

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Relaciones estructura-función en el surfactante pulmonar : efecto de la temperatura y mecanismos de compensación fisiológica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Victoria Picardi

Director

Jesús Pérez-Gil

Madrid, 2014

**RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN
EN EL SURFACTANTE PULMONAR**

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y
MECANISMOS DE COMPENSACIÓN
FISIOLÓGICA**

TESIS DOCTORAL

MARÍA VICTORIA PICARDI



2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR I**



**RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN EL SURFACTANTE
PULMONAR.**

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y MECANISMOS DE
COMPENSACIÓN FISIOLÓGICA.**

TESIS DOCTORAL

MARÍA VICTORIA PICARDI

Director

Dr. Jesús Pérez-Gil

Madrid

2014

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección del Dr. Jesús Pérez-Gil. Parte de los experimentos se realizaron en colaboración con:

- el Dr. Guillermo Orellana del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad Complutense de Madrid.
- el equipo del Dr. Ruud Veldhuizen de la University of Western Ontario de Canadá.
- el equipo de la Dra. Sandra Orgeig de la University of South Australia de Adelaide en Australia.
- el Dr. Timothy E. Weaver del Childrens Hospital Medical Center en Cincinnati, Estados Unidos.
- el equipo del Dr. Wolfgang Bernhard de la Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen de Alemania.

Esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la financiación por el programa Marie Curie EST PULMO-NET.



ABREVIATURAS

CBS	Surfactómetro de Burbuja Cautiva (<i>Captive Bubble Surfactometer</i>)
Chol	Colesterol (<i>Cholesterol</i>)
Clf	Cloroformo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
EO	Extracto Orgánico del surfactante pulmonar
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LAURDAN	2-dimetilamino-6-lauroilnaftaleno
LBA	Lavado broncoalveolar (libre de células)
LC	Fase líquido-condensada
LE	Fase líquido-expandida
Ld	Fase líquido-desordenada
Lo	Fase líquido-ordenada
MetOH	Metanol
MLV's	Vesículas Multilamelares (<i>Multi Lamellar Vesicles</i>)
MT	Mielina Tubular
π	Presión superficial
PBS	Solución tampón de fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PG	Fosfatidilglicerol
PMPC	Palmitoilmiristoilfosfatidilcolina
POPC	Palmitoiloleoilfosfatidilcolina
POPG	Palmitoiloleoilfosfatidilglicerol
rpm	Revoluciones por minuto
SN	Surfactante pulmonar Nativo (porcino)
SP-A	Proteína A del surfactante pulmonar
SP-B	Proteína B del surfactante pulmonar
SP-C	Proteína C del surfactante pulmonar
SP-D	Proteína D del surfactante pulmonar
γ	Tensión superficial
Tm	Temperatura de transición de fase (<i>Temperature of melting</i>)
UV	Ultravioleta
WB	Western Blot

INDICE

INTRODUCCIÓN

1. El epitelio alveolar	7
2. Composición del surfactante pulmonar	8
3. Funciones del surfactante pulmonar	10
3.1. Reducción de la tensión superficial en la interfase aire-líquido	11
3.2. Mantenimiento de la homeostasis del líquido alveolar.....	13
3.3. Defensa del organismo frente a patógenos.....	14
4. Metabolismo del surfactante pulmonar	14
5. Componentes del surfactante pulmonar	17
5.1. Fracción lipídica: estructura y dinámica.....	17
5.2. Fracción proteica: estructura y función	21

OBJETIVOS	27
------------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales de origen sintético	31
2. Materiales de origen natural	31
2.1. Aislamiento y purificación del surfactante pulmonar porcino.....	31
2.2. Aislamiento del EO del surfactante pulmonar	32
2.3. Purificación del surfactante pulmonar no porcino	34
- Surfactante de Dunnarts.....	34
- Surfactante de Murciélagos.....	34
- Surfactante de Ardillas	34
- Surfactante de Ratones	35
- Surfactante de Ratas.....	35
3. Métodos Analíticos	35
3.1. Cuantificación de fosfolípidos	35
3.2. Cuantificación de colesterol.....	36
3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	36
3.4. Transferencia de proteínas a nitrocelulosa.....	36
3.5. Inmunodetección de proteínas.....	37

4. Métodos Interfaciales	37
4.1. Balanzas de superficie	37
4.2. Películas de Langmuir.....	38
- Isotermas de compresión de películas interfaciales constituidas por lípidos sintéticos, SN y EO a diferentes temperaturas de subfase.....	39
- Adsorción interfacial de SN a diferentes temperaturas	40
5. Métodos Espectroscópicos.....	41
5.1. En cubeta.....	41
5.1.1. Preparación de vesículas multilamelares (MLV's) con LAURDAN	41
5.1.2. Medición de fluorescencia.....	41
5.1.3. Análisis de datos: función de polarización generalizada del LAURDAN	41
5.1.4. Preparación de vesículas con DPH.....	42
5.1.5. Medición de anisotropía	42
5.1.6. Análisis de datos: Anisotropía.....	42
5.2. En placas multipocillo o microplacas	43
5.2.1. Formación de películas interfaciales	43
5.2.2. Medición de presión superficial	43
5.2.3. Medición de fluorescencia.....	43
5.3. En balanza de superficie.....	44
5.3.1. Formación de películas de tipo Langmuir.....	44
5.3.2. Isotermas de compresión y medición de fluorescencia	44
6. Métodos Termodinámicos	45
6.1. Calorimetría diferencial de barrido.....	45
7. Métodos de Análisis Funcional	47
7.1. Estudios en Captive Bubble (Surfactómetro de burbuja cautiva).....	47
- Estudios de actividad superficial de películas interfaciales de surfactante	48
- Estudios de estabilidad de películas interfaciales de surfactante frente a perturbaciones mecánicas.....	50

RESULTADOS

CAPÍTULO I

FUNCIONALIDAD DEL SURFACTANTE PULMONAR FRENTE A FLUCTUACIONES TÉRMICAS.

INTRODUCCIÓN	55
RESULTADOS.....	57
1. Fluorescencia	57

1.1. LAURDAN en monocapas de DPPC.....	57
1.2. LAURDAN en películas de tipo Langmuir progresivamente comprimidas.....	58
1.3. LAURDAN en bicapas.....	63
DISCUSIÓN	65

CAPÍTULO II

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LAS RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN DEL SURFACTANTE PULMONAR.

INTRODUCCIÓN	77
RESULTADOS	78
1. Fluorescencia	78
1.1. LAURDAN.....	78
1.2. DPH.....	80
2. Calorimetría	82
3. Estudios Funcionales	85
3.1. Efecto de la temperatura en la extensión y adsorción interfacial de surfactante nativo porcino	85
3.2. Comportamiento funcional en el surfactómetro de burbuja cautiva	86
DISCUSIÓN	98

CAPÍTULO III

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL SURFACTANTE PULMONAR DE ANIMALES HETEROTERMOS.

INTRODUCCIÓN	105
RESULTADOS	106
1. Fluorescencia	106
1.1. LAURDAN.....	106
1.2. DPH.....	107
2. Calorimetría	108
3. Estudios Funcionales	109
DISCUSIÓN	114
ANEXOS	116

CAPÍTULO IV

ESTRUCTURA-FUNCIÓN DEL SURFACTANTE PULMONAR EN MODELOS ANIMALES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA DEFICIENCIA CONGÉNITA DE SP-C.

INTRODUCCIÓN	125
RESULTADOS	126
1. Fluorescencia	126
1.1. LAURDAN.....	126
1.2. DPH.....	128
2. Estudios Funcionales	129
DISCUSIÓN	133

CAPÍTULO V

RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN EL SURFACTANTE PULMONAR DE UN MODELO ANIMAL DE SURFACTANTE MODIFICADO POR DIETA.

INTRODUCCIÓN	139
RESULTADOS	140
1. Fluorescencia	140
1.1. LAURDAN.....	140
1.2. DPH.....	141
2. Estudios Funcionales	142
DISCUSIÓN	148
DISCUSIÓN GENERAL	153
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	161

INTRODUCCIÓN.

1. EL EPITELIO ALVEOLAR

El pulmón es el órgano del aparato respiratorio encargado del intercambio gaseoso. Desde la tráquea, el árbol bronquial se divide en conductos de menor tamaño (bronquios y bronquiolos) hasta dar origen a los sacos alveolares donde se lleva a cabo el proceso respiratorio: oxigenación de la sangre y liberación de dióxido de carbono a través del epitelio alveolar. La zona de intercambio está formada por (1) el **surfactante pulmonar**, un agente tensioactivo que se dispone como una fina película (rica en estructuras membranosas extracelulares) sobre una delgada capa acuosa (fluido alveolar) que recubre el epitelio alveolar y los macrófagos (Pattle 1955) y constituye la primera barrera que debe atravesar el oxígeno para alcanzar el torrente sanguíneo, (2) el **epitelio alveolar** y (3) el **endotelio capilar** (Figura 1).

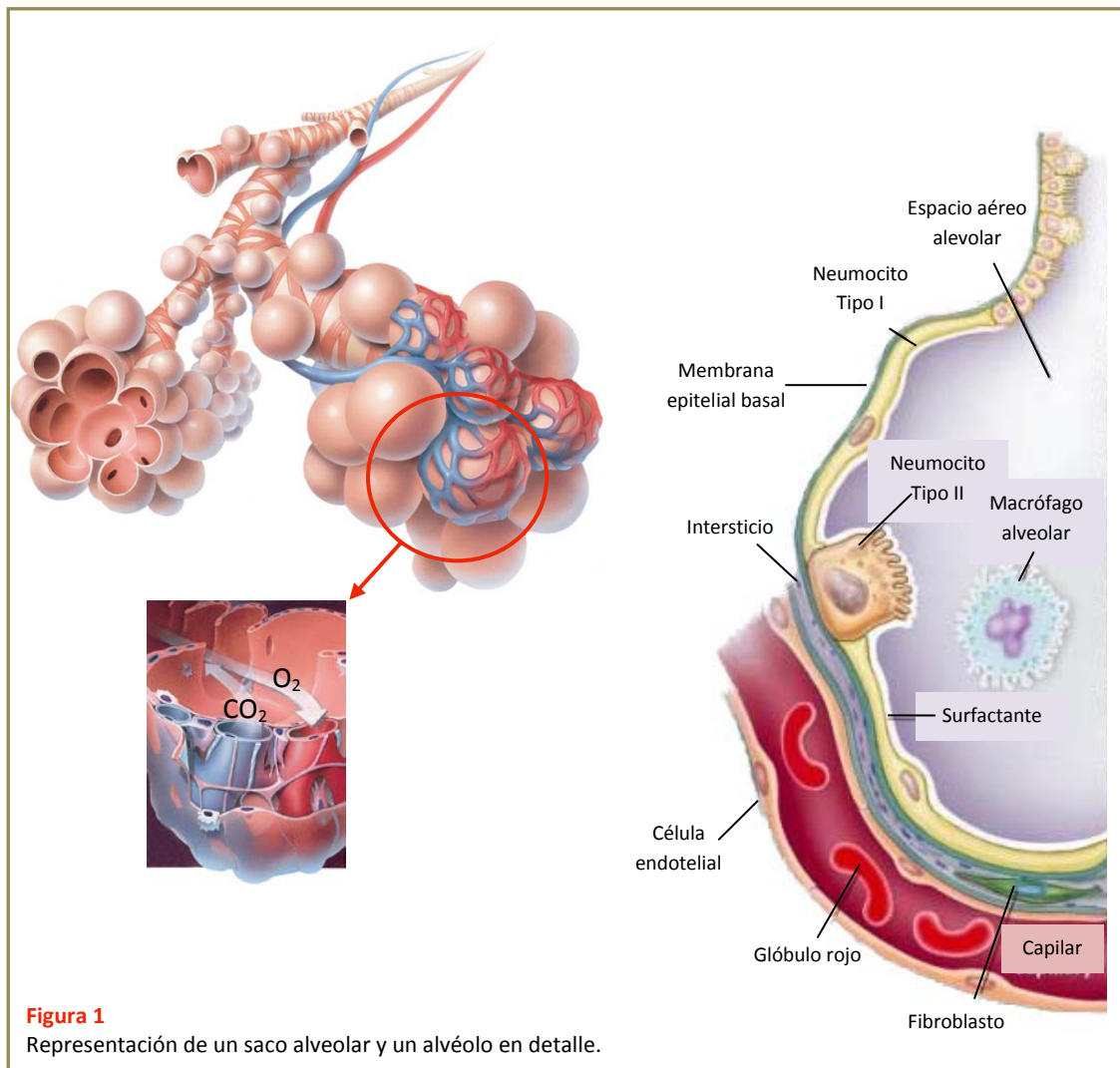


Figura 1
Representación de un saco alveolar y un alvéolo en detalle.

En el intersticio pulmonar (espacio entre el epitelio alveolar y el endotelio capilar) se encuentran componentes del tejido conectivo como fibroblastos, fibras elásticas y de colágeno, así como diversos tipos celulares: macrófagos, linfocitos y células cebadas.

El epitelio alveolar está formado por dos tipos de células: los **neumocitos tipo I**, que son células planas que constituyen el 90-95% de la superficie del alvéolo y podrían tener un papel

en el mantenimiento del fluido alveolar ya que expresan canales iónicos y aquaporina S (Herzog et al. 2008, Johnson 2007) y los *neumocitos tipo II*, que tienen morfología cúbica (típica de célula secretora) y representan sólo el 5-10% de la superficie alveolar. Su distribución es más dispersa y son las células encargadas de la síntesis y secreción del surfactante pulmonar. Éste es un complejo lipoproteico que se sitúa en la interfase aire-líquido y permite el intercambio gaseoso por difusión al estabilizar la exposición de una gran superficie. Además mantiene la homeostasis alveolar ya que evita el colapso de los sacos alveolares frente a diferencias de presión y protege al organismo de la potencial entrada de agentes patógenos. La importancia del surfactante pulmonar queda evidenciada en los problemas clínicos asociados a su déficit o disfunción.

2. COMPOSICIÓN DEL SURFACTANTE PULMONAR

La composición del surfactante varía ligeramente según la especie y edad del individuo. Además, puede haber diferencias composicionales en función del procedimiento empleado para el aislamiento del surfactante (King 1974, Trauble et al. 1974). El método más empleado consiste en obtener el surfactante a partir de lavados broncoalveolares de pulmones frescos. Otro método bastante utilizado, sobre todo en la industria farmacéutica (por razones de ahorro económico y tiempo) consiste en la purificación del material a partir de triturados de tejido de pulmones frescos (Postle y Bernhard 2004).

La composición en lípidos y proteínas del surfactante está muy conservada entre especies, en la que aproximadamente el 90% de la masa total lo constituyen lípidos y en torno a un 8-10% proteínas (Figura 2) (Hawgood 1997, Goerke 1998).

El 80% del contenido lipídico corresponde a fosfatidilcolina (PC), la mayor parte de la cual se encuentra en forma de dipalmitoilfosfatidilcolina (**DPPC**) que representa cerca de un 40% de la masa total (Hawgood 1997, Veldhuizen y Haagsman 2000a) siendo el principal fosfolípido responsable de las propiedades tensioactivas del surfactante (van Golde y Casals 1997). Las dos cadenas de acilo saturadas le permiten formar una monocapa altamente empaquetada capaz de reducir al mínimo la tensión superficial de la interfase aire-líquido, lo que es esencial para evitar el colapso alveolar durante la espiración. El surfactante posee además aproximadamente un 10-15% de fosfolípidos ácidos, esencialmente fosfatidilglicerol (**PG**) y fosfatidilinositol (**PI**) y fracciones minoritarias (1-5% en peso) de esfingomielina (SM), fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE) (Daniels y Orgeig 2001, Pérez-Gil y Keough 1998, Van Golde y Casals 1997). La presencia de fosfolípidos aniónicos parece importante en las interacciones específicas con las proteínas hidrofóbicas mientras que los lípidos insaturados están relacionados con la fluidificación de las membranas de surfactante, importante para facilitar la inserción de material durante las etapas de expansión (inspiración), manteniendo una película superficial activa durante los sucesivos ciclos respiratorios (Veldhuizen y Haagsman 2000b).

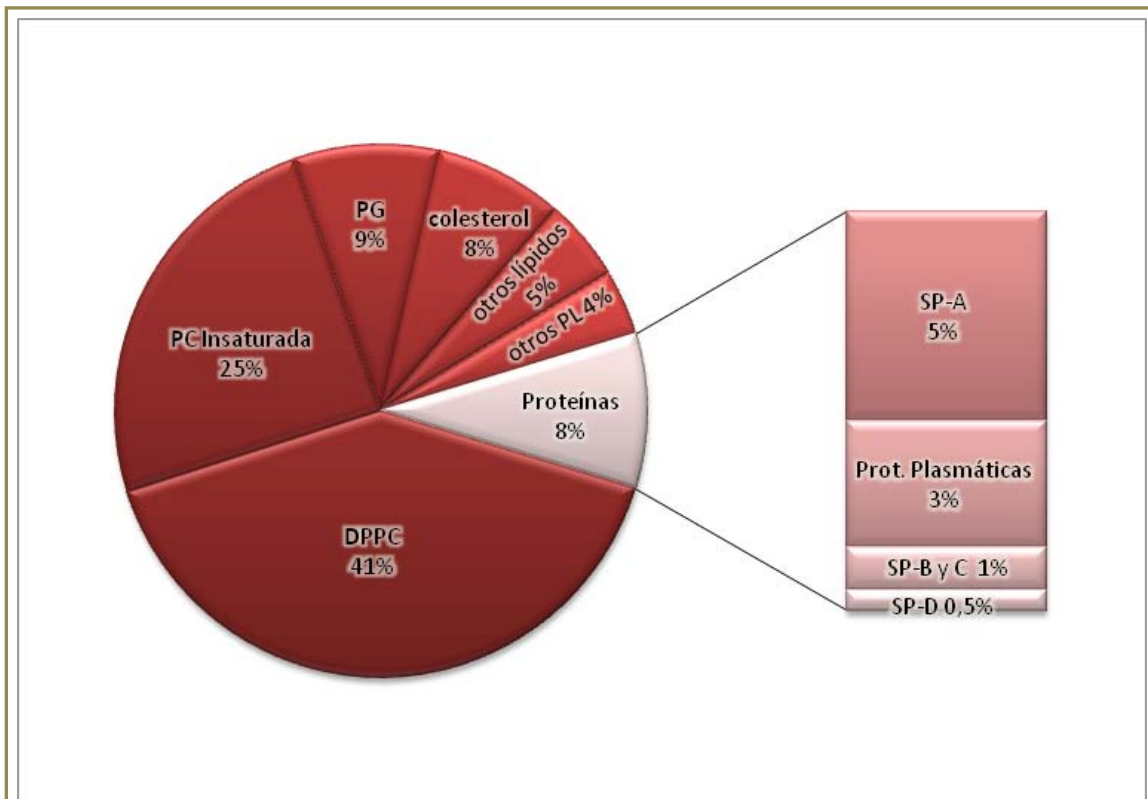


Figura 2

Composición típica del surfactante pulmonar. Esquema modificado de [Hawgood 1997](#) y [Goerke 1998](#).

Otros componentes del surfactante pulmonar incluyen los lípidos neutros, principalmente el **colesterol** y en menor cantidad mono-, di- y triglicéridos y ácidos grasos libres. El colesterol es el lípido neutro más abundante del surfactante (~5-8%) y su papel en la fisiología del sistema surfactante es controvertido. Se ha sugerido que es un factor importante en la fluidificación, lo que facilita la re-extensión de la película tensioactiva después de la compresión ([van Golde y Casals 1997](#)) debido a que puede incrementar la separación entre las moléculas de fosfolípido y por tanto perturbar las interacciones entre sus cabezas polares permitiendo un mayor movimiento rotacional ([Daniels y Orgeig 2003](#)). Estudios recientes han demostrado que el colesterol es responsable de la existencia de una segregación de fases ordenadas y desordenadas en el surfactante, que organiza lateralmente las proteínas y cuya importancia funcional está por determinarse ([Bagatolli 2006](#), [Bernardino de la Serna et al. 2004 y 2009](#)).

Forman también parte del surfactante cuatro **proteínas** específicas: SP-A, SP-B, SP-C y SP-D ([Goerke 1998](#)) que pueden diferenciarse en dos grupos: **hidrofilicas** (SP-A y SP-D) e **hidrofóbicas** (SP-B y SP-C). La proteína mayoritaria es la SP-A (5-6%), que junto con la SP-D está esencialmente implicada en las funciones inmunológicas y de defensa del surfactante ([Johansson y Curstedt 1997](#), [Orgeig et al. 2010](#)). SP-B y SP-C constituyen alrededor de un 1-2% del peso seco de surfactante y son importantes para su función interfacial ([Hawgood 1997](#), [Johansson y Curstedt 1997](#), [Orgeig et al. 2010](#), [Pérez-Gil y Weaver 2010](#)). La SP-D se considera de menor relevancia en el contexto de la función tensioactiva del pulmón ya que no aparece

asociada a los complejos lipoproteicos del surfactante. Las proteínas SP-A y SP-B son esenciales para la formación y mantenimiento de varias de las estructuras del surfactante. SP-B y SP-C son polipéptidos pequeños que interactúan fuertemente con los lípidos y promueven la formación y el adecuado comportamiento dinámico de la película tensioactiva en la interfase aire-líquido (Pérez-Gil y Keough 1998, Pérez-Gil 2008, Possmayer et al. 2001). La ausencia de cualquiera de las proteínas del surfactante produce alteraciones respiratorias de mayor o menor gravedad, pero sólo la falta de SP-B resulta letal poco después del nacimiento (Clark et al. 1995, Melton et al. 2003, Noguee 2004). Las proteínas hidrofílicas están involucradas predominantemente en el sistema de defensa innata del epitelio pulmonar (Crouch y Wright 2001). Ambas son responsables de mantener una baja carga de microorganismos en la superficie respiratoria, en colaboración con los macrófagos alveolares. Además, ambas poseen funciones inmunorreguladoras complejas y pueden promover o resolver los procesos inflamatorios (Orgeig et al. 2010).

3. FUNCIONES DEL SURFACTANTE PULMONAR

Las principales **funciones** asignadas al surfactante pulmonar son (Serrano y Pérez-Gil 2006):

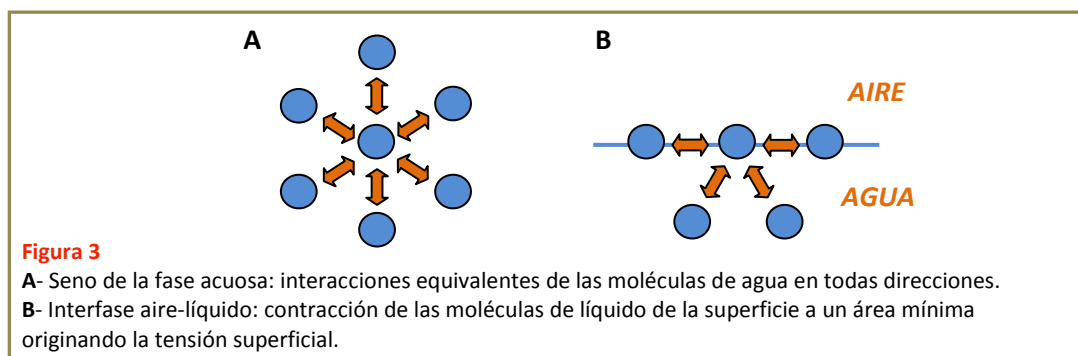
1- Reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido durante la espiración, evitando el colapso alveolar y confiriendo estabilidad mecánica al alvéolo.

2- Mantener la homeostasis del líquido alveolar.

3- Contribuir a la defensa del organismo frente a patógenos.

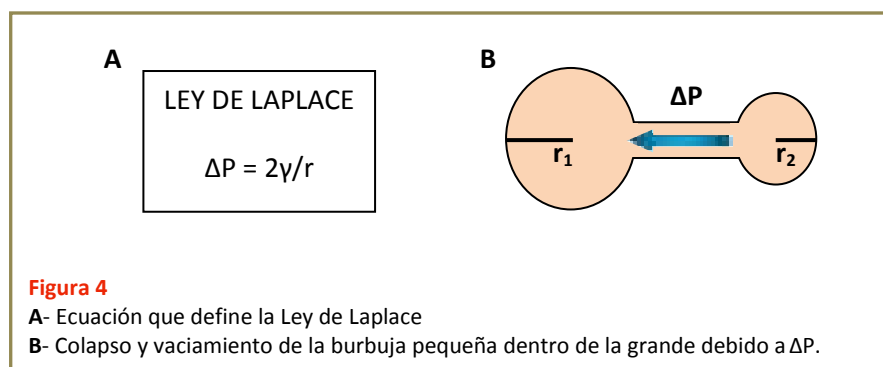
Para entender la función más relevante del surfactante pulmonar (reducción de la tensión superficial) es fundamental introducir el concepto de tensión superficial, fuerza a la que se ven sometidas las moléculas de agua en la superficie de la película de líquido que recubre el epitelio pulmonar.

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. En el interior del líquido las moléculas de agua ejercen y soportan interacciones de magnitud similar en todas las direcciones, mientras que en la interfase las moléculas de agua interactúan más fuertemente entre ellas que con las moléculas del aire (Figura 3).



Esto hace que la superficie del líquido tienda a contraerse al área mínima (Wrobel et al. 2004) haciendo necesaria la aplicación de energía (trabajo) para ensanchar dicha superficie. El primero en demostrar que las fuerzas superficiales en la interfase aire-líquido contribuyen considerablemente a las propiedades mecánicas del pulmón fue Von Neergaard (von Neergaard 1929) y en 1957 Clements demostró que la tensión superficial era menor en presencia de un material surfactante de origen fisiológico (Clements 1957).

Para entender la importancia de la tensión superficial en el contexto del pulmón se suele recurrir a la Ley de Laplace, según la cual la presión (P) en el interior de una burbuja es proporcional a la tensión superficial (γ) e inversamente proporcional al radio (r) de la misma (Figura 4). Cuanto menor es la burbuja, mayor es la presión que soportan sus paredes. Una consecuencia es que si dos burbujas de diferente tamaño estuvieran conectadas, la burbuja pequeña colapsaría vaciándose dentro de la grande (Figura 4). Si se considera a los alvéolos como pequeñas burbujas rodeadas por una fina película acuosa y se aplica la ley de Laplace, puede deducirse que en ausencia de un material tensioactivo los alvéolos estarían sometidos a grandes diferencias de presión debido a la tensión superficial y colapsarían. Teniendo en cuenta que el tamaño de los alvéolos no es homogéneo y que su volumen varía continuamente debido al ciclo respiratorio, las diferencias de presión entre los más pequeños y los más grandes ocasionaría el colapso de los pequeños durante la espiración (atelectasia pulmonar). Normalmente esto no ocurre en pulmones sanos y maduros debido a la presencia del surfactante en la interfase aire-líquido que reduce la tensión superficial de manera proporcional a la reducción del área de los alvéolos durante la espiración (Miller et al. 2006, Pattle 1955, Schürch et al. 1978, Zuo y Possmayer 2007). Durante la compresión de los alvéolos en la espiración la concentración de surfactante en la interfase aumenta reduciendo progresivamente la tensión superficial hasta alcanzar valores cercanos a 0 mN/m. Esta baja tensión superficial permite un fácil hinchamiento de los alvéolos durante la inspiración, facilitando de manera significativa el trabajo respiratorio.



3.1. Reducción de la tensión superficial en la interfase aire-líquido

Ésta es considerada la principal función del surfactante pulmonar, esencial para evitar el colapso de los alvéolos pequeños y reducir el trabajo pulmonar (Clements 1977, Meyer y Zimmerman 2002). El principal responsable de esta función es la DPPC, cuya estructura le permite formar películas interfaciales estables y compactas cuando se someten a compresión. Sin embargo, esta especie fosfolipídica se adsorbe muy lentamente a la interfase aire-líquido y

se re-extiende de manera poco eficiente durante la expansión. Para que la expansión alveolar ocurra en los sucesivos ciclos respiratorios se necesita una re-extensión eficiente del surfactante durante la inspiración, lo que implica la reinsertión de los componentes previamente excluidos durante la compresión (fosfolípidos insaturados, aniónicos, colesterol) y cuya presencia había contribuido a fluidificar el material facilitando su adsorción (Veldhuizen y Haagsman 2000b). Esto ha sugerido la existencia de un reservorio de material surfactante asociado a la película interfacial a partir del cual los fosfolípidos pueden ser incorporados nuevamente de una manera rápida y eficiente (Possmayer et al. 2001, Schürch et al. 1998). Mediante estudios de elipsometría combinados con microscopía de fuerza atómica se evidenció la presencia de bicapas asociadas a la monocapa interfacial (Finot et al. 2013). Otros experimentos han demostrado que el surfactante pulmonar forma una extensa red de estructuras multilamelares conteniendo múltiples bicapas. Estas estructuras multilamelares están enriquecidas en fosfolípidos insaturados, mientras que los fosfolípidos saturados están concentrados en la monocapa interfacial remanente. Esto respalda el modelo denominado de “squeeze-out” en el que la compresión de la película resulta en la formación de multicapas enriquecidas en fosfolípidos insaturados (proceso dependiente de las proteínas del surfactante) que se mantienen funcionalmente asociadas a la monocapa enriquecida en especies fosfolípicas disaturadas. Esto le permite a la película interfacial alcanzar y mantener bajas tensiones superficiales durante la compresión y mantener valores cercanos al equilibrio durante la expansión (Keating et al. 2012). Este proceso permite que los alvéolos se inflen uniformemente y que los sucesivos ciclos respiratorios transcurran con normalidad. El material surfactante también es capaz de actuar como agente anti-adhesivo gracias a su capacidad para modular la tensión superficial ayudando a mantener abiertas las vías respiratorias (Daniels y Orgeig 2003).

Para que la **funcionalidad** interfacial de un surfactante sea **óptima** durante el proceso respiratorio debe cumplir tres requisitos (Figura 5):

I- Rápida adsorción del material a la película interfacial desde la hipofase durante la inspiración.

II- Reducción de la tensión superficial a valores cercanos a 0 mN/m durante la compresión de la superficie respiratoria a lo largo de la espiración.

III- Rápida re-extensión del material replegado en la hipofase acuosa durante la expansión alveolar en la inspiración.

Estas actividades, propias del mecanismo de acción del surfactante, son posibles gracias a la cooperación de los componentes lipídicos y proteicos. La rápida adsorción interfacial y la eficiente re-extensión del material se atribuyen a la colaboración de las proteínas SP-B y SP-C mientras que la capacidad de reducir la tensión superficial a valores mínimos es propia de la particular composición lipídica del surfactante. Recientemente se ha propuesto que la proteína SP-C podría tener un papel particular en favorecer la formación de estados comprimidos a alta presión en películas interfaciales que contienen colesterol (Baumgart et al. 2010, Gómez-Gil et al. 2009). Así, la mezcla de lípidos y proteínas en el surfactante pulmonar estaría optimizada de modo que pueda sostener las tres actividades descritas de forma simultánea.

