectroscopia de fluorescencia y microscopía confocal fueron obtenidos en el Institut Pasteur de Montevideo, en la unidad de Bioquímica y Proteómicas Analíticas que dirigen los Dres. Rosario Duran y Carlos Batthyanny (ensayos de fluorescencia), y con el Dr. Pablo Aguilar, director del Laboratorio de Biología Celular de Membranas (microscopía confocal). Para la realización de esta colaboración se recibió apoyo de PEDECIBA en su programa Pasantías locales (2012).

Resultados:

Estudios tensoactivos del surfactante pulmonar expuesto al sevoflurano: experimentos en surfactómetro de burbuja cautiva y balanza de Wilhelmy.

El análisis del comportamiento tensoactivo de SP nativo (SPN) del lavado bronquioalveolar de cerdo, se realizó en Surfactómetro de Burbuja Captiva (CBS) (por detalles de la técnica referirse a la sección materiales y métodos).

En la figura 3.1A y tabla 3.1 se muestran las cinéticas de adsorción inicial y adsorción post-expansión del surfactante pulmonar nativo (SPN, 100-150nl con una concentración ~ 10 mg/ml) a la interfase de una burbuja de aire en buffer Hepes 5 mM, pH 7.01, 150 mM NaCl, 10% glucosa. Para incluir el anestésico en el sistema se utilizó como estrategia la volatilización del sevoflurano en la interfase aire/agua de la burbuja previamente formada (esto es posible debido la elevada presión de vapor del sevoflurano a 37°C ~ 317 mmHg, el volumen aproximado de burbuja fue de 0.04 cm^3). Se cargó un volumen aproximado de 80-100 nl de sevoflurano puro (concentración aproximada de stock 7.56 M), generando un cambio de volumen en la burbuja de $\sim 0.033 \text{ cm}^3$ y un valor medio de tensión superficial de 35-40mN/m (los moles administrados pueden calcularse a partir del cambio de volumen, la presión del sistema y la temperatura como $n=PV/RT$, $\sim 1.3 \text{ } \mu\text{moles}$). Si se administra el surfactante pulmonar en primer lugar, resulta imposible poder cargar el anestésico, el cual queda en la hipofase y en este caso no se registró ningún efecto funcional.

Al incluir el surfactante pulmonar, la tensión estable pos-adsorción (γ_{AI}) del sistema cambia de 60-70 mN/m (buffer) a ~ 22.5 mN/m (ver tabla 3.1). Los valores de tensión estable pos-adsorción (γ_{AI}) y pos-expansión (γ_{APE}) para los experimentos con sevoflurano no fueron significativamente diferentes cuando se comparan con el grupo control (ver tabla 3.1).

Durante los ciclos Q-estáticos, el sistema se comprime un 20% del volumen inicial y se permite la relajación por 1 segundo de la burbuja antes de

volver a comprimir nuevamente un 20% del volumen, y se continúa comprimiendo hasta alcanzar el valor mínimo de tensión.

Tabla 3.1: Resultados de valores tensoactivos del surfactante pulmonar nativo con/sin sevoflurano. Tensión inicial pos-adsorción (γ_{AI}), tensión inicial pos-expansión (γ_{APE}), tensión máxima (γ_{max}) y mínima (γ_{min}) en ciclos Q-Estáticos, índice de estabilidad (\bar{S})[♦].

	Q-Estc ₁		Q-Estc ₄		Q-Est _{med}		\bar{S}		
	γ_{AI} [♦]	γ_{APE} ^{♦♦}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}			
SPN	22.62±0.45	23.33±0.14	24.72±0.33	5.57±0.42	25.12±0.56	1.38±0.53	24.92±0.73	1.38±0.83	1.51±0.09
SPN+Sevo	19.62±0.71	22.0±0.97	22.28±0.56*	18.57±0.56**	22.56±0.73*	18.64±0.65**	22.42±0.73	18.60±0.60**	0.19±0.01**

♦ Calculado como $2(\gamma_{max} - \gamma_{min}) / (\gamma_{max} + \gamma_{min})$
 Los datos se expresan como media ± ES
 * p<0.05
 ** p<0.01

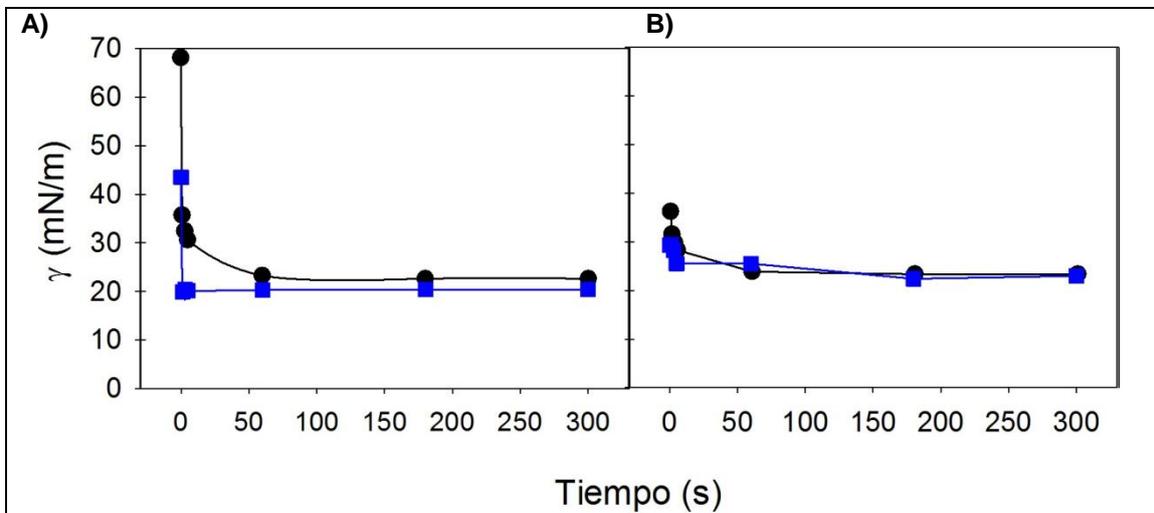


Figura 3.1: Ensayo de adsorción inicial y pos-expansión de surfactante pulmonar nativo (SPN) de cerdo sin y con sevoflurano. A) Gráfico representativo de la adsorción inicial del SPN sin anestésico (negro) y con sevoflurano (azul). B) Gráfico representativo de la adsorción pos-expansión del SPN sin anestésico (negro) y con sevoflurano (azul). Resultados de 3 experimentos independientes.

En la figura 3.3A se puede observar los ciclos Q-estáticos del SPN sin y con sevoflurano, el SPN muestra un retardo en la respuesta inicial a la compresión y luego del segundo ciclo logra alcanzar la tensión mínima con niveles de compresión cercanos al 30% del volumen original. La γ_{max} y γ_{min} se pueden ver en la tabla 3.1, encontrándose dentro de los valores reportados

anteriormente para el SPN (López-Rodríguez-2011). Cuando se incluye sevoflurano en el sistema, se puede observar que la γ_{\min} de los ciclos analizados (1, 4 y promedio de los 4 ciclos) son significativamente diferentes al control, mientras que la γ_{\max} es significativamente diferente para los ciclos 1 y 4 pero no para el promedio. Se calculó el índice de estabilidad para las dos situaciones estudiadas, identificándose una caída del índice de casi un orden de magnitud por la inclusión del sevoflurano (ver tabla 3.1).

Es interesante notar que en los experimentos anteriores, pese a comprimir la burbuja un 50 % del volumen inicial no se logró disminuir la tensión del sistema a valores inferiores a 18 mN/m, esto se puede ver en la figura 3.3A y las imágenes tomadas de la burbuja durante el ciclo de compresión (figura 3.2).

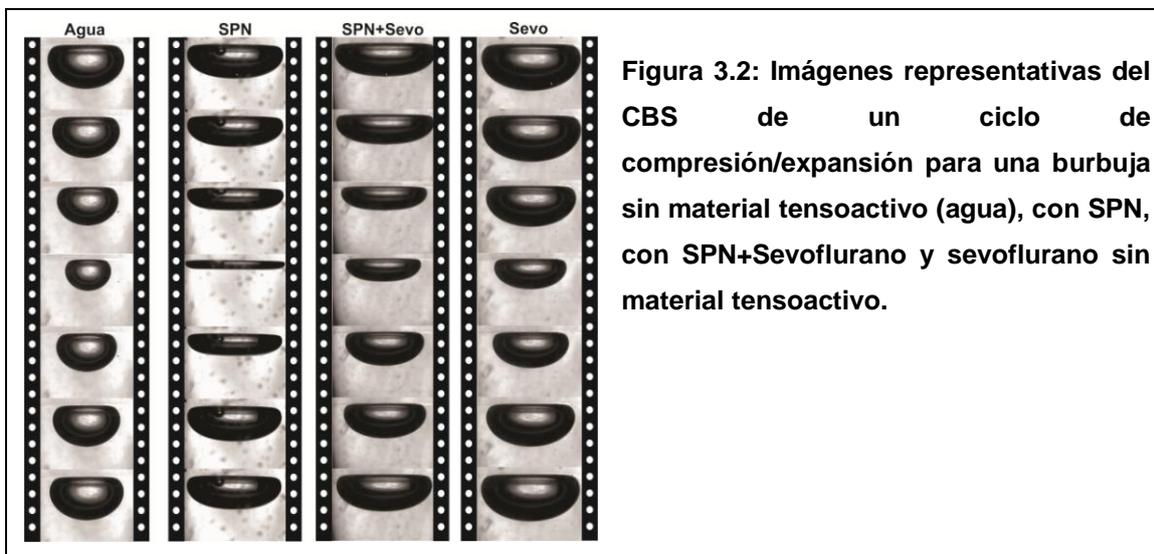


Figura 3.2: Imágenes representativas del CBS de un ciclo de compresión/expansión para una burbuja sin material tensoactivo (agua), con SPN, con SPN+Sevoflurano y sevoflurano sin material tensoactivo.

Durante los ciclos dinámicos se pudo observar que el sevoflurano afectó la γ_{\min} para todos los ciclos analizados, elevando los valores promedio de tensión cercana a 15 mN/m, mientras que γ_{\max} solo se vio afectada para el primer ciclo. El índice de estabilidad cayó 3 veces cuando se incluyó sevoflurano en el sistema (ver tabla 3.2 y figura 3.3B).

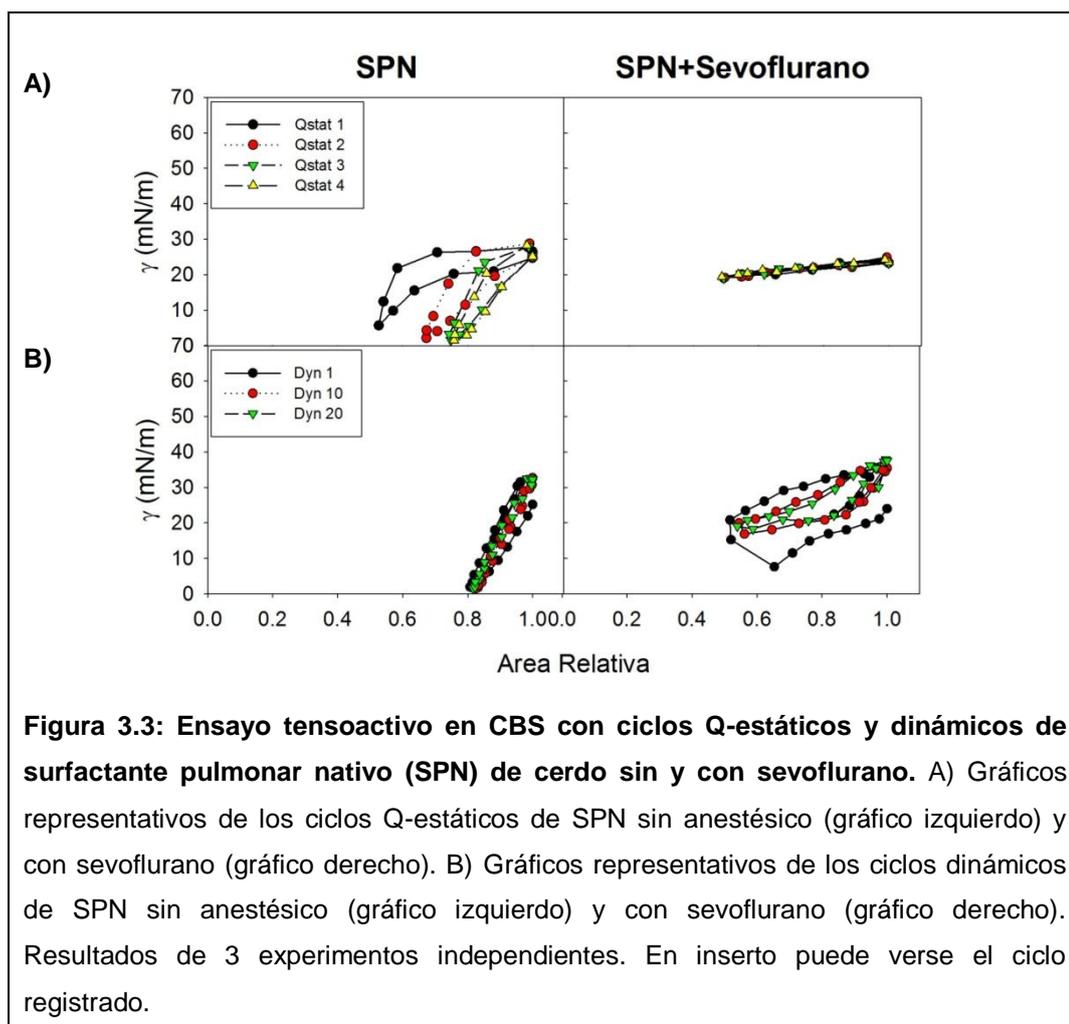


Figura 3.3: Ensayo tensoactivo en CBS con ciclos Q-estáticos y dinámicos de surfactante pulmonar nativo (SPN) de cerdo sin y con sevoflurano. A) Gráficos representativos de los ciclos Q-estáticos de SPN sin anestésico (gráfico izquierdo) y con sevoflurano (gráfico derecho). B) Gráficos representativos de los ciclos dinámicos de SPN sin anestésico (gráfico izquierdo) y con sevoflurano (gráfico derecho). Resultados de 3 experimentos independientes. En inserto puede verse el ciclo registrado.

Tabla 3.2: Resultados de valores tensoactivos del surfactante pulmonar nativo sin/con sevoflurano. Tensión máxima (γ_{max}) y mínima (γ_{min}) en ciclos dinámicos, índice de estabilidad (\bar{S})[♦].

	SPN			SPN+Sevo		
	γ_{max}	γ_{min}	\bar{S}	γ_{max}	γ_{min}	\bar{S}
Din₁	25.16±0.51	1.61±0.24	1.76±0.23	22.78±0.71*	21.31±2.42**	0.62±0.22**
Din₁₀	30.76±0.76	1.48±0.17	1.48±0.36	30.89±4.26	16.85±0.63**	0.57±0.11**
Din₂₀	31.98±0.61	1.48±0.27	1.82±0.21	32.06±4.36	17.57±1.00**	0.57±0.09**
Din_{med}	29.30±1.68	1.52±0.04	1.80±0.02	28.58±3.09	15.58±0.73**	0.58±0.12**

[♦] Calculado como $2(\gamma_{max} - \gamma_{min}) / (\gamma_{max} + \gamma_{min})$

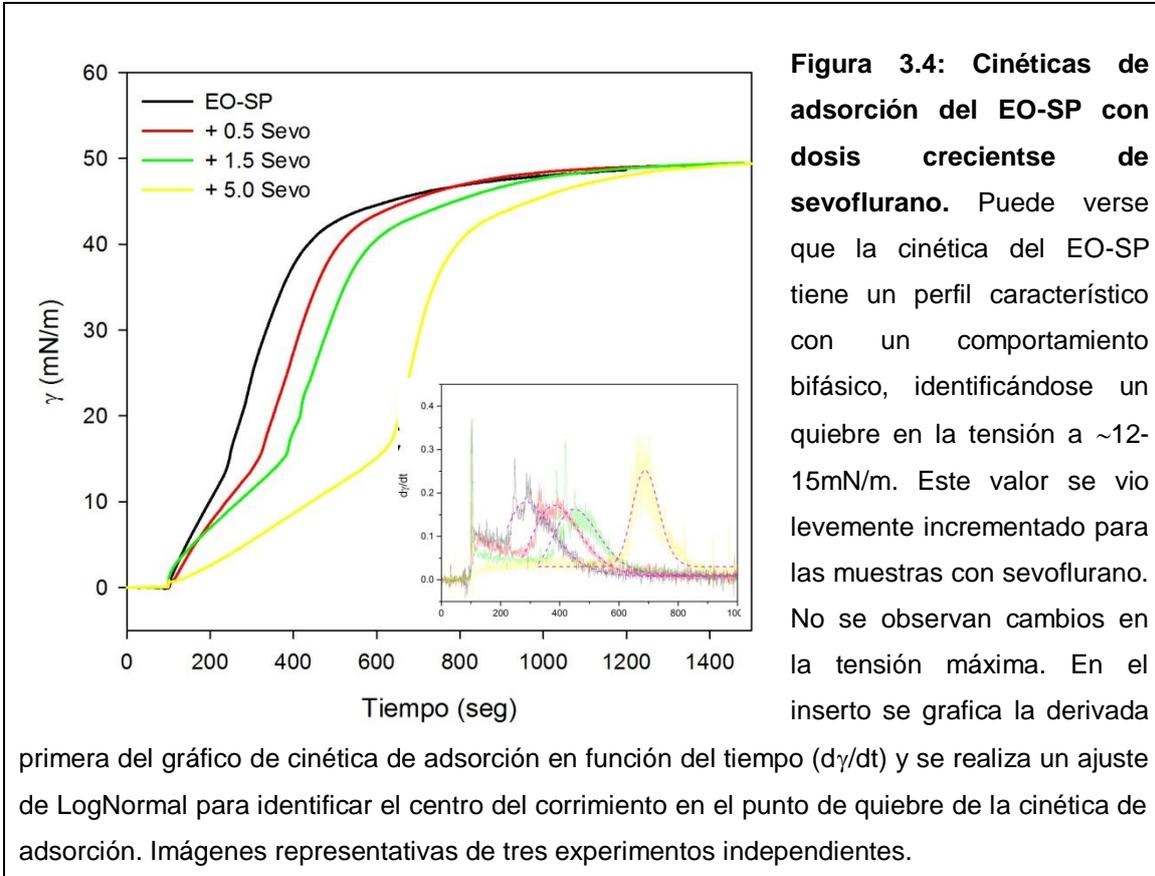
Los datos se expresan como media ± ESM

* p<0.05

** p<0.01

Usando un plato de Wilhelmy se realizaron cinéticas de adsorción interfacial con extracto orgánico de surfactante pulmonar porcino (EO-SP) al que se le agregaron concentraciones crecientes de sevoflurano (0.5, 1.5, 5.0; relación molar [sevoflurano]/[fosfolípidos]). En la figura 3.4 se puede observar

el resultado de las cinéticas de adsorción de EO-SP porcino, identificándose un cambio en la cinética, dosis dependiente, pero sin afectar la tensión máxima estable (ver figura 3.4). Es posible ver que la adición de sevoflurano modifica el comportamiento bifásico de la adsorción interfacial, incrementando el tiempo y la tensión de quiebre de 14 a 16 mN/m.



Estudios estructurales y termodinámicos del surfactante pulmonar expuesto al sevoflurano: una aproximación espectroscópica y por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Se analizó el comportamiento termodinámico del EO-SP expuesto a concentraciones crecientes de Sevoflurano, para lo cual se realizó calorimetría diferencial de barrido de vesículas multilamelares (MLVs) de EO-SP. En la figura 3.5 se pueden observar los termogramas de EO-SP y el efecto del anestésico para un rango de concentración entre 0.5 y 10 mM (0.5 a 10 radio molar [sevoflurano]/[fosfolípidos]).

Se puede observar que el surfactante nativo tiene una ancha transición de fase (baja cooperatividad) y una temperatura de fusión (T_m) cercana a 32 °C. La adición de sevoflurano disminuye la entalpía, T_m y $T_{1/2}$ del EO-SP, los tres parámetros indican una disminución de la energía necesaria para llevar adelante la transición de fases Lo/Ld descrita para el surfactante pulmonar (de

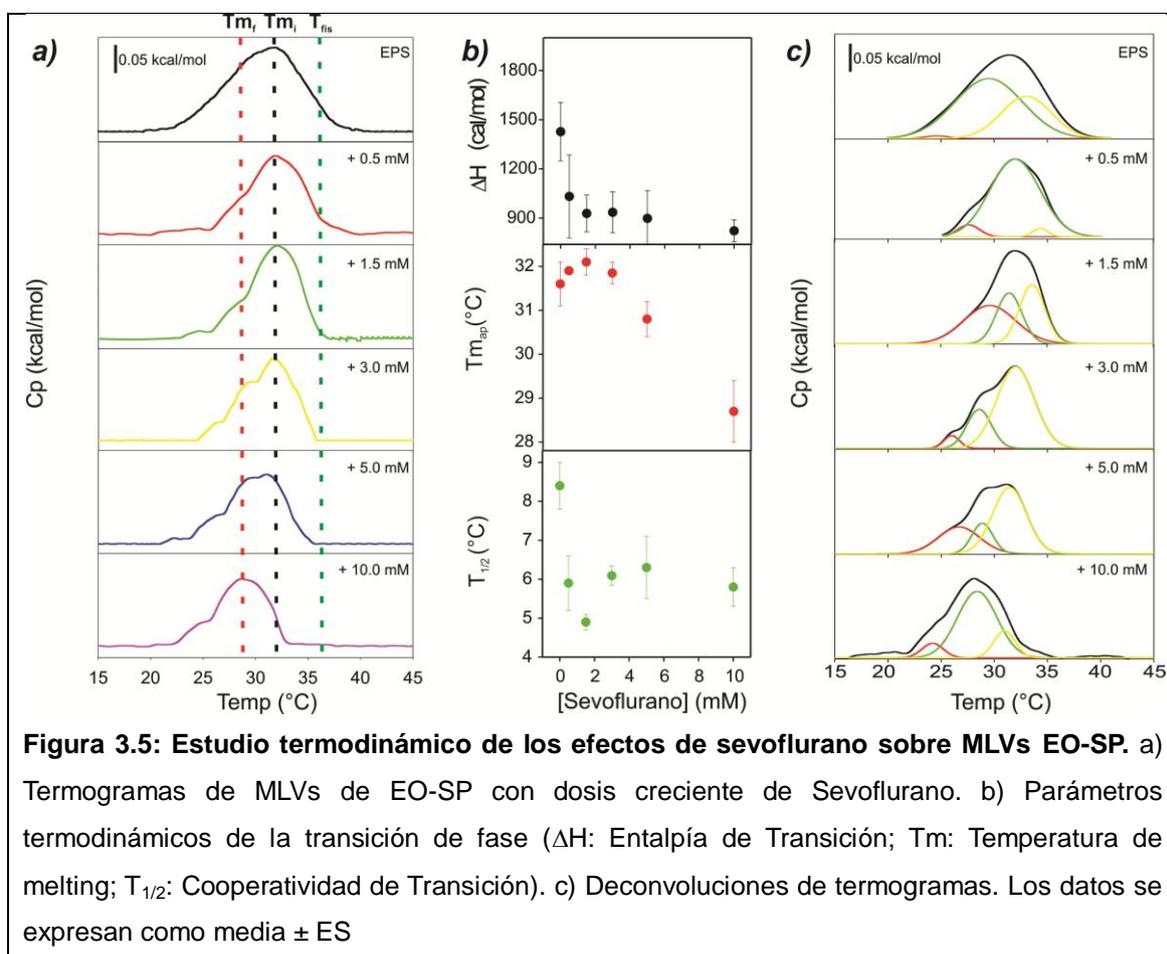


Figura 3.5: Estudio termodinámico de los efectos de sevoflurano sobre MLVs EO-SP. a) Termogramas de MLVs de EO-SP con dosis creciente de Sevoflurano. b) Parámetros termodinámicos de la transición de fase (ΔH : Entalpía de Transición; T_m : Temperatura de melting; $T_{1/2}$: Cooperatividad de Transición). c) Deconvoluciones de termogramas. Los datos se expresan como media \pm ES

la Serna-2004). En la figura 3.5C se procedió a realizar una deconvolución de los termogramas, identificándose una desaparición gradual de los componentes de alta T_m y la estabilización de componentes de baja T_m .

Se observa una caída en la transición de fases en el entorno de $1-3^{\circ}\text{C}$, lo cual es lo previsto según la teoría de depresión del punto de congelamiento. A continuación se calcularon los valores teóricos y experimentales del punto de congelamiento (ΔT_m , según Heimburg-Jackson-2007). Antes de analizar los resultados, resulta relevante puntualizar algunos conceptos sobre los cálculos de ΔT_m . La concentración efectiva de anestésicos en membranas está dada por el coeficiente de reparto con el agua. Desafortunadamente no se encuentra reportado el coeficiente de reparto para el sevoflurano en las membranas del surfactante pulmonar y pese al esfuerzo dedicado por nuestro grupo, tampoco ha sido posible determinarlo hasta el momento. La manera clásica de medida de coeficiente de reparto de estos gases es por cromatografía de gases con inyección de la fracción gaseosa con una jeringa gas-tight. Al no contar con un sistema de cromatografía de gases con un dispositivo capaz de aceptar muestras de fracción gaseosa, hemos intentado resolver el problema con dos alternativas experimentales: 1) espectroscopia IR para los estados vibracionales del sevoflurano y 2) cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La primera opción no fue posible dado que en agua, las señales del sevoflurano son demasiado pequeñas y el peso de la señal del agua hace imposible su determinación. Mientras que por HPLC, aunque seguimos trabajando para resolver el problema, la mayor dificultad radica en poder cuantificar las pequeñas concentraciones en el agua, por debajo de los límites de sensibilidad de nuestra instrumentación.

