

CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA
INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS

PROPIEDADES BIOFÍSICAS, ANTI-INFLAMATORIAS Y ANTIBACTERIANAS DE
SURFACEN® Y SU PROTECCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO POR LA SP-A.

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO CIENTÍFICO
DE DOCTOR EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

Autora: Lic. Odalys Blanco Hidalgo
Tutor: Roberto Faure García, DrC
Jesús Pérez Gil, DrC

CIUDAD DE LA HABANA
AÑO 2005

A:

Mis padres

Mi hija

Mi hermano

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento inmenso a mi tutor Dr. Roberto Faure García, ya que desde los inicios de mi desempeño en esta actividad tuve el privilegio de tener a mi lado a un verdadero científico y a una persona cuyas cualidades humanas son excepcionales, por tanto no me queda más que decir que he tenido mucha suerte.

Asimismo agradezco a mí también tutor Profesor Jesús Pérez Gil, de la Universidad Complutense de Madrid, por confiar en mí sin conocerme, por decirlo de alguna manera, y brindarme la posibilidad de poder intercambiar y trabajar con una personalidad reconocida en el campo del surfactante pulmonar, parte de los resultados de esta tesis, han sido posibles gracias a su colaboración; a su vez me dio la oportunidad de conocer a las personas maravillosas y jóvenes de su grupo de trabajo.

Un reconocimiento especial al Dr. René Delgado Hernández, del CQF, quien me brindo todo su apoyo material y su conocimiento en el campo de la inflamación, parte de los resultados de esta tesis, han sido posibles gracias a su ayuda directa y a su espíritu de colaboración.

Un agradecimiento al CENSA, el cual me ha permitido desarrollarme como investigadora, constituyendo una verdadera escuela.

Que decir de la Dra. Eva Marrero Faz, que me ha brindado su apoyo incondicional y asesoramiento desde siempre y últimamente se convirtió en la persona de elección encontrando una solución a todas las situaciones que se presentan en estos menesteres, lo cual ha podido solventar gracias a su reconocido prestigio. Asimismo el Dr. Octavio Fernández Limia siempre vinculado al tema me brindó todas sus lógicas reflexiones.

Quiero agradecer a mis compañeras de laboratorio Janet y Elizabeth, las cuales se vincularon en el tema del surfactante y juntas hemos transitados por experimentos, interpretaciones y toma de decisiones. Un especial agradecimiento a la técnico Ana Gloria ya que juntas hemos trabajado todos estos años.

A todos mis compañeros del grupo de Química-Farmacología-Toxicología, en especial a Arturo que siempre ha estado pendiente de mi doctorado. También a Yuleyvis que junto a Elizabeth hemos hecho un trío muy afín, a las que considero mis amigas.

A su vez agradezco la ayuda brindada por parte de Yamilka, Amalia y Nivian del laboratorio de Microbiología.

Quisiera a su vez agradecerle a mi pequeña hija, realmente una niña excepcional y tan lógica como un día que después de ayudar a su mamá en tantas labores hogareñas hizo una reflexión especial: *“bueno mamá, lo único que me falta....., es hacerte la tesis”*. Para ella que este esfuerzo le represente que en la vida las cosas no son nada fáciles, pero mucho más importante, por tanto, que sea capaz de elegir para su vida lo que ella desee.

Asimismo le agradezco a mi hermano, que me ha hecho la vida más cómoda, sin cuestionarme ni exigirme nada. Y a mi cuñada, la cual ha asumido momentos importantes en la vida de mi hija.

Por último, gracias a mis padres, ya que en ultima instancia son los que han padecido mis malos momentos, los que han vivido día a día conmigo este gran esfuerzo, a ellos les debo lo que soy y en consecuencia aquí les brindo el resultado de todos estos años.

SÍNTESIS

El objetivo del presente estudio fue demostrar que las propiedades biofísicas de SURFACEN[®] son similares al surfactante natural, que posee propiedades anti-inflamatorias y antibacterianas a la vez que la SP-A porcina lo protege del daño ocasionado por especies reactivas del oxígeno. Los resultados mostraron que SURFACEN[®] presenta propiedades interfaciales similares al surfactante natural, incluyendo la presencia de rápidas transiciones bicapa-monocapa, bajas tensiones superficiales y estabilidad durante ciclos repetidos de compresión-expansión. Estas propiedades resultaron ser superiores a las de un surfactante exógeno comercial. Desde el punto de vista estructural, las películas de SURFACEN[®] muestran procesos de separación lateral de fases similares a los del surfactante nativo y propiedades termotrópicas consistentes en transiciones de fases complejas. En conjunto, estas características funcionales y estructurales reproducen en gran medida el comportamiento del sistema surfactante nativo. Además se demostró que SURFACEN[®] posee propiedades anti-inflamatorias evidenciadas en su capacidad de disminuir el edema pulmonar, la MPO, el MDA, las células inflamatorias totales y restablecer la relación macrófago:PMN en modelo *in vivo* de inflamación, así como inhibir el TNF α y la ICAM-1 *in vitro*. Por otra parte fue capaz de poseer un efecto antibacteriano sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. También demostró que la SP-A porcina posee propiedades antioxidantes, evidenciadas por su capacidad secuestradora del $\cdot\text{OH}$, su posible actividad quelante de hierro y su protección a mitocondrias y microsomas en los modelos *in vitro* evaluados, asimismo la SP-A porcina protege al SURFACEN[®] de la acción oxidativa ejercida por el HClO y el $\cdot\text{OH}$ debido a la inhibición de la peroxidación lipídica lo que se refleja en la menor modificación de las propiedades tensioactivas y en la protección en los PUFA. Este estudio aportó una caracterización en detalle de las propiedades biofísicas de SURFACEN[®], demostró por primera vez las propiedades anti-inflamatorias y antibacterianas de SURFACEN[®] así como las propiedades antioxidantes de la SP-A porcina brindándose datos experimentales que contribuyen a la comprensión de su mecanismo de acción. Estos resultados en su conjunto permiten considerar que SURFACEN[®] constituye un producto potencialmente útil para el tratamiento de pacientes con SDRA y su enriquecimiento con SP-A permitirá disponer de una preparación farmacéutica más eficiente.

INDICE	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	2
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Surfactante Pulmonar	12
2.2 Composición bioquímica general	12
2.2.1 Fracción proteica	12
2.2.1.1 Estructura de la SP-A	13
2.2.1.2 Estructura de la SP-B	16
2.2.1.3 Estructura de la SP-C	16
2.3 Funciones biológicas	17
2.3.1 Tensión superficial. Función tensoactiva	17
2.3.1.1 Papel de los lípidos y las proteínas. Teoría del squeeze out	19
2.3.1.2 Métodos de evaluación de la actividad tensoactiva	22
2.3.2 Funciones de defensa del surfactante pulmonar	24
2.4 Clasificación	27
2.5 Síndrome de Distres Respiratorio Agudo	27
2.5.1 Modelos de daño agudo pulmonar	28
2.5.2 Terapia con surfactante	30
3. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES INTERFASIALES, MORFOLÓGICAS Y TERMOTRÓPICAS DE SURFACEN [®] .	32
3.1 Introducción	32
3.2 Materiales y Métodos	33
3.2.1 Reactivos	33
3.2.2 Productos utilizados	34
3.2.3 Isotermas π -A en la Balanza de Wilhelmy	34
3.2.4 Isotermas de compresión π -A e imágenes de transiciones de fase en películas interfaciales por microscopia de fluorescencia.	35
3.2.5 Determinación de las características termotrópicas.	35
3.3 Análisis estadístico	35
3.4 Resultados	36
3.4.1 Isotermas π -A en la Balanza de Wilhelmy	36
3.4.1.1 Isotermas de compresión π -A e imágenes de transiciones de fases en películas interfaciales por microscopia de fluorescencia.	
3.4.1.2 Características termotrópicas.	38
3.5 Discusión.	39
3.6 Conclusión.	43
4. EFECTO ANTI-INFLAMATORIO Y ANTIBACTERIANO DE SURFACEN [®]	45
4.1 Introducción.	45

4.2 Materiales y Métodos.	46
4.2.1 Reactivos.	46
4.2.2 Animales.	46
4.2.3 Modelo de inflamación <i>in vivo</i> .	47
4.2.3.1 Modelo de choque séptico en ratones inducido por lipopolisacarido.	47
4.2.3.2 Modelo de daño agudo pulmonar en ratas inducido por LPS	47
4.2.4 Modelo de inflamación en líneas celulares.	48
4.2.4.1 Determinación de la concentración de TNF α en monocitos activados por el ensayo de citotoxicidad en la línea celular L 929.	48
4.2.4.2 Determinación de la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 por el método colorimétrico con -(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).	
4.2.5 Actividad antibacteriana.	49
4.2.5.1 Condiciones del cultivo y preparación del inóculo	49
4.2.5.2 Determinación del crecimiento bacteriano por el método suspensión cuantitativa por dilución y conteo	50
4.3 Análisis estadístico.	50
4.4 Resultados.	50
4.4.1 Evaluación de SURFACEN [®] en un modelo de choque séptico inducido por LPS.	51
4.4.1.2 Efecto de SURFACEN [®] en un modelo de daño agudo pulmonar inducido por LPS.	51
4.4.2 Efecto de SURFACEN [®] en la producción de TNF α y en la expresión de ICAM-1.	51
4.4.3 Efecto del SURFACEN [®] sobre el crecimiento bacteriano.	52
4.5 Discusión.	52
4.6 Conclusión.	57
 5. EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA SP-A PORCINA SOBRE SURFACEN [®] EXPUESTO A DAÑO OXIDATIVO.	 59
5.1 Introducción.	59
5.2 Materiales y Métodos.	60
5.2.1 Reactivo.	60
5.2.2 Secuestro de $\cdot$ OH y unión al Hierro (Ensayo de la 2-desoxi-D-ribosa)	61
5.2.3 Aislamiento de mitocondrias y microsomas.	61
5.2.3.1 Peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas por el sistema Fenton.	62
5.2.3.2 Extracción de lípidos y análisis de ácidos grasos por cromatografía gaseosa.	62
5.2.4 Secuestro de HOCL	62
5.2.4.1 Actividad tensoactiva en el Surfactometro de Burbuja pulsátil	63
5.2.4.2 Determinación del MDA	63
5.2.5 Peroxidación lipídica de SURFACEN [®] por el sistema Fenton	63
5.2.6 Determinación de la composición de ácidos grasos de cada tipo	

De fosfolípido en SURFACEN®	64
5.3 Análisis estadístico	64
5.4 Resultados	64
5.4.1 Efecto de la SP-A en el secuestro del radical ·OH y en la capacidad quelante de hierro por el ensayo de la 2-desoxi-D-ribosa.	64
5.4.2 Efecto de la SP-A en la peroxidación lipídica estimulada por hidroperóxido de ácido linoleico.	66
5.4.2.1 Composición de ácidos grasos de los lípidos presentes en mitocondrias y microsomas de ratas.	67
5.4.3 Efecto protector de la SP-A sobre el SURFACEN® expuesto a HCLO	68
5.4.4 Efecto protector de la SP-A sobre SURFACEN® expuesto al radical ·OH.	69
5.4.4.1 Composición de los ácidos grasos de cada tipo de fosfolípido presente en SURFACEN®	70
5.5 Discusión.	70
5.6 Conclusión.	78
6. DISCUSIÓN GENERAL	80
7. CONCLUSIÓN GENERAL	93
8. RECOMENDACIONES	95
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
GLOSARIO	

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Distrés Respiratorio del Neonato (SDRN) o enfermedad de membrana hialina se caracteriza porque los neumocitos tipo II al ser inmaduros no pueden sintetizar y secretar el surfactante pulmonar (Avery y Mead, 1959). En los inicios de la década de los años 80 del siglo XX, la aplicación terapéutica de un surfactante pulmonar natural de origen bovino, cuyo nombre comercial es *SURFACTANT TA*[®], a neonatos con SDRN (Fujiwara y col., 1980), revolucionó por completo la práctica médica en estos pacientes.

Las investigaciones en el campo de los surfactantes aumentan sus perspectivas al conocerse que otras enfermedades respiratorias tales como el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA), las neumonías, la aspiración por meconio, el asma, entre otras, dan lugar a una alteración secundaria del sistema surfactante, si bien su etiología comprende fenómenos más complejos que incluyen procesos inflamatorios que conllevan a la inactivación o inhibición del surfactante.

En pacientes con SDRA hay evidencias de disfunción del surfactante de manera que la actividad superficial se encuentra dañada, produciéndose un incremento en los agregados inactivos del surfactante y un efecto inhibitorio de las proteínas del suero sobre el sistema surfactante (Robertson, 1998). En Estados Unidos se plantea una mortalidad aproximada del 40 % a pesar de la ventilación mecánica y el suplemento con oxígeno, con una prevalencia del 0,07 % y una incidencia que es difícil de cuantificar debido a la variedad de causas del mismo, que se estimó de 1,5 a 77 casos en una población de 100 000 por año, por lo que aún en nuestros días es un fenómeno no resuelto (Hudson y Steinberg, 1999).

Los diferentes ensayos clínicos abordados hasta la fecha para desarrollar la aplicación de técnicas de suplementación con surfactante exógeno en pacientes con SDRA, han resultado

infructuosos (Lewis y Veldhuizen, 2003), los que pueden estar relacionados con el tipo de surfactante empleado (en la mayoría de los casos muy diferentes de los surfactantes en su forma nativa, y por tanto, probablemente subóptimos) y con la causa primaria de la disfunción respiratoria, que en la mayoría de los ensayos abordados es múltiple y hace que la alteración del surfactante que se trata de revertir sea, con toda probabilidad, de muy diversa naturaleza (y posiblemente requiriendo diversa estrategia terapéutica).

Los resultados exitosos en la clínica en los años 80 del siglo XX, propiciaron las investigaciones de la relación estructura-función de los diferentes componentes del surfactante, poniéndose de manifiesto la importancia que poseen en la función tensioactiva, dirigido por una parte a obtener aproximaciones que permitan un mejor entendimiento de su funcionamiento *in vivo* y a su vez poder desarrollar preparaciones de surfactante enteramente sintéticas. Sin embargo, la mayoría de estos análisis se han llevado a cabo en modelos muy simplificados, en los que se han analizado propiedades interfaciales de mezclas muy sencillas de lípidos o de lípidos y proteínas.

Además del SURFACTANT TA[®] (Tokoyo Tanabe Japón) existen 5 surfactantes naturales exógenos producidos por las grandes compañías farmacéuticas, estos son: SURVANTA[®] (variante americana del SURFACTANT TA[®]) (Laboratorios Abbot, EE.UU), ALVEOFACT[®] (Boehringer Ingelheim, Alemania) CUROSURF[®] (Chiesi Pharmaceuticals, Italia) INFASURF[®] (Laboratorios Forest, EE.UU) BLES[®] (BLES Biochem Canadá). A estos pocos se le adiciona el SURFACEN[®], desarrollado en Cuba (CENSA) (Manzanares y col., 1995).

La composición bioquímica de estos surfactantes, de forma general, se caracteriza por la presencia de alto contenido en fosfolípidos (PL), en particular de fosfatidilcolina (PC) y su especie saturada con palmitico, la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). También contienen un elevado porcentaje de algunos fosfolípidos aniónicos inusuales en las membranas de otros tejidos animales, como fosfatidilglicerol (PG) o fosfatidilinositol (PI), y un pequeño porcentaje de ciertas proteínas hidrófobas específicas, conocidas como SP-B y SP-C (Creuwels y col., 1997).

A pesar de estos aspectos comunes, existen diferencias en la composición bioquímica de estos surfactantes. Estas diferencias están basadas en la fuente y el método de obtención. Los surfactantes obtenidos de lavado pulmonar transitan por un proceso más sencillo porque el material de partida está menos contaminado con componentes plasmáticos y tisulares ajenos al surfactante, que puedan dañar la propiedad tensioactiva del surfactante pulmonar. Dentro de este tipo de surfactantes se encuentran ALVEOFACT[®], INFASURF[®], BLES[®] y SURFACEN[®]. Los tres primeros obtenidos a partir de fuente bovina y el último de fuente porcina. Cuando el surfactante es obtenido de pulmones triturados es necesario un procesamiento más riguroso ya que el material tiene un mayor componente de PL de las membranas y de las lipoproteínas plasmáticas, y en consecuencia menor contenido de DPPC, lo cual no favorece las propiedades interfaciales. Los obtenidos por esta vía son CUROSURF[®] y SURVANTA[®]. Esta situación obligó a realizar pasos adicionales para llegar a una composición tensioactiva eficaz, de manera tal que SURVANTA[®] fue suplementado con DPPC, tripalmitina (TP) y ácido palmítico (AP) y CUROSURF[®] se purificó mediante una cromatografía que da lugar a la eliminación completa de lípidos neutros.

SURFACEN[®] se caracteriza por presentar en su composición bioquímica el mayor contenido de PI que se haya informado para todos los surfactantes exógenos comerciales y a su vez el mayor de PL aniónicos. Esto se debe a que el PI es el principal componente PL aniónico en el surfactante porcino, a diferencia de la mayoría de las especies de mamífero, donde la cantidad de PG es mayor que la de PI. En cualquier caso, en la literatura se informa de que el PG y el PI, pero no otros PL aniónicos, tienen propiedades equivalentes en cuanto a promover buen comportamiento tensioactivo en el surfactante. No obstante la presencia de PI podría ofrecer cierta superioridad en promover la adsorción de DPPC en comparación con el PG (Pérez Gil y col., 1992).

Por otra parte las técnicas de producción de muchos de los surfactantes exógenos dan lugar a una eliminación muy significativa de la proporción de lípidos neutros, fundamentalmente de colesterol. Sin embargo, el colesterol (CL) puede ser un componente importante del surfactante (como lo es de todas las membranas de las células animales), y aunque

tradicionalmente se ha considerado un lípido perjudicial para la actividad tensioactiva de las preparaciones surfactantes, estudios recientes han puesto de manifiesto que la presencia del colesterol, en el contexto de la complejidad composicional del surfactante nativo, es esencial para organizar la estructura lateral de las membranas y monocapas de surfactante. Esta estructura podría ser esencial para la adecuada dinámica interfacial de este material (Bernardino de la Serna y col., 2004).

La elección de un surfactante ideal o adecuado para las enfermedades respiratorias diferentes al SDRN transita por una rigurosa investigación básica de la relación estructura función de los componentes del surfactante, y existen datos para pensar que se ha subestimado de forma muy sistemática la importancia funcional tanto de algunos componentes lipídicos minoritarios así como de aquellas estructuras en la cual quedan ensambladas las diferentes especies lipídicas y proteicas del surfactante. Esto probablemente ha llevado a la utilización en la medicina respiratoria actual de preparaciones surfactantes suboptimizadas. Debido a esto se puede inferir que la utilización de un surfactante mucho más parecido al natural, tal y como se aísla de las vías aéreas, tiene mayor probabilidad de éxito en los modelos de SDRA en animales.

Debido a esta problemática, en la actualidad se trabaja en la evaluación de las propiedades biofísicas de las preparaciones de surfactantes comerciales así como de su material de origen para obtener una caracterización más profunda de las propiedades interfaciales y estructurales relacionándolas con la composición bioquímica detallada del mismo que comprende las especies moleculares de la PC (Bernhard y col., 2000) y con mayor hincapié en sus especies minoritarias tales lípidos neutros, plasmalógenos y ácidos grasos insaturados (Rüdiger y col., 2005). En este sentido se han informado cantidades diferentes de las especies minoritarias lipídicas en varias preparaciones de surfactantes comerciales lo cual se traduce en diferencias en la viscosidad de superficie y por tanto en las propiedades biofísicas de los mismos.

SURFACEN[®] ha sido evaluado en cuanto a sus propiedades interfaciales en el Surfactómetro de burbuja pulsátil, demostrando que es un tensioactivo capaz de disminuir la tensión superficial a valores cercanos a 0 mN/m (Manzanares y col., 1995). Independientemente de

que un buen surfactante es aquel que alcance bajas tensiones superficiales, a la luz de los nuevos conocimientos, en los cuales se concibe a la monocapa de superficie activa en estrecha unión con el reservorio de surfactante (Shürch y col., 1995), es necesario conocer otros indicadores biofísicos los cuales al menos pueden ser brindados en los estudios actuales que se llevan a cabo en condiciones de concentración de surfactante menores, tales como los que se realizan en la Balanza de Wilhelmy. Asimismo actualmente se empieza a brindar información acerca de las transiciones de fases del sistema surfactante. En el caso de SURFACEN[®] no se disponen de estos estudios.

La sugerencia de aplicar la terapia con surfactante a otras patologías respiratorias estuvo sustentada además en otras propiedades diferentes a la tensioactiva que posee el surfactante pulmonar, las que serían esenciales para tratar de revertir o al menos atenuar el proceso complejo de carácter inflamatorio y oxidante que comprende su patofisiología. El surfactante está vinculado a los mecanismos de la defensa innata en el pulmón, al constituir la primera barrera frente a los patógenos inhalados en el mismo (Wright, 1997).

En la actualidad, se encuentran en estudio las propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y antibacterianas del surfactante pulmonar y sus preparaciones comerciales obteniéndose diferentes resultados en dependencia de la preparación. Se cuenta con resultados que avalan las propiedades inmunomoduladoras del surfactante y asimismo los resultados revelan diferencias significativas entre las preparaciones de surfactante (Tegtmeyer y col., 1996). En cuanto a la actividad antibacteriana se disponen de pocos trabajos relacionados con la influencia directa del surfactante pulmonar así como de las preparaciones comerciales sobre el crecimiento bacteriano y estos han sido divergentes (Jonsson y col., 1986; Neumeister y col., 1996 y Rauprich y col., 2000). En este sentido los estudios dirigidos a conocer estas propiedades, no relacionadas con la capacidad tensioactiva en SURFACEN[®], no se han realizado.

Por otra parte, una línea de investigación actual en el campo del surfactante postula la posibilidad de la adición de la SP-A a las preparaciones de surfactante comerciales existentes

o las nuevas sintéticas, para reproducir las propiedades completas de este material. Esta estrategia se sustenta en la compleja etiología de las alteraciones respiratorias que ocurren por ejemplo en el SDRA, por lo que puede inferirse que las características de un surfactante exógeno, designado para el tratamiento de una disfunción pulmonar secundaria a una infección y por ende a una inflamación pulmonar son diferentes de aquellas requeridas para tratar una deficiencia primaria de surfactante en pulmones inmaduros. A su vez esta basado en las propiedades de defensa que presenta la SP-A en el epitelio respiratorio. La función de la SP-A ante el estrés oxidativo en el pulmón adquiere una connotación especial en el SDRA y los resultados hasta el presente son contradictorios (Wright, 1997) siendo de particular interés conocer su efecto en el surfactante expuesto a especies reactivas del oxígeno.

Tomando en consideración estos elementos se plantea la siguiente Hipótesis de trabajo:

SURFACEN[®] posee propiedades biofísicas similares al surfactante natural, exhibe actividad anti-inflamatoria y antibacteriana; y la SP- A lo protege del daño oxidativo.

Objetivo General:

Demostrar que las propiedades biofísicas de SURFACEN[®] son similares al surfactante natural, que posee propiedades anti-inflamatorias y antibacterianas a la vez que la SP-A porcina lo protege del daño ocasionado por especies reactivas del oxígeno.

Para dar respuesta a este objetivo general se formularon los siguientes objetivos:

- Determinar las propiedades biofísicas de SURFACEN[®] teniendo en cuenta la evaluación de las características interfaciales mediante isothermas presión-área (π -A), las morfológicas a través de microscopía de fluorescencia y su comportamiento termotrópico mediante calorimetría diferencial de barrido, en comparación con otras preparaciones de surfactante homólogas.

- Determinar el efecto anti-inflamatorio de SURFACEN[®] en modelos de choque séptico y de daño agudo pulmonar, conocer su efecto sobre el TNF α y ICAM 1 *in vitro*, así como su propiedades antimicrobianas en bacterias Gram positivas y Gram negativas *in vitro*.
- Determinar las propiedades antioxidantes de la SP-A porcina a nivel químico, en microsomas y mitocondrias, así como su protección al SURFACEN[®] expuesto al daño oxidativo por el HCLO y el radical $\cdot$ OH.

Al cumplimentar los objetivos trazados en el presente trabajo se habrán aportado los siguientes aspectos novedosos:

- Se caracterizan propiedades biofísicas hasta ahora no evaluadas del surfactante pulmonar cubano SURFACEN[®].
- Se refiere por primera vez, las propiedades anti-inflamatorias y antibacterianas que posee SURFACEN[®].
- Se informa, por primera vez, las propiedades antioxidantes de la SP-A porcina y se presentan datos experimentales que contribuyen a la comprensión de su mecanismo de acción.
- Se brindan los resultados de algunos ensayos farmacológicos preclínicos que permiten fundamentar la aplicación terapéutica de SURFACEN[®] en pacientes con SDRA y su enriquecimiento con SP-A permitirá disponer de una preparación farmacéutica más eficiente.

Publicaciones que contienen los resultados que se presentan en la tesis:

- Isolation of surfactant protein A, SP-A, from bronchoalveolar porcine lavage. **Odalys Blanco**, Janet Sánchez, Dahis Manzanares y Octavio Fernández. 2000. *Revista de Salud Animal* 22: 180-182.
- Surfactant protein A inhibit the non enzymatic lipid peroxidation of porcine lung surfactant. Odalys Blanco and Angel Catalá. 2001. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 65: 185-190.

- Efecto protector de la proteína SP-A porcina sobre el SURFACEN expuesto a ácido hipocloroso. Janet Sánchez Calero, **Odalys Blanco Hidalgo**, Elizabeth de Armas Sanabria, Gregorio Martínez Sánchez, Roberto Faure García y Octavio Fernández Limia. 2002. Revista Cubana de Farmacia 36: 58-60.
- Administración intratraqueal de lipopolisacárido induce infiltración y activación de neutrófilos en pulmón. Elizabeth, de Armas, **Odalys Blanco**, Janet, Sánchez, R. Delgado, J. M. Figueredo, O. Fernández y R. Faure. 2004. Revista Salud Animal 26:
- Propiedades antiinflamatorias del surfactante pulmonar y su aplicación en la clínica. **Odalys Blanco**. 2004. Revista Biotecnología Aplicada.21: 70-76.
- Some anti-inflammatory properties of a natural pulmonary surfactant SURFACEN. **Odalys Blanco** Hidalgo, Amada Beltrán, Deyarina González, Octavio Fernández Limia, Roberto Faure García y René Delgado. 2000. Applied Cardiopulmonary Pathophysiology, 9: 201 –203.
- La proteína A del surfactante porcino (SP-A) exhibe propiedades antioxidantes en el sistema Fenton. Janet Sánchez Calero, **Odalys Blanco Hidalgo**, Gregorio Martínez Sánchez, Elizabeth de Armas Sanabria, Octavio Fernández Limia y Roberto Faure García. 2003. Revista Mexicana Ciencias Farmacéuticas 34: 19-22.

Otras publicaciones relacionadas con el tema

- Effect of SURFACEN in Carrageenan-Induced Pleurisy. **Odalys Blanco**, Vivian Molina, Daysi Carvajal, O. Fernández y R. Faure. 2004. Applied Cardiopulmonary Pathophysiology 13: 21-23.

Presentaciones en Congresos Nacionales e Internacionales:

- I Congreso Internacional de Farmacología, 1998
- IV y V Taller “Surfactante Pulmonar”, CENSA,
- Seminario Nacional de Ciencias Básicas Médicas. Julio 1999
- *I Taller Nacional sobre Mediadores de la Inflamación*, Soc. Cubana de Farmacología, La Habana, Febrero 2000.
- *II Taller Nacional sobre Mediadores de la Inflamación*, Soc. Cubana de Farmacología. Surfactante Pulmonar: Funciones inmunomodulatorias. La Habana, Noviembre, 2001.

- *Floating International Congress SURFACTANT*, 2000. Some anti-inflammatory properties of a natural pulmonary surfactant SURFACEN. Alemania-Suecia.
- *XVI Latinamerican Congress of Pharmacology*. Septiembre 2000. Brasil.
- *IV Simposio Internacional de Estrés Oxidativo en Biomedicina*. 2001. Evaluación “*in vitro*” de la capacidad antioxidante de la proteína SP-A. La Habana, Cuba.
- *IV Congreso Internacional de Química*. 2001. SURFACEN y SP-A: aproximaciones sobre su efecto anti-inflamatorio. La Habana, Cuba.
- *X Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina*. 2001. SP-A aproximación a sus propiedades antioxidantes. Isla Margarita, Venezuela.
- *XI Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina*. 2002. Desarrollo de un modelo de daño agudo pulmonar en ratas. Pavia, Italia.
- *Simposio Internacional sobre Interferón y Citoquinas*. 2002. SURFACEN: inhibe la liberación de TNF alfa y la expresión de ICAM-1, así como el edema pulmonar en un modelo de shock séptico. La Habana, Cuba.
- *IV Congreso Nacional de Farmacología y Terapéutica*, 2002. Efecto del SURFACEN en un modelo de daño pulmonar agudo en ratas. La Habana, Cuba.
- II, III y IV Taller Nacional sobre Mediadores de la Inflamación. 2001, 2002 y 2004.
- Seminario Internacional de Salud Animal, 2003.
- Congress SURFACTANT 2004. Alemania 30 de mayo-5 de junio 2004.
- Seminario Científico del CNIC. La Habana, junio 2005, Cuba

Premios o Reconocimientos:

- LOGRO CIENTÍFICO: “SP-A: propiedades antioxidantes”. Aprobado por el Consejo Científico del CENSA. Diciembre 2002
- Premio CITMA Provincial 2004 “Propiedades inmunomoduladoras de SURFACEN® y SP-A”.
- Propuesta a Premio Academia 2005.

Es importante destacar que SURFACEN® es un medicamento priorizado de nuestro país, declarado por la Comisión Nacional de Medicamentos, posee registro y patente en Cuba y España. Se emplea por toda la red hospitalaria de neonatología.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Surfactante Pulmonar

El surfactante pulmonar es una mezcla compleja de lípidos y proteínas, es sintetizado y secretado por los neumocitos tipo II al espacio alveolar y se encuentra en distintas formas estructurales.

2.2 Composición bioquímica general.

La composición del surfactante pulmonar es muy similar entre varias especies de mamíferos (Shelley y col., 1984). El surfactante pulmonar está compuesto por un 85-90 % de lípidos, cerca de un 10 % de proteínas y un 2% de carbohidratos (King y col., 1972). Los PL constituyen del 80 al 90% del peso de los lípidos y consisten en un 75 % de PC, un 10 % de PG, un 5% de PS más PI y menos de un 5 % de EM. Cerca de la mitad del contenido de la PC es de DPPC, constituyendo el componente mayoritario del surfactante. La DPPC se caracteriza por poseer dos ácidos grasos saturados en su estructura, siendo una molécula típica del pulmón, al compararse con la composición de PC de otras membranas. El CL es el lípido neutro mayoritario y constituye entre el 6 y 8 % del total de los lípidos, lo cual visto en cuanto a base molar, significa un 15 %, esto lo hace un constituyente fundamental del surfactante. Dentro de los componentes minoritarios se encuentran otros PL, glicéridos, ácidos grasos libres, LPL, esfingomielina (EM) y glicolípidos (Creuwels y col., 1997). Estos componentes trazas no han sido bien estudiados en relación a su contribución en el sistema surfactante. No obstante estos componentes tales como ácidos grasos, diacilglicerol (DG) y triacilglicerol (TG) han sido usados en formulaciones de surfactantes artificiales o sintéticos. Existen 4 proteínas específicas, denominadas según su orden de descubrimiento como SP-A, B, C y D (Possmayer, 1988).

2.2.1 Fracción proteica

2.2.1.1 Estructura de la SP-A

La SP-A es la proteína más abundante en el alveolo y constituye cerca del 50 % de la proteína total del surfactante. Constituye una familia de moléculas de diferentes tamaños moleculares, 26-38 kDa en condiciones reductoras, y diferentes cargas (punto isoeléctrico pH 4-5). Estas diferencias son debidas a las diferentes modificaciones post-traduccionales. Las proteínas del surfactante SP-A y SP-D son miembros de una familia de proteínas denominadas colectinas que participan en la inmunidad innata o en la respuesta inmune no mediada por anticuerpos. Las colectinas deben su nombre a la característica común en todas ellas de presentar una región N-terminal con estructura parecida a la del colágeno y otra C-terminal como lectina o dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC). Las colectinas tienen en común 18 aminoácidos altamente conservados, incluyendo 4 residuos de cisteína que forman un puente disulfuro conservado. Las colectinas son también denominadas como lectinas tipo C del grupo II porque su unión a carbohidratos requiere calcio. El dominio de lectina tipo C es encontrado en una variedad de otras proteínas, algunas de las cuales también están involucradas en la respuesta inmune (Wright, 1997).

La estructura primaria de la SP-A está caracterizada por cuatro regiones estructurales bien definidas (Figura 1): un corto segmento N-terminal que contiene un puente disulfuro intercatenario, una región con estructura similar al colágeno rica en prolina, una región hidrofóbica *neck* o *de cuello* y una región o dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) con un alto grado de homología a otros miembros de lectinas de mamíferos tipo C Ca^{2+} dependientes, especialmente a la proteína unidora de manosa (MBP) (McCormack, 1998). A continuación se relacionan las características fundamentales de cada una de las regiones:

El segmento N-terminal: El segmento N-terminal de la SP-A tiene de 8 a 11 aminoácidos dependiendo de la especie y la variación del procesamiento del N-terminal. Existen dos residuos de cisteína presentes en esta región en todas las especies examinadas, excepto en perro, el cual contiene solamente un residuo. Se comprobó que ambas cisteínas participan en la formación del puente disulfuro intercatenario en SP-A de rata y son requeridas para la formación del multímero. Existen varios aminoácidos cargados e hidrofóbicos altamente conservados flanqueando el segundo residuo de cisteína en diferentes especies (McCormack,

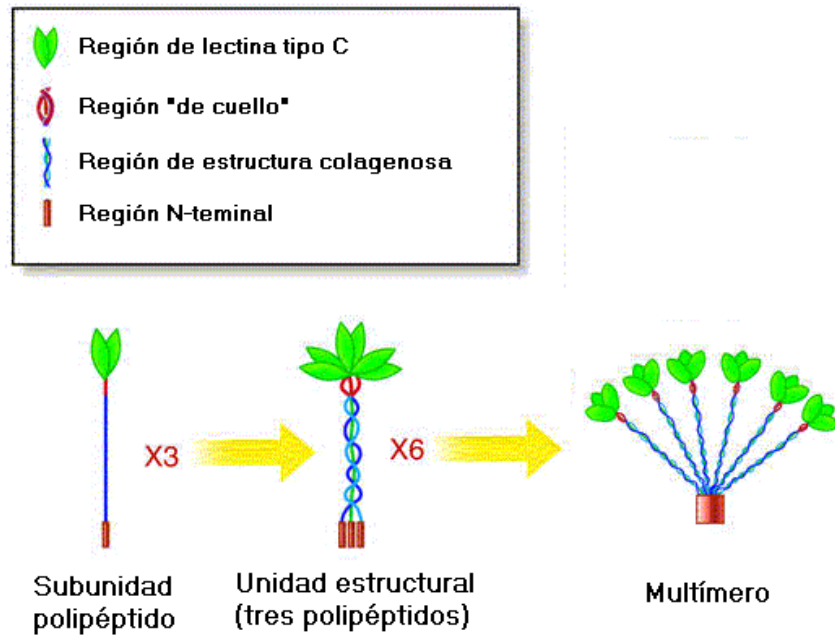


Figura 1. Representación esquemática de las regiones de la SP-A



Figura 2. Representación esquemática de la molécula de SP-B.

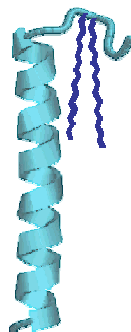


Figura 3. Representación esquemática de la molécula de SP-C

1998).

La región con estructura similar al colágeno: La región como el colágeno de la SP-A contiene una serie de 23 (humano) ó 24 (rata, conejo, perro, cerdo) repeticiones de gly-X-Y. Las estructuras primarias deducidas a partir de cDNAs en humano y rata indican el residuo de prolina en la posición “X” de 4 a 5 de las repeticiones. Las prolinas también se han encontrado presentes en la posición “Y”, de 15 a 16 repeticiones y la mayoría de ellas están hidroxiladas basado en el análisis de secuenciación de proteínas parcial del N-terminal. La presencia de hidroxiprolina en el colágeno aumenta la estabilidad de la hélice del colágeno. La primera mitad del dominio como el colágeno es la región más altamente conservada en la molécula y contiene una serie de aminoácidos cargados positiva y negativamente de manera alternada. Este patrón de cargas es conservado en las otras colectinas también. En la segunda mitad de esta región existen también aminoácidos cargados de manera alternada. Estos segmentos cargados pueden contribuir a la estabilidad de la triple hélice, a la unión al receptor común de las colectinas y/o a la asociación de la SP-A con ligandos solubles. Las dos mitades cargadas están separadas por una interrupción en la secuencia reiterativa del tripéptido y en esta región de bisagra se introduce una torcedura con un ángulo de 60°, este plegamiento también es característico de la molécula C1q que pertenece a la familia de las colectinas. Las otras colectinas conocidas contienen regiones como el colágeno continuas. El dominio como el colágeno es importante para la unión al menos a un receptor de la SP-A y para la inhibición específica de la secreción de surfactante a partir de las células tipo II, pero aún no está claro si la región como el colágeno participa en las interacciones directas proteína-proteína o si ésta amplifica la actividad de unión a ligando de otros dominios de la molécula como por ejemplo el DRC (McCormack, 1998).

La región “neck” o “de cuello”: Como en todas las colectinas, es el segmento de 38 a 40 aminoácidos entre la región como el colágeno y el dominio de lectina de la SP-A, contiene aminoácidos hidrofóbicos que pueden estar organizados dentro de repeticiones. Las cadenas de polipéptido en la región “neck” se pliegan separadamente dentro de una alfa-hélice rígida que no está asociada covalentemente, sino por fuertes fuerzas hidrofóbicas. Este modelo predice dos fases hidrofóbicas en cada cadena polipeptídica de la SP-A que son dominios de asociación potencial para cadenas adyacentes, y cuatro fases que contienen residuos polares y

cargados dirigidas hacia el solvente. Existen dos residuos cargados positivamente altamente conservados en el punto medio de esta región muy ácida (ej. His⁹⁵ y Lys⁹⁶ en la SP-A de rata). En adición a su crítico papel en el plegamiento de la proteína, el dominio “neck” puede orientar los DRC de los trímeros de la SP-A para la unión a ligandos selectivos. La estructura en solución del trímero de la MBP reveló que cada DRC está separado aproximadamente 50 Å de los otros dos. Los aminoácidos hidrofóbicos de la región final del C-terminal del dominio “neck” de la MBP forman la interfase con el DRC, y las variaciones en la secuencia en esta región de las colectinas pueden jugar un papel en determinar el alineamiento de los DRC. Existen evidencias de interacciones cooperativas entre la región *neck* y el DRC que contribuyen a las interacciones de la SP-A con las células tipo II, pero no está claro si la región *neck* de la SP-A tiene algún papel en la unión directa a ligandos (McCormack, 1998).

El dominio de DRC: Los DRC de las lectinas animales pueden ser clasificados dentro de aquellos que preferencialmente se unen a galactosa o N-acetilgalactosamina y aquellos que se unen a Manosa o N-acetilglucosamina. El DRC de la SP-A, un miembro del subgrupo de manosa, ha sido mostrado que media una variedad de interacciones incluyendo modulación de las funciones de las células alveolares tipo II, unión y agregación de PLs y reconocimiento de bacterias, virus y hongos. Esta región contiene aproximadamente 115 aminoácidos, incluyendo 4 cisteínas conservadas, las cuales forman dos puentes disulfuro intramoleculares, además de 10 residuos de aminoácido invariantes y 18 altamente conservados común a las lectinas tipo C. Existen al menos dos sitios de unión a calcio en el DRC de la SP-A y todas las funciones reportadas para el DRC son dependientes de calcio. Existen solamente dos residuos de triptófano en el DRC de todas las especies que han sido bien caracterizadas hasta el momento y ambos están localizados cerca de los sitios de unión al calcio predicho por comparación con la estructura del cristal de MBP. En esta posición los triptófanos pueden ser usados como reporteros para detectar cambios conformacionales en la región. La unión del calcio al DRC de la SP-A resulta en un incremento en la fluorescencia intrínseca y un cambio en el máximo de emisión hacia longitudes de ondas menores, indicando translocación del triptófano a un ambiente más hidrofóbico. Este cambio conformacional aumenta la resistencia a la digestión por proteasas (McCormack, 1998).

2.2.1.2 Estructura de la SP-B

La SP-B es un polipéptido de 79 aminoácidos con una masa molecular de 8.7 kDa, forma un homodímero dependiente de puentes disulfuros (Figura 2).

Contiene un 52 % de aminoácidos hidrofóbicos y por tanto se aísla junto con los PLs en el extracto cloroformo-metanol. Posee un número importante de aminoácidos básicos, resultando en una carga neta de +5. Presenta 7 cisteínas, de las cuales 6 son absolutamente conservadas lo que la clasifica como miembro de la familia de las saposinas (Weaver y Johnson, 2001). Su estructura tridimensional no ha sido determinada aún pero diferentes modelos sugieren que su conformación puede ser dominada por varias hélices anfipáticas (Cruz y col., 1995) como se ha determinado para la NK-lisina miembro de la familia de las saposinas. Aunque la orientación de la SP-B en membranas lipídicas no está clara aún, un gran número de evidencias plantean un modelo en el cual la zona polar de la hélice anfipática interactúa con los grupos de cabeza polar de los PL y los aminoácidos positivos altamente conservados interactúan con el PL aniónico, PG. Este modelo favorece la localización de la SP-B en la superficie de la membrana de tal manera que la zona no polar de la hélice interactúa solamente con la parte más superficial de las cadenas acil, esto produce solamente una perturbación limitada en el empaquetamiento de las cadenas acil de los PL (Morrow y col., 1993; Cruz y col., 1997 y 1998). Estas perturbaciones, sin embargo, son suficientes para producir desestabilización de la bicapa y promover fenómenos tales como fusión, pérdida de contenido o intercambio lipídico de vesículas de PLs (Hawgood y col., 1998 y Pérez-Gil, 2001).

2.2.1.3 Estructura de la SP-C

La SP-C es un péptido de 35 aminoácidos, compuesto de 69 % de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 3) y al igual que la SP-B se aísla junto con los lípidos del surfactante.