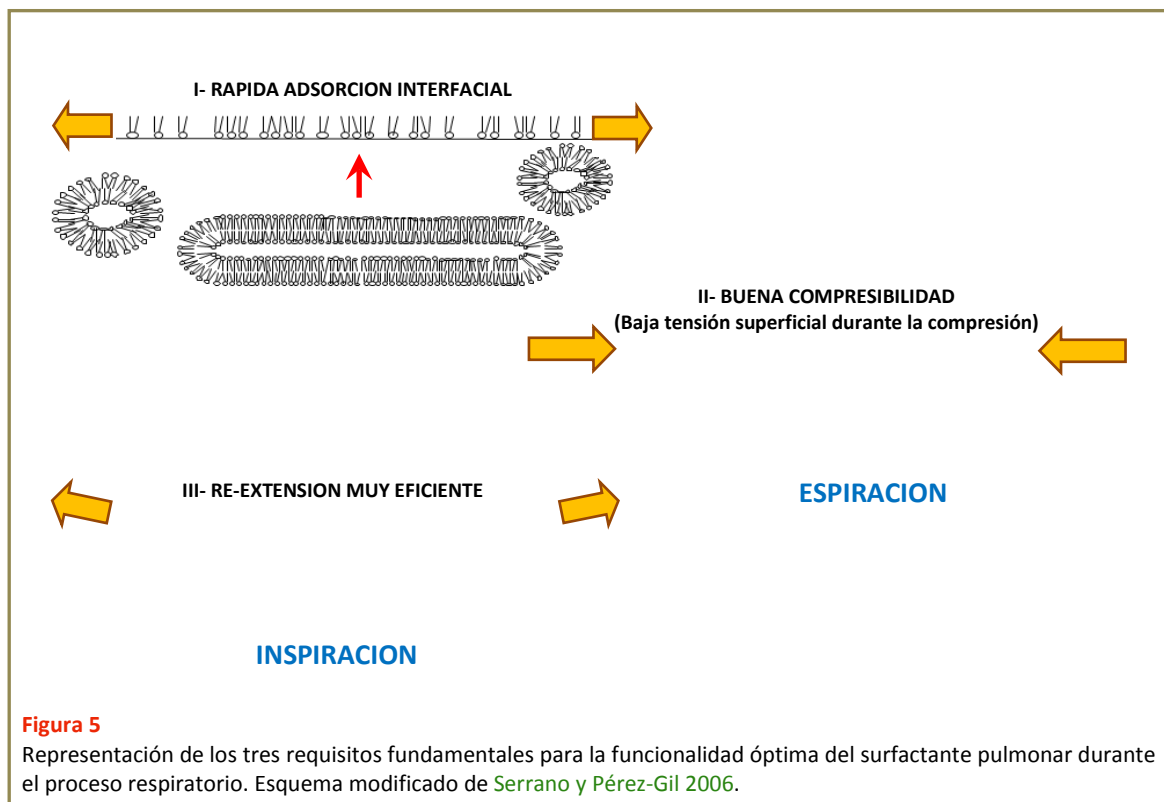


Figura 5

Representación de los tres requisitos fundamentales para la funcionalidad óptima del surfactante pulmonar durante el proceso respiratorio. Esquema modificado de [Serrano y Pérez-Gil 2006](#).

3.2. Mantenimiento de la homeostasis del líquido alveolar

El equilibrio del fluido pulmonar se describe por la ecuación de Starling, según la cual la presión capilar es la principal fuerza que gobierna la entrada de líquido desde los capilares pulmonares hacia la capa intersticial ([Ganter et al. 2006](#)). Esta presión debe mantenerse en equilibrio con la presión en el intersticio alveolar. Si la tensión superficial aumenta (falla el surfactante pulmonar) la presión en el intersticio disminuye originando una presión negativa alrededor de la pared capilar que conduce a un incremento en la presión hidrostática y por tanto produce la extravasación de líquido desde los capilares hacia la capa intersticial y por ende al interior del alvéolo ([Usha Raj 1987](#)). Por eso, se considera al surfactante pulmonar como un factor antiedematoso ya que la regulación de la tensión superficial por el mismo permite que la presión hidrostática se mantenga baja previniendo el edema pulmonar. En condiciones normales, existe un pequeño flujo de salida de fluido desde el espacio vascular al intersticial que el sistema linfático puede drenar fácilmente. Sin embargo, si se produce un incremento en la presión capilar, las vías linfáticas no pueden eliminar rápidamente el fluido y como consecuencia se origina el edema pulmonar ([Ganter et al. 2006](#)). Además, la alteración de la permeabilidad de la barrera alvéolo-capilar puede hacer que se filtren proteínas plasmáticas al espacio alveolar, que además de afectar a las propiedades tensioactivas del surfactante pulmonar suponen un componente coloidosmótico que agrava la acumulación de fluido ([Ikegami et al. 1996](#), [Keough et al. 1998](#)).

3.3. Defensa del organismo frente a patógenos

El pulmón es un órgano muy vulnerable al exponer una superficie media de 80 m² (en el varón adulto) en contacto con el medio externo, lo que supone una vía potencial de entrada para patógenos, alérgenos y contaminantes vehiculizados por el aire que se inhala día a día. En el tracto respiratorio existen mecanismos de defensa innatos que actúan localmente facilitando la eliminación de microorganismos y permitiendo el mantenimiento de la esterilidad de la superficie respiratoria. El surfactante pulmonar constituye la primera barrera física a la entrada de cualquier microorganismo. Las proteínas hidrofílicas del surfactante SP-A y SP-D se unen a la superficie de los patógenos (incluyendo virus y bacterias) y los opsonizan facilitando su fagocitosis por macrófagos y monocitos (Casals y García-Verdugo 2005, Wright 2005). Además regulan la producción de mediadores de la inflamación (Crouch y Wright 2001, Kramer y Speer 2003). Es paradójico que el surfactante pueda actuar como agente quimiotáctico de macrófagos y otras células fagocíticas, mientras que también se le otorga un papel parcialmente inmunosupresor que parece residir en sus componentes fosfolipídicos, esencialmente PC y PG. De hecho, el balance entre las actividades inmunosupresoras e inmunoactivadoras del surfactante parece estar íntimamente ligado al adecuado equilibrio composicional entre sus elementos lipoproteicos. Estudios más recientes también relacionan a las proteínas hidrofóbicas del surfactante con ciertas actividades inmunorreguladoras (Augusto et al. 2002 y 2003, García-Verdugo et al. 2009, van Iwaarden et al. 2001, Wright 1997). Además, se ha visto que las células epiteliales son capaces de producir mediadores químicos, como las citoquinas, capaces de activar y reclutar células como macrófagos y neutrófilos que eliminen la infección (Orgeig et al. 2010).

4. METABOLISMO DEL SURFACTANTE PULMONAR

Los componentes lipídicos y proteicos del surfactante se sintetizan en los neumocitos tipo II. Estas células sintetizan, procesan, empaquetan, secretan a la hipofase y reciclan los distintos componentes del surfactante (Mason y Shannon 1997) (Figura 6). En primera instancia (primera inspiración tras el nacimiento), el surfactante pulmonar se ensambla enteramente a partir de componentes sintetizados *de novo*, pero posteriormente también se reutiliza el material proveniente del lumen alveolar, disminuyendo la necesidad de nueva síntesis y proporcionando un sistema que puede responder rápidamente a las distintas condiciones fisiológicas (Haagsman y van Golde 1991, Hawgood 1997).

En el **ciclo metabólico** del surfactante pulmonar se pueden definir varias etapas:

- 1- *Síntesis de los componentes lipídicos y proteicos.*
- 2- *Ensamblaje y almacenamiento en los cuerpos lamelares para su posterior secreción a la hipofase acuosa.*
- 3- *Adsorción a la interfase aire-líquido y formación de la película interfacial.*
- 4- *Endocitosis, degradación y reciclaje de sus componentes.*

El surfactante pulmonar sintetizado por los neumocitos de tipo II es empaquetado en los **cuerpos lamelares (CL)** (Figura 7A), estructuras con origen lisoendosomal de aproximadamente 1µm de diámetro formadas por múltiples bicapas concéntricas altamente empaquetadas (Dietl et al. 2001). En su interior los CL presentan pH ácido y altas concentraciones de calcio (Wadsworth y Chander 2000). Las membranas de surfactante se secretan a partir de los cuerpos lamelares a la subfase acuosa. El alto empaquetamiento en los CL podría tener un papel importante en favorecer la rápida adsorción del material inmediatamente después de la secreción a la subfase acuosa. Así, se ha visto que el surfactante purificado a partir de lavados broncoalveolares presenta cinéticas de adsorción inicial más lentas que los CL obtenidos directamente de cultivos de neumocitos tipo II (Ravasio et al. 2010).

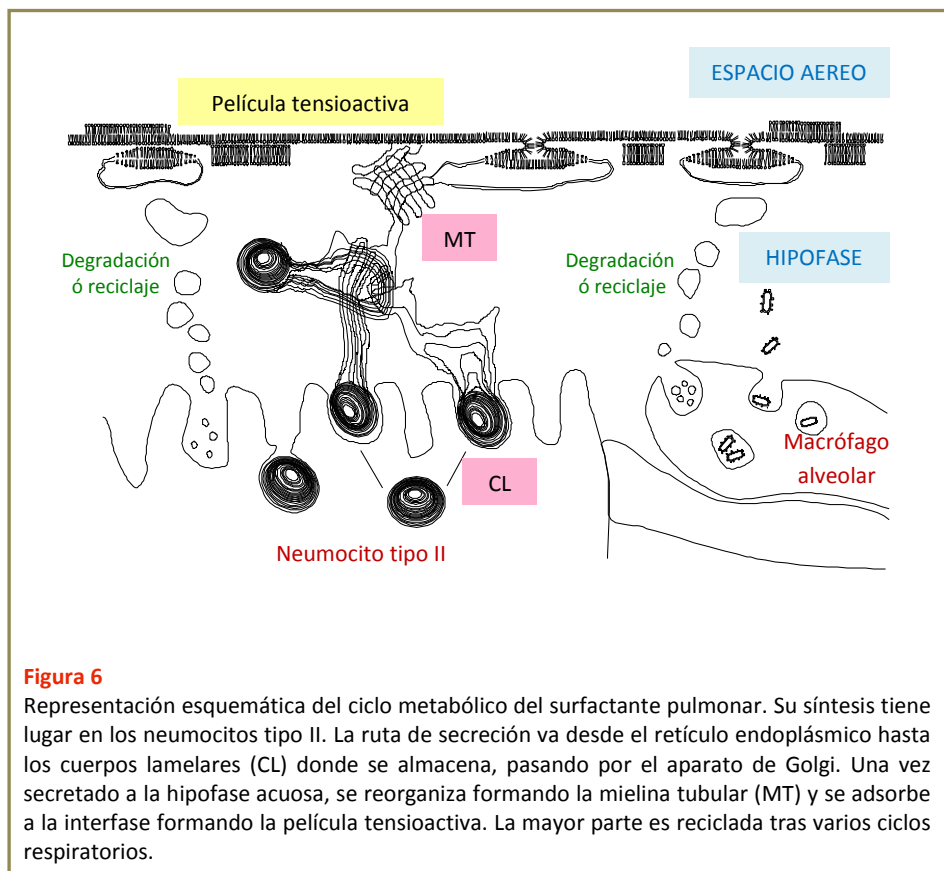
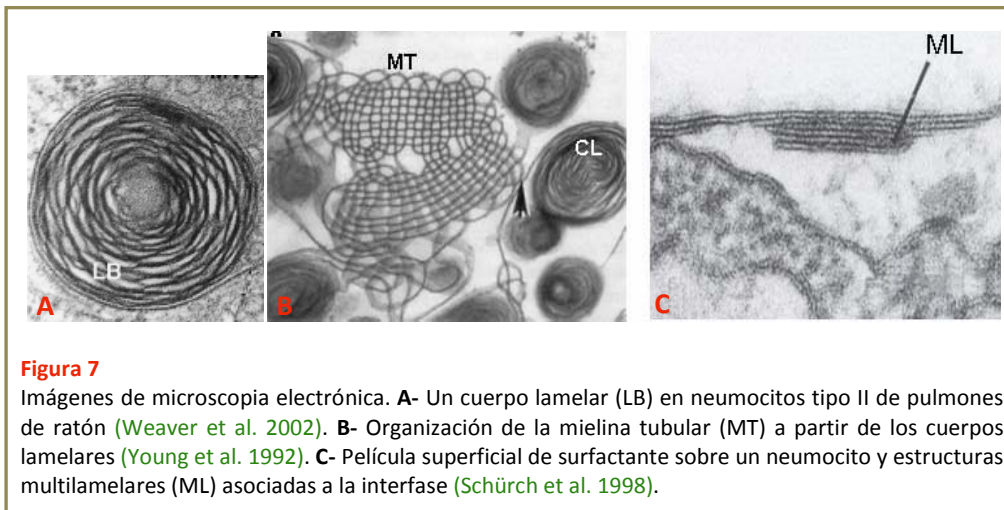


Figura 6

Representación esquemática del ciclo metabólico del surfactante pulmonar. Su síntesis tiene lugar en los neumocitos tipo II. La ruta de secreción va desde el retículo endoplásmico hasta los cuerpos lamelares (CL) donde se almacena, pasando por el aparato de Golgi. Una vez secretado a la hipofase acuosa, se reorganiza formando la mielina tubular (MT) y se adsorbe a la interfase formando la película tensioactiva. La mayor parte es reciclada tras varios ciclos respiratorios.

La secreción depende de varios estímulos siendo el principal la hiperventilación (Hawgood 1997), aunque una inspiración profunda también es suficiente para desencadenar una secreción masiva de surfactante (Rooney 2001). En la subfase, el material de los CL se reorganiza y sufre transformaciones morfológicas para formar, entre otras, una estructura reticular altamente ordenada denominada **mielina tubular (MT)** (Figura 7B). Está compuesta por un entramado de túbulos membranosos en forma de retícula, cuyo tamaño parece relacionado con las dimensiones de la molécula de SP-A (Nag et al. 1999a, Pérez Gil 2008). La formación de MT depende de una determinada composición lipídica, de la presencia de las proteínas SP-A y SP-B del surfactante y de calcio (Benson et al. 1984, Poulain et al. 1992, Suzuki et al. 1989).

Estudios in vitro sugieren que ambas proteínas, SP-A y SP-B, pueden mediar interacciones bicapa-bicapa y bicapa-monocapa (Cruz et al. 1997, Ruano et al. 1996). A partir de la MT y de otras estructuras, los componentes del surfactante se liberan y adsorben rápidamente a la interfase aire-líquido para formar la **película tensioactiva**. La película de surfactante ha sido tradicionalmente considerada como una monocapa (Clements et al. 1958, Nag et al. 1999a y 1999b, Pattle 1965), pero hay evidencias que demuestran mediante la aplicación de microscopía electrónica (Bachofen et al. 2005), análisis de tensión superficial en burbuja cautiva (Schürch et al. 1998), microscopía de fuerza atómica (Amrein et al. 1997, Diemel et al. 2002) o reflexión de neutrones (Follows et al. 2007), que gran parte del surfactante se encuentra asociado a la interfase en forma de estructuras de mayor complejidad que una simple monocapa. Es decir, el surfactante pulmonar en la hipofase acuosa se encuentra formando multicapas que se asocian a la monocapa de la interfase (Figura 7C) y funcionan como reservorios de surfactante.



Su importancia radica en el mantenimiento y estabilidad de la película tensioactiva, ya que acumula surfactante en las proximidades de la interfase para facilitar la reinsertión de material tensioactivo a lo largo de los sucesivos ciclos respiratorios, asegurando una continua renovación del material que se adsorbe. Modelos recientemente publicados (Follows et al. 2007, Pérez-Gil 2008) describen el complejo de surfactante en los espacios alveolares como una estructura o fase tridimensional que se dispone en la superficie respiratoria, permitiendo el correcto intercambio gaseoso, la estabilización mecánica bajo las condiciones dinámicas que impone la respiración y la protección de la superficie expuesta del pulmón frente a patógenos.

El material adsorbido a la interfase aire-líquido forma supuestamente una película enriquecida en DPPC que permite disminuir la tensión superficial hasta valores cercanos a 0mN/m. Se ha propuesto que este enriquecimiento en DPPC puede deberse a una inserción selectiva de este lípido mediada por la acción de SP-A y SP-B o a una exclusión preferencial de los demás componentes del surfactante (Pérez-Gil y Keough 1998, Possmayer et al. 2001, Veldhuizen y Haagsman 2000b). Aún faltan evidencias experimentales directas de este posible enriquecimiento, por lo que se están considerando modelos alternativos para explicar la

capacidad de la película interfacial para alcanzar las bajas tensiones superficiales (Piknova et al. 2001, Serrano y Pérez-Gil 2006). Con cada espiración, al disminuir la superficie interfacial, se produce la salida de parte del material desde la interfase hacia el reservorio, dando lugar a la aparición de estructuras interfaciales complejas. Por otro lado, con cada inspiración, al aumentar la superficie interfacial, el material eliminado se reinserta en la película tensioactiva desde el reservorio. Este proceso puede realizarse sin pérdidas significativas de material surfactante si SP-B y SP-C están presentes (Pérez-Gil y Keough 1998, Possmayer et al. 2001, Veldhuizen y Haagsman 2000).

Durante los ciclos respiratorios la película de surfactante es comprimida y expandida de manera constante. Ocasionalmente, parte del surfactante ya utilizado es liberado como vesículas unilamelares pequeñas que son eliminadas o recicladas. Gran parte del surfactante es así reciclado por los neumocitos de tipo II mediante endocitosis, para reintegrarse en los cuerpos lamelares, mientras una proporción más pequeña es eliminada por los macrófagos alveolares (Fig. 6). Al reciclarse los componentes del surfactante mediante el transporte de vesículas por la ruta endocítica desde los espacios alveolares a los CL, se produce la convergencia del reciclaje con la ruta biosintética (Pérez-Gil y Weaver 2010). El tiempo estimado de renovación del surfactante es de 4 a 11 horas (Baritussio et al. 1981).

5. COMPONENTES DEL SURFACTANTE PULMONAR

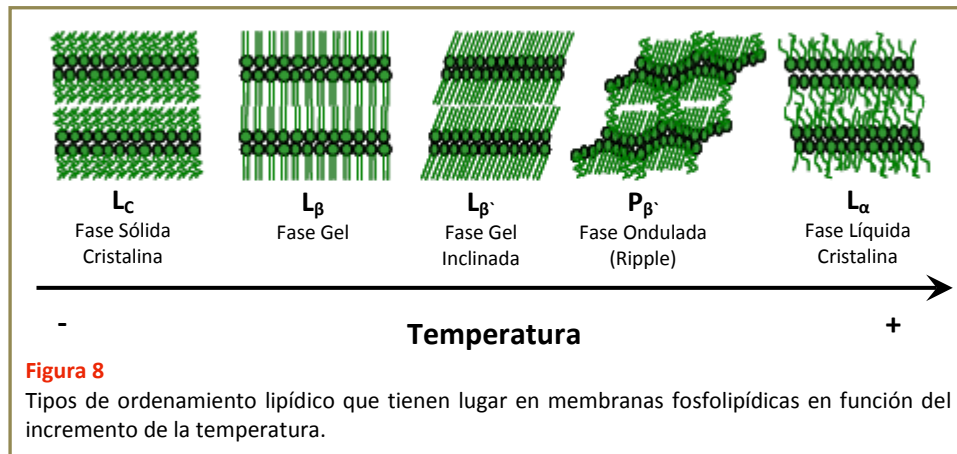
5.1. Fracción lipídica: estructura y dinámica

Para poder entender la funcionalidad del surfactante pulmonar y su participación en el proceso respiratorio es necesario conocer las características estructurales de sus estructuras membranosas, ya que resultan fundamentales para las propiedades tensioactivas de este complejo lipoproteico.

La mayor parte de los fosfolípidos en soluciones acuosas forman de manera espontánea estructuras lamelares (bicapas de fosfolípidos solvatados). Bajo estas condiciones pueden existir en diferentes estados físicos en función de la temperatura (**fases termotrópicas**) (Figura 8). Durante la transición de fase las moléculas lipídicas pasan de estar en fase gel (**L β**), en la que las moléculas fosfolipídicas exhiben muy poco movimiento y sus cadenas de acilo se encuentran muy ordenadas, a una fase líquido-cristalina (**L α**) más desordenada, en la que las cadenas de acilo de los fosfolípidos presentan una alta movilidad como resultado de la formación de isómeros “trans-gauche” que resultan de la rotación de 120° del enlace C-C. Estas isomerizaciones producen acortamientos y torsiones en las cadenas de acilo que impiden el empaquetamiento, aumentan la flexibilidad y movilidad de las cadenas y disminuyen el espesor de la bicapa. Además, el estado líquido-cristalino se caracteriza porque los fosfolípidos exhiben difusión lateral y movimiento rotacional alrededor de un eje perpendicular al plano de la bicapa (Presti y Chan 1982). A la temperatura a la que esta transición gel-líquido-cristalina tiene lugar se la denomina temperatura de transición de fase (**T m**) y depende de la longitud y grado de saturación de las cadenas de acilo y del tamaño y grado de ionización de la cabeza polar de los fosfolípidos.

En membranas de composición fosfolipídica compleja, con mezclas de especies con diferente grado de longitud y/o saturación, puede producirse a una temperatura dada la diferente

distribución lateral de especies lipídicas, originándose lo que se conoce como **separación lateral de fases**, que supone la coexistencia de dominios sólidos ($L\beta$) y dominios fluidos ($L\alpha$) en un rango determinado de temperatura. Los distintos dominios se generan por una distribución lateral anisotrópica de distintas especies lipídicas como consecuencia de su inmiscibilidad y poseen propiedades estructurales y biofísicas diferenciadas en lo que se refiere a fluidez, espesor de la membrana, etc.



Debido a la particular composición del surfactante, sus membranas presentan fenómenos de separación lateral de fases a temperaturas fisiológicas, con coexistencia de dominios fluidos desordenados (Ld) y ordenados (Lo) (Bernardino de la Serna et al. 2004). Esta organización lateral de los lípidos del surfactante podría ser esencial para el correcto desarrollo de su función.

Como ya se ha dicho, una de las principales funciones del surfactante es la de reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido, evitando el colapso alveolar. Esta actividad depende fundamentalmente de los lípidos que componen el surfactante y su capacidad para formar una monocapa en la interfase aire-líquido. El carácter anfipático de las moléculas fosfolípicas permite que se dispongan orientadas en la interfase (con la parte hidrofílica de las moléculas dirigida hacia la fase acuosa y las cadenas de acilo hidrofóbicas expuestas al aire) excluyendo un cierto número de moléculas de agua, lo que da lugar a la reducción de la tensión superficial del líquido en la interfase desde unos 70-72mN/m (tensión superficial del agua a 37 °C) hasta aproximadamente 25mN/m que es la tensión superficial de equilibrio para una interfase saturada con la mayoría de los fosfolípidos (Hawgood 1997, Goerke 1998). Si esta monocapa se comprime hasta ocupar un área menor, los fosfolípidos se empaquetan más eficientemente provocando una mayor exclusión de moléculas de agua expuestas al aire y por tanto una disminución de la tensión superficial hasta valores muy bajos, que pueden incluso ser cercanos a 0mN/m. Esto dependerá de la composición de la película interfacial y del grado de orden que puedan adoptar las moléculas de fosfolípido sometidas a compresión.

Numerosos estudios han demostrado que sólo las moléculas con un alto grado de saturación como la DPPC presentan la capacidad de reducir la tensión superficial a valores cercanos a 0mN/m (Goerke 1998). La DPPC es el componente mayoritario del surfactante pulmonar y

presenta una temperatura de transición de fase de 41 °C, ligeramente mayor que la temperatura fisiológica, por lo que a 37 °C el surfactante podría poseer regiones en fase gel con una estructura altamente ordenada y por tanto susceptibles de soportar los más densos empaquetamientos asociados a las elevadas presiones superficiales (Hawco et al. 1981b).

Sin embargo, a 37 °C la DPPC se adsorbe muy lentamente por lo que no podría formar por sí misma una película tensioactiva de manera suficientemente rápida ni permitir la re-extensión del material durante los sucesivos ciclos respiratorios. Por este motivo es necesaria la presencia adicional de especies fosfolípídicas insaturadas para fluidificar las membranas ricas en DPPC y favorecer la adsorción interfacial (Hook et al. 1984, Notter et al. 1983). En términos generales, puede por tanto asumirse que los fosfolípidos saturados son esenciales para la capacidad tensioactiva máxima, mientras los insaturados modulan las propiedades dinámicas.

El principal fosfolípido aniónico en el surfactante es el fosfatidilglicerol (PG) que aporta carga negativa a las bicapas de surfactante, lo que permite la interacción con las regiones catiónicas de las proteínas (Cruz et al. 1998, King y MacBeth 1981, Pérez-Gil et al. 1995) o con iones calcio (Hawgood 1997) facilitando la formación de la película interfacial. La mezcla en el surfactante de fosfolípidos saturados e insaturados produce una separación lateral de fases sólidas y fluidas en un amplio rango de temperaturas, incluyendo la fisiológica, de modo que las membranas son lo suficientemente fluidas para adsorberse eficientemente a la interfase mientras las películas interfaciales pueden empaquetarse cuando la película interfacial es comprimida con sólo incrementar ligeramente la proporción de DPPC en la interfase. Se han propuesto dos mecanismos para explicar el enriquecimiento de la monocapa en DPPC: una adsorción selectiva de DPPC a la interfase (Schürch et al. 1995) o una eliminación de la interfase de aquellos componentes que no sean DPPC. Este último modelo, conocido como “squeeze-out”, supone que existe una adsorción a la interfase rápida y cooperativa, gracias a que la DPPC se encuentra mezclada con PL insaturados. Tras la adsorción, los componentes fluidos, que son menos efectivos en la disminución de la tensión superficial, son selectivamente excluidos de la interfase durante la compresión (Diemel et al. 2002, Notter 2000, Veldhuizen et al. 2001). Esto permite que la monocapa interfacial quede parcialmente enriquecida en DPPC y sea competente para reducir la tensión superficial en el alvéolo hasta valores cercanos a 0mN/m (Goerke 1998). Los lípidos excluidos de la monocapa son los que formarían estructuras multilamelares asociadas a la interfase constituyendo el reservorio de material surfactante (Schürch et al. 1998) que durante la inspiración, al expandirse la superficie alveolar, se reinsertan en la monocapa interfacial (Schürch et al. 1995). Recientemente se ha visto que las películas interfaciales de surfactante pulmonar forman una extensa red de estructuras multilamelares conteniendo varias bicapas. Estas estructuras están enriquecidas en fosfolípidos insaturados, mientras que los fosfolípidos saturados están concentrados en la monocapa interfacial remanente. Esto respaldaría el modelo modificado de “squeeze-out” en el que la compresión de la película resulta en la formación de multicapas enriquecidas en fosfolípidos insaturados que se mantienen funcionalmente asociadas a la monocapa enriquecida en especies fosfolípídicas disaturadas como DPPC y DPPG. Esto le permite a la película interfacial alcanzar y mantener bajas tensiones superficiales durante la compresión y mantener valores cercanos al equilibrio durante la expansión (Keating et al. 2012).

El papel de los lípidos neutros y en especial del colesterol en este sistema, es difícil de definir. Se ha visto que la presencia de colesterol modifica la estructura lateral de las membranas de surfactante. Numerosos estudios confirman que el efecto del colesterol en las membranas del surfactante depende de su concentración (Gunasekara et al. 2005, Keating et al. 2007). El colesterol, presente en niveles en torno a 5-10% en masa en los complejos de surfactante, es un componente imprescindible para modular su estructura y función (Bagatolli 2006, Bernardino de la Serna et al. 2004). En términos generales, la presencia de colesterol a concentraciones suficientemente altas en las bicapas fosfolipídicas resulta en la formación de fases líquido-ordenadas (Lo), donde las moléculas fosfolipídicas presentan difusión lateral y movimientos rotacionales alrededor de un eje perpendicular al plano de la bicapa y las cadenas de acilo muestran un alto grado de orden pero están menos empaquetadas que en la fase gel (Filippov et al. 2004) y poseen mucho mayor movilidad. La formación de esta fase Lo se debe al efecto *dual* que presenta el colesterol: cuando se inserta entre lípidos en fase gel, incrementa la separación entre las moléculas fosfolipídicas y fluidifica las estructuras ordenadas; pero cuando se asocia con lípidos en fase líquida-cristalina, condensa e incrementa el grado de empaquetamiento de esta estructura (Presti y Chan 1982, Sankaram y Thompson 1991). A concentraciones entre un 7 y un 20 % molar, el colesterol es relativamente beneficioso para las membranas del surfactante ya que produce una coexistencia de fases Lo y Ld que mejora las propiedades de adsorción y re-extensión del surfactante en la interfase aire-líquido.

En general, se puede inferir que la presencia de colesterol influye de manera muy significativa en la estructura lateral y las propiedades biofísicas de las películas de surfactante (Bernardino de la Serna et al. 2004 y 2009). En general, se asume que las proporciones de especies de fosfolípidos saturados e insaturados y de colesterol han sido evolutivamente optimizadas para mantener simultáneamente la estabilidad mecánica de las películas de surfactante y su comportamiento dinámico durante los sucesivos ciclos respiratorios. Es importante tener en cuenta que en la mayoría de los surfactantes clínicos que están en uso se elimina el colesterol de las preparaciones (Blanco y Pérez-Gil 2007) por los efectos aparentemente negativos de las proporciones elevadas de colesterol en el funcionamiento del surfactante (Gunasekara et al. 2005, Leonenko et al. 2007, Suzuki 1982, Taneva y Keough 1997). De hecho, se considera que los síntomas del síndrome de distrés respiratorio agudo (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) se deben en parte a la presencia de niveles muy elevados (hasta el 40%) de colesterol en el surfactante pulmonar (Karagiorga et al. 2006). Sin embargo, es evidente que la presencia de colesterol es compatible con un correcto funcionamiento del surfactante, ya que todos los surfactantes naturales analizados contienen colesterol y en pulmones sanos se alcanzan tensiones superficiales cercanas a 0mN/m en presencia de colesterol (Schürch et al. 1976 y 1985). Otro indicio que apunta a la importancia del colesterol en el funcionamiento del surfactante pulmonar es el hecho de que se regule su concentración en los surfactantes de animales heterotermos (animales cuya temperatura corporal varía en respuesta a diversos estímulos) en función de la temperatura (Codd et al. 2000, Lang et al. 2005). Es interesante destacar que todas las propiedades del surfactante pulmonar, en lo que a la organización lateral de las membranas se refiere, se deben esencialmente a las interacciones entre los componentes lipídicos. Aunque la presencia de las proteínas específicas del surfactante es imprescindible para su funcionamiento, éstas no afectan a su estructura lateral, que sí resulta

ser críticamente dependiente de la presencia de colesterol y de la temperatura. No obstante, la organización definida por los lípidos resulta determinante para la distribución de las proteínas, que se localizan en regiones discretas de las membranas modelo que coinciden con fases desordenadas (Bernardino de la Serna et al. 2004). Es posible que la estructura lateral de las membranas y de las películas del surfactante, definida por los lípidos, actúe como una matriz que regula las interacciones lípido-proteína y el comportamiento biofísico del complejo.

5.2. Fracción proteica: estructura y función

La fracción lipídica por sí sola no posee las propiedades biofísicas que requiere el surfactante para su funcionalidad. Para lograr una óptima función es esencial y necesaria la contribución de las proteínas SP-B y SP-C (Lacaze-Masmonteil 2003, Pérez-Gil y Keough 1998).

Como se ha comentado anteriormente, se han aislado cuatro proteínas específicas consideradas como parte del surfactante pulmonar (Possmayer 1988): SP-A, B, C y D, que se pueden clasificar en dos grupos:

+ Hidrofílicas: SP-A y SP-D, que forman grandes estructuras macromoleculares.