Sin embargo, se encuentra determinado experimentalmente el coeficiente de reparto para el sevoflurano en sangre/gas, solución salina/gas y aceite/gas (0.69, 0.37 y 47.2, respectivamente) (Strum-1987). Estos valores se encuentran en bastante buena concordancia a los cálculos teóricos disponibles en DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>), $\text{LogP} \sim 2.4$ en octanol/agua. Y es posible estimar el LogP para membranas con colesterol a partir de las tablas de (Firestone-1986), donde para membranas de PC con colesterol se predice un $\text{Ln}(P) = 2.21 - \text{Ln}(\text{ED}_{50})$. Para el sevoflurano el ED_{50} reportado es 2.1% (Nickalls-

2003), por lo cual el $\ln(P) \cong 1.47$, aproximadamente la mitad de los valores en octanol/agua.

La concentración de anestésico en membrana es igual a $P \cdot [\text{Sevoflurano}]$, siendo P el coeficiente de partición y $[\text{Sevoflurano}]$ la concentración en la fracción acuosa (aproximadamente para nuestro rango de trabajo 0.01-0.2 mol/L). Mientras que para determinar la fracción molar de anestésico en la membrana primero tenemos que considerar el volumen de un mol de fosfolípido (para la DPPC es alrededor de 0.734 L, asumiendo una densidad de 1g/cm^3). Entonces tenemos que el rango de fracción molar de anestésico en membrana para nuestros experimentos es $x_A \approx 0.00734-0.1468$. Con estos números en mente podemos calcular la $\Delta T_m = -(RT_m^2/\Delta H) \cdot x_A$ (ver detalles en la introducción, sección 2.2.6). La entalpía para la transición de DPPC es $\sim 35000\text{ J/mol}$ y la $T_m \sim 314\text{ K}$ (Marsh-2013).

Los resultados teóricos para el ΔT_m de la DPPC son los esperados para las concentraciones de uso crítico en la clínica, siendo la concentración 1.5 mM la ΔT_m empírica para la ED_{50} del sevoflurano (-0.52 K).

Tabla 3.3: Cálculos teóricos y experimentales de la depresión del punto de congelamiento (ΔT_m).					
DPPC				EO-SP	
$[A]_W$	$[A]_M$	x_A	ΔT_m	x_A	ΔT_m
0.0005	0.01	0.0073	-0.17	0.0068	-0.88
0.0015	0.03	0.0220	-0.52	0.0205	-2.64
0.003	0.06	0.0440	-1.03	0.0410	-5.28
0.005	0.1	0.0734	-1.72	0.0684	-8.80
0.01	0.2	0.1468	-3.44	0.1368	-17.60

$[A]_W$ y $[A]_M$ en mol/L y ΔT_m en $^\circ\text{K}$
 ΔT_m^* experimental
 $\Delta H_{DPPC} \approx 35000\text{ J/mol}$
 $\Delta H_{EO-SP} \approx 6000\text{ J/mol}$
 $T_{m,DPPC} \approx 314\text{ J/mol}$
 $T_{m,EO-SP} \approx 304.7\text{ J/mol}$
 $Vol_{DPPC} \approx 0.734\text{ L}$
 $Vol_{EO-SP} \approx 0.685\text{ L}$ (calculado a partir de las proporciones molares de los lípidos mayoritarios del surfactante pulmonar, DPPC:POPC:Coolesterol)

Sin embargo, cuando analizamos los resultados de ΔT_m de la mezcla de EO-SP, los valores son anormalmente elevados, cuando los resultados experimentales de ΔT_m se encuentran dentro del rango esperado para la dosis crítica del sevoflurano.

Finalmente nos abocamos al estudio de la micro-viscosidad e hidratación de MLVs reconstituidas de EO-SP cuando son expuestas al sevoflurano. Para esto utilizamos dos sondas fluorescentes que permiten estudiar los parámetros fisicoquímicos antes mencionados, estas son el difenilhexatrieno (DPH) y el LAURDAN (se puede leer en la sección materiales y métodos los detalles de las técnicas). En la figura 3.6 se puede ver el cambio de anisotropía del DPH a 25°C con la adición de sevoflurano, a medida que se incrementa la concentración de anestésico se observa una caída en los valores de anisotropía, encontrándose un valor crítico para 3.43 mM de sevoflurano calculado a partir del ajuste de los datos a la ecuación de Boltzmann (figura 3.6).

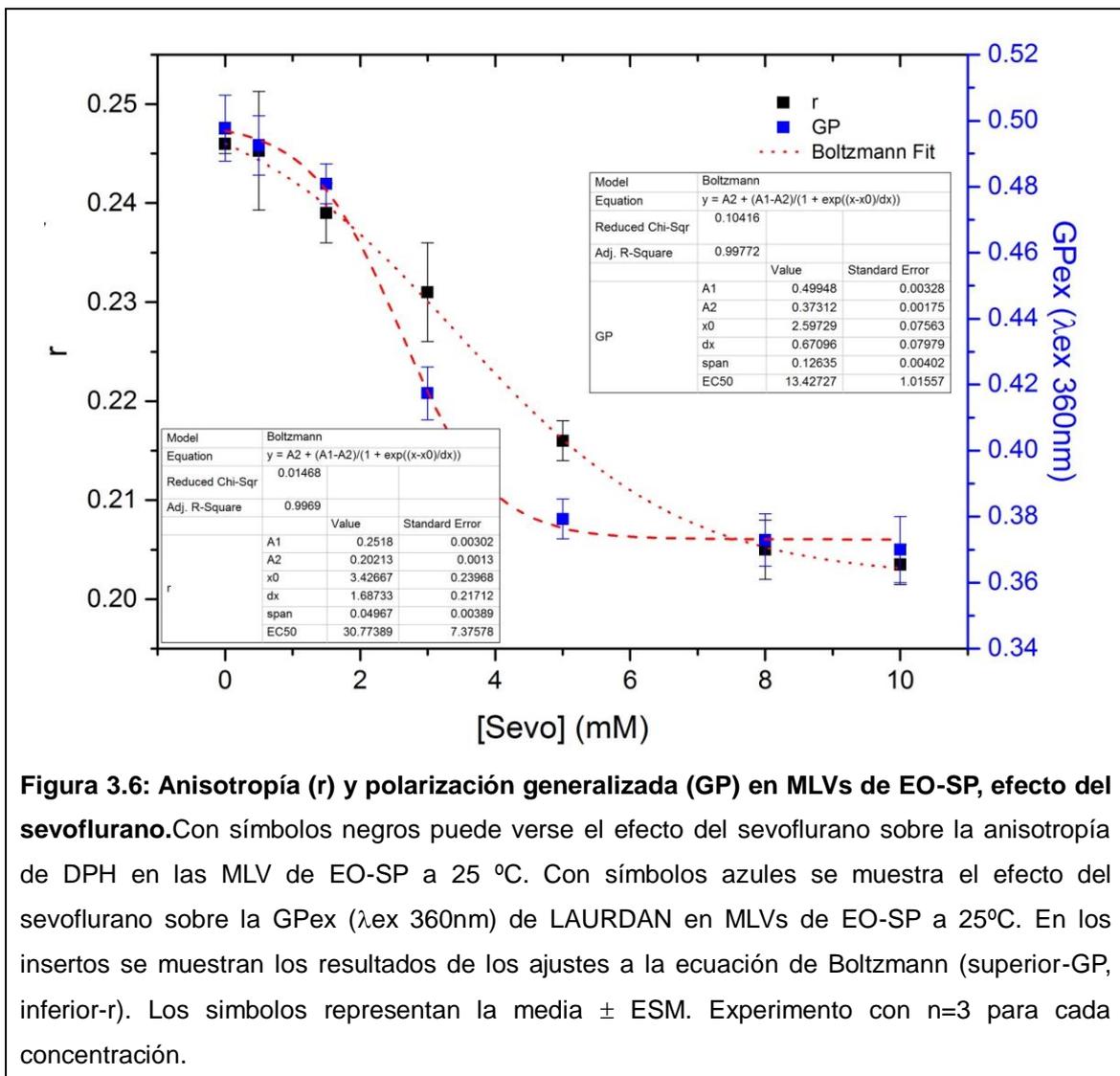
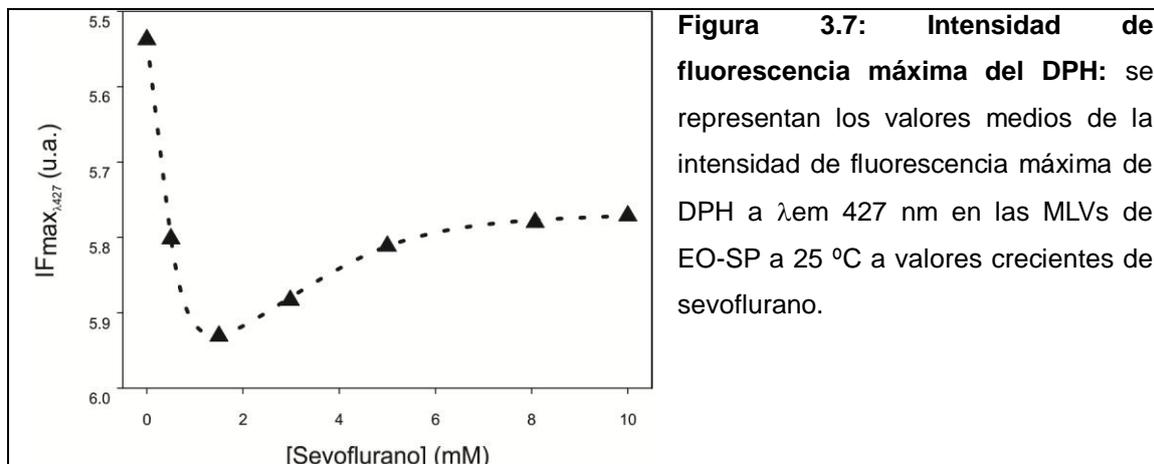


Figura 3.6: Anisotropía (r) y polarización generalizada (GP) en MLVs de EO-SP, efecto del sevoflurano. Con símbolos negros puede verse el efecto del sevoflurano sobre la anisotropía de DPH en las MLV de EO-SP a 25 °C. Con símbolos azules se muestra el efecto del sevoflurano sobre la GPex (λ_{ex} 360nm) de LAURDAN en MLVs de EO-SP a 25°C. En los insertos se muestran los resultados de los ajustes a la ecuación de Boltzmann (superior-GP, inferior-r). Los símbolos representan la media \pm ESM. Experimento con n=3 para cada concentración.

Cuando se grafica la intensidad máxima del DPH en función de la concentración de sevoflurano es posible ver que el anestésico produce una caída de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración (figura 3.7).



Los cambios espectrales de LAURDAN seguidos por la función de GP muestran resultados similares a los obtenidos por la anisotropía de DPH. El incremento de sevoflurano provoca una caída de la GP lo que se traduce en un incremento en la penetración de agua o modificación de las propiedades físicas que permiten una mejor relajación dipolar del LAURDAN. Aplicando el mismo tipo de ajuste que para la anisotropía, es posible identificar que la concentración crítica para la respuesta del anestésico es un poco inferior a la del DPH, en torno a 2.6 mM.

Estos resultados son interesantes y nos plantean el desafío de cómo interpretar esta diferencia en las concentraciones críticas para el mismo cambio diferencial en la unidad GP o r vs la concentración de anestésico. Por lo cual, se propone re-graficar el siguiente set de datos, colocando en las abscisas a la función GP y en las ordenadas a la anisotropía (figura 3.8). Este tipo de gráfico es inédito, pero creemos permite dar una interpretación a los resultados en el contexto de la teoría del perfil lateral de presión propuesto por (Cantor-1997).

Como puede verse, los resultados toman una distribución que se ajusta con buen intervalo de confianza ($R^2 \sim 0.995$) a la función de Boltzmann, identificando un punto crítico donde el gráfico cambia de concavidad (en torno a $r=0.23$ y $GP=0.43$, lo cual corresponde con ~ 3 mM sevoflurano), lo cual plantea dos estados discretos para la membrana (sin y con anestésico, siendo 10 mM una concentración de saturación). Para concentraciones de sevoflurano por debajo del punto crítico, la respuesta al anestésico es mayor para el LAURDAN (ΔGP) que para la anisotropía (Δr) y lo opuesto ocurre para concentraciones por arriba del valor crítico.

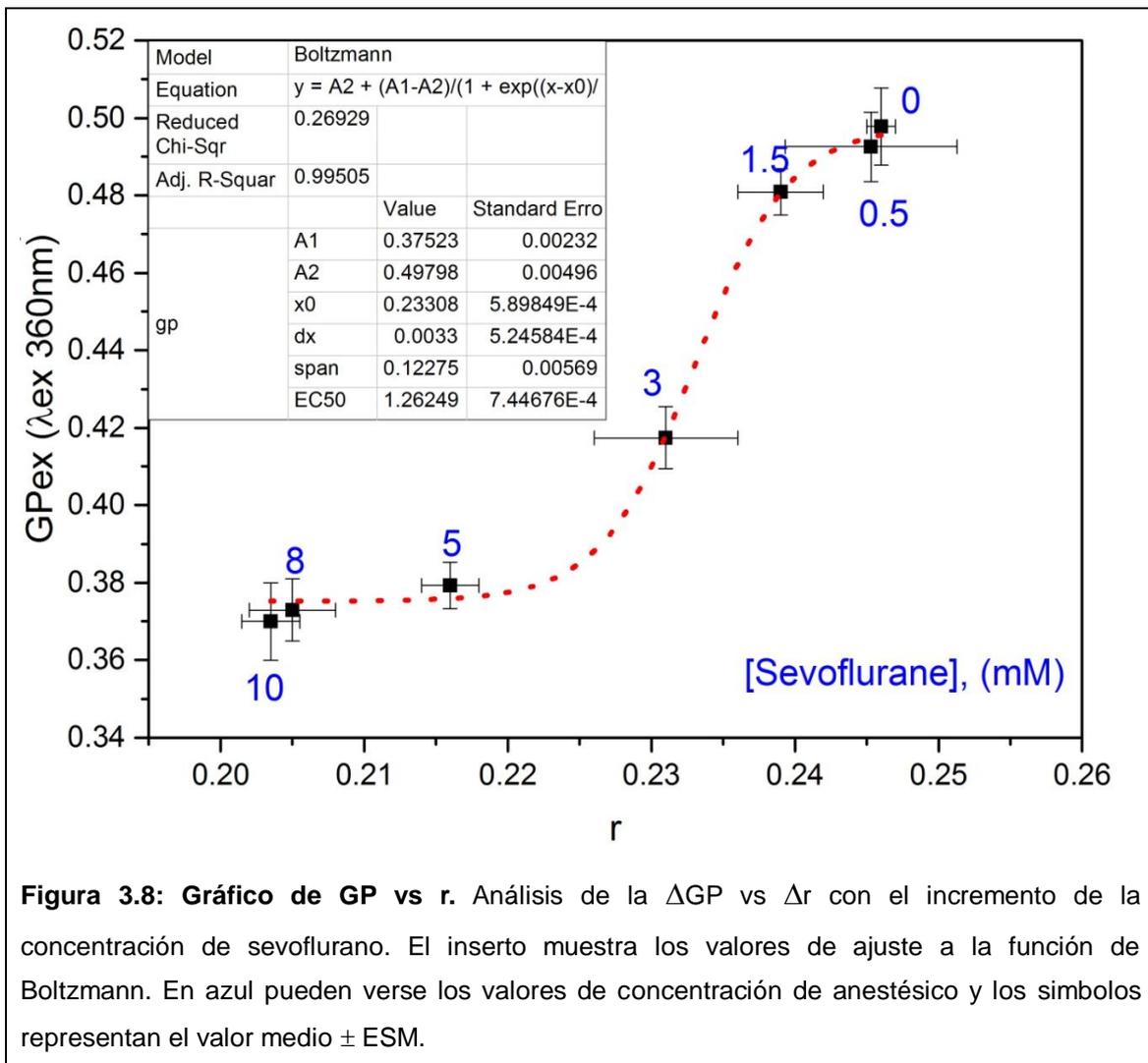


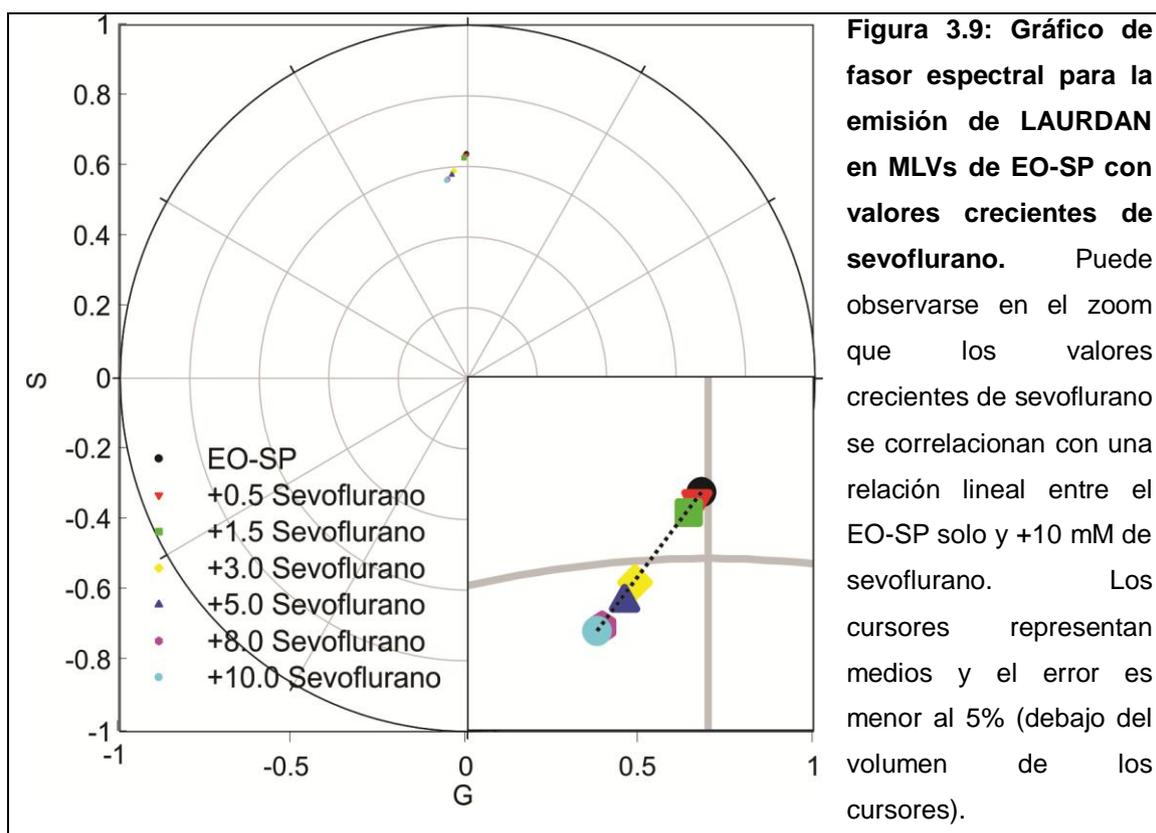
Figura 3.8: Gráfico de GP vs r. Análisis de la ΔGP vs Δr con el incremento de la concentración de sevoflurano. El inserto muestra los valores de ajuste a la función de Boltzmann. En azul pueden verse los valores de concentración de anestésico y los símbolos representan el valor medio \pm ESM.

Esto pensamos está relacionado con la teoría del perfil lateral de presión propuesto por Cantor, asociado a que el anestésico se incluye en la interfase a bajas concentraciones y mayoritariamente su efecto es sobre la hidratación de

la interfase de la membrana (afectando las fuerzas electroestáticas de repulsión/atracción a nivel de los grupos carbonilos/fosfatos). Por encima de la concentración crítica, los cambios más significativos se producen en el core de la membrana (mayor Δr que ΔGP para misma concentración de sevoflurano), posiblemente por un efecto compensatorio de las fuerzas de van der Waals por sobre las fuerzas de repulsión electroestática de la interfase.

Si es correcto que el anestésico produce un sistema en el cual las membranas tienen un estado Lo/Ld pre-anestesia y un estado pos-anestesia Lo/Ld con T_m menor o básicamente Ld a temperatura por encima de 28-29°C (según los datos de calorimetría), esto debería resolverse en el análisis de fasores espectrales de LAURDAN como la combinación lineal de dos estados discretos.

Esto puede verse en la figura 3.9, donde los datos espectrales de LAURDAN de los experimentos de GP fueron transformados al gráfico de fasor espectral, identificándose una relación lineal entre los estados intermedios de anestésico y los valores extremos (0 y 10 mM). Además, se identifica un corrimiento espectral que coincide con la fluidificación del EO-SP y aumento de la heterogeneidad de las membranas.



Discusión:

El CBS introducido por (Schûrch-1985) ha demostrado ser una herramienta más eficiente que su antecesor el surfactómetro de burbuja pulsátil (PBS) en el estudio de las capacidades tensoactivas del surfactante pulmonar dado que el CBS logra salvar los problemas de pérdida de material tensoactivo (leakage), disminuye los volúmenes de muestra, posee un adecuado control de temperatura y rápido control de los ciclos de compresión-expansión (Putz-1994). A partir de experimentos con CBS hemos podido determinar los efectos del sevoflurano sobre la función tensoactiva del surfactante pulmonar. Para esto fue necesario utilizar un método alternativo de carga de material ("spreading" de pequeños volúmenes de SPN en la interfase aire/agua), a la clásica estrategia de administración del extracto de surfactante pulmonar descrito originalmente por (Schûrch-1985). Clásicamente, la adsorción se lograba tras 2-3 ciclos de compresión/expansión de una burbuja en solución rica en surfactante pulmonar (1-3 mg/ml) o por la administración de una solución orgánica de surfactante pulmonar en la interfase de la burbuja. Estas últimas tienen como desventajas: el bajo contraste en soluciones con alta concentración de surfactante (lo cual dificulta la calidad de las medidas) y la administración de solventes (clásicamente cloroformo y metanol) que quedan dentro de la cámara de trabajo y afectan la performance del surfactante pulmonar en estudio (Putz-1998). Para nuestro caso, esta última implicaría generar una situación de sumatoria de efectos anestésicos + solventes, por lo cual pensamos que el método descrito por Putz será mejor para nuestro sistema de estudio.

Es prácticamente imposible generar mezclas de SPN (10-20 mg/ml) con sevoflurano dado que los volúmenes manejados son extremadamente pequeños y no es posible realizar ajustes radiométricos en las concentraciones molares. Por lo tanto se usó como estrategia, la administración directa del anestésico en estado líquido a la burbuja pre-formada en una interfase aire/agua (en su defecto buffer). El volumen de anestésico administrado es aproximadamente 80-100nl y es posible estimar la cantidad de moles por el cambio en el volumen de la burbuja pos-volatilización del anestésico. El cálculo

de concentración es del entorno de 1.3 μ moles de sevoflurano en ~ 0.077 cm³ de volumen de aire (mezcla de aire y sevoflurano, 80:40% aprox). La constante de reparto para el agua/gas reportada es de 0.37, por lo cual la concentración en el aire de la burbuja es $\sim 25\%$.

Lo interesante de este método es que remeda lo que sucede en el espacio alveolar si consideramos a la burbuja como una unidad alveolar y la hipofase más la capa de surfactante pulmonar como la barrera alveolo/capilar.

En las cinéticas de adsorción inicial es posible ver que la adsorción del SPN cuando está presente el sevoflurano es más rápida y alcanza una γ_{IA} sutilmente menor. Un dato interesante a considerar es que la tensión inicial para el sistema en el caso de la interfase aire/agua es ~ 70 mN/m, mientras que en el caso de vapor de sevoflurano/agua se parte de $\sim 30-40$ mN/m. Esto es debido a que los vapores de anestésicos se adsorben en una interfase aire/agua y modifican la tensión del sistema asociado al proceso de hidratación que estos necesitan para solubilizarse en el agua (Wüstneck-2007). El mecanismo por el cual el sevoflurano podría facilitar la adsorción del SPN cuando se encuentra en la interfase aire/agua no resulta trivial y necesita de experimentos complementarios para una mejor interpretación. Sin embargo, basado en los reportes de Kirk y Gruner, es posible proponer que los anestésicos podrían inducir la formación de transiciones $L\alpha$ - H_{II} (lamelar-hexagonal inversa), a través de los resultados que demuestran una disminución de las temperaturas de transición $L\alpha$ - H_{II} (Krik-1985).

Los resultados anteriores pueden ser controvertidos cuando se comparan con los obtenidos en el plato de Wilhelmy (figura 3.4), sin embargo resulta claro que las tensiones máximas no sufren modificación y en este caso los efectos observados podrían ser explicados por una afectación directa de la estructura y organización de las membranas del EO-SP previo a la adsorción que imposibilite el correcto proceso.

Cuantitativamente, el sevoflurano muestra la habilidad de inhibir la capacidad tensoactiva del SPN cuando se estudian los ciclos Q-estáticos y dinámicos, modificando por sobre todo la tensión mínima y el índice de estabilidad (tabla 3.2 y figura 3.3). Esto nos habla de una incapacidad del SPN para comprimirse y lograr disminuir la tensión cercana a cero. Resulta

interesante que la tensión máxima no se vea modificada dramáticamente como sucede en otros casos de inhibición (proteínas, colesterol o sales biliares, Lopez-Rodriguez-2011) y que la inclusión del anestésico desaparezca la histéresis para los ciclos Q-estáticos y la promueva en los dinámicos. Estos resultados pueden ser interpretados en el contexto de la energía necesaria para colapsar y re-expandir la monocapa. El sistema no puede enriquecer la monocapa en material suficientemente sólido (So-Lo) para disminuir la tensión durante la compresión, por lo cual colapsa prematuramente. Durante el ciclo de re-expansión el proceso no se ve del todo afectado (en el caso de los ciclos Q-estáticos se observa una facilitación del proceso) y no se afecta la γ_{\max} .