Constituye uno de los péptidos más hidrofóbicos informados, cuyo dominio más hidrofóbico comprende los aminoácidos de la posición 13 a la posición 28, en el cual la valina es el aminoácido predominante. La hidrofobicidad es incrementada por la palmitoililación de las cisteínas en las posiciones 5 y 6 en la mayoría de las especies (excepto la SP-C de perro y la de vaca que contienen una sola cisteína palmitoilada en la posición 6). Formas no palmitoiladas o deaciladas de la SP-C pueden formar dímeros dependientes de grupos sulfidrilos y fibras de amiloides, por tanto la palmitoilación variable unido a formas truncadas en el N-terminal conducen a una considerable microheterogeneidad (Weaver y Johnson, 2001).

La estructura de la SP-C porcina por resonancia magnética nuclear es consistente con un péptido transmembrana, donde los aminoácidos de la posición 9 al 34 forman una α hélice rígida. Esta estructura puede embeberse en la bicapa fluida de DPPC, de manera que el dominio de polivalina se acomoda perfectamente en el interior de las cadenas acil. La naturaleza helicoidal del dominio embebido en la membrana es promovida por los palmiticos en la región N-terminal extra-membrana, la cual puede interaccionar con membranas adyacentes o más probablemente con la misma bicapa que el péptido reside. La orientación transmembrana de SP-C es a su vez estabilizada por los aminoácidos lisina y arginina en la posición 11 y 12 respectivamente que interacciona con los grupos de cabeza de los PL (Weaver y Johnson, 2001).

2.3 Funciones biológicas:

2.3.1 Tensión superficial. Función tensioactiva

Las fuerzas que tensionan la pared del pulmón dependen de las propiedades mecánicas de la pared alveolar y de la tensión superficial en la interfase aire-líquido. La tensión superficial es la fuerza que tiende a reducir al mínimo el área que ocupa una superficie líquida, haciendo que las gotas de líquido adopten una forma esférica. Es decir, hace que una superficie líquida sea resistente al estiramiento de modo que se hace necesario aplicar un trabajo para estirar o ensanchar dicha superficie. Considerando que la estructura de los alvéolos es muy adaptable, la tensión superficial del líquido que los tapiza contribuye aproximadamente en un 70 % a la

resistencia al estiramiento de la pared pulmonar. Si la película líquida estuviese constituida exclusivamente por agua, la tensión de la pared alveolar sería mucho mayor de la que existe realmente, y se necesitarían fuerzas mucho mayores para inflar el pulmón venciendo la tensión superficial. La razón de que la tensión superficial del líquido que reviste interiormente los alvéolos sea relativamente baja, lo que por otra parte es absolutamente imprescindible para el mantenimiento de estas estructuras, es la presencia del surfactante. Este complejo lipoproteico secretado a la interfase acuosa por las células alveolares de tipo II o neumocitos tipo II, tiene como función principal reducir la tensión superficial de la interfase aire-líquido, facilitando el trabajo pulmonar y previniendo el colapso alveolar durante la espiración.

Para entender la importancia de esta función en el contexto del pulmón se suele recurrir a la ley de Laplace según la cual la presión en el interior de una burbuja es proporcional a la tensión superficial de la burbuja e inversamente proporcional al radio de la misma (Figura 4). Así, si dos burbujas tienen una tensión superficial similar pero son de diferente tamaño, la presión en la burbuja pequeña será mayor que en la grande. Como resultado, si ambas burbujas están en contacto, la burbuja pequeña se vaciará dentro de la grande. Puede considerarse un modelo similar en el pulmón. Los alvéolos serían análogos a una serie de burbujas conectadas entre sí. Si la tensión superficial fuera similar en la superficie de los alvéolos de diferente tamaño, los pequeños tenderían a colapsarse vaciándose en los mayores.

Normalmente esto no ocurre en el pulmón por dos razones: por un lado los tejidos circundantes ayudan a prevenir la sobreexpansión de los alvéolos y por otro, la presencia de surfactante hace que la tensión superficial disminuya de forma progresiva durante la espiración. El resultado de este efecto es la atenuación de las diferencias de presión entre los alvéolos mayores y los pequeños previniendo el riesgo de colapso. Los alvéolos se repliegan al disminuir su volumen y las regiones entre los pliegues acumulan una capa más densa y concentrada de surfactante. La bajísima tensión superficial producida por ésta permite un fácil hinchamiento de los alvéolos colapsados o replegados. Así pues, el surfactante resulta fundamental para la estabilización de la estructura alveolar y la función normal del pulmón (Possmayer y col., 1984 y Goerke, 1998), por reducir la tensión de superficie en la interfase aire-líquido. El surfactante estabiliza el alvéolo a bajo volumen pulmonar y previene la formación del edema pulmonar. Estas funciones disminuyen el trabajo respiratorio.

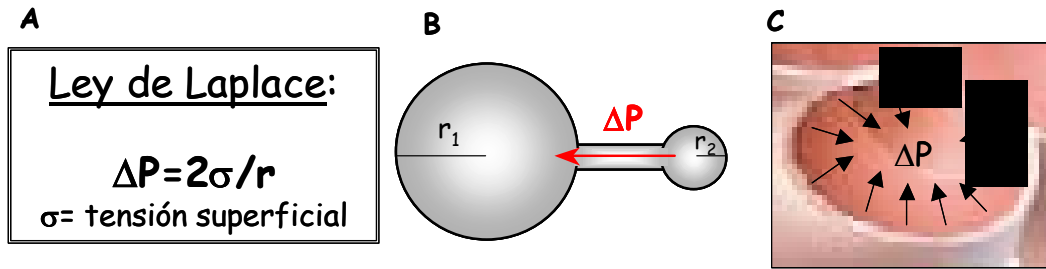


Figura 4 A) Ecuación que define la Ley de Laplace. La presión que tiende a cerrar una burbuja (ΔP) es directamente proporcional a la tensión superficial (σ) e inversamente proporcional al radio de la burbuja. B) La burbuja pequeña tiende a vaciarse en la grande debido a la diferencia de presión entre ambas. C) Los alvéolos pequeños tenderían a colapsarse dentro de los mayores si no estuviera presente el surfactante pulmonar.

2.3.1.1 Papel de los lípidos y las proteínas. Teoría del *squeeze out*.

Los PLs son moléculas anfipáticas que forman monocapas con su grupo de cabeza polar hacia el agua y los grupos de ácidos grasos extendidos hacia el aire. Es importante la especie (referida a la cabeza polar) y la naturaleza de los ácidos grasos esterificados que lo constituyen, estas características determinan la forma de la molécula y la temperatura de transición del estado *gel cristalino* al estado *líquido cristalino* en un medio determinado (Possmayer, 1991). Para la DPPC esta temperatura es elevada (41°C) comparada con la del resto de los PL del surfactante, debido precisamente a la rigidez que le confieren la presencia de los dos ácidos grasos saturados (Goerke y González, 1981). Esto significa que a la temperatura corporal la DPPC se encuentra en estado *gel cristalino*, lo cual determina la capacidad de alcanzar muy bajas tensiones superficiales cuando este PL se incorpora a la interfase. En el caso de la PC no saturadas, los dobles enlaces hacen que ocupen un área mayor y no puedan ser comprimidas al mismo nivel que la DPPC, como consecuencia no son tan efectivas en disminuir la tensión superficial (Possmayer, 1991). En el estado *gel cristalino* los PLs quedan empaquetados de forma regular y prácticamente sin posibilidades de movimiento, aquellos que se encuentran en la fase *líquido-cristalino* tienen más movilidad y son más fácilmente excluidos de la interfase durante la compresión. Estos cambios se traducen en una mayor exclusión del agua de la interfase y por tanto una disminución de la tensión superficial.

Por debajo de su temperatura de transición la DPPC se encuentra en *estado gel* y por tanto no puede adsorberse y extenderse rápidamente en la interfase aire-líquido. La presencia de PL aniónicos en un porcentaje significativo en la composición del surfactante, junto a las proteínas hidrófobas facilitan la rápida adsorción y distribución de la DPPC en la interfase aire-líquido, sin interferir en su capacidad de reducir la tensión superficial a valores cercanos a 0 mN/m de películas de surfactante bajo compresión.

La teoría del *squeeze out* se propuso para dar respuesta a la dicotomía presente en las propiedades de las monocapas de surfactante (Bangham y col., 1979; Goerke y Clements, 1986; Shapiro y Notter, 1989 y Goerke, 1998). La teoría plantea que los lípidos fluidos del

surfactante están presentes solamente para facilitar la adsorción del surfactante a la interfase, en la compresión, los lípidos fluidizantes son selectivamente removidos o *squeeze-out* dando lugar a monocapas enriquecidas en lípidos que promueven la disminución de la tensión superficial. Esta teoría asume una interacción idealizada, inmisible entre los componentes lipídicos saturados (estabilizadores de baja tensión superficial) y los insaturados (fluidizantes). Esta teoría ha dominado la interpretación de los experimentos del surfactante pulmonar y ha influido fuertemente en el diseño de los surfactantes terapéuticos para el tratamiento del SDRN (Johansson, 1998 y Robertson y Halliday, 1998).

Los lípidos neutros aunque presentes en cantidades significativas no han recibido la misma atención con respecto a los PL. No obstante la adición de triglicéridos y ácido palmítico a DPPC aumenta la velocidad de adsorción de la misma. El colesterol es el lípido neutro que se encuentra en mayor cantidad y es probablemente el más importante. Se ha informado que el colesterol aumenta la adsorción de vesículas compuestas de DPPC, supuestamente por incrementar la fluidez y mejorar la re-extensión de la película (Notter y col., 1980). Recientemente se ha demostrado que el colesterol es esencial para organizar la estructura lateral de las membranas y monocapas de surfactante (Bernardino de la Serna, 2004).

Algunas investigaciones clínicas y varios estudios en animales que involucran modelos de transgénicos y genes *knock out* han demostrado el papel esencial de varios componentes del surfactante, específicamente de las proteínas del surfactante en la función normal pulmonar (Glasser y col., 1994).

Interacciones lípido-proteína de la SP-B induce una rápida transferencia de las moléculas superficialmente activas del surfactante hacia la interfase aire-líquido (Cruz y col., 2000; Schram y Hall, 2001 y Ross y col., 2002) y puede modular la estabilidad y comportamiento dinámico de las películas de surfactante interfacial bajo continua compresión-expansión (Taneva y Keough, 1994; Nag y col., 1999; Ding y col., 2001 y Ross y col., 2002). Numerosos trabajos se han dirigido a esclarecer el mecanismo molecular por el cual la SP-B modula la dinámica de la película de surfactante y la estructura de los lípidos. En los últimos años se ha ganado conocimiento en general y específicamente sobre la generación y sostenimiento de la separación de fase lateral que ocurre en las películas interfaciales bajo compresión dinámica

mediante el empleo de sondas fluorescentes y la directa visualización por microscopia de estas estructuras en la interfase aire-líquido (Nag y col., 1997; Ding y col. 2001 y Takamoto y col., 2001). Estos estudios han cambiado la concepción inicial del mecanismo por el cual los componentes del surfactante son capaces de reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido, conocida como teoría de *squeeze out* ó exclusión. Recientemente Takamoto y col. (2001) mediante el uso de isothermas, microscopía de fluorescencia y de fuerza atómica de mezcla de dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) y palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG) con proteínas hidrófobas brindan elementos que refutan la teoría del *squeeze out* al concluir que las proteínas hidrófobas eliminan el *squeeze out* al inducir transiciones de fase de dos a tres dimensiones creando plegamientos reversibles de las películas de PL y por tanto garantizando una asociación permanente con la monocapa, a altas presiones de superficies. De tal manera ellos concluyen que las proteínas hidrófobas alteran el comportamiento de fase y la morfología de la monocapa, siendo independiente de la composición lipídica, pero a su vez depende de la coexistencia entre la fase líquido-condensada y la líquido-expandida.

Por otra parte, la importancia de la SP-B ha quedado demostrada ya que recién nacidos a término deficientes en SP-B desarrollan disfunción pulmonar severa y son resistentes a la terapia tradicional con surfactante (Hamvas y col., 1994; Nogee y col., 1994 y Dunbar y col., 2000). Un modelo animal con deficiencia en SP-B ha demostrado un resultado similar (Tokieda y col., 1997).

La función biológica de la SP-C no está nítidamente definida, pero está claro que la SP-C participa fundamentalmente en la formación y reextensión de la monocapa interfacial. Aunque en menor medida que la SP-B, la SP-C es capaz de promover la adsorción de PL para formar una monocapa interfacial (Oosterlaken-Dijksterhuis y col., 1991). También se ha sugerido que la SP-C podría tener un papel importante en el enriquecimiento de la monocapa en DPPC, ya que durante la compresión, la proteína es excluida arrastrando consigo algunos PL (Pérez-Gil y Keough, 1998). Su elevada capacidad para interaccionar y perturbar membranas, tanto por el segmento α -helicoidal transmembranal, como por su región N-terminal, cuyas propiedades de interacción lípido-péptido han sido recientemente analizadas en detalle (Bi y col., 2002 y Plasencia y col., 2004), hace pensar en un papel básico a nivel de formación o mantenimiento de las membranas de surfactante en los espacios alveolares. En este sentido, se ha observado

que la SP-C promueve la formación de estructuras multilamelares asociadas a la interfase durante la compresión de la monocapa (Kramer y col., 2000) y se propuso que estas estructuras actuarían como reservorios de material que será de nuevo insertado en la expansión (inspiración). Esto permite el mantenimiento de la película interfacial durante los sucesivos y rápidos ciclos respiratorios. La presencia de las dos cadenas de ácido palmítico esterificando las cisteínas parece esencial para el mantenimiento de estas estructuras (Gustafsson y col., 2000). Ratones deficientes en SP-C muestran menores anomalías biofísicas, manifestadas predominantemente a bajo volumen pulmonar, por tanto confirman el papel de esta proteína en el mantenimiento de la estabilización de la película de surfactante (Glasser y col., 2001).

Es necesario destacar que aunque la SP-A no contribuye directamente a la actividad de superficie del surfactante pulmonar (Korfhagen y col., 1996), hay evidencias que indican que la SP-A interactúa con lípidos sugiriendo que participa en la reorganización o recambio del surfactante, a su vez existen elementos que sustentan que la actividad tensioactiva de la SP-A se manifiesta en mayor grado en condiciones de concentración disminuida de surfactante (McCormack 1998 y Sun y col., 1997). La SP-A une y agrega lípidos (Benson y col., 1984), facilita la adsorción mediada por los PL a la monocapa (Hawgood y col., 1987) y es necesaria para la formación de la mielina tubular (Suzuki y col., 1989) y de la capa superficial enriquecida en PL. Además se une con una alta afinidad a receptores de la superficie del neumocito tipo II e inhibe la secreción de PC en estas células.

2.3.1.2. Métodos de evaluación de la actividad tensioactiva

Los métodos utilizados en la evaluación de las propiedades tensioactivas de un surfactante pulmonar *in vitro* son métodos físicos que incluyen diferentes variantes de equipos que se han diseñado con el fin de medir la tensión superficial de forma dinámica con la variación del área. Clements (1957) fue el primero en medir la variación de la tensión superficial del surfactante pulmonar en un modelo físico que permite medir la tensión superficial de forma dinámica, teniendo en cuenta sus variaciones durante cambios de área. Esto fue fundamental en el conocimiento de las propiedades tensioactivas del surfactante pulmonar. Los procedimientos utilizados actualmente para evaluar las propiedades interfaciales de un surfactante pulmonar se basan principalmente en la medida de la tensión superficial respecto al área de compresión.

El equipo desarrollado por Clements es la *Balanza de superficie Wilhelmy Langmuir* (figura 5), en la cual el material a evaluar se coloca en una cubeta y la tensión superficial es medida como la fuerza ejercida sobre una lámina de platino o papel suspendida de un transductor. El área de la película de superficie se cambia mecánicamente por movimiento de la barrera. La presión de superficie π es igual a $\gamma^0 - \gamma$, donde γ^0 es la tensión de superficie de la superficie limpia y γ es la tensión de superficie con el surfactante presente.

El surfactante puede ser estudiado al extender el material directamente en la interfase aire-líquido o por inyectarlo en la subfase, de esta manera la Balanza de Wilhelmy ha sido utilizada para estudiar el fenómeno de adsorción de los PL del surfactante (Notter y col., 1989). Los estudios realizados por este método son limitados por el gran volumen de la cubeta, los lentos tiempos de compresión, las grandes compresiones requeridas para lograr bajas tensiones superficiales y la pérdida de PL de la monocapa. No obstante existen modificaciones de este tipo de Balanzas como por ejemplo, el empleo de una cinta móvil que permite modificar el área que encierra y de esta manera evitar la pérdida de PL que puede producirse cuando la monocapa se comprime a muy elevadas presiones superficiales.

Enhoring (1977) desarrolló un equipo destinado a evaluar las propiedades tensioactivas del surfactante pulmonar: el *Surfactómetro de Burbuja Pulsátil* (figura 6). El surfactómetro permite crear una burbuja de aire en una pequeña cámara que contiene la muestra que se va a medir. Esta cámara comunica al exterior por un pequeño capilar, de manera que la burbuja simula un alvéolo artificial. Mediante un pistón se hace pulsar la burbuja con un cambio de radio de 0,4 a 0,55 mm lo cual resulta en un 50 % de reducción del área superficial total. La diferencia de presión a través de las paredes de la burbuja es medida por un transductor de presión. El cálculo de la tensión superficial se obtiene mediante la aplicación de la ley de Young-Laplace, $\Delta P = 2\gamma/R$, donde ΔP es la diferencia de presión a través de la burbuja, R el radio de la burbuja y γ la tensión superficial. En este modelo, las medidas de las propiedades de adsorción y de disminución de la tensión superficial no se dan por separados, sino se expresan conjuntamente en los resultados (Holm, 1992), a diferencia de lo que ocurre en la Balanza de Superficie. Este instrumento tiene la ventaja que puede realizarse a ritmos comparables con la respiración normal y a la temperatura fisiológica, pudiéndose variar estos parámetros Enhoring (1977), a su vez brinda resultados rápidos y emplea pequeños.

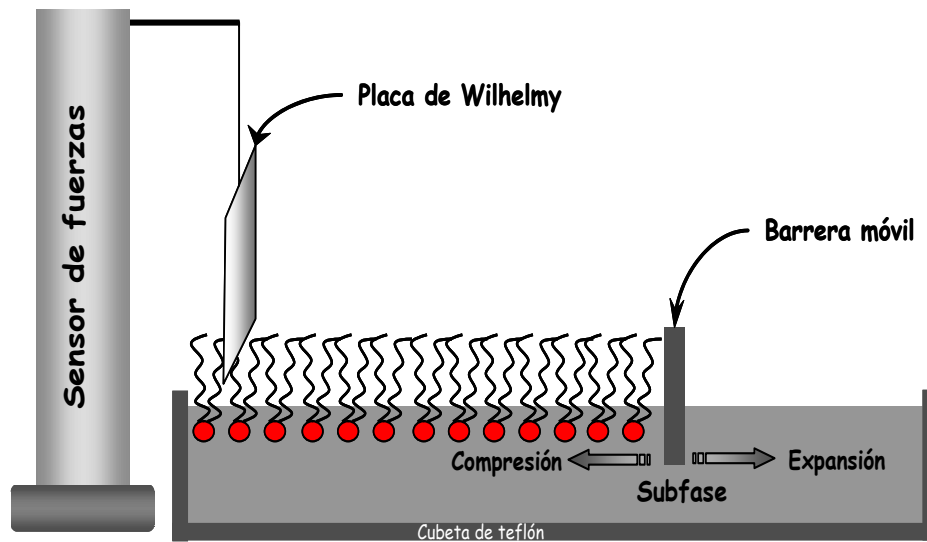


Figura 5. Esquema de una balanza de superficie con los elementos básicos de que se compone. La monocapa interfasial es comprimida o expandida mediante la barrera móvil al tiempo que los cambios en la tensión (o presión) superficial son registrados a través de un sensor de fuerzas acoplado a una placa de Wilhelmy en contacto con la interfase.

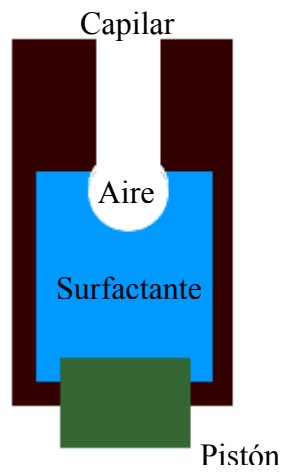


Figura 6. Esquema de un surfactómetro de Burbuja Pulsátil.

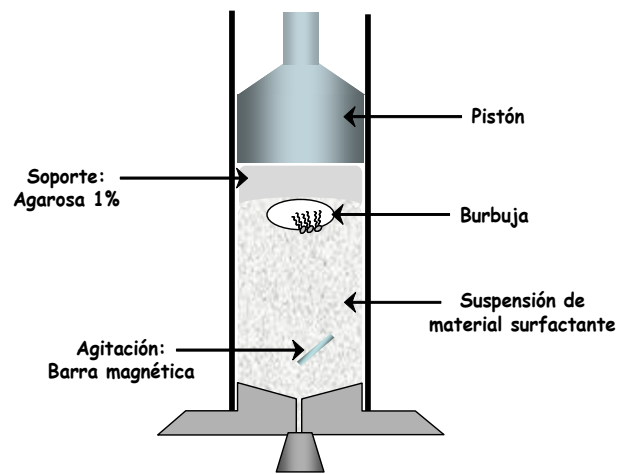


Figura 7. Representación esquemática de un surfactómetro de burbuja cautiva.

volúmenes de muestras. Tiene como desventaja que no se conoce que componentes del sistema surfactante y a que concentración se encuentran en la interfase aire-acuosa, a su vez puede ocurrir deformación de la burbuja a partir de su forma esférica y por consiguiente errores en valores de tensión superficial cercanos a cero. Por otra parte se producen pérdidas de PLs desde la monocapa hacia las paredes del capilar (Goerke, 1992) aunque son menores que en las Balanza de superficie, debido a que los ciclos repetidos previenen la pérdida de material (Enhoring, 2001). Es una técnica muy ventajosa y ampliamente usada por los especialistas.

El otro equipo utilizado para medir tensión superficial es el Surfactometro de Burbuja Cautiva (figura 7), el cual fue introducido por Samuel Schürch a finales de la década del 80 (Schürch y col., 1989) dirigido a solventar los problemas surgidos con el Surfactometro de Burbuja Pulsátil. Una burbuja de aire es creada con una jeringuilla, la cual flota en una solución que contiene surfactante, arriba de la burbuja se encuentra un gel de agar hidrofílico formando una capa ligeramente curva. La burbuja es monitoreada por una cámara de video y su forma es analizada, usando la relación altura-diámetro, para de esta manera calcular la tensión superficial (Schoel y col., 1994). Este equipo tiene la ventaja de que no hay perdida de PL, es más preciso en la determinación de la tensión superficial y como desventaja se encuentra la complejidad del análisis de los datos y que se necesita una concentración mínima de surfactante de 3 mg/ mL.

2.3.2 Función de defensa del surfactante pulmonar

El pulmón se encuentra en constante contacto con el ambiente, en cada inhalación, pequeñas partículas, bacterias, virus y antígenos son constantemente depositados en la capa epitelial que cubre las vías aéreas. El pulmón es un órgano que se caracteriza por un área de superficie extensa de 70 m², si lo comparamos por ejemplo con la piel de alrededor de 1,7 m². Al poseer una mayor área de superficie hace que el mismo sea mas vulnerable a daños secundarios debido a una infección, inflamación y a otros agentes causante de daño tales como exposición a gases oxidantes. Dado esta característica, el pulmón presenta mecanismos que le permiten una respuesta defensiva rápida a estos retos o agentes nocivos, manteniendo un balance entre la respuesta pro y anti-inflamatoria (Wright 1997).

Si bien el surfactante pulmonar es por excelencia conocido por su función de disminuir la tensión superficial, además es capaz de poseer funciones relacionadas con la defensa en el pulmón (Pison y col., 1994 y Crouch y Wright, 2001). Esta función ha tomado una relevancia en los últimos tiempos al descubrirse que dos de las proteínas del surfactante, SP-A y SP-D poseen similitud estructural con la familia de las colectinas, proteínas involucradas en la respuesta inmune innata no mediada por anticuerpos (Wright, 1997). El surfactante previene contra infecciones bacteriales y virales y modula la actividad de varias células inmunocompetentes dentro de las vías aéreas.

El surfactante pulmonar aumenta la unión y fagocitosis de partículas. Van Iwaarden y col. (1990) informa que un surfactante pulmonar obtenido por centrifugación aumenta la fagocitosis de *Staphylococcus aureus* por macrófagos alveolares, sin embargo, el extracto lipídico de este material no estimula la fagocitosis, pero a su vez con la SP-A purificada si se obtuvo este efecto. Tino y Wright (1996) encontraron que lavado pulmonar de rata aumenta la fagocitosis y el efecto fue reducido por anticuerpo policlonal anti-SP-A. De esta forma algunos de los efectos estimulatorios del surfactante en la fagocitosis por macrófagos son mediados por la SP-A.

El surfactante tiene efectos variables en la producción de radicales libres. Se ha informado que el surfactante y los lípidos del surfactante suprimen la producción de especies reactivas del oxígeno por macrófagos alveolares y monocitos estimulados con PMA o zimosan (Geertsman y col., 1993). Una mezcla de PL sintéticos similar en composición al surfactante ensayados por Juers y col. (1976) inhibió la respuesta a la quimioluminiscencia y por tanto concluyeron que el componente lipídico es el responsable de la inhibición observada con el surfactante completo. Posteriores estudios demuestran que cada PL posee una actividad inmunomodulatoria diferente, así por ejemplo DPPG inhibe mientras DPPC y dioleilfosfatidilcolina (DOPC) incrementan la respuesta oxidativa producida por zimosan. Por otra parte el surfactante y los lípidos del mismo son responsables del efecto inhibitorio en la respuesta proliferativa de linfocitos (Ansfield y col., 1979), trabajos posteriores estuvieron dirigidos a conocer la contribución de los componentes lipídicos individuales, en este sentido la fosfatidilcolina y el fosfatidilglicerol tienen un efecto inhibitorio mientras que la fosfatidiletanolamina, el colesterol y la esfingomielina estimulan la respuesta proliferativa. La

combinación de estos diferentes lípidos producen efectos que van desde una inhibición a una estimulación en dependencia de la proporción relativa de los mismo (Wilsher y col., 1988).

Modelos en ratones deficientes en SP-A sugieren que desempeña un papel en la defensa a infecciones bacteriales y virales (Korfhagen y col., 1998). Dentro de las funciones relacionadas con la defensa en el pulmón se encuentran: actuar como una opsonina para patógenos (Tino y Wright, 1996), prevenir la inhibición de la actividad surfactante por las proteínas de la sangre (Cockshutt y col., 1990 e Ikegami y col., 1998), la SP-A humana se une a bacterias Gram-negativas y facilita su agregación, fagocitosis y muerte por los macrófagos de rata (Wright, 1997), la SP-A de rata, canina y humana pueden causar el estallido respiratorio en macrófagos humanos y de rata y aumentar la quimiotaxis de macrófagos activados (Van Iwaarden y col., 1995). Varios estudios revelan que la SP-A directamente estimula (Kremlev y Phelps, 1997) o tiene efecto inhibitorio (McIntosh y col., 1996; Hickling y col., 1998; Sano y col., 1999 y Romeau y col., 1999) en la producción del TNF- α y otras citoquinas pro-inflamatorias por las células inmunes, en este sentido la regulación de la producción de citoquinas por la SP-A es controversial y es influenciado en parte por el estado y el mecanismo de activación de la célula inmune (Stamme y col., 2000). Asimismo la función de la SP-A en la regulación de la producción de radicales libres es controversial, por ejemplo la SP-A mostró un efecto inhibitorio (Wright y col., 1999 y Borron y col., 2000) o estimulante (Blau y col., 1997 y Hickman-Davis y col., 1998) sobre la producción de óxido nítrico por los macrófagos alveolares. Recientemente se ha demostrado su actividad anti-microbiana directa es decir es capaz de ocasionar la muerte a bacterias en ausencia de células inmunes (Wu y col., 2003).

La SP-B presenta un 68 % de homología estructural con un péptido con propiedades antibióticas y a su vez es capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* (Kaser y Skouters, 1997). Recientemente se demostró que la SP-B inhibe la inflamación en el pulmón inducida por endotoxinas (Epauld y col., 2003).

A la SP-C recientemente se le ha informado propiedades anti-inflamatorias, se une a la región del lípido A del LPS, interacciona con el CD-14, y cuando se asocia a vesículas de DPPC, es capaz de inhibir la unión del LPS a la línea de macrófagos RAW 264.7, a su vez inhibe la

producción de óxido nítrico y de TNF α en macrófagos alveolares y peritoneales (Augusto y col., 2001; 2002; 2003 a y b).

2.4 Clasificación.

El surfactante pulmonar natural es aquel que se aísla de las vías aéreas tal cual es decir por lavado pulmonar con solución de NaCL al 0,9 % y una centrifugación para obtener el precipitado de surfactante natural y contiene toda la composición bioquímica descrita en el acápite 2.2. Si ha este precipitado de surfactante natural le hacemos extracción orgánica en cloroformo metanol obtenemos lo que llamamos extracto orgánico de surfactante pulmonar natural, el cual se diferencia del anterior en que no contiene la proteína hidrofílica SP-A ni la SP-D. Si seguidamente hacemos una precipitación con acetona o una cromatografía para eliminar lípidos neutros estamos en presencia de las preparaciones comerciales de surfactantes pulmonares naturales exógenas, es necesario precisar además que las mismas pueden ser obtenidas por triturado de pulmón. Las preparaciones de surfactantes pulmonares pueden clasificarse en naturales o sintéticas, en la tabla 1 se resume las características de los mismos. Hasta el presente ninguna de las preparaciones de surfactantes disponibles contiene SP-A o SP-D. A continuación se detallan las diferentes preparaciones de surfactantes usados en la clínica, así como las nuevas preparaciones de surfactante (tabla 2 y tabla 3).

2.5 Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA)

Ashbaugh (1967), fue el primero en describir el Síndrome de Distres Respiratorio en 12 adultos que murieron por fallo respiratorio. A partir de este informe numerosos estudios han investigado la epidemiología, la patofisiología y los tratamientos terapéuticos. En la conferencia consenso europea-americana sobre la actualización de este síndrome, se definió que pacientes con fallo respiratorio agudo debido a un daño pulmonar del parénquima, incluye a un espectro de condiciones tales como fallo respiratorio agudo (FRA), daño agudo pulmonar (DAP) y SDRA (Bernard y col., 1994). La mortalidad general por SDRA aunque ha disminuido, continúa siendo alta de un 40 % constituyendo un problema significativo (Hudson y Steinberg, 1999).

Tabla 1. Clasificación de las preparaciones de surfactante pulmonar.

Tipo de surfactante	Características
Naturales	Son obtenidos por lavado o trituración del pulmón y extracción con solventes orgánicos y purificados por cromatografía (CUROSURF®) o adición de principio activo (SURVANTA®) o sin purificación por cromatografía, ni adición (SURFACEN®). Contienen el espectro completo de los fosfolípidos del surfactante y las proteínas hidrófobas.
Sintéticos: a) basados en fosfolípidos	Consiste en fosfolípidos sintéticos y agentes químicos (detergentes o lípidos) para facilitar la extensión y adsorción. Estos son EXOSURF® y ALEC®
b) basados en fosfolípidos y proteínas	Contienen mezcla de fosfolípidos sintéticos y análogos de péptidos de la SP-B o la SP-C, sintetizados químicamente o por vía recombinante. Estos son SURFAXIN y VENTICUTE

Tabla 2. Preparaciones de surfactante comerciales empleados en la clínica

Nombre Genérico/Autor	Nombre de la marca	Fuente	Composición	Dosis	Método de suministro	Firma Comercializadora
Beractant/ Fujiwara y col. 1980	<i>Survanta</i> [®]	Tejido pulmonar bovino	SP-B, SP-C y PL	100 mg PL/kg hasta 3 dosis	Instilación intratraqueal	Laboratorios Abbot, (EE.UU)
Surfactant-TA Taeusch y col 1986	<i>Surfacten</i> [®]	Tejido pulmonar bovino	SP-B, SP-C y PL	100 mg PL/Kg. hasta 3 dosis	Instilación intratraqueal	Tokoyo Tanabe (Japan)
Surfactante Bovino/ Yu y col 1983	<i>bLES</i> [®]	Lavado pulmonar bovino	SP-B, SP-C y PL	100 mg PL/Kg.	Instilación intratraqueal	BLES Biochem (Canadá)
SF-RI 1/ Wauer y col 1991	<i>Alveofact</i> [®]	Lavado de pulmón bovino	SP-B, SP-C y PL	50 mg PL /Kg.	Instilación intratraqueal	Boehringer Ingelheim (Alemania)
CALFACTA NT o CLSE/ Shapiro y col. 1985	<i>Infasurf</i> [®]	Lavado de pulmón de ternero	SP-B, SP-C y PL	100 mg PL /Kg.	Instilación intratraqueal	Laboratorios Forest (EE.UU)
Poractant/ Robertson y Curstedt 1988	<i>Curosurf</i> [®]	Tejido pulmonar porcino	SP-B, SP-C y PL	200 mg PL /kg inicial y dos dosis adicionales de 100 mg/Kg.	Instilación intratraqueal	Chiesi Pharmaceuticals (Italia)
Surfactante porcino/ Manzanares y col 1994	<i>Surfacen</i> [®]	Lavado pulmonar porcino	SP-B, SP-C y PL	100 mg PL/kg hasta 2 veces	Instilación intratraqueal	CENSA (Cuba)
Palmitato de colfosceril/ John Clements 1982	<i>Exosurf</i> [®]	Sintético	DPPC, hexadecanol y tiloxapol.	67,5 mg de Palmitato de colfosceril/Kg.	Instilación intratraqueal/ nebulización	Glaxo-Wellcome (Reino Unido)
PUMACTAN T/ Morley y col. 1981	<i>ALEC</i> [®]	Sintético	DPPC:PG	100 mg PL/kg	Instilación intratraqueal/ nebulización	Britania (Reino Unido)

SP-B: Proteína del Surfactante B

PL: Fosfolípidos

SP-C: Proteína del Surfactante C

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

PG: Fostatidilglicerol

Tabla 3. Nuevas preparaciones de surfactantes sintéticos en Ensayos Clínicos

<i>Nombre Genérico/Autor</i>	<i>Nombre de la marca</i>	<i>Fuente</i>	<i>Composición</i>	<i>Dosis</i>	<i>Aprobación por la FDA (estimado)</i>	<i>Método de suministro</i>	<i>Firma Comercializadora</i>
LUCINACTANT o KL ₄ / Cochrane y Revak, 1991	<i>Surfaxin</i> [®]	Sintético	DPPC, POPG, PA, KL ₄ -péptido	10 mg PL/mL vía lavado	SDRN en el 2004 SAM: en el 2005 SDRA: en el 2006	Lavado broncoalveolar	Laboratorios Discovery (EE.UU)
SP-C recombinante/Benson y col. 1999	<i>Venticute</i> [®]	Sintético	DPPC, POPG, PA, SP-C r	1mg rSP-C/Kg., 50 mg PL/kg hasta 4 veces	no se dispone de los datos	Instilación intratraqueal	Altana-Byk Gulden -Pharmaceuticals (Alemania)

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina.

POPG: Palmitoiloleilfosfatidilglicerol.

PA: ácido palmítico.

KL₄:-péptido de 21 aminoácidos constituido por una lisina (K) y 4 Leucina (L)

Repetido hasta n=21.

SDRA: Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.

FDA: Food Drug Administration (EE.UU)

SP-C r: Proteína del surfactante C recombinante.

SDRN: Síndrome de Distrés Respiratorio del neonato.

SAM: Síndrome de Aspiración por Meconio.

Existen varias condiciones pueden conducir al DAP/SDRA. La causa más común es la infección, que puede ser tanto por un daño pulmonar primario tal como una neumonía o por vía sistémica como una sepsis. Otros eventos predisponentes incluyen trauma masivo, transfusiones de sangre múltiples y pancreatitis así como daños directos al pulmón tales como aspiración gástrica o inhalación de gases tóxicos (Bernard y col., 1994). Varios estudios han demostrado concentraciones incrementadas de mediadores pro y anti-inflamatorios en lavado broncoalveolar en estos pacientes. Aunque la liberación de estos mediadores puede ser protector en estados tempranos de la enfermedad, cuando este balance se rompe conlleva a la disfunción progresiva del pulmón, al fallo multi órgano y a la muerte (Dietch, 1992).

El SDRA esta asociado con alteraciones bioquímicas y biofísicas del sistema surfactante pulmonar (Hallman y col., 1982). Estas alteraciones incluyen un incremento en el contenido de proteínas en el lavado broncoalveolar, alteraciones en el perfil de PL y ácidos grasos (Schmidt y col., 2001), reducida concentración de la SP-A y la SP-B (Günther y col., 1996) y bajas concentraciones de la forma biofísicamente activa del surfactante, los grandes agregados. Esto conlleva a una disminución marcada de la actividad superficial que presenta los pacientes con esta enfermedad. Asimismo ocurre una degradación de los componentes esenciales del surfactante por los mediadores inflamatorios (ejemplo proteasas y fosfolipasas) e inhibición de la función surfactante por proteínas del plasma. Esto trae como consecuencia la pérdida de la estabilidad alveolar, la atelectasis y el deterioro severo del intercambio gaseoso. Estas observaciones proveen elementos suficientes para evaluar la administración de preparaciones de surfactantes en pacientes con DAP/SDRA.

2.5.1 Modelos de daño agudo pulmonar

La mayoría de los estudios preclínicos que evalúan la administración del surfactante exógeno han involucrado animales de experimentación usando varios modelos de daño agudo. A diferencia del modelo de animales pre-términos que refleja exactamente la condición clínica de infantes pre-términos, no existe un modelo ideal para el SDRA (Lewis y Veldhuizen, 2003). Una gran variedad de modelos han sido estudiados, cada uno con sus ventajas y desventajas.

El modelo de lavado del pulmón con solución salina repetidas veces ha sido usado ampliamente en numerosas especies debido a la consistencia del daño pulmonar obtenido y a su relativa simplicidad (Ito y col., 1996 y Campbell y col., 2002). Una desventaja del modelo es que el resultado final involucra una deficiencia de surfactante más que un daño al sistema surfactante endógeno. No obstante se utiliza para comparar la eficacia de preparaciones de surfactante y de diferentes modos de ventilación. Otros modelos animales incluyen como agentes inductores de la lesión al ácido clorhídrico (Lamm y col., 1990; Lewis y col., 1993 y Brackenbury y col., 2001), al ácido oleico (Zelter y col., 1990), al NNNMU (Harris y col., 1989), la hipoxia (Engstrom y col., 1989 y Huang y col., 1994) y las endotoxinas (Tashiro y col., 1996; Picone y col., 1996; Lutz y col., 1998; Van Helden y col., 1998 y Wu y col., 2002). Estos tipos de modelos se han realizado en diferentes especies y la alteración que producen en el sistema surfactante endógeno esta más estrechamente relacionado con lo que ocurre en pacientes con SDRA. No obstante, la interpretación y comparación de estos modelos es compleja debido a que se producen diversas severidades de daño.

La eficacia terapéutica de los surfactantes pulmonares en estos modelos depende de dos aspectos fundamentales: de las características del surfactante y del ambiente alveolar que se genere con el empleo de los diferentes agentes inductores de la lesión pulmonar. Con relación al primer aspecto los surfactantes exógenos naturales producen una respuesta mejor que los surfactantes sintéticos sin proteínas, por otra parte los surfactantes que tienen mayor contenido de SP-B y SP-C así como mayor proporción de determinadas especies fosfolípicas, producen una mejor respuesta. En el caso del segundo aspecto el empleo del agente causal determina el grado del daño, de manera que por ejemplo, los modelos donde se emplea lavado pulmonar ocurre una deficiencia de surfactante, es decir un proceso patofisiológico más fácil de revertir y es por eso que, la mayoría de estos modelos responden favorablemente al tratamiento con surfactante en comparación con modelos que emplean agentes más agresivos como el ácido clorhídrico.

2.5.2 Terapia con surfactante en el SDRA

La terapia con surfactante en pacientes con SDRA ha mostrado resultados variables. Los tratamientos con las preparaciones de surfactantes comerciales, en pacientes pediátricos y adulto con SDRA se resumen en la tabla 4. La variabilidad en el éxito de estos estudios se le atribuye a la severidad de la lesión, al criterio de selección del paciente, a la cantidad de surfactante suministrada al alveolo por nebulización y al tipo de surfactante.

Tabla 4. Ensayos clínicos en pacientes con SDRA con preparaciones comerciales de surfactantes

Surfactante	Dosis/Régimen	Tipo de estudio/número de pacientes	Autor/Año	Resultados
CUROSURF®	50 mg/kg vía broncoscopio	No controlado, n= 6	Spragg y col. 1994	PaO ₂ /FiO ₂ : mejora transitoriamente.
EXOSURF®	240 mL de 13,5 mg/mL, nebulizado, 24 h, 5 días	Controlado con placebo y aleatorizado, n= 700	Anzueto y col. 1996	No diferencias en PaO ₂ /FiO ₂ , DSV y M
ALVEOFAC®	300 mg/kg vía broncoscopio	No controlado n = 10	Walrath y col. 1996	PaO ₂ /FiO ₂ : mejora
SURVANTA®	-50 mg/kg (8 dosis) -100 mg/kg (4 o 8 dosis) Vía tubo endotraqueal	Controlado con placebo y aleatorizado, n=700	Gregory y col. 1997	Baja dosis: mejora PaO ₂ /FiO ₂ , M: disminuye 18,8/43,8
INFASURF®	2800 mg/m ² vía tubo endotraqueal	Controlado con placebo y aleatorizado, n=29	Willson y col. 1997	PaO ₂ /FiO ₂ : mejora, M=14%
SURFAXIN®	Administración broncoscópica de 30 mL de 2,5 mg/ mL seguido por succión, después 30 mL de 10mg/ mL (grupo 1) 2x 30 mL de 2,5 mg/ mL (grupo 2) seguido por succión 30 mL de 10 mg/ mL +dosis repetidas (grupo 3)	No controlado, grupos secuenciales, n=12	Wiswell y col. 1999	PaO ₂ /FiO ₂ : mejora
CUROSURF®	50 mg/kg a intervalos de 6 a 24 h 200 mg/kg 9 dosis vía tubo endotraqueal	No controlado (<i>niños</i>), n=20	López de Herce y col. 1999	PaO ₂ /FiO ₂ : mejora
ALVEOFAC®T	300 a 500 mg/kg vía broncoscopio	No controlado n = 27	Gunther y col. 2002; Walrath y col. 2002	PaO ₂ /FiO ₂ : mejora
VENTICUTE®	25 mg/kg x 4 (dosis baja) 50 mg/kg x 4 (dosis alta) vía tubo endotraqueal	Controlado con placebo y aleatorizado, n = 40	Spragg y col. 2003	PaO ₂ /FiO ₂ : no mejora, DSV: no cambio
ALVEOFAC®	100 mg/kg + dosis repetidas vía tubo endotraqueal	Controlado con placebo y aleatorizado (<i>niños</i>), n = 40	Möller y col. 2003	PaO ₂ /FiO ₂ : mejora
SURVANTA®	150 mg/kg dos veces a intervalos de 12 h vía tubo endotraqueal	No controlado (<i>niños</i>) n = 36	Yapicioglu y col. 2003	PaO ₂ /FiO ₂ : mejora

PaO₂/FiO₂ (mmHg): Presión parcial arterial de oxígeno vs fracción inspirada de oxígeno (indicador respiratorio).