+ Hidrofóbicas: SP-B y SP-C, que son proteínas pequeñas y muy hidrofóbicas, motivo por el cual son copurificadas con los componentes lipídicos del surfactante pulmonar en los extractos orgánicos que se obtienen tras el tratamiento con disolventes orgánicos.

La presencia de proteínas hidrofóbicas se describió por primera vez en preparaciones de surfactante porcino (Phizackerley et al. 1979). A partir del material lipoproteico que se obtiene tras la centrifugación de lavados broncoalveolares se aíslan solamente SP-A, B y C, que son por tanto proteínas fuertemente asociadas a las membranas del surfactante (Johansson y Curstedt 1997, Serrano y Pérez-Gil 2006), mientras que SP-D no está normalmente asociada a las membranas (Crouch 1998, Crouch y Wright 2001).

SP-A y **SP-D** son lectinas dependientes de Ca^{2+} y pertenecen a la familia de las colectinas, que principalmente participan en las reacciones del sistema inmune innato (Wright 2005, Orgeig et al. 2010). La SP-A se asocia a los complejos lipoproteicos del surfactante (Figura 9) y es también capaz de modificar y estabilizar ciertas estructuras de estas membranas (Palaniyar et al. 1999a y b) pero no es esencial para el comportamiento biofísico del surfactante (reducción de la tensión superficial). Además, parece ser responsable del espaciamiento entre membranas en la MT, situándose en las esquinas del entramado (McCormack y Whitsett 2002, Voorhout et al. 1991). En modelos animales en los que se ha inactivado la expresión de SP-A no se observan diferencias en cuanto a la composición fosfolipídica, secreción, tensioactividad y reciclaje del surfactante, comparado con los de animales control (Ikegami et al. 2001, Korfhagen et al. 1996). Sin embargo, la SP-A mejora la adsorción de los fosfolípidos promovida por las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C, al menos in vitro (Khubchandani y Snyder 2001, Schürch et al. 1992).

Al contrario de lo que ocurre con las proteínas hidrofóbicas, SP-A y SP-D siguen otras rutas de secreción independientes de las de los otros componentes del surfactante desde los cuerpos lamelares. Sin embargo, recientes evidencias han hecho considerar la posibilidad de que una

parte de la SP-A pueda también ensamblarse junto con los lípidos en los cuerpos lamelares (Fisher 2011).

In vivo, los ratones KO de SP-A y SP-D no sufren ningún tipo de disfunción respiratoria pero muestran una extraordinaria susceptibilidad a infecciones respiratorias (Botas et al. 1998, Haagsman y Diemel 2001, LeVine et al. 1997).

SP-B y **SP-C** son polipéptidos muy hidrofóbicos que se asocian de manera muy fuerte a los lípidos de las membranas del surfactante (Fig. 9) y promueven la formación y el comportamiento dinámico apropiado de las películas tensioactivas en la interfase aire-líquido (Pérez-Gil y Keough 1998, Possmayer et al. 2001). Ambas se producen como precursores mucho más grandes que se procesan a lo largo de la ruta de secreción por proteasas específicas, antes de ser empaquetadas en los cuerpos lamelares a partir de los cuales son secretadas al exterior (Beers y Mulugeta 2005, Korimilli et al. 2000, Pérez-Gil 2008).

La **SP-B** pertenece a la familia de las saposinas (*sphingolipid activator proteins*) que se conocen por su capacidad de perturbar bicapas lipídicas y de insertarse en las membranas (Bruhn 2005). Después del procesamiento proteolítico del precursor proSP-B, la SP-B madura forma homodímeros covalentes de monómeros de 8.7 kDa que contienen tres puentes disulfuro intramoleculares y uno intermolecular. Se desconoce la estructura tridimensional de la SP-B pero datos espectroscópicos y su homología con las saposinas permiten predecir la existencia de varios segmentos helicoidales anfipáticos que facilitan la interacción superficial de la proteína con la membrana y la orientación paralela de la SP-B con respecto a la bicapa (Cruz et al. 1998, Vandenbussche et al. 1992).

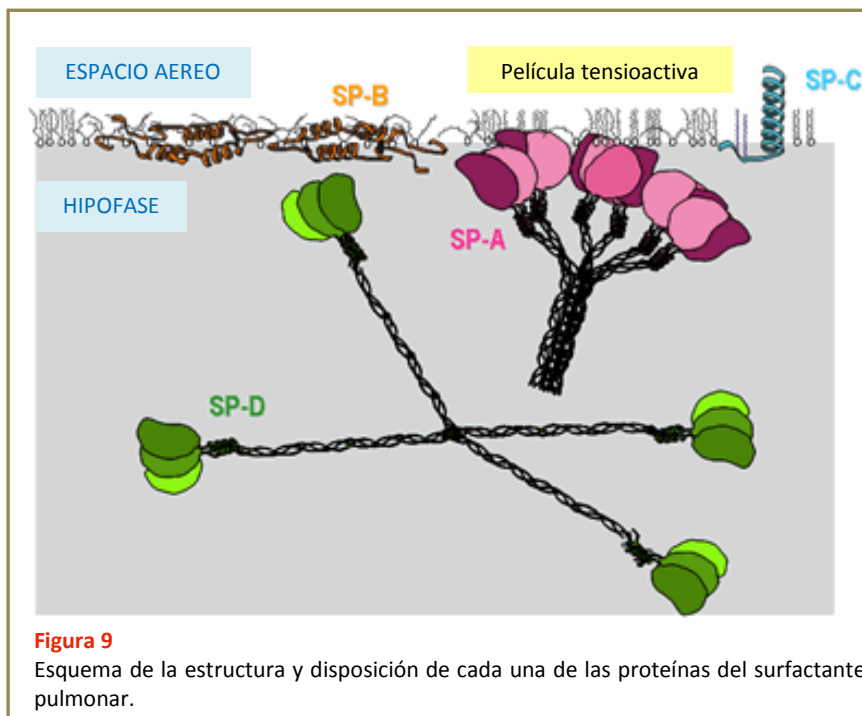


Figura 9
Esquema de la estructura y disposición de cada una de las proteínas del surfactante pulmonar.

Por su capacidad de perturbación del empaquetamiento lipídico, promoviendo el intercambio de fosfolípidos entre las estructuras del surfactante, la SP-B mejora la adsorción interfacial de los fosfolípidos, siendo la proteína del surfactante más activa en este sentido (Schürch et al. 2010). Además, modula las propiedades tensioactivas de la monocapa lipídica al favorecer aparentemente el enriquecimiento en DPPC durante la compresión (Brockman et al. 2003, Veldhuizen et al. 2000) y facilitar la re-extensión de la película tensioactiva durante la inspiración (Taneva and Keough 1994). Se ha sugerido que el dímero de SP-B podría hacer de puente entre bicapas o entre bicapas y monocapa, situando las caras hidrofóbicas de cada monómero en contacto con cada una de las membranas (Johansson y Curstedt 1997, Weaver 1998) (Figura 10). La SP-B podría favorecer la formación de una estructura curvada intermedia entre bicapas y monocapas, por lo que los lípidos podrían fluir de las vesículas a la interfase (Chavarha et al. 2010). La interacción bicapa-bicapa o bicapa-monocapa parece ser fundamental para el empaquetamiento de los fosfolípidos en los cuerpos lamelares y para su dinámica interfacial.

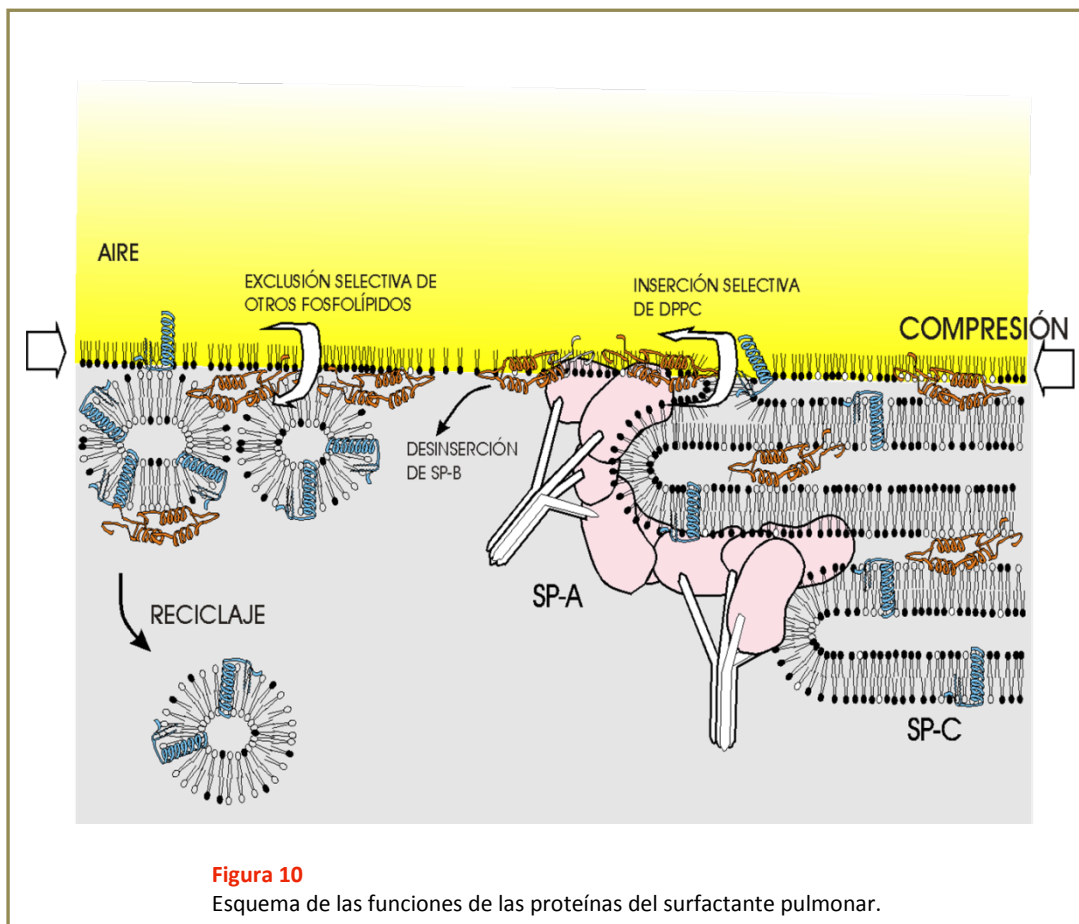


Figura 10
Esquema de las funciones de las proteínas del surfactante pulmonar.

La **SP-C** es la segunda proteína hidrofóbica del surfactante. Es más pequeña aún y más hidrofóbica que la SP-B. Consiste en un segmento helicoidal con disposición transmembrana en el extremo carboxilo-terminal y un segmento catiónico en la región amino-terminal. Además, en la mayoría de las especies analizadas, la SP-C está palmitoilada en las cisteínas 5 y 6. Hasta la fecha no se han descrito proteínas homólogas a la SP-C y parece ser la única proteína del surfactante que en el pulmón se expresa exclusivamente en neumocitos tipo II, ya

que las otras proteínas se expresan también en otros tipos celulares (Bourbon y Chailley-Heu 2001, Paananen et al. 2001a y b).

Aunque la función que la SP-C desempeña en la fisiología respiratoria no está perfectamente definida, estudios *in vitro* parecen sugerir que participa en la formación y re-extensión de las películas interfaciales (Veldhuizen y Haagsman 2000a). Para ello puede decirse que la SP-C tiene dos actividades esenciales: promover y mejorar la adsorción de fosfolípidos a la interfase aire-líquido (Oosterlaken-Dijksterhuis et al. 1991, Schürch et al. 2010) y favorecer el enriquecimiento de la monocapa en DPPC (Fig. 10), ya que durante la compresión la proteína resulta excluida de la monocapa y cada molécula de SP-C va acompañada de entre 8 a 10 moléculas de fosfolípido (Pérez-Gil y Keough 1998). Al igual que la SP-B, la SP-C podría contribuir a facilitar la formación de los intermedios necesarios para la fusión entre bicapas y monocapas (Chavarha et al. 2010). De esta manera, la SP-C promueve la formación de estructuras multilamelares asociadas a la interfase durante la compresión, que actuarían como reservorios de material tensioactivo desde donde se reinsertarían durante la inspiración. Este proceso resulta esencial para el mantenimiento de la película interfacial a lo largo de los sucesivos ciclos respiratorios.

Diferentes estudios biofísicos han demostrado que tanto la SP-B como la SP-C promueven la inserción de los lípidos en las películas interfaciales, la re-extensión de las películas durante la expansión (inspiración) y la reducción de la tensión superficial hasta valores cercanos a 0mN/m durante la compresión (Pérez-Gil y Keough 1998, Veldhuizen y Haagsman 2000a). Este incremento de la reinsertación y re-extensión de los fosfolípidos a la película interfacial tras el colapso se logra mediante interacciones entre las bicapas adyacentes y la monocapa interfacial mediadas por ambas proteínas (Pérez-Gil 2002, Walters et al. 2000). La falta de SP-B en ratones produce un fallo respiratorio irreversible poco después del nacimiento (Clark et al. 1995, Noguee 2004). Sin embargo, los ratones KO de SP-C sobreviven y tienen en primer término una función respiratoria normal aunque se observa una cierta disminución en la estabilidad mecánica de sus pulmones (Glasser et al. 2001). Se ha visto que la ausencia de SP-B resulta en un deficiente procesamiento de la proSP-C, con acumulación de un precursor parcialmente procesado de 8-12 kDa (Clark et al. 1995, Vorbroker et al. 1995). Parece por tanto, que para el correcto funcionamiento de los pulmones se requiere de la presencia de ambas proteínas, SP-B y SP-C, aunque aún es necesaria mayor experimentación para llegar a comprender el papel que juega cada una de estas proteínas en el ensamblaje y mantenimiento estructural de las películas interfaciales de surfactante pulmonar durante el ciclo respiratorio (inspiración-espирación).

Los experimentos en balanzas de superficie con monocapas que contienen diferentes proporciones de SP-B y/o SP-C han demostrado que las dos proteínas son importantes para facilitar las transiciones estructurales que sufren las películas de surfactante durante los ciclos de compresión-expansión. Cuando se someten películas de lípido puro a tales ciclos, el resultado es el colapso de la película y la pérdida irreversible de material a la hipofase (Hawco et al. 1981a, Palaniyar et al. 1999a). Mediante imágenes de AFM se pudo visualizar que la presencia de SP-B y SP-C induce la formación de los reservorios periféricos durante los estados de compresión que permanecen asociados a la interfase para reinsertarse de nuevo en la película durante la expansión (Kramer et al. 2000, Krol et al. 2000).

OBJETIVOS.

El complejo lipo-proteico del surfactante es fundamental para que se lleve a cabo el proceso respiratorio. Tanto la composición como la estructura molecular de las películas de surfactante están optimizadas de forma tal que su función principal, de reducir la tensión superficial a valores cercanos a 0-2 mN/m durante la compresión, no se vea afectada por las exigentes condiciones respiratorias.

Se han llevado a cabo numerosos estudios para tratar de descifrar las relaciones estructura-función de los diferentes componentes del surfactante pulmonar pero aún no se comprende cuál es el papel “específico” de cada uno de ellos. Varios de estos estudios fueron llevados a cabo en modelos lipídicos simplificados del surfactante por lo que el comportamiento “*in vivo*” muchas veces es inferido y quizás no está adecuadamente representado en su complejidad con respecto a las diversas condiciones impuestas por la dinámica respiratoria.

En este contexto, el **objetivo principal** planteado en esta Tesis ha sido el estudio de las relaciones estructura-función del surfactante pulmonar con atención particular a los efectos que provocan los cambios de temperatura.

Este objetivo general se ha abordado mediante los siguientes **objetivos específicos**:

- 1- Correlacionar la estructura lateral del surfactante en monocapas y en bicapas, tanto para sistemas lipídicos modelo como para el surfactante entero, y analizar su implicación en el comportamiento funcional.
- 2- Evaluar la funcionalidad del surfactante pulmonar frente a condiciones extremas como cambios en la temperatura susceptibles de producirse en el ámbito fisiológico.
- 3- Evaluar la funcionalidad del surfactante cuando se presentan cambios en la composición lipídica ó proteica, derivados de situaciones fisiopatológicas especiales.

El **objetivo 1** fue abordado en los **Capítulos I y II** de esta Tesis: “Funcionalidad del surfactante pulmonar frente a fluctuaciones térmicas” y “Efecto de la temperatura en las relaciones estructura-función del surfactante pulmonar.”

El **objetivo 2** fue tratado en el **Capítulo III**: “Efecto de la temperatura en la estructura y función del surfactante pulmonar de animales heterotermos.”

El **objetivo 3** fue estudiado en el **Capítulo IV**: “Estructura-función del surfactante pulmonar en modelos animales modificados genéticamente. Efecto de la temperatura y la deficiencia congénita de SP-C” y en el **Capítulo V**: “Relaciones estructura-función en el surfactante pulmonar de un modelo animal de surfactante modificado por dieta.”

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MATERIALES DE ORIGEN SINTÉTICO

Los fosfolípidos DPPC, POPC, POPG, PG y el lípido neutro colesterol empleados en esta Tesis fueron suministrados por Avanti Polar Lipids (Alabaster, EEUU). Todos fueron usados sin posterior purificación. Soluciones madre de cada lípido se prepararon por disolución de los mismos en Clf-MetOH 2:1 (v/v) de calidad HPLC.

Los disolventes orgánicos Clf y MetOH de grado HPLC fueron proporcionados por Scharlab (Barcelona, España).

El ácido L(+)-ascórbico y el molibdato amónico, necesarios para la reacción de cuantificación de fosfolípidos, así como la sacarosa y otros compuestos y reactivos utilizados fueron de calidad analítica y obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania).

Los geles de cromatografía Sephadex LH-20 y LH-60 fueron suministrados por Pharmacia (Uppsala, Suecia).

Las sondas fluorescentes LAURDAN y DPH fueron provistas por Molecular Probes Inc., actualmente Invitrogen (Eugene, OR, EEUU). El LAURDAN se disuelve y almacena en Clf/MetOH 2:1 (v/v) para marcar vesículas formadas a partir de lípidos sintéticos o EO ó en dimetilsulfóxido para su empleo en el marcaje de suspensiones de surfactante pulmonar nativo. El DPH se disuelve y almacena en MetOH.

Los marcadores de masa molecular para las electroforesis se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (California, EEUU).

2. MATERIALES DE ORIGEN NATURAL

2.1. Aislamiento y purificación del surfactante pulmonar porcino

El surfactante pulmonar nativo y sus fracciones derivadas se obtiene de lavados broncoalveolares de pulmones frescos de cerdo cedidos por el matadero municipal (Madrid). Una vez sacrificados los animales, se extraen los pulmones y se conservan en hielo durante el transporte al laboratorio donde inmediatamente se procede al aislamiento de una fracción enriquecida en lípidos y proteínas del surfactante utilizando el método publicado por Curstedt y colaboradores en 1987 (Curstedt et al. 1987) que posteriormente fue modificado y optimizado en el laboratorio donde se desarrolló esta Tesis (Pérez-Gil et al. 1993).

El lavado broncoalveolar (LBA) se obtiene mediante lavados sucesivos de los pulmones con una solución salina 5mM Tris-150mM NaCl a 4 °C y pH 7 que es instilada por la tráquea (Figura 1). Se emplean 2-2,5 L de solución por par de pulmones. Tras realizar un suave masaje en la superficie de los pulmones hinchados por la solución para lograr una mayor liberación del surfactante, se recolecta el lavado y se filtra con una gasa. Este lavado se somete a centrifugaciones sucesivas, la primera a 1000g a 4 °C durante 5 minutos para separar células y restos de tejido. El sobrenadante se recoge y se filtra con una gasa. Si no se va a emplear en el momento se almacena y conserva el LBA a -20 °C. La segunda centrifugación se realiza a 100.000g a 4 °C durante 1 hora. El sedimento que se obtiene está formado por los agregados grandes del surfactante pulmonar, donde se encuentran mayoritariamente los cuerpos

lamelares, la mielina tubular y otros componentes de tipo membranoso específicos del surfactante, responsables de una mayor actividad tensioactiva. El sobrenadante que se obtiene se puede conservar si se desea trabajar con los agregados pequeños del surfactante pulmonar.

Los sedimentos obtenidos se recolectan y homogenizan. Para conseguir un material totalmente limpio de posibles contaminantes sanguíneos se realiza una ultracentrifugación en un gradiente de densidad discontinuo preparado a partir de soluciones 16%, 13% y 0% de bromuro de sodio en solución salina de NaCl 0,15M. El material a centrifugar se sitúa en el fondo del gradiente, diluido en la solución al 16%. La centrifugación se realiza a 120.000g a 4 °C durante 2 horas y sin freno para no romper el gradiente.

El surfactante purificado se recoge de la interfase entre el 0% y 13% y se homogeniza en solución salina. Usualmente de cada 1,5 L de LBA se obtienen entre 7 y 10 mL de una suspensión blanquecina y densa que es el surfactante pulmonar nativo (SN) que se almacena en alícuotas de cantidad variable a -80 °C.

2.2. Aislamiento del EO del surfactante pulmonar

El SN almacenado a -80 °C se descongela y se realiza una extracción orgánica siguiendo un método similar al descrito por Bligh y Dyer (Bligh y Dyer 1959). En primer lugar se añade a la muestra un volumen equivalente de cloroformo y dos volúmenes de metanol, se agita en vórtex durante 30 segundos (se forma un sistema monofásico) y se introduce en un baño a 37-40 °C durante 30 minutos (para inducir la floculación de las proteínas). Al cabo de este tiempo se añade un volumen de agua y otro de cloroformo, se agita vigorosamente durante medio minuto y se centrifuga a 2000-3000g, a 4 °C, durante 5 minutos en una centrífuga de mesa para obtener así un sistema bifásico. De éste se extrae la fase orgánica que contiene los lípidos y proteínas hidrofóbicas del surfactante pulmonar. La fase acuosa se lava dos veces más añadiendo dos volúmenes de cloroformo y repitiendo la centrifugación y separación de la fase orgánica. Las fases orgánicas recogidas se lavan con KCl 0,15M, empleando un volumen aproximado correspondiente al 25% del volumen total reunido. Se agita y centrifuga como en los pasos anteriores. La nueva fase orgánica extraída se concentra en rotavapor hasta un volumen aproximado de 2 mL. Este material obtenido constituye el EO del surfactante pulmonar nativo y se almacena a -20 °C en Clf/MetOH 2:1 (v/v).

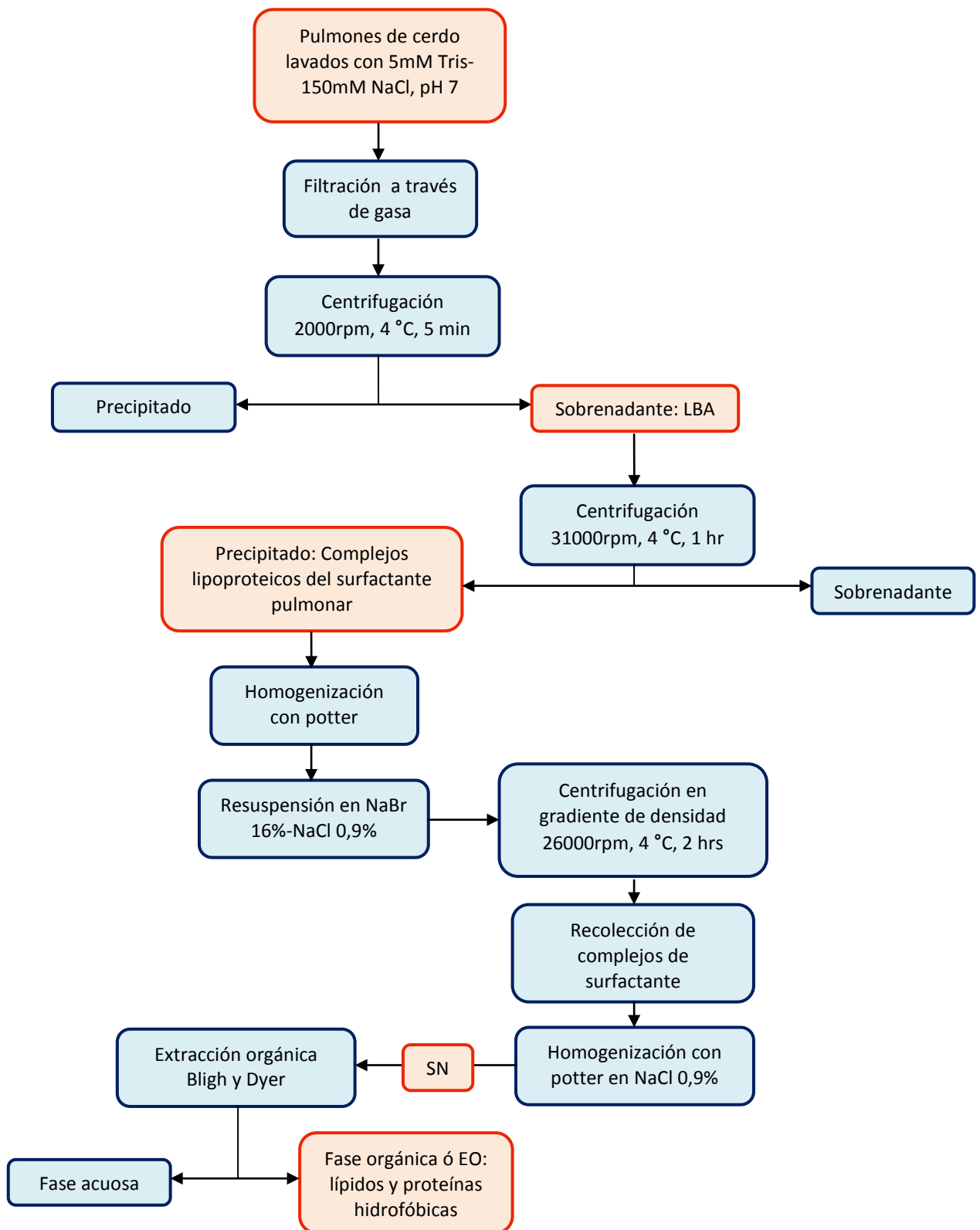


Figura 1
Esquema del protocolo de aislamiento del surfactante pulmonar nativo y su extracto orgánico a partir de pulmones de cerdo.

2.3. Purificación del surfactante pulmonar no porcino

Estas muestras fueron suministradas por diferentes laboratorios con los que se han realizado trabajos en colaboración.

- Surfactante de Dunnarts

Los *dunnarts* (*Sminthopsis crassicaudata*) son mamíferos heterotermos, de la familia de los marsupiales, oriundos de Australia, que tienen la capacidad de entrar en letargo, es decir, entrar en un estado metabólico disminuido como resultado de cambios en el entorno como falta de agua o alimento y cambios de temperatura. Durante este estado de letargo la temperatura corporal de los animales decae de 35-37 °C hasta aproximadamente 23 °C.

Las muestras de lavado alveolar en estado liofilizado fueron suministradas por la Doctora Sandra Orgeig del “Sansom Institute for Health Research” de la Universidad del Sur de Australia en Adelaida. Éstas se resuspenden en un volumen adecuado de agua bidestilada, que se obtiene mediante dos procesos, primero desionizada a calidad MiliQ en un sistema Millipore y posteriormente destilada en presencia de permanganato de potasio (Cruz y Pérez-Gil 2007) y se centrifugan a 100.000g a 4 °C durante 1 hora. Se descartan los sobrenadantes y se vuelven a resuspender los precipitados en disolución salina 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7. Se realiza una segunda centrifugación en las mismas condiciones que la primera y se descartan nuevamente los sobrenadantes. Los precipitados finales se resuspenden en disolución salina 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7 y se almacenan en alícuotas a -80 °C.

- Surfactante de Murciélagos

Los murciélagos analizados (*Chalinolobus gouldii*) son mamíferos heterotermos que tienen la capacidad de entrar en letargo durante el día y son activos durante la noche. Experimentan así ritmos circadianos térmicos que oscilan entre los 37 y los 23-25 °C.

Las muestras de lavado broncoalveolar en estado liofilizado fueron suministradas también por la Doctora Orgeig, de la Universidad del sur de Australia en Adelaida. Éstas se resuspenden en un volumen adecuado de disolución salina 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7 y se almacenan en alícuotas a -80 °C.

- Surfactante de Ardillas

Las ardillas analizadas en este estudio (*Ictidomys tridecemlineatus*) son mamíferos heterotermos que tienen la capacidad de entrar en un estado de letargo profundo o hibernación durante el invierno, en el que su temperatura corporal decae por debajo de los 10 °C. Durante este período, las ardillas experimentan un ritmo respiratorio lento y episódico, interrumpido periódicamente por breves períodos de vigilia.

Las muestras de surfactante que corresponden a los “agregados grandes” fueron proporcionadas por el Doctor Ruud Veldhuizen del “Lawson Research Institute” de la Universidad de Western Ontario (Ontario, Canada). Las muestras fueron estudiadas sin posterior tratamiento.

- Surfactante de Ratones

Los ratones estudiados en esta Tesis fueron modificados genéticamente de forma tal que no son capaces de expresar la proteína SP-C del surfactante pulmonar (SP-C knock-out).

Los precipitados que contienen los complejos lipoproteicos del surfactante de ratones control (SP-C +/+) y de ratones knock-out (SP-C -/-) fueron suministrados por el Doctor Timothy Weaver del “Children’s Hospital Medical Center” (Cincinnati, EEUU). En primera instancia se recibieron pellets de un pool de 20 animales de cada condición. Éstos se resuspenden en NaBr 16%-NaCl 0,9% y se realiza una ultracentrifugación en un gradiente de densidad discontinuo como se hace para purificar el surfactante pulmonar porcino. Una vez extraído el surfactante de la interfase, éste se centrifuga a 100.000g a 4 °C durante 1 hora para lavar la muestra y eliminar el bromuro. Los precipitados finales se resuspenden con solución salina de NaCl 0,9% y se almacenan en alícuotas a -80 °C.

En una segunda fase se obtuvieron precipitados de lavados de animales individuales. Para evitar la pérdida de material al hacer el gradiente de densidad, en este caso las muestras fueron tratadas de manera distinta. Se resuspende cada precipitado en un volumen adecuado de agua bidestilada (Cruz y Pérez-Gil 2007) y se centrifuga a 120.000g a 4 °C durante 1 hora. Se descartan los sobrenadantes y se resuspenden los precipitados nuevamente en agua bidestilada. Se realiza una segunda centrifugación en las mismas condiciones que la primera y se descarta nuevamente el sobrenadante. Los precipitados finales se resuspenden en solución salina de NaCl 0,9% y se almacenan en alícuotas a -80 °C.

- Surfactante de Ratas

Se ha estudiado en esta Tesis el surfactante de ratas sometidas a diferentes dietas lipogénicas, que tiene como resultado una composición fosfolipídica modificada.

Las muestras en forma de lavados broncoalveolares congelados fueron suministradas por el Doctor Wolfgang Bernhard de la “Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen” (Tübingen, Alemania). Los lavados son descongelados y se centrifugan a 50.000g a 4 °C durante 1 hora. Los sobrenadantes que corresponden a los “agregados pequeños” del surfactante pulmonar se recogen y almacenan en tubos falcon de 15 mL congelados a -80 °C. Los precipitados ó “agregados grandes” del surfactante pulmonar se resuspenden en solución salina de NaCl 0,9% y se almacenan en alícuotas a -80 °C.

3. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.1. Cuantificación de fosfolípidos

Se realiza por valoración de fósforo según el método de Rouser y colaboradores (Rouser et al. 1966). Se secan las muestras, se les añade ácido perclórico al 70% (0,45 mL) y se incuban en baño de arena a 250-260 °C durante 30 minutos para conseguir la mineralización del fósforo. Transcurrido ese tiempo se dejan enfriar los tubos y se agregan 3,50 mL de agua miliQ, 0,50 mL de molibdato de amonio (2.5% p/v) y 0,50 mL de ácido ascórbico (10% p/v) a cada muestra. Se agitan los tubos con vórtex y se incuban 7 minutos en agua hirviendo. La reacción se detiene por inmersión de los tubos en agua con hielo y se mide la absorbancia del producto coloreado

que se forma en presencia de fósforo a 820nm en un espectrofotómetro *Beckman DU-640*. Para determinar la concentración de fosfolípido de las muestras, la absorbancia obtenida se interpola en una recta patrón realizada a partir de una solución estándar de concentración conocida de fosfato inorgánico (KH_2PO_4 0,05 mg/ml).

3.2. Cuantificación de colesterol

Para la cuantificación de colesterol se emplea un kit comercial de Spinreact (Gerona, España) basado en el método descrito por Allain y colaboradores (Allain et al. 1974), posteriormente modificado por Roeschlau y colaboradores (Roeschlau et al. 1974). Este método determina la concentración de colesterol total, incluyendo los ésteres de colesterol. Consiste en un ensayo colorimétrico de tres etapas cinético-enzimáticas:

- 1- Hidrólisis de los ésteres de colesterol a colesterol por la colesterol esterasa.
- 2- Oxidación del grupo hidroxilo del colesterol a un grupo cetona por la colesterol oxidasa, liberando agua oxigenada.
- 3- Generación de un producto coloreado por la peroxidasa. Esta enzima usa como sustrato el agua oxigenada liberada en la reacción anterior para producir, a partir del reactivo proporcionado por el kit comercial (ácido benzoico y una piridina), un producto coloreado.

Se mide la absorbancia de la muestra y de un patrón de concentración conocida de colesterol (proporcionado por el kit) a 505 nm en un espectrofotómetro *Beckman DU-640*. El intervalo de linealidad en la detección de colesterol según este procedimiento es de 0 a 20 mmoles/L.

3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La presencia o ausencia de las proteínas hidrofóbicas en los diferentes surfactantes estudiados, se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS siguiendo el método descrito por Laemmli (Laemmli 1970). Como los controles de proteína purificada se encuentran en Clf/MetOH, primero se evapora el disolvente bajo una corriente de nitrógeno antes de añadir el tampón de carga. Las muestras son incubadas 5 minutos a 100 °C con el tampón de carga que contiene glicerol al 50%, Tris 250 mM, SDS 10%, con o sin β -mercaptoetanol al 20% como agente reductor, y azul de bromofenol como marcador del frente de electroforesis, a pH 6.8. Un volumen de 15 μL de muestra se carga en cada pocillo del gel polimerizado con una concentración de acrilamida del 16% y la electroforesis se desarrolla en una cubeta *Mini-Protean II* de Bio-Rad®, utilizando un amperaje constante de 25mA por gel. En uno de los pocillos del gel se aplica también el marcador preteñido de bajo peso molecular “Kaleidoscope” de Bio-rad.

3.4. Transferencia de proteínas a nitrocelulosa

Para detectar e identificar las proteínas que fueron sometidas a electroforesis se realiza una transferencia desde el gel a una membrana de PVDF (polivinilo difluoruro, Amersham), utilizando un sistema *Transfer-Blot SD* (Bio-Rad) mediante el método húmedo.

La hidratación de la membrana se realiza primero en MetOH y después en agua, sumergiéndola finalmente en el tampón Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20% a pH 8.3. La transferencia se realiza durante una hora a un amperaje constante de 300 mA.

3.5. Inmunodetección de proteínas

Finalizada la transferencia se sumerge la membrana en PBS-Tween 0,05%. La Inmunodetección o western-blot se realiza a vacío con el sistema SNAP (Millipore). Sobre la membrana se añaden 30 mL de disolución de bloqueo (leche descremada al 0,05% (p/v) en PBS-T) y tras lavar tres veces con PBS-Tween 0,05% se incuba durante 10 minutos con 3 mL del anticuerpo primario anti-SP-B ó anti-SPC (Sevenhills Bioreagents) en una dilución 1:7000 en PBS-Tween. Transcurrido ese tiempo la membrana se lava tres veces con PBS-Tween 0,05% y se incuba otros 10 minutos con el anticuerpo secundario anti-rabbit (Sta. Cruz Biotechnology) en una dilución 1:10000 en PBS-Tween. Por último se lava cuatro veces con PBS-T y se revela el western-blot con una solución comercial de ECL (enhanced chemiluminiscent) de Millipore.

4. MÉTODOS INTERFACIALES

4.1. Balanzas de superficie

Son equipos que permiten medir la tensión o presión superficial de un líquido en función del área que ocupa la interfase aire-líquido. Existen varios modelos, pero en este trabajo se han empleado dos tipos de balanzas fabricadas exprofeso por Nima Technology (Coventry, Inglaterra) para el estudio de las propiedades funcionales de las preparaciones de lípidos sintéticos o surfactante (Figura 2).

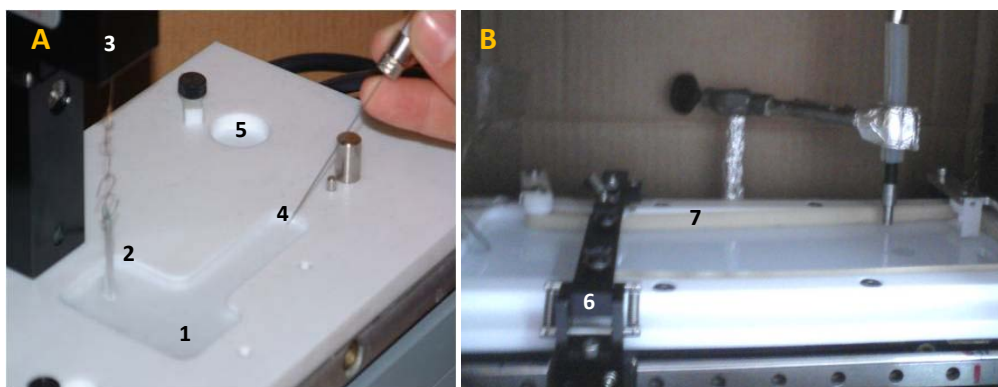


Figura 2

Imágenes de los dos tipos de balanzas de superficie empleadas en la realización de los experimentos de actividad superficial.

A- Balanza utilizada en los experimentos de extensión y adsorción interfacial de surfactante. Cubeta en forma de L (1), placa de Wilhelmy (2), sensor de presión superficial (3), orificio de inyección (4), microcubeta pocillo (5).

B- Balanza empleada en la obtención de isothermas de compresión. Barrera móvil (6) que permite modificar el área encerrada por la cinta (7).

La balanza empleada en la obtención de isotermas de compresión (Figura 2B) es un modelo modificado de la originalmente ideada por Langmuir (Langmuir 1920). Este nuevo modelo sustituye el sistema clásico de barreras móviles para modificar el área de la superficie en la que se confina la película interfacial por una cinta de perímetro continuo (Roberts et al. 1981). La medida de la tensión superficial en esta balanza se lleva a cabo según el método de Wilhelmy (Wilhelmy 1863) que consiste en la determinación directa de la fuerza debida a la tensión superficial que se ejerce sobre un objeto suspendido cuando es sumergido parcialmente dentro de un fluido.

Está compuesta por una cubeta termostatazada de teflón de 200 mL de capacidad donde se dispone la subfase acuosa, sobre la cual se deposita el material anfipático que forma la película surfactante. Una cinta móvil recubierta por una capa de teflón vitrificado permite modificar el área disponible para comprimir o expandir la película interfacial que queda contenida dentro de esta barrera. Para la detección de la tensión superficial se emplea una bandera de papel Whatman #1 (conocida como placa de Wilhelmy) que se mantiene en continuo contacto con la superficie del líquido. Ésta se acopla a un sensor de fuerzas que se calibra de forma tal que proporcione el valor de presión superficial ($\pi = \gamma_{H_2O} - \gamma_{muestra}$) en cada momento en relación a la superficie acuosa limpia.

Para los estudios de extensión y adsorción interfacial de surfactante se emplea otra balanza especialmente diseñada para tal fin. Está formada por dos microcubetas termostatazadas, una en forma de pocillo de 1,5 mL de capacidad y la otra con forma de L y 5mL de capacidad (Figura 2A). Las medidas de tensión superficial se obtienen de igual manera que en la balanza anteriormente descrita, empleando una bandera de papel de filtro como placa de Wilhelmy en contacto con la superficie del líquido. Ambas cubetas poseen un sistema de termostatación conectado a un baño Ecoline RE 204 de LAUDA (Alemania) para controlar la temperatura durante el experimento.

Los ensayos en balanzas de superficie son altamente sensibles a la presencia de trazas de compuestos tensioactivos en la subfase (Schenkel y Kitchener 1958), por lo que en todos los experimentos de este tipo la cubeta de la balanza es llenada con disolución salina 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7 preparada con agua bidestilada (Cruz y Pérez-Gil 2007).

4.2. Películas de Langmuir

Son las películas que originan las moléculas hidrofóbicas (insolubles en agua) que forman una capa monomolecular orientada en la interfase aire-agua cuando se deposita el material de estudio directamente sobre dicha interfase. El estricto confinamiento interfacial permite su estudio en condiciones de empaquetamiento lateral controlado (Adamson y Gast 1997). Esta técnica se utiliza además para simular el comportamiento de sistemas de membranas biológicas, asumiendo que una monocapa de fosfolípidos mimetiza adecuadamente las propiedades de cada hemicapa de una membrana fosfolipídica.

Teniendo en cuenta que una de las funciones del surfactante es la formación de películas tensioactivas, la utilización de monocapas fosfolipídicas de Langmuir, en las que se puede monitorizar de forma continua la tensión superficial según se varían las condiciones del

entorno, ha contribuido de manera fundamental a la elaboración de los modelos que explican el papel del surfactante en la dinámica respiratoria.

Mediante el estudio de películas interfaciales de surfactante pulmonar se ha podido analizar cómo los diversos componentes de este sistema se organizan en la interfase (estudios estructurales), cómo se orientan y redistribuyen en función del área disponible por molécula (estudios dinámicos), y cómo actúan frente a la acción de agentes que favorecen o inhiben la función tensioactiva (estudios de interacción lípido-lípido y lípido-proteína), etc (Notter 2000). La aplicación de la técnica de superficie al estudio del surfactante pulmonar fue iniciada por Clements (Clements 1957, Clements et al. 1961). Desde entonces su aplicación ha seguido aportando nuevos datos sobre las relaciones estructura-función del surfactante.

En el presente trabajo las balanzas de superficie se han empleado para realizar los siguientes tipos de experimentos:

-Isotermas de compresión de películas interfaciales constituidas por lípidos sintéticos, SN y EO a diferentes temperaturas de subfase

El análisis de la presión superficial (π) en función de las variaciones de área (A) disponible en la interfase aire-líquido a temperatura constante constituye un experimento típico para caracterizar la estructura y organización de las películas interfaciales. La presión superficial es la diferencia entre la tensión superficial de la subfase acuosa (medida en ausencia de material) y la obtenida en presencia del material de estudio. Las isotermas del tipo π -A obtenidas son características de cada molécula y se ven afectadas por diferentes factores como la temperatura, la composición de la subfase o la fuerza iónica (Roberts 1990). La reducción progresiva del área disponible para las moléculas en la interfase produce reorganizaciones de la estructura y empaquetamiento de las mismas dando lugar a transiciones de fase bidimensionales que son función del área por molécula disponible en la monocapa (Adamson y Gast 1997).

Las isotermas π -A del tipo representado en la Figura 3 se obtienen con el fin de caracterizar la estructura y organización de las películas interfaciales de lípidos sintéticos o de surfactante nativo y su extracto orgánico.

La balanza de superficie empleada en estos estudios es la que se muestra en la Fig. 2B. La cubeta de teflón es llenada con disolución salina 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7 preparada con agua bidestilada. Se termostatiza la subfase a la temperatura de estudio deseada y se deja equilibrar por un lapso de 15 minutos para asegurar la saturación con vapor de agua de la capa de aire inmediatamente en contacto con la subfase. Posteriormente la alícuota correspondiente de la muestra a ensayar se deposita en la interfase aire-líquido. Transcurridos 15 minutos para permitir la completa evaporación del disolvente y la completa distribución y reorganización del material en la interfase, se procede a comprimir la película formada a una velocidad constante de 60 cm²/min, hasta alcanzar la presión de estudio deseada. En estas condiciones se procede a registrar espectros de emisión de fluorescencia (ver punto 5.3.2.)

-Adsorción interfacial de SN a diferentes temperaturas

La capacidad del surfactante pulmonar para transferir de manera muy rápida y eficiente las moléculas fosfolípicas tensioactivas desde las membranas a la interfase aire-líquido se evidencia a partir de la expansión de las suspensiones lipoproteicas sobre la interfase. Para ello se emplea la balanza que posee una cubeta de teflón de 5mL de capacidad en la que se dispone disolución salina 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7. Las diferentes suspensiones de surfactante a ensayar se aplican directamente sobre la interfase con una microjeringa Hamilton en un extremo de la cubeta opuesto al lugar en el que se dispone el sensor de presión (Fig. 2A). La monitorización de los cambios de presión superficial con el tiempo permite detectar cómo el material es progresivamente transferido y se distribuye por toda la interfase. Los ensayos típicos se realizaron aplicando 10 microgramos de material directamente en la interfase a temperaturas entre 10 y 55 °C.

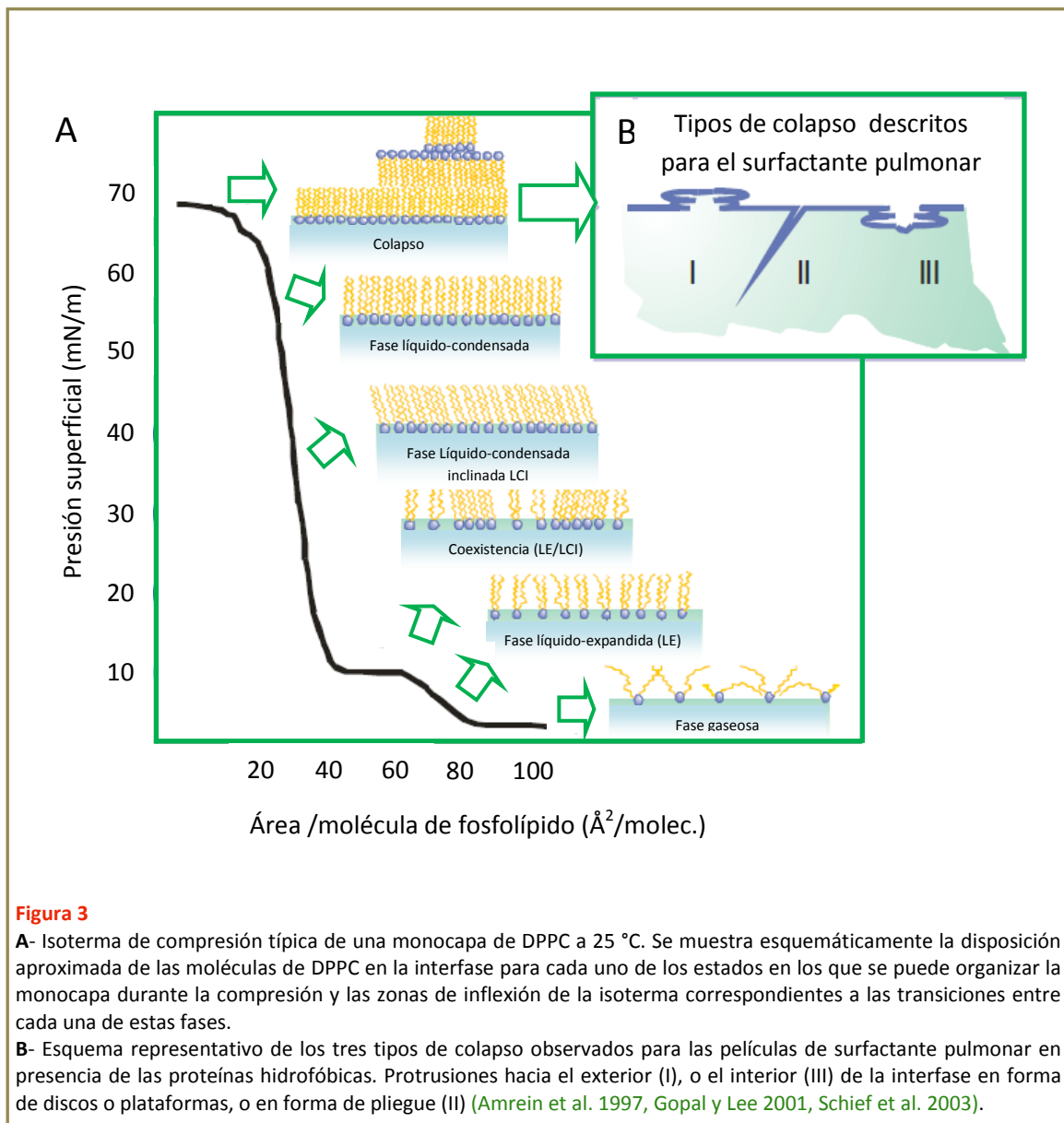


Figura 3

A- Isotherma de compresión típica de una monocapa de DPPC a 25 °C. Se muestra esquemáticamente la disposición aproximada de las moléculas de DPPC en la interfase para cada uno de los estados en los que se puede organizar la monocapa durante la compresión y las zonas de inflexión de la isoterma correspondientes a las transiciones entre cada una de estas fases.

B- Esquema representativo de los tres tipos de colapso observados para las películas de surfactante pulmonar en presencia de las proteínas hidrofóbicas. Protrusiones hacia el exterior (I), o el interior (III) de la interfase en forma de discos o plataformas, o en forma de pliegue (II) (Amrein et al. 1997, Gopal y Lee 2001, Schief et al. 2003).

5. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

5.1. En cubeta

5.1.1. Preparación de vesículas multilamelares (MLV's) con LAURDAN

Las MLV's lipídicas o lipoproteicas se obtienen mediante el método de evaporación-rehidratación. Para esto se cuenta con soluciones madre de cada uno de los lípidos a ensayar o del extracto orgánico del surfactante y de la sonda en Clf/MetOH 2:1 (v/v). Se deposita en el fondo de un tubo de ensayo la cantidad adecuada del lípido o lípidos (en el caso de mezclas complejas) que se quieren estudiar o del EO de surfactante junto con la sonda LAURDAN (en proporción del 1% con respecto a la masa de fosfolípido). A continuación se secan las muestras bajo flujo de N₂ y posteriormente en vacío en UNIVAP durante 2 horas con el fin de eliminar las trazas de disolvente orgánico. Para obtener las suspensiones multilamelares la película seca se rehidrata en agua bidestilada o en tampón 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7 empleando un agitador termostatizado. Las muestras se incuban durante una hora a 45 °C agitando vigorosamente 5 minutos cada 10 minutos. A lo largo del proceso de reconstitución se mantuvo la temperatura por encima de la de transición de fase del correspondiente lípido o mezcla lipídica empleada.

En el caso de muestras acuosas como el surfactante pulmonar, la sonda LAURDAN se incorpora a partir de soluciones concentradas en DMSO, agregándose directamente a la suspensión una traza de sonda en DMSO con una microjeringa Hamilton en constante agitación en vórtex. Posteriormente se deja reposar la muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz para permitir que el LAURDAN se distribuya homogéneamente en las membranas. Es importante destacar que las moléculas de LAURDAN que no se insertan y que permanecen en solución no emiten fluorescencia ya que ésta sonda sólo emite si se encuentra inmersa en un entorno hidrofóbico.

En todos los casos la sonda es agregada manteniendo la relación lípido-sonda en torno al 1% (mol/mol) y la concentración final de fosfolípido en las suspensiones a estudiar es de 10 µg/mL.

5.1.2. Espectros de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia del LAURDAN en suspensiones lipídicas o lipoproteicas se obtuvieron en un espectrofluorímetro modelo *Aminco-Bowman Series 2 luminescence spectrometer* equipado con celda termostatizada ($\pm 0,1$ °C) (Thermo Spectronic, Waltham, MA, EEUU) y cubetas de cuarzo de 5x5 mm de paso óptico. La longitud de onda de excitación empleada fue de 370 nm y se registraron los espectros de emisión en el rango de 400-550 nm a razón de 1 nm por segundo.

5.1.3. Análisis de datos: función de polarización generalizada del LAURDAN

La emisión del LAURDAN es típicamente azul en los entornos deshidratados, como los que provee la región de las cabezas polares de los fosfolípidos en el estado gel, pero se desplaza al verde en el estado líquido-cristalino que provee un entorno más hidratado (Parasassi et al. 1990 y 1991).

Para cuantificar los cambios en la emisión de fluorescencia la función de polarización generalizada (GPF) se definió de manera análoga a la función de polarización de fluorescencia:

$$GPF = (I_B - I_R) / (I_B + I_R)$$

en donde las orientaciones paralela y perpendicular del polarizador fueron reemplazadas por las intensidades de emisión de fluorescencia a longitudes de onda en el extremo azul y rojo del espectro de emisión (I_B e I_R respectivamente) (Parasassi et al. 1990 y 1991).

Es importante destacar que para la medición de GPF en este trabajo no se han empleado polarizadores. Esta función, bien caracterizada, es sensible a los procesos de relajación dipolar del agua en las membranas lipídicas (Bagatolli y Gratton 2001).

5.1.4. Preparación de vesículas con DPH

A partir de soluciones madre de cada uno de los lípidos a ensayar en Clf/MetOH 2:1 (v/v) y de la sonda DPH en MetOH, las MLV's se obtienen mediante el método de evaporación-rehidratación como en el caso anterior. Para obtener las suspensiones multilamelares la película seca se rehidrata en agua bidestilada o en tampón 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7 como se ha explicado anteriormente. Las muestras se incuban protegidas de la luz durante una hora a 45 °C agitando vigorosamente 10 minutos cada 5 minutos.

Cuando se emplea surfactante pulmonar, el DPH se agrega directamente a la suspensión en una traza de solución metanólica, con una jeringa de tipo Hamilton, manteniendo la muestra en constante agitación en vórtex. Posteriormente se incuban las vesículas, protegidas de la luz, durante una hora a 45 °C agitando vigorosamente 10 minutos cada 5 minutos.

La sonda es agregada manteniendo una relación lípido-sonda del 0,5% (mol/mol) y la concentración final de fosfolípido en las suspensiones a estudiar es de 500 µg/mL.

Una vez obtenidas las vesículas y antes de recopilar los espectros se realizan dos sonicaciones sucesivas de 2 minutos cada una en un sonicador de vástago modelo UP 200S a 65% de amplitud y 0,6 ciclos para obtener una suspensión de vesículas de tamaño uniforme.

5.1.5. Medición de anisotropía

Las medidas de anisotropía de fluorescencia del DPH se obtuvieron en un fluorímetro modelo *Aminco-Bowman Series 2 luminescence spectrometer* equipado con polarizadores *Glam prism* y una celda termostatzada ($\pm 0,1$ °C) (Thermo Spectronic, Waltham, MA, EEUU). Para todas las mediciones se usan cubetas de cuarzo de 5x5 mm de paso óptico (Saenz et al. 2006). Las longitudes de onda de excitación y emisión empleadas fueron de 360 y 430 nm respectivamente. La intensidad de fluorescencia emitida en orientación paralela y perpendicular al haz de luz de excitación se recolecta 10 veces en cada sentido para cada muestra y posteriormente estos valores son promediados. La intensidad del fondo que proporcionan las vesículas sin sonda es restada a cada registro de intensidad de fluorescencia.

5.1.6. Análisis de datos: Anisotropía

La anisotropía "r" se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$r = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2GI_{\perp}}$$

en donde I_{\parallel} e I_{\perp} son las intensidades de emisión de fluorescencia polarizada en orientación paralela y perpendicular, respectivamente, con respecto a la luz de excitación polarizada verticalmente y G es un factor de corrección del monocromador.

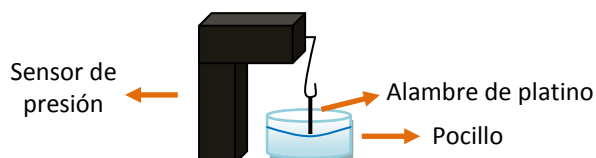
5.2. En placas multipocillo o microplacas

5.2.1. Formación de películas interfaciales

Estos experimentos se realizaron en placas multipocillo de 6 ó 12 pocillos. Cada pocillo es llenado con disolución salina 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7 a razón de 2 mL/pocillo en las de 12 y 3 mL/pocillo en las de 6. Posteriormente pequeñas alícuotas (en orden creciente) de una solución de DPPC 0,1 mg/mL en Clf/MetOH 2:1 (v/v), con o sin 5 μ L de una solución de LAURDAN 0,1 mg/mL en el mismo disolvente, se depositan con una microjeringa Hamilton en la superficie de la subfase salina, cuidando de no mover la placa ni de sumergir la jeringa. Es necesario dejar evaporar el disolvente por un lapso de 10 minutos antes de realizar cualquier tipo de medición.

5.2.2. Medición de presión superficial

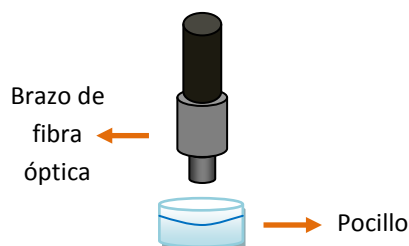
La presión superficial correspondiente a las cantidades crecientes de DPPC depositadas en superficie se mide con un alambre de platino conectado a un sensor de presión superficial de una balanza de superficie (Nima Technology, Inc., Coventry, UK).



5.2.3. Medición de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia del LAURDAN en las películas interfaciales formadas en cada uno de los pocillos se obtienen en un espectrofluorímetro del tipo “contador de fotones” (photon-counting), modelo *Horiba Jobin Yvon (HJY) Fluoromax II photon counting spectrofluorimeter* (Longjumeau, Francia) equipado con una lámpara de xenón 150-W (Osram) y un adaptador HJY F-3000 de la fibra óptica al compartimento de medición de las microplacas. Un brazo de fibra óptica bifurcado es el que permite detectar la fluorescencia de las muestras que se hallan dentro del lector de placas HJY Micromax 384 microwell-plate reader (<http://www.jobinyvon.com/MicroMax/>) ya que conduce la luz hasta y desde las microplacas. La longitud de onda de excitación empleada fue de 370 nm y se registran los espectros de emisión en el rango de 430-540 nm. Para eliminar todo tipo de luz espuria que pudiera interferir en la medición de fluorescencia, se empleó un filtro 290-420 nm bandpass (Schott

UG-1) en el camino de la luz de excitación y un filtro 420 nm long pass (Schott GG-420) en el de la luz de emisión. Todas las mediciones se realizan a 25 ± 1 °C.



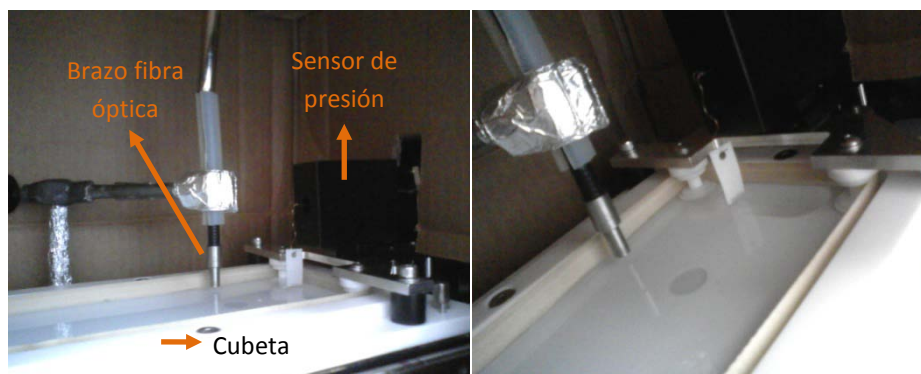
5.3. En balanza de superficie

5.3.1. Formación de películas de tipo Langmuir

Soluciones de cada uno de los lípidos o mezclas lipídicas a ensayar marcados con la sonda LAURDAN (relación lípido-sonda del 1% mol/mol) en Clf/MetOH 2:1 (v/v) se emplearon para formar películas interfaciales por extensión del material directamente sobre la superficie de la subfase acuosa de la balanza, previamente termostatzada a la temperatura de trabajo deseada (para más detalles ver apartado 4).

5.3.2. Isotermas de compresión y medición de fluorescencia

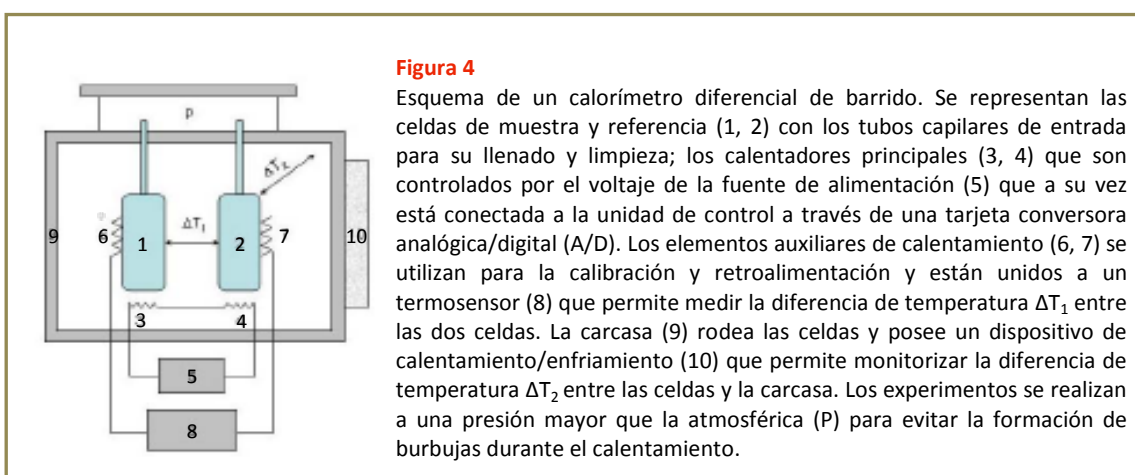
La balanza de superficie empleada en estos estudios se dispuso dentro de una cámara, diseñada de forma casera por la autora de este trabajo, para asegurar la protección de la muestra (y por ende de las mediciones de fluorescencia) de cualquier tipo de luz externa interferente y además para conseguir la adecuada saturación de humedad. La cubeta de la balanza es llenada con disolución salina 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7 preparada con agua bidestilada. Se termostatiza la subfase a la temperatura de estudio deseada y se deja equilibrar por un lapso de 15 minutos para asegurar la saturación del aire con vapor de agua. Posteriormente, una alícuota adecuada de la mezcla lípido/LAURDAN en disolvente orgánico, o en su defecto del surfactante nativo/LAURDAN, se deposita en la interfase aire-líquido. Transcurridos 15 minutos para permitir la completa evaporación del disolvente y el equilibrado de la película formada, se procede a comprimir paso a paso la monocapa a una velocidad constante de $60 \text{ cm}^2/\text{min}$. Una vez alcanzados diferentes valores de presión superficial, se detiene la compresión y se procede a registrar los espectros de emisión de fluorescencia. Para esto se coloca el brazo de fibra óptica del equipo de fluorescencia descrito en el punto 5.2.3 a pocos milímetros de la superficie acuosa formando un ángulo de 90° con la misma. El resto de parámetros empleados en la obtención de los espectros son los mismos que se utilizan para las mediciones de fluorescencia en las placas multipocillo.