Cuando contextualizamos estos resultados con los obtenidos por calorimetría diferencial de barrido y espectroscopia de fluorescencia, podemos comprender mejor y proponer una mejor modelización de lo que sucede en el sistema.

Los parámetros termodinámicos (figura 3.5) muestran que el anestésico produce un severo efecto sobre las fuerzas de interacción de los lípidos, debilitando las fuerzas de van der Waals y promoviendo una caída de la temperatura y energía necesarias para llevar adelante la transición. A la temperatura que fueron realizados los experimentos de CBS (37°C) la mezcla de SPN y EO-SP se encuentra completamente fluidificada (fase Ld), la coexistencia de fases Lo/Ld han sido previamente demostrada como elemento crucial para la funcionalidad del surfactante pulmonar (Bernardino de la Serna-2004, Saenz-2010).

El análisis en el contexto de la teoría termodinámica de la anestesia basada en la disminución del punto de congelamiento (Heimburg-Jackson-2007), nos permite demostrar que nuestros experimentos están en el rango de valores de anestésicos de uso crítico, pero abre nuevas controversias dado la incongruencia sobre los valores de ΔT_m para el sistema de SPN. Esta desviación de la regla puede ser explicada por dos motivos, en primer lugar los ajustes de línea de base para las curvas son siempre difíciles, realizándose habitualmente de manera empírica (Cañadas-2013), por lo cual es fácil sobre o sub estimar la entalpía de transición.

Sin dejar de lado este importante punto en el análisis de los resultados, creemos que el punto clave que permite explicar esta diferencia radica en la

suposición que el modelo de caída del punto de congelamiento hace sobre el no reparto de las moléculas anestésicas en fases gel o Lo. Tal como lo discutiéramos en la Introducción, Kaminoh y colaboradores demostraron que el halotano tiene la posibilidad de mezclarse en membranas con fase gel (Kaminoh-1988). Robert Cantor en su trabajo original sobre el perfil de presión lateral (Cantor-1997), discute el efecto de los anestésicos en membranas con colesterol y concluye que el colesterol magnifica el efecto de los anestésicos en un factor $(x_{chol}-1)^{-1}$, disminuyendo la concentración necesaria para lograr la misma potencia. Por lo cual pensamos que la compleja composición fosfolípídica del surfactante pulmonar y los elevados valores de colesterol (20% molar) pueden apartar al sistema de la regla.

Los datos de anisotropía y GP, denotan que la inclusión del sevoflurano afecta el perfil axial de hidratación y viscosidad del EO-SP (figura 3.6). Proponemos entonces este nuevo modelo de análisis global de los datos de anisotropía y GP (figura 3.8), basados en los fundamentos teóricos del perfil lateral de presión (Cantor-1997). En lo mejor de nuestro conocimiento no existe en la bibliografía una aproximación similar más allá de los reportes del análisis de ambos parámetros por separado (Harris-2002, Aguilar-2012). El resultado más relevante radica en identificar que, dependiendo de la concentración de sevoflurano, dos propiedades fisicoquímicas independientes pero estrictamente relacionadas se modifican diferencialmente. Inicialmente los efectos más significativos se encuentran asociados a los cambios de la región hidrofílica-hidrofóbica donde el LAURDAN puede censar el estado de hidratación (recordar que el LAURDAN puede censar agua con características muy particulares que se discutieron en el capítulo 1). Esto significa que el sevoflurano, al localizarse en la región polar de los fosfolípidos, afecta las propiedades dieléctricas de la región (Kaminoh-1991), probablemente disminuyendo las fuerzas de repulsión e incrementando el área específica de los fosfolípidos, re-organizando la línea de tensión transversal que se ve compensado con una caída de la micro-viscosidad del core de la membrana. Esto se encuentra en línea con los efectos teóricos de los anestésicos descritos por Cantor, el cual encuentra que los cambios más significativos en el área específica de los fosfolípidos se ve en región de la interfase por sobre el core (Cantor-1997).

El análisis de fasores espectrales permite proponer que básicamente el efecto de los anestésicos en los rangos de concentración manejados en nuestros experimentos condice con un sistema de dos estados, que LAURDAN puede pensar como estados discretos de hidratación de la membrana (cavidades de $nH_2O/LAURDAN$). Los cambios espectrales identifican un corrimiento hacia longitud de ondas mayores (aumento de la relajación dipolar) y aumento del ancho espectral.

En este contexto, claramente, los resultados de tensoactividad toman otra dimensión, debido a que tenemos argumentos certeros de una afectación biofísica de las propiedades fisicoquímicas de las membranas de surfactante pulmonar que determinan la inhibición de sus capacidades tensoactivas. Es posible proponer entonces que a partir de una alteración de las interacciones lípido-lípido y probablemente lípido-proteína asociado a los cambios en el perfil lateral de hidratación y viscosidad (lo que pensamos se asocia al perfil lateral de presión), se vean comprometidas las estructuras en la tercera dimensión del surfactante pulmonar (formación de fases hexagonales) que permiten la correcta inclusión y exclusión de material tensoactivo y disminuir la tensión a cero durante la compresión.

Creemos que estos resultados dan soporte suficiente para proponer con certeza el mecanismo que planteamos al final de la sección anterior (figura 5, Malacrida-2014) y abren nuevas perspectivas asociadas a comprender cómo pueden verse afectadas las interacciones lípido-proteína y proteína-proteína que son imprescindibles para el correcto funcionamiento del surfactante pulmonar (Pérez-Gil-2008). Además, permite pensar que procesos como la difusión de gases en la barrera alvéolo/capilar podrían verse comprometidas dada la relevancia que ha tomado recientemente el surfactante pulmonar en la difusión de oxígeno y moléculas cargadas en la interfase alveolar (Aberg-2010, Olmeda-2010, Parra-2013). También es interesante plantear si más allá de comprometerse la función del surfactante pulmonar que se encuentra en el líquido alveolar (por inhibición directa o mediada por degradación), también podría verse comprometido el surfactante pulmonar que se encuentra en los N-II en forma de cuerpos lamelares. Esto se sustenta en las prolongadas hipoxemias de los pacientes (en algunos casos 12-24 h) y la altísima lipofilidad de los cuerpos lamelares, los cuales podrían actuar como

acumuladores/reservorio de anestésico, comprometiendo en el tiempo, la actividad del surfactante que será secretado.

Por lo cual, un abordaje celular *in vitro* para evaluar la acumulación de anestésico intracelular y el uso de estrategias de microscopía confocal con resolución espacio-temporal de sistemas de vesícula única (GUVs), permitirán comprender en detalle cómo los aspectos celulares y supramoleculares del surfactante pulmonar pueden verse comprometidos por la inclusión del anestésico.

Estos resultados se encuentran en etapa de escritura para ser prontamente enviados a su comunicación:

Gases in the air: affection of pulmonary surfactant function and supramolecular structure by sevoflurane anesthesia.

Leonel Malacrida, Olga Cañadas, Elena López-Rodríguez, Rosina Toledo-Galo, Ana Denicola, Jesús Pérez-Gil*, Cristina Casals*, Arturo Briva*.

*Autores de correspondencia

Capítulo 4: Efectos celulares y supramoleculares del sevoflurano sobre el surfactante pulmonar: estudio en células A549 y vesículas gigantes unilamelares.

Tal como se describiera en Introducción, los cuerpos lamelares son vesículas exocíticas de pH ácido y gran tamaño (1-2 μm) que contiene los lípidos y proteínas hidrofóbicas del surfactante pulmonar. Pese a ser precursor del surfactante pulmonar que se encontrará en fluido alveolar, su composición tiene sutiles diferencias cuando se compara con el surfactante pulmonar. Particularmente tiene niveles elevados de proteínas, aproximadamente una relación fosfolípido/proteína 0.35 y colesterol/proteína 0.15 (Diez-Blanco-1987). La fracción fosfolipídica está compuesta mayoritariamente por fosfatidilcolina (64.5%), fosfatidiletanolamina (11%), fosfatidilglicerol (7.9%), esfingomiélin (4%) y fosfatidilinositol (3%). La secreción de los cuerpos lamelares puede ser desencadenada por diferentes factores, pero la distensión mecánica es probablemente el estímulo más importante (Wirtz-Dobbs-1990). Se consideran estructuras con un gran contenido energético en su interior (asociado al empaquetamiento de unidades hidrofóbicas) como multi-bicapas concéntricas que al llegar a la interfase se funcionan dando lugar a una monocapa con coexistencia de fases Lo/Ld (Ravasio-2010).

Pese a comprenderse bastante bien los aspectos ultraestructurales, la secreción y fusión de los cuerpos lamelares, poco se sabe a cerca del estado de ordenamiento e hidratación de estas membranas. Spalding y colaboradores usando una sonda de espin electrónico y resonancia paramagnética nuclear muestran, que a temperatura fisiológica, los cuerpos lamelares y vesículas compuestas por lípidos purificados de éstos, tienen un alto grado de fluidez pese a poseer 50% de DPPC, lo cual plantean se encontraría influenciado por la presencia de los componentes lipídicos (Spalding-1983). Usando espectroscopia Raman, Swain y colaboradores demuestran que el contenido

de lípidos es modificado a lo largo de la diferenciación de los N-II y que el contenido interno de lípidos es el marcador distintivo entre los N-I y N-II (Swain-2008).

Para estudiar estas estructuras sub-celulares, clásicamente se han utilizado los cultivos primarios de N-II (Suwabe-1991, Haller-1998), pero también el uso de líneas celulares como la A549 de características estructurales y funcionales similares a los N-II, ha permitido también avanzar en el conocimiento de esta área (Shapiro-1978, Jaing-2010, Stephanova-2008). Las células A549 derivan de un cultivo continuo de carcinoma de pulmón y presentan la ventaja de poder usar una línea celular inmortalizada con características similares a los N-II. Sintetizan y secretan surfactante pulmonar, encontrándose una composición de los cuerpos lamelares similar a los de N-II (Shapiro-1978).

Stephanova, demostró que el halotano tiene efectos genotóxicos y citotóxicos sobre las células A549, pero lo más relevante es que demostraron una disminución de los cuerpos lamelares presentes en estas células por la adición del anestésico (Stephanova-2008).

Sin embargo, poco más se sabe respecto a los efectos y posible acumulación de los anestésicos en los cuerpos lamelares dada su alta lipofiliidad. Pensamos que los resultados de nuestro grupo permiten plantear una acumulación del anestésico en estas estructuras sub-celulares que comprometen su función luego de terminada la anestesia.

Basados en las propiedades espectroscópicas del LAURDAN y en los resultados que se presentaron en la sección anterior (ver figura 3.8), pensamos que el LAURDAN puede ser usado como un sensor intracelular de la presencia de anestésico. Esto se basa en los cambios espectrales que la molécula sufre cuando la membrana posee anestésico. Por lo cual se plantea estudiar por microscopia confocal de fluorescencia utilizando resolución espectral (tal como se desarrollo para las vesículas gigantes unilamelares en el capítulo 1), el efecto del sevoflurano sobre la estructura e hidratación de los cuerpos lamelares de células A549.

Por otro lado, de los resultados del capítulo anterior se desprende que una afectación sobre la estructura y dinámica de las membranas de surfactante pulmonar por la adición de sevoflurano puede ser planteada. Por lo cual

usando vesículas gigantes unilamelares y microscopia confocal es posible identificar efectos del anestésico por sobre las propiedades supramoleculares y dinámicas de los lípidos y proteínas del surfactante pulmonar.

La primera referencia de utilización de vesículas gigantes unilamelares en microscopía confocal de fluorescencia para el estudio de la organización de membranas es reportada por (Bagatolli-Gratton-1999). Desde entonces, se ha transformado en una espectacular herramienta para el estudio de la organización lateral de membranas y su interacción con drogas o proteínas.

La visualización de dominios de tamaño micrométrico en el surfactante pulmonar se observa por primera vez en extractos lipídicos de origen bovino (Nag-2002). Posteriormente, Bernardino de la Serna y colaboradores demostraron la relación en la segregación de fases Lo/Ld con el contenido de colesterol y la independencia de la proteínas en esta segregación (Bernardino de la Serna-2004-2009).

No existe bibliografía relacionada a los efectos de los anestésicos inhalatorios sobre organización de membranas, encontrándose solamente un reporte del efecto de alcoholes y anestésicos generales intra-venosos sobre la miscibilidad de membranas plasmáticas reconstituidas como GUVs (Gray-2013). En este trabajo, los autores proponen que los anestésicos generales disminuyen el punto crítico de miscibilidad de la membrana plasmática (4°C) y este efecto sería responsable de la acción de la anestesia general sobre la función de canales iónicos y proteínas de membrana.

Los resultados que se presentan en esta sección fueron obtenidos en colaboración con el Dr. Pablo Aguilar (Laboratorio de Biología Celular de Membranas, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay), la Mag. Soledad Astrada (Laboratorio de Biología Celular, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay), el Prof. Jesús Pérez-Gil (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid, España), el Prof. Luis Bagatolli (Membrane Biophysics and Biophotonics Group, Center for Biomembrane Physics, University of Southern Denmark, Denmark) y el Prof. Enrico Gratton (Laboratory for Fluorescence Dynamics, LFD, University of California at Irvine, USA).

Resultados

Efecto del sevoflurano sobre los cuerpos lamelares de células A549: abordaje con fasores espectrales

Se cultivaron células A549 hasta lograr confluencia del 70-80% y se incubaron con LAURDAN según recomendaciones previas para la visualización de las estructuras de membrana celular y sub-celular (Golfetto-2013). En la figura 4.1A es posible ver una imagen de contraste de una célula A549; las flechas blancas señalan algunos organelos sub-celulares que se consideran cuerpos lamelares. En la figura 4.1B se tomó la misma imagen con microscopía de un fotón usando un laser UV de 405 nm y colectando dos fracciones de la emisión de LAURDAN ($\text{canal}_{1(\text{azul})}=415-460$ y $\text{canal}_{2(\text{verde})}=460-530$). Tal como se ha reportado anteriormente, LAURDAN modifica su emisión dependiendo del estado de hidratación de las membranas en la que se encuentra. El canal azul corresponde a la emisión del LAURDAN en estructuras de membrana más ordenadas, mientras que el canal verde en estructuras de membranas más fluidas (Bagatolli-2006). Es posible ver que las estructuras señaladas con flechas azules tienen gran intensidad en el canal azul, mientras que el resto de las membranas celulares poseen una emisión más significativa en el canal verde.

Cuando se calcula la GP pixel por pixel, de igual manera que se hace para los análisis de emisión en cubeta pero operando las intensidades de los canales antes descritos, se puede ver que las estructuras seleccionadas con flechas azules y que preferentemente emitían en el canal azul, tienen valores de GP más cercanos al rojo (cabe destacar que los valores de GP son transformados a una escala de colores de rojo a azul, lo que equivale a 1 hasta -1), ver figura 4.1C. En el histograma GP (figura 4.1E) se puede ajustar con una distribución para dos poblaciones tipo Gauss con valores medios de 0.019 y 0.471. Los valores de GP altos se correlacionan con membranas en estado muy ordenado y baja hidratación, mientras lo opuesto sucede para los valores de GP bajo. El valor de GP_2 determinado para los cuerpos lamelares se

correlaciona con membranas en estado Lo, mientras que las membranas con bajo GP₁ con estructuras en estado Ld (Bernardino de la Serna-2009).

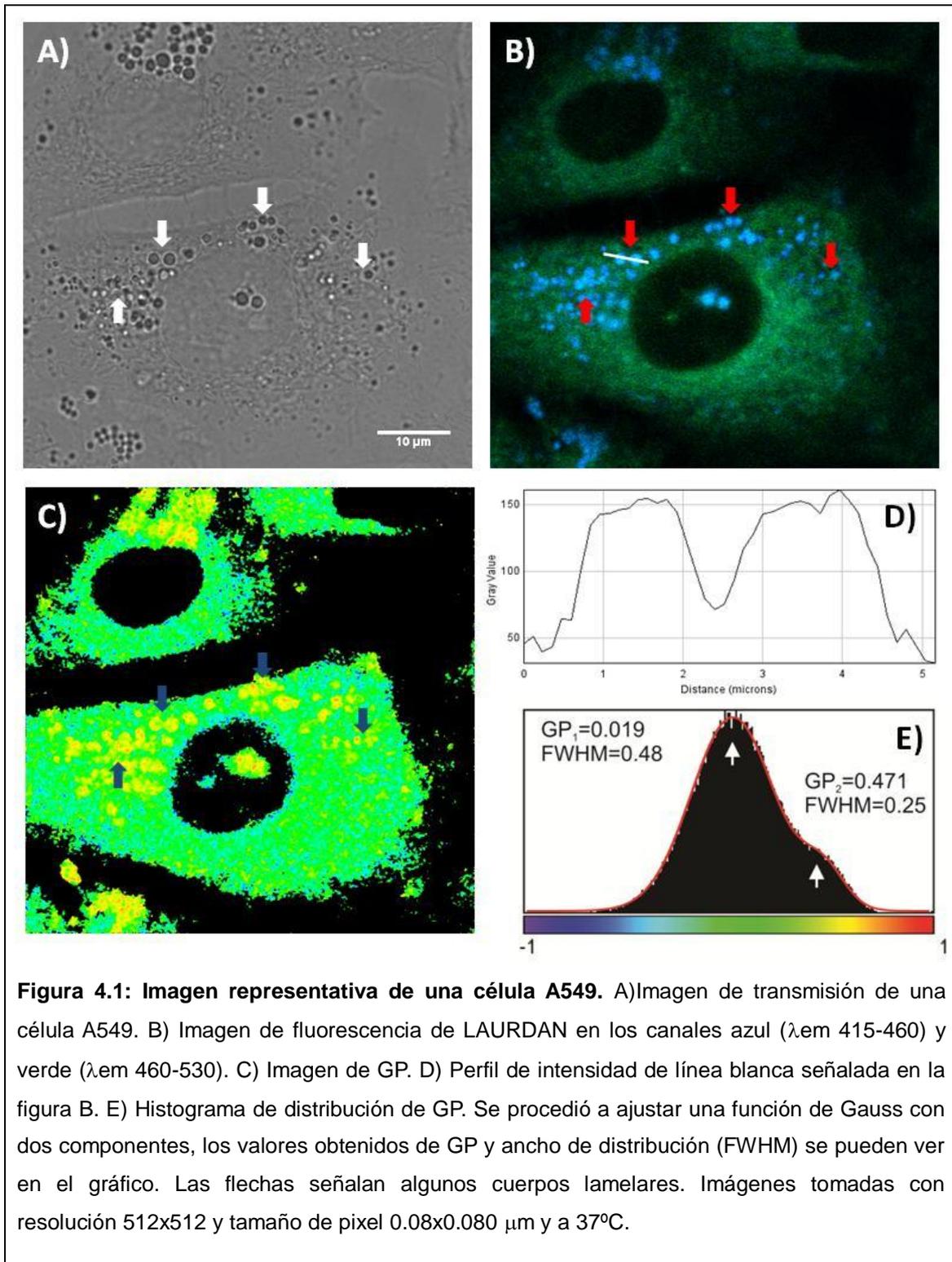


Figura 4.1: Imagen representativa de una célula A549. A) Imagen de transmisión de una célula A549. B) Imagen de fluorescencia de LAURDAN en los canales azul (λ_{em} 415-460) y verde (λ_{em} 460-530). C) Imagen de GP. D) Perfil de intensidad de línea blanca señalada en la figura B. E) Histograma de distribución de GP. Se procedió a ajustar una función de Gauss con dos componentes, los valores obtenidos de GP y ancho de distribución (FWHM) se pueden ver en el gráfico. Las flechas señalan algunos cuerpos lamelares. Imágenes tomadas con resolución 512x512 y tamaño de pixel 0.08x0.080 μm y a 37°C.

Las medidas de los diámetros de las vesículas intracelulares conciben con los valores esperados para los cuerpos lamelares, existiendo distribución

entre 0.5-2 μm y también una gran variabilidad en la cantidad que cada célula tiene (figura 4.1D) (Jaing-2010).

Pese a que las dimensiones y características estructurales son las esperadas para los cuerpos lamelares, esto no es argumento concluyente para afirmar que lo son. Por lo cual utilizamos otros sistemas de marcación para corroborar que las estructuras que identificamos son cuerpos lamelares. Siguiendo las recomendaciones de Haller y colaboradores, incubamos las células A549 con Lyso-Tracker red (LTR, Invitrogen, TM), sonda que se acumula en estructuras sub-celulares con pH bajo y Mito-Tracker red (Invitrogen, TM) sonda que se acumula en mitocondrias (Haller-1998). En ambos casos, a las mismas células se las incubó con LAURDAN intentando co-localizar las sondas.

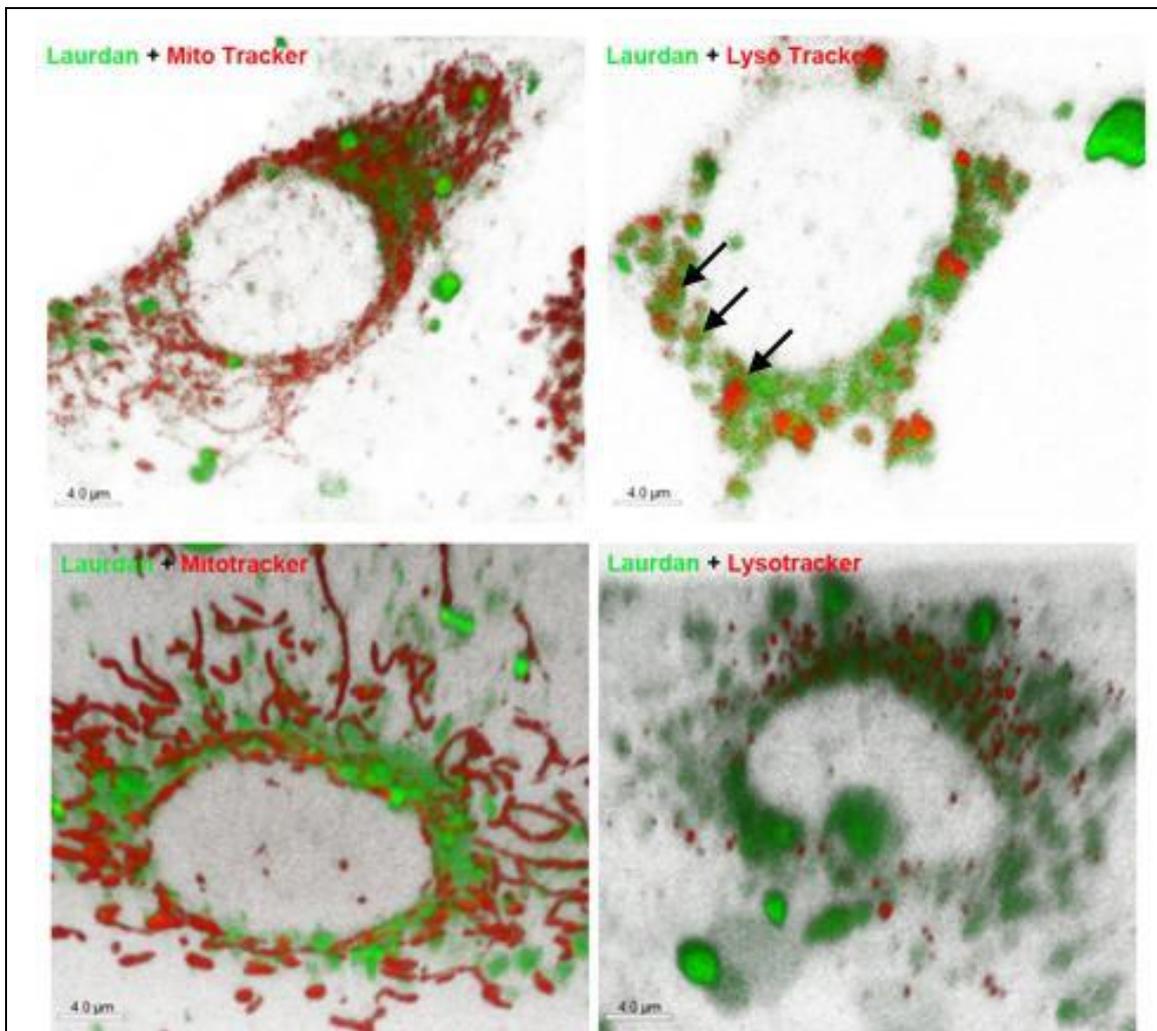


Figura 4.2: Render 3D de células A549 marcadas con LAURDAN+Mito-Tracker o LAURDAN+Lyso-Tracker. Las flechas muestran algunas estructuras que co-localizan para ambas marcas. Imagen realizada utilizando 3D VTK viewer del Icy v1.5.3.1

En la figura 4.2 puede verse una reconstitución 3D de dos células marcadas como se menciona anteriormente. Claramente la localización de las mitocondrias es completamente distinta a las señales del canal azul del LAURDAN, y cuando miramos el experimento con LysoTracker se observa que algunas estructuras parecen co-localizar (ver flechas en la imagen), sin embargo es posible ver muchas otras estructuras que no co-localizan, por lo cual resulta difícil poder ser convincente solamente con estas imágenes. Lamentablemente, no hemos podido realizar inmunofluorescencia para las proteínas específicas del surfactante pulmonar (experimentos que se encuentran en marcha). Pero resulta interesante poder discutir un poco más