DSV: Días sin ventilación mecánica.

M: Mortalidad.

3. CARACTERIZACION DE LAS PROPIEDADES INTERFASIALES, MORFOLOGICAS Y TERMOTROPICAS DE SURFACEN.

3 CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES INTERFASIALES, MORFOLÓGICAS Y TERMOTRÓPICAS DE SURFACEN.

3.1 Introducción

Independientemente de la reconocida aplicación exitosa de las preparaciones de surfactantes comerciales, un estudio clínico comparativo entre SURVANTA[®] y CUROSURF[®] en neonatos pretérminos reveló diferencias entre estas preparaciones en cuanto a los indicadores respiratorios y de mortalidad (Ramanathan y col., 2004). Por otra parte la aplicación terapéutica de los surfactantes comerciales en el SDRA no ha sido exitosa (Anzueto y col., 1996 y Spragg y col., 2003).

Observaciones experimentales demuestran que la composición del surfactante natural varía significativamente entre especies (Holm y col., 1996). A las diferencias de composición en función de la fuente utilizada se suman las diferencias debidas al método de extracción y producción, y a la adición frecuente de componentes como la DPPC o el ácido palmítico. No existe por tanto aún una composición de surfactante universalmente aceptada (Bernhard y col., 2000 y Rüdiger y col., 2005).

Los métodos físicos utilizados en la evaluación de las propiedades tensioactivas de un surfactante pulmonar incluyen diferentes variantes de equipos que se han diseñado con el fin de medir la tensión superficial de forma dinámica con la variación del área. Estos incluyen a la balanza de superficie (Clements, 1957), el surfactometro de burbuja pulsátil (Enhorning, 1977) y el surfactometro de burbuja cautiva (Schürch, 1995). La mayoría de los estudios analizan las preparaciones de surfactantes a concentraciones a las cuales ejercen su actividad surfactante, es decir se utilizan concentraciones en exceso, de manera que no se aprecian diferencias en la eficacia. Estudios dirigidos a evaluar estas preparaciones a menores concentraciones son los que revelan las diferencias entre las mismas (Bernhard y col., 2000). Esto adquiere una

importancia vital, al orientarse el uso terapéutico de dichas formulaciones a enfermedades respiratorias donde existe la inactivación del surfactante.

En la última década las transiciones estructurales que adopta la película de surfactante en la interfase aire-líquido son visualizadas por microscopía de fluorescencia. Estos estudios se han llevado a cabo fundamentalmente en sistemas modelos de lípidos y proteínas para conocer el mecanismo molecular por el cual las proteínas del surfactante modulan la dinámica de la película de surfactante (Discher y col., 1999; Pikhova y col., 2001; Knebel y col., 2002 y Cruz y col., 2004). Estudios de este tipo comienzan a realizarse dirigidos a las preparaciones de surfactante comerciales en CLSE[®] (Discher y col., 1996), BLES[®] (Nag y col., 2002) y SURVANTA[®] (Alonso y col., 2004). A partir de estas consideraciones podemos decir que se dispone de pocos estudios comparativos estandarizados en cuanto a las diferencias bioquímicas, funcionales y morfológicas de las preparaciones de surfactantes comerciales de amplio uso clínico. En este sentido no se disponen de los estudios de las propiedades interfasiales de SURFACEN[®] en balanza de Wilhelmy, ni de los estudios de las transiciones de fases del mismo por métodos morfológicos y termotrópicos es por esto que el objetivo de este capítulo es:

Determinar las propiedades biofísicas de SURFACEN[®] teniendo en cuenta la evaluación de las características interfasiales mediante isothermas presión-área (π -A), las morfológicas a través de microscopía de fluorescencia y su comportamiento termotrópico mediante calorimetría diferencial de barrido, en comparación con otras preparaciones de surfactante homologas.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Reactivos: Los reactivos empleados se obtuvieron de las firmas que se indican: Cloroformo, Metanol (Laboratorios Merk, Alemania), [1-palmitoil, 6-(N-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-PC (NBD- PC)] (Avanti Polar Lipid), bromuro de sodio (NaBr) (Laboratorios Sigma, MO). El resto de los reactivos utilizados eran puros para análisis de los Merk (Alemania) o BDH (UK).

3.2.2 Productos utilizados:

Surfactante pulmonar natural porcino (SPNP): Se obtuvo a partir de lavados con cloruro de sodio (NaCl) 0,15 M a pulmones porcinos (Keough y col., 1985). El lavado obtenido fue centrifugado a $1000 \times g$ por 10 min para eliminar el componente celular y el sobrenadante se centrifugó a $20\,000 \times g$ por 1 h, el precipitado obtenido (surfactante) fue disuelto en una solución compuesta por bromuro de sodio (NaBr) al 16 % y NaCl al 0,9 %, sobre la que se añadió un volumen NaBr al 13 % y NaCl al 0,9 % para formar un gradiente de densidad discontinuo y se centrifugó a $26\,000 \text{ r.min}^{-1}$ por 2h. El material obtenido en la interfase entre los dos medios de diferente densidad constituye el surfactante pulmonar natural porcino.

Extracto orgánico de surfactante pulmonar porcino (ESPNP): El surfactante natural porcino se usó para extraer el material hidrofóbico mediante combinaciones de la mezcla cloroformo: metanol: agua mediante el método de Bligh y Dyer (1959). El material obtenido contiene todos los lípidos y las proteínas hidrófobas (SP-B y SP-C) presentes en el surfactante pulmonar porcino.

SURFACEN[®]: Es un surfactante pulmonar natural obtenido a partir de lavado pulmonar porcino, el cual se extrae con cloroformo: metanol (2:1 v/v). Se presenta en forma de un liofilizado estéril de color blanco que contiene 50 mg de PL, 0,3 a 0,7 mg de proteínas hidrófobas y 2,03 a 3,03 mg de otros lípidos (Manzanares y col., 1995).

CUROSURF[®]: Es un surfactante pulmonar natural obtenido a partir de triturado de pulmones porcino, el cual se extrae con cloroformo: metanol. Se presenta en forma de suspensión de color blanco-amarilla conteniendo 120 mg de PL en 1,5 mL (Robertson y Curstedt, 1988).

3.2.3 Isotermas π -A en la Balanza de Wilhelmy

Se realizó según lo descrito por Clements (1977). Se depositó lentamente las muestras (ESPNP, SURFACEN[®] y CUROSURF[®]) entre 35 y 38 μL de muestra en disolvente orgánico y 70 μL de muestra (SPNP, SURFACEN[®] y CUROSURF[®]) en solución acuosa, con una microjeringa Hamilton sobre una cubeta que contiene 300 mL de una solución amortiguadora

Tris-HCl 5 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0 de una balanza de superficie (NIMA Technology, Coventry, Inglaterra). Tras equilibrar la película interfacial durante 10 min se procedió a comprimir la superficie a 65 cm²/min (área máxima = 212 cm², área mínima = 40 cm²), a una temperatura de la subfase constante a 26 ± 1°C registrándose los cambios de presión superficial. Las muestras se sometieron a 10 ciclos de compresión-expansión.

3.2.4 Isoterma de compresión π -A e imágenes de transiciones de fases en películas interfaciales por microscopia de epifluorescencia

Se realizó según el método descrito por McConnell (1991). Brevemente se depositó lentamente una solución de 1 mg/mL en cloroformo de ESPNP, SURFACEN[®], CUROSURF[®] en una subfase que contenía una solución amortiguadora de Tris 0,5 M con NaCl 0,15 M, pH 7,0 en una balanza de superficie modificada (Nima Technology, Coventry, UK). Después se esperó 10 min para que se evaporara el solvente, las monocapas fueron comprimidas. Después de 10 min de equilibrio la monocapa conteniendo de PC fluorescente [1-palmitoil, 6-(N-7-nitrobenz-2oxa-1,3-diazol-4-il)-PC (NBD- PC)] al 1 % fue transferida a láminas de vidrio a una velocidad de 25 cm²/min, las cuales fueron previamente inmersas en la subfase para formar películas Langmuir-Blodgett (LB). Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron obtenidas en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan II (Carl Zeiss, Jena, Alemania) equipados con filtros de fluorescencia apropiados para la observación (emisión de fluorescencia máxima a 520 nm).

3.2.5 Determinación de las características termotrópicas

Las medidas termotrópicas se realizaron mediante calorimetría diferencial de barrido VP-DSC de MicroCal (Baltimore, MD). Las células de muestra se cargaron con 0,5 mL de cada suspensión (SPNP, ESPNP, SURFACEN[®] y CUROSURF[®]) mientras en la célula de referencia se cargó con una alícuota equivalente a la solución amortiguadora. De cada muestra se obtuvieron 10 barridos de 5 a 60 °C a una velocidad de 1°C/min.

3.3 Análisis estadístico

En las isothermas π -A los experimentos que se presentan en las figuras son el resultado de la media de repetir al menos tres veces. Para el análisis de los valores de π máxima y mínima se expresaron como la media $\pm$ el error estándar de la media ($x \pm \text{EEM}$) y se empleó la prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) usando el paquete estadístico STATIGRAPHY versión 3. En el experimento de calorimetría los resultados fueron procesados por restar la línea base y estimar la entalpía asociada a la transición y la temperatura de transición (T_m) utilizando el programa Origin versión 7, las curvas obtenidas son la media de al menos tres determinaciones.

3.4 Resultados

3.4.1 Isothermas π -A en la Balanza de Wilhelmy

La figura 8 muestra las isothermas de presión-área de la película interfasial de SURFACEN[®] (A), CUROSURF[®] (B), ESPNP (C) en medio orgánico durante 10 ciclos de compresión-expansión a 26 °C. La presión superficial (π) es la diferencia entre la tensión de superficie del agua (70mN/m) y la tensión de superficie de la sustancia que se mide: $\gamma = 70 - \pi$, por tanto, alta presión de superficie corresponden a baja tensión superficial. La presión de colapso de una monocapa corresponde a la mayor presión de superficie (menor tensión superficial) que puede alcanzar la película de fosfolípidos antes de que la monocapa se pliegue o se rompa. Se plantea que una presión de colapso elevada (alrededor de 70 mN/m supondría tensiones superficiales cercanas a 0 mN/m) y reproducible es esencial para minimizar el trabajo respiratorio.

Desde el punto de vista cualitativo se observó similitud en la estabilidad de las películas de SURFACEN[®] y del ESPNP comparadas con las de CUROSURF[®]. Ambos, SURFACEN[®] y ESPNP alcanzan π cercanas a 70 mN/m, tienen largas mesetas de exclusión (en compresión) y de re-inserción (en expansión), y elevada reproducibilidad. Independientemente de los valores finales de π , en la figura 8 se observa que SURFACEN[®] desde el punto de vista cualitativo es ligeramente inferior a las películas de ESPNP dado por una pequeña diferencia en la estabilidad, y menores mesetas (sobre todo la de re-inserción).

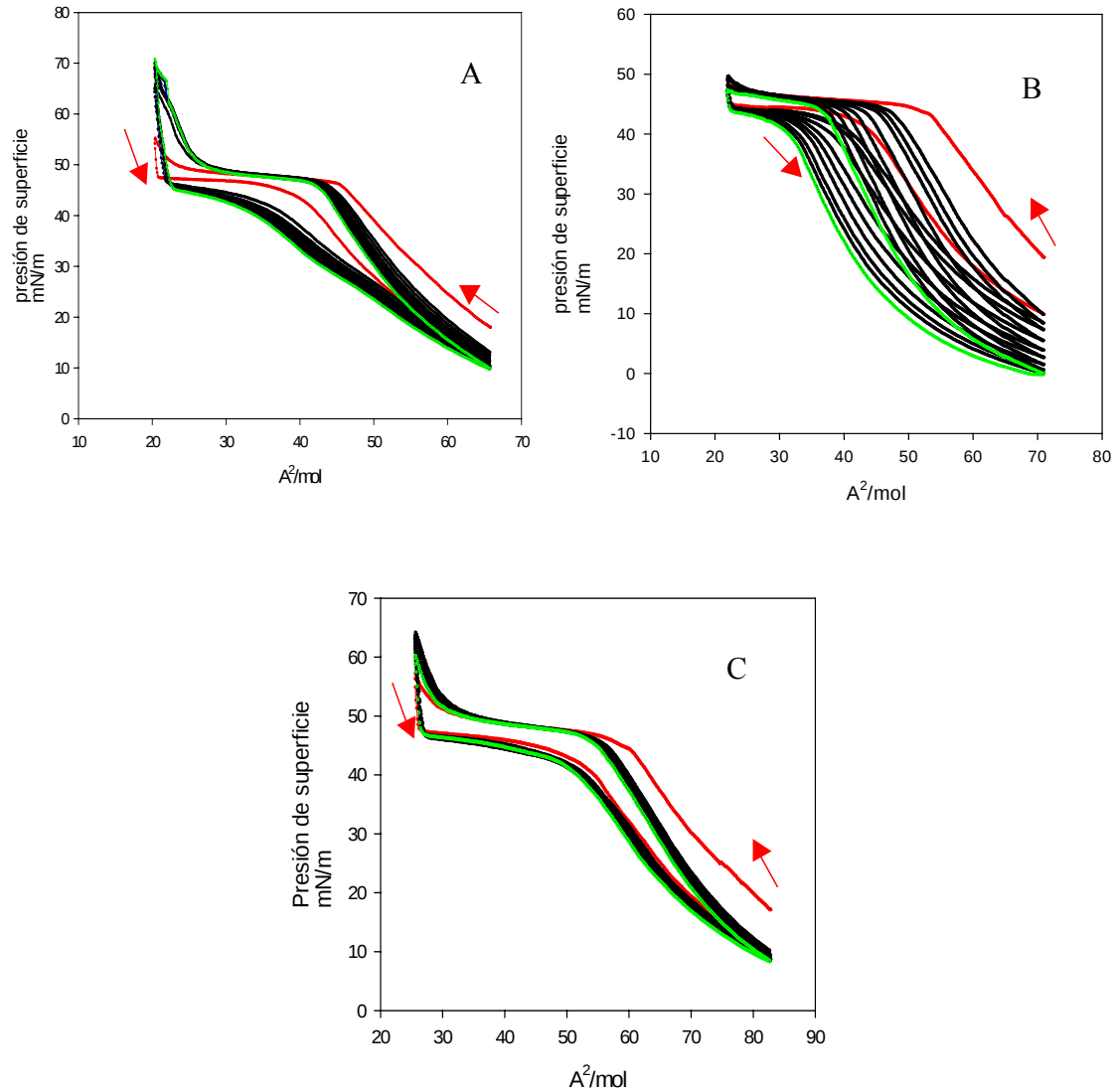


Figura 8. Isotermas de compresión-expansión cíclica de monocapas de SURFACEN[®] (A) y CUROSURF[®] (B) y ESPNNP (C) en medio orgánico. Las monocapas se comprimieron y expandieron a temperatura constante (25°C) durante 10 ciclos consecutivos registrándose los cambios de presión superficial en función del área. Las flechas rojas con sentido hacia arriba o hacia abajo indican el comienzo de la compresión o expansión, respectivamente. La curva roja representa el primer ciclo y la verde el décimo ciclo. Las curvas son el promedio de tres repeticiones.

Las regiones de las isothermas que muestran la reinserción de los componentes del surfactante durante la expansión son mesetas mucho más marcadas y extensas para ESPNP y para SURFACEN[®] en comparación con CUROSURF[®]. SURFACEN[®] mostró isothermas reproducibles a lo largo de los 10 ciclos de pulsación, con la peculiaridad de que a medida que avanzan los ciclos se alcanzan mayores π de colapso, lo que habla a favor de la eficiente capacidad de los componentes de SURFACEN[®] de reincorporarse a la interfase después del colapso. Está demostrado que los surfactantes que manifiestan esta propiedad son mejores tensioactivos. Si comparamos las π máximas y mínimas de cada ciclo de estas preparaciones, podemos observar como SURFACEN[®] fue significativamente superior al ESPNP ($p=0,002$), a pesar de que el comportamiento cualitativo de las isothermas cíclicas es mucho más parecido e incluso mejor para el ESPNP, asimismo estos datos mostraron la superioridad de SURFACEN[®] sobre CUROSURF[®] ($p=0,001$). A su vez es interesante resaltar que en SURFACEN[®] se lograron obtener π mínima sostenidas al final de la expansión (figura 9). SURFACEN[®] presentó un comportamiento dinámico en compresión cualitativamente similar al del ESPNP.

Los resultados mostrados en la figura 10 representan las películas formadas por extensión de suspensiones acuosas de SPNP, SURFACEN[®] y CUROSURF[®] de manera que se depositan bicapas, y la formación de las películas deben empezar por la transferencia de especies moleculares de las bicapas a la interfase. La suspensión de SPNP dió isothermas mucho más estables y repetitivas y SURFACEN[®] presentó un comportamiento similar al mismo, lo que evidencia sus buenas propiedades como surfactante (figura 10). La muestra de CUROSURF[®] disuelta en solución acuosa presentó un comportamiento mejor a medida que transcurren los ciclos en comparación con su forma en medio orgánico en cuanto a la presión de superficie máxima. Sin embargo el comportamiento de disminución de la presión de superficie mínima tanto en solución acuosa como orgánica fue el mismo (figura 11).

3.4.1.1 Isotherma de compresión π -área e imágenes de transiciones de fases en películas interfaciales

Las figuras 12, 13 y 14 muestran la isoterma típica de compresión y sus imágenes observadas a partir de las películas de A: SURFACEN[®], B: CUROSURF[®] y C: ESPNP[®] junto a la sonda

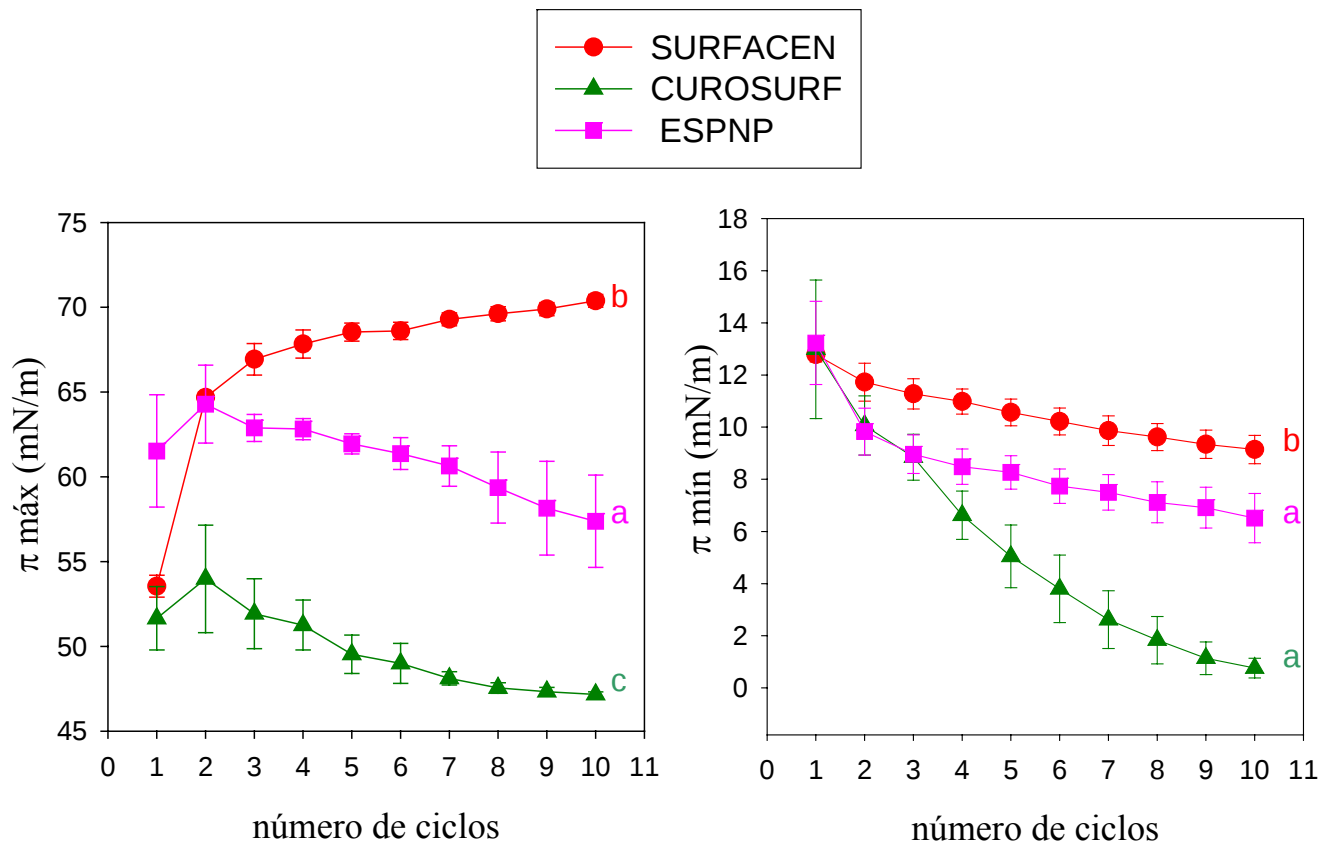


Figura 9. Valores de presión de superficie máxima (π) y mínima de ESPNP, SURFACEN[®] y CUROSURF[®] en solución orgánica, obtenidos a partir de las isothermas π -A de la figura 8, en función del número de ciclos. Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de tres experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

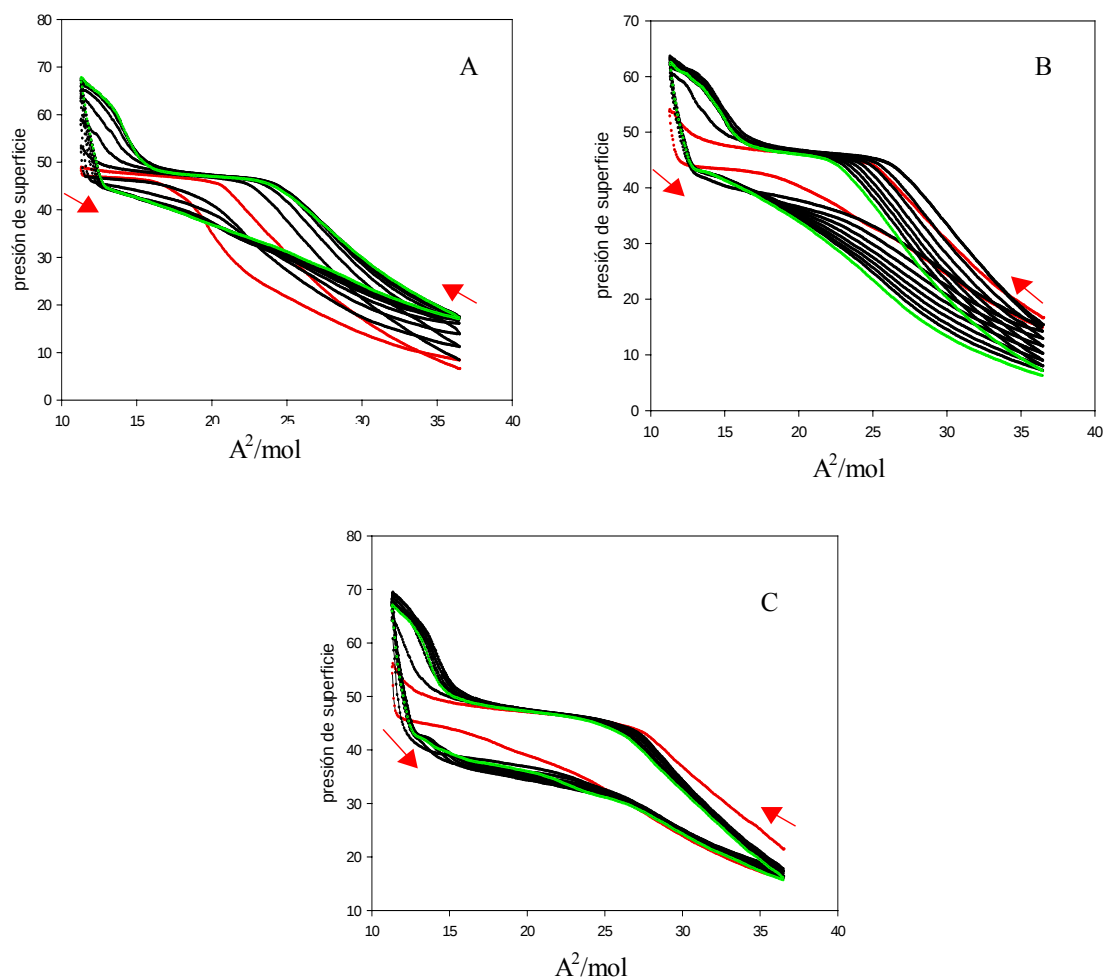


Figura 10 Isothermas de compresión-expansión cíclica de monocapas de SURFACEN[®] (A) y CUROSURF[®] (B) y SPNP (C) en medio acuoso. Las monocapas se comprimieron y expandieron a temperatura constante (25°C) durante 10 ciclos consecutivos registrándose los cambios de presión superficial en función del área. Las flechas rojas con sentido hacia arriba o hacia abajo indican el comienzo de la compresión o expansión, respectivamente. La curva roja representa el primer ciclo y la curva verde el décimo ciclo. Las curvas son el promedio de tres repeticiones.

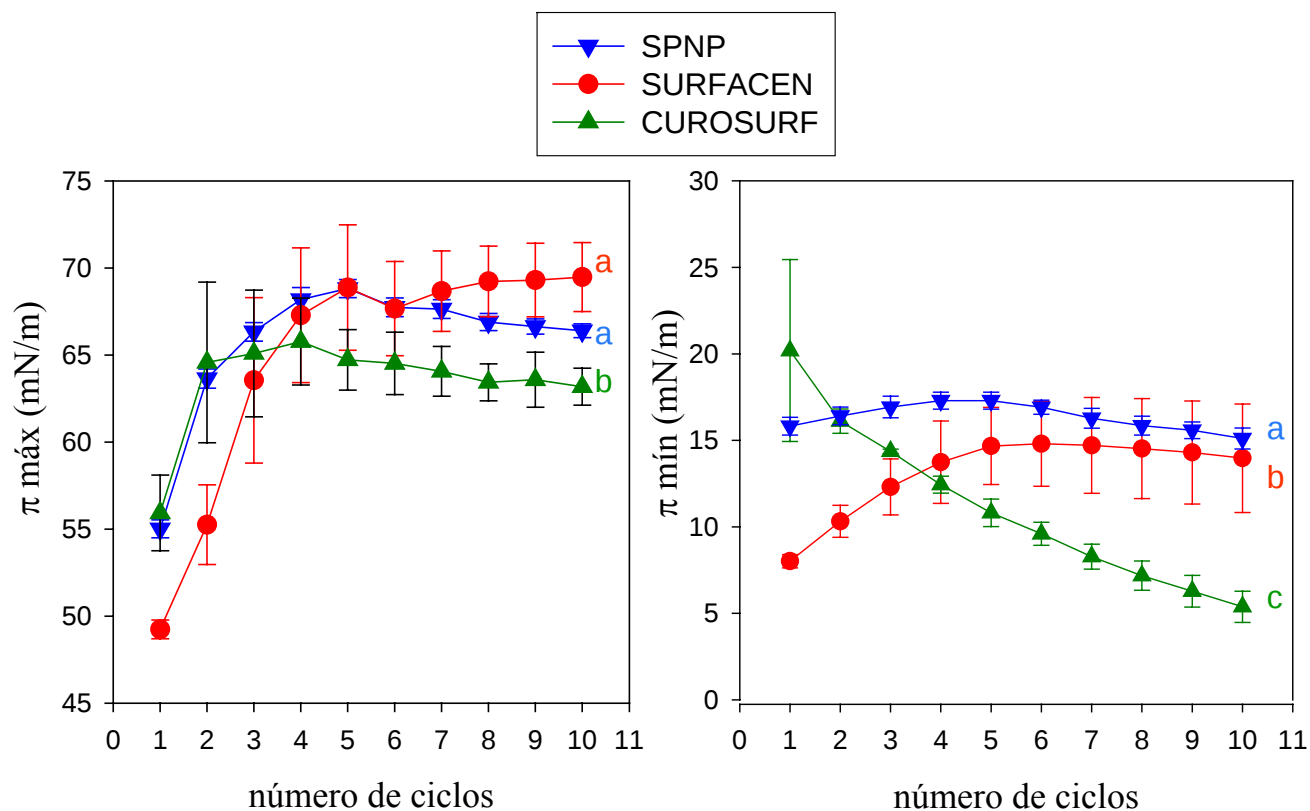


Figura 11. Valores de presión de superficie máxima (π) y mínima de SPNP, SURFACEN[®] y CUROSURF[®] en solución acuosa, obtenidos a partir de las isothermas π -A de la figura 10, en función del número de ciclos. Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de tres experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

fluorescente NBD-PC. Las isothermas mostraron un comportamiento similar presentando una región conocida como plateau a la π de 45 a 48 mN/m. Las imágenes reflejan las transiciones de fase durante la compresión dinámica en la interfase, cada fase de transición es un reflejo de estructuras lipídicas agregadas en una fase coexistiendo con la otra. De forma general dominios oscuros representan áreas de la monocapa conteniendo lípidos en fase comprimida-ordenada y dominios brillantes representa lípidos en fase expandida desordenada. La primera imagen que se observa de la monocapa de SURFACEN[®] corresponde con una π de 22,8 mN/m, a esta presión se empiezan a observar la fase de líquido condensado o dominios de color negro que corresponde a zonas donde se excluye la sonda fluorescente. Con el incremento de la π , imagen de SURFACEN[®] a 37,7 mN/m se observó un incremento en el número de los dominios. Un incremento mayor en la π se traduce en una disminución de estos dominios. A la π de 46,9 mN/m, ubicada dentro de la π de colapso se observó un cambio en el comportamiento en las imágenes de SURFACEN[®], tienden a desaparecer los dominios condensados, conduciendo a una reducción en las regiones oscuras y se observaron zonas brillantes, esto es debido a que la sonda fluorescente se concentra en las regiones menos empaquetadas. Esto ocurre debido a que la sonda se excluye de las regiones más estrechamente empaquetadas debido simplemente a su forma (impedimento estérico) y se acumulan en regiones más pequeñas que por lo tanto aparecen más brillantes. Además cuando la monocapa colapsa lo suele hacer por las zona menos empaquetadas por lo que cuando esto ocurre, las zonas de fractura o donde comienzan a producirse estructuras tridimensionales suelen observarse más brillantes. Un comportamiento similar se observó para las imágenes obtenidas con CUROSURF[®]. Las imágenes captadas para el ESPNP revela la formación de dominios oscuros que coexisten en zona brillantes, lo cual coincide con lo informado por Nag y col. (1998).

3.4.1.2 Característica termotrópicas

La figura 15 muestra los cambios en el calor liberado en las diferentes transiciones termotrópicas que ocurren cuando se calientan las membranas de SPNP, ESPNP SURFACEN[®] y CUROSURF[®]. El comportamiento termotrópico del SPNP, al ser una mezcla de varios compuestos es complejo. Los datos mostrados para SURFACEN[®] experimentan una

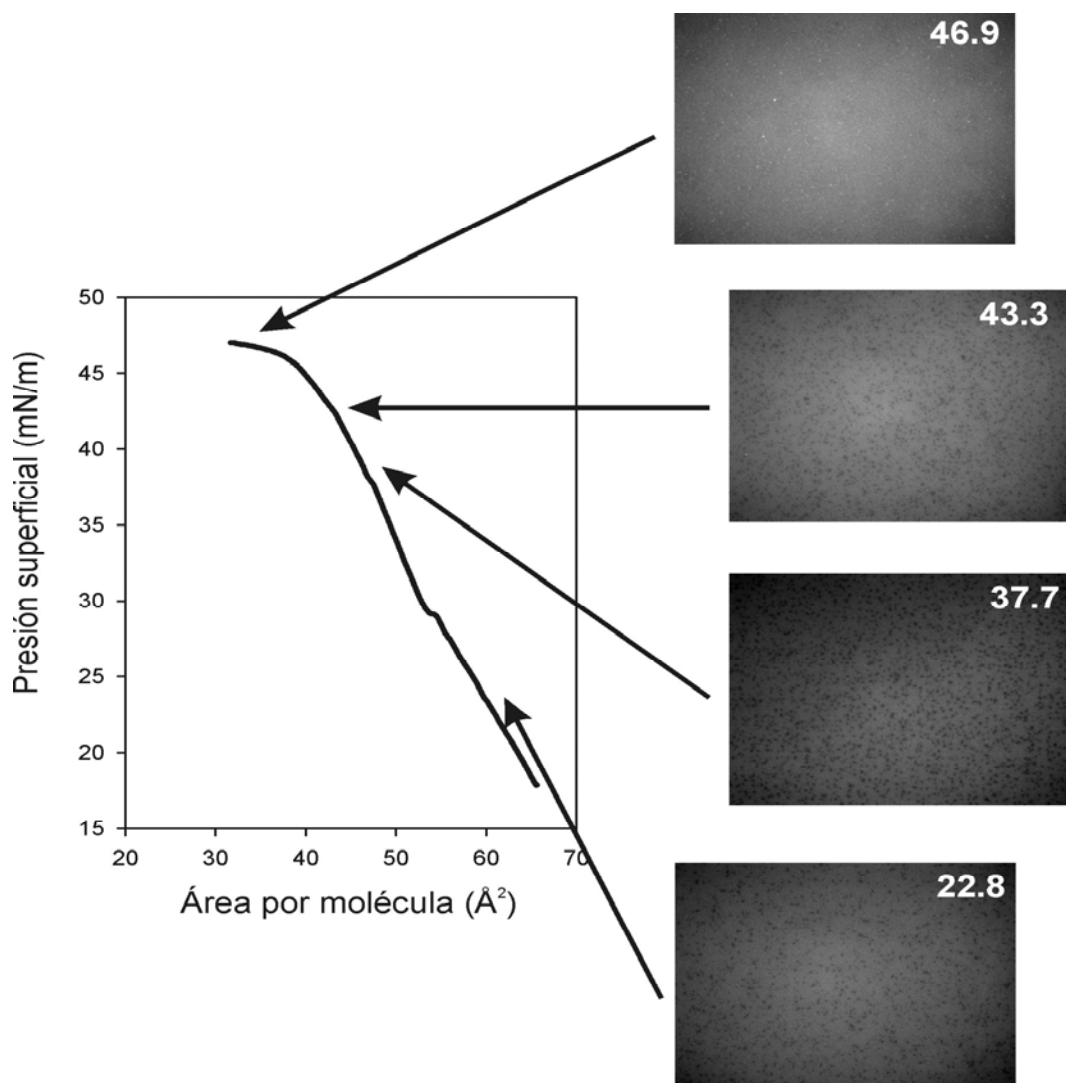


Figura 12. Isoterma π -A de compresión de la monocapa de SURFACEN[®] e imágenes a diferentes π .

Leyenda: Dominios oscuros representan lípidos en la fase comprimida-ordenada y dominios brillantes representa lípidos en fase expandida.

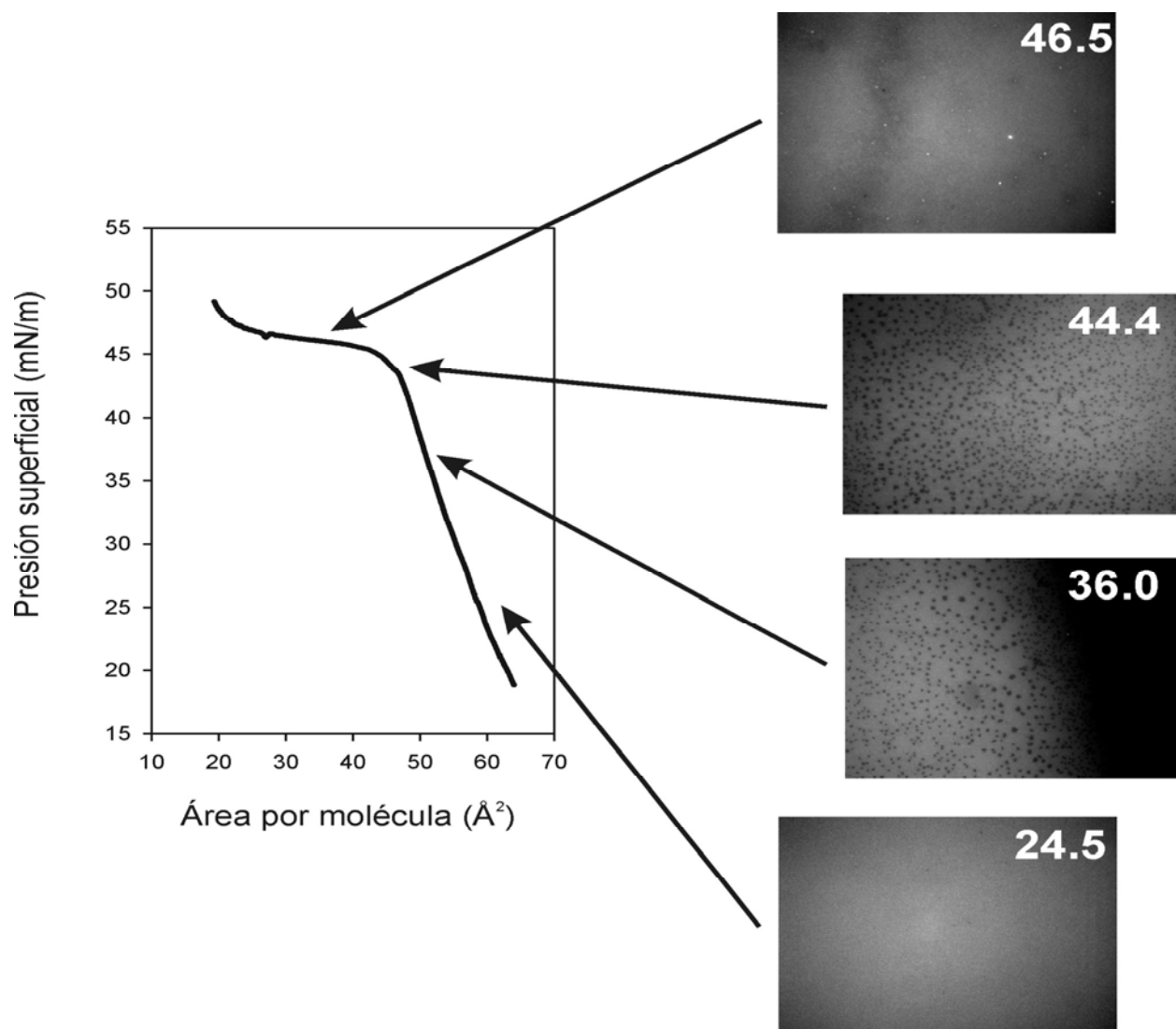


Figura 13 Isotherma π -A de compresión de la monocapa de CUROSURF[®] e imágenes a diferentes π .

Leyenda: Dominios oscuros representan lípidos en la fase comprimida-ordenada y dominios brillantes representa lípidos en fase expandida.