6. MÉTODOS TERMODINÁMICOS

6.1. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC: *Differential Scanning Calorimetry*) es una técnica que permite medir el exceso de capacidad calorífica aparente (C_p) de una muestra como función continua de la temperatura. Se basa en un método diferencial, es decir, la capacidad calorífica de la muestra se mide de forma relativa con respecto a una referencia. Las celdas de la muestra y de la referencia están aisladas térmicamente y se calientan a una velocidad constante de tal forma que se mantenga la misma temperatura en ambas celdas durante todo el barrido. Un esquema típico de un calorímetro se muestra en la [Figura 4](#).



La información que puede obtenerse de un experimento de DSC supone la determinación de la capacidad calorífica de la muestra y de los parámetros termodinámicos globales asociados con diferentes transiciones termotrópicas como la entalpía (ΔH), la entropía (ΔS), la energía libre de Gibbs (ΔG) y la capacidad calorífica (ΔC_p). Estos parámetros suministran información sobre las propiedades termotrópicas de los sistemas de membrana.

La curva que representa la absorción o liberación de calor por parte de la muestra, según ésta se va calentando, se denomina termograma y se caracteriza por tener curvatura positiva si está originada por un proceso endotérmico ó negativa si es exotérmico. Si el cambio de

temperatura origina una transición entre dos estados termodinámicamente diferentes del sistema, la capacidad calorífica (C_p) presenta un máximo o un mínimo a la temperatura a la que ocurre la transición (T_m) y la integral del área bajo el termograma se corresponde con el incremento de la entalpía asociada a la transición (ΔH).

$$\Delta H = C_p \Delta T$$

A partir del termograma o representación de C_p en función de la temperatura (Figura 5), se pueden determinar los siguientes parámetros:

1- T_c ó Temperatura de inicio de la transición: temperatura a la que comienza la transición de fase.

2- T_m ó Temperatura de transición de fase: temperatura a la que se ha completado el 50% de la transición.

3- C_p ó Exceso de capacidad calorífica aparente: cantidad de calor por mol necesaria para elevar la temperatura de la muestra un grado centígrado.

4- ΔH ó Cambio de entalpía de la transición: corresponde al área bajo el pico de la transición en el termograma y es la cantidad de calor por mol necesaria para completar la transición.

5- $\Delta T_{1/2}$ ó Ancho de la transición: valor en grados centígrados del ancho del pico cuando se ha alcanzado la mitad del valor de máxima C_p . Cuanto más estrecho es el pico y menor es el valor $\Delta T_{1/2}$ más cooperativo es el proceso.

El seguimiento de C_p muestra las transiciones de fase que se producen en las estructuras lipídicas como consecuencia del aumento o la disminución de la temperatura. Se han observado varios tipos de transiciones de fase en bicapas lipídicas y todas ellas pueden ser analizadas mediante calorimetría. En términos generales, las bicapas de un fosfolípido sufren una transición endotérmica desde la fase lamelar gel ($L\beta$) a la fase líquido-cristalina (L_c), que está relacionada con un aumento significativo de la libertad conformacional de las cadenas de acilo de los ácidos grasos que lo componen (Fig. 5). La existencia de estas transiciones y sus parámetros termodinámicos vienen determinados en los diferentes sistemas lipídicos por la longitud de la cadena hidrocarbonada, su grado de insaturación y por el tipo de cabeza polar de los fosfolípidos (Cevc 1987), ya que éstas son las propiedades que determinan la energía de interacción entre las moléculas de lípidos y las de lípidos y proteínas.

Los experimentos de calorimetría presentados en este trabajo se realizaron en un *microcalorímetro VP-DSC* (Valery Plotnikov Differential Scanning Calorimeter) de MicroCal (Northampton, MA, EEUU). Para estos experimentos se utilizaron suspensiones multilamelares preparadas a partir de lípidos sintéticos o de surfactante pulmonar a una concentración de 1 ó 3 mg/mL. Una alícuota de 0.6 mL de la suspensión a estudiar, previamente desgasificada, se carga en la celda de muestra mientras que en la celda de referencia se carga un volumen equivalente de disolución salina 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7. De cada muestra se realizan 15 barridos de 5 a 50 ó de 10 a 60 °C a una velocidad de calentamiento de 30 °C/hora. Siguiendo el mismo protocolo se registra una línea base instrumental aplicando en ambas celdas la disolución salina empleada como referencia. Tras los tres primeros ciclos, las muestras

presentan termogramas repetitivos. Para el procesamiento de los datos obtenidos y con el fin de normalizar los termogramas registrados se resta la línea base o de referencia de la registrada para cada muestra empleando el programa Origin® para análisis de datos de DSC suministrado por MicroCal (Northampton, MA, EEUU).

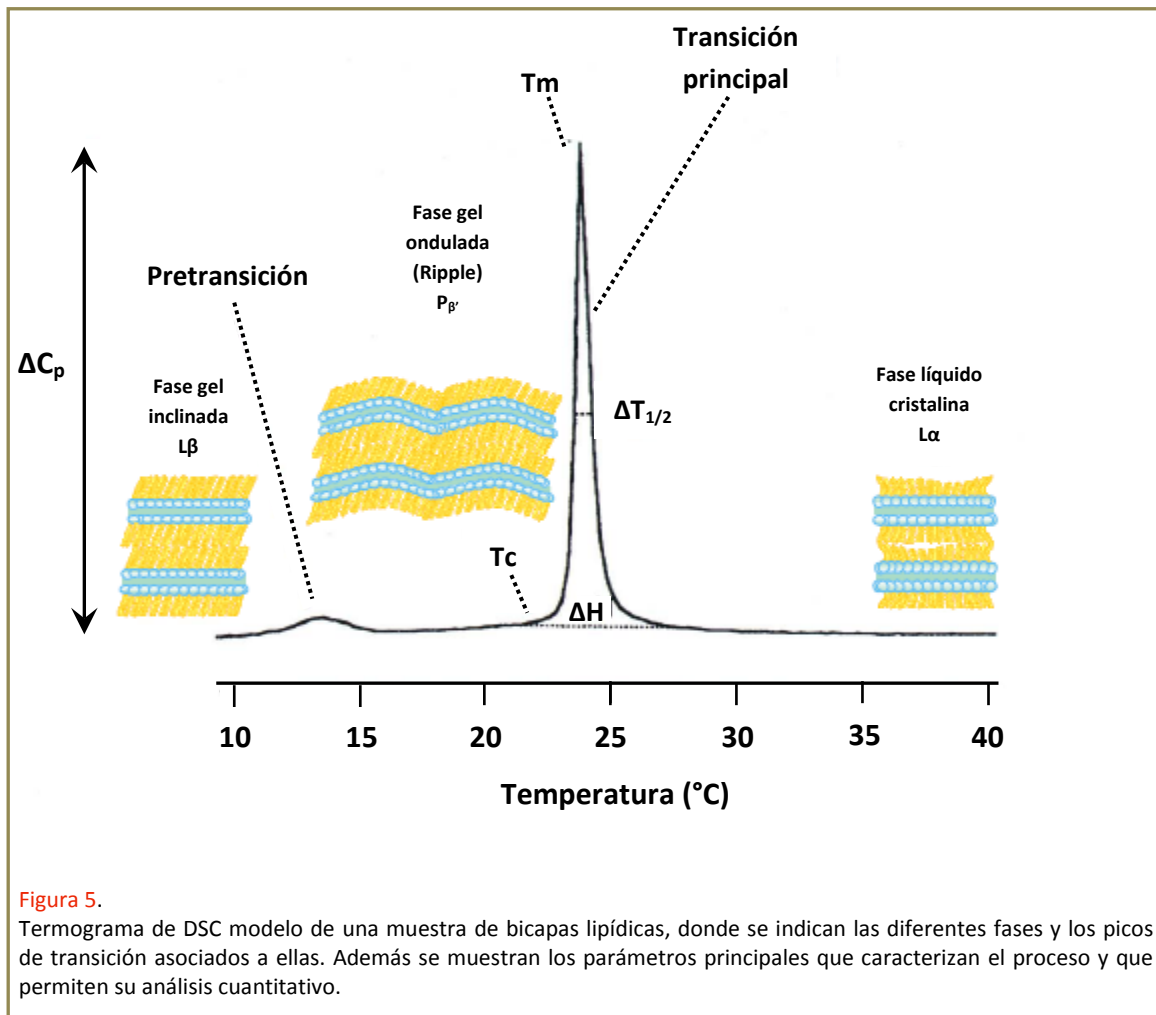


Figura 5. Termograma de DSC modelo de una muestra de bicapas lipídicas, donde se indican las diferentes fases y los picos de transición asociados a ellas. Además se muestran los parámetros principales que caracterizan el proceso y que permiten su análisis cuantitativo.

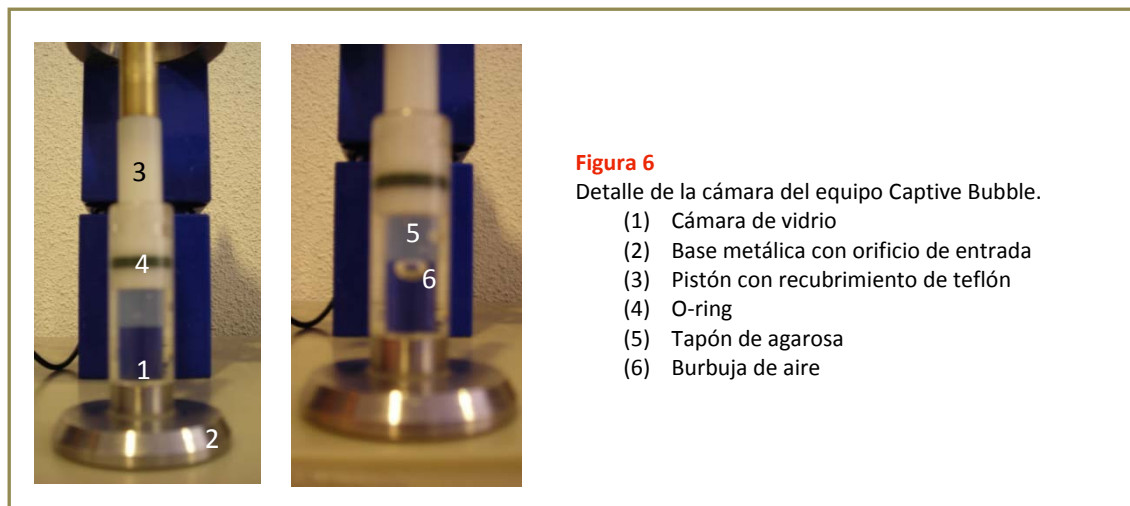
7. MÉTODOS DE ANÁLISIS FUNCIONAL

7.1. Estudios en Captive Bubble (Surfactómetro de Burbuja Cautiva)

El método del *Captive Bubble* es una técnica *in vitro* desarrollada para la monitorización de la tensión superficial, área y volumen de una burbuja de aire que contiene una película de surfactante en la interfase aire-líquido. El tamaño de la burbuja y por lo tanto la tensión superficial de cualquier película formada en la superficie de la burbuja puede alterarse cambiando la presión dentro de la cámara cerrada (Schürch et al. 1994).

El diseño y la construcción de este aparato están ampliamente descritos en el trabajo de Schürch y colaboradores (Schürch et al. 1989). El equipo empleado en el desarrollo de los experimentos de esta Tesis es un modelo modificado y más evolucionado que el inicialmente desarrollado por el profesor Samuel Schürch, de la Universidad de Calgary en Canadá y construido por éste para la Universidad Complutense. Consta de una cámara de vidrio

cilíndrica con base metálica que posee un orificio para introducir la muestra y el otro extremo abierto para poder acoplar el pistón que permite realizar los cambios de presión dentro de la cámara. El pistón es de metal con un extremo recubierto en teflón y posee un O-ring que permite su ajuste cuando se introduce en la cámara de vidrio (Figura 6).



En el techo de la cámara se introduce un tapón de agarosa al 1% de forma cilíndrica y con su base ligeramente cóncava (Fig. 6). Esto genera una superficie completamente hidrofílica en contacto con la burbuja. En estas condiciones la superficie de la burbuja es continua y se evita que el material se adhiera a cualquier otro soporte o lugar que no sea la interfase aire-líquido.

La temperatura dentro de la cámara puede ser regulada y mantenida a la temperatura de trabajo deseada, mediante su inclusión en una camisa de termostatación llena de agua que puede ser calentada mediante un chorro de aire caliente que incide de manera directa en función de la temperatura suministrada por un termopar. Los experimentos realizados en este trabajo se llevaron a cabo a temperaturas entre 15 y 45 °C mediante diversas estrategias que permitieron mantener dichas temperaturas a lo largo de todo el experimento.

La cámara está montada en una especie de platina móvil y el pistón queda fijo, sujeto al armazón del equipo. La burbuja dentro de la cámara es comprimida moviendo la platina hacia arriba contra el pistón fijo; mientras que se expande al mover la cámara hacia abajo. Los cambios de forma de la burbuja son monitorizados por una videocámara (Pulnix TM 7 CN) (Figura 7). Las imágenes digitales son capturadas y almacenadas en el disco duro de ordenador por medio de un software de captura de video.

-Estudios de actividad superficial de películas interfaciales de surfactante

La cámara se llena con 1-1,5 mL de disolución salina 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7 conteniendo sacarosa al 10%. La sacarosa aumenta considerablemente la densidad de la solución tampón en comparación con la suspensión de surfactante (aprox. 1.04g/mL vs 1.01 g/mL) (Gunasekara et al. 2005). Esta diferencia de densidad permite que todo el material que se aplica directamente en la burbuja permanezca en la interfase aire-líquido y no se diluya en el volumen total de la cámara. Se ha demostrado previamente que la presencia de sacarosa no interfiere en la funcionalidad del surfactante (Codd et al. 2002, Gunasekara et al. 2005). Una

vez realizada la desgasificación de la solución en la cámara se procede a formar una pequeña burbuja de aire de entre 2 y 3 mm de diámetro, dejando entrar aire por el orificio de la base de metal y permitiendo que la burbuja se separe y flote hacia el tapón de agarosa. Se eleva entonces la temperatura a la deseada y se equilibra la burbuja durante 10 minutos para asegurar una humedad del 100% ya que se ha demostrado que la humedad afecta a la actividad del surfactante en la interfase (Zuo et al. 2006). A continuación, un volumen de aproximadamente 0,1 a 0,3 μl de surfactante a 10 mg/mL de concentración se aplica directamente en la superficie de la burbuja mientras simultáneamente se monitoriza la forma de la burbuja a lo largo del tiempo con la cámara de video (Figura 8). Se ha demostrado que el material forma una delgada capa en la interfase que mimetiza la que se forma en la interfase aire-líquido de los alvéolos pulmonares (Schürch et al. 2010).



Transcurridos 5 minutos la entrada de la cámara es sellada (tapón a rosca) y la burbuja se expande rápidamente a un volumen de 0,15 mL (diámetro de aproximadamente 6 mm) y se monitoriza durante 5 minutos. Todas las imágenes capturadas son almacenadas en forma automática en el disco duro del ordenador. El protocolo continúa con 4 ciclos de compresión/expansión quasi-estáticas de la película interfacial, que consisten en reducir secuencialmente el volumen de la cámara para así comprimir la película interfacial a la mínima tensión superficial posible antes del colapso y posteriormente aumentar el volumen de la cámara, también de manera secuencial, para expandir la película hasta alcanzar el volumen inicial de la burbuja. Entre cada paso de compresión o expansión hay un intervalo de 4 segundos que permite la estabilización de la película y entre ciclos hay un intervalo de 1 minuto. La forma de la burbuja al principio y fin de cada paso es capturada y almacenada. Por

último se procede a realizar ciclos dinámicos, que consisten en compresiones y expansiones continuas en el rango de volúmenes especificados en los ciclos quasi-estáticos. Se realizan 20 ciclos en un minuto, velocidad en el rango de la compresión-expansión de los pulmones durante el proceso respiratorio.

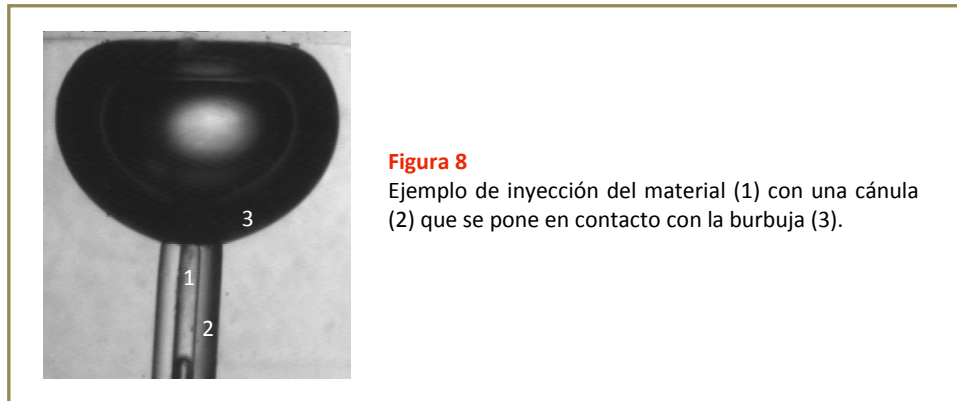


Figura 8
Ejemplo de inyección del material (1) con una cánula (2) que se pone en contacto con la burbuja (3).

A partir de las imágenes obtenidas, se calcula el volumen, el área interfacial y la tensión superficial a partir de la altura y diámetro de la burbuja según el método de Schoel (Schoel et al. 1994).

-Estudios de estabilidad de películas interfaciales de surfactante frente a perturbaciones mecánicas

Se comprime la película interfacial a la mínima tensión superficial posible previa al colapso y se procede a la introducción de perturbaciones mecánicas con un martillo pendular que consta de un brazo de metal de 24 cm de largo que posee un bloque de metal de forma rectangular en un extremo. La cara menor de este bloque es la que golpea en la superficie del pistón (Figura 9).

El martillo se deja caer desde una altura correspondiente a la posición de 90° con respecto a la vertical del soporte, de forma que al golpear en pistón introduce una perturbación mecánica en la burbuja. Se llevan a cabo 5 perturbaciones sucesivas y el análisis de las imágenes obtenidas permite monitorizar la relajación que ocurre en la película de surfactante comprimida al cabo de estas perturbaciones (Schürch et al. 2010). También se llevaron a cabo experimentos en los que se continúan introduciendo perturbaciones hasta alcanzar una tensión superficial y área estables que ya no resultan modificarse tras la introducción de perturbaciones adicionales.

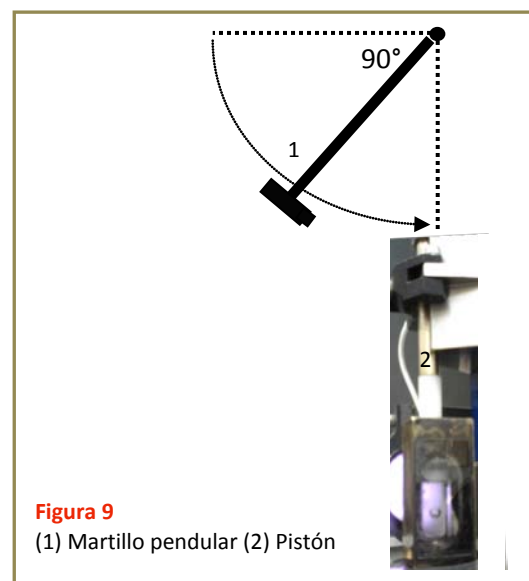


Figura 9
(1) Martillo pendular (2) Pistón

Capítulo I

FUNCIONALIDAD DEL SURFACTANTE PULMONAR FRENTE A FLUCTUACIONES TÉRMICAS.



Los resultados que se muestran en este capítulo ya fueron publicados en el trabajo:

Phospholipid packing and hydration in pulmonary surfactant membranes and films as sensed by LAURDAN.

Picardi M.V., Cruz A., Orellana G. and Pérez-Gil J.

Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

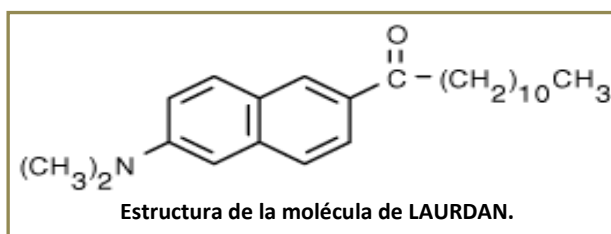
[Biochim Biophys Acta 1808\(3\):696-705. 2011.](#)

INTRODUCCIÓN

La eficiencia del surfactante pulmonar para estabilizar la superficie respiratoria depende críticamente de su capacidad para formar películas altamente empaquetadas en la interfase aire-líquido.

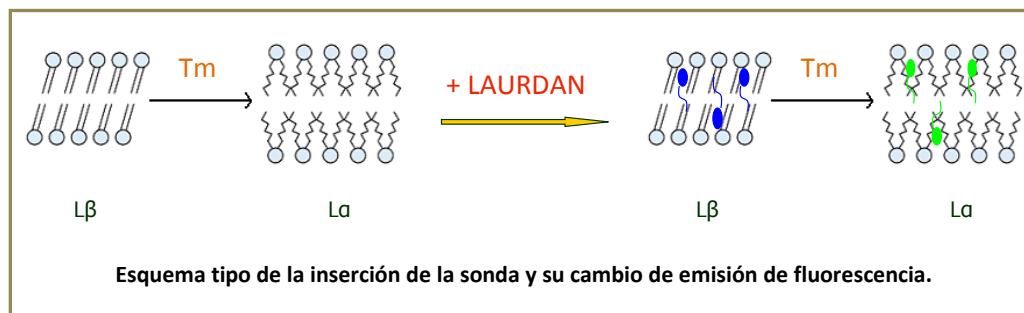
La composición de la fracción lipídica del surfactante pulmonar juega un papel fundamental en la determinación de la estructura lateral de las membranas y películas de surfactante. Estas últimas, cuando son sometidas a compresión se segregan en regiones ordenadas (del tamaño de micras) enriquecidas en fosfolípidos saturados y en regiones más desordenadas donde particionan los fosfolípidos insaturados y las proteínas hidrofóbicas del surfactante pulmonar (Discher et al. 1996, Nag et al. 1998). Estudios estructurales con diferentes sistemas modelo sugieren que la presencia de una adecuada combinación de especies fosfolipídicas con bajas y elevadas temperaturas de transición de fase (T_m) es necesaria para mantener la segregación de fases que es fundamental para la funcionalidad del surfactante pulmonar. Esta particular composición de las películas de surfactante permite simultáneamente obtener estabilidad estructural en estados de alta compresión y un entorno dinámico que facilita el desarrollo de las transformaciones estructurales que se cree ocurren durante el ciclo respiratorio (Serrano y Pérez-Gil 2006, Pérez-Gil 2008, Wustneck et al. 2005). La segregación de fases ordenadas y desordenadas también se ha observado en bicapas de surfactante (Bernardino de la Serna et al. 2004 y 2009), confirmando las propiedades de los lípidos y proteínas del surfactante para auto-organizarse. Sin embargo, la correspondencia entre la organización lateral y el empaquetamiento molecular en mono- y bicapas de surfactante no puede ser directamente establecida, ya que ambos modelos están sujetos a diferentes limitaciones. De hecho, las monocapas fosfolipídicas son ampliamente empleadas como modelos de membranas biológicas (Brockman 1999) pero la exacta correspondencia entre el empaquetamiento lateral y la organización molecular es objeto de controversia.

En el presente trabajo se ha logrado obtener una correlación paralela entre la organización lateral y el empaquetamiento lipídico en películas interfaciales y membranas de surfactante a partir de las características espectroscópicas singulares de la sonda LAURDAN.



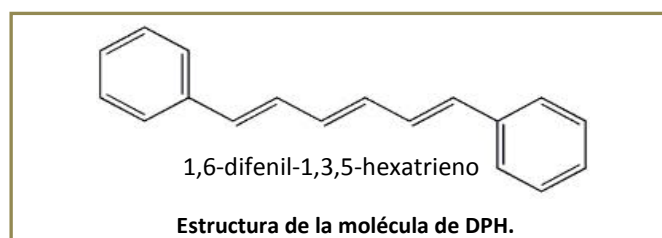
Su emisión de fluorescencia es altamente sensible al nivel de hidratación de la región de la membrana correspondiente a las cabezas polares de los fosfolípidos, que se ve afectado por el empaquetamiento y la organización lateral (Bagatolli 2003, De Vequi-Suplicy et al. 2006). En la fase gel el máximo de emisión del LAURDAN está centrado alrededor de los 440 nm (extremo

azul del espectro), pero al aumentar la temperatura y por tanto la fluidez de la membrana este máximo se desplaza a 490 nm (extremo verde del espectro). El cambio espectral es resultado del aumento de hidratación en el entorno de la sonda, en la región de las cabezas polares de los fosfolípidos.



La fluorescencia del LAURDAN ha sido recientemente empleada para obtener información sobre la organización lateral de monocapas interfaciales de lípidos simples ya que puede revelar la segregación de dominios condensados y las transiciones tridimensionales resultado de la compresión, con resolución microscópica (Brewer et al. 2010). En este contexto, hemos caracterizado el empaquetamiento lipídico mediante el uso del LAURDAN en membranas y películas complejas, como las que mimetizan el surfactante y algunos de sus modelos.

Además, para completar el estudio de las relaciones estructura-función en el surfactante pulmonar se han realizado experimentos en función de la temperatura con la sonda DPH, lo que permite obtener información del grado de fluidez de las membranas y orden lipídico en función de su composición. Las desviaciones en los movimientos rotacionales de la sonda (movimientos anisotrópicos), que están asociados a las diversas orientaciones de las cadenas de acilo de los fosfolípidos, han sido empleadas para establecer las variaciones en el orden de la membrana (Baatz et al. 1990). La sonda se distribuye al azar en la región hidrofóbica de la membrana y es sensible a los cambios en el orden lipídico en diferentes segmentos en el interior de la bicapa (Lentz 1989).



Además, se distribuye uniformemente en membranas en estado gel y fluidas (Sklar et al. 1975, Lentz 1989). Ciertos estudios han demostrado que la inserción de DPH en membranas provoca perturbaciones en la región hidrocarbonada de la misma. Estas perturbaciones se manifiestan por un aumento del orden de las cadenas de acilo de los fosfolípidos y una difusión lateral reducida. El aumento del orden en la vecindad de la sonda produce un ensanchamiento de la

membrana y un pequeño descenso del área por molécula promedio. Sin embargo, estas perturbaciones son sólo de tipo local y no se propagan al resto de la membrana (Repáková et al. 2005).

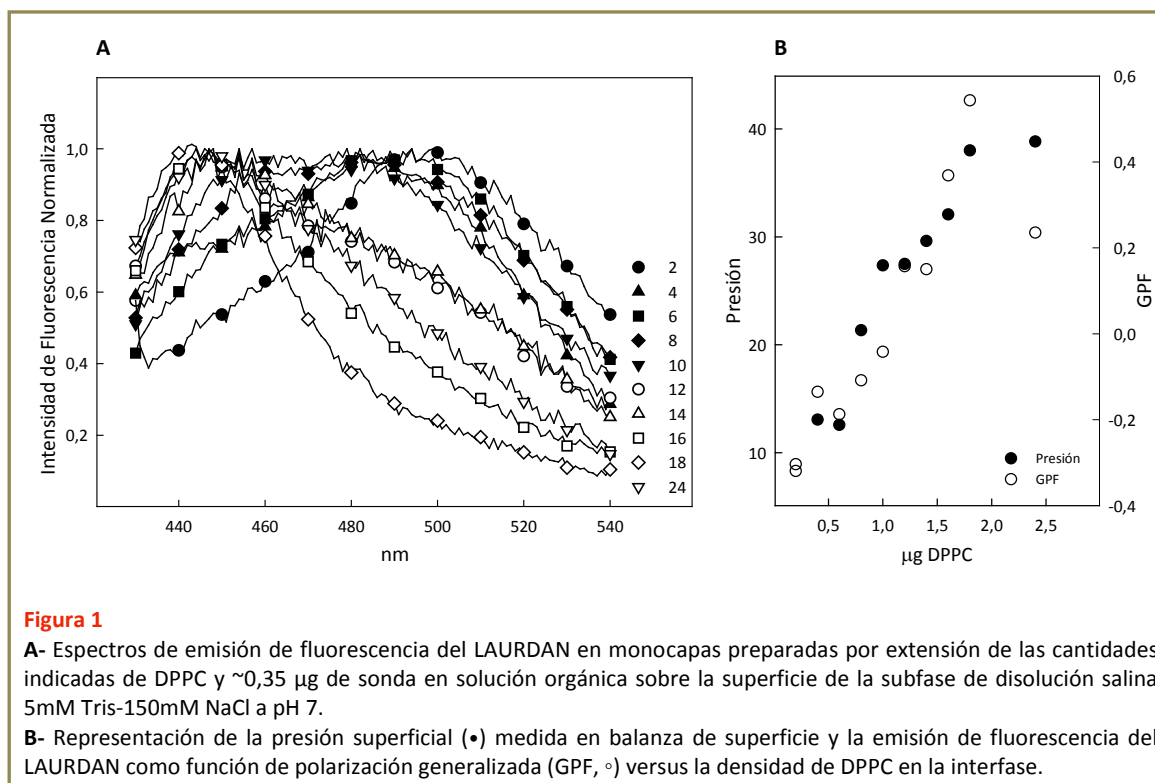
RESULTADOS

1. FLUORESCENCIA

1.1. LAURDAN en monocapas de DPPC

El espectro de emisión de la sonda fluorescente LAURDAN es particularmente sensible al entorno que la rodea en membranas. El empaquetamiento lipídico, consecuencia de cambios en la presión o temperatura, provoca desplazamientos en el máximo de emisión de la sonda. El espectro de emisión del LAURDAN es azul en la fase gel mientras que se desplaza al verde cuando las membranas se hallan en el estado líquido cristalino (Parasassi et al. 1990 y 1991). Cuando se estudian monocapas de DPPC, formadas por extensión de soluciones lipídicas en la interfase aire-líquido en placas multipocillo, los incrementos de presión son alcanzados por aumentos de la densidad lipídica en la interfase, ya que el área de los pocillos es constante.

La **Figura 1** ilustra la sensibilidad de la emisión de fluorescencia del LAURDAN al empaquetamiento lipídico en monocapas de DPPC, el cual es progresivamente mayor al aumentar la densidad de moléculas de lípido en la interfase aire-líquido. La **Fig. 1A** muestra el desplazamiento hacia el extremo azul en el espectro de emisión de la sonda como consecuencia del depósito en la interfase de cantidades progresivamente mayores de DPPC. Al añadir más cantidad de material, tanto la densidad como el empaquetamiento lipídico son mayores, dando como resultado mayores presiones superficiales que provocan el desplazamiento en el espectro de emisión del LAURDAN. Probablemente la progresiva deshidratación de la interfase y por tanto el menor acceso de las moléculas de agua a la región polar de la sonda, como consecuencia del mayor empaquetamiento, sería la responsable de este desplazamiento en el espectro de emisión. En la **Fig. 1B** se observan las gráficas de GPF (calculada a partir de los espectros de la figura 1A) y presión superficial de películas interfaciales formadas por extensión en la interfase aire-líquido de cantidades crecientes de DPPC. A bajas densidades lipídicas, la película de DPPC se encuentra en fase líquido-expandida (LE) y la emisión de la sonda ocurre alrededor de los 490 nm. Cuando la densidad lipídica es mayor, las moléculas están más empaquetadas y ordenadas, dando origen a la fase líquido-condensada (LC). En esta fase el máximo de emisión ocurre alrededor de los 440 nm. A densidades lipídicas intermedias, donde probablemente hay coexistencia de fases LE y LC, el espectro de emisión del LAURDAN es intermedio, está ensanchado y ocurre a ambas longitudes de onda. La **Fig. 1B** muestra la fuerte correlación que existe entre los valores calculados de GPF y la presión superficial, demostrando la sensibilidad que esta sonda presenta frente al empaquetamiento lipídico.