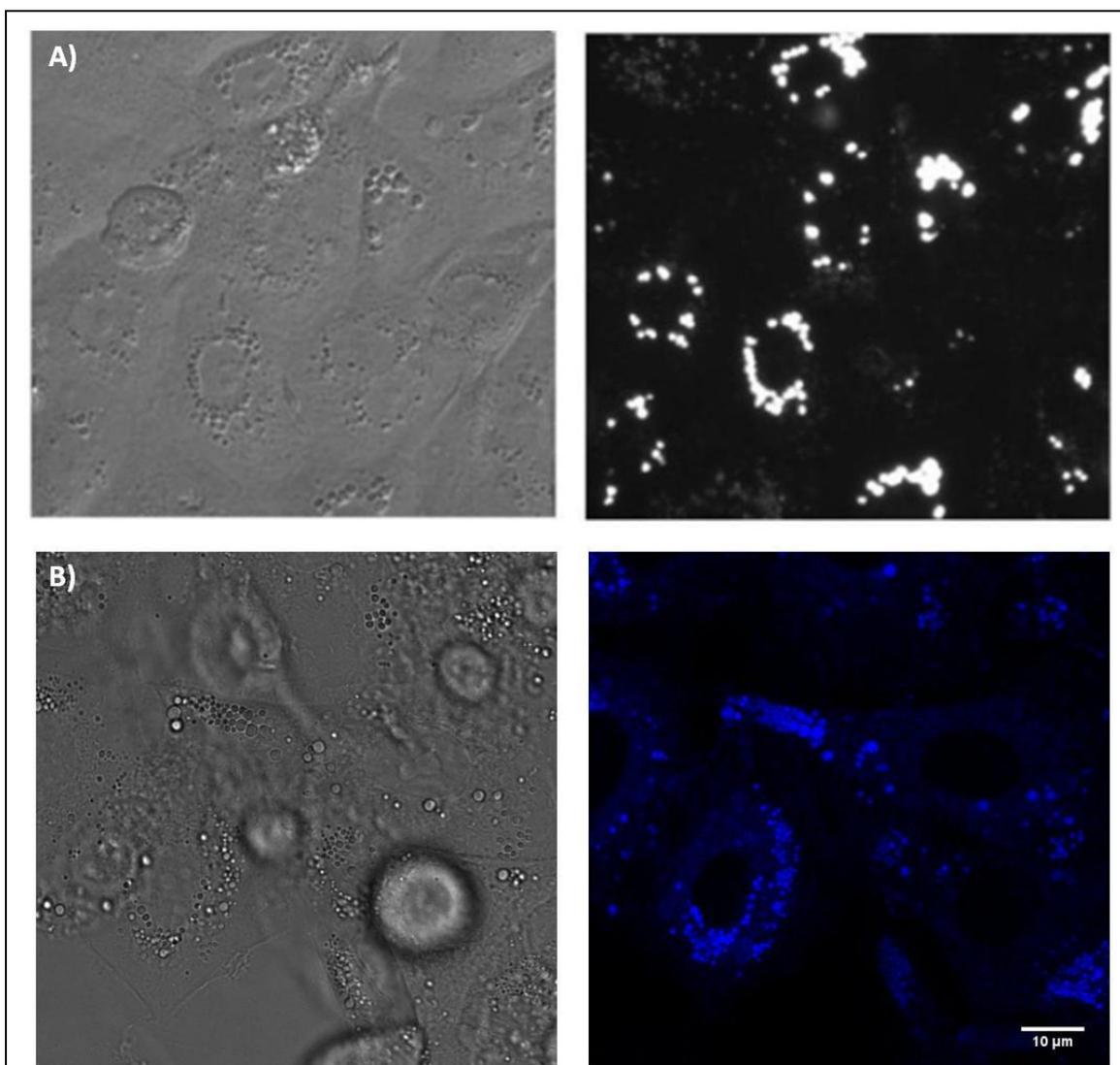


Figura 4.3: Identificación de cuerpos lamelares por LysoTracker-Green (LTG). A) Imágenes de transmisión y fluorescencia con LTG en células A549 tomadas de (Wemhöner-2011). B) Células de nuestros experimentos con LAURDAN (canal azul). La distribución perinuclear y el tamaño de los cuerpos lamelares similar cuando se comparan las imágenes.

acerca de los resultados que se obtuvieron con LAURDAN en la figura 4.1. Un dato a favor acerca de la hipótesis de que se trate de cuerpos lamelares es la enorme acumulación de la sonda y el estado de hidratación que hace que estas estructuras emitan mayoritariamente de una forma no relajada del LAURDAN. Como se discutió anteriormente, LAURDAN no censa pH, ni carga de los fosfolípidos, ni tampoco es soluble en entornos acuosos, por lo cual parece razonable pensar que estas estructuras sean cuerpos lamelares. En la figura 4.3A, puede verse una imagen de (Wemhöner-2011) y en la parte inferior una imagen nuestra, de transmisión, superpuesta al canal azul de LAURDAN (figura 4.3B). La similitud de las estructuras y distribución de las mismas en las células confirma que se trata de cuerpos lamelares.

Hasta el momento actual, no existe en la bibliografía en nuestro conocimiento, ningún reporte que caracterice la estructura y organización de los cuerpos lamelares con el uso de LAURDAN. Resulta interesante que la GP toma valores llamativamente elevados y posee una distribución bastante homogénea para los cuerpos lamelares (ver figura 4.4).

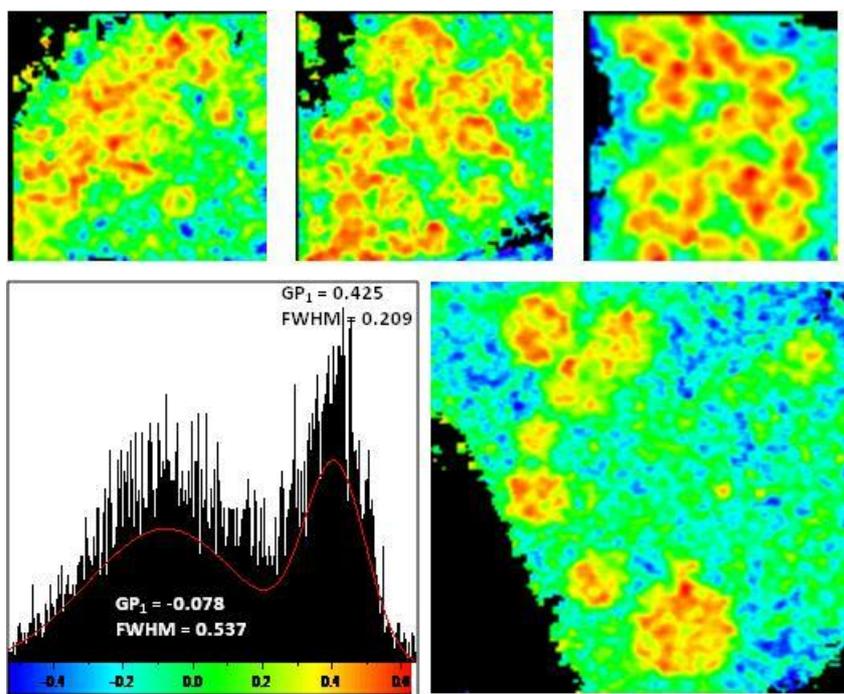
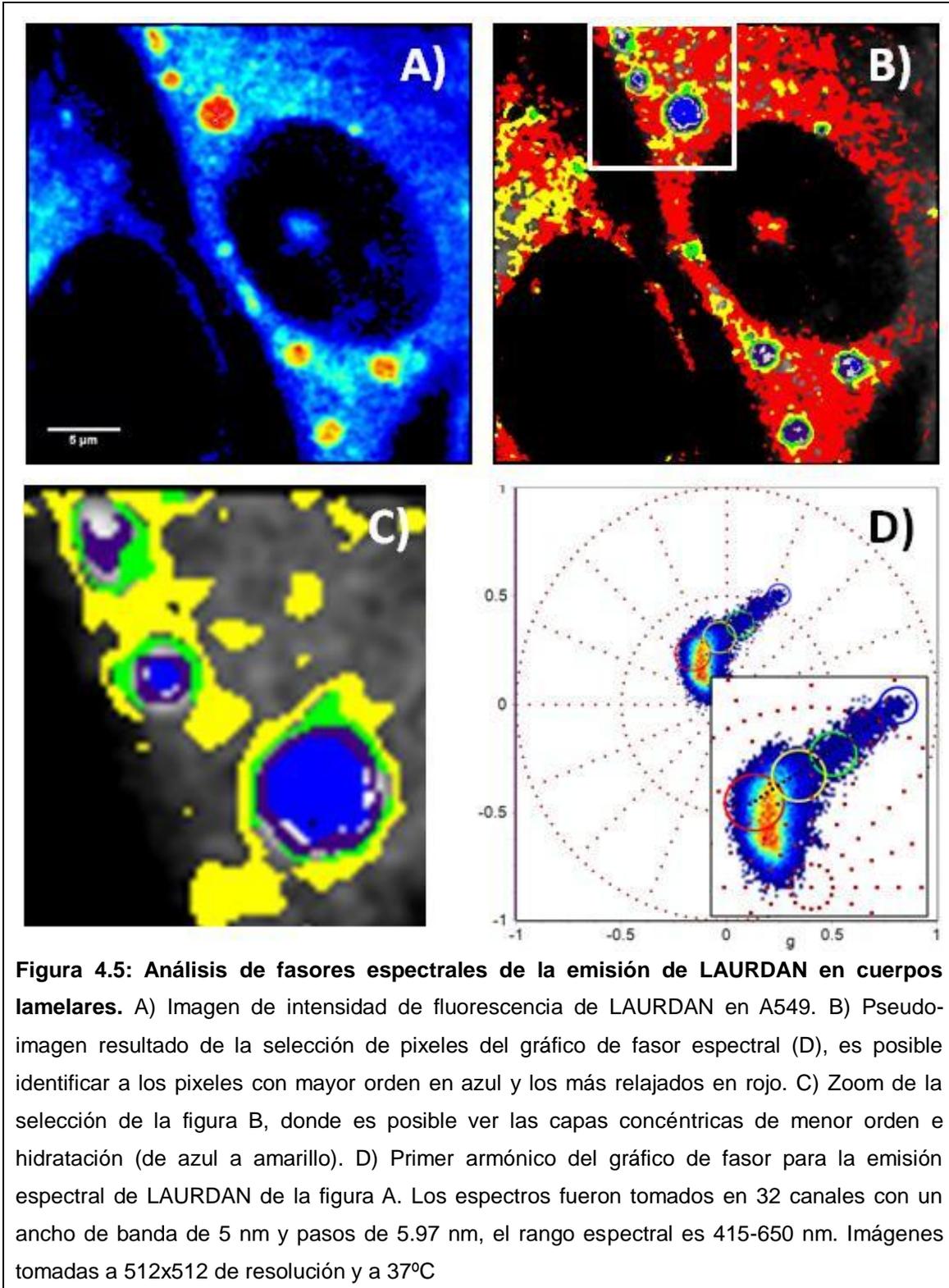


Figura 4.4: Imágenes de GP para una selección de cuerpos lamelares. Es posible identificar a los cuerpos lamelares como estructuras de GP alta (0.425 ± 0.03). En la parte inferior se puede ver el histograma de distribución para los valores de GP,

donde se observa que la distribución para los valores de GP altos presenta un ancho de campana menor. Las imágenes GP fueron obtenidas a partir del macro Generalized Polarization Analysis desarrollado por Jesper Søndergaard Hansen para ImageJ 1.48v. Imágenes tomadas con resolución 512x512 y a 37°C.

Para comprender mejor cómo se encuentran organizados los cuerpos lamelares, se planteó el uso de gráficos de fasores con una mejor descripción asociado a las propiedades que fueron descritas en el capítulo 1.

A continuación se presentan una serie de imágenes de cuerpos lamelares

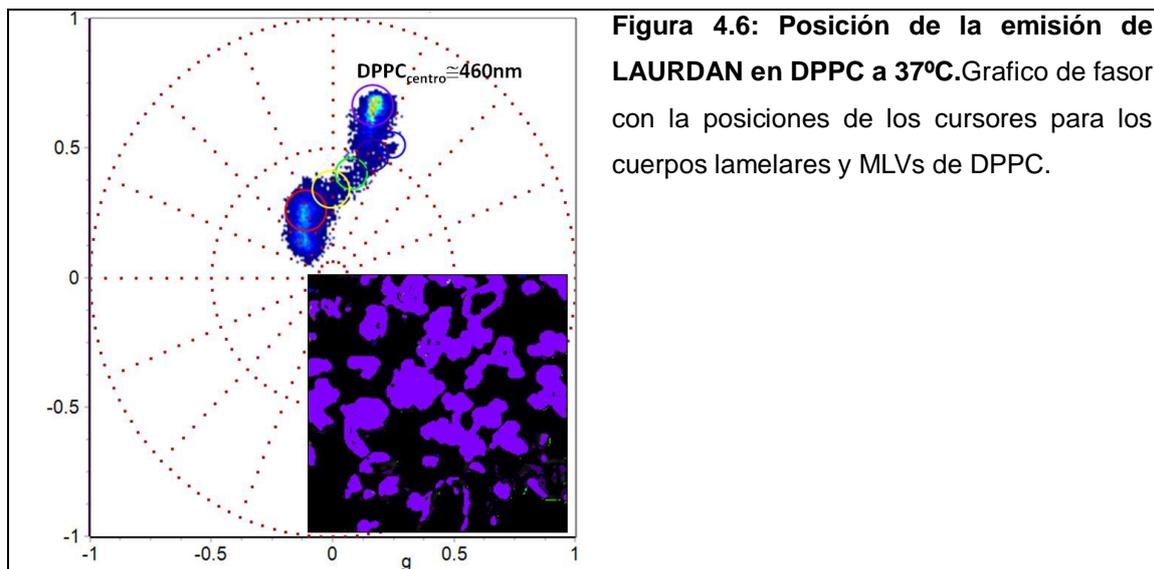


analizados por fasores espectrales.

Los resultados permiten identificar una trayectoria lineal entre los cursores azul y rojo (lo cual sustenta que se trata de la emisión de LAURDAN en lípidos). Los cuerpos lamelares presentan una estructura con capas concéntricas con diferente estado de orden e hidratación (cabe destacar que los experimentos fueron realizados con temperatura controlada a 37°C). El core de los cuerpos lamelares parece tener un espectro tipo gel o Lo y a medida que nos alejamos del centro se transforma en membranas con mayor coexistencia de Lo/Ld dado que se puede ver una proporción de los estados discretos de LAURDAN (rojo/azul, relajado/no-relajado).

Estos resultados concuerdan con los observados por el clásico análisis de GP, pero desafortunadamente no es posible utilizar las posiciones de los cursores que se utilizaron para las diferentes mezclas de GUVs, dado que la instrumentación es distinta y los rangos espectrales también. Por lo cual se evaluó la posición espectral de LAURDAN en vesículas multilamelares de DPPC a 37°C.

Como puede verse en la figura, el LAURDAN en DPPC presenta una emisión centrada alrededor de 460 nm (según los valores obtenidos en el capítulo 1, tabla 1.6), mientras el core de los cuerpos lamelares presenta un centro espectral corrido hacia el azul y con un mayor ancho espectral. Esto es interesante y podría deberse a la presencia de colesterol (membranas Lo), tal como sucede para las mezclas de DOPC:DPPC:Chol que corren su centro espectral de la fase Lo a longitudes de onda mayores, pero con un menor ancho espectral.



A continuación nos proponemos estudiar los efectos del sevoflurano sobre el orden y estructura de los cuerpos lamelares. Para incluir el sevoflurano en las células alveolares se utiliza la administración del anestésico diluido en DMSO (volumen final de solvente en medio menor a 0.5%) y se lo agrega al medio de cultivo 2h antes de iniciar el experimento, así como en el buffer Krebs-Ringer que se usa durante el experimento. Las dosis usadas fueron calculadas a partir de la concentración de lípidos de las células a confluencia y se utilizaron relaciones molares en el rango de 0-3 MAC.

En la figura 4.7A-C se ilustran tres imágenes representativas de 10 células independientes que se analizan conjuntamente en el gráfico de faser de la figura 4.7D. Se puede observar que la concentración de sevoflurano creciente, modifica la posición espectral de los pixeles, provocando que los cursores seleccionados para el sistema sin anestésico (figura 4.5) no puedan identificar la posición de los pixeles para estas imágenes. Cuando se selecciona nuevamente la posición de los cursores, teniendo en cuenta solamente las imágenes con sevoflurano, entonces puede verse el efecto contrario, o sea que ahora no es posible identificar los pixeles de las imágenes sin anestésico.

Es claro que el sevoflurano provoca un cambio espectral que se condice con la fluidificación de las membranas de los cuerpos lamelares, pudiéndose comprobar que estos organelos pueden actuar como reservorio de anestésico.

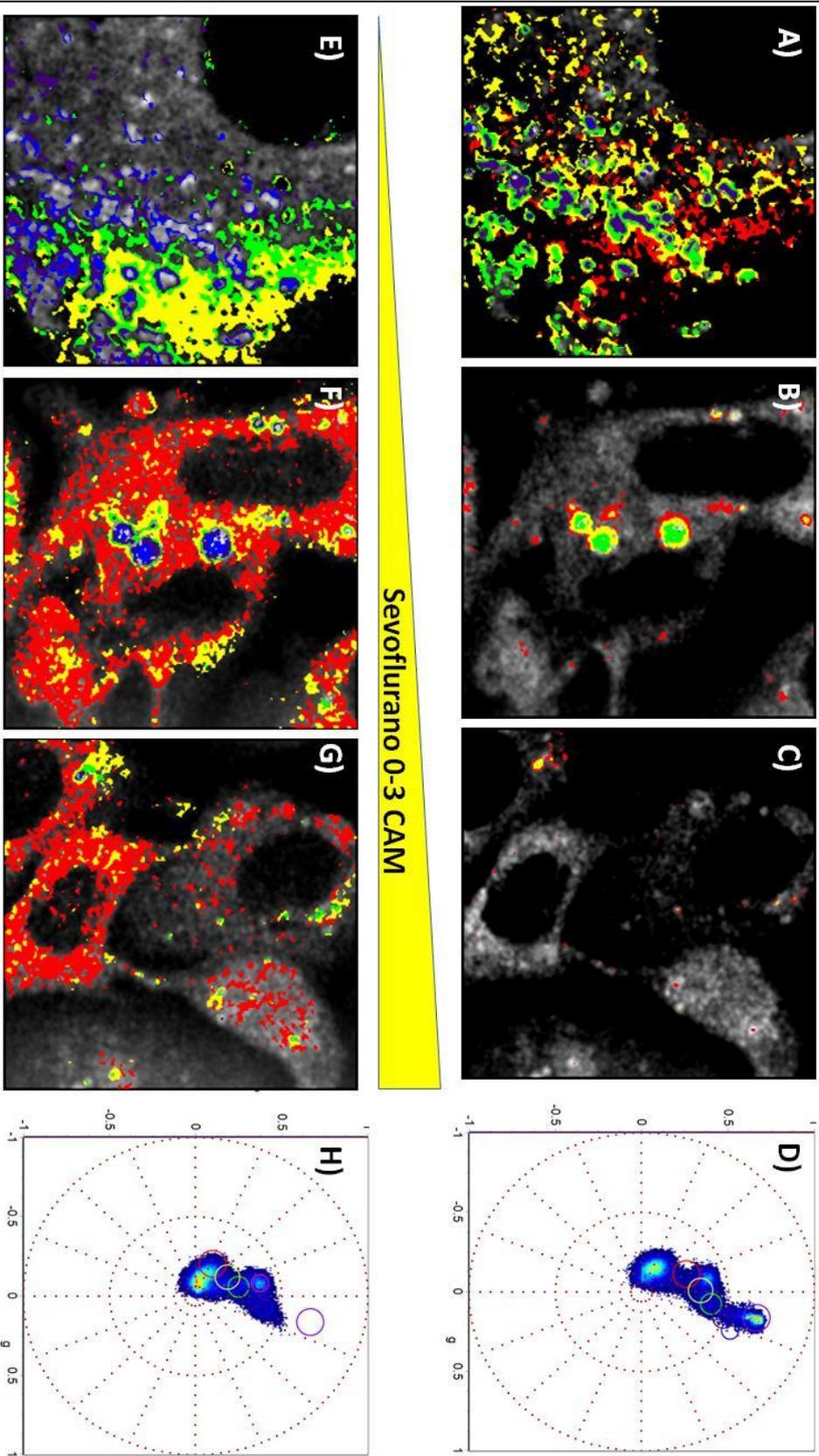


Figura 4.7: Imágenes representativas de células A 549 expuestas a sevoflurano. A-C) figuras generadas a partir de las posiciones espectrales de LAURDAN en diferentes entornos. De A a C se introduce un aumento en la concentración de anestésico (0-3 CAM). D) Como puede verse, los cursores son los seleccionados por las imágenes anteriores, pero el incremento en la concentración de anestésico produce un corrimiento espectral que hace necesario corregir la posición en los cursores para que se puedan volver a marcar las estructuras celulares. E-G) Misma serie de imágenes pero con una nueva selección de los cursores. Es posible ver que se trata de estructuras más fluidas. Los espectros fueron tomados en 32 canales con un ancho de banda de 5 nm y pasos de 5.97 nm, el rango espectral es 415-650 nm. Imágenes tomadas a 512x512 de resolución y a 37°C

Efecto del sevoflurano sobre las características supramoleculares y dinámicas del surfactante pulmonar: microscopía confocal de fluorescencia.

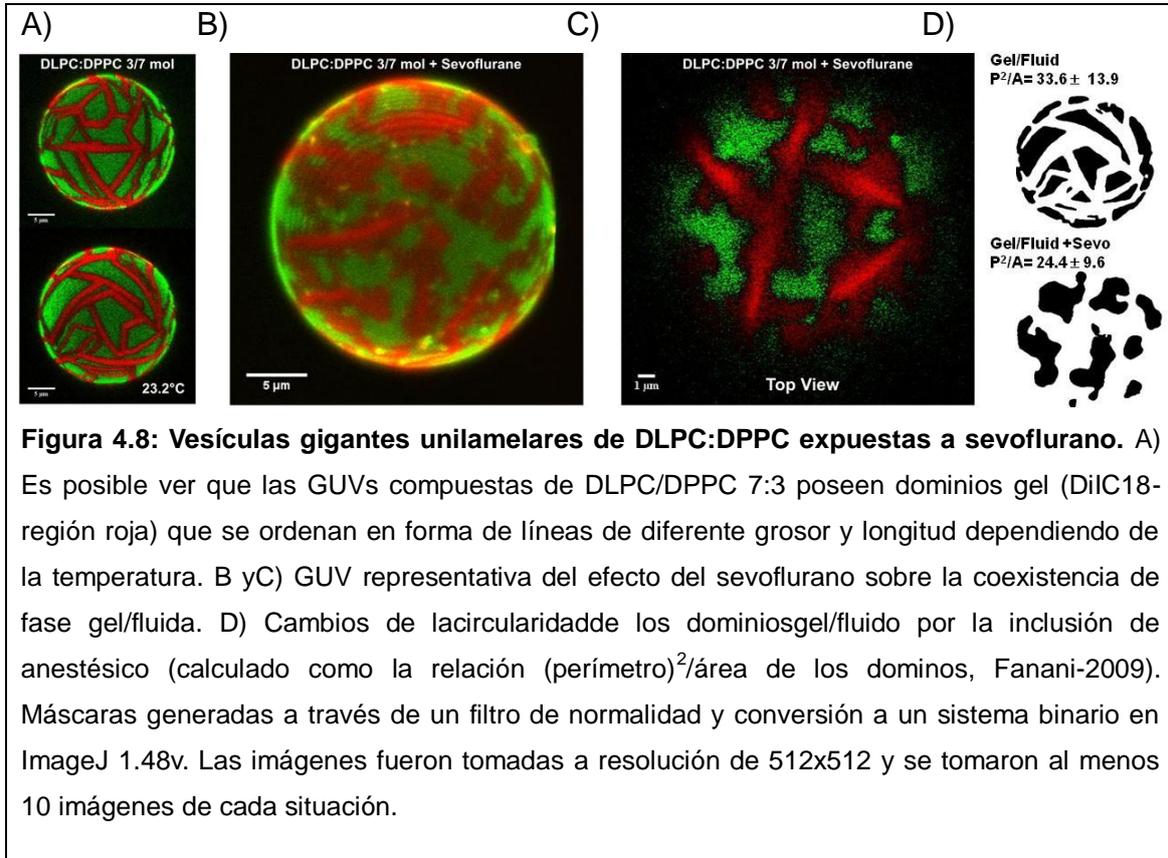
Iniciamos esta sección de experimentos estudiando los efectos del sevoflurano sobre la organización lateral de GUVs compuestas de una membrana con coexistencia de fase Gel/fluida (Fidorra-2009). La mezcla de DLPC:DPPC (dilauroilfosfatidilcolina/dipalmitoilfosfatidilcolina) ha sido caracterizada por diversos autores, pero particularmente Fidorra y colaboradores desarrollaron un método de procesamiento de imágenes que permitió caracterizar por primera vez un sistema de GUV aplicando la teoría de Lever en equilibrio termodinámico.

Pensamos entonces que este sistema bien caracterizado podrá ser útil para comprender inicialmente los efectos del anestésico en un sistema de membranas bien caracterizado, lo que posteriormente nos será útil para entender un sistema complejo como el surfactante pulmonar. Se utilizó un par de sondas fluorescentes que tienen reparto diferencial por fases gel o fluida de este sistema (DiIc18 y Bodipy-PC, respectivamente). Cabe aclarar que esta afinidad no es por el estado físico de la fase, sino por afinidad fisicoquímica, por lo cual no es extrapolable a otros sistemas y en cada caso debe de ser caracterizada para saber cuál es el reparto. La mezcla estaba compuesta por una proporción molar 7:3 (DLPC:DPPC) y posee una $T_m \sim 39.25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H \sim 22.57 \text{ kcal/mol}$ y $T_{1/2} \sim 2.3 \text{ }^\circ\text{C}$ (determinados por calorimetría diferencial de barrido).