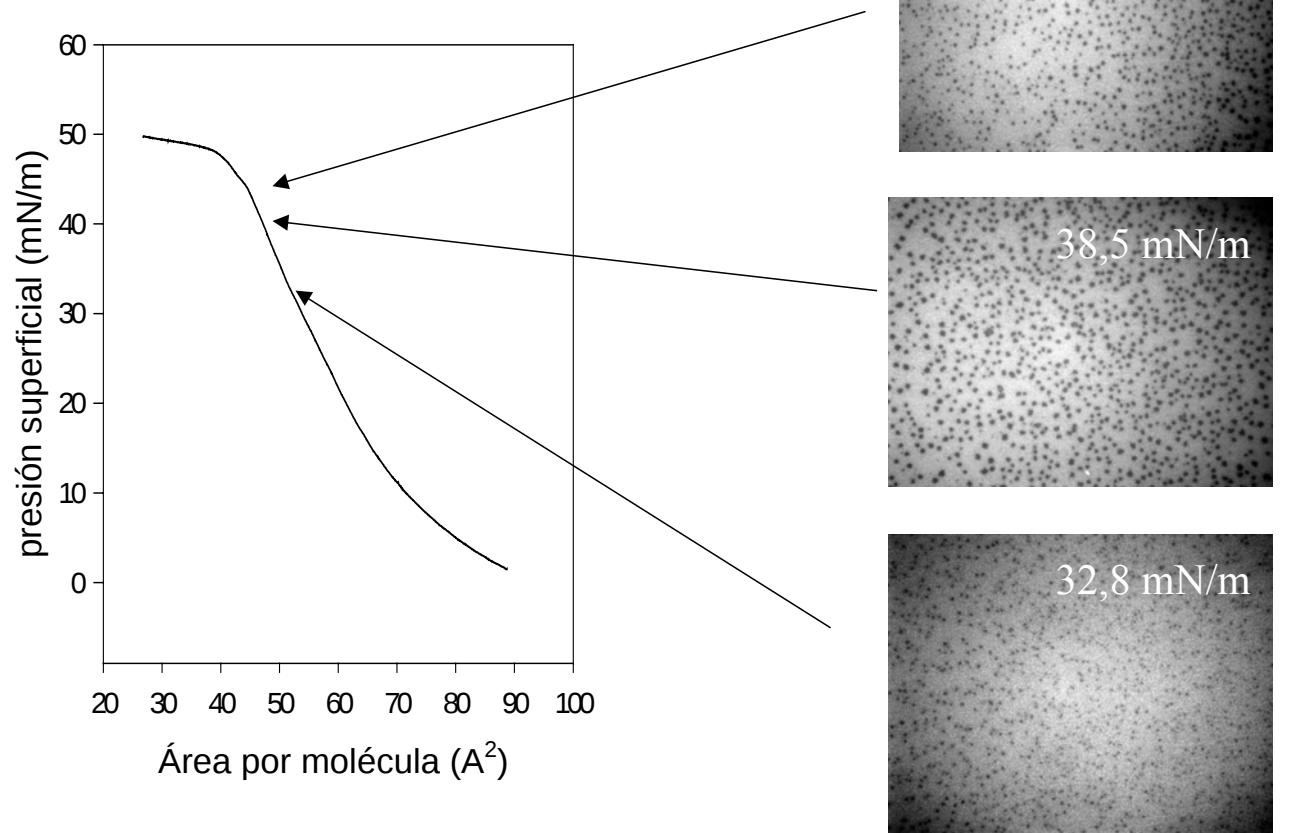


Figura 14. Isotherma π -A de compresión de la monocapa de ESPNP e imágenes a diferentes π .
 Leyenda: Dominios oscuros representan lípidos en la fase comprimida-ordenada y dominios brillantes representa lípidos en fase expandida.
 ESPNP: Extracto de surfactante natural pulmonar porcino

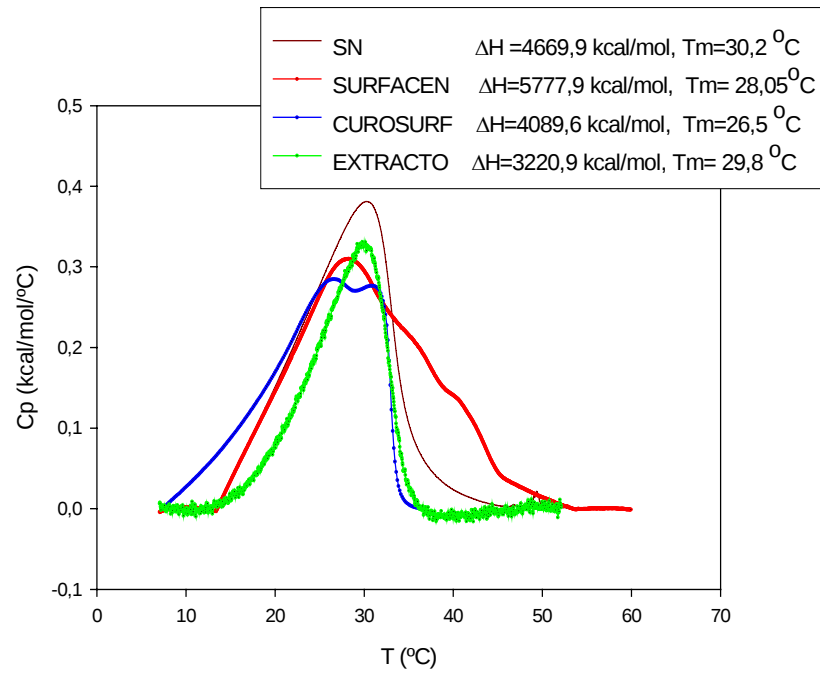


Figura 15. Termograma de SPNP, ESPNP, SURFACEN[®] y CUROSURF[®].
 Leyenda: SPNP surfactante pulmonar natural porcino representado por SN, ESPNP extracto de surfactante pulmonar natural porcino representado por Extracto.

fase de transición compleja y la más amplia comprendida entre 15 y 50°C, ocurriendo la transición de fases a la temperatura (T_m) de 28,05°C. El termograma de SURFACEN[®] mostró un componente entálpico a una temperatura similar al SPNP ($T_m = 30,2$ °C).

3.5 Discusión

Un surfactante pulmonar para ser un buen tensoactivo debe cumplir 5 indicadores: adsorberse rápido de la subfase a la interfase, disminuir la tensión superficial a valores cercanos a cero mN/m, poseer baja comprensibilidad, capacidad de reinsertarse a la monocapa en la expansión y ser estable a elevadas presiones de colapso (Banerjee y Bellare, 2001).

Estos resultados de las isothermas π -A apoyan a que por una parte hay que tener en cuenta el papel de las especies más tensioactivas (sobre todo DPPC), de las que SURFACEN[®] está bien provisto (Manzanares y col. 1995) como el surfactante pulmonar natural (SPN), papel que se muestra sobre todo una vez que esas especies están ya en la interfase (experimentos de extensión de soluciones orgánicas), y por otra parte, a su vez hay que tener en cuenta todo aquello que facilita rápidos y eficientes tránsitos entre bicapas y monocapas, en las dos direcciones. El comportamiento del SPNP y ESPNP refleja la importancia de la fluidez de la membrana que contienen CL y otros compuestos que faciliten rápidos y eficientes tránsitos entre bicapas y monocapas (Bernardino de la Serna y col., 2004). En este sentido SURFACEN[®] evidenció un comportamiento cuantitativo igual al SPNP ($p=0,6$) (figura 11).

La capacidad del surfactante pulmonar para recuperar las moléculas excluidas en la subfase por readsorción a la interfase durante la expansión, así como para alcanzar valores máximos de π (mínimos de tensión superficial, muy próximos a 0 mN/m) en los sucesivos ciclos respiratorios, es una propiedad fundamental de este material (Pérez-Gil y col., 1992 y Possmayer y col., 2001).

Estudios realizados por Bernhard y col., 2000 en el surfactómetro de burbuja pulsátil con ALVEOFACT[®], CUROSURF[®], SURVANTA[®] y EXOSURF[®] demostraron que ALVEOFACT[®] y CUROSURF[®] logran TSM cercanas a 5 mN/m, pero a concentraciones diferentes y que SURVANTA[®] y EXOSURF[®] no logran TSM cercanas a 5 mN/m aún a

mayores concentraciones. Asimismo ninguna preparación terapéutica de surfactante natural fue capaz de igualarse, en cuanto a concentración, con respecto al surfactante natural endógeno, en su propiedad de disminuir la TSM a valores cercanas a 5 mN/m. En el caso del extracto lipídico de surfactante natural bovino logró valores de TSM de 0,9 mN/m a la concentración de 2 mg/mL, sin embargo a la concentración de 1 mg/mL su TSM fue de 21,4 mN/m, lo cual coinciden con los resultados del presente trabajo.

El polimorfismo lipídico es el responsable de que los lípidos puedan encontrarse formando diferentes estructuras y en diferentes fases, por tanto es la causa de que haya transición lateral de fases, que es el cambio de una fase a otra. La segregación lateral ocurre cuando bajo determinadas circunstancias, normalmente durante la transición de fase coinciden en una misma presión y temperatura, diferentes fases lo que origina la aparición de dominios.

Piknova y col. (2002) plantearon que cuando se analiza la composición de los lípidos del surfactante y el comportamiento de fase de una mezcla de lípidos simples se deduce que pueden existir tres comportamientos de fases. La DPPC componente mayoritario que según estimación reciente comprende del 30 al 45 % de los PL del surfactante (Postle y col., 2001) presenta una temperatura de transición gel a líquido cristalino de 41°C lo que indica la posibilidad de una fase sólida a temperatura fisiológica. Además de los otros PL que poseen una temperatura de transición más baja, el SPN contiene colesterol, lo que implica la presencia de dos fases fluidas, una desordenada y otra ordenada, distinguidas en parte por su contenido en CL.

SURFACEN[®], al igual que el ESPNP, presenta separación lateral de fase, con formación de dominios condensados probablemente enriquecidos en DPPC. De forma general los dominios son comunes para este tipo de preparaciones y pueden ser esenciales para la función surfactante (Nag y col., 1998).

Los dominios condensados en BLES[®] aparecen a la presión de superficie de 12 mN/m y crecen en tamaño según se va comprimiendo la película. La isoterma y el patrón de dominios condensados crecen en BLES[®] hasta 20 mN/m y son similares a aquellos previamente observados en películas de extracto de pulmón de ternero y porcino (Discher y col., 1996;

1999 y Nag y col., 1998). El comportamiento observado en BLES[®], a su vez, es similar al de la fracción de fosfolípidos de ternero (Piknova y col., 2001).

SURVANTA[®] (Alonso y col., 2004) posee dominios discretos oscuros que coexisten con un fondo brillante continuo similar a las mezclas de lípidos y lípidos-proteínas. Cuando la presión superficial es incrementada los dominios oscuros incrementan, aunque la fase brillante permanece continua hasta 43 mN/m. Los dominios son lejanamente monodispersos y la forma es circular a elíptica. Los dominios oscuros son asumidos ser fases cristalinas que excluye a la sonda fluorescente que no puede empaquetarse en ella. En la segunda compresión la morfología de la película de surfactante es la misma pero hay una mayor fracción de dominios oscuros a la misma π , esto es consistente con el cambio de la isoterma hacia menores áreas.

Banerjee y Bellare (2001) propusieron un sistema patrón para evaluar la eficacia de preparaciones de surfactantes en condiciones estandarizadas, evalúan dos surfactantes sintéticos EXOSURF[®] y ALEC[®] con mezclas binarias de DPPC y PG. La mejor respuesta interfasial la obtuvieron con la mezcla binaria PC: PG (2:3), lo cual coincide con los resultados de Holm y col. (1996) que plantearon que mezcla de PL con un contenido mas bajo de DPPC (40%) mostraron un comportamiento de las isothermas π -A más semejante a un surfactante exógeno natural (CLSE[®]) comparado con concentraciones mayores de DPPC.

Los resultados obtenidos en las imágenes de las películas de SURFACEN[®], CUROSURF[®] y ESPNP están en correspondencia con lo planteado por Piknova y col. (2001) que demuestran que monocapas conteniendo el espectro completo de los PL del surfactante están en la fase expandida y persisten en coexistencia con dominios condensados hasta la π de 70 mN/m. Los resultados obtenidos en el presente trabajo revelan la coexistencia de fases de las preparaciones de surfactantes ensayadas.

La capacidad de sostener alta π es característica de películas liquido-condensada. Sin embargo cuando el surfactante se comprime in vitro demuestra un comportamiento de fase liquido expandida (Smith y Berg, 1980), colapsando rápidamente cuando logra una π de equilibrio de 45 mN/m (Pison y col., 1996). Estas observaciones han conducido a la mayoría de los investigadores ha aceptar que el surfactante sufre un proceso de refinamiento composicional

antes de lograr la estabilidad a alta presión de superficie. Solamente la DPPC puede formar dominio líquido condensado. La transición de los otros lípidos ocurre a temperatura por debajo de la temperatura ambiente. La teoría del squeeze out supone que el refinamiento de estos PL ocurre por encima de la π de equilibrio (Clements, 1977 y Bangham y col. 1979). Investigaciones mas recientes han sugerido que en vez de o en adición al squeeze out los componentes refinados resultan a partir de una adsorción selectiva de DPPC durante la formación de la película de superficie activa (Schürch, 1995).

El uso de métodos de microscopio provee un acceso directo al comportamiento de fase incluso a mezclas tan complejas como el surfactante pulmonar. Microscopia de fluorescencia y ángulo Brewster distingue dos fases que coexisten en un amplio rango de π hasta 40 mN/m de extracto de surfactante (Discher y col. 1996 y Nag y col., 1998).

Cruz y col. (2004) evalúan el efecto de la SP-B en sistemas modelos de fosfolípidos y encuentran que la SP-B afecta la distribución de regiones líquido extendida-líquido condensado de películas de DPPC o DPPC/DPPG de manera que los microdominios condensados se convierten más numerosos, pero su tamaño disminuye resultando en una disminución total de la cantidad de fase líquido condensada. A nivel nanoscópico SP-B causa una marcada disminución también de los nanodominios como condensados dentro de la fase líquido extendida. SP-B promueve un enredado nanoscópico de nanodominios de lípidos y lípidos-proteínas que es asociado a una resistencia a deformarse la película de superficie activa. El efecto de la SP-B en la estructura nanoscópica fue mayor en mezclas DPPC/DPPG indicando una contribución adicional de la interacción electrostática lípido-proteína. Esta característica de la SP-B le permite que simultáneamente sostenga estabilidad estructural así como flexibilidad dinámica en la película de surfactante en las condiciones extremas impuestas por la mecánica respiratoria. En este sentido surfactantes con mayores contenidos en SP-B son más eficaces en las propiedades biofísicas y SURFACEN[®] al ser un surfactante obtenido de lavado pulmonar se encuentra en ventaja en comparación con los obtenido de triturado de pulmón.

Estudios realizados por Nag y col. (2002) con el BLES[®] muestra un comportamiento termotrópico complejo típico de este tipo de preparaciones con un pico alrededor de los 28 °C y un cambio de entalpía entre 10 y 35 °C. McMurchie y col. (1983) estudiaron el comportamiento termotrópico de los lípidos del surfactante procedentes de oveja, rata y conejo y encontraron diferencias en el límite superior de transición de fase siendo 30,1; 36,8 y 36,3 °C para oveja, rata y conejo.

Experimentos de calorimetría de extracto de surfactante con (Dluhy y col., 1989) o sin (Ebel y col., 2001 y Nag y col., 2002) colesterol demuestra coexistencia de fase que se extiende sobre un amplio rango de temperatura y que finaliza justo por debajo de 37 °C. Nag y col. (2002) analiza por calorimetría un surfactante bovino carente de colesterol y encuentran coexistencia de fase gel-líquido cristalina y baja diferencias energética indicativo de una composición similar en ambas fases lo que indicaría mayor porcentaje de lípidos saturados.

Los resultados de SURFACEN[®] por calorimetría confirman las transiciones de fases que tiene lugar en este tipo de preparaciones y corrobora los resultados obtenidos por epifluorescencia.

3.6 Conclusión

Se demostró que SURFACEN[®] presenta propiedades interfasiales similares al surfactante natural, incluyendo la presencia de rápidas transiciones bicapa-monocapa, baja tensión superficial y estabilidad durante ciclos repetidos de compresión-expansión. Estas propiedades resultaron ser superiores a las de un surfactante exógeno comercial. Desde un punto de vista estructural, las películas de SURFACEN[®] muestran procesos de separación lateral de fases similares a los del surfactante nativo y propiedades termotrópicas consistentes en transiciones de fases complejas. En conjunto, estas características funcionales y estructurales reproducen en gran medida el comportamiento del sistema surfactante nativo.

4. EFECTO ANTI-INFLAMATORIO Y ANTIBACTERIANO DE SURFACEN®.

4 EFECTO ANTI-INFLAMATORIO Y ANTIBACTERIANO DE SURFACEN®

4.1 Introducción

Históricamente el pulmón es percibido como un órgano primariamente involucrado en el intercambio gaseoso. Sin embargo el epitelio pulmonar expone una superficie media de 70 m² (en el hombre) al contacto con el medio externo. Se hace por tanto imprescindible la presencia de mecanismos de defensa reforzados. Además de constituir la primera barrera física para la entrada de microorganismos, el surfactante pulmonar y más concretamente las proteínas hidrofílicas, interaccionan con una gran variedad de patógenos estimulando su fagocitosis (Crouch y Wright, 2001 y Kramer y Speer, 2003). El surfactante actúa como agente quimiotáctico de macrófagos y otras células fagocíticas, al tiempo que se le otorga un papel inmunosupresor que parece residir en sus componentes fosfolipídicos (Wilsher y col., 1988 y Wright, 1997). El desarrollo de ambas funciones, en principio paradójico, es fundamental para mantener un equilibrio adecuado en la respuesta inmune, considerando el alto grado de exposición del epitelio respiratorio a agentes externos. Estudios más recientes también relacionan las proteínas hidrofóbicas del surfactante con su función inmunorreguladora (van Iwaarden y col., 2001; Augusto y col. 2002; 2003a y 2003b).

En enfermedades respiratorias diferentes al SDRN, tal como el SDRA existe una función anormal del surfactante, esto unido a un contexto inflamatorio y a las propiedades inmunomodulatorias del surfactante pulmonar, inició una serie de investigaciones a nivel experimental y clínico dirigidas a evaluar el efecto terapéutico de las preparaciones de surfactantes. Estudios en animales y ensayos clínicos han demostrado un efecto inmunomodulatorio del surfactante (Woerndle y col., 1994) encontrándose diferencias significativas entre CUROSURF®, SURVANTA® y ALVEOFACT® (Tegtmeyer y col., 1996). Así mismo diferencias entre preparaciones de surfactantes en cuanto a las propiedades antibacterianas son informadas (Neumeister y col., 1996 y Rauprich y col., 2000).

Hay crecientes evidencias que especies moleculares de fosfolípidos ejercen efectos distintos en las células del pulmón. Las especies moleculares de PC tales como la PC 16:0/12:0 y la PC 16:0/16:1, que presentan en la posición 2, ácidos grasos de longitud corta o insaturados son capaces de suprimir la producción del anión superóxido en células fagocíticas más eficientemente que otros componentes como la PC 16:0/18:1 y la PC 16:0/16:0 (Ahuja y col., 1996 y Smith y col., 1999).

SURFACEN[®] es reconocido por sus propiedades tensioactivas, sin embargo no están demostradas sus propiedades anti-inflamatorias y antibacterianas. Dado estos elementos el objetivo de este capítulo es:

- Determinar el efecto anti-inflamatorio de SURFACEN[®] en un modelo de choque séptico y daño agudo pulmonar, conocer su efecto sobre el TNF α y la ICAM-1 *in vitro*, así como sus propiedades antimicrobianas en bacterias Gram positivas y Gram negativas *in vitro*

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Reactivos: lipopolisacarido (LPS) serotipo 055:B5, hexadeciltrimetil amonio, o-dianisidina, peróxido de hidrógen, hidroxitoluenobutilado (BHT), ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico, medio RPMI-1640, glutamina, penicilina, suero fetal bovino, Actinomicina D TNF α humano, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), IL-1 β , forbol miristil 13-acetato (PMA) de Laboratorios Sigma (ST. Louis, MO). El resto de los reactivos utilizados eran puros para análisis de los Merk (Alemania) o BDH (UK).

4.2.2 Animales

Los animales (ratas y ratones) fueron suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Bejucal, La Habana, Cuba). Se adaptaron por una semana a las condiciones de laboratorio, estuvieron en un local con ambiente controlado con una temperatura de 23 ± 2 °C, con ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad y una humedad relativa de 50-70 % con libre acceso a la alimentación (dieta estándar, CENPALAB) y al agua.

Para la administración intratraqueal (i.t.) se realizó el siguiente procedimiento: los animales se anestesiaron con vapores de éter dietílico hasta que su respiración se hizo lenta, se ubicaron de cubito supino y se practicó una pequeña incisión en la piel a nivel de la tráquea, se decoló la zona de la tráquea y se inyectó el LPS, posteriormente se suturó la piel. Todos los procedimientos fueron realizados según lo aprobado por los Comités Internacionales para el Cuidado de los Animales y de acuerdo con las regulaciones nacionales para la experimentación animal (R 15: Cuidado y manejo de animales de laboratorio. Principios éticos).

4.2.3 Modelo de inflamación *in vivo*

4.2.3.1 Modelo de choque séptico en ratones inducido por lipopolisacárido (LPS)

Se utilizaron ratones Balb/c machos, de 20 a 22 g, se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos experimentales, cada uno con 10 animales, Grupo I: Control negativo solución de NaCl 0,9 %, Grupo II: control positivo LPS 30 mg/kg, serotipo 055:B5, por vía intraperitoneal (i.p.), Grupo III: LPS 30 mg/kg i.p. + SURFACEN[®] 25mg/kg i.t., 50 µL, Grupo III: LPS 30 mg/kg i.p. + SURFACEN[®] 50 mg/kg i.t., GRUPO IV: LPS 30 mg/kg i.p. + SURFACEN[®] 100 mg/kg i.t. SURFACEN[®] fue administrado 5 h después de aplicado el LPS, a los grupos I y II se le aplicó solución de NaCl 0,9 %. A las 24 h los ratones se sacrificaron, se abrió el tórax y se extrajo el módulo corazón-pulmón-tráquea, se separó el pulmón y se pesó en balanza analítica (Sartorius), lo que representa el peso húmedo (PH), posteriormente el pulmón se secó en estufa (4 h a 80 °C) y se pesó lo que constituye el peso seco (PS).

4.2.3.2 Modelo de daño agudo pulmonar en ratas inducido por LPS

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos, de 220 a 240g. Se formaron tres grupos de 12 ratas cada uno, Grupo I: Control negativo solución de NaCl 0,9 % 200 µL i.t.; Grupo II: LPS 3 mg/kg i.t.; Grupo III: LPS 3 mg/kg i.t. + SURFACEN[®] 100 mg/kg i.t., en todos los casos se utilizó un volumen de 200µL. SURFACEN[®] o solución de NaCl 0,9 % fueron administrados una hora después de administrado el LPS. Después de 24 h, las ratas fueron sacrificadas, se canuló la tráquea y el lavado broncoalveolar (LBA) se realizó por instilación de 2 mL de

solución de NaCl 0,9 %. El contenido de células totales se midió en cámara Neubauer y los valores se expresaron como número de células/mL. Posteriormente el LBA fue centrifugado a $400 \times g$ por 10 min, el precipitado celular se disolvió en 0,5 mL de NaCl 0,9 % y se usó para realizar el conteo celular diferencial, según el método de Füll (1981). La actividad mieloperoxidasa (MPO) fue determinada en LBA fresco mediante el ensayo colorimétrico descrito por Goldblum y col. (1985). Brevemente, a 30 μ L de muestras, por duplicado, se le adicionó 960 μ L solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM, pH 6, que contenía 0,5 % de bromuro de hexadeciltrimetil amonio y 0,167 mg/mL de o-dianisidina) y 10 μ L de peróxido de hidrógeno al 0,03 %, e inmediatamente se midió la absorbancia a 460 nm. Los resultados se expresaron en U/mL. La determinación de malondialdehído (MDA) se realizó según Gillard y col. (1994). Brevemente, a muestras procedentes de LBA se añadió ácido tricloroacético al 15 %, ácido tiobarbitúrico (ATB) al 0,375 %, ácido clorhídrico al 0,25 N y hidrotolueno butilado (BHT) al 0,01 %. Se calentó a 95 °C, se centrifugó y se leyó la absorbancia a 535 nm. La concentración de MDA se calculó utilizando el coeficiente de extinción, $\epsilon_{535} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y se expresó en nmol.L^{-1} .

4.2.4 Modelo de inflamación en líneas celulares

4.2.4.1 Determinación de la concentración de $\text{TNF}\alpha$ en monocitos activados por el ensayo de citotoxicidad en la línea celular L 929

Las células mononucleadas humanas provenientes de sangre purificada (Laboratorios Beterá) fueron aisladas mediante un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque y los monocitos fueron purificados por adherencia (Strober, 1992). Los monocitos adherentes fueron cultivados por 24 h en medio RPMI-1640 suplementado con glutamina al 1%, penicilina 2 mM y suero fetal bovino al 10 %, mantenidos a 37° C en 5 % de CO_2 , en presencia o ausencia de SURFACEN® a las concentraciones de 0,25; 0,5 y 1 mg/mL, posteriormente los monocitos fueron estimulados con LPS 10 μ g /mL (055:B5) por 24 h. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a $300 \times g$ 10 min. El sobrenadante se conservó a -70°C. La concentración de $\text{TNF } \alpha$ se determinó en el sobrenadante de las células empleando un ensayo de citotoxicidad en la línea celular L 929 según (Faggioni y col., 1994) pretratadas con Actinomicina D 1 μ g/mL,

utilizando como patrón de referencia TNF α humano y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en un lector de microplacas.

4.2.4.2 Determinación de la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 por el método colorimétrico con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

El ensayo de adhesión celular se realizó según (Crockett-Torab, 1998) usando un método colorimétrico con MTT, se utilizaron dos líneas celulares: células endoteliales de la aorta bovina (BAEC) las cuales se activaron con TNF α 100 ng/mL e IL-1 β 50 ng/mL por 24 horas en presencia o ausencia de SURFACEN[®] 50, 100 y 200 μ g/mL, para que expresaran los receptores de ICAM-1, paralelamente la línea celular leucémica HL-60 se marco con MTT y se activó con forbol miristil 13-acetato (PMA) 10^{-7} M para que expresara el contrareceptor de ICAM-1, transcurrida las 24 horas se añadió las HL-60 a las BAEC y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en un lector de microplacas.

4.2.5 Actividad antibacteriana

4.2.5.1 Condiciones del cultivo y preparación del inóculo

Los microorganismos utilizados fueron *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Las cepas fueron cultivadas en medio Agar Sangre, incubadas a 37 °C por 24 h y mantenidas liofilizadas a 4 °C. A las cepas se les realizó las pruebas bioquímicas mediante sistema API (analytical prolife index, bioMérieux, Francia) para su identificación. Las cepas se diluyeron en solución de NaCl 0,9 % y se llevaron a 3×10^8 UFC/mL según la escala Mac Farland. La concentración del inóculo se controló realizando diluciones decimales seriadas 1:10 y sembrando 0,1 mL de las diluciones -5,-6,-7 en dos placas de TSA que se diseminaron con la ayuda de varillas L. Las placas se invirtieron e incubaron a 37 °C por 24 h. Todos los inóculos se utilizaron dentro de la primera hora de preparados y se consideraron válidos los conteos entre 20 y 200 UFC/mL.

4.2.5.2 Determinación del crecimiento bacteriano por el método de suspensión cuantitativa por dilución y conteo

Los tubos conteniendo solución de NaCL 0,9 %, suspensión de bacteria en solución salina y SURFACEN[®] disuelto en agua (1, 10 y 20 mg/mL) se agitaron en zaranda horizontal a 90 r.min⁻¹ durante 5 h a 37 °C (Rauprich y col. 2000). Se tomó una alícuota de 100 µL de cada tubo, se realizaron diluciones seriadas en solución salina 1/10 (hasta -6) y se sembró en placas de agar sangre. Después de 24 h de incubación a 37°C se contaron las colonias y las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) fueron calculadas a partir del conteo de colonias y la dilución respectiva. Se realizaron tres determinaciones independientes.

4.3 Análisis estadístico

El análisis se inició con la detección y eliminación de los outliers. El edema pulmonar fue evaluado por el peso húmedo del pulmón (PHP) en un Modelo Lineal General utilizando la siguiente ecuación: $T_{(1-5)} = PH_{(1-5)} + PS_{(1-28)} + E$, donde: T= tratamiento, PH: peso húmedo, PS: peso seco y E: error utilizando el programa SAS versión 8,02 (1999-2001). Las diferencias en el conteo de leucocitos se evaluaron a través de una prueba de comparación de proporciones. Los datos de ICAM-1 se expresaron como el porcentaje de inhibición de la expresión de ICAM-1 referidos al 100 % del estímulo (máxima expresión) y para los datos del crecimiento microbiano, se calculó el logaritmo de las unidades formadoras de colonias ($\log_{10}UFC/mL$) debido a que el crecimiento bacteriano sigue una curva de crecimiento logarítmica. Los valores fueron expresados como la reducción del crecimiento bacteriano (RCB) donde $RCB = \log_{10}C - \log_{10}S$, C: UFC del control y S: UFC en presencia de SURFACEN[®]. Se consideró efecto antibacteriano una reducción del logaritmo del crecimiento microbiano (Russell y col., 1982). Estos datos así como el resto de los indicadores fueron evaluados por una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis). Los datos fueron procesados por el paquete estadístico STATGRAPHICS Versión 3.1 para WINDOWS. Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM. Diferencias significativas fueron consideradas para $p < 0,05$.

4.4 Resultados

4.4.1 Evaluación de SURFACEN[®] en un modelo de choque séptico inducido por LPS

La figura 16 muestra que administración intraperitoneal de LPS en ratones Balb/c resultó en un incremento en el peso húmedo del pulmón en comparación con ratones expuesto a solución de NaCL 0,9 %. El tratamiento con SURFACEN[®] disminuyó significativamente ($p < 0,001$), de forma dosis dependiente, el peso húmedo del pulmón.

4.4.1.2 Efecto de SURFACEN[®] en un modelo de daño agudo pulmonar inducido por LPS

La inyección de LPS intratraqueal induce una inflamación pulmonar caracterizada por la extravasación de células inflamatorias hacia el espacio alveolar, reflejado en un aumento del número de células totales (macrófago y PMN) recobrados en el LBA. La administración de SURFACEN[®] (100 mg/kg) una hora después de administrado el LPS redujo este incremento (tabla 1). El conteo diferencial de células en LBA mostró que después de la instilación de LPS, el porcentaje de PMN incrementó dramáticamente, mientras que en paralelo el porcentaje de macrófagos disminuyó (figura 17). Los PMN liberan la enzima MPO, la cual se involucra directamente en la producción de radicales libres del oxígeno dando lugar al daño celular en las vías aéreas. El LPS induce un incremento en la actividad de la MPO en el LBA como un índice de la infiltración de los PMN y un incremento en la concentración de MDA. La administración de SURFACEN[®] redujo significativamente ($p < 0,05$) la actividad MPO y las concentraciones de MDA (tabla 1).

4.4.2 Efecto de SURFACEN[®] en la producción de TNF α y en la expresión de ICAM-1

La estimulación de monocitos humanos con LPS provocó un aumento significativo ($p < 0,05$) en la concentración de TNF α . La incubación de SURFACEN[®] (0,25; 0,5 y 1mg/mL) inhibió de forma dosis-dependiente la concentración de TNF α (figura 18).

SURFACEN[®] (0,05; 0,1 y 0,2 mg/mL) disminuye de forma dosis dependiente la expresión de la integrina ICAM-1, en el ensayo de adhesión de células HL-60 a células BAEC, (activadas con PMA 10^{-7} M y con TNF α 100 ng/mL e IL-1 β respectivamente) por 24 h (figura 19).

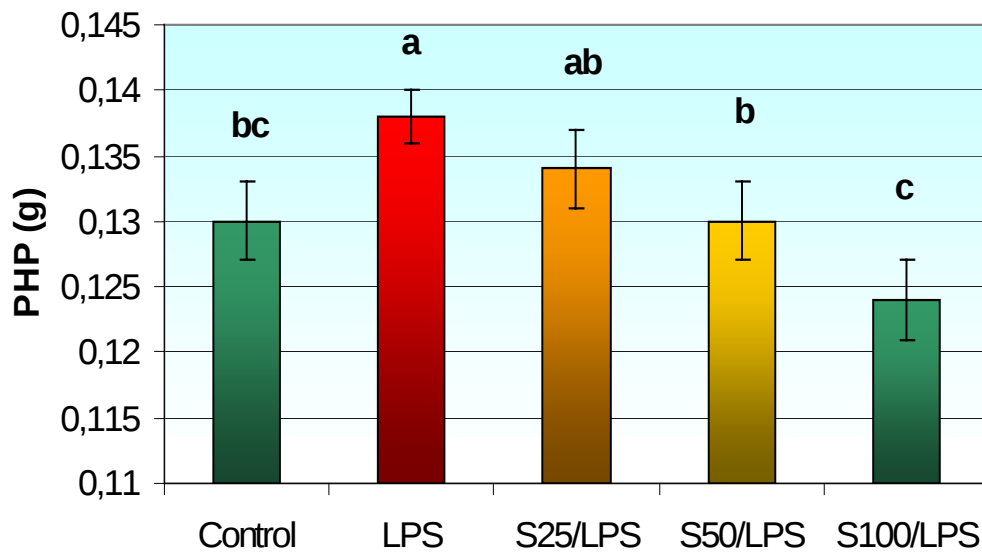


Figura 16. Peso húmedo del pulmón (PHP) en ratones Balb/c expuesto a LPS en función de la concentración de SURFACEN[®]. Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de 10 animales por grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,001$).

Leyenda:

Control: solución de NaCl 0,9 % ip y it.

LPS: LPS 30 mg/kg, por vía intraperitoneal (i.p.)

S25/LPS: LPS 30 mg/kg i.p. + SURFACEN[®] (S) 25mg/kg i.t.

S50/LPS: LPS 30 mg/kg i.p. + SURFACEN[®] (S) 50 mg/kg i.t.

S100/LPS: LPS 30 mg/kg i.p. + SURFACEN[®] (S) 100 mg/kg i.t.

Tabla 5. Conteo de células totales, actividad MPO y concentración de MDA en el modelo de daño agudo pulmonar. Efecto del SURFACEN[®]

	<i>Células Totales x 10⁴/mL</i>	<i>MPO U/mL</i>	<i>MDA, nmol/L</i>
Salina	36,67±4,56 ^a	0,006±0,001 ^a	0,045±0,006 ^a
LPS	938,10±211,60 ^b	0,412±0,120 ^b	0,070±0,005 ^b
LPS+ SURFACEN[®]	388,96±101,44 ^c	0,134±0,020 ^c	0,060±0,003 ^c

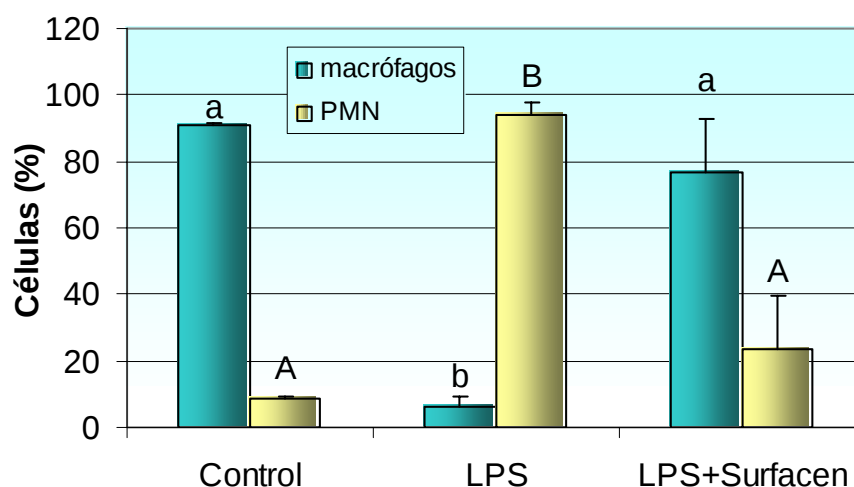


Figura 17. Proporción de macrófago y PMN en LBA del modelo de daño agudo pulmonar. Efecto del SURFACEN[®].

Los datos son expresados como la media ± EEM de 12 animales por grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

MPO: Mieloperoxidasa MDA: Malonil dialdehído
 PMN: Polimorfonuclear LBA: Lavado broncoalveolar
 i.t.: Intratraqueal

Leyenda:

Control: solución de NaCl 0,9 % , 200 it. µL, 1h después 200 µL de solución de NaCl 0,9 %

LPS: 3 mg/kg i.t., 200 µL, 1h después 200 µL solución de NaCl 0,9 % i.t

LPS + SURFACEN[®]: LPS 3 mg/kg i.t. 200 it. µL, 1h después SURFACEN[®] 100 mg/kg i.t., 200 it. µL

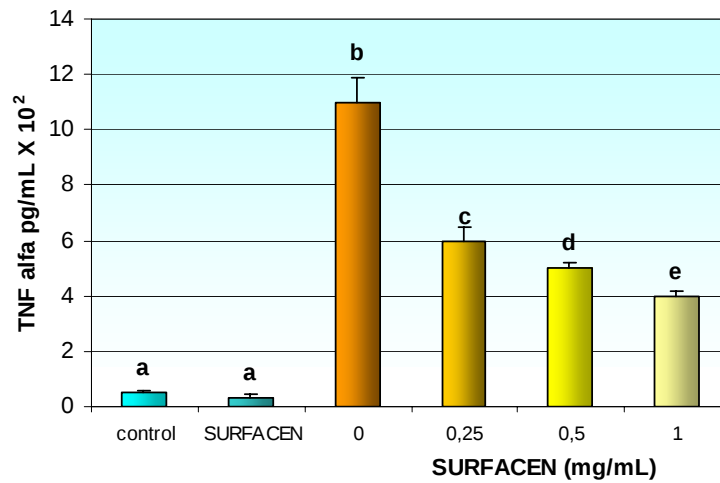


Figura 18. Producción de TNF α en monocitos humanos preincubados 24 horas con SURFACEN[®] y estimulados con 10 μ g/mL de LPS. Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

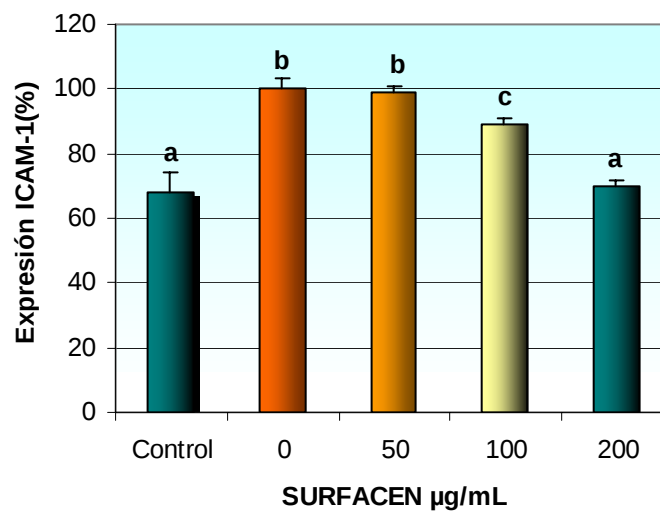


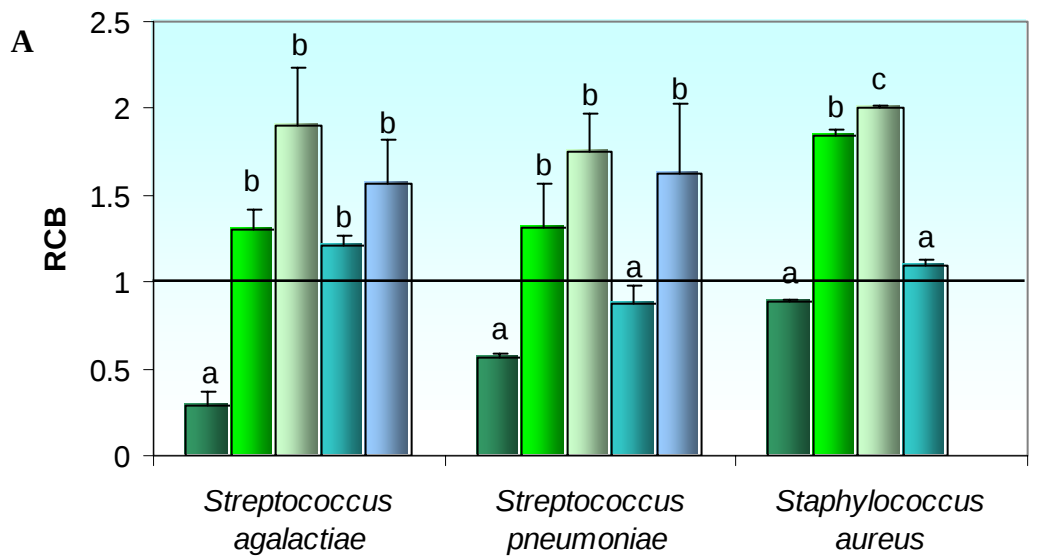
Figura 19. Efecto de SURFACEN[®] en la adhesión de células HL 60 activadas (PMA 10^{-7}) a células BAEC activadas con TNF α (100ng/mL) e interleuquina 1 β (50 U) por 24 h. Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

4.4.3 Efecto del SURFACEN[®] sobre el crecimiento bacteriano

La incubación de SURFACEN[®] durante 5 h con las bacterias Gram positivas: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus Aureus* (figura 20A) resultó en una disminución dosis dependiente en las unidades formadoras de colonias expresado como un aumento en la reducción del crecimiento microbiano. A las concentraciones de 10 y 20 mg/mL se observó una disminución del crecimiento por encima de un logaritmo de reducción. Asimismo los resultados obtenidos con la incubación de SURFACEN[®] con bacterias Gram negativas: *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* resultó en una disminución en las unidades formadoras de colonias dosis dependiente expresado como un aumento en la reducción del crecimiento microbiano (figura 20B), lográndose una reducción del logaritmo del crecimiento microbiano a partir de la concentración de 10 mg/mL. Para los microorganismos evaluados en ausencia de SURFACEN[®] se obtuvo el máximo del crecimiento (datos no mostrados). Por otra parte en el caso de la DPPC, componente mayoritario del surfactante pulmonar y del PG, el cual se encuentra en mayor proporción en SURFACEN[®] en comparación con otras preparaciones de surfactantes pulmonares naturales exógenas, fueron capaces de reducir el crecimiento microbiano en los microorganismos donde se evaluados (figura 20 A y B).

4.5 Discusión

La instilación de endotoxina estimula la liberación de citoquinas inflamatorias la cual causa secuestro del neutrófilo al pulmón. El neutrófilo secuestrado libera proteasas que dañan la membrana alveolo capilar y causan edema. El fluido edematoso entra en el alveolo y desactiva el surfactante. La inactivación del surfactante es el último evento patológico que produce el daño agudo inducido por endotoxina, de esta manera la administración de endotoxinas simula el orden de los eventos patológicos que ocurren en el SDRA (Lutz y col., 1998). Los fagocitos, en particular los macrófagos y las células PMN, son reconocidos como los principales componentes de la respuesta inmunológica e inflamatoria celular en el pulmón (Sibille y Reynolds, 1990).