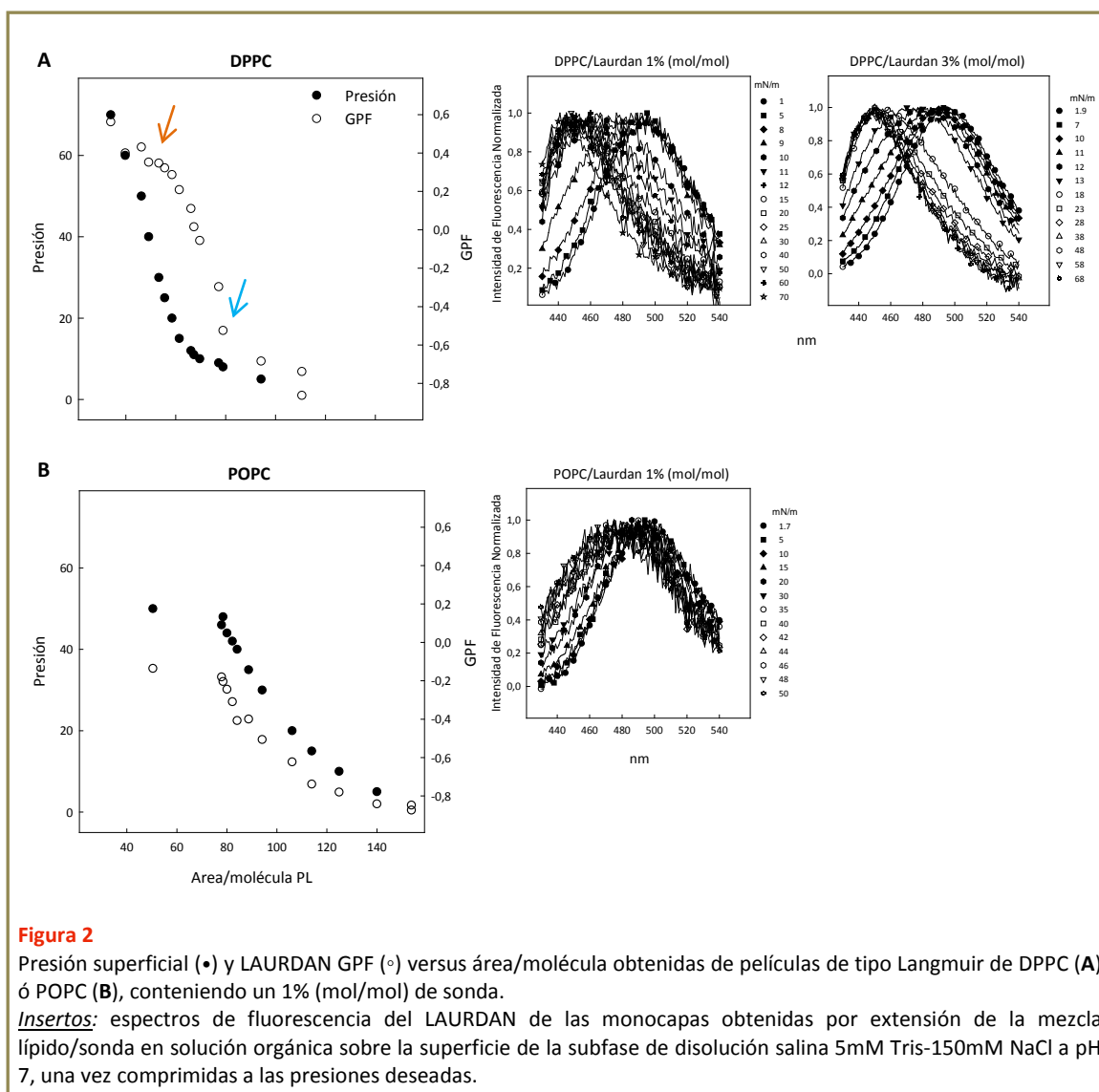


1.2. LAURDAN en películas de tipo Langmuir progresivamente comprimidas

La **Figura 2** muestra las isotermas de compresión de películas de DPPC o POPC conteniendo un 1 ó 3% de LAURDAN (relación sonda-lípido, mol/mol). Las isotermas de fosfolípidos disaturados como la DPPC alcanzan presiones superficiales por encima de los 60 mN/m a temperaturas por debajo de la temperatura de transición de fase gel-líquido (T_m 41 °C para DPPC) ya que las moléculas de lípido son capaces de empaquetarse eficientemente alcanzando un estado tipo sólido metaestable. La isoterma de DPPC presenta un plateau alrededor de los 10 mN/m, presión a la cual ocurre una transición de fase LE-LC característica. Los detalles en la **Fig. 2** demuestran cómo la emisión de fluorescencia de la sonda es sensible al estado de compresión de las películas de DPPC en un amplio rango de presiones superficiales.

Se pueden comparar los espectros de emisión en películas de DPPC progresivamente comprimidas que contienen un 1 ó un 3% de sonda. En ambos casos es evidente el desplazamiento hacia el azul en el espectro de emisión del LAURDAN como consecuencia de mayor compresión. Los espectros de las películas con mayor contenido de sonda presentan una mejor relación señal-ruido pero aún los que contienen un 1% son susceptibles de ser analizados en términos de la dependencia presión/GPF. Es importante destacar que se han realizado todos los experimentos con un 1% de sonda para así minimizar las posibles perturbaciones en la estructura de las películas promovidas por la sonda (**Cruz et al. 2005**). Los valores de GPF del LAURDAN aumentan moderadamente en función del progresivo empaquetamiento lipídico en la fase LE a presiones por debajo de 10 mN/m en películas de DPPC. Se puede observar un punto de inflexión (**Fig. 2A, flecha celeste**) al comienzo del plateau de coexistencia de fases LE-LC, lo cual indica que la transición es el factor que promueve la

deshidratación del LAURDAN que da como resultado el desplazamiento hacia el azul en el espectro de emisión de la sonda. Un segundo punto de inflexión (Fig. 2A, flecha naranja) ocurre presumiblemente cuando se completa la transición LE-LC.

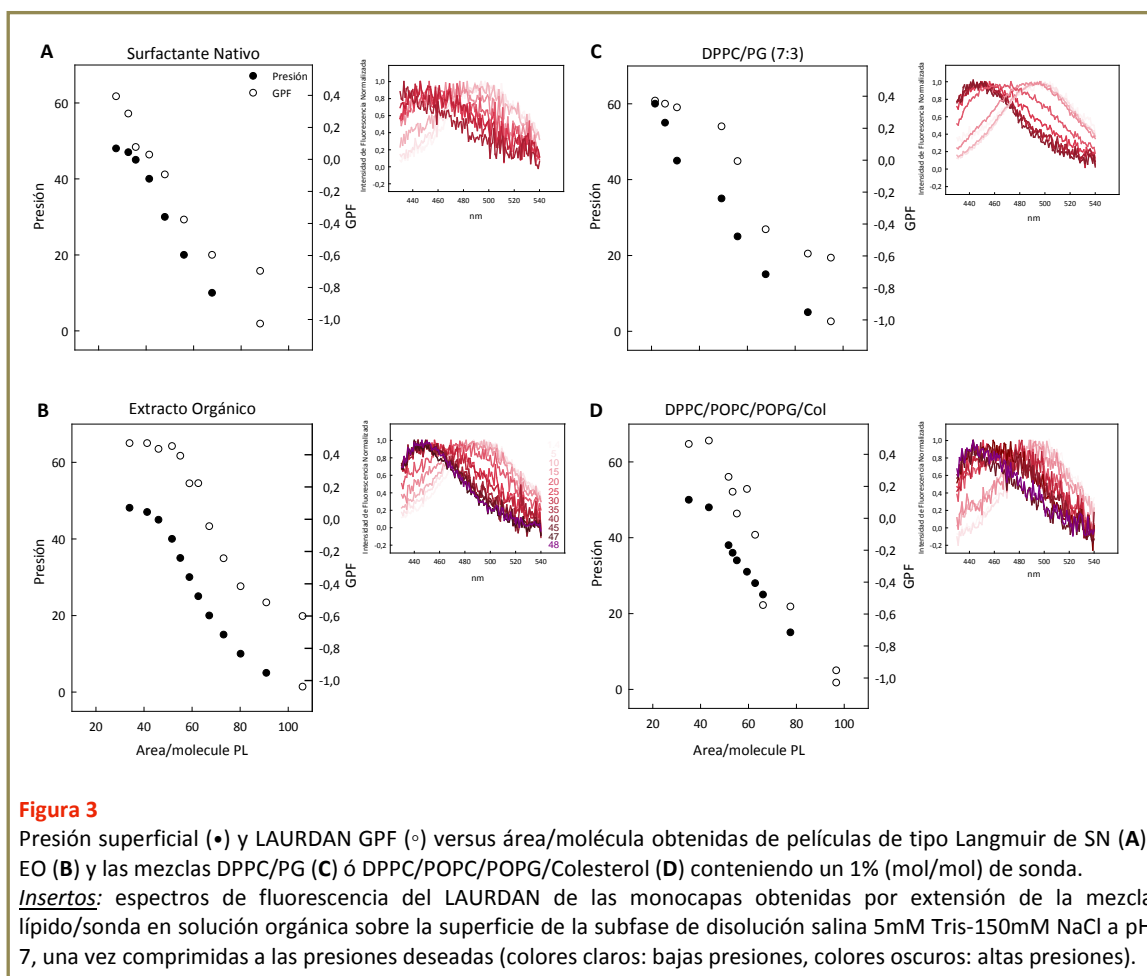


En la Fig. 2 también se muestra que la compresión de películas de POPC produce un moderado pero progresivo desplazamiento de la emisión del LAURDAN hacia longitudes de onda menores a pesar de que las películas de POPC se encuentran en fase LE a todas las presiones alcanzadas por encima de la temperatura de transición. El aumento en los valores de GPF como resultado del aumento de la presión superficial está estrictamente asociado con la deshidratación de las moléculas de POPC inducida por la compresión que origina un mayor empaquetamiento molecular. Los valores máximos absolutos de GPF que se alcanzan con películas de POPC comprimidas ($\sim -0,2$ a $\sim 70 \text{ \AA}^2/\text{moléc.}$) son significativamente menores que los de películas de DPPC ($\sim 0,43$ a $\sim 40 \text{ \AA}^2/\text{moléc.}$), indicando que las moléculas de POPC están menos empaquetadas pero más hidratadas a máximas compresiones que las de DPPC.

Teniendo en cuenta la sensibilidad de la fluorescencia del LAURDAN a la organización lateral y el estado de compresión de películas interfaciales de fosfolípido se ha analizado el comportamiento de la misma en películas más complejas como las formadas espontáneamente a partir de la adsorción interfacial de los complejos lipo-proteicos del surfactante pulmonar. En la **Figura 3A** se puede observar la isoterma de compresión (presión/Área) de una película formada por extensión y adsorción en la interfase aire-líquido de una alícuota de surfactante pulmonar porcino marcado con LAURDAN. Ésta presenta la morfología esperada, con un marcado plateau a 45-50 mN/m que ha sido asociado con transiciones tridimensionales de material que forma estructuras multilamelares como resultado de la compresión (Discher et al. 1996, Nag et al. 1998, Schief et al. 2003). Los espectros de emisión del LAURDAN obtenidos a diferentes estados de compresión de estas películas tienen bastante ruido pero presentan el desplazamiento característico de la emisión hacia el extremo azul del espectro como resultado del aumento de compresión en la interfase. Al representar los valores de GPF en función del área/molécula se ve que la GPF correlaciona con el aumento de presión, hasta llegar a valores alrededor de 0,4, menor que el observado para las películas de DPPC pura. En cualquier caso, el nivel de hidratación del LAURDAN en películas interfaciales de surfactante se asemeja más al entorno de la sonda en películas de DPPC que en las de POPC, confirmando que la máxima compresión de películas de surfactante conduce a la formación de estructuras altamente empaquetadas enriquecidas en DPPC. Es interesante destacar que el aumento de la GPF con la compresión parece alcanzar un plateau a valores alrededor de 0,1, que luego aumenta hasta 0,4 una vez que la compresión conduce al plateau asociado a la formación de estructuras tridimensionales de la película interfacial. El incremento paralelo de los valores de GPF y presión superficial es también marcadamente claro en las películas interfaciales formadas por extensión del extracto orgánico (EO) del surfactante, que contiene todo el material lipídico del surfactante junto con las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C (**Figura 3B**). Las isotermas de películas de EO de surfactante también exhiben un plateau alrededor de los 45 mN/m, asociado a valores máximos de GPF alrededor de 0,4. Las películas de extracto orgánico siempre alcanzan mayores presiones superficiales y mayores niveles de deshidratación que las películas de surfactante nativo entero comprimido de la misma manera.

Sin embargo, las isotermas de películas formadas por mezclas complejas como son el surfactante pulmonar y su extracto orgánico no pueden ser fácilmente interpretadas en términos de factores simples. Los cambios en la emisión de fluorescencia de las moléculas de LAURDAN insertas en las membranas probablemente están afectados tanto por la segregación de fases y dominios, como por la existencia de transiciones de tipo 2D y 3D inducidas por la compresión, además de los cambios en el empaquetamiento lateral de los lípidos. Para facilitar la interpretación del complejo comportamiento de las películas de surfactante se ha comparado las isotermas presión-GPF/área con las obtenidas por compresión de películas formadas por mezclas lipídicas más sencillas que mimetizan parte de la complejidad composicional del surfactante. En la **Figura 3C** se observa la isoterma de compresión y los espectros de emisión del LAURDAN de una película de DPPC/PG (7:3, peso/peso), mezcla extensivamente usada para reconstituir sistemas miméticos del surfactante pulmonar (Blanco y Pérez-Gil 2007). Esta mezcla conteniendo un 30% de fosfolípidos insaturados es más fluida y dinámica que la DPPC pura y contiene además el fosfolípido aniónico PG, requerido para

optimizar las interacciones lípido-proteína con la región hidrofóbica de las proteínas del surfactante (Ingenito et al. 2000, Pérez-Gil et al. 1995). En la Figura 3D se observa la isoterma de DPPC/POPC/POPG/Colesterol (50/25/15/10, peso/peso/peso/peso), mezcla que contiene prácticamente la misma proporción de fosfolípidos saturados/insaturados y zwitteriónicos/aniónicos que el surfactante pulmonar y una proporción de colesterol en el rango de los valores fisiológicos. Las películas interfaciales formadas con ambas mezclas lipídicas muestran una buena correlación GPF/Presión superficial. Una vez comprimidas, los valores máximos de GPF son comparables a los obtenidos con películas de surfactante progresivamente empaquetadas.



En la Figura 4 se muestran las gráficas GPF vs Presión superficial de las diversas muestras lipídicas estudiadas. Estas curvas pueden tomarse como estándares de calibración para correlacionar los valores de GPF del LAURDAN con cualquier estado de empaquetamiento de los lípidos en las diferentes mezclas analizadas. En términos generales, las películas que contienen especies lipídicas saturadas, incluyendo aquellas formadas por surfactante entero o su extracto orgánico, alcanzan elevados valores de GPF una vez comprimidas, a diferencia de las películas formadas exclusivamente por lípidos insaturados. La compresión de las películas de surfactante hasta presiones en las que ocurre el plateau produce valores de GPF alrededor de 0,4-0,5, cuantitativamente comparables a los alcanzados por las mezclas que contienen DPPC. Esto indica que en todas estas películas la máxima deshidratación de la molécula de

sonda es probablemente alcanzada en el estado de alto empaquetamiento lipídico de entornos enriquecidos en DPPC. La compresión de películas de DPPC pura conduce a la formación de un plateau con valores similares de GPF, los cuales son mayores de 0,5 si la película es comprimida a valores superiores de 60 mN/m, presumiblemente una vez que la DPPC pasa de un estado condensado inclinado a una verdadera fase sólida bidimensional.

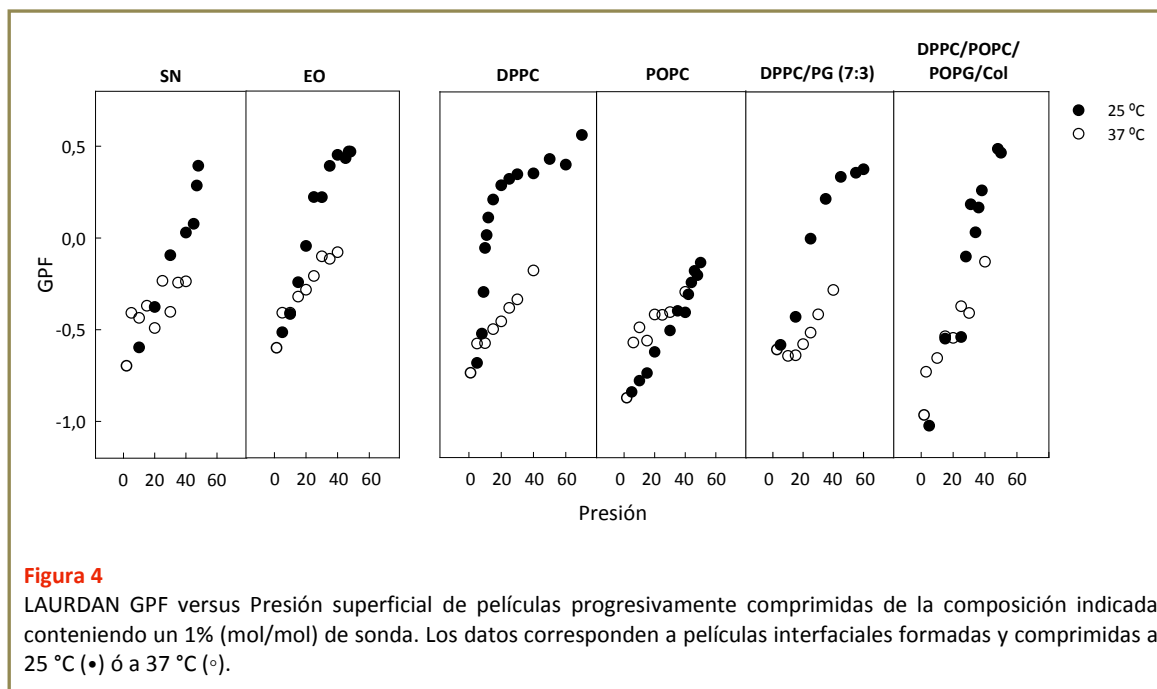


Figura 4

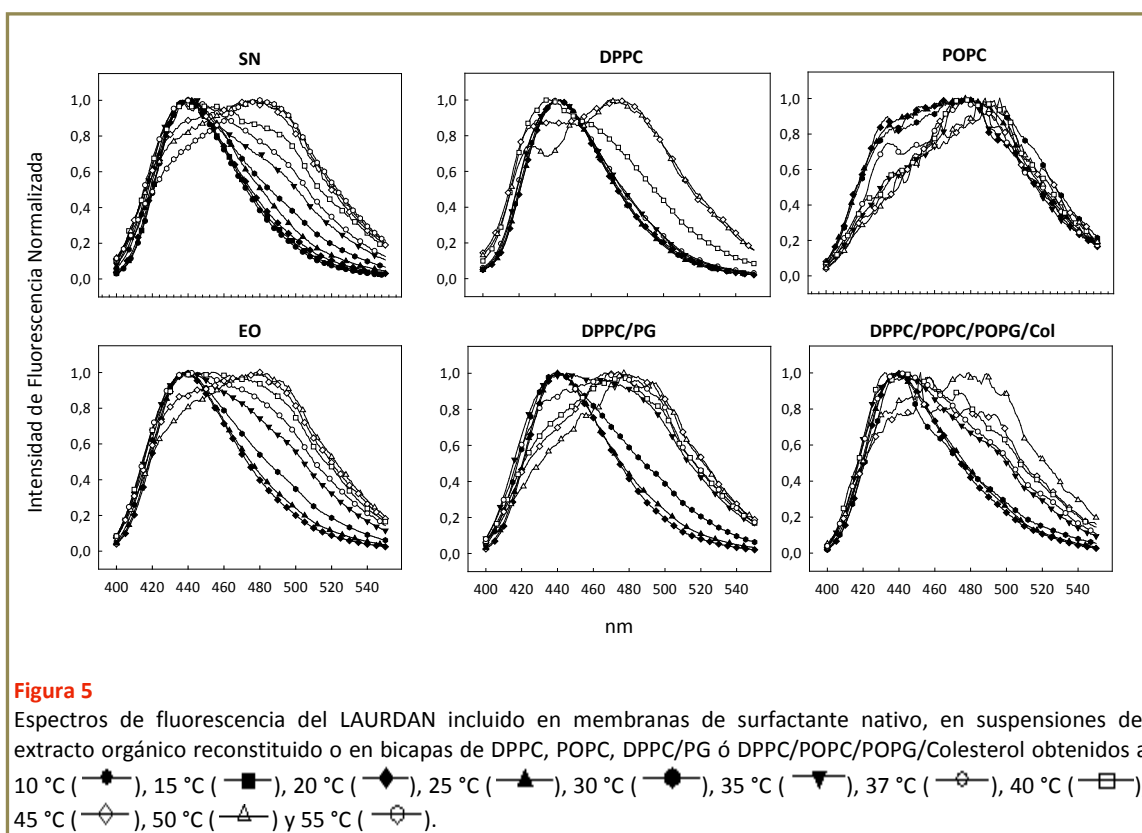
LAURDAN GPF versus Presión superficial de películas progresivamente comprimidas de la composición indicada conteniendo un 1% (mol/mol) de sonda. Los datos corresponden a películas interfaciales formadas y comprimidas a 25 °C (●) ó a 37 °C (○).

En general, la máxima presión alcanzada por las películas interfaciales a 37 °C es sustancialmente menor que la alcanzada a 25 °C antes del colapso. Este efecto se debe probablemente a que el colapso a 37 °C ocurre más rápido que la más alta velocidad de compresión que se puede alcanzar con la balanza de superficie empleada (Schief et al. 2003, Yan et al. 2005).

La obtención de isothermas de compresión en balanza de tipo Langmuir termostatzada a 37 °C fue un desafío técnico. En estos casos los espectros del LAURDAN son peores en términos de la relación señal-ruido que los obtenidos a 25 °C. Los espectros de las mezclas más complejas como el surfactante nativo o su extracto orgánico son los que presentan mayor ruido pero aún muestran una buena correlación entre los valores de GPF y la presión superficial. A 37 °C los valores de GPF del LAURDAN asociados con los estados de compresión de todas las películas conteniendo DPPC fueron marcadamente menores que los obtenidos a 25 °C y no demasiado diferentes de los valores obtenidos para películas de POPC. Esto indica que el LAURDAN a 37 °C puede estar en un entorno relativamente hidratado, parecido al entorno que resulta en fases líquido-expandidas donde la GPF prácticamente dependerá de la presión lateral. Es interesante notar que sólo las películas que contienen colesterol pueden producir a 37 °C valores un poco más elevados de GPF. Esto probablemente demuestra la sensibilidad de la fluorescencia del LAURDAN a la presencia de fases interfaciales de tipo líquido-ordenadas conteniendo colesterol, donde la sonda estaría más deshidratada que en las regiones líquido-expandidas.

1.3. LAURDAN en bicapas

En la **Figura 5** se resumen las gráficas de los espectros de emisión de fluorescencia del LAURDAN incorporado en el surfactante nativo, en suspensiones acuosas del extracto orgánico de surfactante nativo o en suspensiones multilamelares de DPPC, POPC o las mezclas DPPC/PG (7/3, peso/peso) ó DPPC/POPC/POPG/Colesterol (50:25:15:10, peso/peso/peso/peso) a diferentes temperaturas. Al igual que ocurre en las monocapas interfaciales, la fluorescencia del LAURDAN es altamente sensible al estado de hidratación de la región de las cabezas polares de los fosfolípidos, la cual a su vez depende del estado de fase, de la organización lateral y del empaquetamiento lipídico; factores que a su vez son influenciados por la temperatura (Bagatolli 2003, De Vequi-Suplicy et al. 2006, Parasassi et al. 1991).



La **Figura 6** resume los perfiles termotrópicos de los diferentes sistemas estudiados, calculando los valores de GPF a partir de los espectros mostrados en la Fig. 5. Las membranas de surfactante nativo, así como también las suspensiones preparadas a partir de su extracto orgánico presentan una marcada y amplia transición, que probablemente corresponda al paso progresivo desde estados más ordenados a fases más desordenadas, como ha sido bien caracterizado en trabajos anteriores por DSC o espectroscopia de infrarrojo (IR) (Bernardino de la Serna et al. 2004, Dluhy et al. 1989, Trauble et al. 1974). Esta transición ocurre con un aparente punto de inflexión alrededor de los 32 °C. Las bicapas de DPPC muestran transiciones más abruptas alrededor de los 40 °C. Bicapas reconstituidas de mezclas lipídicas como DPPC/PG o DPPC/POPC/POPG/Colesterol poseen perfiles termotrópicos de GPF más ensanchados, centrados alrededor de los 30-32 °C. En todos estos sistemas de membranas, los

máximos valores de GPF alcanzados son similares, alrededor de 0,5. Por el contrario, en membranas de POPC pura, la GPF del LAURDAN experimenta una variación más limitada por efecto de la temperatura, con máximos justo por encima de 0,0 a la menor temperatura en que fueron evaluadas.

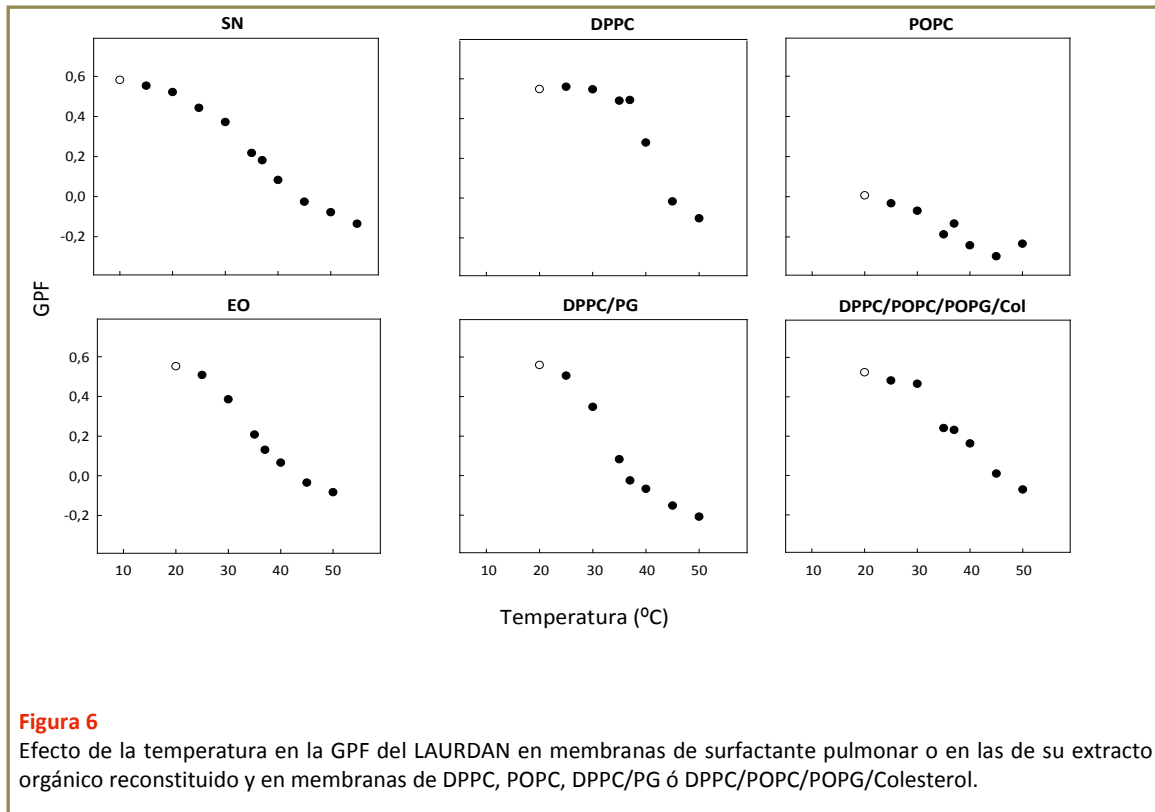


Tabla 1

Lípido	T °C	Monocapas			Bicapas
		GPF máx	π	A/mol	GPF
SN	25	0,077	45	35,6	0,442
	37	-0,244	40,2	10,5	0,181
EO	25	0,435	45	47,3	0,507
	37	-0,079	39,6	49,5	0,130
DPPC	25	0,431	70,0	38,7	0,560
	37	0,065	44,4	51,7	0,493
POPC	25	-0,202	47,3	70,1	-0,034
	37	-0,329	44,2	61,1	-0,134
DPPC/PG	25	0,342	50,0	24,1	0,505
	37	-0,270	42,4	29,4	-0,025
DPPC/POPC/POPG/Col	25	0,224	45,3	49,6	0,482
	37	-0,132	40,0	54,9	0,231

La **Tabla 1** resume y compara los máximos valores de GPF del LAURDAN obtenidos en monocapas y bicapas para los diferentes sistemas estudiados, tanto a 25 como a 37 °C. Además reúne información sobre los valores de presión superficial y área/molécula que corresponden a los máximos valores de GPF. En términos generales se puede decir que los máximos valores de GPF alcanzados en monocapas fueron siempre menores que los obtenidos en bicapas de la misma composición lipídica y expuestas a las mismas condiciones ambientales. Tanto en mono como en bicapas de cualquiera de las diferentes composiciones estudiadas, los valores de GPF son menores a 37 que a 25 °C, lo que es consistente con el menor empaquetamiento y la mayor hidratación de la región de las cabezas polares de los fosfolípidos en las membranas que ocurre a altas temperaturas. Las diferencias entre mono y bicapas son sustancialmente mayores a 37 que a 25 °C.

Si los valores de GPF positivos y negativos están asociados con emisiones predominantemente en el azul (fase condensada, deshidratada) o en el verde (fase expandida, hidratada), respectivamente, los valores de la **Tabla 1** indican que las mono o bicapas de DPPC pura a 25 o 37 °C tienen carácter condensado, mientras que en el caso de POPC, las mono o bicapas están expandidas, totalmente hidratadas, a ambas temperaturas. La mezcla DPPC/PG muestra en promedio un carácter condensado a 25 °C tanto en mono como bicapas, mientras que a 37 °C mono y bicapas están en un estado más expandido e hidratado. Son de especial interés las mezclas complejas que contienen colesterol, incluyendo el surfactante nativo, su extracto orgánico y la mezcla cuaternaria DPPC/POPC/POPG/Colesterol, ya que presentan aparentemente un carácter condensado y deshidratado a 25 °C, tanto en mono- como en bicapas, pero se comportan de manera diferente a 37 °C, presentando un carácter condensado en bicapas pero relativamente hidratado y probablemente expandido en monocapas.