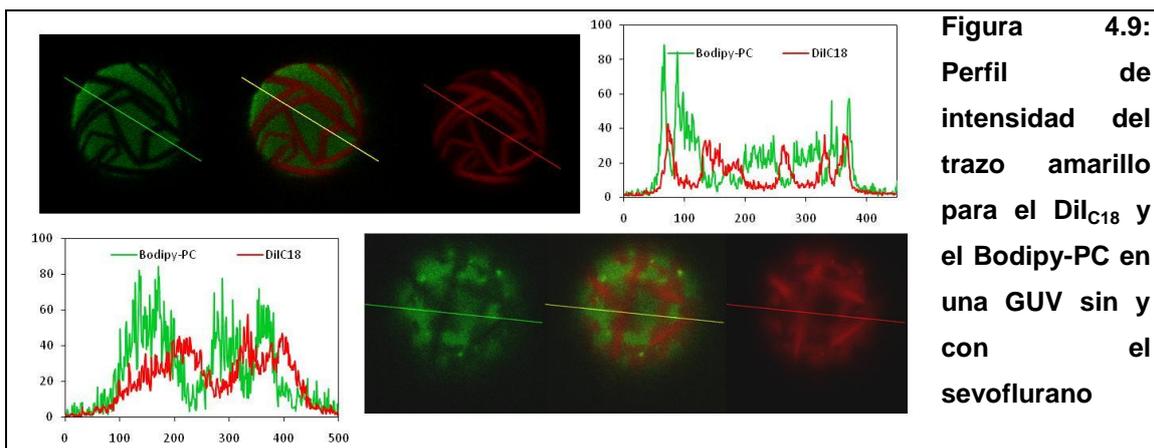
Para introducir el anestésico utilizamos la misma estrategia de los experimentos con células. Pero en este caso usamos dos procedimientos de administración: alta concentración-corto tiempo de exposición (3000/1 ratio molar sevoflurano/fosfolípido, 30 minutos) o baja concentración-largo tiempo de exposición (0.5 o 1.5 ratio molar sevoflurano/fosfolípido, 2 horas).

En la figura 4.8A se observa la estructura característica del sistema gel/fluido de las membranas de DLPC:DPPC, con líneas de fase gel (roja) con diferente ancho dependiendo de la temperatura y proporción de fosfolípidos de alto y bajo T_m . Estas estructuras, con líneas de tensión de alta energía en los límites de los dominios, son debido al mismatch hidrofóbico (diferencia entre

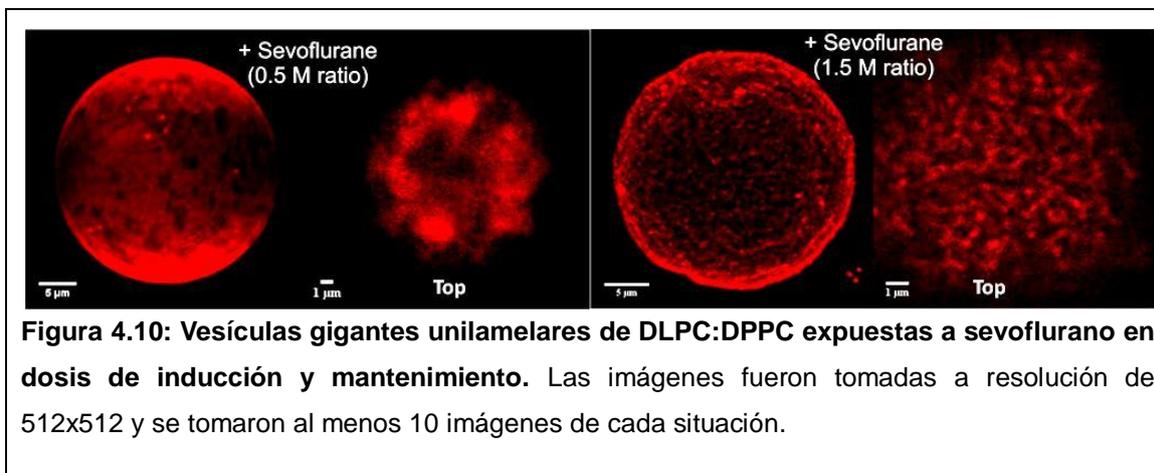
largo de cadenas entre la DLPC y DPPC, 4 carbonos). Cuando se administró sevoflurano por 30 minutos a alta concentración se observó que los límites de los dominios estaban alterados y un incremento en la miscibilidad de las fases puede ser propuesto (figura 4.8B y C).



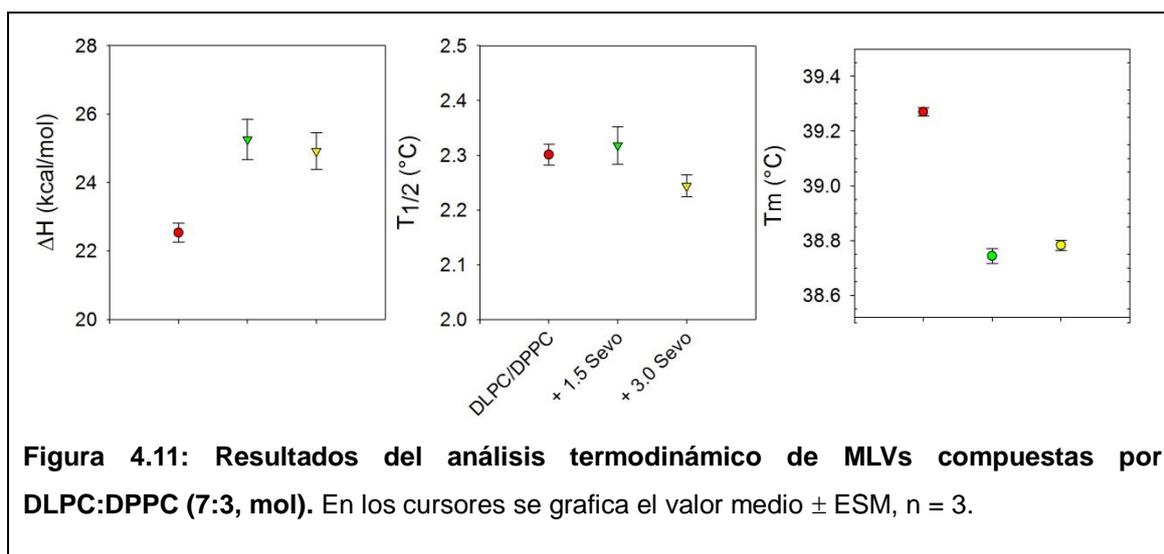
Para ver si efectivamente existe un cambio en la miscibilidad de las fases gel/fluida analizamos el perfil de intensidad de fluorescencia para un grupo de GUVs. Es posible observar que la intensidad de fluorescencia para ambas sondas se aprecia más solapada cuando el anestésico está presente en el sistema (figura 4.9).



Cuando se incuban por 2 h, a dosis de inducción y mantenimiento de la anestesia, se puede observar que existe una completa reorganización de las membranas, apareciendo dominios de membrana redondos, lo que sugiere la coexistencia de fases fluidas.



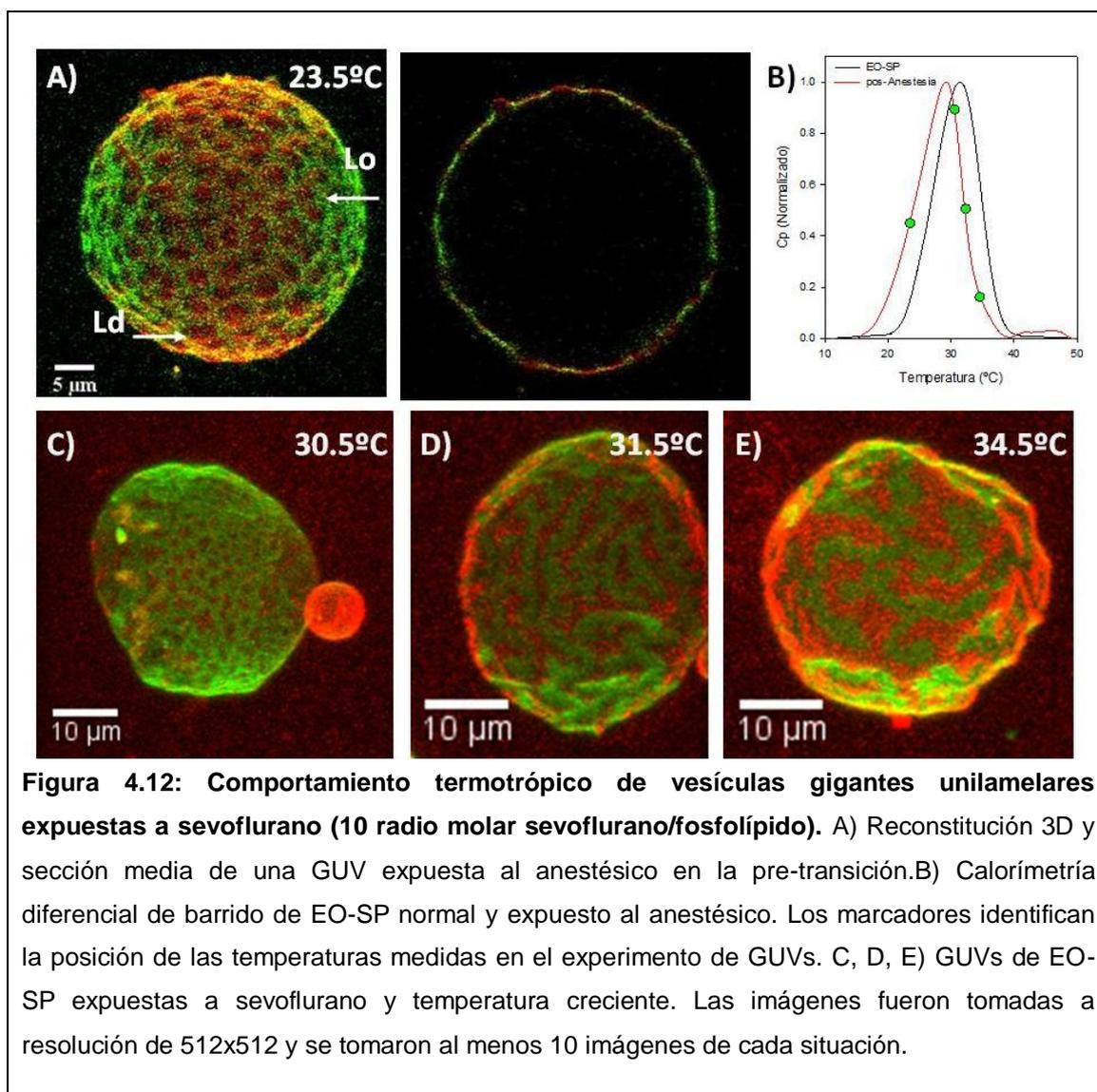
Por último, los parámetros termodinámicos del sistema mostraron que el anestésico fluidifica el sistema y disminuye la entalpía de transición.



Finalmente nos abocamos al estudio de los efectos del sevoflurano sobre la estructura supramolecular y dinámica del surfactante pulmonar. Para ello hemos utilizados dos métodos similares pero con diferencias sustanciales en la información que otorgan sobre las propiedades del sistema de estudio. Para el primer grupo de resultados se aplicó la misma aproximación que se usó anteriormente para las membranas con coexistencia de fases gel/fluida.

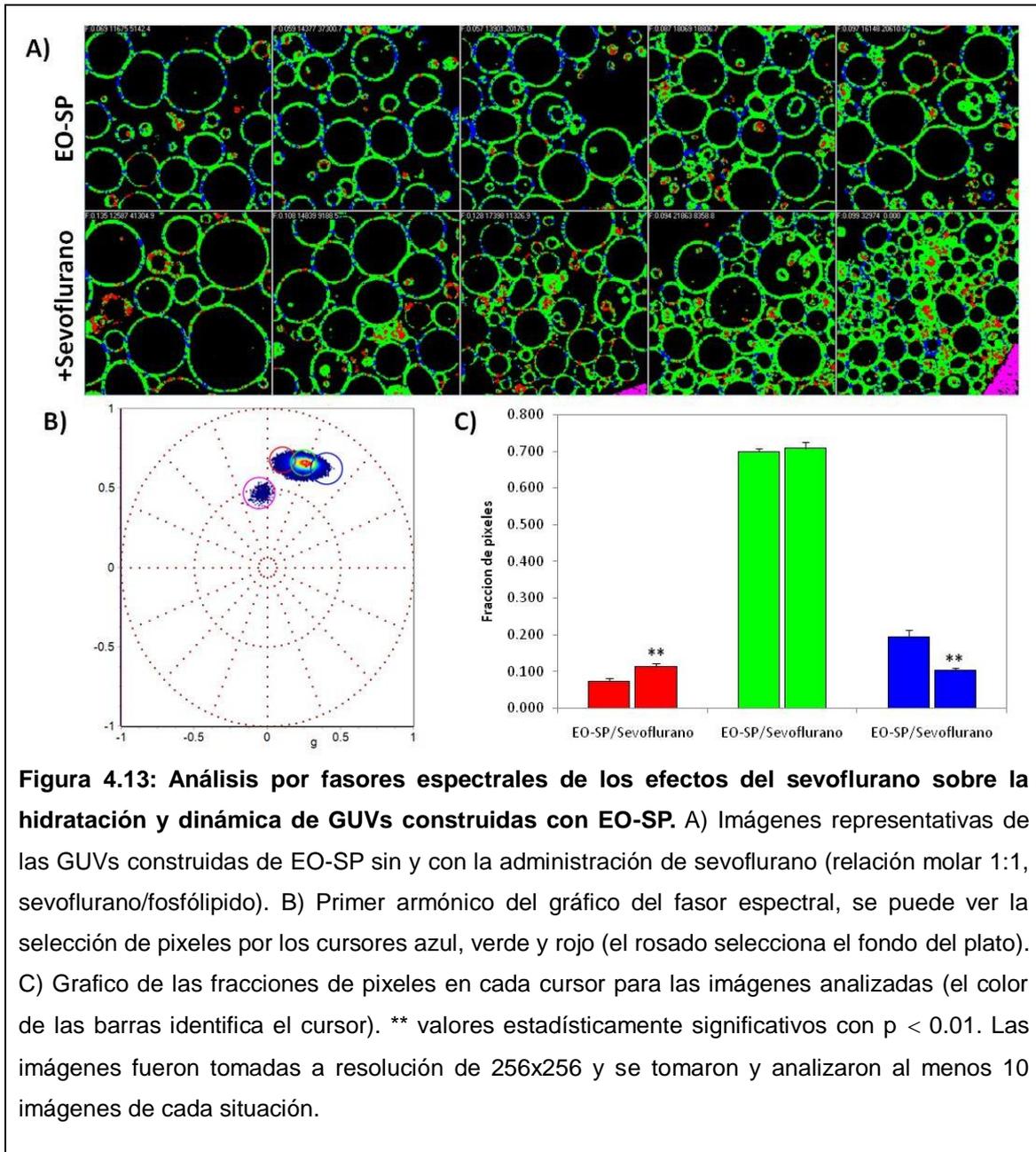
Mientras que para el estudio de las propiedades dinámicas del surfactante pulmonar expuesto al sevoflurano se utilizó microscopia confocal de dos-fotones con resolución espectral.

En la figura 4.12 se muestran imágenes representativas de GUVs construidas con EO-SP tras la exposición al sevoflurano (radio molar sevoflurano/fosfolípido=10) donde se observa se afecta el comportamiento termotrópico surfactante pulmonar normal (ver termogramas obtenidos por DSC, figura 4.12B). Las imágenes fueron obtenidas a diferente temperatura y se puede identificar en el termograma que para temperaturas mayores a ~ 28-29°C, la coexistencia de fases Lo/Ld se encuentra comprometida, además es posible ver que se pierde la estructura esférica de las GUVs cuando se pasa la T_m.



Usando la metodología desarrollada en el capítulo 1 (fasores espectrales), analizamos los efectos del sevoflurano sobre la organización de GUVs preparadas de EO-SP. Se utilizó una relación equimolar de anestésico/fosfolípido y se tomaron las imágenes a 24°C.

En la figura 4.13 puede observarse imágenes representativas de las GUVs con las máscaras de colores que se seleccionan a partir del gráfico del fasor espectral en el primer armónico. No es posible ver diferencias visuales muy significativas, aunque las GUVs que no fueron expuestas al anestésico presentan una mayor cantidad de píxeles seleccionados con el cursor azul. En la gráfica de la sección C, se puede ver las fracciones de píxeles para cada cursor en los dos grupos de imágenes. Un análisis estadístico mostró que la cantidad de píxeles seleccionados con los cursores rojo y azul son diferentes, el grupo con sevoflurano tiene mayor cantidad de píxeles seleccionados con el cursor rojo y menor número de píxeles azules cuando se compara con el grupo control. Estas diferencias, pese a ser sutiles, se asocian a un corrimiento espectral del LAURADN a longitud de onda mayores, lo que se condice con membranas más fluidas.



Discusión

Poco se sabe acerca del estado de organización sub-celular de las membranas que componen al cuerpo lamelar. Mas allá de los estudios que demuestran que en una interfase aire/agua los cuerpos lamelares se adsorben rápidamente formando una monocapa con fases L_E/L_C (Ravasio-2010), no conocemos ningún estudio que aborde el problema intracelularmente.

Valiéndonos de las propiedades que LAURDAN tiene para estudiar el estado de orden e hidratación de las membranas, nos planteamos poder comprender en primera instancia cuál es el estado fisicoquímico de los cuerpos lamelares intracelulares y si son capaces de acumular anestésico en su interior durante la anestesia.

Pensamos que las estructuras que estamos observando son cuerpos lamelares (la cual pensamos corroborar por inmunofluorescencia con anticuerpos contra pro-SP-B) y pese a que no tenemos resultados completamente concluyentes en el uso de sondas de afinidad por estructuras subcelulares acídicas, el tamaño, la gran acumulación de LAURDAN y el comportamiento lineal que presenta la emisión de LAURDAN en dichas estructuras hace pensar con certeza que se trata de cuerpos lamelares. Una posibilidad es que se trate de gotas de grasa (lipid droplets), pero si fuera el caso, creemos que el comportamiento de la emisión de LAURDAN debería de ser distinto. En ese caso no se debería observar una relación lineal y es posible que la totalidad del organelo tuviera el mismo entorno para LAURDAN (elemento que no se ve en los fasores espectrales, así como tampoco en el cálculo de GP).

Pasando a la discusión de cómo están organizadas estas estructuras (de ahora en adelante las llamaremos cuerpos lamelares) y qué tipo de orden de membrana poseen, es posible ver que presentan unos valores de GP elevados que concuerdan con membranas en fase L_d de surfactante pulmonar (y algunas fases gel también). Tal como se reportara en trabajos previos, el surfactante pulmonar posee un orden lateral de membranas con coexistencia L_o/L_d (Bernardino de la Serna-2004, -2009). Los valores calculados para las membranas internas de los cuerpos lamelares coinciden correctamente con los

reportados en 2009 por estos autores para el surfactante pulmonar nativo. Sin embargo, resulta interesante ver que la distribución de valores de GP para estas estructuras es muy baja y que mayoritariamente el interior de los cuerpos lamelares estaría compuesto por membranas tipo Lo.

Cuando se compara estos resultados con los obtenidos por el análisis de fasores espectrales, podemos ver que coinciden correctamente y además este método permite identificar capas de diferente estado de relajación para el LAURDAN. Esto significa que muy posiblemente la estructura interna del cuerpo lamelar tenga valores restringidos de agua y que las capas más cercanas al exterior se encuentren en un estado más hidratado y más cercano a una fase Ld.

Pese a la concordancia de estos resultados resulta importante hacer algunas precisiones sobre el análisis de estos resultados, dado el tipo de laser usado para la excitación. Como se introdujera en el capítulo 1, el LAURDAN en membranas en su estado basal, presenta dos poblaciones de la sonda dependiendo de la polaridad del entorno. La banda de excitación en el rojo se correlaciona con un estado basal estabilizado por los dipolos presentes en el entorno del LAURDAN. Cuando se usa un laser UV (λ_{ex} 405 nm) preferentemente estamos seleccionando a esta población de moléculas de LAURDAN con un estado basal característico y que se relacionan con un espectro de emisión muy corrido al azul. Eso no es del todo considerado en la bibliografía y en los últimos años han empezado a aparecer reportes con el uso de laser UV para trabajar con LAURDAN, lo cual no es un problema, más allá del foto-apagamiento que la sonda puede sufrir, sin considerar esta característica de la sonda y entonces requiere ser cautelosos con el análisis de nuestros resultados.

Siguiendo adelante con la discusión, resulta interesante que dado la imposibilidad de usar los sistemas de cursores que habíamos optimizado con las GUV de mezclas ternarias (capítulo 1), cuando analizamos la posición espectral de LAURDAN en MLVs de DPPC (en fase gel a 37°C) la posición espectral de los cuerpos lamelares es muy cercana a la de la DPPC pero con un mayor ancho espectral. Esto podría deberse a otros entornos de LAURDAN con diferente relajación dipolar (por ejemplo proteínas), sin embargo en ensayos preliminares que no se muestran en esta tesis, no hemos visto

cambios significativos por pH y concentración de proteína en la posición del fasor espectral de LAURDAN en DPPC. Pensamos que, tal como sucede con las mezclas ternarias de DOPC:DPPC:Chol, el colesterol produce un cambio en el entorno de LAURDAN; en este caso la fase Ld tiene una posición espectral más al azul que la fase gel de DPPC.

Cuando incubamos con el anestésico a las células A549, vemos que el mismo produce un corrimiento espectral hacia el rojo tal como lo habíamos demostrado anteriormente para el EO-SP (figura 3.6 del capítulo anterior). Esto significa que el anestésico ingresa al organelo dada su gran lipofílicidad y modifica la dinámica de agua, asociado a los cambios físicos que el anestésico produce en membranas.

Este resultado da gran sustento al estado hipoxémico mantenido posanestesia por los pacientes hasta 24 h después del periodo operatorio. Y además, permite expandir el esquema que propusiésemos en la figura 6 de Malacrida y colaboradores (Malacrida-2014), incluyendo una inhibición de surfactante pulmonar intracelular previo a su liberación.

El estudio sobre las alteraciones supramoleculares del sevoflurano en membranas modelo y surfactante pulmonar, mostró que el anestésico afecta la organización lateral de sistemas simples, cambiando la miscibilidad de las membranas.

Esto concuerda con los resultados de difracción de ángulo bajo de Weinrich y colaboradores, donde en un sistema binario igual al que utilizamos para este trabajo y mezclas ternarias, mostraron un aumento de la miscibilidad de los lípidos con diferente largo de cadena (DLPC, DPPC) (Weinrich-2012, -2013). También está en línea con los resultados que soportan la disminución de la temperatura crítica para la miscibilidad de membranas con fase Lo/Ld (Gray-2013).

Sin embargo, pensamos que el aporte más significativo de estos resultados radica en la posibilidad de que el anestésico puede transformar una membrana con fase gel/fluida en una membrana con coexistencias de fase líquida (Lo/Ld). Esto se desprende del análisis de circularidad de los dominios y la identificación final de dominios redondos en las membranas que fueron expuestas por largo tiempo al anestésico.

El parámetro P^2/A permite calcular la circularidad de una forma determinada y cuando ésta es circular su valor se acerca a 4π , mientras que si se aleja de la misma toma valores mayores a éste (Fanani-2008). Para nuestro caso, si consideramos en parte el error de aplanar una hemi-vesícula y calculamos este valor, vemos, como era de esperar, que las membranas con fase gel/fluida tiene un elevado valor P^2/A , mientras que al incluir el anestésico este valor disminuye. Pensamos que este es un punto en el recorrido hasta alcanzar el nuevo equilibrio termodinámico que se parece a una membrana Lo/Ld.

Cuando analizamos el efecto sobre las vesículas de EO-SP, vemos que disminuye la temperatura de melting (hecho que ya habíamos documentado), esto hace que sufra una prematura transición de fase que imposibilite el correcto funcionamiento. En una elegante revisión, Cañadas y Casals revisan el estado de conocimiento sobre la relevancia de la coexistencia de fases Lo/Ld para el surfactante pulmonar en su funcionamiento (Cañadas-Casals-2012). Resulta claro entonces que los efectos que los anestésicos inhalatorios producen sobre la función pulmonar, tienen su explicación molecular en la afectación supramolecular del surfactante pulmonar que conlleva a su inhibición tensoactiva.

Por último, es posible plantear que los resultados que se muestran en la figura 4.13, se correlacionen con un cambio en la función lipoproteica del surfactante pulmonar y todo lo que esto implica en la organización de estructuras no lamelares, transporte de gases y el funcionamiento correcto del sistema. Lamentablemente no hemos podido incluir parte de los resultados obtenidos durante la pasantía por el Laboratorio del Prof. Gratton (estos experimentos son también una colaboración con el Prof. Jesús Pérez-Gil) que abordan el estudio de las interacciones lípido-proteína y proteína-proteína con espectroscopia de cross-correlación, debido a diferentes dificultades y que algunos de ellos son ensayos preliminares que necesitan mayor profundidad en el análisis. Sin embargo, quisiera poder mencionar que los primeros análisis que determinan la constante de difusión y oligomerización de la SP-B en presencia de sevoflurano (hecho nunca reportado hasta el momento), indican que éste afecta la oligomerización de la SP-B y disminuye la constante de difusión en un orden de magnitud.