■ S1mg/mL ■ S10mg/mL ■ S20mg/mL ■ DPPC1mg/mL ■ PG1mg/mL

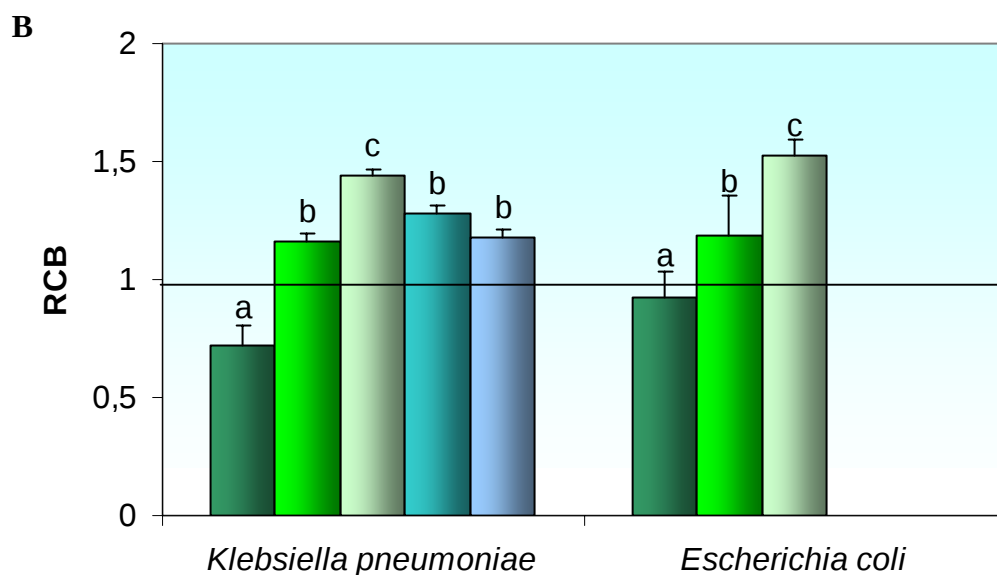


Figura 20. Reducción del crecimiento bacteriano de bacterias Gram positivas (A) y Gram negativas (B) en función de la concentración de SURFACEN[®], DPPC y PG. Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de tres determinaciones independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

S: SURFACEN[®] DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

PG: Fosfatidilglicerol

Corteling y col. (2002) obtuvieron un incremento en el número de neutrófilos en el LBA, dependiente de la dosis de LPS y el conteo de células totales es asociado con una disminución dosis dependiente del número de macrófagos. Gongalves de Moraes y col. (1996) encontraron un aumento del número de neutrófilos en forma dosis y tiempo dependiente en LBA en un modelo animal de inhalación de LPS en ratones. La MPO y la elastasa son dos enzimas procedentes de los neutrófilos cuya actividad en los fluidos del LBA se correlacionan con la extensión del daño pulmonar (Pittet y col., 1997 y Lesur y col., 1999).

Van Helden y col. (1998) utilizaron un modelo de daño pulmonar por LPS y evaluaron el efecto del CUROSURF[®], sus resultados demostraron que CUROSURF[®] disminuye las células totales, el contenido de proteínas y el edema pulmonar, otro estudio donde emplean un modelo de daño por LPS y el mismo surfactante encontraron que CUROSURF[®] fue capaz de disminuir las células totales, la cantidad de PMN infiltrado y por tanto restablecer la relación macrófago: PMN e inhibir la fosfolipasa A₂ (Wu y col., 2002). Sin embargo Huang y col. (1994) usando un modelo de daño cuyo agente inductor fue la hipoxia no encontraron un mejoramiento en el edema. Engstrom y col. (1989) en contraste a los hallazgos de Huang y col. (1994) encontraron que la aplicación de INFASURF[®] atenúa el incremento en la permeabilidad alveolar causado por la hipoxia y mejora la sobrevivencia.

La literatura plantea el empleo de varios modelos que simulan los aspectos fisiopatológicos del SDRA, estos utilizan diferentes agentes causales de daño, diversas preparaciones de surfactante y el efecto evaluado comprende desde mediciones de indicadores respiratorios, de composición bioquímica, de actividad biofísica, de indicadores inflamatorios hasta su influencia en la mortalidad. Sin embargo estudios dirigidos a comparar la eficacia de una estrategia de tratamiento con un surfactante en particular en diferentes modelos animales de daño pulmonar así como varios surfactantes en un mismo modelo son escasos (Häfner y col., 1995 y Puligandla y col., 2000).

Existen estudios donde emplean como agente causal de daño al LPS y evalúan indicadores claves de la inflamación tales MPO, conteo de células totales, proporción de macrófagos y PMN (Xing y col., 1994; Van Helden y col., 1998; Li y col., 1998; Hecht y col., 1999; Asti y col., 2000; Corteling y col., 2002 y Wu y col., 2002), sin embargo en solo dos de ellos se

evalúan el efecto terapéutico del surfactante (Van Helden y col., 1998 y Kim JY comunicación personal). Los resultados con SURFACEN[®] coinciden con los obtenidos con CUROSURF[®] (Van Helden y col., 1998) y con los obtenidos con SURFACTEN[®] (Kim JY comunicación personal) excepto que este no disminuyó el número de células totales.

El efecto inhibitorio en los indicadores inflamatorios y el edema pulmonar, obtenido mediante la administración intratraqueal de SURFACEN[®] en los pulmones de ratas y ratones dañados con LPS, demuestran que este producto tiene propiedades anti-inflamatorias. SURFACEN[®] demostró el mismo comportamiento que el obtenido para el CUROSURF[®] cuando se evaluó en un modelo de daño agudo pulmonar (Van Helden y col., 1998).

Por otra parte varios de los surfactantes usados como terapia de reposición en pacientes con SDRN han mostrado un efecto inhibitorio en la liberación de citoquinas en ensayos *in vitro* realizado en células inmunes. Speer y col. (1991) demostraron que CUROSURF[®] inhibe la secreción de TNF α en monocitos estimulados con LPS. Allen y col. (1995) informaron que EXOSURF[®] y SURVANTA[®] inhibieron la producción de IL-1 β , pro- IL-1 β y TNF α en macrófagos alveolares estimulados con LPS. Estos resultados muestran como tanto un surfactante completamente sintético (EXOSURF[®]) como un surfactante natural exógeno bovino (SURVANTA[®]) que contiene las proteínas hidrófobas SP-B y SP-C presentaron este efecto. En el caso del EXOSURF[®], Thomasen y col. (1995) mostraron que el ingrediente activo es el tiloxapol, detergente no iónico cuya función es actuar como agente dispersante simulando el comportamiento de las proteínas hidrófobas, el cual fue capaz de inhibir la secreción de citoquinas así como sus ARNm.

Antal y col. (1996) demostraron en células monocíticas de la línea THP-1 que tanto EXOSURF[®] como SURVANTA[®] ejercen este efecto mediante la disminución de la activación del factor nuclear (NF)- κ B, y a su vez demostraron que este efecto no es específico del macrófago alveolar ya que también se produce en fibroblastos. Estos resultados sugieren que el surfactante pulmonar suprime las citoquinas a nivel transcripcional mediante la vía del (NF)- κ B. Asimismo Baur y col. (1998) demostraron que el surfactante natural exógeno porcino CUROSURF[®] disminuye el ARN mensajero y el receptor del TNF α .

Tonks y col. (2001) encontraron que la PC así como la DPPC, pero no la PC 16/20:4 inhiben la liberación de TNF α en una línea de células monocíticas y sugirieron que el mecanismo por el cual ejercen este efecto es por alterar la fluidez de la membrana, no encontrándose efecto por la vía de la fosforilación de la proteína quinasa. Asimismo el componente fosfolípido inhiben la vía del factor activante de plaqueta (PAF) actuando a través de las enzimas biosintéticas asociadas a la membrana (Tonks y col., 2003). Estudios con la SP-C evidenciaron que cuando se asocia a vesículas de DPPC, es capaz de inhibir la unión del LPS a macrófagos RAW 264.7, a su vez inhibió tanto la producción de óxido nítrico como la de TNF α en macrófagos alveolares y peritoneales (Augusto y col., 2003 b). Los resultados con SURFACEN[®] reafirman los obtenidos para otros surfactantes, en cuanto a la propiedad de los mismo de inhibir la producción de la principal citoquina pro-inflamatoria, el TNF α .

La interacción de leucocitos con células endoteliales vasculares es un paso esencial en el proceso inflamatorio, de forma que la activación de la adhesión de los leucocitos se correlaciona con el daño tisular asociado a numerosas enfermedades inflamatorias tales como el daño agudo del pulmón (Crockett-Torab, 1998). Existen pocos estudios donde se evalúan el efecto de las preparaciones de surfactantes pulmonares en las moléculas de adhesión. Reiss y col. (1995) demostraron que CUROSURF[®] y EXOSURF[®] son capaces de suprimir el número de células positivas a la L-selectina, sin embargo ALVEOFACT[®] no produjo ningún efecto. Esto sugiere que pueden existir diferencias significativas en el efecto de los diferentes surfactantes exógenos naturales. A su vez se informó que el tratamiento con SURVANTA[®] redujo la expresión de varias moléculas de adhesión, tales como CD2, CD11a, CD58 y la molécula 1 de adhesión intracelular (Wright 1997).

Coonrod y Yoneda (1983) demostraron que la fracción surfactante procedente de lavado de rata causó lisis del *Streptococcus pneumoniae* y en otras bacterias Gram positivas tales como *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus bovis*. Estos autores especularon que el efecto bactericida que se observó se debió a la presencia de ácidos grasos libres en esta fracción. Los resultados en modelos animales de neumonías fueron muy promisorios, Herting y col. (1994) utilizando tratamiento con CUROSURF[®] en conejos infectados con *Streptococcus* grupo B, encontraron una disminución de la proliferación

bacterial en homogenado de pulmón y Song y col. (1996) informaron que tratamiento con este mismo surfactante en ratas con neumonía debido a *Escherichia coli* provocó una mejora en la función respiratoria. Brogden y col. (1996) demostraron la presencia de un péptido antibacteriano en el surfactante pulmonar bovino, asimismo Harwig y col. (1995) demostraron la presencia de un péptido aniónico denominado profenina-1 obtenido de leucocitos porcinos, que puede ser asociado a los lípidos del surfactante. Para el surfactante porcino CUROSURF[®] se informó la presencia de tres péptidos derivados de la familia de las catelicidinas pertenecientes a los péptidos antimicrobianos, son péptidos del tipo profeninas, uno contiene 79 aminoácidos y es igual al informado para el surfactante pulmonar bovino, el otro consiste en 80 aminoácidos con un N-terminal de ácido piroglutámico y el último corresponden a un fragmento de 18 aminoácidos de profenina (Wang y col., 1999).

Kaser y Skouters (1997) informaron que la SP-B contenida en los surfactantes naturales exógenos presenta un 68 % de homología estructural con el péptido antibiótico dermaseptina b I y demostraron que la misma inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*. A su vez los fosfolípidos, particularmente la DPPC actuó como inhibidor del *Streptococcus* del grupo A y del B, perteneciente a la familia de los β hemolíticos (Doran y col., 2002 y Nizet y col., 2002).

Neumeister y col. (1996) estudiaron el comportamiento de tres preparaciones de surfactante (ALVEOFACT[®], SURVANTA[®] y EXOSURF[®]) en el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae* y encontraron que SURVANTA[®] indujo el crecimiento de *Escherichia coli*, posteriormente Rauprich y col. (2000) evalúan el efecto de diferentes preparaciones de Surfactante: SURVANTA[®], CUROSURF[®], ALVEOFACT[®], EXOSURF[®] y PUMACTANT[®] en el crecimiento de *Streptococcus grupo B*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Sus resultados mostraron que solo CUROSURF[®], fue capaz de inhibir el crecimiento de *Streptococcus grupo B*, no observándose este efecto para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Ninguno de los surfactantes evaluados inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* y SURVANTA[®] lo aumentó. Los resultados obtenidos con relación al SURVANTA[®] coinciden con lo informado por Neumeister y col. (1996). Estudios realizados por Bouhafs y col. (1999) obtuvieron un efecto bactericida de CUROSURF[®] frente a *Streptococcus grupo B* y *Escherichia coli* evidenciando que ocurre una peroxidación del surfactante debido a las

especies reactivas liberadas por estas bacterias. Los resultados con SURFACEN[®] muestran el efecto antibacteriano de esta preparación sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos y como el mismo puede ser fundamentado, en parte, a los efectos obtenidos para la DPPC y el PG.

Junto a los procesos inflamatorios e infecciosos que tienen lugar en el pulmón de pacientes con SDRA, se desencadenan a su vez procesos oxidativos que degradan los componentes del surfactante pulmonar, se ha demostrado que la SP-A presenta un papel antioxidante fundamental, de ahí que es de vital importancia conocer el efecto de la misma sobre el SURFACEN[®] expuestos a daño oxidativo.

4.6 Conclusión

Se demostró que SURFACEN[®] posee propiedades anti-inflamatorias evidenciadas en su capacidad de disminuir el edema pulmonar, la MPO, el MDA, las células inflamatorias totales y restablecer la relación macrófago:PMN en modelo *in vivo* de inflamación, así como inhibir el TNF α y la ICAM-1 *in vitro*. Por otra parte fue capaz de poseer un efecto antibacteriano sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

**5. EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA SP-A SOBRE EL SURFACEN[®]
EXPUESTO A DAÑO OXIDATIVO.**

5 EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA SP-A PORCINA SOBRE SURFACEN[®] EXPUESTO A DAÑO OXIDATIVO

5.1 Introducción

Los radicales libres derivados del oxígeno y otras especies reactivas del oxígeno (ERO) se producen durante el metabolismo normal de las células. Las ERO tienen algunas funciones beneficiosas como parte de la defensa contra microorganismos y como agentes de señalización celular. Sin embargo, bajo determinadas condiciones las ERO son potencialmente dañinas debido a su propiedad de reaccionar y alterar los componentes principales de las células, incluyendo lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (Dennis y Shibamoto, 1989).

Las células pulmonares son las primeras en ponerse en contacto con el oxígeno inhalado y por tanto las concentraciones de oxígeno en el pulmón son relativamente alta comparadas a sus niveles en otros órganos. La generación de ERO es a su vez incrementa por la inhalación de partículas tóxicas y gases. Considerables evidencias sugieren que las ERO producidas tanto por vía intracelular en las células del parénquima pulmonar como por vía extracelular por macrófagos alveolares y neutrófilos infiltrados desempeñan un papel central en la patogénesis de varias enfermedades pulmonares, tales como SDRA y enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, entre otras (Heffner y Repine, 1989; Barnes, 1990; Sibille y Reynolds, 1990; Kamp y col., 1992 y Kinnula y col., 1995). Las células inflamatorias producen ERO tales como ácido hipocloroso (HOCl), peroxinitrito (ONOO) en concentraciones que pueden ser de 0,1 mM/min durante horas. En presencia de iones ferrosos, ellas son capaces de inducir el sistema Fenton en el fluido que cubre las células epiteliales dando lugar al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), uno de los más dañinos al organismo. Los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos del surfactante pulmonar constituyen una diana para la reacción en cadena de los radicales libres y contribuyen a amplificar el daño oxidativo. Las consecuencias patofisiológicas de la

oxidación del surfactante en animales experimentales y humanos incluyen colapso alveolar, reducción de la *compliance* y daño en el intercambio gaseoso.

Los efectos de las ERO en la estructura y función de los componentes del surfactante *in vitro* han sido estudiados (Merrit y col., 1993; Gilliard y col., 1994 y Mark e Ingenito, 1999). Estudios dirigidos a evaluar directamente el efecto de la SP-A sobre el daño de las ERO en los lípidos del surfactante son escasos (Bridges y col., 2000 y Kuzmenco y col., 2004). Es conocida la función antioxidante de la SP-A, sin embargo su efecto en la producción de radicales libres es divergente y predominan estudios dirigidos al estudio de su papel en la generación del radical anión superóxido. Asimismo, su acción ha sido poco estudiada en el sistema Fenton generador de radicales $\cdot\text{OH}$ (Bridges y col., 2000 y Kuzmenco y col., 2004). Por otra parte, no se conoce de esta propiedad en la SP-A porcina y los mecanismos por lo cuales ejerce este efecto están bajo estudio. Dado estos elementos el objetivo de este estudio es:

- Determinar las propiedades antioxidantes de la SP-A porcina a nivel químico, en microsomas y mitocondrias, así como su protección al SURFACEN[®] expuesto al daño oxidativo por el HClO y el radical $\cdot\text{OH}$ mediante ensayos *in vitro*.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Reactivos: Los reactivos empleados se obtuvieron de las firmas que se indican: ácido ascórbico, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), ácido tiobarbitúrico (ATB), dimetil sulfóxido (DMSO), di-ter-Butilhidroxitolueno (BHT), desferroxamina (DFO), PMSF hidroperóxido de ácido linoleico (LHP), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido araquidónico (C20:4) de Laboratorios Sigma (ST. Louis, MO). SP-A porcina: Según procedimiento descrito por Blanco y col. (2000). El resto de los reactivos utilizados era puros para análisis de los Merk (Alemania) o BDH (UK).

5.2.2 Secuestro de $\cdot\text{OH}$ y unión al Hierro (Ensayo de la 2-desoxi-D-ribosa)

Se realizó según el ensayo descrito por Aruoma 1994. Para el secuestro de $\cdot\text{OH}$ el medio de reacción contenía un volumen final de 1,25 mL de los siguientes reactivos a las concentraciones finales que se indican: cloruro de hierro III (FeCl_3) 50 μM , EDTA 100 μM , 2-desoxi-D-ribosa 2,8 mM, solución amortiguadora de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 10 mM pH 7,4, H_2O_2 67 mM y ácido ascórbico 100 μM . La mezcla de reacción se incubó 1 h a 37 °C. Posteriormente se determinaron los productos reactivos con el ácido tiobarbitúrico (PRATB), expresados en concentración de MDA, para lo cual se mezclaron 500 μL de las muestras incubadas con 1,95 mL de solución reactivo que contenía el ATB, posteriormente se detuvo la reacción con 50 μL de una solución de BHT. Se calentó 15 min a 100°C, se centrifugó a 3000 r.min^{-1} 15 min y se leyó la densidad óptica del sobrenadante a 535 nm en espectrofotómetro Ultrospec (Buege y Aust, 1978). Se utilizó el dimetil sulfóxido (DMSO) a 25 mg/mL como control positivo. Para la evaluación de la capacidad quelante de hierro se omitió el uso del EDTA y se empleó como control positivo a la desferroxamina (DFO) a 0,65 mg/mL. En ambas variantes se adicionó la SP-A porcina a las concentraciones de 0,25; 0,5 y 1 mg/mL o agua destilada para el blanco a la mezcla de reacción.

5.2.3 Aislamiento de mitocondrias y microsomas

Se utilizaron ratas Wistar machos de 180-220 g lo cual cumplieron los requisitos del acápite 4.2.2, se sacrificaron por dislocación cervical y seguidamente se les extrajo los pulmones se colocaron en frío inmediatamente y se cortaron con una cuchilla en piezas pequeñas, se lavaron extensivamente con solución de NaCl 0,9 %. Posteriormente se homogenizó utilizando un homogenizador potter- Elvehjem con una solución fría de sacarosa 0.25 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 con PMSF 0,1 mM, durante 20 s y se transfirió a tubos de centrifuga. La fracción mitocondrial fue aislada por centrifugación diferencial. El homogenizado se centrifugo a 3000 x g 10 min, el sedimento se desechó, el sobrenadante se centrifugó a 20 000 x g 10 min y el precipitado mitocondrial se colectó y resuspendió en solución amortiguadora de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 con PMSF 0,1 mM. El sobrenadante post-mitocondrial (5 mL) se aplicó a una columna de Sefarosa (1,6 x 12 cm) se equilibró y eluyó con Tris-HCl 10 mM pH 7,4 NaN_3 al 0,005 % para separar el material particulado del citosol

(Tangen y col. 1973). Se colectaron 20 fracciones de 2 mL cada una, la fracción microsomal aparece en el volumen muerto. Todo se realizó a 4°C, las muestras se guardaron a -84 °C hasta el momento de su determinación.

5.2.3.1 Peroxidación lipídica de mitocondrias y microsomas por el sistema Fenton

La peroxidación fue ensayada por la incubación de 1 mg de proteína mitocondrial y microsomal determinada por el método de Lowry (Lowry y col., 1951), en solución amortiguadora de fosfato 0,01 M pH 7,4 conteniendo hierro a 2,5 µM en un volumen final de 1 mL a 37°C. La reacción fue iniciada por la adición de ascorbato, concentración final de 0,4 mM e hidroperóxido de ácido linoleico (LHP) a 50 nmol/mg de proteína. Simultáneamente SP-A fue añadida 2,5; 3,75 y 5,0 µg de SP-A en mitocondrias y 2,5; 3,75; 5,0 y 7,5 µg de SP-A en microsomas. En todos los casos se realizó un control sin ascorbato e LHP. La peroxidación lipídica se midió por monitorear la emisión de la luz mediante un analizador de centelleo líquido (Packard 1900 TR), durante 180 min y expresada en cpm (Wright y col., 1979).

5.2.3.2 Extracción de lípidos y análisis de ácidos grasos por cromatografía gaseosa

Los lípidos totales peroxidados y no peroxidados de mitocondrias y microsomas de pulmón de rata fueron extraídos con cloroformo: metanol 2:1 (v/v) conteniendo BHT al 0,01 % como antioxidante. Los ácidos grasos fueron transmetilados con Boruro de Fluor (BF₃) al 20 % en metanol (p/v) a 60 °C por 3 h bajo atmósfera de nitrógeno. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se extrajeron con hexano:agua 2:1 (v/v) y fueron analizados por cromatografía gaseosa (GC-14A, Shimadzu, Kyoto, Japan) con columna (1.80 m x 4 mm id). Se utilizó nitrógeno como transportador de gas. La temperatura del inyector y del detector fue mantenida a 250°C. Los picos de esteres metílicos de los ácidos grasos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención con los estándares. Los estándares utilizados fueron: ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido araquidónico (C20:4).

5.2.4 Secuestro de HOCL

Para este estudio SURFACEN[®] fue resuspendido en NaCl 0,9 % a una concentración final de 2 mg/mL de fosfolípidos. La SP-A porcina se añadió a SURFACEN[®] al 10 % respecto a la concentración de fosfolípidos y previo a la adición del ácido hipocloroso 75 μ M, generado inmediatamente antes de ser utilizado mediante la acidificación del NaClO con H₂SO₄ diluido hasta pH= 6,2 (Payá y col., 1992). Se agitó e incubó a 37 °C durante 40 min. El diseño experimental fue Grupo I: SURFACEN[®], Grupo II: SURFACEN[®] + SP-A, Grupo III SURFACEN[®] + HCLO y Grupo IV: SURFACEN[®] + HCLO + SP-A. Posteriormente se determinó la actividad tensioactiva y la concentración de MDA.

5.2.4.1 Actividad tensioactiva en el Surfactómetro de Burbuja Pulsátil

Se realizó según el método descrito por Enhorning (1977). Las muestras, 40 μ L, se depositaron en una celda, la cual fue introducida en la cámara a 37 °C, se creó una burbuja de aire la cual fue pulsada entre un radio mínimo de 0,4 mm y uno máximo de 0,55 mm a 20 ciclos por min en el Surfactómetro de Burbuja Pulsátil (PBS Electronics Corporation, USA). El cálculo de la tensión superficial mínima (TSM) se obtuvo mediante el empleo de la ley de Laplace ($\Delta P = 2\gamma/R$) a partir del radio y la presión conocida.

5.2.4.2 Determinación del MDA

Según acápite 5.2.2

5.2.5 Peroxidación lipídica de SURFACEN[®] por el sistema Fenton

La peroxidación lipídica de SURFACEN[®] (1, 2 y 3 mg/mL) incubado en solución amortiguadora de fosfato 0,01 M, pH 7,4 (conteniendo hierro a 2,5 μ M) se inició por añadir ascorbato 0,4 mM en un volumen final de 1 mL a 37°C. Simultáneamente la SP-A fue añadida (1, 2 y 4 μ g/mL) sobre SURFACEN[®] 3 mg/mL. En todos los casos se realizó un control sin ascorbato. La peroxidación lipídica se midió por monitorear la emisión de la luz mediante un analizador de centelleo líquido (Packard 1900 TR), durante 180 min y expresada en cpm (Wright y col., 1979). Las muestras fueron analizadas por análisis de ácidos grasos según acápite 5.2.3.2.

5.2.6 Determinación de la composición de ácidos grasos de cada tipo de PL en SURFACEN[®]

Los diferentes PL de SURFACEN[®] fueron separados y obtenidos por cromatografía en placa delgada de sílica gel G-60, con mezcla de corrida cloroformo-etanol-ácido acético-agua (30:34:8:3,5) (Touchstone y col., 1980). Los componentes separados fueron raspados y utilizados para el análisis de la composición de ácidos grasos según se describe en el acápite 5.2.3.2

5.3 Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media $\pm$ EEM de las determinaciones practicadas. Para el análisis de los datos de secuestro de $\cdot\text{OH}$ y captura de hierro se expresaron en el porcentaje de inhibición con respecto al blanco, el cual se realizó mediante la sustracción del valor del blanco al de la muestra, dividido por el valor del blanco y multiplicado por 100. Para el estudio de la relación existente entre los valores de concentración y porcentajes de inhibición se utilizó el análisis de regresión y la correlación logarítmica. El caso de los datos de quimioluminiscencia de mitocondrias, microsomas y SURFACEN[®], el cálculo del porcentaje de inhibición se realizó considerando la suma de la quimioluminiscencia total del control positivo (máxima peroxidación) al 100 %. Para el análisis de los ácidos grasos, el contenido de cada ácido graso individual fue expresado como el porcentaje por área de los ácidos grasos totales. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, el criterio estadístico de significancia fue seleccionado a valores diferentes de p, utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS Versión 3.1 para WINDOWS.

5.4 Resultados

5.4.1 Efecto de la SP-A en el secuestro del radical $\cdot\text{OH}$ y en la capacidad quelante de hierro por el ensayo de la 2-desoxi-D-ribosa

La incubación de la SP-A (0,25; 0,5 y 1 mg/mL) en presencia de la mezcla de reacción Fe^{3+} -EDTA, H_2O_2 y ácido ascórbico, así como en presencia de la misma mezcla en ausencia de EDTA, resulta en una disminución del daño oxidativo a la 2-desoxi-D-ribosa, lo que se evidencia por la disminución en la formación de PRATB. La SP-A porcina inhibe de forma dosis dependiente la formación de PRATB, alcanzando un 75 % de inhibición a la concentración de 1 mg/mL y mostró propiedades secuestradoras de radicales $\cdot\text{OH}$ superiores al dimetil sulfóxido (DMSO), un clásico secuestrador de $\cdot\text{OH}$ (Aruoma, 1994). En ausencia de EDTA también se observó un efecto dependiente de la concentración, obteniéndose un 48 % de inhibición en la formación de PRATB a la concentración de 1 mg/mL. Esto indica que la SP-A tuvo un efecto significativo en la reducción de la generación de $\cdot\text{OH}$ a partir de H_2O_2 dependiente de iones metálicos, probablemente por quelación de hierro (figura 21).

En la figura 22 se observan los efectos protectores de la SP-A sobre la degradación de la 2-desoxi-D-ribosa, tanto en el ensayo con EDTA como en el que este se excluye. La diferencia de las pendientes indica que el secuestro de $\cdot\text{OH}$ (ensayo con EDTA) y la unión a hierro (ensayo sin EDTA) son atributos independientes de la SP-A. No obstante, se observa que a las mismas concentraciones de SP-A evaluadas, a partir del punto de corte de ambas rectas se obtienen los mayores valores de inhibición en el ensayo en presencia de EDTA, mostrando que la proteína es más eficiente en el secuestro de $\cdot\text{OH}$ que en la inhibición de su generación por su unión al hierro. Este resultado puede estar relacionado con el hecho de que la disponibilidad de un electrón de los grupos funcionales de los aminoácidos más expuestos en la proteína para reaccionar con el $\cdot\text{OH}$, hace más probable la reacción SP-A/ $\cdot\text{OH}$ que 2-desoxi-D-ribosa/ $\cdot\text{OH}$. Mientras que en la segunda variante del ensayo, el resultado final depende de la competencia entre la SP-A y la 2-desoxi-D-ribosa para unirse al hierro. Estas propiedades se muestran a concentraciones de la SP-A enmarcadas en el intervalo fisiológico, estimadas entre 0,3 y 1,8 mg/mL (Bridges y col., 2000).

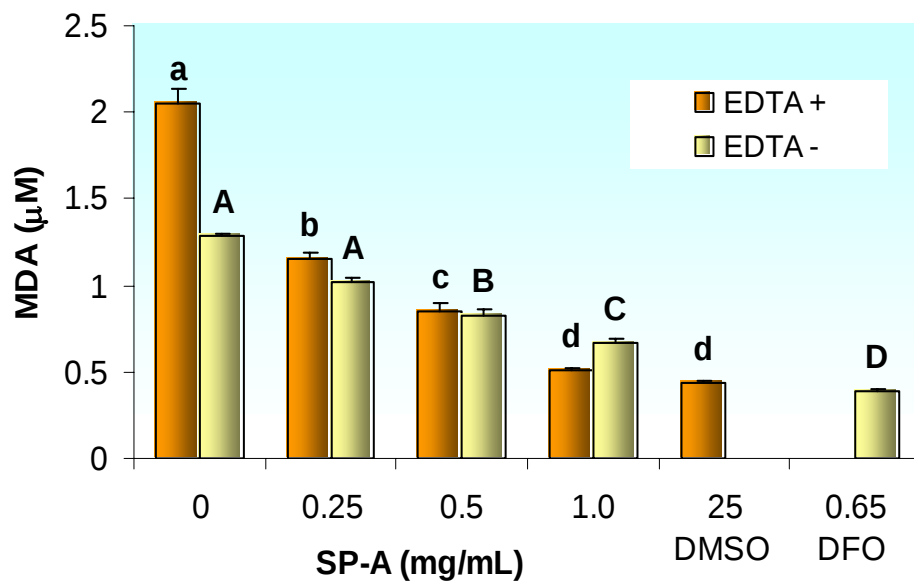


Figura 21. Concentración de MDA en el ensayo de la degradación de la 2-desoxi-D-ribosa en función de la concentración de SP-A. DMSO (control EDTA +) DFO (control EDTA-) Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0,05$.

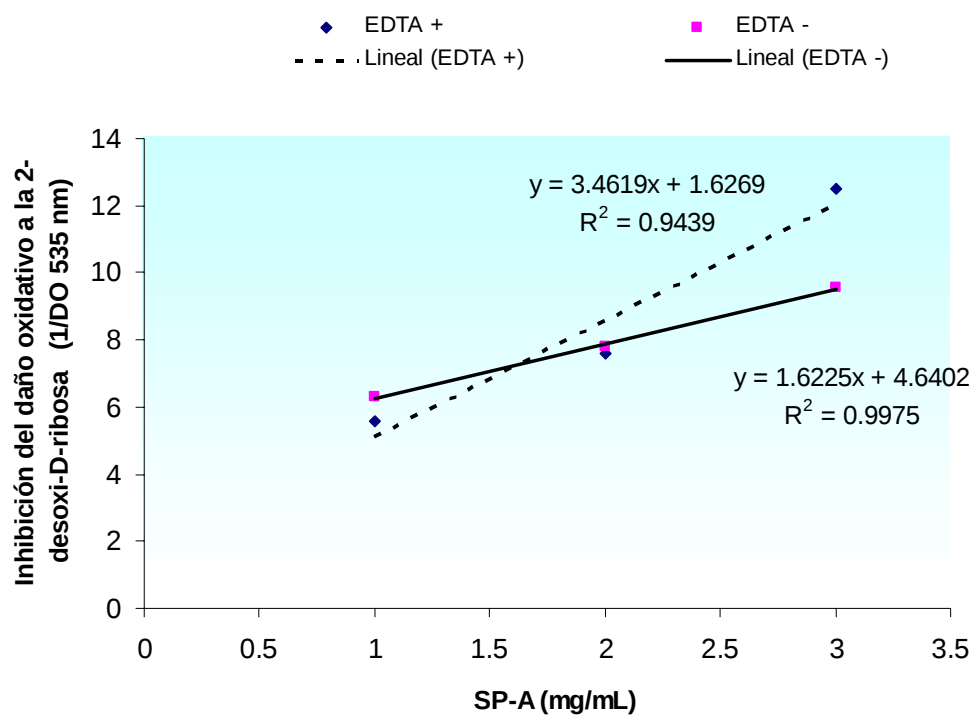


Figura 22. Comparación del efecto de la SP-A en la capacidad secuestradora de $\cdot\text{OH}$ (EDTA +) y el efecto quelante (EDTA -). Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0,05$.

5.4.2 Efecto de la SP-A en la peroxidación lipídica estimulada por hidroperóxido de ácido linoleico

La adición de Fe^{+++} -ascorbato más hidroperóxido de ácido linoleico (LHP) a mitocondrias y microsomas aislados de pulmón de rata resultó en una peroxidación lipídica evidenciada por la emisión de la luz (quimioluminiscencia). Las mitocondrias y microsomas de pulmón de rata se trataron con 2,5; 3,75 y 5,0 μg de SP-A en el caso de los microsomas se empleó además 7,5 μg de SP-A. En ambos casos, en ausencia de ácido ascórbico y LHP, la emisión de la luz fue muy baja (grupo control). La adición de ácido ascórbico solo al sistema, causó un pequeño incremento en la quimioluminiscencia. La adición de LHP, junto al sistema Fe^{+++} -ascorbato, a mitocondrias y microsomas causó un incremento en la emisión de la luz (peroxidación lipídica). La emisión de la luz incrementó gradualmente y logró el valor máximo a los 60 min de incubación. Un pico de quimioluminiscencia mucho mayor ocurrió en los microsomas (pico máximo de 148,986 a los 60 min).

En la figura 23 se muestra la quimioluminiscencia total de mitocondrias y microsomas de pulmón de rata respectivamente con diferentes cantidades de SP-A. Cuando las membranas fueron peroxidadas con Fe^{+++} -ascorbato + LHP la quimioluminiscencia total se incrementa. Adición de SP-A resultó en una disminución de la quimioluminiscencia total. En mitocondrias se observó una disminución de forma proporcional a la concentración de SP-A. En mitocondrias con 5 μg de SP-A el cpm fue similar al control, obteniendo una protección antioxidante del 100 %. En microsomas con 7,5 μg de SP-A se obtuvo una protección del $51,25 \pm 3,48$ %. Si se compara la quimioluminiscencia total de la peroxidación con Fe^{+++} -ascorbato + LHP la inducción producida en microsomas es mayor que en mitocondrias y el efecto inhibitorio de la SP-A es mayor en mitocondrias que en microsomas. En ambos casos muestras sin SP-A y tratadas con 2,5 μg SP-A presentan diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) con respecto a la emisión de luz de las muestras controles. Por otra parte en mitocondrias se observan diferencias altamente significativas entre el grupo peroxidado sin tratar con SP-A y el grupo tratado con 3,75 μg y 5 μg de SP-A.

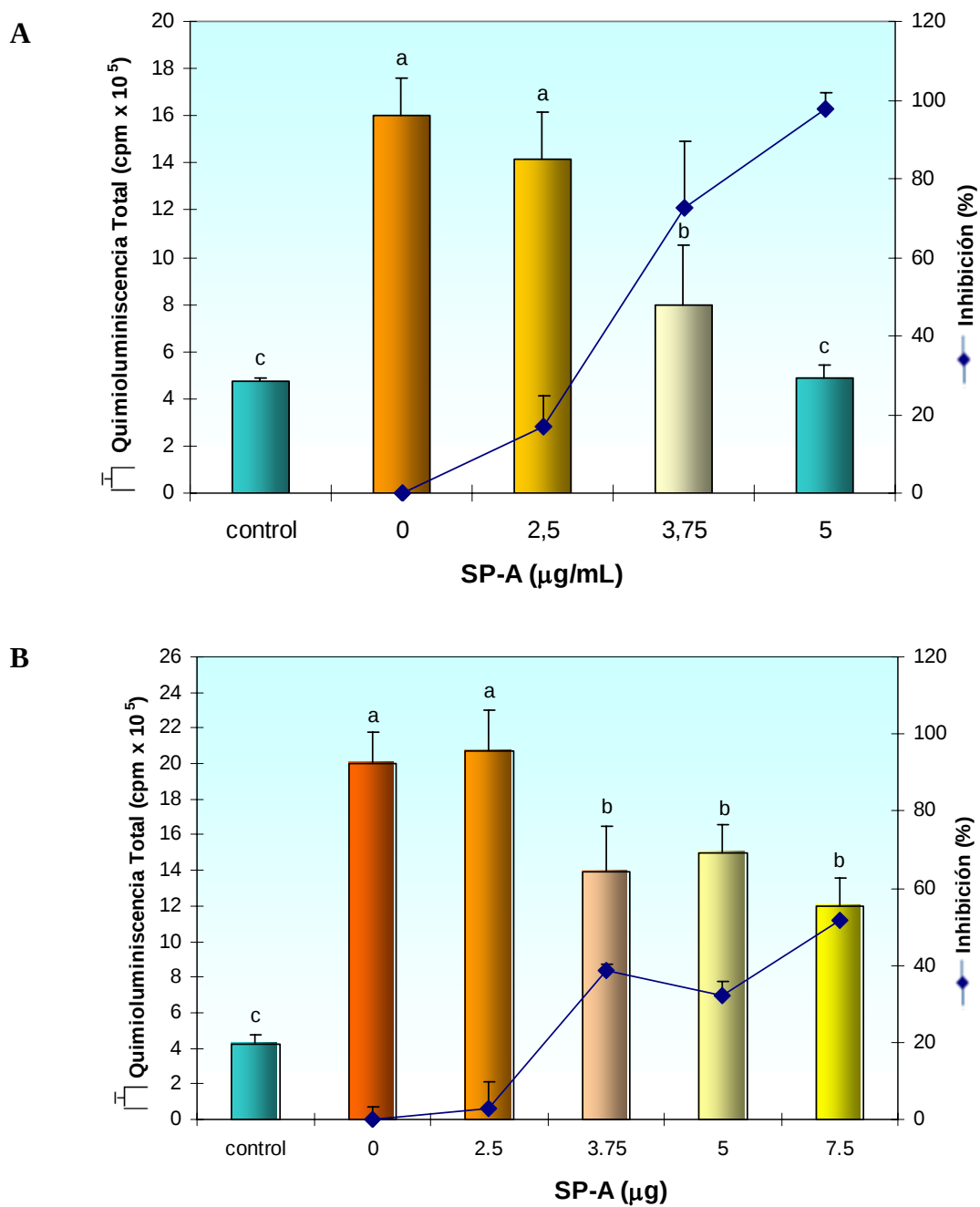


Figura 23. Quimioluminiscencia Total $\square$ producida en mitocondrias (A) y microsomas (B) de pulmón de rata por el sistema Fe^{+++} -ascorbato-LHP y porcentaje de inhibición $\blacklozenge$ en función de la concentración de SP-A. Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

5.4.2.1 Composición de ácidos grasos de los lípidos presentes en mitocondrias y microsomas de ratas.

El contenido y composición de los lípidos totales recobrados en mitocondrias y microsomas dió como resultado que el 16:0 fue el ácido graso predominante (30- 34%), seguido por 18:1n-9 (19 %), 18:2 n-6 (14-15 %), 18:0 (11-12 %), 20:4 n-6 (7-9 %) y 22:6 n-3 (2-2,5%).

En la tabla 6 se muestra el contenido de ácidos grasos del total de lípidos provenientes de mitocondrias de pulmón de rata: sin peroxidar, peroxidada y peroxidada en presencia de 2,5; 3,75 y 5,0 μg de SP-A. En los grupos sin peroxidar y peroxidados en presencia y en ausencia de SP-A 2,5 μg , existió diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de ácido docosahexaenoico (22:6 n-3). El ácido docosahexaenoico (22:6 n-3) disminuyó marcadamente cuando la mitocondria es preoxidada de $2,5 \pm 0,24 \%$ a $0,73 \pm 0,57 \%$. La disminución que se observó en los otros ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) no fue estadísticamente significativa.

En la tabla 7 se muestra el contenido de ácidos grasos del total de lípidos provenientes de microsomas de pulmón de rata: sin peroxidar, peroxidada y peroxidada en presencia de 2,5; 3,75; 5,0 y 7,5 μg de SP-A. Se observó cambios en el perfil de ácidos grasos de los lípidos de microsomas sin peroxidar y peroxidado. Los principales PUFA afectados por la peroxidación lipídica fueron 18:2 n-6, 20:4 n-6 y 22:6 n-3, los cuales disminuyen considerablemente. Como consecuencia se produce un incremento relativo en el porcentaje de ácidos grasos saturados y monoenoicos. En los grupos sin peroxidar, peroxidados y peroxidados tratados con SP-A 2,5 μg , existió diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de ácidos peroxidables. Por ejemplo, el contenido de ácido araquidónico en el grupo control fue de $7,39 \pm 1,14 \%$ y disminuyó a $3,21 \pm 0,77 \%$ y a $2,67 \pm 0,94 \%$ en el grupo peroxidado y peroxidado + 2,5 μg de SP-A respectivamente.

Los resultados en la determinación del índice de insaturación (I.I), mostraron que el I.I en mitocondrias fue $110,62 \pm 10,1$ y cuando estas son peroxidada disminuyó a $94,07 \pm 15,36$. En microsomas, este indicador se afectó profundamente cuando se compara el grupo no

Tabla 6 Composición de ácidos grasos del total de lípidos de mitocondrias (mit) de pulmón de ratas controles y peroxidados con y sin diferentes concentraciones de SP-A. Diferencias significativas entre grupo control y grupos peroxidados son indicados por ^a p<0,05 (Prueba Kruskal-Wallis).

Ácidos grasos (%)	Mit control (sin peroxidación)	Mit peroxidada (Fe ⁺⁺⁺ + Asc. + LHP)	Mit peroxidada + 2,5 µg/mL SP-A	Mit peroxidada + 3,75µg/mL SP-A	Mit peroxidada + 5µg/mL SP-A
16:0	30,53 ± 1,04	29,74 ± 6,07	30,64 ± 3,64	34,96 ± 2,85	35,95 ± 5,32
16:1	3,38 ± 0,24	1,89 ± 1,42	4,75 ± 0,41	2,94 ± 1,89	3,50 ± 0,96
18:0	10,93 ± 0,09	13,51 ± 2,47	14,13 ± 2,02	13,68 ± 1,38	12,30 ± 0,78
18:1n-9	19,74 ± 1,86	28,74 ± 8,23	25,39 ± 2,42	24,63 ± 0,34	19,94 ± 2,61
18:2n-6	15,44 ± 2,49	17,83 ± 5,04	11,60 ± 2,01	13,57 ± 0,45	13,96 ± 3,67
18:3n-3	0,96 ± 0,77	0,17 ± 0,23	0,03 ± 0,04	0,09 ± 0,13	0,06 ± 0,08
20:4n-6	9,68 ± 1,60	5,72 ± 1,64	4,55 ± 0,83	5,89 ± 1,30	9,41 ± 3,29
22:6n-3	2,50 ± 0,24	0,73 ± 0,57 ^a	0,22 ± 0,31 ^a	1,39 ± 0,89	1,73 ± 0,29
Saturado	41,46 ± 0,99	43,25 ± 4,76	44,77 ± 5,49	48,64 ± 4,21	48,26 ± 4,75
Monoinsaturado	23,12 ± 1,84	30,52 ± 6,77	30,13 ± 2,06	27,57 ± 2,18	23,45 ± 3,54
Poli-insaturado	28,59 ± 2,87	24,45 ± 7,43	16,41 ± 0,99	20,95 ± 1,56	25,16 ± 1,75
Total de Insaturaciones	51,70 ± 4,48	54,98 ± 4,27	46,54 ± 2,89	48,53 ± 2,29	48,60 ± 3,01
Saturados vs. Insaturado	0,81 ± 0,07	0,79 ± 0,15	0,97 ± 0,18	1,01 ± 0,12	1,00 ± 0,16
Indice de Insaturación	110,62 ± 10,10	94,07 ± 15,36	72,97 ± 1,30 ^a	93,45 ± 5,25	99,55 ± 5,13

Leyenda: Fe⁺⁺⁺ + Asc. + LHP: sistema hierro- ácido ascórbico- hidroperóxido de ácido linoleico.