DISCUSIÓN

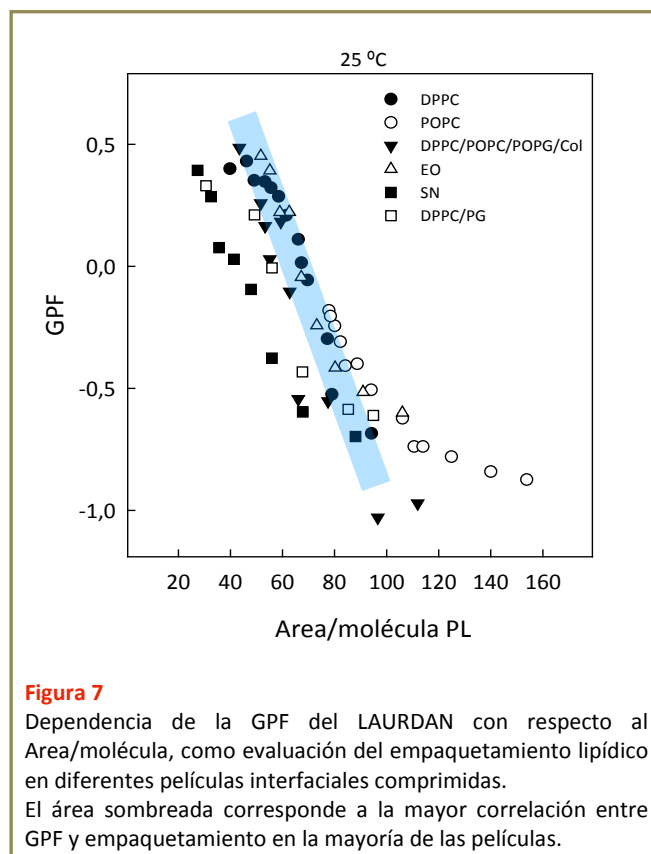
La composición lipídica del surfactante pulmonar juega un papel fundamental en la determinación de la estructura lateral en membranas y películas de surfactante, así como también en la capacidad de las películas interfaciales para soportar un elevado empaquetamiento durante el proceso de reducción de la superficie alveolar que ocurre en la espiración. Los estados altamente empaquetados son esenciales para que la tensión superficial pueda reducirse a valores necesarios para estabilizar el espacio alveolar (Goerke 1998). La DPPC es el componente mayoritario del surfactante pulmonar en animales homeotermos con temperaturas corporales en torno a los 37 °C y es el mayor responsable de conferir las propiedades tensioactivas. Las cadenas de acilo saturadas de la DPPC le permiten formar películas con alto grado de empaquetamiento como resultado de la compresión. Se ha demostrado que en las películas de surfactante, como resultado de la compresión, se segregan regiones ordenadas, enriquecidas en fosfolípidos saturados, de regiones más desordenadas donde preferentemente particionan especies fosfolípicas insaturadas junto con las proteínas (Discher et al. 1996 y 1999, Nag et al. 1998).

En el presente trabajo se ha estudiado y comparado la organización lateral, las propiedades de empaquetamiento de los lípidos del surfactante pulmonar y el grado de hidratación en mono y bicapas por medio de una sonda hidrofóbica que tiene características espectroscópicas únicas. Esta sonda es el LAURDAN, cuyo espectro de emisión es muy sensible al nivel de hidratación de la región de las cabezas polares de los fosfolípidos, el cual es afectado a su vez por el empaquetamiento y organización lateral (Bagatolli 2003, De Vequi-Suplicy et al. 2006). En películas interfaciales, la emisión de la sonda sufre un desplazamiento hacia el azul en el espectro cuando las monocapas son comprimidas a altas presiones laterales. En este caso el LAURDAN presenta un bajo nivel de hidratación. Los valores de GPF del LAURDAN obtenidos para películas de surfactante comprimidas a 25 °C son muy similares a los de monocapas de DPPC pura altamente comprimidas, sugiriendo que el entorno de la sonda en películas comprimidas de surfactante es similar al que encuentra en películas de DPPC en términos de empaquetamiento y deshidratación. Estos resultados son consistentes con la clásica hipótesis en el campo del surfactante que propone que la compresión de películas de surfactante nativo a presiones suficientemente altas probablemente finaliza con la formación de estructuras altamente empaquetadas enriquecidas en DPPC, que son las responsables de la máxima estabilidad de los pulmones en condiciones fisiológicas (Goerke 1998, Wustneck et al. 2005). Sin embargo, los experimentos realizados sugieren que a 37 °C las películas de surfactante están menos condensadas y deshidratadas que las de DPPC pura, considerando los menores valores de GPF obtenidos por compresión de películas conteniendo la sonda. Esto indica que alcanzar altas presiones supone algo más que condensar las películas a estados tipo sólidos. En películas interfaciales formadas por adsorción de suspensiones acuosas de surfactante nativo, probablemente constituidas por una monocapa con bicapas asociadas, los altos valores de GPF son obtenidos sólo al final del plateau característico, a alrededor de los 45 mN/m, en la isoterma presión/área. Este plateau ha sido atribuido a la formación de plegamientos y estructuras tridimensionales asociadas a la interfase, promovidos por las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C y favorecidas por la presencia de especies lipídicas insaturadas y/o colesterol (Lhert et al. 2007, Schief et al. 2003, Serrano y Pérez-Gil 2006, Yan et al. 2005). El final del plateau parece coincidir con el estado de máxima deshidratación, según la información que proporciona el LAURDAN, y precede al aumento final de presión superficial que conduce en las películas de surfactante a las menores tensiones superficiales. Las películas conteniendo colesterol producen, como resultado de la compresión, los valores más altos de GPF a 37 °C, sugiriendo que ciertas proporciones de colesterol podrían ayudar a alcanzar estados altamente condensados y deshidratados en películas complejas como las formadas por surfactante nativo entero, particularmente en condiciones de temperatura fisiológica. Estudios recientes demuestran que la adición de colesterol a surfactantes clínicos, que generalmente son desprovistos del mismo, aumenta de manera significativa la estabilidad de las películas interfaciales que son sujetas a compresión en condiciones fisiológicas de temperatura y humedad (Zuo et al. 2006). La presencia de colesterol en el surfactante nativo en proporciones del orden de 5-10% en peso debe tener una contribución importante a nivel estructural, modulando la organización lateral de los lípidos y proteínas en membranas de surfactante (Bernardino de la Serna et al. 2004), y sugiere una posible estrategia para optimizar preparaciones terapéuticas de surfactante. La proporción de colesterol probablemente no deba sobrepasar cierto nivel, teniendo en cuenta que un contenido

exacerbado de lípidos neutros va en detrimento de la funcionalidad del surfactante (Gunasekara et al. 2005, Leonenko et al. 2007).

Los estudios realizados demuestran que la fluorescencia del LAURDAN puede ser empleada como una herramienta para evaluar la formación de películas interfaciales de surfactante mediante mediciones espectroscópicas. La clásica manera de evaluar la funcionalidad del surfactante en balanzas de superficie no permite realizar estudios de tipo masivo de diversas muestras y dificulta (por la accesibilidad al ensayo de un número elevado de muestras) la búsqueda de nuevos fármacos y aditivos para mejorar las prestaciones de surfactantes terapéuticos. Otros métodos espectroscópicos han sido diseñados para evaluar la actividad superficial del surfactante (Ravasio et al. 2008), pero ninguno de ellos mide de manera cuantitativa propiedades directamente relacionadas con la presión superficial y la acumulación de surfactante en la interfase aire-líquido. Los resultados obtenidos en este trabajo permiten proponer que la formación de las películas de surfactante puede ser cuantificada y seguida de manera fácil en diversas muestras monitorizando cuán rápido altos valores de GPF son alcanzados en la interfase.

La Figura 7 representa la correlación existente entre los valores de GPF y el A/molécula en las diferentes películas estudiadas, preparadas a partir de mezclas simples o complejas de lípido a 24 ± 1 °C. Todas las películas estudiadas presentan una gran correlación entre los valores de GPF y el A/molécula (véase la parte lineal de todas las isoterms) y prácticamente todas las películas, excepto las preparadas por adsorción de surfactante pulmonar nativo entero, muestran una dependencia cuantitativamente comparable de la GPF en función del estado de compresión, considerando el error experimental (véase el área sombreada en Fig. 7). Además, en el rango de $50-100 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, la fluorescencia del LAURDAN parece venir definida estrictamente por el empaquetamiento lipídico, independientemente de la composición lipídica particular de las películas y de posibles diferencias en términos de la organización lateral. Sin embargo, el perfil de Area/molécula de los valores de GPF de películas de surfactante pulmonar está claramente desplazado hacia áreas reducidas. Esto significa que a estados de compresión o densidades de empaquetamiento similares, las películas de surfactante adsorbidas presentan mayores niveles de hidratación que el resto de las películas formadas por extensión de mezclas de lípido o lípido/proteína en disolventes orgánicos. Se debe tener en cuenta que la determinación del Area/molécula en películas formadas por depósito de suspensiones acuosas de surfactante pulmonar entero tiene cierta incertidumbre. Los valores de área/molécula representados en la Fig. 7 fueron calculados asumiendo una transferencia a la interfase del 100% de las moléculas de fosfolípido. Si una fracción de surfactante no fuese transferida, porque parte de los complejos estuvieran manteniendo la asociación con la interfase en forma de bicapas o difundiendo desde la superficie hacia el reservorio de la subfase acuosa, los valores de área/molécula estarían subestimados. Las isoterms Presión/Area de películas formadas por surfactante nativo entero están usualmente desplazadas, según los resultados que se obtienen en los estudios en balanzas de superficie, a valores de A/molécula un 5% menores en comparación con las películas del extracto orgánico del surfactante que produce presiones superficiales similares, sugiriendo que una porción del material no estaría presente en la interfase.



Por otra parte, el estudio de las propiedades espectroscópicas del LAURDAN a diferentes estados de compresión de las películas requiere obtener isothermas del tipo π -A en diferentes pasos, incluyendo períodos de tiempo en los cuales la compresión es detenida y la presión mantenida para poder obtener los espectros de emisión del LAURDAN correspondientes. En estos períodos de “equilibrado”, las diferentes películas experimentan una relajación parcial que es dependiente de la presión superficial, la composición de la película y la temperatura. La relajación en las películas formadas por extensión de soluciones en solvente orgánico probablemente supone sólo la reorganización y redistribución de las diferentes moléculas en el plano de la interfase. Sin embargo, la relajación en películas formadas por extensión y adsorción de suspensiones acuosas, que potencialmente contienen complejos monocapa/bicapa, puede incluir además reorganizaciones tridimensionales que resultan en un estado más hidratado de la región de las cabezas polares como demuestra la fluorescencia del LAURDAN. Es interesante destacar que la compresión de las películas de surfactante nativo más allá del plateau a 40-45 mN/m arroja valores de GPF similares a los que se observan en las películas formadas por extensión de soluciones en solvente orgánico, lo que sugiere que la reorganización tridimensional promovida por la compresión de las películas en el plateau ayuda a producir similares estados de empaquetamiento, más deshidratados. La red tridimensional de membranas que constituyen las películas de surfactante nativo podría mantener un carácter más dinámico a lo largo de la isoterma, como lo manifiesta el menor valor de GPF, que podría ser importante para facilitar las reorganizaciones estructurales asociadas con la adsorción de surfactante secretado o con la re-extensión de las fases

comprimidas durante la expansión (Pérez-Gil 2008). Es posible que parte de la señal de fluorescencia de la sonda en películas de surfactante nativo provenga de las bicapas asociadas a la monocapa, en donde se encuentra menos empaquetada que en la monocapa interfacial, que se encuentra sometida a compresión, y que posiblemente ésta sea la razón de detectar “en promedio” un estado aparentemente más hidratado en este tipo de películas. Sin embargo, el hecho de que la máxima compresión de estas películas produzca valores de GPF máximas similares, sugiere que todo el complejo (película interfacial asociada a multicapas) alcanza estados altamente empaquetados homogéneos, con las mismas características de deshidratación.

Otra pregunta interesante sobre la que cabe discutir, derivada de los resultados obtenidos, es la comparación del comportamiento de los modelos bicapa y monocapa. Se espera que la comparación de la fluorescencia del LAURDAN obtenida de bicapas y monocapas de composición comparable y bajo las mismas condiciones permita hallar una correlación directa entre el estado de empaquetamiento en ambos tipos de organización, tomando como referencia la fluorescencia en monocapas, que poseen un estado de empaquetamiento definido (compresión controlada). Esta pregunta es relevante en la biofísica de membranas así como también para comprender la equivalencia en el comportamiento en monocapas y bicapas en términos de organización lateral e interacciones lípido-lípido y lípido-proteína. Se asume habitualmente que el empaquetamiento lipídico y la presión lateral en bicapas es comparable al obtenido por fosfolípidos en monocapas comprimidas a presiones en el orden de los 30 mN/m (Brockman 1999), siendo este valor un parámetro de referencia en muchos estudios que emplean monocapas como modelos de diferentes sistemas de membrana (Barlic et al. 2004, Caaveiro et al. 2001, Thuduppathy et al. 2006, Vernoux et al. 2007), independientemente de su composición lipo-proteica particular. Recientemente, un estudio similar fue realizado por el grupo de Bagatolli (Brewer et al. 2010), comparando las propiedades espectroscópicas de monocapas interfaciales y bicapas planas en soporte con geometría similar y exactamente bajo las mismas condiciones experimentales, ya que se empleaba el mismo equipo. Se encontró que la correspondencia entre los valores de GPF de mono y bicapas de dioleilfosfatidilcolina (DOPC) y dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) ocurre cuando las correspondientes películas interfaciales fueron comprimidas hasta 26 ± 2 y 28 ± 3 mN/m, respectivamente.

En los experimentos realizados en el presente trabajo, la buena correlación observada entre presión superficial y GPF del LAURDAN en las diferentes películas interfaciales sugiere en principio su utilidad como potencial mecanismo de calibración para inferir parámetros de empaquetamiento en membranas, una vez que se obtienen los espectros de la sonda en bicapas con la misma composición. Sin embargo, los valores máximos de GPF obtenidos en monocapas comprimidas fueron siempre menores que los de bicapas a la misma temperatura, siendo esta diferencia más sustancial cuanto más alta es la temperatura. Como referencia, se pueden citar los datos de empaquetamiento fosfolipídico previamente obtenido para modelos de bicapas mediante cristalografía de rayos X y modelado molecular. El área/molécula ocupada por moléculas de DPPC ha sido estimado en alrededor de 48 \AA^2 a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 59 \AA^2 a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 62 \AA^2 a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ y 64 \AA^2 a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (Kucerka et al. 2005, Nagle and Tristram-Nagle 2000). El Área/molécula vs. GPF que se representa en la Fig. 7 indica que la fluorescencia del LAURDAN en películas de DPPC comprimidas hasta $50\text{-}60 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ tiene una GPF alrededor de 0,3-

0,4; mientras que la GPF en bicapas de DPPC está por encima de 0,5 a temperaturas entre 20-30 °C. El Area/molécula de un fosfolípido insaturado como POPC en bicapas es de alrededor de 68 Å² a 30 °C (Kucerka et al. 2005). La GPF del LAURDAN en una película de POPC comprimida a ~70 Å²/molécula está alrededor de -0,15 mientras que en bicapas de POPC a 25-30 °C está alrededor de -0,05. Si la hidratación de la sonda, según se puede evaluar de los valores de GPF, dependiese solamente del empaquetamiento molecular se podría concluir que el empaquetamiento fosfolipídico en bicapas produce mayores niveles de deshidratación del LAURDAN que en monocapas, aún cuando las películas fuesen comprimidas a valores cercanos al colapso. Asumiendo que la compresión interfacial permite en principio obtener estados altamente empaquetados de las películas lipídicas, con los lípidos ocupando la menor área/molécula posible, la diferencia aparente en hidratación de la sonda al comparar los valores de GPF obtenidos para mono y bicapas puede tener su origen en una diferente disposición de la sonda o en una diferencia intrínseca en el nivel de hidratación de la región de las cabezas polares. Es posible que la estructura de la bicapa ofrezca a la molécula de LAURDAN la posibilidad de localizarse más profundamente en la región de las cadenas de acilo en comparación con películas interfaciales, en donde puede estar forzosamente localizada cerca de la superficie acuosa en la que está confinada. El efecto de la temperatura sugiere otra probable fuente de mayor hidratación en el entorno de la sonda incorporada en películas interfaciales. La evaporación en la superficie de la fase acuosa probablemente induce un gradiente del contenido en agua hacia la fase gaseosa y por tanto dentro de la región de las cadenas de acilo hasta que se equilibra la presión parcial de vapor de agua a una temperatura definida. Este efecto es probablemente más importante cuanto mayor es la temperatura, con una mayor evaporación efectiva a 37 que a 25 °C. El flujo de moléculas de agua a través de la capa lipídica es una fuente de desestabilización, influenciando el estado de empaquetamiento alcanzado en la interfase. Esto sugiere que la organización lipídica, la susceptibilidad de interacción de proteínas con los lípidos y su inserción en las capas lipídicas, así como la dependencia de estos y otros sucesos en la membrana del balance de interacciones polares/no polares, puede ser muy diferente en modelos de mono y bicapas, los cuales pueden ser afectados de diferente manera por el flujo de moléculas de agua a través de la región de las cadenas de acilo.

El efecto de hidratación en la estabilidad de estados empaquetados en películas interfaciales fosfolipídicas tiene una relevancia fisiológica particular en el caso del surfactante pulmonar. Está ampliamente asumido que la humedad en los espacios aéreos distales es del orden de 100% y que esto puede suponer una fuente de inestabilidad de los estados comprimidos de las películas de surfactante que se alcanza al final de la espiración, cuando la tensión superficial debe reducirse a valores por debajo de los 5 mN/m. De hecho, se ha demostrado recientemente que la capacidad de las distintas preparaciones de surfactante para alcanzar y mantener muy bajas tensiones superficiales es muy diferente en interfases aire-líquido secas o húmedas (Acosta et al. 2007, Zuo et al. 2005 y 2006). Películas comprimidas generadas a partir de surfactantes clínicos con diferente composición son muy inestables en interfases expuestas a aire húmedo, mientras que son capaces de mantener muy bajas tensiones superficiales durante sucesivos ciclos de expansión-compresión si se exponen a aire seco (Acosta et al. 2007, Zuo et al. 2006). Las películas formadas por surfactante nativo completo son igualmente estables y capaces de alcanzar muy bajas tensiones superficiales ya sea en presencia de aire

seco o húmedo (Zuo et al. 2006), característica que puede ser alcanzada por adición de colesterol a los surfactantes clínicos cuya composición carece de esteroides. Los experimentos realizados demuestran que la presencia de colesterol ayuda a alcanzar menores niveles de hidratación durante la compresión de las películas, como se monitoriza con el LAURDAN, presumiblemente porque el colesterol contribuye a “acomodar” los defectos de empaquetamiento en las películas lipídicas, propiedad bien documentada en bicapas (Arrais y Martins 2007, Norlen 2001, Theunissen et al. 1986).

Sucesivos experimentos ayudarán a confirmar la importancia del colesterol, un componente del surfactante pulmonar relativamente infravalorado, para optimizar el empaquetamiento lipídico en películas de surfactante y por tanto aumentar la estabilidad y eficiencia de películas de surfactante en condiciones fisiológicas extremas.

La concentración de colesterol presente en las muestras de surfactante pulmonar es uno de los parámetros críticos en la modulación de la estructura lateral de las membranas. Si además se considera que la proporción de colesterol en surfactante varía según diferentes situaciones metabólicas o ambientales (como estados de letargo), se puede pensar en un papel importante del colesterol para sostener la adecuada estructura que las membranas del surfactante requieren en cada momento.

Capítulo II

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LAS RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN DEL SURFACTANTE PULMONAR.



Los resultados que se muestran en este capítulo fueron realizados en nuestros laboratorios.

INTRODUCCIÓN

El surfactante pulmonar tiene la capacidad de estabilizar la superficie respiratoria, la cual a su vez depende críticamente de su capacidad para formar películas altamente empaquetadas en la interfase aire-líquido.

Estudios estructurales con diferentes sistemas modelo sugieren que la presencia de una adecuada combinación de especies fosfolípídicas con bajas y elevadas temperaturas de transición de fase (T_m) es necesaria para mantener la segregación de fases que es fundamental para la funcionalidad del surfactante pulmonar. Esta particular composición de las películas de surfactante permite simultáneamente obtener estabilidad estructural en estados de alta compresión y un entorno dinámico que facilita el desarrollo de las transformaciones estructurales que se cree ocurren durante el ciclo respiratorio (Serrano y Pérez-Gil 2006, Pérez-Gil 2008, Wustneck et al. 2005).

Se ha visto incluso que a temperaturas mayores que la fisiológica, el surfactante pulmonar conserva, hasta cierto punto, la capacidad de reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido del alvéolo. Esto se debe a la particular composición lipídica, que asegura fluidez pero sin perder estabilidad estructural aún a temperaturas por encima de los 37 °C.

Para estudiar las relaciones estructura-función en el surfactante pulmonar hemos recurrido al uso de sondas fluorescentes y realizado estudios funcionales en balanzas de superficie y el surfactómetro de burbuja cautiva.

La fluorescencia del LAURDAN ha sido recientemente empleada para obtener información sobre la organización lateral de monocapas interfaciales de lípidos simples ya que puede revelar la segregación de dominios condensados y las transiciones tridimensionales resultado de la compresión, con resolución microscópica (Brewer et al. 2010). En este contexto, hemos caracterizado el empaquetamiento lipídico mediante el uso del LAURDAN en membranas y películas complejas, como las que mimetizan el surfactante y algunos de sus modelos.

Para continuar con el estudio de las relaciones estructura-función en el surfactante pulmonar hemos realizado experimentos en función de la temperatura con la sonda DPH, lo que permite obtener información del grado de fluidez de las membranas y orden lipídico en función de su composición. La sonda se distribuye al azar en la región hidrofóbica de la membrana y es sensible a los cambios en el orden lipídico en diferentes segmentos en el interior de la bicapa (Lentz 1989), distribuyéndose uniformemente en membranas en estado gel y fluidas (Sklar et al. 1975, Lentz 1989).

Ensayos de tipo calorimétrico nos han permitido definir la temperatura de transición de fase del surfactante pulmonar porcino, de su extracto orgánico y de diversas mezclas lipídicas que mimetizan su composición.

Para evaluar la funcionalidad del surfactante en un amplio rango de temperatura se han realizado experimentos de extensión y adsorción en balanzas de superficie y ensayos en el surfactómetro de burbuja cautiva.

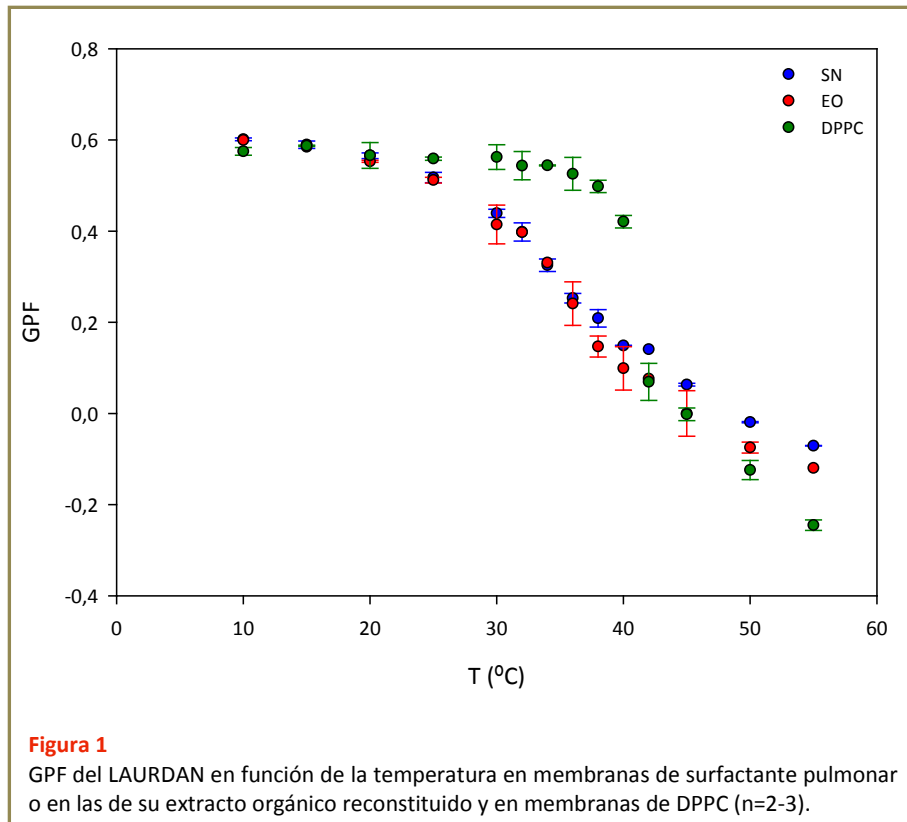
RESULTADOS

1. FLUORESCENCIA

1.1. LAURDAN

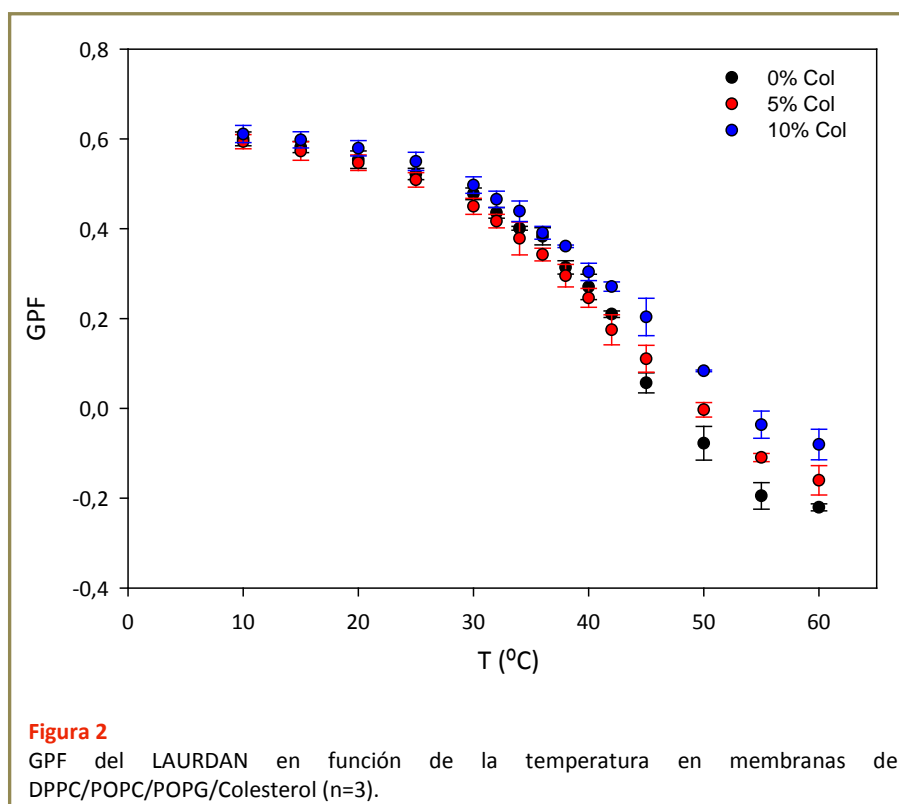
El espectro de emisión de esta sonda es particularmente sensible al entorno que la rodea en membranas. La fluorescencia del LAURDAN es altamente sensible al estado de hidratación de la región de las cabezas polares de los fosfolípidos, la cual a su vez depende del estado de fase, de la organización lateral y del empaquetamiento lipídico; factores que a su vez son influenciados por la temperatura (Bagatolli 2003, De Vequi-Suplicy et al. 2006, Parasassi et al. 1991).

El espectro de emisión del LAURDAN es azul en la fase gel mientras que se desplaza al verde cuando las membranas se hallan en el estado líquido cristalino (Parasassi et al. 1990 y 1991).



En la **Figura 1** se resumen los perfiles termotrópicos del surfactante nativo, de suspensiones acuosas de su extracto orgánico y de suspensiones multilamelares de DPPC. Es posible determinar el rango de temperatura en el que se produce la transición de fase. Las membranas de surfactante nativo, así como también las suspensiones preparadas a partir de su extracto orgánico presentan una marcada y amplia transición, que probablemente corresponda al paso progresivo desde estados más ordenados a fases más desordenadas, como ha sido previamente caracterizado (Bernardino de la Serna et al. 2004, Dluhy et al. 1989, Trauble et al. 1974). Esta transición ocurre con un aparente punto de inflexión alrededor de los 36 °C. Las bicapas de DPPC muestran transiciones más abruptas con su punto de inflexión alrededor de los 42 °C.

La **Figura 2** resume los perfiles termotrópicos de la mezcla DPPC/POPC/POPG/Colesterol (peso/peso/peso/peso) con diferentes contenidos de colesterol. El rango de temperatura en el que se lleva a cabo la transición ocurre entre los 30 y 50 °C. Para las tres muestras estudiadas el punto de inflexión se encuentra alrededor de los 40-42 °C. A temperaturas por debajo de la transición de fase no se observan diferencias entre las tres mezclas ternarias (con contenido variable de colesterol) estudiadas. Sin embargo, a temperaturas superiores a los 45 °C, cuanto mayor es el contenido de colesterol los valores de GPF son mayores, indicando que el medio en el que se encuentra inmersa la sonda es más ordenado o deshidratado debido al efecto ordenador del colesterol en fases fluidas.

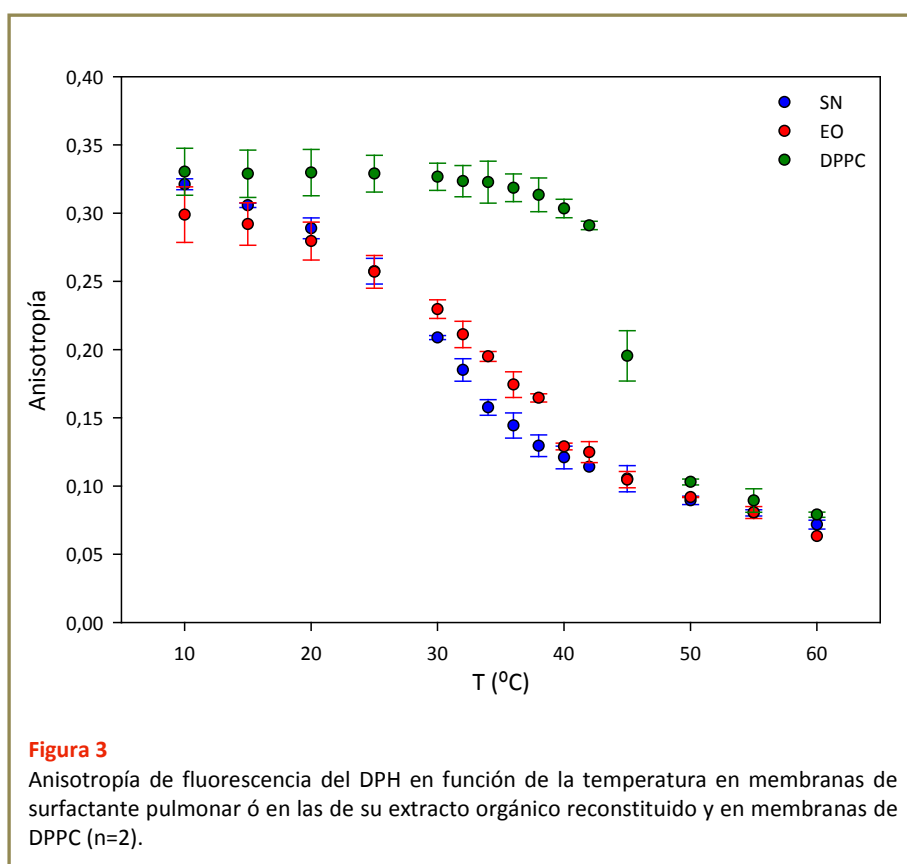


1.2. DPH

Para poder determinar el rango de temperatura en el cual se produce la transición de fase de una muestra se puede usar, además de la fluorescencia del LAURDAN, una técnica como la anisotropía de fluorescencia, que da información sobre el estado de fluidez de las membranas.