Conclusiones y Perspectivas

De manera de organizar mejor los diferentes grupos de resultados presentados en los cuatro capítulos anteriores, nos parece pertinente hacer una conclusión capítulo por capítulo y posteriormente una consideración global de los alcances de la tesis.

1) Los gráficos de fasores en el tiempo de vida y en estado estacionario, han demostrado poseer gran potencia para estudiar sistemas de membranas modelo y nativas. Parte de esta excelente performance se debe a la utilización de las propiedades de vectores y el espacio de la transformación de Fourier. Pensamos que este trabajo muestra el desarrollo y validación de los métodos para sistemas de membrana que no era del todo claro en el pasado y creemos que en el futuro reciente puedan transformarse en métodos de gran valor para el estudio de sistemas nativos. Claramente, los resultados en microscopía otorgan una nueva dimensión al uso de estas herramientas y que en ningún punto de vista intentan competir con los clásicos métodos de GP u otros, sino que por el contrario, es posible extraer lo mejor de cada uno de ellos para lograr un mejor análisis de los resultados de LAURDAN en membranas celulares. Resulta evidente luego de finalizada la tesis, la relevancia que ha tenido el desarrollo de estas tecnologías para lograr la mejor comprensión de los complejos efectos de sevoflurano en membranas in vitro, in vivo y ex vivo. Esperamos prontamente poder publicar los resultados de esta sección, dado que ya se encuentran en etapa final de evaluación para ser enviado a la revista *Methods and Applications in Fluorescence*.

2) Los resultados de este capítulo sentaron las bases de nuestra área de trabajo en el país y han permitido el desarrollo de múltiples espacios de colaboración. Básicamente, hemos podido demostrar por primera vez que los anestésicos inhalatorios de uso rutinario en la práctica clínica tienen la potencialidad de dañar la función pulmonar a partir de un efecto sobre la actividad y composición del surfactante pulmonar. Queda claro que existe un efecto dual de corto y largo plazo que la anestesia con ventilación mecánica puede producir sobre la función del surfactante. Es probable, y luego de los argumentos demostrados en esta tesis aún más, que el esquema de inhibición

que proponemos para el anestésico y el surfactante pulmonar en nuestro trabajo (Malacrida-2014), se acerque con exactitud a la línea de eventos que pueden suceder durante la anestesia en el pulmón. Pensamos que será necesario evaluar con mayor precisión y nuevos abordajes los efectos celulares e inflamatorios que el modelo puede tener, pero resulta claro que la acumulación de liso-PC y la alteración de la capacidad tensoactiva, permiten explicar con exactitud el colapso alveolar que se encontró en los animales de experimentación y pacientes pos-anestesia. El colapso se relaciona de manera directa con la inhomogeneidad en la ventilación/perfusión, explicando los eventos de hipoxemia. Pero no podemos dejar de lado dos aspectos trascendentales a la luz de los resultados aquí antes mencionados. El primero radica en la posibilidad de que parte de la hipoxemia que los pacientes sufren durante la anestesia con ventilación mecánica sea alteración de la difusión de gases en la interfase alveolar. Claramente la organización del surfactante pulmonar es un hecho claro en esto y los anestésicos pueden generar este tipo de alteraciones, como se demuestra en esta tesis. La segunda es que los mecanismos de apertura de los sacos alveolares a partir de inclusión de presiones al final de la inspiración o aumento de la presión meseta, no logran mantener el pulmón abierto una vez que el protocolo es finalizado. Esto pensamos es debido a la alteración o inestabilidad alveolar, debido a la afectación del surfactante pulmonar por la anestesia. Esto no quiere decir, desde ningún punto de vista, que el uso de los gases anestésicos pueda ponerse en juicio por este problema, sino que por el contrario, más investigación relacionada a alternativas y mejor manejo de la ventilación mecánica o terapias suplementarias de surfactante pulmonar podrían contribuir a paliar los efectos deletéreos que los anestésicos demostraron tener sobre la composición y función del surfactante pulmonar.

3) La afectación funcional del surfactante pulmonar permite relacionar los efectos fisiopatológicos de la función pulmonar durante el uso de los anestésicos inhalatorios, con aspectos estructurales y funcionales de la inestabilidad alveolar y la mecánica pulmonar. Sin embargo nada nos dice de cuáles son los mecanismos moleculares que permiten explicar el evento. En esta sección hemos vinculado aspectos funcionales con ensayos de termodinámica clásica y espectroscopia moderna, para intentar comprender

mejor los mecanismos moleculares de la afectación del surfactante pulmonar durante la anestesia inhalatoria (y porqué no, de la teoría de la anestesia). En base a los experimentos de DSC y fluorescencia podemos concluir que el sevoflurano al incluirse en la membranas del surfactante pulmonar afecta las fuerzas de interacción lípido-lípido (sin dejar de lado interacciones lípido-proteína), a través de alterar las propiedades dieléctricas e hidroestáticas en la interfase de las membranas, provocando una alteración en las fuerzas de interacción transeccional que determina su incapacidad funcional. Los experimentos con anisotropía de DPH y la función GP de LAURDAN (nuevo grafico GP vs r para aproximarnos a la evaluación del perfil lateral de presión), permiten proponer que las fuerzas de la sección transmembrana se ven afectadas por la inclusión del anestésico, mayoritariamente por un efecto de hidratación y electroestática de la interfase. Esto produce un re-arreglo del core de la membrana para compensar el cambio en las repulsiones electroestáticas. El grafico GP vs r, pensamos que permite aproximarnos experimentalmente a la teoría de la presión lateral de membranas y entra en una discusión valedera sobre los efectos de los anestésicos en membrana sin antecedentes hasta ahora. Los resultados permiten en parte explicar el mecanismo por el cual se afecta la capacidad tensoactiva, el cual creemos se produce a partir de modificar las propiedades fisicoquímicas de las membranas que impiden el correcto compactamiento y disminución de la tensión. Lo que parece suceder es el colapso prematuro de la interfase aire/surfactante y es probable que la formación de estructuras no lamelares pueda estar comprometida. Resta por comprender cómo es afectado el proceso de inclusión/exclusión de material tensoactivo de la interfase alveolar, para lo cual seguramente la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (^{31}P) y la difracción de rayos X de ángulo bajo seguramente otorgarán claridad al proceso.

Nuestros resultados en parte exceden al modelo del surfactante pulmonar, debido a que, por ejemplo, el apartamiento de la teoría termodinámica de la anestesia permite plantear que cuando las membranas poseen mezclas con elevado contenido de colesterol, los anestésicos pueden afectar no solamente a las fases Ld sino también en parte a las fases Lo. Por otro lado, los resultados en CBS son extrapolables en parte, a lo que sucede en los botones sinápticos, donde la formación de estructuras no lamelares es

elemento imprescindible para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central. Nuestro resultado está en línea con el hallado por otros autores (Nguyen-2009) permite proponer que los anestésicos potencian la función de vesículas en una interfase, lo cual modifica los procesos de liberación y recaptación de neurotransmisores.

4) En este capítulo hemos podido describir por primera vez el efecto de los anestésicos inhalatorios sobre los cuerpos lamelares y membranas estudiadas por GUVS. Además, hemos dado una descripción de la organización de las membranas de los cuerpos lamelares, valiéndonos de los desarrollos metodológicos que esta tesis ha aportado y las propiedades espectroscópicas de LAURDAN. Los cuerpos lamelares parecen ser estructuras con membranas muy compactadas y escasa actividad de agua (más experimentos usando PRODAN podrían ser interesantes dado el alto reparto que tiene por agua), que además se organizan en formas de esferas de hidratación y que potencialmente puede ser explicado a través de la disminución de la entropía del sistema.

Parece claro que al incluir anestésico en los alveolos éste se acumula en los cuerpos lamelares, por lo cual el efecto no solamente será sobre el que se encuentra en la interfase alveolar, sino que además es posible que el surfactante recién secretado y los reservorios en la hipofase (cuerpos lamelares y mielina tubular) puedan ser afectados por el anestésico. Es claro que la desorganización de estas estructuras afectará su funcionalidad y más experimentación será necesaria para comprender la mecánica del proceso.

Por otro lado, los ensayos con GUVs nos permiten decir que no solo se afectan las propiedades fisicoquímicas de los lípidos y proteínas donde el anestésico se encuentre, sino que las organizaciones supramoleculares como los dominios de membranas también se ven afectados, siendo claves en procesos funcionales del surfactante pulmonar como la señalización celular, por ejemplo. Los experimentos demuestran que los re-arreglos de hidratación y viscosidad comprometen desde la escala atómica-molecular (hidratación de un fosfolípido) a toda una organización celular. En el contexto del surfactante pulmonar, estos resultados demuestran el estrecho vínculo entre la funcionalidad y el orden lateral de membranas aunque claramente mucho más resta por comprender sobre los aspectos de la interacción proteína-lípido.

Finalmente, creemos que esta tesis tal como su título lo ejemplifica, ha realizado un camino desde los aspectos funcionales del pulmón a los detalles moleculares y biofísicos que el sevoflurano provoca sobre el surfactante pulmonar. Pensamos que ha contribuido humildemente al estado del conocimiento sobre los efectos de los anestésicos sobre el pulmón y los sistemas de membrana en general. Lo más importante pensamos es hacer el camino inverso y tratar de correlacionar los detalles más precisos de nuestros resultados sobre la función final del pulmón. Seguramente en el futuro no tan lejano, podremos comprender, con el advenimiento de nueva tecnología como la fluorescencia in vivo de especies con autofluorescencia, cómo esto sucede in vivo y dentro del pulmón. Me gustaría poder finalizar tal como el Profesor Píriz siempre nos enseñase *“No existen temas agotados, sino investigadores agotados sobre los temas”*.

Bibliografía

- A theoretical study of diffusional transport over the alveolar surfactant layer. Aberg C, Sparr E, Larsson M, Wennerström H. *J R Soc Interface*. 2010 Oct 6;7(51):1403-10.
- Adebiyi A, Soni H, John TA, Yang F. Lipid rafts are required for signal transduction by angiotensin II receptor type 1 in neonatal glomerular mesangial cells. *Exp Cell Res*. 2014 May 15;324(1):92-104.
- Agarwal SR, Yang PC, Rice M, Singer CA, Nikolaev VO, Lohse MJ, Clancy CE, Harvey RD. Role of membrane microdomains in compartmentation of cAMP signaling. *PLoS One*. 2014 Apr 21;9(4):e95835.
- Aguilar LF, Pino JA, Soto-Arriaza MA, Cuevas FJ, Sánchez S, Sotomayor CP. Differential dynamic and structural behavior of lipid-cholesterol domains in model membranes. *PLoS One*. 2012;7(6):e40254.
- 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.
- Angelova M.I., Dimitrov D.S. Liposome electroformation, *Faraday Discuss, Chem. Soc.* 1986; 81: 303–311.
- Arbibe L, Koumanov K, Vial D, Rougeot C, Faure G, Havet N, et al. Generation of lysophospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase A2 and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A2 protein interaction. *J Clin Invest* 1998;6:1152e60.
- 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.
- Bachofen, H., Gerber, U., Gehr, P., Amrein, M. and Schurch, S. (2005). "Structures of pulmonary surfactant films adsorbed to an air-liquid interface in vitro." *Biochim Biophys Acta* 1720(1-2): 59-72.
- Bagatolli LA, Gratton E, Fidelio GD (1998) Water dynamics in glycosphingolipid aggregates studied by LAURDAN fluorescence. *Biophys J* 75(1):331–341
- Bagatolli LA, Parasassi T, Fidelio GD, Gratton E (1999a) A model for the interaction of 6-lauroyl-2-n, n-dimethylamino) naphthalene with lipid environments: Implications for spectral properties. *Photochem & Photobiol* 70(4):557–564
- Bagatolli LA, Gratton E (1999b) Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophys J* 77(4):2090–2101
- Bagatolli LA, Gratton E. (2000a) A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: A two-photon fluorescence microscopy study. *Biophys J*. Jul;79(1):434-47.

- Bagatolli LA, Gratton E. (2000b) Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures. *Biophys J*. Jan;78(1):290-305.
- Bagatolli L, Gratton E, Khan TK, Chong PL (2000c) Two-photon fluorescence microscopy studies of bipolar tetraether giant liposomes from thermoacidophilic archaebacteria *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biophys J* 79(1):416–425
- Bagatolli LA, Gratton E (2001) Direct observation of lipid domains in free-standing bilayers using two-photon excitation fluorescence microscopy. *J Fluorescence* 11(3):141–160
- Bagatolli, L. A. (2006). "To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy." *Biochim Biophys Acta* 1758(10): 1541-56.
- Bagatolli LA. (2013) LAURDAN Fluorescence Properties in Membranes: A Journey from the Fluorometer to the Microscope. In *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes*, Springer Series on Fluorescence, Chapter 1, Vol. 13.
- Ban, N., Matsumura, Y., Sakai, H., Takanezawa, Y., Sasaki, M., Arai, H. and Inagaki, N. (2007). "ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis." *J Biol Chem* 282(13): 9628-34.
- Bates JHT, Rossi A, Milic-Emili J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiratory flow. *J Appl Physiol* 1985;58:1840e8.
- Bates, S. R., Dodia, C. and Fisher, A. B. (1994). "Surfactant protein A regulates uptake of pulmonary surfactant by lung type II cells on microporous membranes." *Am J Physiol* 267(6 Pt 1): L753-60.
- 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 OL, 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*. 2010 Nov 17;99(10):3234-43
- Bein K, Wesselkamper SC, Liu X, Dietsch M, Majumder N, Concel VJ, et al. Surfactant-associated protein B is critical to survival in nickel-induced injury in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009 Aug;41(2):226-36.
- Ben-Yasar, V., and Y. Barenholz. 1989. The interaction of cholesterol and cholest-4-en-3-one with dipalmitoylphosphatidyl-choline. Comparison based on the use of three fluorophores. *Biochim. Biophys. Acta*. 985: 271-278.
- Bendtzen K, Christensen O, Nielsen CH, Holmstrup P. A matrix of cholesterol crystals, but not cholesterol alone, primes human monocytes/macrophages for excessive endotoxin-induced production of tumor necrosis factor-alpha. Role in atherosclerotic inflammation? *Discov Med*. 2014 Jun;17(96):309-12.
- Benson, B. J., Hawgood, S. and Williams, M. C. (1984). "Role of apoprotein and calcium ions in surfactant function." *Exp Lung Res* 6(3-4): 223-36.
- Bernard C. Leçons sur les anesthésiques et sur l'asphyxie, 1875 [Claude Bernard and anesthesia. *Anesthesiology* 35, pp. 112–113, 1971]
- Bernardino de la Serna, J., J. Perez-Gil, A. C. Simonsen y L. A. Bagatolli (2004). "Cholesterol rules: direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures." *J Biol Chem* 279(39): 40715-22.

- Bernardino de la Serna J, Orädd G, Bagatolli LA, Simonsen AC, Marsh D, Lindblom G, Perez-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.
- Biswas SC, Rananavare SB, Hall SB. Differential effects of lysophosphatidylcholine on the adsorption of phospholipids to an air/water interface. *BiophysJ* 2007;92:493e501.
- 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.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
- Brasch F, Ten Brinke A, Johnen G, Ochs M, Kapp N, Müller KM, Beers MF, Fehrenbach H, Richter J, Batenburg JJ, Bühling F. Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Jun;26(6):659-70.
- Brasch, F., Ochs, M., Kahne, T., Guttentag, S., Schauer-Vukasinovic, V., Derrick, M., Johnen, G., Kapp, N., Muller, K. M., Richter, J., Giller, T., Hawgood, S. and Buhling, F. (2003). "Involvement of napsin A in the C- and N-terminal processing of surfactant protein B in type-II pneumocytes of the human lung." *J Biol Chem* 278(49): 49006-14.
- 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.
- Brauer, L., Johl, M., Borgermann, J., Pleyer, U., Tsokos, M. and Paulsen, F. P. (2007a). "Detection and localization of the hydrophobic surfactant proteins B and C in human tear fluid and the human lacrimal system." *Curr Eye Res* 32(11): 931-8.
- Brauer, L., Kindler, C., Jager, K., Sel, S., Nolle, B., Pleyer, U., Ochs, M. and Paulsen, F. P. (2007b). "Detection of surfactant proteins A and D in human tear fluid and the human lacrimal system." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(9): 3945-53.
- Baritussio, A., Pettenazzo, A., Benevento, M., Alberti, A. and Gamba, P. (1992). "Surfactant protein C is recycled from the alveoli to the lamellar bodies." *Am J Physiol* 263(5 Pt 1): L607-11.
- Breslin, J. S. and Weaver, T. E. (1992). "Binding, uptake, and localization of surfactant protein B in isolated rat alveolar type II cells." *Am J Physiol* 262(6 Pt 1): L699-707.
- Brown, L. A., Pasquale, S. M. and Longmore, W. J. (1985). "Role of microtubules in surfactant secretion." *J Appl Physiol* 58(6): 1866-73.
- Boggaram V, Smith ME, Mendelson CR. Posttranscriptional regulation of surfactant protein-A messenger RNA in human fetal lung in vitro by glucocorticoids. *Mol Endocrinol*. 1991 Mar;5(3):414-23.
- Botas, C., Poulain, F., Akiyama, J., Brown, C., Allen, L., Goerke, J., Clements, J., Carlson, E., Gillespie, A. M., Epstein, C. and Hawgood, S. (1998). "Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20): 11869-74.
- Cabre, E. J., J. Malmstrom, D. Sutherland, J. Perez-Gil y D. E. Otzen (2009). "Surfactant protein SP-B strongly modifies surface collapse of phospholipid vesicles: insights from a quartz crystal microbalance with dissipation." *Biophys J* 97(3): 768-76.

- Cabré EJ, Loura LM, Fedorov A, Perez-Gil J, Prieto M. Topology and lipid selectivity of pulmonary surfactant protein SP-B in membranes: Answers from fluorescence. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jul;1818(7):1717-25.
- Cabré EJ, Loura LM, Fedorov A, Perez-Gil J, Prieto M. Topology and lipid selectivity of pulmonary surfactant protein SP-B in membranes: Answers from fluorescence. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar 20;1818(7):1717-1725.
- Cantor RS. The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry*. 1997 Mar 4;36(9):2339-44.
- Cañadas O, Casals C. Differential scanning calorimetry of protein-lipid interactions. *Methods Mol Biol*. 2013;974:55-71.
- 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.
- Campagna JA, Miller KW, Forman SA. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* 2003 May 22;348(21):2110-24.
- Celli A, Beretta S, Gratton E (2008) Phase fluctuations on the micron-submicron scale in guvs composed of a binary lipid mixture. *Biophys J* 94(1):104–116
- 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.
- 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., Husted, R. F., Johnson, R. P. and Gribetz, I. (1961). "Pulmonary surface tension and alveolar stability." *J Appl Physiol* 16: 444-50.
- Crouch, E., Persson, A., Chang, D. and Parghi, D. (1991). "Surfactant protein D. Increased accumulation in silica-induced pulmonary lipoproteinosis." *Am J Pathol* 139(4): 765-76.
- Crouch, E., 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.
- Crouch, E. and Wright, J. R. (2001). "Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense." *Annu Rev Physiol* 63: 521-54.
- Cruz, A., Vazquez, L., Velez, M. and Perez-Gil, J. (2004). "Effect of pulmonary surfactant protein SP-B on the micro- and nanostructure of phospholipid films." *Biophys J* **86**(1 Pt 1): 308-20.
- Corbet AJ, Voelker RM, Murphy FM, Owens ML. Inhibition by colchicine of phospholipid secretion induced by lung distension. *J Appl Physiol* 1988;65(4): 1710e5.

- 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.
- Comellas AP, Briva A, Dada LA, Butti ML, Trejo HE, Yshii C, et al. Endothelin-1 impairs alveolar epithelial function via endothelial ETB receptor. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:113e22.
- 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.
- Chavarha M, Khoojinian H, Schulwitz LE Jr, Biswas SC, Rananavare SB, Hall SB. Hydrophobic surfactant proteins induce a phosphatidylethanolamine to form cubic phases. *Biophys J*. 2010 Apr 21;98(8):1549-57.
- Chiou, J.S., Ueda, I., 1994. Ethanol unfolds firefly luciferase while competitive inhibitors antagonize unfolding: DSC and FTIR analyses. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12, 969–975.
- Cutrale F, Salih A, Gratton E. Spectral Phasor approach for fingerprinting of photo-activatable fluorescent proteins Dronpa, Kaede and KikGR. *Methods Appl Fluoresc.* 2013;1(3):35001.
- Daniels, C. B. and Orgeig, S. (2003). "Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing." *News Physiol Sci* 18: 151-157.
- Dietl, P. and Haller, T. (2004). "Exocytosis of Lung Surfactant: From the Secretory Vesicle to the Air-Liquid Interface." *Annu Rev Physiol*.
- Dietrich C, Bagatolli LA, Volovyk ZN, Thompson NL, Levi M, Jacobson K, Gratton E (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J* 80(3):1417–1428
- Diez-Blanco MN, Sanchez-Yagüe J, Cabezas JA, Llanillo M. Isolation, characterization and phospholipid composition of lamellar bodies and subcellular fractions from dog lung. *Int J Biochem.* 1987;19(8):693-8.
- Digman M.A., V.R. Caiolfa, M. Zamai, E. Gratton, The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis, *Biophys. J.* 94 (2008) L14–L16.
- Dobbs, L. G., Mason, R. J., Williams, M. C., Benson, B. J. and Sueishi, K. (1982). "Secretion of surfactant by primary cultures of alveolar type II cells isolated from rats." *Biochim Biophys Acta* 713(1): 118-27.
- 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.
- Enhorning G, Pototschnik R, Possmayer F, Burgoyne R. Pulmonary surfactant films affected by solvent vapors. *Anesth Analg.* 1986 Dec;65(12):1275-80.
- Fanani Maria Laura, Luisina De Tullio,† SteffenHartel,‡ Jorge Jara,§{ and Bruno Maggio. Sphingomyelinase-Induced Domain Shape Relaxation Driven by Out-of-Equilibrium Changes of Composition *Biophysical Journal* Volume 96 January 2009 67–76

- Fereidouni F, Bader AN, Gerritsen HC. Spectral phasor analysis allows rapid and reliable unmixing of fluorescence microscopy spectral images. *Opt Express*. 2012 Jun 4;20(12):12729-41.
- Fehrenbach, H. (2001). "Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited." *Respir Res* 2(1): 33-46.
- Fidorra M, Garcia A, Ipsen JH, Härtel S, Bagatolli LA. Lipid domains in giant unilamellar vesicles and their correspondence with equilibrium thermodynamic phases: a quantitative fluorescence microscopy imaging approach. *BiochimBiophysActa*. 2009 Oct;1788(10):2142-9.
- Firestone, L. L., J. C. Miller, and K. W. Miller. 1986. Tables of physical and pharmacological properties of anesthetics. In *Molecular and Cellular Mechanism of Anesthetics*. S. H. Roth and K. W. Miller, editors. Plenum Press, New York.
- 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.
- Floros, J. and Kala, P. (1998). "Surfactant proteins:molecular genetics of neonatal pulmonary diseases." *Annu Rev Physiol* 60: 365-384.
- Fornasier M, Puccini P, Razzetti R, Acerbi D, Bongrani S, Ventura P. Evaluation of potentially injurious effects of exogenous surfactant lysophospholipids on the alveolar epithelium and pulmonary mechanics. *Bio Neonate* 1997;71: 337e44.
- Franks NP, Lieb WR. Rapid movement of molecules across membranes. Measurement of the permeability coefficient of water using neutron diffraction. *J Mol Biol*. 1980 Jul 25;141(1):43-61.
- Frick, M., Bertocchi, C., Jennings, P., Haller, T., Mair, N., Singer, W., Pfaller, W., Ritsch-Marte, M. and Dietl, P. (2004). "Ca²⁺ entry is essential for cell strain induced lamellar body fusion in isolated rat type II pneumocytes." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(1): L210-20.
- 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 P2Y₂
- Gerber F, Krafft MP, Vandamme TF, Goldmann M, Fontaine P. Fluidization of a dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayer by fluorocarbon gases: potential use in lung surfactant therapy. *Biophys J* 2006 May 1;90(9):3184-92.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1973 Nov;51(5):1417-23.
- Glasser, S. W., Burhans, M. S., Korfhagen, T. R., Na, C. L., Sly, P. D., Ross, G. F., Ikegami, M. and Whitsett, J. A. (2001). "Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11): 6366-71.
- Glasser, S. W., Detmer, E. A., Ikegami, M., Na, C. L., Stahlman, M. T. and Whitsett, J. A. (2003). "Pneumonitis and emphysema in sp-C gene targeted mice." *J Biol Chem* **278**(16): 14291-8.
- Graesbøll K, Sasse-Middelhoff H, Heimbürg T. The thermodynamics of general and local anesthesia. *Biophys J*. 2014 May 20;106(10):2143-56.
- Gray E, Karlake J, Machta BB, Veatch SL. Liquid general anesthetics lower critical temperatures in plasma membrane vesicles. *Biophys J*. 2013 Dec 17;105(12):2751-9.

- Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C, Hyers TM. Surfactant Chemical Composition and Biophysical Activity in Acute Respiratory Distress Syndrome. *J. Clin. Invest.* 1991; Vol 88: 1976-1981
- Golfetto O1, Hinde E, Gratton E. Laurdan fluorescence lifetime discriminates cholesterol content from changes in fluidity in living cell membranes. *Biophys J.* 2013 Mar 19;104(6):1238-47.
- Gomez-Gil, L., D. Schurch, E. Goormaghtigh y J. Perez-Gil (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(10): 2736-45.
- Gonzales, L. W., Guttentag, S. H., Wade, K. C., Postle, A. D. and Ballard, P. L. (2002). "Differentiation of human pulmonary type II cells in vitro by glucocorticoid plus cAMP." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(5): L940-51.
- 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.
- Gunther A, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walmrath D, et al. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res* 2001;2(6):353-64.
- Günther A1, Korfei M, Mahavadi P, von der Beck D, Ruppert C, Markart P. Unravelling the progressive pathophysiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev.* 2012 Jun 1;21(124):152-60.
- 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.
- Guttentag, S., Robinson, L., Zhang, P., Brasch, F., Buhling, F. and Beers, M. (2003). "Cysteine protease activity is required for surfactant protein B processing and lamellar body genesis." *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(1): 69-79.
- Haagsman, H. P., A. Hogenkamp, M. van Eijk y E. J. Veldhuizen (2008). "Surfactant collectins and innate immunity." *Neonatology* 93(4): 288-94.
- Haller T, Ortmayr J, Friedrich F, Völkl H, Dietl P. Dynamics of surfactant release in alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 17;95(4):1579-84.
- 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.
- Faith M. Harris, Katrina B. Best, John D. Bell. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order *Biochimica et Biophysica Acta* 1565 (2002) 123– 128
- Head, J. F., Mealy, T. R., McCormack, F. X. and Seaton, B. A. (2003). "Crystal structure of trimeric carbohydrate recognition and neck domains of surfactant protein A." *J Biol Chem* 278(44): 43254-60.
- Hedenstierna G, Rothen HU. Atelectasis formation during anesthesia: causes and measures to prevent it. *J Clin Monit Comput.* 2000;16(5-6):329-35.

- 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.
- Hollenstein, K., Dawson, R. J. and Locher, K. P. (2007). "Structure and mechanism of ABC transporter proteins." *Curr Opin Struct Biol* 17(4): 412-8.
- Holm, B. A., G. Enhorning y R. H. Notter (1988). "A biophysical mechanism by which plasma proteins inhibit lung surfactant activity." *Chem Phys Lipids* 49(1-2): 49-55.
- Ikegami, M., Ueda, T., Purtell, J., Woods, E. and Jobe, A. (1994). "Surfactant protein A labeling kinetics in newborn and adult rabbits." *Am J Respir Cell Mol Biol* 10(4): 413-8.
- Ikegami, M., Whitsett, J. A., Martis, P. C. and Weaver, T. E. (2005). "Reversibility of lung inflammation caused by SP-B deficiency." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**(6): L962-70.
- Ipsen, J. H., G. Karlstron, O. G. Mouritsen, H. Wennerstrom, and M. H. Zuckermann. 1987. Phase equilibria in the phosphatidylcholinecholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta*. 905:162-172.
- Izquierdo-García JL, Naz S, Nin N, Rojas Y, Erazo M, Martínez-Caro L, García A, de Paula M, Fernández-Segoviano P, Casals C, Esteban A, Ruíz-Cabello J, Barbas C, Lorente JA. A Metabolomic Approach to the Pathogenesis of Ventilator-induced Lung Injury. *Anesthesiology*. 2014 Mar;120(3):694-702.
- Jiang RD, Shen H, Piao YJ. The morphometrical analysis on the ultrastructure of A549 cells. *Rom J MorpholEmbryol*. 2010;51(4):663-7.
- Jameson D.M., E. Gratton, R.D. Hall, The measurement and analysis of heterogeneous emissions by multifrequency phase and modulation fluorometry, *Appl. Spectrosc. Rev.* 20 (1984) 55–106.
- Jameson DM. *Introduction to Fluorescence*. Taylor & Francis Goup-CRC Press. 2014
- Jin Y1, Li H, Xie G, Chen S, Wu S, Fang X. Sevoflurane combined with ATP activates caspase-1 and triggers caspase-1-dependent pyroptosis in murine J774 macrophages. *Inflammation*. 2013 Apr;36(2):330-6.
- Jimenez-Cabré E. Tesis Doctoral "Determinantes y efectos de la integración de la proteína SP-B del surfactante pulmonar en membranas lipídicas". Madrid 2009.
- Johansson, J. (2003). "Molecular determinants for amyloid fibril formation: lessons from lung surfactant protein C." *Swiss Med Wkly* **133**(19-20): 275-82.
- Kaminoh Y, Tashiro C, Kamaya H, Ueda I. Depression of phase-transition temperature by anesthetics: nonzero solid membrane binding. *Biochim Biophys Acta*. 1988 Dec 22;946(2):215-20.
- Kaminoh, Y., Kitagawa, N., Nishimura, S., Kamaya, H., Ueda, I., 1991. Two-state model for nerve excitation and local anesthetic action. *Ann. NY Acad. Sci.* 625, 315–317.
- Krasnowska EK, Gratton E, Parasassi T (1998) PRODAN as a membrane surface fluorescence probe: partitioning between water and phospholipid phases. *Biophys J* 74(4):1984–1993
- Katz Y. Solubility, adsorption, and the thermodynamics of the cutoff effect. *J Theor Biol*. 2003 Dec 7;225(3):341-9.

- Kalimeris K, Christodoulaki K, Karakitsos P, Batistatou A, Lekka M, Bai M, et al. Influence of propofol and volatile anaesthetics on the inflammatory response in the ventilated lung. *Acta Anaesth Scand* 2011;55:740e8.
- Keough, K. M., B. Giffm, and P. L. Matthews. 1989. Phosphatidylcholine-cholesterol interactions: bilayers of heteroacid lipids containing linoleate lose calorimetric transitions at low cholesterol concentration. *Biochim. Biophys. Acta.* 983:51-55.
- KIRK, G. L. & S. M. GRUNER. 1985. Lyotropic effects of alkanes and headgroup composition on the La-HII, lipid liquid crystal phase transition: hydrocarbon packing versus intrinsic curvature. *J. Physique* 46: 761-769.
- 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.
- Korfhagen, T. R., M. D. Bruno, G. F. Ross, K. M. Huelsman, M. Ikegami, A. H. Jobe, S. E. Wert, B. R. Stripp, R. E. Morris, S. W. Glasser, C. J. Bachurski, H. S. Iwamoto y J. A. Whitsett (1996). "Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9594-9.
- Korfhagen, T. R., Sheftelyevich, V., Burhans, M. S., Bruno, M. D., Ross, G. F., Wert, S. E., Stahlman, M. T., Jobe, A. H., Ikegami, M., Whitsett, J. A. and Fisher, J. H. (1998). "Surfactant protein-D regulates surfactant phospholipid homeostasis in vivo." *J Biol Chem* 273(43): 28438-43.
- Kotani N, Takahashi S, Sessler DI, Hashiba E, Kubota T, Hashimoto H, et al. Volatile anesthetics augment expression of proinflammatory cytokines in rat alveolar macrophages during mechanical ventilation. *Anesthesiology* 1999;1:187e97.
- Koubi L, Tarek M, Klein ML, Scharf D. Distribution of halothane in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer from molecular dynamics calculations. *Biophys J.* 2000 Feb;78(2):800-11.
- Kuroki, Y. and Voelker, D. R. (1994). "Pulmonary surfactant proteins." *J Biol Chem* 269(42): 25943-6.
- Kuroki, Y., M. Takahashi y C. Nishitani (2007). "Pulmonary collectins in innate immunity of the lung." *Cell Microbiol* 9(8): 1871-9.
- Lakowicz JR, Bevan DR, Maliwal BP, Cherek H, Balter A (1983) Synthesis and characterization of a fluorescence probe of the phase transition and dynamic properties of membranes. *Biochemistry* 22:5714-5722
- Lee EJ, Yun UJ, Koo KH, Sung JY, Shim J, Ye SK, Hong KM, Kim YN. Down-regulation of lipid raft-associated onco-proteins via cholesterol-dependent lipid raft internalization in docosahexaenoic acid-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan;1841(1):190-203.
- Linton, K. J. (2007). "Structure and function of ABC transporters." *Physiology (Bethesda)* 22: 122-30.
- Lopez-Rodriguez E, Echaide M, Cruz A, Tausch HW, Perez-Gil J. Meconium impairs pulmonary surfactant by a combined action of cholesterol and bile acids. *Biophys J.* 2011 Feb 2;100(3):646-55.
- Magnusson L, Spahn DR. New concepts of atelectasis during general anaesthesia. *Br J Anaesth* 2003 Jul;91(1):61-72.

- Martínez Sarrasague M, Cimato A, Rubin de Celis E, Facorro G. Effect of serum proteins on an exogenous pulmonary surfactant: ESR analysis of structural changes and their relation with surfactant activity. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012 Jul 31;183(1):48-57.
- Martínez Sarrasague M, Cimato A, Piehl L, Brites F, Facorro G. Effect of serum lipoproteins and cholesterol on an exogenous pulmonary surfactant. ESR analysis of structural changes and their relation with surfactant activity. *Respir Physiol Neurobiol*. 2013 Dec 1;189(3):581-7.
- Marsh D. (2013) *Handbook of Lipid Bilayers, Second Edition* - CRC Press Book
- 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.
- Matsuzaki K. How Do Membranes Initiate Alzheimer's Disease? Formation of Toxic Amyloid Fibrils by the Amyloid β -Protein on Ganglioside Clusters. *AccChem Res*. 2014 Jul 16.
- Melchior, D. L., F. J. Scavitto, and J. M. Steim. 1980. Dilatometry of dipalmitoyl-lecithin-cholesterol bilayers. *Biochemistry*. 19:4828-4834.
- Mely, Yves, Duportail, Guy (Eds.). *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes*, Springer Series on Fluorescence, Vol. 13, 2013..
- Meyer H. Zur Theorie der Alkoholnarkose. *Arch ExpPatholPharmakol* 1899;42:109e18.
- Mikerov, A. N., Umsted, T. M., Huang, W., Liu, W., Phelps, D. S. and Floros, J. (2005). "SP-A1 and SP-A2 variants differentially enhance association of *Pseudomonas aeruginosa* with rat alveolar macrophages." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288(1): L150-8.
- Miklavc, P., Wittekindt, O. H., Felder, E. and Dietl, P. (2009). "Ca²⁺-dependent actin coating of lamellar bodies after exocytotic fusion: a prerequisite for content release or kiss-and-run." *Ann N Y Acad Sci* 1152: 43-52.
- Miller RN, Thomas PA. Pulmonary surfactant: determinations from lung extracts of patients receiving diethyl ether or halothane. *Anesthesiology*. 1967 Nov-Dec;28(6):1089-93.
- Miller KW, Paton WD, Smith RA, Smith EB. The pressure reversal of general anesthesia and the critical volume hypothesis. *Mol Pharmacol*. 1973 Mar;9(2):131-43.
- 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.
- Molliex S, Dureuil B, Aubier M, Friedlander G, Desmonts JM, Clerici C. Halothane decreases Na,K-ATPase, and Na channel activity in alveolar type II cells. *Anesthesiology* 1998 Jun;88(6):1606-13.
- Morr-Strathmann U, Welter J, Lawin P. [Effects of ethrane and halothane on compliance and resistance (author's transl)]. *Anaesthesist*. 1977 Apr;26(4):165-7.
- Morrow, M. R., S. Temple, J. Stewart y K. M. Keough (2007). "Comparison of DPPC and DPPG environments in pulmonary surfactant models." *Biophys J* 93(1): 164-75.
- Mortensen, N. K., W. Pfeiffer, E. Sackmann, and W. Knoll. 1988. Structural properties of a phosphatidylcholine-cholesterol system as studied by small-angle neutron scattering: ripple structure and phase diagram. *Biochim. Biophys. Acta*. 945:221-245.

- Mouritsen, O. G. 1991. Theoretical models of phospholipid phase transitions. *Chem. Phys. Lipids*. 57:179-194.
- Mouritsen OG. Lipids, curvature, and nano-medicine. *Eur J Lipid SciTechnol* 2011;113(10):1174e87.
- Mulugeta, S., Gray, J. M., Notarfrancesco, K. L., Gonzales, L. W., Koval, M., Feinstein, S. I., Ballard, P. L., Fisher, A. B. and Shuman, H. (2002). "Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3." *J Biol Chem* 277(25): 22147-55.
- Mulugeta, S. and Beers, M. F. (2006). "Surfactant protein C: Its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung." *Microbes and Infection* 8: 2317-2323.
- Mulugeta S, Maguire JA, Newitt JL, Russo SJ, Kotorashvili A, Beers MF. Misfolded BRICHOS SP-C mutant proteins induce apoptosis via caspase-4- and cytochrome c-related mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Sep;293(3):L720-9.
- Nag, K., J. Perez-Gil, A. Cruz y K. M. Keough (1996a). "Fluorescently labeled pulmonary surfactant protein C in spread phospholipid monolayers." *Biophys J* 71(1): 246-56.
- 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.
- Nag K, Pao JS, Harbottle RR, Possmayer F, Petersen NO, Bagatolli LA. Segregation of saturated chain lipids in pulmonary surfactant films and bilayers. *Biophys J*. 2002 Apr;82(4):2041-51.
- Naz S, Garcia A, Erazo M, Ruiz-Cabello J, Esteban A, Lorente JA, et al. A novel non-targeted metabolomic approach in ventilator induced lung injury: mass spectrometric characterization of fatty amide, sphinganine and lysophosphatidylcholine. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:A6724.
- Nemecz, G., and F. Shroeder. 1988. Time-resolved fluorescence investigation on membrane cholesterol heterogeneity and exchange. *Biochemistry*. 27:7740-7749.
- Nguyen. (2009) Effects of various small-molecule anesthetics on vesicle fusion: a study using two-photon fluorescence cross-correlation spectroscopy. *J PhysChem B*. 2009 Jul 30;113(30):10357-66
- Nickalls, R. W. D., &Mapleson, W. W. (August 2003). "Age-related iso-MAC charts for isoflurane, sevoflurane, and desflurane in man". *British Journal of Anaesthesia* 91 (2): 170–4.
- Nogee, L. M., Garnier, G., Dietz, H. C., Singer, L., Murphy, A. M., deMello, D. E. and Colten, H. R. (1994). "A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds." *J Clin Invest* 93(4): 1860-3.
- Nogee LM. Genetics of the hydrophobic surfactant proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19;1408(2-3):323-33.
- Nogee, L. M. (2002). "Abnormal expression of surfactant protein C and lung disease." *Am J Respir Cell Mol Biol* 26(6): 641-4.
- Nunn JF, Bergman NA, Coleman AJ. Factors influencing the arterial oxygen tension during anaesthesia with artificial ventilation. *Br J Anaesth* 1965 Dec;37(12):898-914.

- Nortter, R. H. (200) Lung surfactant: basic science and clinical application. New York, Marcel Decker.
- Olmeda B, Villén L, Cruz A, Orellana G, Perez-Gil J. Pulmonary surfactant layers accelerate O₂ diffusion through the air-water interface. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1798: 1281–1284.
- Olmeda B, García-Álvarez B, Pérez-Gil J. Structure-function correlations of pulmonary surfactant protein SP-B and the saposin-like family of proteins. *Eur Biophys J*. 2013 Mar;42(2-3):209-22.
- Orgeig S, Barr HA, Nicholas TE. Effect of hyperpnea on the cholesterol to disaturated phospholipid ratio in alveolar surfactant of rats. *Exp Lung Res*. 1995 Jan-Feb;21(1):157-74.
- Orgeig, S., P. S. Hiemstra, E. J. Veldhuizen, C. Casals, H. W. Clark, A. Haczku, L. Knudsen y F. Possmayer (2010). "Recent advances in alveolar biology: evolution and function of alveolar proteins." *Respir Physiol Neurobiol* 173 Suppl: S43-54.
- Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A., van Eijk, M., van Buel, B. L., van Golde, L. M. and Haagsman, H. P. (1991b). "Surfactant protein composition of lamellar bodies isolated from rat lung." *Biochem J* 274 (Pt 1): 115-9.
- Osanai, K., Mason, R. J. and Voelker, D. R. (1998). "Trafficking of newly synthesized surfactant protein A in isolated rat alveolar type II cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(6): 929-35.
- Osanai, K., Tsuchihara, C., Hatta, R., Oikawa, T., Tsuchihara, K., Iguchi, M., Seki, T., Takahashi, M., Huang, J. and Toga, H. (2006). "Pulmonary surfactant transport in alveolar type II cells." *Respirology* 11 Suppl: S70-3.
- Overton E. Studienüber die Narkose Zugleichein Beitragzur Allgemeinen Pharmakologie. Jena, Germany: Verlag von Gustav Fisher; 1901.
- Owen DM, Williamson DJ, Magenau A, Gaus K. Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution. *Nat Commun*. 2012;3:1256
- Panda AK, Nag K, Harbottle RR, Rodriguez-Capote K, Veldhuizen RA, Petersen NO, Possmayer F. Effect of acute lung injury on structure and function of pulmonary surfactant films. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 May;30(5):641-50.
- Parasassi T, Conti F, Gratton E (1986) Fluorophores in a polar medium: time dependence of emission spectra detected by multifrequency phase and modulation fluorometry. *Cell Mol Biol* 32(1):99–102
- Parasassi T, De Stasio G, d'Ubaldo A, Gratton E (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by LAURDAN fluorescence. *Biophys J* 57(6):1179–1186
- Parasassi T, De Stasio G, Ravagnan G, Rusch RM, Gratton E. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence, *Biophys. J*. 1991; 60: 179–189.
- Parasassi T, Massimo Di Stefano, Marianna Loiero, Giampietro Ravagnan, and Enrico Gratton. (1994a) Influence of Cholesterol on Phospholipid Bilayers Phase Domains as Detected by Laurdan Fluorescence. *Biophysical Journal* Volume 66 January, 120-132

- Parasassi T, Di Stefano M, Loiero M, Ravagnan G, Gratton E (1994b) Cholesterol modifies water concentration and dynamics in phospholipid bilayers: a fluorescence study using LAURDAN probe. *Biophys J* 66(3 Pt 1):763–768
- Parasassi T, Giusti AM, Raimondi M, Gratton E (1995) Abrupt modifications of phospholipid bilayer properties at critical cholesterol concentrations. *Biophys J* 68(5):1895–1902
- Parasassi T, Gratton E, Yu WM, Wilson P, Levi M (1997) Two-photon fluorescence microscopy of LAURDAN generalized polarization domains in model and natural membranes. *Biophys J* 72(6):2413–2429
- Parasassi T, Krasnowska EK, Bagatolli LA, Gratton E (1998) LAURDAN and PRODAN as polarity sensitive fluorescent membrane probes. *J Fluorescence* 8(4):365–373
- Parra E, Moleiro LH, López-Montero I, Cruz A, Monroy F, Pérez-Gil J. A combined action of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C modulates permeability and dynamics of phospholipid membranes. *Biochem J*. 2011 Sep 15;438(3):555-64.
- Parra E, Alcaraz A, Cruz A, Aguilera VM, Pérez-Gil J. Hydrophobic pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C induce pore formation in planar lipid membranes: evidence for proteolipid pores. *Biophys J*. 2013 Jan 8;104(1):146-55.
- Pattle RE, Schock C, Battensby J. Some effects of anaesthetics on lung surfactant. *Br J Anaesth*. 1972 Nov;44(11):1119-27.
- 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. (2001). "Lipid-protein interactions of hydrophobic proteins SP-B and SP-C in lung surfactant assembly and dynamics." *Pediatr Pathol Mol Med* **20**(6): 445-69.
- Pérez-Gil, J. (2008b). "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.
- Postle AD, Heeley EL, Wilton DC. A comparison of the molecular species compositions of mammalian lung surfactant phospholipids. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001 May;129(1):65-73.
- 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.
- G. Putz , J. Goerke , H. W. Taeusch , J. A. Clements. Comparison of captive and pulsating bubble surfactometers with use of lung surfactants. *Journal of Applied Physiology* Published 1 April 1994 Vol. 76 no. 1425-1431
- G Putz, M Walch, M Van Eijk, H P Haagsman. A spreading technique for forming film in a captive bubble. *Biophys J*. 1998 November; 75(5): 2229–2239.
- Ravasio A1, Olmeda B, Bertocchi C, Haller T, Pérez-Gil J. Lamellar bodies form solid three-dimensional films at the respiratory air-liquid interface. *J Biol Chem*. 2010 Sep 3;285(36):28174-82.
- 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. *Anestesia, 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.
- Rezaiguia-Delclaux S, Jayr C, Luo DF, Saidi NE, Meignan M, Duvaldestin P. Halothane and isoflurane decrease alveolar epithelial fluid clearance in rats. *Anesthesiology* 1998 Mar;88(3):751-60.
- Rider, E. D., Ikegami, M., Pinkerton, K. E., Peake, J. L. and Jobe, A. H. (2000). "Lysosomes from rabbit type II cells catabolize surfactant lipids." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(1): L68-74.
- Rodriguez-Capote K, Manzanares D, Haines T, Possmayer F. Reactive oxygen species inactivation of surfactant involves structural and functional alterations to surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biophys J* 2006 Apr 15;90(8):2808-21.
- 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.
- Savov J, Silbajoris R, Young SL. Mechanical ventilation of rat lung: effect on surfactant forms. *Am J Physiol* 1999;277:L320e6.
- Sáenz A, López-Sánchez A, Mojica-Lázaro J, Martínez-Caro L, Nin N, Bagatolli LA, Casals C. Fluidizing effects of C-reactive protein on lung surfactant membranes: protective role of surfactant protein A. *FASEB J*. 2010 Oct;24(10):3662-73.
- Sakamoto A, Jun-ichi I, Nishikawa A, Reiko H, Emi I, Yanagisawa Y, et al. Influence of inhalation anesthesia assessed by comprehensive gene expression profiling. *Gene* 2005;356:39e48.
- Sankaram, M. B., and T. E. Thompson. 1990a. Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state ²H nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry*. 29:10676-10684.
- Sankaram, M. B., and T. E. Thompson. 1990b. Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry*. 29: 10670-10675.
- Saldias FJ, Lecuona E, Comellas AP, Ridge KM, Sznajder JI. Dopaminerestores lung ability to clear edema in rats exposed to hyperoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:626e33.
- Samuli Ollila OH, Louhivuori M, Marrink SJ, Vattulainen I. Protein shape change has a major effect on the gating energy of a mechanosensitive channel. *Biophys J*. 2011 Apr 6;100(7):1651-9.
- Sane, A. C. and Young, S. L. (1994). "The stimulation of cellular phospholipid uptake by surfactant apoproteins." *Biochim Biophys Acta* 1213(1): 107-12.
- Sanchez-Barbero, F., J. Strassner, R. Garcia-Canero, W. Steinhilber y C. Casals (2005). "Role of the degree of oligomerization in the structure and function of human surfactant protein A." *J Biol Chem* 280(9): 7659-70.
- Sano, H. and Yoshio, K. (2005). "The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity." *Molecular immunology* 42: 279-287.

- Serrano, A. G. and Perez-Gil, J. (2006). "Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system." *Chem Phys Lipids* 141(1-2): 105-18.
- Schürch S1, Bachofen H, Goerke J, Possmayer F. A captive bubble method reproduces the in situ behavior of lung surfactant monolayers. *J Appl Physiol* (1985). Dec;67(6):2389-96.
- Schürch, S., Green, F. H. and Bachofen, H. (1998). "Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry." *Biochim Biophys Acta* 1408(2-3): 180- 202.
- Schürch S, Bachofen H, Possmayer F. Surface activity in situ, in vivo, and in the captive bubble surfactometer. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001 May;129(1):195-207.
- Schurich, D., O. L. Ospina, A. Cruz y J. Perez-Gil (2010). "Combined and independent action of proteins SP-B and SP-C in the surface behavior and mechanical stability of pulmonary surfactant films." *Biophys J* 99(10): 3290-9.
- Shafiq URR. Rapid isocratic method for the separation and quantification of major phospholipid classes by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1991;567:29e37.
- Shapiro DL, Nardone LL, Rooney SA, Motoyama EK, Munoz JL. Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1978 Aug 25;530(2):197-207.
- Shinitzky M., C. Dianoux, C. Gitler, and G. Weber. Microviscosity and Order in the Hydrocarbon Region of Micelles and Membranes Determined with Fluorescent Probes. I. Synthetic Micelles. *Biochemistry* Vol.10, no.11 (1971) 2106-2113.
- Simon, S.A., McIntosh, T.J., Bennett, P.B., Shrivastav, B.B., 1979. Interaction of halothane with lipid bilayers. *Mol. Pharmacol.* 16, 163–170
- Schroeder, F., J. R. Jefferson, A. B. Kier, J. Knittel, T. J. Scallen, W. Gibson Wood, and I. Hapala. 1991. Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196:235-252.
- Spalding JW, Ortner MJ, Tombropoulos EG, Gilmore LB, Hook GE. Isolation and characterization of rabbit lung lamellar bodies.
- Stahlman, M. T., Gray, M. P., Falconieri, M. W., Whitsett, J. A. and Weaver, T. E. (2000). "Lamellar body formation in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice." *Lab Invest* 80(3): 395-403.
- Stanley TH, Zikria BA, Sullivan SF. The surface tension of tracheobronchial secretions during general anesthesia. *Anesthesiology*. 1972 Oct;37(4):445-9.
- Stenger PC, Alonso C, Zasadzinski JA, Waring AJ, Jung CL, Pinkerton KE. Environmental tobacco smoke effects on lung surfactant film organization. *Biochim Biophys Acta* 2009 Feb;1788(2):358-70.
- Stephanova E1, Topouzova-Hristova T, Hazarosova R, Moskova V. Halothane-induced alterations in cellular structure and proliferation of A549 cells. *Tissue Cell*. 2008 Dec;40(6):397-404.
- Stevens, P. A., Wissel, H., Zastrow, S., Sieger, D. and Zimmer, K. P. (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.
- Strum DP, Eger EI 2nd. Partition coefficients for sevoflurane in human blood, saline, and olive oil. *Anesth Analg*. 1987 Jul;66(7):654-6.