Tabla 7 Composición de ácidos grasos del total de lípidos de microsomas (mic) de pulmón de ratas controles y peroxidados con y sin diferentes cantidades de SP-A. Diferencias significativas entre el grupo control y los grupos peroxidados son indicas por ^a p<0.005 y ^b p< 0,05; entre grupos peroxidados sin SP-A y peroxidados con SP-A por ^c p<0,05; entre grupo peroxidado con 2,5 µg de SP-A y con 7,5 µg de SP-A por ^d p<0,05. (Prueba de Kruskal-Wallis).

Ácidos Grasos (%)	Mic control (sin peroxidación)	Mic peroxidado (Fe+ Asc. + LHP)	Mic peroxidado + 2.5 µg SPA	Mic peroxidado + 3.75µg SP-A	Mic peroxidado + 5µg SP-A	Mic peroxidado + 7.5µg SP-A
16:0	34,06 ± 3,30	46,76 ± 5,29 ^b	49,18 ± 4,63 ^b	43,92 ± 3.64	42,74 ± 1,41	41,24 ± 2,11
16:1	2,64 ± 1,68	2,94 ± 2,09	2,41 ± 1,99	0,89 ± 1.27	3,65 ± 1,86	4,47 ± 0,78
18:0	11,32 ± 1,68	12,87 ± 1,87	12,73 ± 2,07	12,98 ± 1.32	15,25 ± 0,71	12,05 ± 1,71
18:1n-9	19,49 ± 1,30	24,50 ± 1,66	22,83 ± 2,66	26,90 ± 2.94 ^b	23,14 ± 2,09	20,61 ± 1,74
18:2n-6	14,43 ± 3,54	7,45 ± 0,21 ^a	7,80 ± 1,35 ^a	9,98 ± 1.24 ^a	10,14 ± 0,69 ^a	13,35 ± 1,09 ^{c,d}
18:3n-3	1,17 ± 1,05	-	-	-	-	0,02 ± 0,03
20:4n-6	7,39 ± 1,14	3,21 ± 0,77 ^a	2,67 ± 0,94 ^a	4,05 ± 1.06 ^b	3,66 ± 0,56 ^b	5,95 ± 0,73 ^d
22:6n-3	1,96 ± 0,65	0,08 ± 0,11 ^a	0,08 ± 0,10 ^a	0,47 ± 0.66 ^a	0,28 ± 0,19 ^a	0,51 ± 0,24 ^a
Saturado	45,38 ± 3,68	59,62 ± 4,05 ^b	60,24 ± 3,31 ^b	56,90 ± 2.35 ^b	57,41 ± 2,92 ^b	53,29 ± 3,80
Mono-insaturado	22,14 ± 1,50	27,45 ± 1,09	25,24 ± 3,85	27,77 ± 1.92	26,79 ± 0,29	25,08 ± 1,99
Poli-insaturado	24,95 ± 4,04	10,73 ± 1,06 ^a	10,47 ± 0,79 ^a	14,42 ± 2.76 ^a	14,08 ± 0,60 ^a	19,82 ± 0,94 ^{c,d}
Total de Insaturaciones	47,09 ± 4,91	38,18 ± 1,97	35,71 ± 4,61 ^b	42,26 ± 3.08	40,87 ± 0,74	44,90 ± 2,69
Saturacione vs. Insaturaciones	0,97 ± 0,09	1,57 ± 0,18	1,73 ± 0,33 ^b	1,36 ± 0.16	1,42 ± 0,07	1,19 ± 0,16
Indice de Insaturaciones	95,83 ± 11,64	55,64 ± 4,66 ^a	51,98 ± 5,36 ^a	66,75 ± 10.00 ^b	63,36 ± 1,10 ^b	77,19 ± 2,88

Leyenda: Fe⁺⁺⁺+ Asc. + LHP: sistema hierro- ácido ascórbico- hidroperóxido de ácido linoleico.

peroxidado y los grupos peroxidados. La SP-A fue más efectiva en incrementar el I.I en mitocondrias que en microsomas, de modo que con 5,0 µg de SP-A se produjo un incremento del I.I a $99,55 \pm 5,13$.

Los resultados demostraron que la SP-A inhibió la peroxidación de lípidos mitocondriales y microsomales de pulmón de rata inducidos por el sistema Fe^{+++} -ascorbato dependiente de hidroperóxido de ácido linoleico. Esta proteína fue más efectiva en inhibir la peroxidación lípida de los lípidos mitocondriales que los microsomales, y el LHP es más activo en producir quimioluminiscencia en microsomas de pulmón de rata. La SP-A inhibe la oxidación de membranas en forma dosis dependiente para mitocondrias, siendo la concentración inhibitoria media de 3,25 µg y la total de 5 µg en mitocondrias. Para microsomas la adición de 7,5 µg logra un $51,25 \pm 3,48$ % de inhibición.

El perfil de ácidos grasos en mitocondria de pulmón de rata no difiere sustancialmente del de microsomas, ambos son ricos en PUFA de la familia n-6, como el 18:2n-6. Microsomas tienen relativamente menos 20:4n-6 y 22:6n-3 que la mitocondria.

Los resultados demuestran que los cambios en la composición de los lípidos de mitocondrias y microsomas expuestos a estrés oxidativo, se manifiestan como una disminución del contenido de ácidos grasos poli-insaturados y un incremento en la concentración de los ácidos grasos saturados. Estos cambios fueron menos pronunciados en presencia de SP-A. Estas alteraciones que tienen lugar en la composición de ácidos grasos de mitocondrias y microsomas pulmonar pueden jugar un papel esencial en el mecanismo de daño pulmonar.

5.4.3 Efecto protector de la SP-A sobre el SURFACEN[®] expuesto a HCLO

En la figura 24 A se observa que la adición de la SP-A a SURFACEN[®] control provocó a partir de 15 ciclos de pulsación de la burbuja una disminución significativa ($p < 0,05$) en la TSM a valores cercanos a cero. El efecto de la SP-A porcina purificada por un método que no incluye solventes orgánicos ni detergentes sobre la actividad tensioactiva de SURFACEN[®] coincide con lo previamente informado para la SP-A porcina purificada por precipitación con butanol (Manzanares y col., 1994). La figura 24B se muestra que la incubación de

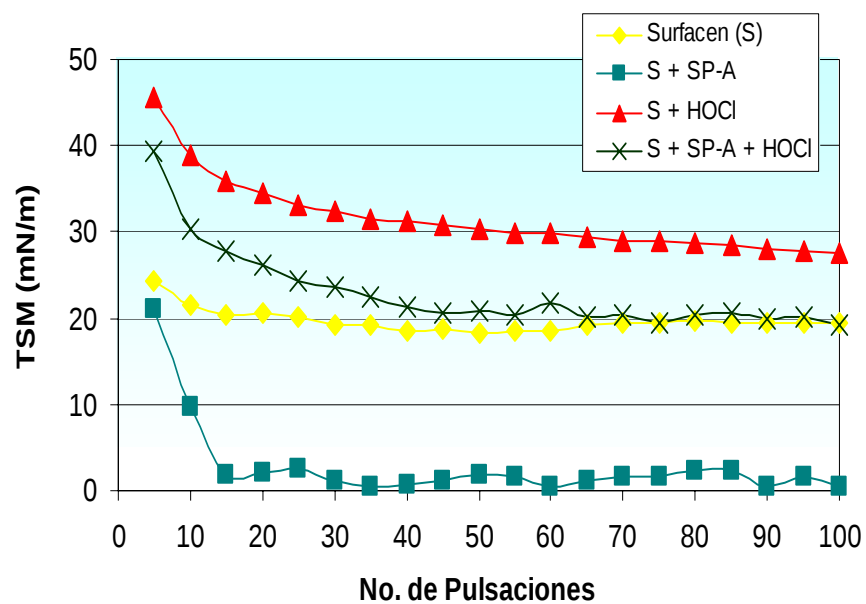


Figura 24 A. Comportamiento de la tensión superficial mínima (TSM). Efecto de la SP-A Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas $P < 0,05$.

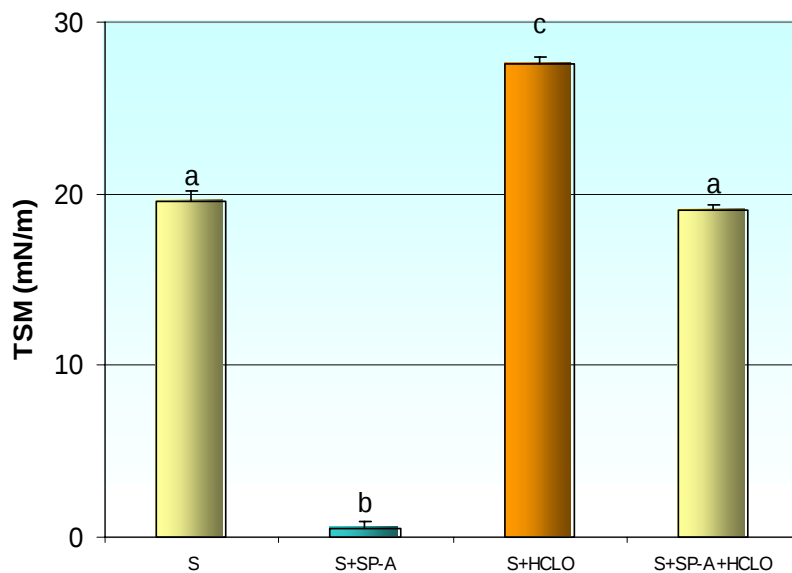


Figura 24B. Valores de TSM a los 5 min de pulsación. Efecto de la SP-A Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas $P < 0,05$.

SURFACEN[®] (2 mg de PL/mL) en presencia de HCLO provocó inhibición en las propiedades tensioactivas del surfactante, que se evidencia en el aumento de TSM durante los 100 ciclos de pulsaciones de la burbuja en el Surfactómetro, alcanzando un valor de $27,55 \pm 0,4$ mN/m a los cinco minutos de registro, que resultó significativo ($p < 0,05$) cuando se compara con muestras controles de SURFACEN[®] que mostraban lecturas de TSM de $19,55 \pm 0,6$ mN/m.

Cuando la SP-A es añadida previa a la incubación de SURFACEN[®] con HCLO reduce el número de pulsaciones requeridas para alcanzar la TSM correspondiente a esta concentración de fosfolípidos del surfactante y se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en los valores de TSM a los 5 min de registro que alcanzó los valores del SURFACEN[®] control (figura 24B). Solo una pequeña fracción de la proteína total que no fue dañada puede promover las propiedades tensioactivas del SURFACEN[®] y es la responsable de la pequeña disminución de la TSM después de cinco minutos de pulsaciones. Estos resultados indican que la proteína tiene propiedades antioxidantes por actuar como un secuestrador de iones hipocloroso y que es capaz de proteger al SURFACEN[®] de la inactivación oxidativa por esta ERO.

El agente oxidante provocó la peroxidación lipídica del surfactante que se evidencia por un aumento significativo ($p < 0,05$) en la concentración de MDA, cuando se comparó con muestras controles no expuestas HCLO, la adición de la SP-A porcina previo a la incubación del SURFACEN[®] con el agente oxidante disminuyó significativamente ($p < 0,05$) la concentración de MDA a valores que no se diferencian significativamente de los encontrados en SURFACEN control (figura 25) lo que significa un 72,4 % de protección de los lípidos insaturados de SURFACEN[®]. Estos resultados indican que la proteína tiene actividad antioxidante por actuar como un inhibidor de la peroxidación lipídica.

5.4.4 Efecto protector de la SP-A sobre SURFACEN[®] expuesto al radical $\cdot\text{OH}$

La incubación de SURFACEN[®] (1, 2 y 3 mg/mL de fosfolípidos) en presencia de Fe^{+++} -ascorbato resultó en una peroxidación lipídica evidenciada en la emisión de la luz (quimioluminiscencia). La adición de Fe^{+++} -ácido ascórbico produce un considerable

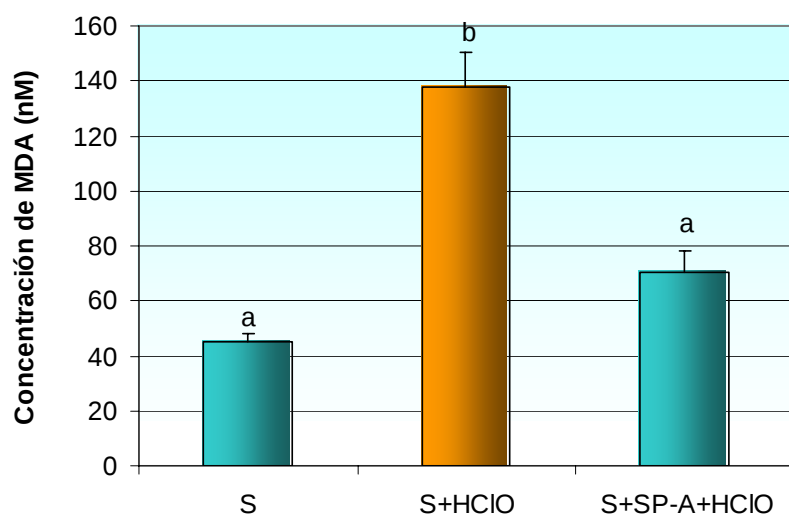


Figura 25. Concentración de MDA en el ensayo del HCLO. Efecto de la SP-A. Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas $P < 0,05$.

Leyenda:

S: SURFACEN[®]

S + HCLO: SURFACEN[®] + HCLO

S + SP-A + HCLO: SURFACEN[®] + SP-A + HCLO

incremento de la quimioluminiscencia cuando se compara con la muestra control incubada sin ácido ascórbico. La emisión de luz fue concentración dependiente (figura 26A).

La SP-A porcina (2 y 4 $\mu\text{g/mL}$) en presencia de SURFACEN[®] expuesto al sistema Fenton inhibió la peroxidación lipídica evidenciada en la disminución de la quimioluminiscencia que fue dosis dependiente con un 60 % de inhibición a la concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ y de un 73,6 % de inhibición a la concentración de 4 $\mu\text{g/mL}$ (figura 26B).

La peroxidación lipídica de SURFACEN[®] por el sistema Fe^{+++} -ascorbato provocó una profunda modificación en la composición de los ácidos grasos, con una disminución de los PUFA 18:2 n6 y 20:4 n6 (tabla 8). Cuando la SP-A se usó a baja concentración (1 y 2 $\mu\text{g/mL}$) no se observaron cambios en la composición de ácidos grasos, a mayor concentración (4 $\mu\text{g/mL}$) se logró una protección del 20:4 n6 (tabla 9). Por lo tanto cuando SURFACEN[®] es oxidado se observa una disminución de los PUFA (18:2 n6 + 20:4 n6) de $7,22 \pm 0,17$ a $5,31 \pm 0,29$. El efecto fue revertido casi completamente por la adición de 4 $\mu\text{g/mL}$ de SP-A. A la mayor concentración de SP-A usada se observó una buena relación entre la protección de los PUFA y la inhibición de la emisión de la luz.

5.4.4.1 Composición de los ácidos grasos de cada tipo de PL presente en SURFACEN[®]

La tabla 10 muestra el perfil de ácidos grasos por especie fosfolípídica que contiene SURFACEN[®]. La PE es el PL que presenta el mayor porcentaje de PUFA, le sigue el PI y la EM. Este comportamiento es similar a lo informado para otros surfactantes (Rüdiger y col, 2005).

5.5 Discusión

Cifuentes y col. (1995) evaluaron la propiedad potencial que tenían tres surfactantes: Surfactante Pulmonar Natural (SPN), Exosurf[®] y Survanta[®], para secuestrar los radicales hidroxilos, los dos últimos surfactantes no mostraron capacidad de captura de $\cdot\text{OH}$, en cambio una concentración de 40 μM de SPN disminuyó significativamente la concentración de $\cdot\text{OH}$, sugiriendo una probable interacción del $\cdot\text{OH}$ con los grupos sulfhidrilos de la proteína SP-A

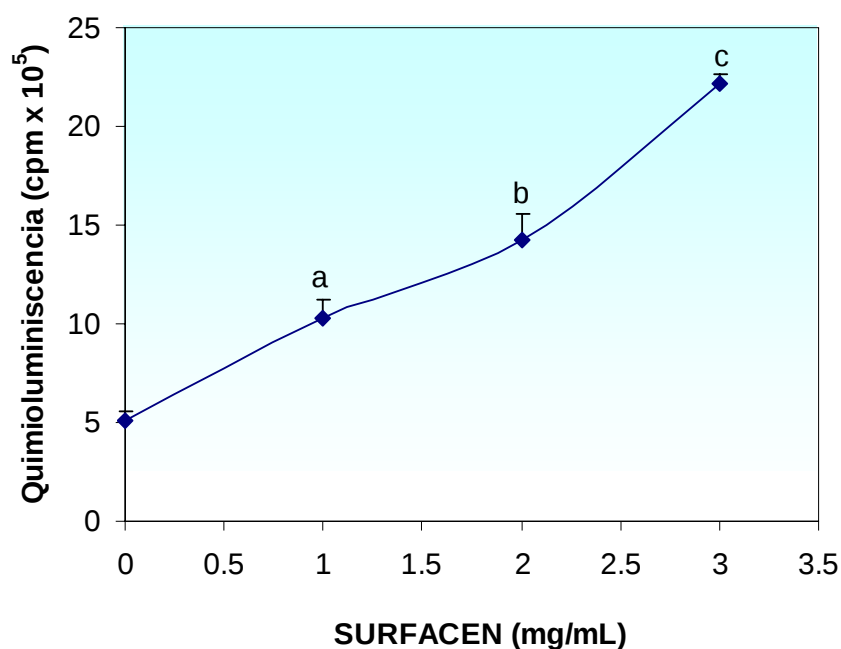


Figura 26A. Quimioluminiscencia total como una función de la concentración de SURFACEN®. Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas, $p < 0.05$.

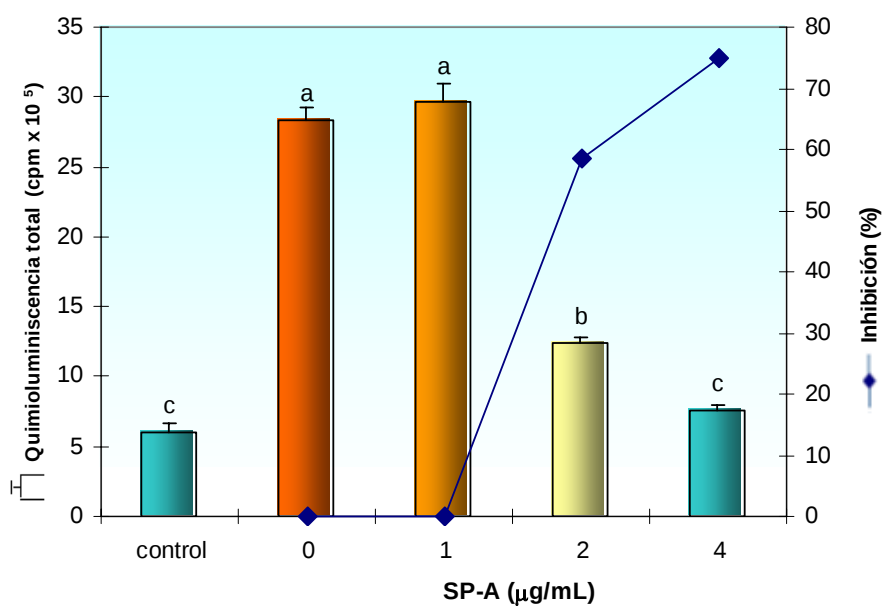


Figura 26 B. Quimioluminiscencia Total $\square$ producida en SURFACEN® (3mg/mL) por el sistema Fe^{+++} -ascorbato y porcentaje de inhibición $\blacklozenge$ en función de la concentración de SP-A. Los datos son expresados como la media $\pm$ EEM de 3 experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas, $p < 0.05$.

Tabla 8. Composición de ácidos grasos (área %) de SURFACEN[®] sin peroxidar (-Fe⁺⁺⁺/Asc) y peroxidado (Fe⁺⁺⁺/Asc). Diferencias significativas entre el grupo peroxidado y sin peroxidar son indicadas por * p<0,05.(Prueba de Kruskal -Wallis).

	SURFACEN [®] (mg/mL)					
	1		2		3	
Ácidos Grasos (%)	-Fe ⁺⁺⁺ /Asc	Fe ⁺⁺⁺ /Asc	-Fe ⁺⁺⁺ /Asc	Fe ⁺⁺⁺ /Asc	-Fe ⁺⁺⁺ /Asc	Fe ⁺⁺⁺ /Asc
<i>C 16:0</i>	62,29 ± 1,31	62,17 ± 0.78	62,00 ± 1.88	64,7 ± 1.59	62,58 ± 2,24	65.91 ± 0.88
<i>C 16:1</i>	3,31 ± 0,72	3,29 ± 0.92	3,87 ± 0.27	3,91 ± 0.22	3,51± 0,20	3.49 ± 0.19
<i>C 18:0</i>	7,38 ± 0,19	7,73 ± 0.36	7,59 ± 0.62	7,13 ± 0.06	7,31 ± 0,24	6.95 ± 0.13
<i>C 18:1</i>	15,04 ± 0,73	15,7 ± 1.24	15,08 ± 1.26	14,72 ± 0.75	15,38 ± 0,51	14.6 ± 0.35
<i>C 18:2</i>	3,43 ± 0,16	3,02 ± 0.21	3,09 ± .0.47	2,91 ± 0.12	3,33 ± 0,08	2.79 ± 0.17
<i>C 20:4</i>	3,82 ± 0,20	2,91 ± 0.22 *	3,77 ± 0.03	2,47 ± 0.06 *	3,89 ± 0,09	2.52 ± 0.12 *
<i>Saturados</i>	69,67 ± 1,50	69,9 ± 1.14	69,59 ± 1.65	71,83 ± 1.65	69,89 ± 2,48	72.86 ± 1.01
<i>Mono-insaturados</i>	18,76 ± 1,04	19,62 ± 1.53	18,95 ± 1.53	18,63 ± 0.97	18,89 ± 0,71	18.09 ± 0.54
<i>Poli-insaturados</i>	7,25 ± 0,37	5,99 ± 0.42 *	7,24 ± 0.12	5,38 ± 0.18 *	7,22 ± 0,17	5.31 ± 0.29 *
<i>Insaturación Total</i>	26,01 ± 1,47	25,61 ± 1.95	26,19 ± 1.65	24,01 ± 1.15	26,11 ± 0,88	23.4 ± 0.83
<i>Saturados/insaturados</i>	2,67	2,72	2,67	2,99	2,68	3.11
<i>II</i>	40,49	36,67	40,21	34,33	41,11	33,75

Fe⁺⁺⁺-Asc: Sistema hierro-ácido ascórbico.

Tabla 9. Composición de ácidos grasos (área %) de SURFACEN® sin peroxidar (-Fe⁺⁺⁺/Asc) y peroxidado (Fe⁺⁺⁺/Asc), con o sin diferentes concentraciones de SP-A. Diferencias significativas entre el grupo peroxidado y sin peroxidar son indica * p<0,05 (Prueba de Kruskal-Wallis).

			SP-A porcina (μg/mL)		
			1	2	4
Ácidos Grasos (%)	-Fe ⁺⁺⁺ /Asc	Fe ⁺⁺⁺ /Asc	Fe ⁺⁺⁺ /Asc	Fe ⁺⁺⁺ /Asc	Fe ⁺⁺⁺ /Asc
<i>C 16:0</i>	62,58 ± 2,24	65,91 ± 0,88	65,5 ± 1,1	66,6 ± 0,95	64,37 ± 1,03
<i>C 16:1 n7</i>	3,51 ± 0,21	3,48 ± 0,19	3,23 ± 0,14	3,17 ± 0,13	2,97 ± 0,74
<i>C 18:0</i>	7,31 ± 0,24	6,95 ± 0,13	6,96 ± 0,14	6,99 ± 0,21	7,19 ± 0,23
<i>C 18:1 n9</i>	15,38 ± 0,51	14,06 ± 0,35	15,53 ± 1,71	13,97 ± 0,61	15,19 ± 0,04
<i>C 18:2 n6</i>	3,33 ± 0,09	2,79 ± 0,05	2,93 ± 0,11	2,72 ± 0,01	3,26 ± 0,18
<i>C 20:4 n6</i>	3,89 ± 0,12	2,52 ± 0,12*	2,45 ± 0,17*	3,00 ± 0,24*	3,41 ± 0,22
<i>Saturados</i>	69,89 ± 2,48	72,86 ± 1,01	72,46 ± 1,24	73,59 ± 1,16	71,56 ± 1,26
<i>Mono-insaturados</i>	18,89 ± 0,71	18,09 ± 0,54	18,76 ± 1,85	17,14 ± 0,74	18,16 ± 0,78
<i>Poli-insaturados</i>	7,22 ± 0,17	5,31 ± 0,29*	5,38 ± 0,28*	5,72 ± 0,25*	6,67 ± 0,4
<i>Insaturación Total</i>	26,11 ± 0,88	23,4 ± 0,83	24,14 ± 2,13	22,86 ± 0,99	24,83 ± 1,18
<i>Saturados/insaturados</i>	2,68	3,11	3,00	3,21	2,88
<i>I.I</i>	41,11	33,2	34,42	34,58	38,32

Fe⁺⁺⁺/Asc: Sistema hierro-ácido ascórbico.

Tabla 10. Composición de ácidos grasos (área %) de SURFACEN[®] y sus diferentes tipos de fosfolípidos.

Ácidos grasos (%)	SURFACEN	LPC	SM	PC	PS	PI	PE	PG	otro
<i>C 16:0</i> L	62,44±2,24	32,55±1,2	54,26±1,5	67,23±1,8	34,06±1,1	27,45±1,3	30,7±1,9	44,18±1,5	33,5±1,9
<i>C 16:1</i> n-7	3,41± 0,21	1,1± 0,26	7,5±0,28	3,91±0,20		1,79±0,25	3,42±0,30	6,93±0,20	3,45±0,20
<i>C 18:0</i> S	7,35± 0,24	20,55± 0,3	10,71± 0,4	6,94± 0,3	12,97± 0,25	27,3± 0,30	14,7± 0,3	23,91± 0,3	21,74± 0,31
<i>C 18:1</i> n-7	15,21±0,51	32,6±0,46	9,58±0,50	8,63±0,48	33,09±0,30	25,8±0,41	30,17±0,46	17,78±0,35	21,67±0,40
<i>C 18:2</i> F	3,38± 0,09		3,69± 0,09	1,84± 0,12	3,35± 0,15	3,97± 0,20	7,47± 0,18	3,69± 0,20	2,56± 0,23
<i>C 20:4</i> o	3,86± 0,12		2,84± 0,15	0,31± 0,16		4,8± 0,20	3,69± 0,25	1,04± 0,18	0,67± 0,15
Saturados	69,79±2,48	53,11±1,50	49,18±1,9	74,18±2,1	42,03±1,35	54,8±1,60	45,44±2,2	68,69±1,8	52,26±2,21
Mon-insaturados	18,62±0,71	33,7±0,72	15,92±0,78	12,55±0,68	33,09±0,30	27,5±0,66	33,59±0,76	15,82±0,55	25,12±0,60
Poli-insaturados	7,24± 0,17		6,53±0,24	2,0±0,28	3,35±0,15	8,77±0,40	11,16±0,43	2,36±0,38	3,23±0,38
Insaturaciones Totales	25,86±0,88	33,7±0,72	22,46±1,02	14,55±0,96	36,44±0,45	36,36±1,06	44,75±1,19	18,18±0,93	28,36±0,98

dilcolina

PI: Fosfatidilinositol

SM: Esfingomielina

PE: Fosfatidiletanolamina

PC: Fosfatidilcolina

PG: Fosfatidilglicerol

PS: Fosfatidilserina

Los datos son expresados en % de la cantidad total de PL de tres determinaciones independientes.

presente en el SPN. La capacidad secuestradora de $\cdot\text{OH}$ demostrada para la SP-A porcina en nuestro trabajo, es una probable explicación a los resultados de investigadores previamente mencionados, ya que la SP-A sólo está presente en el SPN. Se ha informado que los aminoácidos más susceptibles al daño oxidativo por el $\cdot\text{OH}$ son el triptófano, tirosina, fenilalanina, metionina y cisteína (Aruoma, 1994). En otro estudio se señala la afectación en la estructura de la SP-A después de su exposición a radicales $\cdot\text{OH}$. El análisis de “Western Blott” de la SP-A, procedente del surfactante de ternero, sometida a un sistema generador de radicales $\cdot\text{OH}$ mediante la reacción de Fenton, demostró modificación de la proteína con la generación de agregados de mayor y menor masa molecular indicando que el $\cdot\text{OH}$ ataca los puentes disulfuro de la proteína que son importantes en mantener la configuración del complejo hexamérico de la SP-A, por tanto el proceso de oxidación-reducción de los enlaces disulfuro intracatenarios mediados por radicales libres es uno de los eventos responsables de los cambios en la estructura de esta biomolécula (Mark e Ingenito, 1999).

Las propiedades secuestradoras de radicales hidroxilos de la SP-A porcina podemos deducir que pueden explicarse por un mecanismo en el que la proteína actúa como “suicida” neutralizando los radicales $\cdot\text{OH}$, mediante la interacción de este radical libre con las cadenas laterales de los aminoácidos más sensibles a él.

En la variante del experimento para detectar la capacidad quelante de hierro de la SP-A, cuando los iones férricos son añadidos a la mezcla de reacción como cloruro de hierro III en vez de en forma de complejo con el EDTA, algunos de los iones forman un complejo con la desoxirribosa. Este complejo puede ser reducido por el ascorbato a hierro II, el cual puede permanecer unido a la desoxirribosa y posteriormente reaccionar con el peróxido de hidrógeno. Esta reacción produce los radicales $\cdot\text{OH}$, los cuales inmediatamente comienzan la degradación de la desoxirribosa de una manera sitio específico. Las moléculas que pueden inhibir la degradación de la desoxirribosa son aquellas que tienen la capacidad de unirse al hierro y pueden capturar los iones hierro de la desoxirribosa y rendir complejos inactivos o pobremente activos en la reacción de Fenton (Aruoma, 1994).

Hasta el momento no se ha informado la capacidad de la SP-A de unirse a los iones hierro. Solo se conoce la existencia de al menos dos sitios de unión al Ca^{2+} en el DRC ubicado en la zona C-terminal de la SP-A y que un gran número de las funciones en las que participa el DRC son dependientes de calcio (McCormack 1998). Otro trabajo informa cambios en las propiedades interfaciales del surfactante de ternero, en presencia del sistema Fenton, siendo necesario un incremento de un 30 a un 70% en el radio de compresión de la burbuja para alcanzar los mismos valores de tensión superficial mínima que las muestras no tratadas. La adición de SP-A purificada al surfactante de ternero al 5 % en peso eliminó la disfunción cuando los radicales $\cdot\text{OH}$ son generados a partir del Fe^{2+} , pero no cuando se emplea Cu^{2+} , sugiriendo que los sitios específicos de reactividad pueden ser diferentes (Mark e Ingenito 1999).

Bridges y col. (2000) realizaron varios experimentos para dilucidar el mecanismo antioxidante por el cual la SP-A de rata inhibe la peroxidación lipídica inducida por Cu^{2+} en una mezcla de lípidos saturados e insaturados que están presentes en el surfactante, ellos no encontraron afectación de las propiedades antioxidantes de la proteína cuando el ensayo se realizó en presencia de calcio 2 mM, quedando saturado el llamado sitio de unión a calcio de la SP-A. La proteína mostró la actividad con igual eficacia cuando fue dializada extensivamente contra Tris 5 mM o sulfato de cobre 20 μM . Además se observó que la SP-A inhibió la peroxidación lipídica en presencia de cloruro de hierro (III) y pirofosfato de hierro (III) + ácido ascórbico. Con estos datos los autores concluyen que el mecanismo de protección no es específico al cobre, ni depende de la quelación de cobre por la proteína.

Arbibe y Touqui (1998) encontraron que la SP-A actúa como un inhibidor de la actividad de la fosfolipasa A_2 de secreción (sPLA_2) por un mecanismo de interacción proteína-proteína dependiente del ión calcio (Ca^{2+}), que también ocurrió en presencia de otros cationes divalentes como manganeso (Mn^{2+}) o bario (Ba^{2+}), pero no con magnesio (Mg^{2+}); este mismo comportamiento se observa en la asociación de la SP-A a carbohidratos.

El análisis de los resultados de los autores mencionados anteriormente sugiere la posibilidad de unión de otros cationes, entre los que podría incluirse el hierro, al llamado sitio de unión a calcio de la proteína. Como vemos no existen elementos suficientes para plantear un posible

mecanismo por el cual la SP-A quela el hierro, por lo que se requieren estudios adicionales en esta dirección.

El estudio de los efectos de la SP-A en el modelo de la 2-desoxi-D-ribosa permitió conocer que tanto su unión al hierro como el secuestro directo de radicales $\cdot\text{OH}$ conducen a una disminución en la generación de $\cdot\text{OH}$. Este radical, considerado como el más reactivo, está comprometido con el daño oxidativo que tiene lugar en las diferentes biomoléculas durante el estrés oxidativo, por lo que resulta de particular interés su intervención en los procesos inflamatorios (Aruoma, 1996).

Yang y col. (2003) demostraron que la destrucción peroxidativa de membranas celulares internas, como las de las mitocondrias puede conducir a pérdida de su integridad funcional. Se ha postulado que una producción de radicales de oxígenos incrementada en las células pulmonares puede ser un factor importante en la etiología del daño pulmonar por hiperoxia. Freeman y Crapo (1981) brindan evidencias de una asociación entre la hiperoxia y la producción incrementada de ERO parcialmente reducidas en el pulmón y en la mitocondria del pulmón. En el pulmón de rata sujeto a hiperoxia, se induce la superóxido dismutasa CuZn en citoplasma y mitocondrias como consecuencia de una respuesta adaptativa.

La SP-A se une ávidamente a la DPPC. También se ha informado que se une a la EM, pero no se une a otros componentes PL presentes en el surfactante como el PG, el PI, la PE y la PS. Kuroki y Akino (1991) demostraron que el sitio de unión a lípidos en la SP-A se localizó en la región cuello, lo cual es de esperar por la naturaleza hidrofóbica de esta región, pero también se demostró que el DRC es el principal sitio de unión a lípidos. A su vez Bridges y col. (2000) encontraron que la actividad antioxidante de la SP-A esta localizada en esta región. Rodríguez-Capote y col. (2003) demostraron que la SP-A puede revertir los efectos perjudiciales en las propiedades biofísicas del surfactante oxidado por un mecanismo que es dependiente de la formación de puentes disulfuros y del dominio de unión a PL.

Aunque el mecanismo por el cual la SP-A reduce la peroxidación lipídica permanece desconocido, un mecanismo posible es que la SP-A pueda limitar la propagación de la reacción en cadena de radicales libres por secuestrar los radicales peroxil lipídicos y por lo

tanto bloquea la reacción de peroxidación lipídica protegiendo a los ácidos grasos poli-insaturados del daño oxidativo.

Para dilucidar el mecanismo antioxidante de la SP-A, se necesitan realizar investigaciones que involucren interacciones de la proteína con el hierro, antioxidantes y intermediarios de radicales libres tales como hidroperóxidos de ácidos grasos. En este ensayo la SP-A minimiza el daño mitocondrial y microsomal causado por un hidroperóxido de ácido graso en proporción a la cantidad de proteína, en células pulmonares la SP-A pudiera tener un efecto similar y por tanto proteger contra el efecto citotóxico potencial durante el estrés oxidativo en las membranas pulmonares, donde hidroperóxidos de ácidos grasos pueden estar presentes. Los resultados sugieren que una función de la SP-A es actuar como un secuestrador de radicales libres, lo cual ha sido demostrado en el ensayo de la 2-desoxiribosa, protegiendo las membranas de un efecto perjudicial expuestas a peroxidación lipídica y por tanto presenta un papel fisiológico importante como antioxidante al proteger al pulmón durante el estrés oxidativo debido a una inhalación de oxígeno, agentes nocivos o a la inflamación en el pulmón.

El pulmón está expuesto a estrés oxidativo mediante la inhalación del oxígeno presente en la atmósfera, la exposición a trazas de metales y a otros componentes en el aire contaminado; así como a radicales libres liberados por macrófagos y neutrófilos al espacio alveolar (Mark e Ingenito, 1999 y Bridges y col., 2000). Aunque el surfactante es inherentemente resistente a la oxidación debido a que en él predominan los PL saturados, el CL oxidable y los fosfolípidos insaturados representan aproximadamente el 35 % del peso del surfactante, y el 15 % de todos los PL del surfactante contienen dos o más dobles enlaces (Postle y col., 1999).

Existen investigaciones que registran una interrelación entre la peroxidación lipídica y la inhibición de la función biofísica del surfactante. Merrit y col. (1993) encontraron afectación de la actividad tensioactiva después de la exposición a ácido hipocloroso en tres surfactantes: Surfactante Pulmonar Natural (SPN) humano, SURVANTA[®] y el surfactante KL₄ (SURFAXIN[®]), pero no en EXOSURF[®], ellos sugieren que la ausencia de fosfolípidos insaturados en EXOSURF[®] es la responsable de su resistencia a la alteración de sus

propiedades tensioactivas, porque el ácido hipocloroso produce clorohidrinas a partir de los ácidos grasos poli-insaturados. Ellos demostraron que el ácido ascórbico y el glutatión protegieron al surfactante de la inactivación, lo que sugiere que el ácido hipocloroso producido por los neutrófilos activados en el compartimiento alveolar del pulmón en estados inflamatorios como es el caso del SDRA daña el surfactante endógeno y afecta la función de los surfactantes exógenos administrados, especialmente si las concentraciones del ácido ascórbico y el glutatión en el pulmón son subnormales, como es conocido en el caso de algunas enfermedades inflamatorias del pulmón.

La exposición de un extracto de surfactante de pulmón de ternero a peroxinitrito y $\text{Fe}^{3+} + \text{EDTA}$, inhibió su capacidad de alcanzar valores mínimos de tensión superficial durante la compresión dinámica. Se comprobó que el daño ocurrió en los lípidos y además en las proteínas hidrófobas. La exposición de una mezcla de estas proteínas hidrofóbicas a peroxinitrito inhibió la propiedad que tienen estas biomoléculas de disminuir la tensión superficial de los lípidos del surfactante (Haddad y col., 1993).

Se ha informado que la adición de la SP-A a SURVANTA[®] potencia el efecto terapéutico del surfactante mejorando la estabilidad pulmonar estática y dinámica del pulmón de conejos recién nacidos prematuros ventilados (Yamada y col., 1990). Cockshutt y col. (1990) encontraron que la adición de la SP-A a un extracto de surfactante bovino (BLES[®]) disminuye el tiempo necesario para alcanzar tensiones superficiales cercanas a cero mN/m durante la compresión dinámica. Sun y col. (1997) informan que la adición de la SP-A porcina al 5 % en peso al CUROSURF[®], a una concentración de 1 mg/mL de PL, provocó una disminución de los valores de TSM de $16,3 \pm 3,9$ mN/m a $8,4 \pm 3,6$ mN/m y fue similar al informado para el SPNP $7,5 \pm 5,5$ mN/m. En estudios *in vivo* se ha demostrado que la SP-A se une a los lípidos y promueve junto con la SP-B la formación de la mielina tubular, aumenta la velocidad de adsorción de los lípidos a la monocapa en la interfase aire-líquido del alvéolo, además por unión a fosfolípidos específicos como la DPPC e induce estabilidad superficial de los lípidos del Surfactante (Possmayer y col., 2001). Estudios para determinar los dominios de la SP-A involucrados en la disminución de la tensión superficial revelan la importancia de la oligomerización dependiente del DRC y el dominio N-terminal en las asociaciones fosfolípido - SP-A (Yu y col., 1999). Aunque *in vitro* esta estructura no esta presente, si se han brindado

resultados que la SP-A manifiesta su propiedad biofísica en condiciones de concentración disminuida de surfactante (Sun y col., 1997 y McCormack, 1998), lo cual adquiere una relevancia importante en el SDRA.

El efecto de la SP-A porcina sobre las propiedades biofísicas del SURFACEN[®] oxidado con HCLO coincide con lo informado por Rodríguez-Capote y col. (2003) para la SP-A bovina y el surfactante bovino BLES[®]. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores con otras ERO. Amirkhanian y Merrit (1998) compararon el efecto inhibitorio del radical hidroxilo en la actividad tensioactiva de dos preparaciones de surfactante y encontraron un aumento de la TSM en SURVANTA[®], surfactante bovino natural exógeno de composición bioquímica similar al SURFACEN[®], mientras que en el surfactante natural (SPN) este efecto no fue significativo a similares concentraciones de fosfolípidos. Estos investigadores refieren que la presencia de SP-A y el contenido de catalasa en el SPN pueden tener un efecto protector en la inactivación del SPN por ERO.

La actividad secuestrante que muestra la proteína sobre el HCLO pudiera explicarse por un mecanismo en el que la SP-A actúa como diana competidora con el propio surfactante para neutralizar este agente oxidante, basado en que Halliwell y Gutteridge (1990) demostraron que el ácido hipocloroso reacciona con los grupos sulfhidrilos, metionina, triptófano y aminos proteicos, modificando la estructura de las proteínas y alterando así su función biológica. Varios trabajos informan acerca de la modificación de la estructura de la SP-A después de su exposición a radicales libres, sugiriendo la idea que la acción protectora de la SP-A al daño oxidativo por las ERO tiene lugar mediante un mecanismo en el que la proteína actúa como *suicida* para neutralizar los radicales libres. En uno de estos estudios se indica que la exposición de la SP-A canina a ozono provocó un aumento del peso molecular aparente de la forma monomérica, detectándose oxidación de los aminoácidos metionina y triptófano (Oosting y col., 1991).