- 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.
- Suri LN, McCaig L, Picardi MV, Ospina OL, Veldhuizen RA, Staples JF, Possmayer F, Yao LJ, Perez-Gil J, Orgeig S. Adaptation to low body temperature influences pulmonary surfactant composition thereby increasing fluidity while maintaining appropriately ordered membrane structure and surface activity. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Feb 24;1818(7):1581-1589.
- Subczynski, W. K., W. E. Antholine, J. S. Hyde, and A. Kusumi. 1990. Microimmiscibility and three-dimensional dynamic structure of phosphatidylcholine-cholesterol membranes: translational diffusion of a copper complex in the membrane. *Biochemistry*. 29:7936-7945.
- Suwabe A, Mason RJ, Voelker DR. Temporal segregation of surfactant secretion and lamellar body biogenesis in primary cultures of rat alveolar type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991 Jul;5(1):80-6.
- Suzuki, Y., Fujita, Y. and Kogishi, K. (1989). "Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant." *Am Rev Respir Dis* 140(1): 75-81.
- Swain RJ1, Kemp SJ, Goldstraw P, Tetley TD, Stevens MM. Spectral monitoring of surfactant clearance during alveolar epithelial type II cell differentiation. *Biophys J*. 2008 Dec 15;95(12):5978-87.
- Takala RS, Soukka HR, Kirvela OA, Kujari HP, Pelliniemi LJ, Kaapa PO, et al. Alveolar integrity and ultrastructure in pigs remain undamaged after exposure to sevoflurane. *ActaAnesthesiolScand* 2002;46:1137e43.
- Takala RS, Soukka HR, Salo MS, Kirvela OA, Kaapa PO, Rajamaki AA, et al. Pulmonary inflammatory mediators after sevoflurane and thiopentone anaesthesia in pigs. *ActaAnesthesiolScand* 2004;48:40e5.
- Tamp, R., A. von Lukas, and H. J. Galla. 1991. Glycophorin-induced cholesterol-phospholipid domains in dimyristoylphosphatidylcholine bilayer vesicles. *Biochemistry*. 30:4909-4916.
- Taneva, S. y K. M. Keough (1994). "Pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C in spread monolayers at the air-water interface: III. Proteins SP-B plus SP-C with phospholipids in spread monolayers." *Biophys J* 66(4): 1158-66.
- Taneva, S. y K. M. Keough (1997). "Cholesterol modifies the properties of surface films of dipalmitoylphosphatidylcholine plus pulmonary surfactant-associated protein B or C spread or adsorbed at the air-water interface." *Biochemistry* 36(4): 912-22.
- Taneva, S. G. y K. M. Keough (2000). "Adsorption of pulmonary surfactant protein SP-A to monolayers of phospholipids containing hydrophobic surfactant protein SP-B or SP-C: potential differential role for tertiary interaction of lipids, hydrophobic proteins, and SP-A." *Biochemistry* 39(20): 6083-93.
- ten BA, van Golde LM, Batenburg JJ. Palmitoylation and processing of the lipopeptide surfactant protein C. *Biochim Biophys Acta* 2002 Aug 8;1583(3):253-65.
- Terama E, Ollila OH, Salonen E, Rowat AC, Trandum C, Westh P, Patra M, Karttunen M, Vattulainen I. Influence of ethanol on lipid membranes: from lateral pressure profiles to dynamics and partitioning. *J Phys Chem B*. 2008 Apr 3;112(13):4131-9.
- Thewalt JL, Bloom M. Phosphatidylcholine: cholesterol phase diagrams. *Biophys J*. 1992 Oct;63(4):1176-81.

- Trudell JR. A unitary theory of anesthesia based on lateral phase separations in nerve membranes. *Anesthesiology*. 1977 Jan;46(1):5-10.
- Tobin WR, Kaiser HE, Groeger AM, Lema MJ. The effects of volatile anesthetic agents on pulmonary surfactant function. *In Vivo*. 2000 Jan-Feb;14(1):157-63.
- Tolle, A., W. Meier, M. Rudiger, K. P. Hofmann y B. Rustow (2002). "Effect of cholesterol and surfactant protein B on the viscosity of phospholipid mixtures." *Chem Phys Lipids* 114(2): 159-68.
- 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, T., Ikegami, M., Henry, M. and Jobe, A. H. (1995). "Clearance of surfactant protein B from rabbit lungs." *Am J Physiol* 268(4 Pt 1): L636-41.
- 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.
- Ueno, T., Linder, S., Na, C. L., Rice, W. R., Johansson, J. and Weaver, T. E. (2004). "Processing of pulmonary surfactant protein B by napsin and cathepsin H." *J Biol Chem* 279(16): 16178-84.
- van Langen, H., G. van Ginkel, D. Shaw, and Y. K. Levine. 1989. The fidelity response by 1-[4-(trimethylammonio)phenyl]-6-phenyl-1,3,5- hexatriene in time-resolved fluorescence anisotropy measurements on lipid vesicles. *Eur. Biophys. J.* 17:37-48.
- Venkitaraman AR, Hall SB, Whitsett JA, Notter RH. Enhancement of biophysical activity of lung surfactant extracts and phospholipid-apoprotein mixtures by surfactant protein A. *Chem Phys Lipids*. 1990 Dec;56(2-3):185-94.
- Venkitaraman AR, Baatz JE, Whitsett JA, Hall SB, Notter RH. Biophysical inhibition of synthetic phospholipid-lung surfactant apoprotein admixtures by plasma proteins. *Chem Phys Lipids*. 1991 Jan-Feb;57(1):49-57.
- 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):467-74.
- Vist, M. R., and J. D. Davis. 1990. Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures; ²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry*. 29:451-464.
- Vockeroth D, Gunasekara L, Amrein M, Possmayer F, Lewis JF, Veldhuizen RWA. Role of cholesterol in the biophysical dysfunction of surfactant in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010; 298: L117-L125.
- Vorbroker, D. K., Profitt, S. A., Noguee, L. M. and Whitsett, J. A. (1995). "Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency." *Am J Physiol* 268(4 Pt 1): L647-56.
- Voorhout, W. F., Veenendaal, T., Kuroki, Y., Ogasawara, Y., van Golde, L. M. and Geuze, H. J. (1992). "Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung." *J Histochem Cytochem* 40(10): 1589-97.
- Wang, G., Bates-Kenney, S. R., Tao, J. Q., Phelps, D. S. and Floros, J. (2004). "Differences in biochemical properties and in biological function between human SP-A1 and SP-A2 variants, and the impact of ozone-induced oxidation." *Biochemistry* 43(14): 4227-39.

- Warriner, H. E., J. Ding, A. J. Waring y J. A. Zasadzinski (2002). "A concentration-dependent mechanism by which serum albumin inactivates replacement lung surfactants." *Biophys J* 82(2): 835-42.
- 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. (1998). "Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C." *Biochim. Biophys. Acta.* 1408: 173-179.
- Weaver, T. E. and Conkright, J. J. (2001). "Function of surfactant proteins B and C." *Annu Rev Physiol* 63: 555-78.
- Weaver, T. E., Na, C. L. and Stahlman, M. (2002). "Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant." *Semin Cell Dev Biol* 13(4): 263-70.
- Weber G, Farris FJ. Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry.* 1979 Jul 10;18(14):3075-8.
- Weber G., Resolution of the fluorescence lifetimes in a heterogeneous system by phase and modulation measurements, *J. Phys. Chem.* 85 (1981) 949–953.
- Weber G. Detection and Measurement of the statics and dynamics of protein-ligand and protein-protein association. Chapter XII. *Protein Interacction.* Chapman and Hall Ed. 1992.
- Wegner, D. J., Hertzberg, T., Heins, H. B., Elmberger, G., MacCoss, M. J., Carlson, C. S., Noguee, L. M., Cole, F. S. and Hamvas, A. (2007). "A major deletion in the surfactant protein-B gene causing lethal respiratory distress." *Acta Paediatr* 96(4): 516-20.
- Weibel, E. R. and Gil, J. (1968). "Electron microscopic demonstration of an extracellular duplex lining layer of alveoli." *Respir Physiol* 4(1): 42-57.
- Wemhöner A, Jennings P, Haller T, Rüdiger M, Simbruner. Effect of exogenous surfactants on viability and DNA synthesis in A549, immortalized mouse type II and isolated rat alveolar type II cells G - *BMC Pulm Med* (2011)
- Williams, M. C. (1977). "Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs." *J Cell Biol* 72(2): 260-77.
- Wirtz, H. R. and Dobbs, L. G. (1990). "Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells." *Science* 250(4985): 1266-9.
- 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. (2005). "Immunoregulatory functions of surfactant proteins." *Nat Rev Immunol* 5(1): 58-68.
- Woo SW, Berlin D, Hedley-Whyte J. Surfactant function and anesthetic agents. *J Appl Physiol.* 1969 May;26(5):571-7.
- Wood, S. C., Weber, R. E., Hargens, A. R. and Millard, R. W. (1992). *Physiological Adaptations in Vertebrates (Lung Biology in Health and Disease)* New York, Marcel Dekker. Inc.
- Wüstneck N, Wüstneck R, Pison U, Möhwald. On the dissolution of vapors and gases. *Langmuir* 2007;23:1815e23.

- Yang T, Li Y, Liu Q, Tao J, Wu W, Huang H. Isoflurane aggravates the decrease of phosphatidylcholine synthesis in alveolar type II cells induced by hydrogenperoxide. *Drug Metabol Drug Interact* 2001;18:243e9.
- Yu W, So PT, French T, Gratton E (1996) Fluorescence generalized polarization of cell membranes: a two-photon scanning microscopy approach. *Biophys J* 70(2):626–636
- Young, S. L., Wright, J. R. and Clements, J. A. (1989). "Cellular uptake and processing of surfactant lipids and apoprotein SP-A by rat lung." *J Appl Physiol* 66(3): 1336-42.
- Weinrich M, Nanda H, Worcester DL, Majkrzak CF, Maranville BB, Bezrukov SM. Halothane changes the domain structure of a binary lipid membrane. *Langmuir*. 2012 Mar 13;28(10):4723-8.
- Weinrich M, Worcester DL. Xenon and other volatile anesthetics change domain structure in model lipid raft membranes. *J PhysChem B*. 2013 Dec 19;117(50):16141-7.
- Wustneck, N., Wustneck, R., Perez-Gil, J. and Pison, U. (2003). "Effects of Oligomerization and Secondary Structure on the Surface Behavior of Pulmonary Surfactant Proteins SP-B and SP-C." *Biophys J* **84**(3): 1940-9.
- Yang L, Johansson J, Ridsdale R, Willander H, Fitzen M, Akinbi HT, Weaver TE. Surfactant protein B propeptide contains a saposin-like protein domain with antimicrobial activity at low pH. *J Immunol*. 2010 Jan 15;184(2):975-83.
- 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.
- Young, S. L., Wright, J. R. and Clements, J. A. (1989). "Cellular uptake and processing of surfactant lipids and apoprotein SP-A by rat lung." *J Appl Physiol* 66(3): 1336-42.
- Zhang H, Wang YE, Fan Q, and Zuo YY. On the Low Surface Tension of Lung Surfactant. *Langmuir* 2011, 27, 8351–8358
- Zeng J, Chong PL. Effect of ethanol-induced lipid interdigitation on the membrane solubility of Prodan, Acdan, and Laurdan. *Biophys J*. 1995 Feb;68(2):567-73.
- 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.

Anexos

6.1. Lista de Publicaciones, premios y becas o proyectos recibidos

6.1.1. Publicaciones

- **Sevoflurane anesthesia deteriorates pulmonary surfactant promoting alveolar collapse in male Sprague-Dawley rats.**

Malacrida L., Reta G, Piriz H, Rocchiccioli F, Botti H, Denicola A, Briva A. *Pulm Pharmacol Ther.* 2014 Aug;28(2):122-9. doi: 0.1016/j.pupt.2013.12.005. Epub 2014 Jan 3.

- **Phasor plots for lifetime and spectral studies of Laurdan and Prodan in membranes: A new perspective for membrane biophysics**

Leonel S. Malacrida, Rosina Toledo Gallo, Magdalena San Roman, Arturo Briva, Ana Denicola, Enrico Gratton, David M. Jameson. En preparación para *Methods and Application in Fluorescence*.

- **Gases in the air: affection of pulmonary surfactant function and supramolecular structure by sevoflurane anesthesia.**

Leonel Malacrida, Olga Cañadas, Elena López-Rodríguez, Rosina Toledo-Galo, Ana Denicola, Jesús Pérez-Gil, Cristina Casals, Arturo Briva. En preparación para *PNAS*.

- **The effect of sevoflurane on membranes: Studies using the environmental sensitive probe PRODAN.**

Leonel Malacrida, Horacio Botti, Arturo Briva, David M. Jameson, Ana Denicola. En preparación para *Biophysical Journal*.

- **Phasor Plots and Spectral Phasor Analysis of Laurdan and Prodan for Membrane Heterogeneity Studies: New Frontiers in Membrane Biophysics***

Leonel S. Malacrida, Arturo Briva, Carrisa M. Vetromile, Enrico Gratton, Ana Denicola, David M. Jameson. *Biophysical Journal*, (2014) Vol. 106, Issue 2, p84a

- **Sleeping Bubbles: Effects of Volatile Anesthetics in the Lateral Structure of Giant Unilamellar Vesicles**

Leonel S. Malacrida, Arturo Briva, Luis A. Bagatolli, Pablo Aguilar, Ana Denicola. *Biophysical Journal*, (2013) Vol. 104, Issue 2, p33a

- **Deterioration of Pulmonary Surfactant by Volatile Anesthetics**

Leonel S. Malacrida, Olga Cañadas, Elena Lopez-Rodriguez, Horacio Botti, Jesús Perez-Gil, Ana Denicola, Cristina Casals, Arturo Briva. *Biophysical Journal*, (2012) Vol. 102, Issue 3, p496a

- **Los anestésicos halogenados deterioran la composición de fosfolípidos en un sistema de surfactante pulmonar***

Leonel Malacrida, Fabiana Rochiccioli, German Reta, Hector Píriz, Horacio Botti, Ana Denicola, Arturo Briva. *Respirar*, (2012), numero 6, pag 22.

- **Halogenated Anesthetics Impairs Biophysical Properties of a Membrane Model of Pulmonary Surfactant***

Leonel S. Malacrida, Horacio Botti, Fabiana Rochiccioli, Ana Denicola, Arturo Briva. *Biophysical Journal*, (2011) Vol. 100, Issue 3, p505a–506a

- **Halogenated Anesthetics Impairs Biophysical Properties Of Pulmonary Surfactant.**

Briva A; **Malacrida L.**; Botti H.; Rocchiccioli F.; Soto JP.; Angulo M.; Denicola A. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v.: 183, 2011

- **Halogenated Anesthetics Impairs Phospholipid composition from a Pulmonary Surfactant System.**

Malacrida L.; Briva A; Rocchiccioli F.; Reta G.; Piriz H. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v.: 181, 2010

* Los trabajos señalados han recibido premios locales e internacionales que se detallan a continuación.

6.1.2.Premios

- International Travel Award - Premio por el Trabajo: **Phasor Plots and Spectral Phasor Analysis of LAURDAN and PRODAN for membrane heterogeneity studies: New Frontiers in Membrane Biophysics**, 2014. 58th Annual Meeting of Biophysical Society American Biophysical Society (Internacional). (Dotación económica de U\$S 700)
- Primera mención a mejor trabajo de investigación del Hospital de Clínicas del año 2012-2013 por: **Sleeping Bubbles: Effects of Sevoflurane in the lateral organization of Giant Unilamellar Vesicles.**, Semana Académica del Hospital de Clínicas 2013, Montevideo-Uruguay (Local).
- Premio a mejor trabajo de investigación del Hospital de Clínicas del año 2011-2012 por: **Los anestésicos halogenados deterioran la composición de fosfolípidos en un sistema de surfactante pulmonar**, Semana Académica del Hospital de Clínicas, 2-5 de octubre de 2012, Montevideo-Uruguay (Local).(Dotación económica de U\$S 1500)
- 1° Mención a mejor trabajo de Investigación Básica del 8° Congreso de la Asociación Latinoamericana de Tórax (ALAT), por: **Los anestésicos halogenados deterioran la composición de fosfolípidos en un sistema de surfactante pulmonar**, 2012 (Regional). (Dotación económica de U\$S 250)
- International Travel Award - Premio por el Trabajo: **Halogenated Anesthetics impairs Biophysical properties of a membrane model of Pulmonary Surfactant**, 2011. 55th Annual Meeting of Biophysical Society American Biophysical Society (Internacional). (Dotación económica de U\$S 820)
- Mención Mejor Poster de la Sección Biofísica de la 7° Jornada de la Seccional Bioquímica y Biología Molecular, Sociedad Uruguaya de Biociencias (SUB) 2011. Por: **Rol del Surfactante Pulmonar en la Lesión Pulmonar Aguda: desde la Fisiopatología a aspectos Biofísicos de su función**, (Nacional).

6.1.3.Proyecto o Becas

3. Beca de Movilidad de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (BE_MOV_2010_1913). Para la realización de una pasantía en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid-España. Bajo la supervisión de la Prof. Cristina Casals.
4. Beca de Finalización de Maestría, Comisión de Posgrados Académicos, Universidad de la República (2012).
5. Proyecto I+D-2012 CSIC, Proyecto "Surfactante Pulmonar durante la Lesión Pulmonar Aguda: Abordaje funcional estructural y terapéutico." Responsable Académico: Leonel Malacrida.
6. Proyecto de Iniciación a la Investigación ANII, Proyecto "Buscando en la evolución estrategias terapéuticas para la lesión pulmonar: ¿Existe un surfactante pulmonar terapéutico patología específico?", Responsable: Rosina Toledo, Tutor: Leonel Malacrida.

6.2. Códigos MatLab

A continuación se proveen los código para el calculo de espectros medios, GP, CM y SP en primer y segundo armónico en MATLAB, el código reconoce 4 columnas contiguas en un archivo .csv (λ/IF) y calcula el valor medio para los tres primeros espectros restando el blanco que se definió siempre a la posición 4 del holder de celdas en nuestro fluorimetro (esto ha sido realizado en colaboración con el MSc. Magdalena San Róman).

```
7. function
   [mgp,sgp,mcm,scm,mgil,sgil,msil,ssil,sgi2,sgi2,msi2,ssi2]=gp_cm_sp(
   L,condicion,lambd1,lambd2)
8.
9. % corrijo por el control
10. L_c=L.data(:,1:6);
11. for i=2:2:6;
12. L_c(:,i)=L.data(:,i)-L.data(:,8);
13. end
14.
15. %% plot de espectros corregidos
16. if condicion==1
17. color='b';
18. elseif condicion==2
19. color='g';
20. elseif condicion==3
21. color='r';
22. elseif condicion==4
23. color='m';
24. elseif condicion==5
25. color='c';
26. end
27.
28. figure(1)
29. plot(L_c(:,1),mean([L_c(:,2) L_c(:,4) L_c(:,6)],2),color)
30. xlabel('lambda')
31. ylabel('I (a.u.)')
32. hold on
33.
34. %%%
35. ix_lambda1=find(L_c(:,1)==lambd1);
36. ix_lambda2=find(L_c(:,1)==lambd2);
37.
38. %%% GP
39. gp=[];
40. for i=2:2:size(L_c,2)
41. gp=[gp (L_c(ix_lambda1,i)-
   L_c(ix_lambda2,i))/(L_c(ix_lambda1,i)+L_c(ix_lambda2,i))];
42. end
43. mgp=mean(gp);
44. sgp=std(gp)/(length(gp))^(1/2);
```

```

45.
46. % figure(2)
47. % plot(ejex,mgp,'b*',ejex,mgp)
48. % errorbar(ejex,mgp,sgp)
49. % xlabel('ejex')
50. % ylabel('gp')
51. % hold on
52.
53. %%% CM
54. cm=[];
55. for i=2:2:size(L_c,2)
56. cm=[cm sum(L_c(:,i)./(L_c(:,i-1)*1e-7))/sum(L_c(:,i))];
57. end
58. mcm=mean(cm);
59. scm=std(cm)/(length(cm))^(1/2);
60.
61. %%% spectral phasor calculation
62.
63. hn=1;%numero de armonico
64. w=2*pi/((max(L_c(:,1))-min(L_c(:,1)))*1e-7);
65.
66. % Gi
67. gi=[];
68. for i=2:2:size(L_c,2)
69. gi=[gi sum(L_c(:,i).*cos(hn*w*(L_c(:,i-1)*1e-
70. 7))./sum(L_c(:,i)))]];
71. end
72. mgil=mean(gi);
73. sgil=std(gi)/(length(gi))^(1/2);
74.
75. % Si
76. si=[];
77. for i=2:2:size(L_c,2)
78. si=[si sum(L_c(:,i).*sin(hn*w*(L_c(:,i-1)*1e-
79. 7))./sum(L_c(:,i)))]];
80. end
81. msil=mean(si);
82. ssil=std(si)/(length(si))^(1/2);
83.
84. hn=2;%numero de armonico
85. w=2*pi/((max(L_c(:,1))-min(L_c(:,1)))*1e-7);
86.
87. % Gi
88. gi=[];
89. for i=2:2:size(L_c,2)
90. gi=[gi sum(L_c(:,i).*cos(hn*w*(L_c(:,i-1)*1e-
91. 7))./sum(L_c(:,i)))]];
92. end
93. mgi2=mean(gi);
94. sgi2=std(gi)/(length(gi))^(1/2);
95.
96. % Si
97. si=[];

```

```

95. for i=2:2:size(L_c,2)
96. si=[si sum(L_c(:,i).*sin(hn*w*(L_c(:,i-1)*1e-
    7))./sum(L_c(:,i)))];
97. end
98. msi2=mean(si);
99. ssi2=std(si)/(length(si))^(1/2);

```

Hoja 2

```

clear all
close all
clc
%%
condicion=input('condicion (del 1 al 5): '); % cada condicion
corresponde a una serie distinta, por ejemplo para ver el efecto de
sevofluorano

ejex=input('ingrese vector con valores de ejex ([x1 x2]): '); %[x1 x2
x3 ...]

lambda1=input('ingrese valor para lambda 1 (440, 340 etc): ');
lambda2=input('ingrese valor para lambda 2 (490, 400 etc): ');
%%

% v_gp=zeros(condicion,length(ejex));
% v_sgp=zeros(condicion,length(ejex));
% v_cm=zeros(condicion,length(ejex));
% v_scm1=zeros(condicion,length(ejex));
% v_gil=zeros(condicion,length(ejex));
% v_sil=zeros(condicion,length(ejex));
% v_cm2=zeros(condicion,length(ejex));
% v_scm2=zeros(condicion,length(ejex));
% v_gi2=zeros(condicion,length(ejex));
% v_si2=zeros(condicion,length(ejex));

for j=1:condicion
    for i=1:length(ejex)
        existe=input(['analizar condicion ' num2str(j) 'en ejex='
num2str(ejex(i)) '? (si=1, no=0) ' ]);
        if existe==1
            [FileName,PathName] = uigetfile('*.csv',['Selec. archivo
de condicion' num2str(j) 'y ejex = ' num2str(ejex(i))]);
            disp(FileName)
            L=open(FileName);

            % gp y cm

[mgp,sgp,mcm,scm,mgil,sgil,msil,ssil,mgil2,sgil2,msi2,ssi2]=gp_cm_sp(L,j
,lambda1,lambda2);

            v_gp(j,i)=mgp;
            v_sgp(j,i)=sgp;
            v_cm(j,i)=mcm;
            v_scm(j,i)=scm;
            v_gil(j,i)=mgil;
            v_sgil(j,i)=sgil;

```

```

        v_sil(j,i)=msil;
        v_ssi1(j,i)=ssi1;
        v_gi2(j,i)=mgi2;
        v_sgi2(j,i)=sgl2;
        v_si2(j,i)=msi2;
        v_ssi2(j,i)=ssi2;
    end
end
end
%% plot

for k=1:condicion

    if k==1
        color='b*';
    elseif k==2
        color='g*';
    elseif k==3
        color='r*';
    elseif k==4
        color='m*';
    elseif k==5
        color='c*';
    end

    figure(2)
    hold all
    p2=plot(ejex,v_gp(k,:),color);
    errorbar(ejex,v_gp(k,:),v_sgp(k,:),color)
    xlabel('% Cholesterol')
    ylabel('GP')

    figure(3)
    hold all
    p3=plot(ejex,v_cm(k,:),color);
    errorbar(ejex,v_cm(k,:),v_scm(k,:),color)
    xlabel('% Cholesterol')
    ylabel('Center of spectral mass (CM, cm-1)')

    if k==1
        color2='b';
    elseif k==2
        color2='g';
    elseif k==3
        color2='r';
    elseif k==4
        color2='m';
    elseif k==5
        color2='c';
    end

    figure(4)
    hold all
    ra=1;
    [x,y,z]=cylinder(ra,200);
    plot(x(1,:),y(1:,:),'k:');
    axis equal
    p4=plot(v_gil(k,:),v_sil(k,:),color);

```

```

errorbarxy(v_gi1(k,:),v_si1(k,:),v_sgi1(k,:),v_ssi1(k,:),{color,color2
,color2})
xlabel('G')
ylabel('S')
title('primer armonico')

figure(5)
hold all
ra=1;
[x,y,z]=cylinder(ra,200);
plot(x(1,:),y(1:,:),'k:');
axis equal
p5=plot(v_gi2(k,:),v_si2(k,:),color);

errorbarxy(v_gi2(k,:),v_si2(k,:),v_sgi2(k,:),v_ssi2(k,:),{color,color2
,color2})
xlabel('G')
ylabel('S')
title('segundo armonico')
end

```

Ejemplo de resultados para comportamiento termotrópico de LAURDAN en membranas de surfactante pulmonar, gráficos del espectro medio para cada situación, vector gp, cm, gi1 vs si1 (SP primer armónico), gi2 vs si2 (SP segundo armónico), todos los vectores son graficados con sus respectivos errores estándar medio. La rutina permite hacer análisis de espectros de excitación y emisión.