La SP-A de rata inhibió la oxidación de una mezcla de lípidos saturados e insaturados que están presentes en el surfactante, que fue determinado por una disminución de la formación de PRATB y bloqueó de la formación de dienos conjugados en partículas de lipoproteínas de baja

densidad, en ambos experimentos la oxidación fue inducida por cobre y la SP-A mostró un efecto dependiente de la dosis (Bridges y col., 2000).

La SP-A inhibe la oxidación casi instantáneamente cuando es añadida en la fase de propagación de los radicales libres, sugiriendo la hipótesis de que la proteína interfiere en la oxidación de los lípidos por inhibir la formación de los radicales lipídicos o por actuar como un terminador de las reacciones en cadena de los radicales libres mediante eventos de reconocimiento, aproximación y extinción de los radicales lipídicos (Bridges y col., 2000).

Recientemente Kuzmenko y col. (2004) analizaron la capacidad de la SP-A de inhibir la oxidación de una mezcla de PL del surfactante inducida por CuSO_4 y concluyeron que la SP-A inhibe la oxidación de lípidos de una manera dosis dependiente por un mecanismo que incluye modificaciones oxidativa de la SP-A.

Los metales de transición han sido implicados en el daño del surfactante por radicales libres, debido a que ellos pueden promover la formación de especies químicas reactivas. En adición, se ha demostrado la presencia de hierro activo redox en fluido broncoalveolar a partir de fuentes endógenas en pacientes normales. La propiedad de la SP-A de inhibir la fase de propagación de la reacción en cadena de radicales libres puede prevenir la peroxidación lipídica.

La disfunción del surfactante es un importante factor que contribuye a la fisiopatología del SDRA (Hallman y col., 1989; Goode y Webster, 1993 y Lewis y col., 1993). Se han propuesto varios mecanismos para explicar los cambios observados en las propiedades interfaciales, estos incluyen interacciones biofísicas con las proteínas del suero en los procesos de edema y membrana hialina, disminución del contenido de proteínas del surfactante debido a la degradación de estas por proteasas liberadas de los leucocitos y alteración en la composición de los lípidos y proteínas del surfactante causado por radicales libres (Ryan y col., 1991 y Pittet y col., 1997). Un mejor conocimiento en la contribución relativa de estos mecanismos pudiera ser útil para el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento del SDRA.

Los resultados del presente trabajo contribuyen al conocimiento de este proceso al caracterizar específicamente las alteraciones en los ácidos grasos del SURFACEN[®] expuesto a radicales libres y demuestra como estas alteraciones pueden ser revertidas en presencia de SP-A porcina.

5.6 Conclusiones

- Se demostró que la SP-A porcina posee propiedades antioxidantes, evidenciadas por su capacidad secuestradora del $\cdot\text{OH}$, su posible actividad quelante de hierro y su protección a mitocondrias y microsomas en los modelos *in vitro* evaluados, asimismo la SP-A porcina protege al SURFACEN[®] de la acción oxidativa ejercida por el HClO y el $\cdot\text{OH}$ debido a la inhibición de la peroxidación lipídica lo que se refleja en la menor modificación de las propiedades tensioactivas y en la protección en los PUFA.

6. DISCUSION GENERAL.

6. DISCUSIÓN GENERAL

Recientes estudios han demostrado que la composición del surfactante natural varía entre especies (Bernhard y col., 2000). Estas diferencias en composición se acentúan cuando se comparan diferentes preparaciones de surfactante de origen animal actualmente utilizadas en clínica. A las diferencias en el procedimiento de extracción y producción de la fracción tensioactiva del material pulmonar se suma la adición de proporciones variables de algunos componentes supuestamente beneficiosos como es DPPC suplementaria o ácido palmítico (Bernhard y col., 2000 y Rüdiger y col., 2005) (tabla 11).

Los resultados de esta Tesis con relación a las isothermas presión-área evidencian una superioridad aparente de las propiedades interfaciales de SURFACEN sobre las de CUROSURF. Este comportamiento puede adquirir relevancia fisiológica en el tratamiento de enfermedades respiratorias donde la inactivación del surfactante probablemente impone reducciones en su disponibilidad para la interfase, y para cuyo tratamiento pueden requerirse no sólo preparaciones de surfactante que funcionen óptimamente sino que lo hagan a las menores concentraciones posibles.

Alonso y col. (2004) han caracterizado las isothermas presión-área de SURVANTA y discuten que las curvas se desplazan progresivamente hacia área más pequeñas, lo que es indicativo de que la película de surfactante se hace más rígida con el tiempo, lo que sin duda va asociado a la pérdida también progresiva del material fluido. *En los resultados de esta Tesis, se observa que CUROSURF presenta un comportamiento similar al planteado por Alonso y col. (2004) con SURVANTA.* Mucho son los factores que pueden desencadenar este fenómeno además de la presencia de componentes extraños o ajenos a la composición original del surfactante, añadidos durante el proceso de producción. Las proteínas hidrofóbicas del surfactante, SP-B y SP-C, son responsables de estabilizar los reservorios de lípidos fluidos en la vecindad de la interfase (Ding y

Tabla 11. Composición lípidica (% p/p del total de lípidos) del surfactante natural y de preparaciones de surfactante comerciales

	SN (8)	CUROSURF® (1,3,8,10,11)	SURFACEN® (5)	SURVANTA® (1,8,9,10,11)	ALVEOFACT® (1,11,12)	INFASURE® (2,4,6,7)	BLES® (13)
PL	80-90	99,0	91-95	84,0	88,0	NI	NI
PC	70-85	78,0	65,0-71,4	62,0-87,0	82,0 ± 1,4	70,0-83,0	79,0 ± 1,6
-DPPC (%PC)	36-54	31,0-56,0	44,3-46,8	70,0	39,0	41,0	41, 6
PI	4-7	3,3-7,2	11,4-13,3	0,5	0,5 ± 0,2	5,0 (PS)*	1,8 ± 0,3
PG	7-10	1,2-3,5	5,4-7,7	2,5-3,2	9,0 ± 1,3	6,0	11,3 ± 0,5
PE	3,0	4,5-7,5	3,7-4,8	2,2	3,0 ± 0,4	3,0	3,5 ± 0,5
PS	5,0	1,2±1,1	1,1-1,8	3,7-4,8	NI	NI	NI
LPC	0,2	<1,0- 6,9	0,6-1,5	2,2	4,0 ± 0,2	<1,0	1,5 ± 0,4
SM	2,0	1,84 ± 0,3 - 8,1	3,6-5,1	0,79±0,15- 4,8	0,46± 0,09	2,0	2,6 ± 0,5
CL	5,0	0,0	0,3-1,6	0,0	3,0	5,0	NI

1 Bernhard y col., 2000

2 Bloom y col, 1997

3 Chiesi Farmaceutici

4 Kahn y col., 1995

5 Manzanares y col., 1995

6 Notter y col., 1985

7 ONY I.

Nota:

NI: No informado, *: el valor corresponde a PI+PS

SN: Surfactante Natural

8 Robertson y Taeusch, 1985

9 Ross, 1999

10 Rudiger y col., 2005

11 Seeger y col., 1993

12 Wauer y col., 1998

13 Yu y col., 1983

PL: Fosfolípidos

PC: Fosfatidilcolina

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

PI: Fosfatidilinositol

PE: Fosfatidiletanolamina

PS: Fosfatidilserina

LPC: Lisofosfatidilcolina

SM: Esfingomielina

CL: Colesterol

col., 2001; Takamoto y col., 2001 y Ding y col., 2003). De forma general los surfactantes clínicos producidos a partir de fuentes naturales se caracterizan por un contenido más bajo de SP-B en comparación a su material de partida. SURVANTA[®] posee la concentración más baja de SP-B en comparación con ALVEOFACT[®], y a su vez en comparación con CUROSURF[®] (Bernhard y col., 2000; Taeusch y col., 2002 y Rüdiger y col., 2005) y posiblemente con SURFACEN[®], ya que proviene de lavado pulmonar. Así por ejemplo la adición de SP-B a SURVANTA[®] hace que la fase fluida permanezca a una alta presión de superficie lo que se traduce en mejores propiedades tensioactivas durante la compresión y expansión dinámica (Ding y col., 2001). Asimismo Notter y col. (2002) muestran cómo la SP-B es crucial para las propiedades tensioactivas, incluyendo promover la adsorción interfacial, disminuir la tensión de superficie de forma dinámica y optimizar las curvas presión volumen durante ciclos de compresión-expansión. SURVANTA[®], al tener un 45 % menor en contenido de SP-B comparado al surfactante natural de origen, presenta una menor capacidad de adsorción, una tensión de superficie mínima mayor y un menor efecto en las curvas presión-volumen de animales deficientes en surfactante. Es interesante que la adición de SP-B al 0,05% a SURVANTA[®] no mejora estos indicadores, los cuales si fueron mejorados con la adición de 0,7 % de la proteína.

Hay evidencias de que los surfactantes de origen natural actualmente disponibles presentan diferencias importantes en sus efectos terapéuticos. La elección de un surfactante ideal puede estar también determinada por la búsqueda de un efecto terapéutico inmediato. Un ensayo clínico aleatorizado dirigido a recién nacidos con SDRN donde se emplearon dos surfactantes comerciales exógenos, BLES[®] y SURVANTA[®], no mostró diferencias aparentes en la respuesta al tratamiento, medida como mortalidad, días en los que se requirió ventilación o el desarrollo de enfermedades crónicas. Sin embargo, los infantes tratados con BLES[®] mostraron una respuesta clínica más rápida en términos de mejora del índice de oxigenación (Lam y col., 2005). Asimismo otro ensayo clínico comparativo entre CUROSURF[®] y SURVANTA[®] evidenció una menor fracción de oxígeno inspirado en pacientes tratados con CUROSURF[®] con relación a los tratados con SURVANTA[®] (Ramanathan y col., 2004). Resultados con SURFACEN[®] en un ensayo clínico comparativo con SURVANTA[®] realizado en neonatos

con SDRN mostraron que a los 5 minutos de administrado el producto hubo una mejor respuesta en la presión parcial de oxígeno en niños prematuros a los cuales se les administró SURFACEN[®] con relación al grupo que recibió SURVANTA[®] (comunicación personal). *El comportamiento superior de SURFACEN[®] con relación a CUROSURF[®] en las propiedades interfaciales que se han analizado en esta Tesis, junto con los resultados por Alonso y col. (2004) con SURVANTA[®] puede sustentar, al menos en parte, los resultados logrados en el ensayo clínico comparativo con SURFACEN[®].*

El componente lipídico mayoritario y esencial en las preparaciones de surfactante comerciales es la DPPC (Notter, 2000). Existen diferencias en su contenido, de manera que INFASURF[®] tiene un 40 % de DPPC, SURVANTA[®] un 70 % (Berharnd y col., 2000) CUROSURF[®] alrededor de un 35 % (Robertson y Curstedt, 1988 y Rüdiger y col., 2005) o un 56 % (Berharnd y col., 2000), BLES con un 41,6 % (Yu y col., 1983) y un 45 % en SURFACEN[®] (Manzanares y col., 1995). Un estudio referido por Holm y col. (1996) demuestran que mezclas de lípidos que contienen DPPC al 40 % en comparación con un 60 y 80 % presentan la isoterma presión-área más favorable con respecto a las obtenidas con mayor proporción de DPPC, sugiriendo que surfactantes con relativamente menores contenidos en DPPC pudieran servir como mejores surfactantes exógenos. *Estos resultados sustentan que a pesar de que la DPPC es el componente tensioactivo mayoritario en el surfactante, la eficiencia de este material para estabilizar la dinámica respiratoria es estrictamente dependiente del mantenimiento de la complejidad composicional y estructural completa del sistema. Teniendo en cuenta estos resultados podemos decir que la DPPC se encuentra probablemente en SURFACEN[®] en una proporción más adecuada si se compara con la proporción de DPPC en SURVANTA[®].*

Parece importante la presencia en el surfactante de una proporción suficiente de especies fosfolípídicas insaturadas. Esta fracción insaturada dota al sistema surfactante de la suficiente fluidez para desarrollar su papel dinámico en las diferentes estructuras en las que se interconvierte el surfactante en el ciclo metabólico alveolar. Un adecuado balance de especies saturadas e insaturadas sería además responsable de la organización lateral de las membranas

para generar la coexistencia de regiones ordenadas y desordenadas (Nag y col., 1998 y Bernardino de la Serna y col. 2004). Las regiones ordenadas, constituidas esencialmente por DPPC y una contribución importante del colesterol, serían las responsables de estabilizar las películas interfaciales a las más bajas tensiones superficiales, al final de la espiración. Las regiones más desordenadas y fluidas serían las directamente responsables de facilitar las transiciones bicapa-monocapa tanto durante la adsorción y formación de la película interfacial como durante los procesos de re-extensión de la película interfacial previamente comprimida, en las subsecuentes etapas de expansión, durante la inspiración. *Los resultados en esta Tesis muestran que SURFACEN[®] y CUROSURF[®] presentan coexistencia de dominios condensados con fase fluida, lo que está probablemente determinado en esencia por el contenido en DPPC y las especies insaturadas (Tabla 12). Esta coexistencia de fases ordenadas y desordenadas es probablemente de diferente carácter que la que se observa en el surfactante natural en presencia de un 5-10 % de colesterol, ya que la presencia de colesterol en SURFACEN[®] es de sólo alrededor del 1,3 % (Manzanares y col., 1995), siendo completamente nula su presencia en CUROSURF[®].*

Recientemente Rüdiger y col. (2005) han correlacionado la presencia de ciertas especies lipídicas minoritarias, por ejemplo la fracción de PL de ácidos grasos poli-insaturados (PL-PUFA), el colesterol, o los plasmalógenos, con la formación y sostenimiento del reservorio de surfactante asociado a la superficie activa (Schürch, 1995). Éstos lípidos parecen promover la formación de estructuras lipídicas de tipo fase hexagonal invertida (H_{II}) (Yeagle, 1986), como las que podrían requerirse para facilitar el tránsito de lípidos desde y hacia el reservorio interfacial. Por otra parte, muchas de estas especies lipídicas minoritarias podrían ser también importantes para mantener una baja viscosidad, lo que facilitaría el flujo y re-extensión del material tensioactivo a lo largo de todos los espacios alveolares. El estudio de Rüdiger y colaboradores encuentra diferencias significativas en cuanto a las características de viscosidad de CUROSURF[®], ALVEOFACT[®] y SURVANTA[®]. Las menores cantidades de plasmalógenos, PL-PUFA y colesterol de SURVANTA hacen que éste alcance la menor tensión superficial con una relativamente elevada viscosidad, mientras CUROSURF[®], con mayores concentraciones de PL-PUFA y plasmalógenos, puede alcanzar la menor tensión

Tabla 12. Patrón de insaturaciones totales de SURFACEN[®], CUROSURF[®] y SURVANTA[®] y de sus PC y PE.

Ácidos grasos (%)	SURFACEN [®]	CUROSURF ^{®1}	SURVANTA ^{®1}
Mono-insaturaciones	18,62	39,0	28,0
Poli-insaturaciones	7,24	26,0	6,0
Insaturaciones totales	25,86	68,0	34,0
PC			
Mono-insaturaciones	12,55	16,7	9,1
Poli-insaturaciones	2,0	9,8	1,2
Insaturaciones totales	14,55	24,17	10,3
PE			
Mono-insaturaciones	33,59	28,2	37,4
Poli-insaturaciones	11,16	40,0	15,4
Insaturaciones totales	44,75	68,2	52,8

¹ Rudiger y col., 2005

Los datos son expresados en % de la cantidad total de PL

superficial con una menor viscosidad. Es de destacar que CUROSURF[®] posee el mayor porcentaje de fosfolípidos con ácidos grasos mono-insaturados y poli-insaturados con relación a SURFACEN[®] y SURVANTA[®] (tabla 12). Este tipo de propiedades reológicas de los materiales surfactantes terapéuticos estarían también asociadas a la existencia en los surfactantes de un balance adecuado de fosfolípidos saturados e insaturados. *SURFACEN[®] podría contener en este sentido un equilibrio de especies saturadas/insaturadas cercano al natural, lo cual se asocia sin duda con el mejor comportamiento de sus propiedades interfaciales.* Estudios preliminares del comportamiento reológico de SURFACEN[®] a la concentración de 25 mg/mL mostraron que esta preparación presenta una baja viscosidad y exhibe un comportamiento aparentemente Newtoniano (datos no presentados), lo que sin duda es favorable para su aplicación por administración a los pacientes por vía endotraqueal.

Cada componente del surfactante tiene su propio papel, pero todos en su conjunto contribuyen a su función común. La PC es el componente principal en la disminución de la tensión superficial. Sin embargo, la PC sola no puede servir como un sustituto del surfactante pulmonar debido a que ésta no se extiende en la interfase aire-líquido rápidamente a la temperatura fisiológica. El PG y el PI, pero no otros PL aniónicos, tienen propiedades equivalentes en cuanto a promover buen comportamiento tensioactivo en el surfactante, probablemente por actuar en cooperación con las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C, que favorecen el tránsito de las moléculas tensioactivas desde las estructuras en bicapa en que se ensamblan y almacenan en los neumocitos, hasta la interfase aire-líquido respiratoria (Pérez-Gil y col., 1992 y Pérez-Gil y Keough, 1998). *SURFACEN[®] se caracteriza por presentar en su composición bioquímica el mayor contenido de PG que se haya informado para todos los surfactante exógenos comerciales y a su vez el mayor de PL aniónicos (Manzanares y col., 1995), esta particularidad puede contribuir a las mejores propiedades interfaciales de SURFACEN[®] registradas en esta tesis. Es de particular interés este elevado porcentaje ya que en pacientes con SDRA, la concentración de PG se encuentra disminuida (Gunther y col., 2001) por lo que una preparación con mayor contenido del mismo podría ser especialmente beneficiosa.*

SURVANTA[®], al igual que CUROSURF[®], se obtiene a partir de macerados de pulmón, por lo que son surfactantes con una proporción relativamente elevada en PG y contaminantes de las membranas, tales como PE, EM o LPC (Taeusch y col., 2002), los cuales no son considerados buenos agentes tensioactivos. En este sentido SURFACEN[®] presenta las menores concentraciones de estos contaminantes (Manzanares y col., 1995). A su vez, SURVANTA[®] está suplementado con DPPC, AP y TP, lo que puede acentuar aun más un comportamiento tensioactivo subóptimo comparado con el surfactante natural, como ha sido ya planteado por Notter (2000) quien sugiere que la adición de lípidos puede alterar la propiedad de los surfactantes de disminuir la tensión superficial a valores cercanos a cero en la compresión y de promover histéresis reproducibles en ciclos repetidos de expansión y compresión. *Los resultados de la presente Tesis en cuanto a la comparación de las propiedades interfaciales de SURFACEN[®] y CUROSURF[®] pueden estar también relacionados con una mayor presencia de PL contaminantes de membrana en CUROSURF[®] (Taeusch y col., 2002).*

Los pocos surfactantes enteramente sintéticos ensayados hasta ahora, como es el caso de EXOSURF[®] y ALEC[®], contienen esencialmente DPPC y PG, con una mayor proporción de DPPC en comparación a los naturales, aproximadamente un 40 % más. Estos surfactantes han resultado ser poco efectivos en la terapia de enfermedades respiratorias (Anzueto y col., 1996 y Ainsworth y col., 2000) lo cual esta probablemente más relacionado con la ausencia de las proteínas hidrófobas en ellos.

Junto a su propiedad de disminuir la tensión superficial en el pulmón, el surfactante pulmonar tiene una función fundamental en la defensa pulmonar, aprovechando que se ubica sobre la superficie alveolar. Algunos de los componentes del surfactante pulmonar que resultan ser los responsables de la acción biofísica son los mismos que van a poseer propiedades relacionadas con la defensa pulmonar.

En cuanto al TNF α , la principal citoquina pro-inflamatoria, los surfactantes evaluados han mostrado la misma respuesta. *Los resultados con SURFACEN[®] confirman lo referido en la literatura al inhibir la producción de TNF α .* Tonks y col. (2001) demostraron que la DPPC

inhibe significativamente la liberación de $\text{TNF } \alpha$ en una línea de células monocíticas y sugirieron que el mecanismo por el cual se ejerce este efecto debe estar relacionado con la alteración de la fluidez de la membrana, además de que el componente fosfolípido inhibe tanto la actividad de la enzima NADPH oxidasa como la vía del PAF actuando a través de las enzimas biosintéticas asociadas a la membrana (Tonks y col., 2003).

La sepsis causada por microorganismos Gram negativos en pacientes con SDRA constituye la principal causa de mortalidad, por lo que el empleo de modelos animales que reproduzcan los aspectos fisiopatológicos del SDRA, es de vital importancia para completar la valoración de la actividad anti-inflamatoria de los surfactantes pulmonares. Los resultados con SURFACEN[®] evidencian sus propiedades anti-inflamatorias, puesto que resulta inhibir de forma significativa indicadores claves de la inflamación. *Los resultados con SURFACEN[®] coinciden con los obtenidos en el estudio del efecto de otros surfactantes tales como CUROSURF[®], que también han manifestado propiedades anti-inflamatorias* (Van Helden y col., 1998 y Wu y col., 2002) y que apoyan un papel protagonista de los lípidos y las proteínas hidrofóbicas. En este sentido se han obtenido resultados que sustentan el papel de las proteínas hidrófobas en la modulación de la función inmunológica. Epaud y col. (2003) utilizando ratones transgénicos encontraron que aquellos en los que se produce una sobreexpresión en los niveles de SP-B son los que tienen reducidos los niveles de células inflamatorias y de citoquinas pro-inflamatorias. A su vez se ha informado que la SP-C es capaz de unir y eliminar el LPS (Augusto y col., 2002 y 2003a).

SURVANTA[®] es capaz de inhibir la producción de óxido nítrico y el componente responsable es la SP-B, la cual ejerce su efecto a nivel de la óxido nítrico sintasa (Miles y col., 1999). También se ha informado que el CUROSURF[®] inhibe la expresión de la sPLA₂ en un modelo animal de daño agudo pulmonar y el mecanismo por el cual ejerce este efecto es a través de la disminución del $\text{TNF } \alpha$ (Wu y col., 2002).

Existe una estrecha relación entre los indicadores inflamatorios evaluados *in vitro* en esta Tesis y los procesos sépticos que ocurren en el pulmón. Así por ejemplo, la emigración de los

neutrófilos al sitio de inflamación aguda ocasionada por la *Escherichia coli* es mediada por una compleja adhesión de leucocitos (CD11/CD18). La molécula de adhesión ICAM-1 es un ligando endotelial inducible para CD11a/CD18 y para CD11b/CD18. Así, la endotoxina de *Escherichia coli* incrementa la expresión de ICAM-1 produciendo emigración a través de un mecanismo dependiente de CD18 en pulmón de conejo, y sugirieron que el mecanismo de adhesión puede ser regulado por la expresión de moléculas de adhesión endotelial. Durante los procesos de neumonías y daño agudo pulmonar existe un incremento en la expresión de ICAM-1, evidenciando que esta molécula constituye un marcador temprano de daño pulmonar (Burns y col., 1994). *Los resultados logrados con SURFACEN® muestran que es capaz de inhibir la expresión de ICAM-1.* Sin embargo, en la literatura se refieren pocos resultados y a su vez contradictorios en cuanto al comportamiento de los surfactantes y las moléculas de adhesión.

Los surfactantes exógenos manifiestan un comportamiento variable cuando se enfrentan a patógenos causantes de enfermedades pulmonares. *Los resultados en esta Tesis muestran que SURFACEN® posee propiedades antibacterianas intrínsecas frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.* En la actividad antibacteriana de las preparaciones de surfactantes parece tener una importante contribución el contenido en SP-B, y la presencia de péptidos anti-microbianos. La SP-B presenta homología secuencial con un péptido de reconocida actividad antibacteriana siendo capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* (Kaser y Skouters, 1997). Considerando que el contenido en SP-B en las diferentes preparaciones de surfactante es muy variable (Bernhard y col., 2000 y Taeusch y col., 2002), parece justificado que aquellos surfactantes con menor contenido en SP-B, como es el caso de SURVANTA®, sean menos efectivos como agentes antipatogénicos. La presencia adicional de péptidos antimicrobianos ha sido confirmada en el surfactante porcino CUROSURF® (Harwig y col., 1995 y Wang y col., 1999). Por otra parte se ha informado que la DPPC es capaz de reducir la toxicidad celular asociada a las citolisinas producidas por *Streptococcus del grupo B* (Nizet y col., 2002). Los resultados de la presente tesis muestra que la DPPC, no solo inhibe el *Streptococcus del grupo B* sino además puede exhibir este efecto en otros microorganismos, a su vez se informa el efecto antimicrobiano del PG. Sin embargo, no todas las preparaciones de

surfactante inhiben el crecimiento de este patógeno, de manera que puede inferirse que en lo que se refiere a esta actividad, el comportamiento de la DPPC depende del contexto composicional de cada surfactante particular.

El análisis de los ácidos grasos del principal componente PL, la PC de SURFACEN[®] (tabla 12) y los de CUROSURF[®] referidos por Rüdiger y col. (2005) muestra que la PC de SURFACEN[®] posee un 14,55 % de PUFA mientras que la de CUROSURF[®] posee un 24,17 %. Asimismo el contenido de PUFA en la PC de SURFACEN[®] es de 2 % siendo de un 9,8 % para la de CUROSURF[®]. El surfactante pulmonar endógeno se caracteriza por un contenido relativamente bajo de PL-PUFA (aproximadamente un 35 % del peso del surfactante), lo que está asociado con su función. Sin embargo este porcentaje no escapa a la peroxidación lípida debido a que el pulmón está expuesto a estrés oxidativo asociado a la inhalación del oxígeno presente en el aire, a la exposición a trazas de metales y a otros componentes en la contaminación ambiental. *El menor porcentaje de insaturaciones encontrado en las fosfatidilcolinas de SURFACEN[®] en comparación con CUROSURF[®] puede sugerir que SURFACEN[®] estaría menos expuesto al daño oxidativo, lo cual lo haría más eficiente en condiciones de inactivación del surfactante. Ello se sumaría a las mejores propiedades interfaciales evidenciadas por SURFACEN[®] en comparación con las de CUROSURF[®], lo que se deduce de los resultados de este trabajo.*

En el contexto del estrés oxidativo que ocurre en el SDRA el efecto antioxidante que pueda ejercer la SP-A reviste especial importancia en las enfermedades respiratorias de carácter inflamatorio. *Los resultados de esta Tesis muestran el efecto antioxidante de la SP-A porcina, comprendido en el intervalo fisiológico.*

Los estudios llevados a cabo en esta Tesis demuestran por primera vez los cambios en la composición de los lípidos de SURFACEN[®], así como en mitocondrias y microsomas de pulmón sometidos a condiciones de estrés oxidativo, manifestado en una disminución de los ácidos grasos poli-insaturados. Las alteraciones que tienen lugar en la composición de los ácidos grasos de mitocondrias y microsomas juegan un papel importante en los mecanismos

de daño celular. Asimismo la peroxidación de los ácidos grasos de los PL del surfactante pulmonar conlleva a una alteración potencialmente importante de las propiedades estructurales y funcionales de las membranas y películas tensioactivas. Es importante destacar que la composición de ácidos grasos de SURFACEN[®] difiere de la de las membranas mitocondriales y microsomales, como se ha visto en los análisis de composición de estas membranas. SURFACEN[®] contiene un $69,67 \pm 1,5$ % de PUFA, principalmente ácido palmítico, y solamente $7,25 \pm 0,37$ % de PUFA, mientras que los microsomas y mitocondrias de pulmón de rata contienen $24,95 \pm 4,04$ % y $28,59 \pm 2,87$ % de PUFA, respectivamente. Estos resultados sugieren que la SP-A porcina es capaz de ejercer protección no solamente al sistema surfactante, sino que potencialmente puede ampliar su acción a las mitocondrias y microsomas del pulmón.

El mecanismo por el cual la SP-A reduce la peroxidación lipídica no está bien establecido. Estudios dirigidos por McCormack revelan que la SP-A puede limitar la reacción en cadena de los radicales libres por actuar como secuestrador de radicales peroxil lipídicos, y por tanto bloquear la peroxidación lipídica protegiendo los ácidos grasos poli-insaturados del daño oxidativo (McCormack, 1998). *Los resultados del presente trabajo contribuyen a la comprensión de los mecanismos de acción de la SP-A al sugerir que la proteína actúa como secuestrador de radicales hidroxilos e hipocloroso y que presenta una posible actividad quelante de hierro.* En las células pulmonares la SP-A puede tener un efecto similar al observado sobre mitocondrias y microsomas, protegiendo del efecto citotóxico producido durante el estrés oxidativo a las membranas pulmonares, donde los hidroperóxidos de ácidos grasos pueden estar presentes.

La aplicación terapéutica de las preparaciones de surfactante dirigidas a pacientes con SDRA han transitado por informe de casos, tratamientos clínicos no controlados y pequeños y estudios clínicos controlados, aleatorizados y multicéntricos. Informes de caso demostraron que la administración de preparaciones de surfactante exógeno administrado a pacientes con severo SDRA resultó en un mejoramiento inmediato de la oxigenación y la radiología (Spragg y col., 1994). Subsecuentes ensayos donde se involucran un mayor número de pacientes

confirmaron estas observaciones (Willson y col., 1996). Posteriormente se han realizado ensayos clínicos controlados, aleatorizados y multicéntricos para conocer si este tratamiento puede influir en indicadores más relevantes como días sin ventilación o la mortalidad. En este sentido se han realizado tres ensayos clínicos relevantes. En un primer estudio con EXOSURF[®], no se obtuvieron diferencias en la respuesta fisiológica, en los días sin ventilación y la mortalidad (Anzueto y col., 1996). Posteriormente se realizó un ensayo clínico de fase II en el cual se empleo SURVANTA[®], que permitió detectar diferencias en la mortalidad a favor del grupo tratado (Gregory y col., 1997). Sin embargo, posteriores ensayos clínicos no han mostrado diferencias significativas en los indicadores mencionados, como por ejemplo en un ensayo clínico de fase III con el surfactante recombinante VENTICUTE (Spragg y col., 2003). No obstante es interesante destacar que un análisis *post hoc* demostró diferencias en la mortalidad en el grupo de pacientes con daño directo producido por agentes tales como neumonías o aspiración. De estos resultados se infiere que un surfactante natural como es SURVANTA[®] presenta mayores posibilidades de ser eficaz en enfermedades respiratorias más complejas en comparación con los sintéticos. Un estudio en animales de experimentación evidenció que el BLES[®] era capaz de lograr una mejor respuesta en el intercambio gaseoso en comparación con SURVANTA[®] (Lewis y col., 1996) corroborando la ventaja de los surfactantes obtenido de lavados sobre los producidos a partir de tejido pulmonar triturado.

Las diferencias mencionadas en lo que se refiere a los resultados clínicos (SDRN y SDRA) sugieren que el diseño y optimización de preparaciones tensioactivas mejoradas, más semejantes a los complejos de surfactante natural que las actuales preparaciones de uso clínico, es factible. La utilización de mejores preparaciones podría ofrecer mayores posibilidades terapéuticas al tratamiento de enfermedades pulmonares, donde dichas diferencias deben quedar más manifiestas en aquellas enfermedades respiratorias donde la inflamación y el estrés oxidativo suponen elementos adicionales de reducción de la cantidad de material surfactante operativo disponible.

Aunque aún no está todavía claro si la mortalidad del SDRA pueda ser reducida con la terapia con surfactante, sí está claro que mejora la oxigenación, mejora la *compliance* pulmonar y disminuye la necesidad de soporte ventilatorio. A su vez hay que tener presente que la efectividad de una preparación de surfactante depende de muchos factores además de su composición bioquímica en lo que se refiere a la proporción de fosfolípidos de mayor capacidad tensioactiva o al porcentaje de proteínas. El número de dosis de surfactante exógeno aplicadas, la técnica utilizada para su administración o la presencia o no de sustancias inactivantes en las vías aéreas son elementos adicionales que van a influir en la respuesta al surfactante exógeno (Lewis y Veldhuizen, 2003). Por tanto se necesitan estudios más extensos para dilucidar estos aspectos, así como profundizar en el estudio de la función del surfactante en la regulación inmune del pulmón.

Los resultados de esta Tesis, tanto en las propiedades biofísicas como en las anti-inflamatorias y antibacterianas, permiten proponer que SURFACEN[®] es una preparación potencialmente útil para el tratamiento de pacientes con SDRA, por otra parte su enriquecimiento con SP-A permitirá disponer de una preparación farmacéutica más eficiente. Los datos brindados son de vital importancia teniendo en cuenta que no se dispone a nivel internacional de una terapia definitiva y por tanto Cuba se ubica entre los pocos países del mundo que puede disponer de este tipo de preparación farmacéutica y que por demás constituye un reclamo a nivel estatal, lo cual servirá sin duda, como una terapia complementaria necesaria para este tipo de pacientes.

7. CONCLUSIÓN GENERAL.

7. CONCLUSIÓN GENERAL

- Se comprueba que SURFACEN[®] posee cualidades biofísicas, anti-inflamatorias y antibacterianas que lo hacen un buen candidato como medicamento a evaluar en ensayos clínicos del Síndrome de Distres Respiratorio Agudo. A la vez que la adición de la SP-A puede resultar conveniente para la innovación futura de SURFACEN[®].

8. RECOMENDACIONES.

8. RECOMENDACIONES

1. Iniciar los ensayos clínicos con SURFACEN[®] dirigidos a pacientes con SDRA.
2. Desarrollar investigaciones tendientes a disponer de una SP-A apta para los fines de innovar el producto.
3. Continuar profundizando en los siguientes aspectos:

Caracterización de la composición bioquímica de SURFACEN, específicamente de las especies moleculares de la fosfatidilcolina y de los lípidos minoritarios, así como su relación con las propiedades interfaciales y morfológicas.

Corroborar los hallazgos del efecto antibacteriano de SURFACEN en modelos de infección *in vivo*.

Valorar la eficacia de la mezcla SURFACEN-SP-A porcina en el tratamiento del daño agudo pulmonar en un modelo *in vivo*.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Ahuja A, Oh N, Chao W, Spragg RG y Smith RM. Inhibition of the human neutrophil respiratory burst by native and synthetic surfactant. *Am J Resp Cell Mol.* 1996; 14: 496-503.
- Ainsworth SB, Beresford MW, Milligan DWA, Shaw NJ, Matthews JNS, Fenton AC y Ward Platt MO. Pumactant and poractant alfa for treatment of respiratory distress syndrome in neonates born at 25-29 weeks gestation: a randomized trial. *Lancet.* 2000; 335: 1387-92.
- Allen JN, Moore SA, Pope-Harman AL, Marsh CB y Wewers MD. Immunosuppressive properties of surfactant and plasma on alveolar macrophages. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 356-69.
- Alonso C, Alig T, Yoon J, Bringezu F, Warriner H y Zasadzinski J. More than a monolayer: relating lung surfactant structure and mechanics to composition. *Biophys J.* 2004; 87: 4188-202
- Amirkhanian JD y Merritt TA. Inhibitory effects of oxyradicals on surfactant function: utilizing in vitro Fenton reaction. *Lung.* 1998; 176: 63-72.
- Ansfield MJ, Kaltreider HB, Benson BJ y Caldwell JL. Immunosuppressive activity of canine pulmonary surface active material. *J Immunol.* 1979; 122: 1062-66.
- Antal JM, Devis LT, Erzarum SC, Winedemann HP y Thomasse MJ. Surfactant suppresses NF-KB activation in human monocyte cells. *Am J Resp Cell Mol.* 1996; 14: 374-79.
- Anzueto A, Baughman RP, Guntupalli KK, Weg JC, Wiedemann HP, Raventos AA, Lemaire F, Long W, Zaccardelli DS y Pattishall EN. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1417-21.
- Arbibe L y Touqui L. Generation of lyso-phospholipids 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; 102: 1152-60.

- Aruoma OI. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods Enzymol.* 1994; 23: 57-66.
- Aruoma OI. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radical Biol Med.* 1996; 20: 675-705.
- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL y Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet.* 1967; 2: 319-23.
- Asti C, Ruggieri V, Porzio S, Chiusaroli R, Melillo G y Caselli GF. Lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. I. Concomitant evaluation of inflammatory cells and haemorrhagic lung damage. *Pulm Pharmacol Ther.* 2000; 13: 61-69.
- Augusto LA, Blay KL, Auger G, Blanot D y Chaby R. Interaction of bacterial lipopolysaccharide with mouse surfactant protein C inserted into lipid vesicles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 281: 776-85.
- Augusto LA, Li J, Synguelakis M, Johansson J y Chaby R. Structural basis for interactions between lung surfactant protein C and bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 2002; 277: 23484-92.
- Augusto LA, Synguelakis M, Espinassous Q, Lepoivre M, Johansson J y Chaby R. Cellular antiendotoxin activities of lung surfactant protein C in lipid vesicles. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003(a); 168: 335-41.
- Augusto LA, Synguelakis M, Johansson J, Pedron T, Girard R. y Chaby R. Interaction of Pulmonary Surfactant Protein C with CD14 and Lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 2003(b); 71: 61-67.
- Avery ME y Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child.* 1959; 97: 517-23.
- Banerjee R. y Bellare J R. Scoring of surface parameters of physiological relevance to surfactant therapy in respiratory distress syndrome. *J Appl Physiol.* 2001; 90: 1447-54.
- Bangham A, Morley C y Phillips M. The physical properties of an effective lung surfactant. *Biochim Biophys Acta.* 1979; 573: 552-56.
- Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radical Bio Med.* 1990; 9: 235-43.
- Baur FM, Brenner B, Goetze-Speer B, Neu S y Speer CP. Natural porcine surfactant (Curosurf) down-regulates mRNA of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF-

- alpha type II receptor in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *Pediatr Res*. 1998; 44: 32-36.
- Benson BJ, Williams MC, Sueishi K, Goerke J y Sargeant T. Role of calcium ions in the structure and function of pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta*. 1984; 793: 18-27.
- Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A y Spragg R. The American–European Consensus Conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 149: 818-24.
- Bernardino de la Serna J, Perez-Gil J, Simonsen A y Bagatolli L. Cholesterol rules direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures. *J Biol Chem*. 2004; 279, 39: 40715–22.
- Bernhard W, Mottaghian J, Gebert A, Rau G, Von der Hardt H y Poets Ch. Commercial versus native surfactants surface activity, molecular components, and the effect of calcium. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 1524-33.
- Bi X, Flach CR, Perez-Gil J, Plasencia I, Andreu D, Oliveira E y Mendelsohn R. Secondary structure and lipid interactions of the N-terminal segment of pulmonary surfactant SP-C in Langmuir films: IR reflection-absorption spectroscopy and surface pressure studies. *Biochemistry*. 2002; 41: 8385-95.
- Blanco O, Sánchez J, Manzanares D y Fernández O. Isolation of surfactant protein A, SP-A, from bronchoalveolar porcine lavage. *Rev Salud Anim*. 2000; 22. 180-82.
- Blau H, Riklis S, VanIwaarden JF, McCormack FX y Kalina M. Nitric oxide production by rat alveolar macrophages can be modulated in vitro by surfactant protein A. *Am J Physiol* 1997; 272: 1198-204.
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Med Sci*. 1959; 37: 911-17.
- Bloom B, Kattwinkel J, Hall R, Delmore P, Egan E, Trout J y col. Comparison of Infasurf (Calf Lung Surfactant Extract) to Survanta (Beractant) in the treatment and prevention of respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1997; 100: 31-8.
- Borron P, McIntosh JC, Korfhagen TR, Whitsett JA, Taylor J y Wright JR. Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production "in vivo". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 278: 840-47.

- Bouhafs RK y Jarstrand C. Lipid peroxidation of lung surfactant by bacteria. *Lung*. 1999; 177: 101-10.
- Brackenburg AM, Puligandla PS, McCaig LA, Nikore V, Yao L, Veldhuizen RW y Lewis JF. Evaluation of Exogenous Surfactant in HCl-induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163: 1135-42.
- Bridges JP, Davis HW, Damodarasamy M, Kuroki Y, Howles G, Hui DY y McCormack FX. Pulmonary surfactant proteins A y D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury. *J Biol Chem*. 2000; 275: 38848-55.
- Brogden KA, De Lucca AJ, Bland J y Elliot S. Isolation of a bovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93: 412-16.
- Buege JA y Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Method. Enzymol*. 1978; 30: 301-10.
- Burns AR, Takei F y Doerschuk CM. Quantitation of ICAM-1 expression in mouse lung during pneumonia. *J Immunol*. 1994; 153: 3189-3198.
- Campbell H, Bosma K, Brackenburg A, McCaig L, Yao LJ, Veldhuizen R Y Lewis J. Polyethylene glycol (PEG) attenuates exogenous surfactant in lung-injury adult rabbits. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165: 475-80.
- Chiesi Farmaceutici Chiesi Farmaceutici. Curosurf Package Insert. Package Insert; NDA 20-744: 1-7.
- Cifuentes J, Ruiz-Oronoz J, Myles C, Nieves B, Carlo WA y Matalon S. Interaction of surfactant mixtures with reactive oxygen and nitrogen species. *J Appl Physiol*. 1995; 78: 1800-05.
- Clements JA. Surface tension of lung extracts. *Proc Exp Biol Med*. 1957; 93: 170-72.
- Clements JA. Functions of the alveolar lining. *Am Rev Respir Dis*. 1977; 115: 67-71.
- Clements JA. Lung surfactant compositions. Inventors; Regents of the University California, assignee. *US patent 4,312,860*. 1982 January 26.
- Cochrane CG y Revak SD. Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. *Science*. 1991; 254: 566-68.
- Cockshutt AM, Weitz J y Possmayer F. Pulmonary surfactant-associated protein A enhances the surface activity of lipid extract surfactant and reverses inhibition by blood proteins in vitro. *Biochemistry*. 1990; 29: 8424-29.

- Coonrod JD y Yoneda K. Detection and partial characterization of antibacterial factors in alveolar lining material of rats. *J Clin Invest.* 1983; 71: 129-41.
- Corteling R, Wyss D y Trifilieff A. In vivo models of lung neutrophil activation. Comparison of mice and hamsters. *BMC Pharmacol.* 2002; 2: 1-10.
- Creuwels L, Van Golde LMG y Haagsman HP. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects (Review). *Lung.* 1997; 175: 1-39.
- Crockett-Torab E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukocyte Biol.* 1998; 63: 1-13.
- Crouch E y Wright J. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defence. *Annu Rev Physiol.* 2001; 63: 521-54.
- Cruz A, Casals C y Pérez-Gil J. Conformational flexibility of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C, studied in aqueous organic solvents. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1255: 68-76.
- Cruz A, Casals C, Keough KM y Pérez-Gil J. 1997. Different modes of interaction of pulmonary surfactant protein SP-B in phosphatidylcholine bilayers. *Biochem J.* 1997; 327: 133-38.
- Cruz A, Casals C, Plasencia I, Marsh D y Pérez-Gil J. Depth profiles of pulmonary surfactant protein B in phosphatidylcholine bilayers, studied by fluorescence and electron spin resonance spectroscopy. *Biochemistry.* 1998; 37: 9488-96.
- Cruz A, Worthman LA, Serrano AG, Casals C, Keough KM y Pérez-Gil J. Microstructure and dynamic surface properties of surfactant protein SP-B/dipalmitoylphosphatidylcholine interfacial films spread from lipid-protein bilayers. *Eur Biophys J.* 2000; 29: 204-13.
- Cruz A, Vazquez L, Vélez M y Pérez-Gil J. Effect of pulmonary surfactant protein SP-B on the micro- and nanostructure of phospholipid Films. *Biophys J.* 2004; 86: 308-320.
- Daguet GL y Chabbert VA. Técnicas en Bacteriología *Editorial JIMS.* 1977; 3: 135-53.
- Dietch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potencial future therapy. *Ann Surg.* 1992; 216: 117-34.
- Ding J, Takamoto DY, Nahmen A von, Lipp MM, Lee KY, Waring AJ y Zasadzinski JA. Effects of lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, and palmitic acid on monolayer stability. *Biophys J.* 2001; 80: 2262-72.

- Ding J, Doudevski I, Warriner HE, Aling T, Zasadzinski J, Waring AJ y Sherman MA. Nanostructure changes in lung surfactant monolayers induced by interactions between palmitoyloleoylphosphatidylglycerol and surfactant protein B. *Langmuir*. 2003; 19: 1539-1550.
- Discher BM, Maloney KM, Schief Jr WR, Grainger DW, Vogel V y Hall SB. Lateral phase separation in interfacial films of pulmonary surfactant. *Biophys J*. 1996; 71: 2583-90.
- Discher BM, Schief WR, Vogel V y Hall SB. Phase separation in monolayers of pulmonary surfactant phospholipids at the air-water interface: composition and structure. *Biophys J*. 1999; 77: 2051-61.
- Dluhy RA, Reilly KE, Hunt RD, Mitchell ML, Mautone AJ y Mendelsohn R. Infrared spectroscopic investigations of pulmonary surfactant. Surface film transitions at the air-water interface and bulk phase thermotropism. *Biophys J*. 1989, 56: 1173-81.
- Doran KS, Chang JCW, Benoit VM, Eckmann y Nizet V. Group B streptococcal β -Hemolysin/Cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *J Infect Dis*. 2002; 185: 196-203.
- Dunbar AE, Wert SE, Ikegami M, Whitsett JA, Hamvas A, White FV, Piedboeuf B, Jobin C, Guttentag S y Noguee LM. Prolonged survival in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency associated with a novel splicing mutation. *Pediatr Res*. 2000; 48: 275-82.
- Ebel H, Grabitz P y Heimburg T. Enthalpy and volume changes in lipid membranes. I. The proportionality of heat and volume changes in the lipid melting transition and its implication for the elastic constants. *J Phys Chem B*. 2001; 105: 7353-60.
- Engstrom PC, Holm BA y Matalon S. Surfactant replacement attenuates the increase in alveolar permeability in hypoxia. *J Appl Physiol*. 1989; 67: 688-93.
- Enhörning G. Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *J Appl Physiol*. 1977; 43: 198-203.
- Enhörning G. Pulmonary surfactant function studied with the pulsating bubble surfactometer (PBS) and the capillary surfactometer (CS). *Comp Biochem Phys A*. 2001; 129: 221-26.
- Epaud R, Ikegami M, Whitsett JA, Jobe AH, Weaver TE y Akinbi HT. Surfactant protein B inhibits endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003; 28: 373-78.
- Faggioni R, Gatti S, Dimitri MT, Delgado R, Echtenacher B, Gnocchi P, Heremans H y

- Ghezzi P. Role of xanthine oxidase and reactive oxygen intermediates in LPS- and TNF-induced pulmonary edema. *J Lab Clin Med.* 1994; 173: 1305-10.
- Freeman BA y Crapo JD. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem.* 1981; 256: 10986-92.
- Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y y Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet.* 1980; 1: 55-59.
- Füll M, Garlt C y Lippman R. Klinische Labor Diagnostik. *Hirsel Verlag Leipzig (Ed.).* 1981: 68-69.
- Geertsman MF, Nibbering PH, Haagsman HP, Daha MR y Van Furth R. Lung surfactant suppresses oxygen-dependent bactericidal functions of human blood monocytes by inhibiting the assembly of the NADPH oxidase. *J Immunol.* 1993; 150: 2391-2400.
- Gillard N, Heldt GP, Loredó J, Gasser H, Redl H, Merritt TA y Spragg RG. Exposure of hydrophobic components of porcine lung surfactant to oxidant stress alters surface tension properties. *J Clin Invest.* 1994; 93: 2608-15.
- Glasser SW, Korfhagen TR, Wert SE y Whisett JA. Transgenic models for study of pulmonary development and disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1994; 267: 489-97.
- Glasser SW, Burhans MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, Ikegami M Y Whisett JA. Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 6366-71.
- Goerke J y González J. Temperature dependence of dipalmitoylphosphatidylcholine monolayer stability. *J Appl Physiol.* 1981; 51: 1108-14.
- Goerke J y Clements JA. Alveolar surface tension and lung surfactant. In *Handbook of Physiology, Section 3: The Respiratory System, Vol. III: Mechanics of Breathing (Part I).* A. P. Fishman, editor. American Physiological Society, Bethesda, MD. 1986; 247-61.
- Goerke J. Surfactant and lung mechanics in "Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice". B Robertson, LMG van Golde, Batenburg JJ (Eds) Elsevier, Amsterdam. 1992; 165-92.
- Goerke J. Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1408: 79-89.

- Goldblum SE, Wu KM y Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbit. *J Appl Physiol*. 1985; 59: 1978-85.
- Gongalves de Moraes VL, Bargaftig BB, Lefort J, Mearger A y Chignard M. Effect of cyclooxygenase inhibitors and modulation of cyclic AMP formation on lipopolysaccharide-induced neutrophil infiltration in mouse lung. *Br J Pharmacol*. 1996; 117: 1792-96.
- Goode HF y Webster NR. Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit Care Med*. 1993; 21: 1770-76.
- Gregory TJ, Steinberg KP, Spragg R, Gadek, JE, Hyers, TM, Longmore, WT, Moxley, MA, Cai, GZ, Hite, RD, Smith, R, Hudson, LD, Crim, C., Newton, P, Mitchell, BR y Gold, A. Bovine surfactant therapy for patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155: 1309–15.
- Gunther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, Temmesfeld B, Walmrath D, Morr H y Seeger W. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care*. 1996; 153: 176–84.
- Gunther A, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walmrath D y Seeger W. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res* 2001; 2: 353–64.
- Gunther A, Schmidt R, Harodt J, Schmehl, D. Walmrath, C. Ruppert, F. Grimminger F y Seeger W. Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic shock: impact on biophysical and biochemical surfactant properties. *Eur Respir J*. 2002; 19: 797–804.
- Gustafsson M, Palmblad M, Curstedt T, Johansson J y Schurch S. Palmitoylation of a pulmonary surfactant protein C analogue affects the surface associated lipid reservoir and film stability. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1466: 169-78.
- Haddad IY, Ischiropoulos H, Holm BA, Beckman JS, Baker JR y Matalon S. Mechanisms of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants. *Am J Physiol*. 1993; 265: 555-64.
- Halliwell B y Gutteridge, JMC. Rol of Free Radicals and catalytic metal ion in human diseases: an overview. *Meth Enzymol*. 1990; 186: 1-85.

- Hallman M, Spragg R, Harell JH, Moser KM y Gluck L. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. *J Clin Invest*. 1982; 70: 673–83.
- Hallman M, Massilta P, Sipila I y Tahvanainen J. Composition and function of pulmonary surfactant in adult respiratory distress syndrome. *Eur Respir J*. 1989; 3: 104-08.
- Hamvas A, Cole FS, deMello DE, Moxley M, Whitsett JA, Colten HR y Noguee LM. Surfactant protein B deficiency: antenatal diagnosis and prospective treatment with surfactant replacement. *J Pediatr*. 1994; 125: 356-61.
- Harris JD, Jackson F, Moxley MA y Longmore WJ. Effect of exogenous surfactant instillation on experimental acute lung injury. *J Appl Physiol*. 1989; 66: 1846-51.
- Harwig SSL, Kokryakov VN, Swiderek KM, Aleshina GM, Zhao C y R.Lehrer RI. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Lett*. 1995; 362: 65-69.
- Hawgood, S, Benson BJ, Schilling J, Damm D, Clements A y White RT. Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP-18 and evidence for cooperation between SP 18 and SP 28-36 in surfactant lipid adsorption. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84: 66-70.
- Hawgood S, Derrick M y Poulain F. Structure and properties of surfactant protein B *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1408: 150–60.
- Häfner D, Beume R, Kilian U, Krasznai G. and Lachmann B. Dose-response comparisons of five lung surfactant factor (LSF) preparations in an animal model of adult respiratory distress syndrome (ARDS). *Br J Pharmacol*. 1995; 115: 451-8
- Hecht M, Bälder H, Muhle H y Emmendorffer A. Development of a rat model to investigate inflammatory reactions of the lung. *Workshop N. Infect Immun*. Abstract N.10. 1999.
- Heffner JE y Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis*. 1989; 140: 531-54.
- Herting E, Jarstrand C, Rasool O, Curstedt T, Sun B y Robertson B. Experimental neonatal group B streptococcal pneumonia: effect of a modified porcine surfactant on bacterial proliferation in ventilated near-term rabbits. *Pediatr Res*. 1994; 36: 784-91.
- Hickling TP, Malhotra R y Sim RB. Induction of TNF-alpha release from human buffy coat cells by *Pseudomonas aeruginosa* is reduced by lung surfactant protein A. *FEBS Lett*. 1998; 437: 65-69.

- Hickman-Davis JM, Lindsey JR, Zhu S y Matalon S. Surfactant protein A mediates mycoplasmacidal activity of alveolar macrophages. *Am J Physiol*. 1998; 274: 270-77.
- Holm BA. Surfactant inactivation in adult respiratory distress syndrome in Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice. *Robertson, LMG van Golde, Batenburg JJ (Eds) Elsevier, Amsterdam*. 1992: 665-84.
- Holm BA, Wang Z, Egan EA y Notter RH. Content of dipalmitoyl phosphatidylcholine in lung surfactant: ramifications for surface activity. *Pediatr Res*. 1996; 39: 805-11.
- Huang YT, Caminiti SP, Fawcett TA, Moon RE, Fracica PJ, Miller FJ y col. Natural surfactant and hyperoxic lung injury in primates: I. Physiology and biochemistry. *J Appl Physiol*. 1994; 76: 991-1001.
- Hudson LD y Steinberg KP. Epidemiology of Acute Lung Injury and ARDS. *Chest*. 1999; 116: 74S-82S.
- Ikegami M, Korfhagen TR, Whitsett JA, Bruno MD, Wert SE, Wada K y Jobe AH. Characteristics of surfactant from SP-A-deficient mice. *Am J Physiol*. 1998; 275: 247-54.
- Ito Y, Goffin J, Veldhuizen R, Joseph M, Bjarneson D y col. Timing of exogenous surfactant administration in a rabbit model of acute lung injury. *J Appl Physiol*. 1996; 80: 1357-64.
- Johansson J. Structure and properties of surfactant protein C. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1408: 161-72.
- Jonsson S, Musher D, Goree A y Lawrence EC. Human alveolar lining material and antibacterial defenses. *Am Rev Respir Dis*. 1986; 133: 136-40.
- Juergens JA, Rogers RM, McCurdy JB y Cook WW. Enhancement of bactericidal capacity of alveolar macrophages by human alveolar lining material. *J Clin Invest*. 1976; 58: 271-75.
- Kahn M, Anderson G, Amyan W, Hall S. Phosphatidylcholine molecular species of calf lung surfactant. *Am J Physiol* 1995; 13: L567-73.
- Kamp DW, Graceffa P, Pryor WA y Weitzman SA. The role of free radicals in asbestos induced diseases. *Free Radical Bio*. 1992; 12: 293-315.
- Kaser MR y Skouters GG. Inhibition of bacterial growth by synthetic SP-B1-78 peptides. *Peptides*. 1997; 18: 1441-44.

- Keough KMW, Farrel E, Cox M, Harrel G y Taeusch HW. Physical, chemical and physiological characteristics of isolates of pulmonary surfactant from adult rabbits. *Can J Physiol Pharm.* 1985; 63: 1043-51.
- King RJ y Clements JA. Surface active material from dog lung. II. Compositions and physiological correlations. *Am J Physiol* . 1972; 223: 86-101.
- Kinnula VL; Crapo JD y Raivio KO. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest.* 1995; 73: 3-19.
- Knebel D, Sieber M, Reichelt R, Galla HJ y Amrein M. Scanning force microscopy at the air-water interface of an air bubble coated with pulmonary surfactant. *Biophys J.* 2002; 82: 474–80.
- Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, Wert SE, Stripp BR, Morris RE, Glasser SW, Bachurski CJ, Iwamoto HS y Whitsett JA. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 9594-99.
- Korfhagen T R, LeVine AM y Whitsett JA. Surfactant protein A (SP-A) gene targeted mice. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1408: 296-302.
- Kramer, A., Wintergalen, A., Sieber, M., Galla, H. J., Amrein, M. y Guckenberger, R. Distribution of the surfactant-associated protein C within a lung surfactant model film investigated by near-field optical microscopy. *Biophys J.* 2000; 78: 458-65.
- Kramer BW y Speer CP. Surfactant proteins A and D: major factors of the immune response of the lung. *Z Geburtsh Neonatol.* 2003; 207: 41-7.
- Kremlev SG y Phelps DS. Effect of SP-A and surfactant lipids on expression of cell surface markers in the THP-1 monocytic cell line. *Am J Physiol.* 1997; 272: 1070-77.
- Kuroki Y y Akino T. Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Biol Chem.* 1991; 266: 3068-73.
- Kuzmenko AI, Wu H, Bridges JP y McCormack FX. Surfactant protein oxidation: Surfactant lipid peroxidation damages surfactant protein A (SP-A) and inhibits interactions with phospholipid vesicles. *J Lipid Res.* 2004; 45: 1061-68.
- Lam BC, Ng YK y Wong KY. Randomized trial comparing two natural surfactants (Survanta vs. bLES) for treatment of neonatal respiratory distress syndrome. *Pediatr Pulm.* 2005; 39: 64-9.

- Lamm WJE y Albert RK. Surfactant replacement improves lung recoil in rabbit lungs after acid aspiration. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142: 1279-83.
- Lesur O, Berthiaume Y, Blaise G, Damas P, Deland E, Guimond JG y Michel RP. Acute respiratory distress syndrome: 30 years later. *Can Respir J*. 1999; 6: 71-86.
- Lewis JF y Jobe AH. Surfactant and the Adult Distress Respiratory Syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147: 218-33.
- Lewis JF, Goffin J, Yue P, McCaig LA, Bjarneson D y Veldhuizen R. Evaluation of exogenous surfactant treatment strategies in an adult model of acute lung injury. *J Appl Physiol*. 1996; 80: 1156-64
- Lewis JF y Veldhuizen R. The role of exogenous surfactant in the treatment of acute lung injury. *Annu Rev Physiol*. 2003; 65: 613-42.
- Li XY, Donaldson K y Macnee W. Lipopolysaccharide-induced alveolar epithelial permeability. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157: 1027-33.
- López-Herce J, Lucas N, Carrillo A, Bustinza A, Moral R. Surfactant treatment for acute respiratory distress syndrome. *Arch Dis Child*. 1999; 80: 248–52.
- Lowry OH, Rosenbrough NR, Farr AI y Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-75.
- Lutz C, Carney D, Finck C, Picone A, Gatto LA, Paskanik A et al. Aerosolized Surfactant Improves Pulmonary Function in Endotoxin-induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158: 840-45.
- Manzanares D, Mandina, T, Muñoz, MC, Díaz H, Gutiérrez M., Blanco O., Alfonso W y Fernández O. Efecto de la proteína asociada al surfactante SP-A en las características tensoactivas del surfactante pulmonar Surfacen. *Rev Salud Anim*. 1994; 16: 41-50.
- Manzanares D, Díaz E, Alfonso W, Escobar A, Colomé H, Muñoz MC, Noa M, Rabell S y Hidalgo A. Surfactante pulmonar porcino. 1995. República de Cuba, A 61 K 35-42
- Mark L e Ingenito EP. Surfactant function and composition after free radical exposure generated by transition metals. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1999; 276: 491-500.
- McConnell H. Structures and transitions in lipid monolayers at the air-water interface. *Annu Rev Phys Chem*. 1991; 42: 171-95.
- McCormack FX. Structure, processing and properties of surfactant protein A. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1408: 109-31.

- McIntosh JC, Mervin-Blake S, Conner E y Wright JR. Surfactant protein A protects growing cells and reduces TNF-alpha activity from LPS-stimulated macrophages. *Am J Physiol.* 1996; 15: 310-19.
- McMurchie EJ, Teubner JK y Gibson RA. Thermal phase transitions in sheep, rat and rabbit surfactant lipids detected by differential scanning calorimetry. *Comp Biochem Physiol A.* 1983; 74(2): 295-99.
- Merritt TA, Amirkhanian JD, Helbock H, Halliwell B y Cross CE. Reduction of the surface-tension-lowering ability of surfactant after exposure to hypochlorous acid. *Biochem J.* 1993; 295: 19-22.
- Miles PR, Bowman L, Rao KMK, Baatz JL and Huffman L. Pulmonary Surfactant inhibits LPS-induced nitric oxide by alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 1999; 276: L186-99.
- Möller J Ch, Schaible T, Roll C, Schiffmann J. H, Bindl L, Schrod L, Reiss I, Kohl M, Demirakca S, Hentschel R, Paul T, Vierzig A, Groneck P, von Seefeld H, Schumacher H, Gortner L. Treatment with bovine surfactant in severe acute respiratory distress syndrome in children: a randomized multicenter study. *Intensive Care Med* 2003; 29: 437-46.
- Morley CJ, Bangham AD, Miller N. y col. Dry artificial lung surfactant and its effect on very premature babies. *Lancet* 1981; i:64-68.
- Morrow MR, Perez-Gil J, Simatos G, Boland C, Stewart J, Absolom D, Sarin V y Keough KM. Pulmonary surfactant associated protein SP-B has little effect on acyl chains in dipalmitoylphosphatidylcholine dispersions. *Biochemistry.* 1993; 32: 4397-4402.
- Nag K, Taneva SG, Perez-Gil J, Cruz A y Keough KM. Combinations of fluorescently labeled pulmonary surfactant proteins SPB and SP-C in phospholipid films. *Biophys J.* 1997; 72: 2638-50.
- Nag K, Perez Gil J, Ruano MLF, Worthman LAD, Stewart J, Casals C y Keough KMW. Phase transitions in films of lung surfactant at the air-water interface. *Biophys J.* 1998; 74: 2983-95.
- Nag K, Munro JG, Inchley K, Schurch S, Petersen NO y Possmayer F. SP-B refining of pulmonary surfactant phospholipidfilms. *Am J Physiol.* 1999; 277: 1179-89.

- Nag K, Pao JS, Harbottle RR, Possmayer F, Petersen NO y Bagatolli LA. Segregation of saturated chain lipids in pulmonary surfactant films and bilayers. *Biophys J.* 2002; 82: 2041-51.
- Neumeister B, Woerndle S y Bartmann P. Effects of different surfactant preparations on bacterial growth "in vitro". *Biol Neonate.* 1996; 70: 128-34.
- Nizet V. Streptococcal β -hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends Microbio.* 2002; 12: 575-80.
- Nogee, L. M., Garnier, G., Dietz, H. C., Singer, L., Murphy, A. M., deMello, D. E. y Colten, H. R. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest.* 1994; 93: 1860-3.
- Notter RH, Tabak SA y Mavis RD. Surface properties of binary mixture of some pulmonary surfactant components. *J Lipid Res.* 1980; 21: 10-22.
- Notter, R. H., E. A. Eagan, M. S. Kwong, B. A. Holm, and D. L. Shapiro. 1985. Lung surfactant replacement in premature lambs with extracted lipids from bovine lung lavage: effects of dose, dispersion technique and gestational age. *Pediatr. Res.* 19: 569-577.
- Notter RH. Physical chemistry and physiological activity of pulmonary surfactants. 1989 DL Shapiro, RH Notter (EDS) AR Liss, Amsterdam.
- Notter RH. Lung surfactant: basic science and clinical applications. 2000, New York, Basel: Marcel dekker, Inc.
- Notter RH, Wang Z, Egan EA y Holm BA. Component-specific surface and physiological activity in bovine-derived lung surfactants. *Chem Phys Lipids.* 2002; 114: 21-34.
- ONY I. Infasurf (Calfactant). Package insert 1998.
- Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Haagsman HP, Golde LM van y Demel RA. Characterization of lipid insertion into monomolecular layers mediated by lung surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biochemistry.* 1991; 30: 10965-71.
- Oosting RS, Van Greevenbroek MM, Verhoef J, Van Golde LM y Haagsman HP. Structural and functional changes of surfactant protein A induced by ozone. *Am J Physiol.* 1991; 261: 77-83.
- Payá M, Halliwell B y Hoult RS. Interactions of a series of coumarines with reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol.* 1992; 44: 205-14.

- Pérez-Gil J, Tucker J, Simatos G y Keough KMW. Interfacial adsorption of simple lipid mixtures combined with hydrophobic surfactant protein from pig lung. *Biochem Cell Biol.* 1992; 70: 332-38.
- Pérez-Gil J y Keough KM. Interfacial properties of surfactant proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1408: 203-17.
- Pérez-Gil J. Lipid-protein interactions of hydrophobic proteins SP-B and SP-C in lung surfactant assembly and dynamics. *Pediatr Pathol Mol Med.* 2001; 20: 445–69.
- Picone A, Gatto LA, Nieman GF, Paskanik AM y Lutz C. Pulmonary surfactant function following endotoxin: effects of exogenous surfactant treatment. *Shock.* 1996; 5: 304-10.
- Piknova B, Schief WR, Vogel V, Discher BM y Hall SB. Discrepancy between phase behavior of lung surfactant phospholipids and the classical model of surfactant function. *Biophys J.* 2001; 81: 2172–80.
- Piknova B, Schram V y Hall SB. Pulmonary surfactant: phase behavior and function. *Curr Opin Struc Biol.* 2002; 12: 487–494.
- Pison U, Max M, Neuendank A, Weissbach S y Pietschmann S. Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence from “non-surfactant” functions of the surfactant system. *Eur J Clin Invest.* 1994; 24: 586-99.
- Pison U, Herold R y Schürch S. The pulmonary surfactant system: biological functions, components, physicochemical properties and alterations during lung disease. *Colloid Surface A.* 1996; 114: 165-84.
- Pittet JF, MacKersie RC, Martin TR y Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155:1187-205.
- Plasencia I, Rivas L, Keough KM, Marsh D y Perez-Gil J. The N-terminal segment of pulmonary surfactant lipopeptide SP-C has intrinsic propensity to interact with and perturb phospholipid bilayers. *Biochem J.* 2004; 377: 183-93.
- Possmayer F, Yu S-H, Weber JM y Harding PGR. Pulmonary surfactant. *Can J Biochem Cell Biol.* 1984; 62: 1121-33.
- Possmayer F. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Resp Dis.* 1988; 138: 990-98.

- Possmayer F. Biophysical activities of pulmonary surfactant in fetal and neonatal physiology. *RA Polin, W Fox (Eds). WB Saunders Co, Philadelphia.* 1991; 949-62.
- Possmayer, F, Nag K, Rodriguez K, Qanbar R y Schurch S. Surface activity in vitro: role of surfactant proteins. *Comp. Biochem. Phys A Mol Integr Physiol.* 2001; 129; 209-20.
- Postle AD, Mander A, Reid KBM, Wang JY, Wright SM, Moustaki M y Warner, J. O. Deficient Hydrophilic Lung Surfactant Proteins A and D with Normal Surfactant Phospholipid Molecular Species in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20: 90-98.
- Postle AD, Heeley EL y Wilton DC. A comparison of the molecular species compositions of mammalian lung surfactant phospholipids. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001; 129: 65-73.
- Puligandla PS, Gill T, McCaig LA, Yao L, Veldhuizen RAW, Possmayer F y Lewis JF. Alveolar environment influences the metabolic and biophysical properties of exogenous surfactants. *J Appl Physiol.* 2000; 88: 1061-71.
- Ramanathan R, Rasmussen MR, Gerstmann DR, Finer N y Sekar K. A randomized multicenter masked comparison trial of poractant Alfa (Curosurf) versus Beractant (Survanta) in the treatment of respiratory distress syndrome in preterm infants. *Am J Perinat.* 2004; 21: 109-19.
- Rauprich P, Möller O, Walter G, Herting E y Robertson B. Influence of Modified Natural or Synthetic Surfactant Preparations on Growth of Bacteria Causing Infections in the Neonatal Period. *Clin Diagn Lab Immun.* 2000; 7: 817-22.
- Reiss I, Tegtmeyer FK, Ziesenitz S, Moller JC and Gortner L. Influence on L-selectine and PMN-inhibition on activated neutrophils by different surfactant preparations. *Applied Cardiopulm Pathophysiol.* 1995; 53: 98-99.
- Robertson B, Taeusch H. Surfactant therapy for lung disease, lung biology in health and disease. NY: Marcel Dekker; 1985.
- Robertson B y Curstedt T inventors; Robertson B applicant. Natural pulmonary surfactant, method of preparation and pharmaceutical compositions. *European Patent Application.* 1988 April 7; A 61K 37/02.
- Robertson B. Surfactant inactivation and surfactant therapy in acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Monaldi Arch Chest Dis.* 1998; 53: 64-69.

- Robertson B y Halliday HL. Principles of surfactant replacement. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1408: 346–61.
- Rodríguez Capote K, McCormack FX y Possmayer F. Pulmonary surfactant protein-A (SP-A) restores the surface properties of surfactant after oxidation by a mechanism that requires the Cys6 interchain disulfide bond and the phospholipid binding domain, *J Biol Chem* 2003; 278: 20461-74.
- Romeau S, Hammerl P, Maus U, Gunther A, Seeger W, Grimminger F y Lohmeyer J. Surfactant protein A down-regulates proinflammatory cytokine production evoked by *Candida albicans* in human alveolar macrophages and monocytes. *J Immunol*. 1999; 163: 4495-502.
- Ross A. Survanta (Beractant). Package insert 1999
- Ross, M., S. Krol, A. Janshoff, and H. J. Galla. Kinetics of phospholipid insertion into monolayers containing the lung surfactant proteins SP-B or SP-C. *Eur Biophys J*. 2002; 31: 52–61.
- Rüdiger M, Tolle A, Meir W y Rüstow B. Naturally derived commercial surfactants differ in composition of surfactant lipids and in surface viscosity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 288: L379–L383.
- Rusell AD, Hugo WB y Ayliffe GAJ. Desinfection, preservation and sterilization. Ed. *Blasckweel Scientific Publication*. 1982; Part 1, p.3-262.
- Ryan SF, Ghassibi Y y Liao DF. Effects of activated polymorphonuclear leukocytes upon pulmonary surfactant in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991; 4: 33-41.
- Sano H, Sohma H, Muta T, Nomura S, Voelker DR y Kuroki Y. Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD14. *J Immunol*. 1999; 163, 387-95.
- Schmidt R, Meier U, Yabut-Perez M, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W y Günther A. Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipids in acute respiratory distress syndrome and pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163: 95–100.
- Schneider WC y Hogeboom GH. Intracellular distribution of enzymes, V. Further studies of the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. *J Biol Chem*. 1950; 178: 123-28.

- Schoel WM, Schurch S y Goerke, J. The captive bubble method for the evaluation of pulmonary surfactant: surface tension, area, and volume calculations. *Biochim Biophys Acta* 1200. 1994; 281-90.
- Schram V y Hall SB. Thermodynamic effects of the hydrophobic surfactant proteins on the early adsorption of pulmonary surfactant. *Biophys J*. 2001; 81: 1536–1546.
- Schürch S, Bachofen H, Goerke J y Possmayer F. A captive bubble method reproduces the in situ behavior of lung surfactant monolayers. *J Appl Physiol*. 1989; 67(6): 2389-96.
- Schürch S, Qanbar R, Bachofen H y Possmayer F. The surface associated surfactant reservoir in the alveolar lining. *Biol Neonate*. 1995; 67: 61-76.
- Seeger W, Grube C, Gunther AW, Schmidt R. Surfactant inhibition by plasma proteins: differential sensitivity of various surfactant preparations. *Eur Respir J* 1993; 6: 971-7.
- Shapiro DL, Notter RH, Morin FC, Deluga KS, Goluk LM, Sinkin RA, Weiss KI y Cox C. Double-blind, randomized trial of calf lung surfactant extract administered at birth to very premature infants for prevention of respiratory distress syndrome. *Pediatrics*. 1985; 76: 593-99.
- Shapiro DL y Notter RH. Surfactant Replacement Therapy. *Liss, New York*. 1989.
- Shelly SA, Pacida JE y Balis JU. Lung surfactant phospholipid in different animal species. *Lipids*. 1984; 19: 857-62.
- Sibille Y y Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defence and injury. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 141: 471–501.
- Smith RM, Spragg R y Connor J. Surfactant phospholipids inhibit neutrophil NADPH oxidase activity in a cell free system. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 159(Suppl.): A894.
- Smith RD y Berg JC. The collapse of surfactant monolayers at the air-water interface. *J. Colloid Interf Sci*. 1980; 74: 273-86.
- Song GW, Robertson B, Curstedt T, Gan XZ y Huang WX. Surfactant treatment in experimental *Escherichia coli* pneumonia. *Acta Anaesth Scand*. 1996; 40: 1152-59.
- Speer CP, Gotze P, Cursted T y Robertson B. Phagocyte functions and tumor necrosis factor secretion of human monocytes exposed to natural porcine surfactant (Curosurf). *Pediatr Res*. 1991; 30: 69-74.

- Spragg RG, Gilliard N, Richman P, Smith RM, Hite RD, Pappert D, Robertson B, Curstedt T y Strayer D. Acute effects of a single dose of porcine surfactant on patients with the adult respiratory distress syndrome. *Chest*. 1994; 105: 195–202.
- Spragg RG, Lewis JF, Wurst W, Häfner D, Baughman RP, Wewers MD y Marsh JJ. Treatment of acute respiratory distress syndrome with recombinant surfactant protein C surfactant. *Am J Resp Crit Care Med*. 2003; 167: 1562–6.
- Stamme C, Walsh E y Wright JR. Surfactant protein A differentially regulates IFN-gamma and LPS-induced nitrite production by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 23: 772-79.
- Strobe W.: Chapter 7 Immunologic studies in Humans: Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood, In: Current Protocol in Immunology. Colegan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM y Strober W. (Eds) *Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience*. 1992 pag 7.1.1-7.1.2.
- Sun B, Curstedt T, Lindgren G, Franzén B, Alaiya AA, Calkovská A y Robertson B. Biophysical and physiological properties of a modified porcine surfactant enriched with surfactant protein A. *Eur Respir J*. 1997; 10: 1967-74.
- Suwabe A, Mason RJ y Voelker DR. Calcium dependent association of surfactant protein A with pulmonary surfactant: Application to simple surfactant protein A purification. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 327: 285-91.
- Suzuki Y, Fujita Y y Kogishi K. Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am Rev Respir Dis*. 1989; 140: 75-81.
- Taeusch HW, Lu K. y Ramierez-Schrempp D. Improving pulmonary surfactants. *Acta Pharmacol Sin*. 2002; 23: 11-15.
- Takamoto DY, Lipp MM, Nahmen A von, Lee KY, Waring AJ y Zasadzinski JA. Interaction of lung surfactant proteins with anionic phospholipids. *Biophys J*. 2001; 81: 153–69.
- Taneva S y Keough KM. Pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C in spread monolayers at the air-water interface: I. Monolayers of pulmonary surfactant protein SP-B and phospholipids. *Biophys J*. 1994; 66: 1137–48.
- Tangen O, Jonsson J y Orrenius S. Isolation of rat liver microsomes by gel filtration. *Anal Biochem*. 1973; 54: 597-603.

- Tashiro K, Yamada K, Li WZ, Matsumoto Y y Kobayashi T. Aerosolized and instilled surfactant therapies for acute lung injury caused by intratracheal endotoxin in rats. *Crit Care Med*. 1996; 24: 488-94.
- Tegtmeyer FK, Gortner L, Ludwig A y Brandt E. In vitro modulation of induced neutrophil activation by different surfactant preparations. *Eur Respir J*. 1996; 9: 752-57.
- Thomasen MJ, Antal JM, Divis LT y Wiedemann HP. Regulation of human alveolar macrophages inflammatory cytokines by tyloxapol: a component of the synthetic surfactant Exosurf. *Clin Immunol Immunop*. 1995; 77: 201-05.
- Tino MJ y Wright JR. Surfactant protein A stimulates phagocytosis of specific pulmonary pathogens by alveolar macrophages. *Am J Physiol*. 1996; 270: 677-88.
- Tokieda K, Whitsett JA, Clark JC, Weaver TE, Ikeda K, McConnell KB, Jobe AH, Ikegami M y Iwamoto HS. Pulmonary dysfunction in neonatal SP-B-deficient mice. *Am. J. Physiol. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1997; 273: 875-82.
- Touchstone JC, Chen JC y Beaver KM. Improved separation of phospholipids in thin layer chromatography. *Lipids*. 1980; 15: 61-62.
- Tonks A, Morris RH, Price AJ, Thomas AW, Jones KP y Jackson SK. Dipalmitoylphosphatidylcholine modulates inflammatory functions of monocytic cells independently of mitogen activated protein kinases. *Clin Exp Immunol*. 2001; 124: 86-94.
- Tonks AJ, Tonks A, Morris RH, Jones KP, Jackson SK. Regulation of platelet-activating factor synthesis in human monocytes by dipalmitoyl phosphatidylcholine. *J Leukoc Biol*. 2003; 74: 95-101.
- Van Helden HPM, Kuijpers WC, Langerwerf PEJ, Langen RCJ, Haegsman HP y Bruijnzeel PLB. Efficacy of Curosurf in a rat model of acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J*. 1998; 12: 1-7.
- Van Iwaarden F, Welmers B, Verhoef J, Haagsman HP y Van Golden LM. Pulmonary surfactant protein A enhances the host-defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Med*. 1990; 2: 91-98
- Van Iwaarden JF, VanBerkhout F, Whitsett JA, Oosting RS y VanGolden LMG. A novel procedure for the rapid isolation of surfactant protein A with retention of its alveolar-macrophage-stimulating properties. *Biochem J*. 1995; 309: 551-55.

- Van Iwaarden JF, Claassen E, Jeurissen SH, Haagsman HP y Kraal G. Alveolar macrophages, surfactant lipids, and surfactant protein B regulate the induction of immune responses via the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 24: 452-8.
- Walmrath D, Gunther A, Ghofrani HA, Schermuly R, Schneider T, Grimminger F y Seeger W. Bronchoscopic surfactant administration in patients with severe adult respiratory distress syndrome and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 154: 57-6
- Walmrath D, Grimminger F, Pappert D, Knothe C, Obertacke U, Benzing A, Günther A, Schmehl T, Leuchte H y Seeger W. Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic shock: impact on gas exchange and haemodynamics. *Eur Respir J*. 2002; 19: 805-810.
- Wang Y, Griffiths WJ, Curstedt T y Johansson J. Porcine pulmonary surfactant preparations contain the antibacterial peptide prophenin and a C-terminal 18-residue fragment thereof. *FEBS Lett*. 1999; 460: 257-62.
- Wauer R, Rogalski M, Schwerecke A y Schmalisch G. Prophylaxe and Therapie des neonatalen atemnotsyndroms durch endotracheale application exogen en surfactants-eine literaturbersicht. *Klinische Medizin*. 1991; 46: 985-92.
- Wauer, R. 1998. Respiratory distress syndrome, p. 2-19. In R. R. Wauer (ed.), *Surfactant therapy: basic principles, diagnosis, therapy*. Thieme, Stuttgart, Germany.
- Weaver TE y Johnson J. Function of surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol*. 2001; 63: 555-78.
- Wilsher ML, Hughes DA y Haslam PL. Immunoregulatory properties of pulmonary surfactant: influence of variations in the phospholipid profile. *Clin Exp Immunol*. 1988; 73(1): 117-22.
- Willson DF, Jiao JH, Bauman LA, Zaritsky A, Craft H, Dockery K, Conrad D y Dalton H. Calf's lung surfactant extract in acute hypoxemic respiratory failure in children. *Crit Care Med*. 1996; 24: 1316-22.
- Wiswell T, Smith RM, Katz LB, Mastroianni L, Wong D, Willms D, Heard S, Wilson M, Hite RD, Anzueto A, Revak S, y Cochrane CG. Bronchopulmonary segmental lavage with Surfaxin (KL(4)-surfactant) for acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160: 1188-95.

- Woerndle S y Bartmann P. The effect of three surfactant preparations on *in vitro* lymphocyte functions. *J Perinat Med*. 1994; 22: 119-28.
- Wright JR, Rumbaugh RC, Colby HD y Miles PR. The relationship between chemiluminescence and lipid peroxidation in rat hepatic microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1979; 192: 344-51.
- Wright JR. Immunomodulatory functions of Surfactant. *Physiol Rev*. 1997; 77: 931-62.
- Wright JR, Zlogar DF, Taylor JC, Zlogar TM y Restrepo CI. Effects of endotoxin on surfactant protein A and D stimulation of NO production by alveolar macrophages. *Am J Physiol*. 1999; 276: 650-58.
- Wu H, Kuzmenko A, Wan S, Schaffer L, Weiss A, Fisher JH, Kim KS y McCormack FX. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1589–602.
- Wu Y, Singer M, Thouron F, Alaoui-el-azher M y Touqui L. Effect of surfactant on pulmonary expression of type IIA PLA₂ in an animal model of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 282: L743-50.
- Xing Z, Jordana M, Kirpalani H, Driscoll KE, Schall TJ y Gauldie J. Cytokine expression by neutrophils and macrophage inflammatory protein-2, Interleukin-1 β , and Interleukin-6 but not RANTES or transforming Growth Factor- β 1 mRNA expression in Acute Lung Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994; 10: 148-153.
- Yamada, T, Ikegami M, Tabor BL y Jobe AH. Effects of surfactant protein A on surfactant function in preterm ventilated rabbits. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142: 754-57.
- Yang C, Moriuchi H, Takase J, Ishitsuka Y, Irikura M y Irie T. Oxidative stress in early stage of acute lung injury induced with oleic acid in guinea pigs. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26: 424-28.
- Yapicioglu H, Yildizdas D, Bayram I, Sertdemir Y y Yilmaz HL. The use of surfactant in children with acute respiratory distress syndrome: efficacy in terms of oxygenation, ventilation and mortality. *Pulm Pharmacol Ther* 2003; 16: 327-33.
- Yeagle PL. Hydration and the lamellar to hexagonal II phase transition of phosphatidylethanolamine. *Biochemistry*. 1986; 25: 7518–7522.
- Yu S, Harding P, Smith N y Possmayer F. Bovine pulmonary surfactant: chemical composition and physical properties. *Lipid*. 1983; 18: 522-29.

- Yu SH, McCormack FX, Voelker DR y Possmayer F. Interactions of pulmonary surfactant protein SP-A with monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol: roles of SP-A domains. *J Lipid Res.* 1999; 40(5): 920-29.
- Zelter M, Escudier BJ, Hoeffel JM y Murray JF. Effects of aerosolized artificial surfactant on repeated oleic acid injury in sheep. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 141: 1014-19.

GLOSARIO

- ADNc: ácido desoxiribonucleico complementario
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- BAEC: Células endoteliales de la aorta bovina
- BHT: Di-ter-butilhidroxitolueno
- CL: Colesterol
- CLS: Surfactante natural de ternero
- CLSE: Extracto de surfactante pulmonar de ternero
- cpm: centelleo por minutos
- DAP: Daño agudo pulmonar
- DG: Diacilglicerol
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina
- DPPG: Dipalmitoilfosfatidilglicerol
- DRC: Dominio de reconocimiento de carbohidrato
- EEM: Error estándar de la muestra
- ERO: Especies reactivas del oxígeno
- ESPNP: Extracto surfactante pulmonar natural porcino
- FRA: Fallo respiratorio agudo
- HCLO: Ácido hipocloroso
- ICAM-1: Molécula de adhesión celular integrina-1
- IL-1 β : Interleuquina 1 β
- LB: Langmuir-Blodgett
- LBP: Lavado pulmonar porcino
- LPC: Lisofosfatidilcolina
- LPH: Hidroperóxido de ácido linoleico
- LPS: Lipopolosácarido
- MDA: Malonil dialdehído
- MPB: Proteína unidora de manosa
- MPO: Mieoloperóxidasa
- MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- NBD-PC: [1-palmitoil, 6-(N-7-nitrobenz-2oxa-1,3-diazol-4-il)-PC (NBD- PC)]
- NF- κ B: Factor nuclear Kb
- OH: Radical hidroxilo
- ONOO: Radical peroxinitrito
- PAF: Factor activante de plaquetas
- PC: Fosfatidilcolina
- PG: Fosfatidilglicerol
- PI: Fosfatidilinositol
- PL: Fosfolípidos
- PL-PUFA: Fosfolípidos con ácidos grasos poli-insaturados
- PMA: forbol miristil 13 acetato

- PMN: Polimorfonuclear
- PRATB: Productos reactivos al ácido tiobarbitúrico
- PS: Fosfatidilserina
- PUFA: Ácidos grasos poli-insaturados
- SDRA: Síndrome de Distress Respiratorio Agudo
- SDRN: Síndrome de Distress Respiratorio del Neonato
- SM: Esfinomielina
- SP-A: Proteína del surfactante A
- SP-B: Proteína del surfactante B
- SP-C: Proteína del surfactante C
- SP-D: Proteína del surfactante D
- sPLA₂: Fosfolipasa A₂ de secreción
- SPN: Surfactante pulmonar natural
- SPNP: Surfactante pulmonar natural porcino
- TA: Triacilglicerol
- Tm: Temperatura de transición de fases
- TNF α : Factor de necrosis tumoral
- TSA: Agar triptona soya
- TSM: Tensión superficial mínima
- UFC: Unidades formadoras de colonia