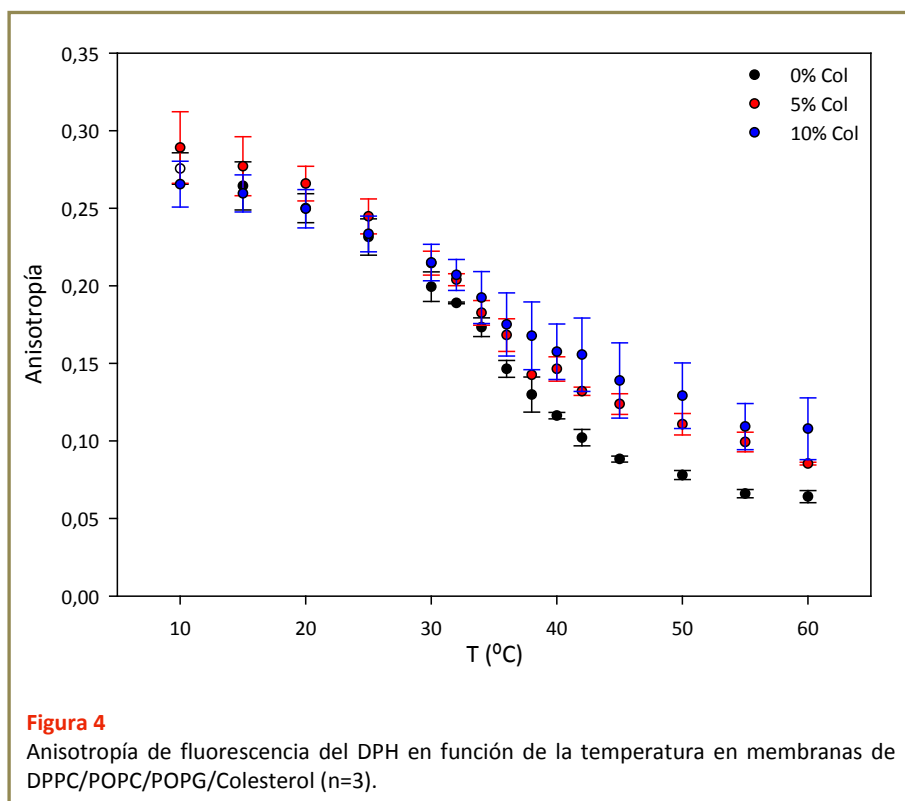
Para ello, se ha empleado la sonda DPH (Difenilhexatrieno) que se distribuye en la región hidrofóbica de la membrana y es sensible a los cambios en el orden lipídico y fluidez de la membrana (Holopainen et al. 1998, Lentz 1993, Repáková et al. 2004). Además, se distribuye uniformemente en las fases gel y fluida (Sklar et al. 1975, Lentz 1989).

La **Figura 3** resume los perfiles termotrópicos del surfactante nativo, de suspensiones acuosas de su extracto orgánico y de suspensiones multilamelares de DPPC. Es posible determinar el rango de temperatura en el que se produce la transición de fase. Las membranas de surfactante nativo, así como también las suspensiones preparadas a partir de su extracto orgánico presentan una marcada y amplia transición, tal y como se observaba en los perfiles termotrópicos del LAURDAN, que probablemente corresponda al paso progresivo desde estados más ordenados a fases más desordenadas, como ha sido previamente caracterizado (Bernardino de la Serna et al. 2004, Dluhy et al. 1989, Trauble et al. 1974). Esta transición ocurre con un aparente punto de inflexión alrededor de los 32 °C. Las bicapas de DPPC muestran transiciones más abruptas con su punto de inflexión alrededor de los 42 °C.



A temperaturas por debajo de 25 °C y por encima de 45 °C los valores de anisotropía para el SN y el EO son similares, pero se observa una marcada diferencia en el rango de temperatura comprendido entre 30 y 40 °C. En este intervalo los valores de anisotropía para el EO son ligeramente superiores, indicando que la sonda está inmersa en un entorno ligeramente más rígido que el sentido para el surfactante nativo.

La **Figura 4** resume los perfiles termotrópicos de la mezcla DPPC/POPC/POPG/Colesterol (peso/peso/peso/peso) con diferentes contenidos de colesterol. El rango de temperatura en el que se lleva a cabo la transición ocurre entre los 30 y 40 °C. Para las tres muestras estudiadas el punto de inflexión se encuentra alrededor de los 32-34 °C. Es sabido que el colesterol introduce un efecto “desordenante” y fluidificador en las fases ordenadas mientras tiene un efecto “ordenante” y rigidificante sobre las fases desordenadas (Bernardino de la Serna et al. 2004, Yu y Possmayer 2003). A temperaturas por debajo de la transición de fase no se observan diferencias entre las tres mezclas ternarias (con contenido variable de colesterol) estudiadas. Sin embargo, a temperaturas superiores, cuanto mayor es el contenido de colesterol los valores de anisotropía son mayores, indicando que el medio en el que se encuentra inmersa la sonda es más rígido debido al efecto ordenador del colesterol en fases fluidas. A estas temperaturas también se observa que cuanto mayor es el contenido de colesterol mayor es la desviación estándar entre réplicas.



El perfil termotrópico del surfactante nativo se encuentra en medio de los perfiles obtenidos para las tres mezclas miméticas estudiadas, lo que permite corroborar que el contenido de colesterol del surfactante pulmonar es menor al 10% como ha sido comentado en la

Introducción (ver **Tabla 1**, donde se muestran los valores promedio y las respectivas desviaciones estándar).

Tabla 1
Anisotropía en función de la temperatura

T °C	Muestra			
	SN	0% Col	5% Col	10% Col
10	0,321 ± 0,004	0,276 ± 0,010	0,289 ± 0,023	0,266 ± 0,015
15	0,306 ± 0,002	0,264 ± 0,016	0,277 ± 0,019	0,260 ± 0,012
20	0,289 ± 0,008	0,250 ± 0,009	0,266 ± 0,011	0,250 ± 0,012
25	0,257 ± 0,009	0,232 ± 0,012	0,245 ± 0,011	0,233 ± 0,012
30	0,209 ± 0,001	0,199 ± 0,009	0,215 ± 0,008	0,215 ± 0,012
32	0,185 ± 0,008	0,189 ± 0,001	0,204 ± 0,004	0,207 ± 0,010
34	0,158 ± 0,006	0,173 ± 0,006	0,183 ± 0,008	0,192 ± 0,017
36	0,144 ± 0,009	0,146 ± 0,005	0,168 ± 0,011	0,175 ± 0,020
38	0,130 ± 0,008	0,130 ± 0,011	0,143 ± nd	0,168 ± 0,022
40	0,121 ± 0,008	0,116 ± 0,002	0,146 ± 0,008	0,158 ± 0,018
42	0,114 ± nd	0,102 ± 0,005	0,132 ± 0,003	0,156 ± 0,024
45	0,105 ± 0,010	0,088 ± 0,002	0,124 ± 0,007	0,139 ± 0,024
50	0,090 ± 0,003	0,078 ± 0,003	0,111 ± 0,007	0,129 ± 0,021
55	0,080 ± 0,002	0,066 ± 0,003	0,099 ± 0,006	0,109 ± 0,015
60	0,072 ± 0,003	0,064 ± 0,004	0,085 ± 0,001	0,108 ± 0,020

(nd = no determinado) *Promedio (n = 2-3) ± DE*

Puede decirse que estas mezclas empleadas mimetizan en cierta forma el comportamiento complejo del surfactante nativo y sirven como referencia para realizar otro tipo de estudios.

2. CALORIMETRÍA

En general, los lípidos aislados a partir de membranas biológicas muestran transiciones entre fases ordenadas/desordenadas que ocurren en un intervalo de temperatura entre -20 y 60 °C, en el que las membranas absorben calor, y que suponen la pérdida del ordenamiento lateral y el de las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas lipídicas (Heimburg y Jackson 2005). Los estudios termotrópicos de material surfactante se llevaron inicialmente a cabo en mezclas sencillas que contenían fundamentalmente DPPC y colesterol (Phillips y Chapman 1968, Trauble et al. 1974) y posteriormente en presencia de las proteínas específicas del surfactante pulmonar (Shiffer et al. 1988, 1993, Williams et al. 1991). Actualmente, la manera más empleada, por su sencillez y rapidez, para investigar las transiciones de fase asociadas a variaciones de temperatura en membranas en suspensión es el empleo de la microcalorimetría diferencial de barrido (DSC). Los termogramas obtenidos en la presente Tesis corresponden a procesos de melting (fusión) o desorganización de membranas lipo-proteicas como resultado del incremento de la temperatura. Estos procesos son de tipo endotérmicos (absorben calor) ya que las muestras requieren energía para cambiar su estado físico-químico. Es por esto que siempre se obtuvieron como resultado termogramas con curvaturas positivas o cóncavas.

En la **Figura 5** se muestran los termogramas obtenidos para el surfactante pulmonar porcino, su extracto orgánico reconstituido en suspensión acuosa y de la mezcla DPPC/POPC/POPG con contenido variable de colesterol.

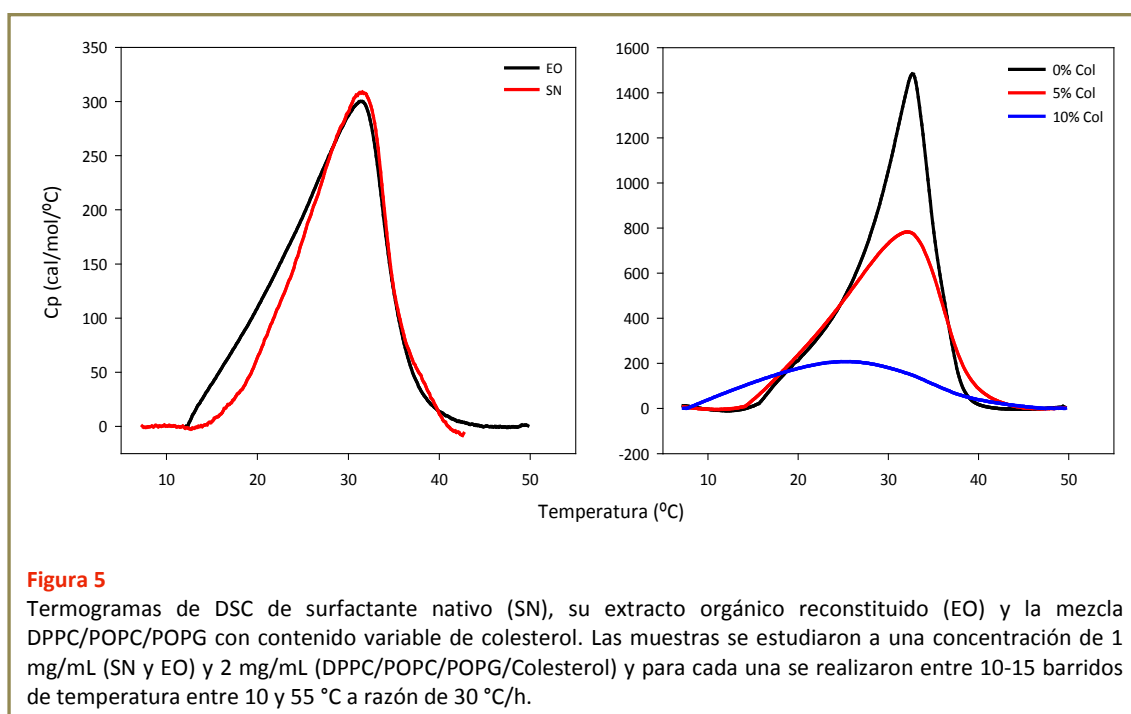


Figura 5

Termogramas de DSC de surfactante nativo (SN), su extracto orgánico reconstituido (EO) y la mezcla DPPC/POPC/POPG con contenido variable de colesterol. Las muestras se estudiaron a una concentración de 1 mg/mL (SN y EO) y 2 mg/mL (DPPC/POPC/POPG/Colesterol) y para cada una se realizaron entre 10-15 barridos de temperatura entre 10 y 55 °C a razón de 30 °C/h.

Todas las preparaciones estudiadas mostraron una transición principal de fase ancha y asimétrica, que posiblemente sea el resultado del solapamiento de varias transiciones en el intervalo de temperatura comprendido entre 20 y 40 °C. La transición principal se asocia a cambios de fase tipo ordenado-desordenado de regiones de membrana con diferente proporción de fosfolípidos saturados/insaturados. Además, en todas las muestras se observa que inmediatamente después de la T_m se produce una caída muy pronunciada del flujo de calor, precisamente en el intervalo de temperatura a la que el surfactante pulmonar nativo lleva a cabo su función fisiológica. Este hecho es interesante y hace pensar que un pequeño cambio en el rango de la temperatura fisiológica puede provocar una variación importante en la capacidad calorífica de estas membranas y por tanto afectar su funcionalidad.

En todas las muestras estudiadas, en el intervalo de temperatura entre 35 y 37,5 °C la transición principal aún no se ha completado, indicando que a la temperatura fisiológica puede haber aún una coexistencia de fases. Este aspecto fue descrito por Trauble ([Trauble et al. 1974](#)) quien mediante estudios de fluorescencia y de dispersión de luz observó que en las membranas de surfactante pulmonar se producían transiciones de fase en el intervalo comprendido entre 20-40 °C, con una T_m en torno a 30-32 °C.

La T_m de bicapas lipídicas que sufren transiciones endotérmicas depende de la longitud de las cadenas de acilo de los fosfolípidos, de su grado de insaturación y del tipo de cabeza polar ([Cevc 1987](#)). Estas características afectan directamente al área y al volumen efectivo de los lípidos provocando cambios en la elasticidad y compresibilidad de las membranas. Se ha publicado que los valores máximos de estos parámetros en las membranas se obtienen en la

región de la transición de fase, cerca de la T_m y que esto podría tener importantes implicaciones funcionales (Heimburg y Jackson 2005).

En la **Tabla 2** se resumen los valores de los parámetros típicos que describen de manera cuantitativa la transición calorimétrica principal asociada a las muestras estudiadas, obtenidos a partir de los termogramas de la **Figura 5**.

Todas las muestras mostraron termogramas con poca cooperatividad, con picos de $\Delta T_{1/2}$ en torno a 9-12 °C e incluso 20 °C para la muestra con mayor contenido de colesterol. Existen diferencias importantes en la T_m y en la entalpía. Teniendo en cuenta que la entalpía asociada a la transición calorimétrica de cada una de las muestras da una idea de la cantidad de calor que cada tipo de membrana requiere para pasar de un estado ordenado a uno más desordenado, es interesante destacar que los valores más altos se obtuvieron para las muestras que no contienen proteínas, es decir, para DPPC/POPC/POPG con contenido variable de colesterol. Para estas muestras las entalpías asociadas a la transición de fase son muy elevadas, siendo su valor menor cuanto mayor es el contenido de colesterol. Cabe recordar que el colesterol produce un efecto fluidificador cuando se encuentra en concentración elevada y probablemente por ello se requiere menos flujo de calor para que se produzca la transición desde fases ordenadas a más desordenadas cuando el contenido de colesterol se eleva. En cambio, para el surfactante nativo y su extracto orgánico, los valores de T_m y entalpía son similares para ambos pero mucho menores que los anteriores. Esto indicaría que las proteínas en las mezclas naturales están formando complejos con los lípidos que afectan al ordenamiento de los mismos, haciendo que sea necesario aportar menos energía en forma de calor para pasar a un estado más desorganizado.

En lo que respecta a la temperatura de transición, el surfactante nativo y su extracto orgánico poseen una T_m en torno a 31,5 °C, mientras que para la muestra ternaria DPPC/POPC/POPG, la T_m disminuye a medida que aumenta el contenido de colesterol, siendo muy marcada esta disminución cuando el contenido es del 10%.

Tabla 2

Muestra	ΔH (kcal/mol)	T_m (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
SN	3,96 ± 0,21	31,38 ± 0,25	11,19 ± 1,20
EO	4,08 ± 0,22	31,69 ± 0,32	11,67 ± 0,43
0%	12,63 ± 1,17	32,91 ± 0,37	8,34 ± 1,41
5%	11,23 ± 0,57	32,13 ± 0,02	12,96 ± 0,19
10%	4,84 ± 0,70	26,25 ± 1,68	20,79 ± 0,09

Promedio (n = 2-3) ± DE

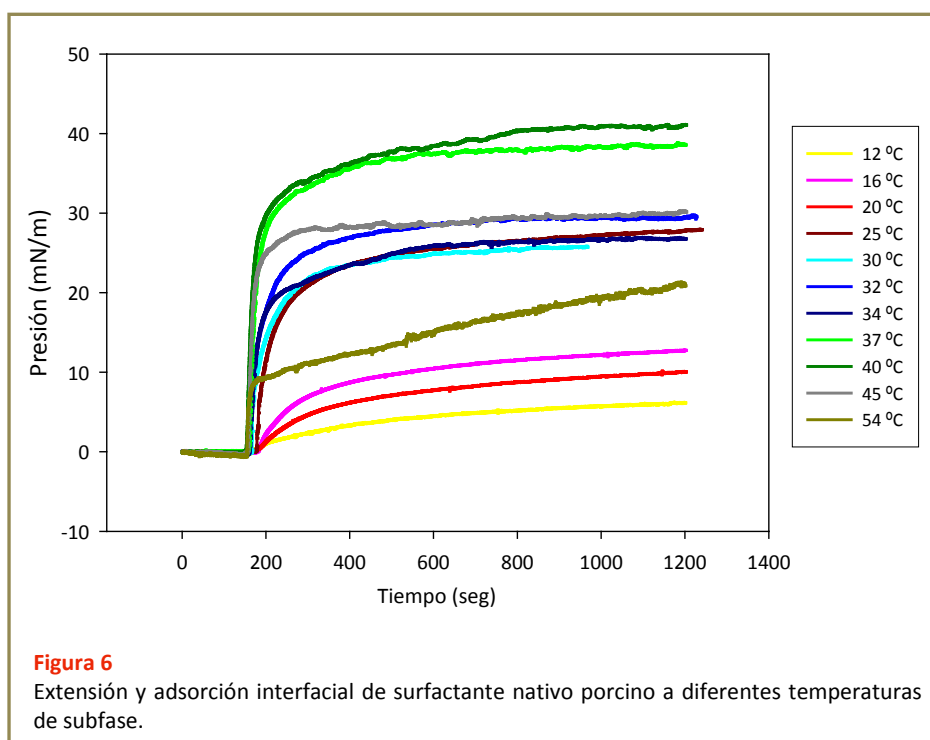
Desde un punto de vista cualitativo, la similitud de las curvas calorimétricas asociadas al surfactante nativo, su extracto orgánico y la mezcla ternaria que no posee proteínas sugiere que los lípidos son los principales responsables de la organización de las membranas del surfactante que a su vez condiciona sus propiedades termotrópicas. Esta idea ya fue postulada

por Trauble (Trauble et al. 1974) que mediante métodos espectroscópicos sugirió que las proteínas tenían poca influencia en la transición de fase de la mezcla completa. Además dedujo que a 37 °C los lípidos parecen estar en un estado fundamentalmente fluido ya que tienen un parámetro de orden asociado de aproximadamente 0.8, en contraste a lo que podía pensarse considerando la T_m de 41 °C de la DPPC que es el componente mayoritario del surfactante pulmonar. De este modo se ha propuesto que la presencia de colesterol y de especies con cadenas hidrocarbonadas insaturadas es lo que produce un ensanchamiento de la transición y una disminución de la T_m , en comparación con los parámetros de las transiciones termotrópicas que ocurren en las bicapas de DPPC pura. Otros estudios realizados por Shiffer y sus colaboradores han analizado el efecto que producen las proteínas hidrofóbicas del surfactante en el comportamiento calorimétrico de membranas lipídicas artificiales (Shiffer et al. 1988 y 1993) y han mostrado que concentraciones crecientes de SP-B o SP-C provocan un ensanchamiento progresivo de la transición principal, un aumento de la T_m y una disminución del valor de la entalpía asociada a esa transición (Shiffer et al. 1993). Comparando los valores de entalpía obtenidos para el SN, su EO y la mezcla ternaria, podemos decir que concuerda el comportamiento con lo descrito por el equipo de Shiffer.

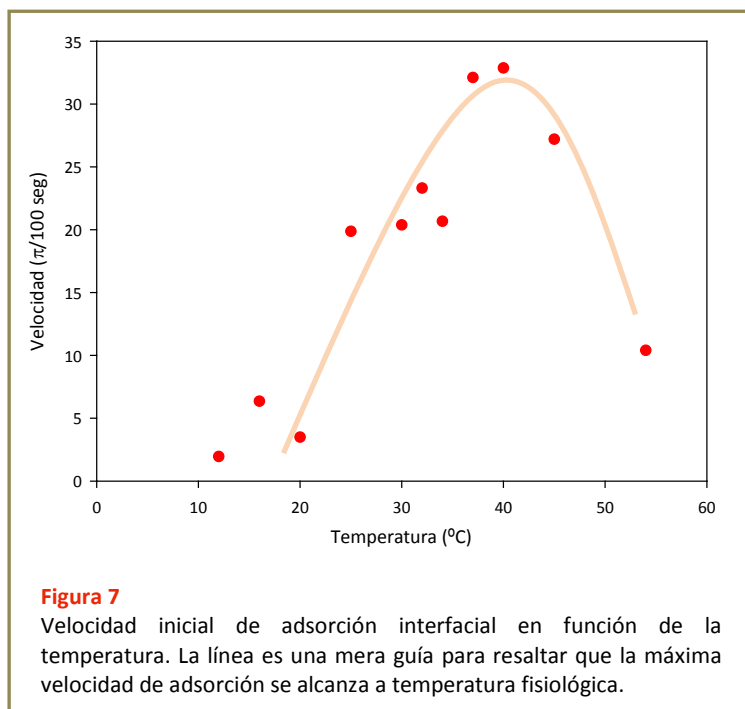
3. ESTUDIOS FUNCIONALES

3.1. Efecto de la temperatura en la extensión y adsorción interfacial de surfactante nativo porcino

Para hallar la temperatura a la cual el surfactante nativo funciona de manera óptima se realizó un experimento en el cual se extiende una alícuota sobre la subfase acuosa 5mM Tris-150mM NaCl a pH 7 previamente termostatazada a diferentes temperaturas y se analiza su transferencia a la interfase y el concomitante incremento en presión superficial (reducción de tensión superficial).



En la **Figura 6** se observa cómo a medida que aumenta la temperatura la capacidad de adsorción interfacial del surfactante es mayor. A temperatura fisiológica (37 °C), e incluso a 40 °C, se alcanza la máxima actividad, alcanzando el surfactante las mayores presiones y por tanto menores tensiones superficiales. Al superar esta temperatura óptima la funcionalidad del surfactante decae.



En la **Figura 7** se representa la velocidad inicial de adsorción, en términos de Presión/unidad de tiempo, en función de la temperatura. Se puede observar cómo el surfactante nativo alcanza su máxima velocidad de adsorción en el rango de temperaturas fisiológicas, para decaer a temperaturas por encima de los 40 °C.

3.2. Comportamiento funcional en el surfactómetro de burbuja cautiva

Todos los experimentos se han realizado con surfactante nativo porcino a una concentración de 10 mg/ml. Esta concentración está cerca del límite de concentración necesaria para un comportamiento funcional óptimo, garantizando material en exceso en la interfase y por tanto una óptima estabilidad de la película interfacial a lo largo de sucesivos ciclos de compresión-expansión. Se han evaluado concentraciones menores pero en general no se obtenía una actividad suficientemente buena de forma reproducible.

Para analizar el efecto de la temperatura en el comportamiento interfacial del surfactante se llevaron a cabo tres tipos de experimentos en el surfactómetro de burbuja cautiva:

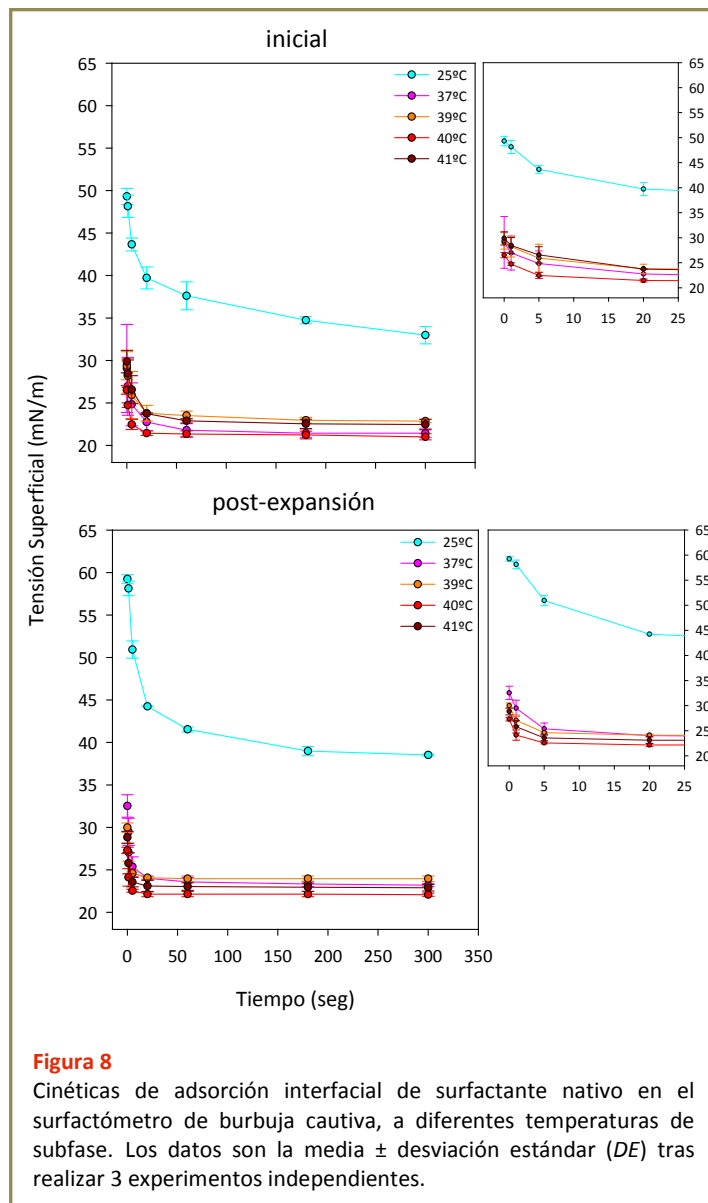
+ *Comportamiento de películas formadas a diferentes temperaturas.*

+ *Comportamiento de películas interfaciales formadas a 37 °C y sometidas posteriormente a estrés térmico a diferentes temperaturas.*

+ Efecto de la temperatura en la estabilidad de películas interfaciales formadas y comprimidas a 37 °C.

- Películas de surfactante formadas a diferentes temperaturas

Cuando una cantidad suficiente de surfactante pulmonar activo se adsorbe a la interfase aire-líquido de la burbuja, en el interior de la cámara del surfactómetro, se produce una disminución casi instantánea de la tensión superficial a valores de equilibrio alrededor de los 20-21 mN/m. Este valor no puede reducirse a menores tensiones a no ser que la película interfacial sea comprimida. En la **Figura 8** se muestran las cinéticas de formación de la película interfacial de surfactante pulmonar porcino a diferentes temperaturas de subfase. En todos los casos un exceso de material (2-4 nmoles) fue inyectado para asegurar que pueda alcanzarse la tensión mínima de equilibrio.



A 25 °C no se alcanzan tensiones de equilibrio de 20 mN/m, sino que los valores no disminuyen más allá de los 32 mN/m, necesitándose casi 3 minutos para alcanzar este valor. Sin embargo, a temperaturas superiores (incluso superiores a la fisiológica) se alcanza la tensión de 20-21 mN/m en menos de 10 segundos. Transcurridos 20 segundos se alcanza la mínima tensión de equilibrio para estas muestras. Es particularmente llamativo que a 40 °C la mínima tensión, alcanzada a los 20 segundos de adsorbida la muestra, sea significativamente menor que a temperatura fisiológica. Esto podría deberse a una mayor fluidez de la película por la elevada temperatura, que da como resultado una organización lateral distinta a la que se obtiene a 37 °C. Este resultado concuerda con lo observado en los experimentos de calorimetría o en las cinéticas de adsorción interfacial.

Transcurridos 5 minutos de la adsorción inicial y formación de la película tensioactiva, se procede a expandir rápidamente la burbuja, monitorizando el cambio en la tensión superficial que se produce como resultado de la incorporación a la nueva interfase abierta de material surfactante adicional desde los reservorios asociados en la subfase (Schürch et al. 1998). El análisis de la adsorción post-expansión está sujeto a menos artefactos que la inicial ya que este proceso no se encuentra afectado por la proximidad de la cánula a la burbuja, o por la propia perturbación introducida durante la inyección del material (Schürch et al. 2010). Además, la adsorción del surfactante a una superficie en expansión, previamente ocupada por surfactante, refleja mejor lo que sucede en el alvéolo durante la respiración. Como ocurre con la adsorción inicial, el surfactante pulmonar se adsorbe rápidamente durante la expansión de la interfase a temperaturas superiores a 25 °C, disminuyendo la tensión superficial a valores de equilibrio en torno a 20-21 mN/m en menos de 10 segundos. Para evaluar la posible existencia de diferencias significativas en las tensiones alcanzadas por el surfactante ensayado a temperaturas iguales o superiores a la fisiológica, se realizó un análisis de varianza (One Way ANOVA).

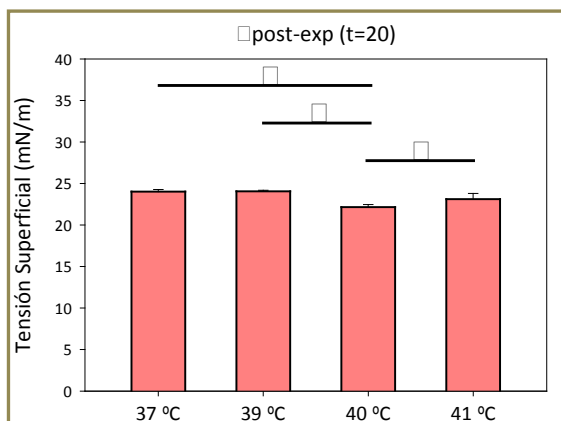


Figura 9
Mínima tensión superficial alcanzada por adsorción post-expansión de surfactante nativo a diferentes temperaturas de subfase.
Las líneas horizontales con asterisco indican las diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,05$).

Aplicando el método Student-Newman-Keuls para comparar los diferentes grupos, utilizando un nivel de significación de 0,05; se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 9.

Existen diferencias significativas al comparar la adsorción del surfactante a las diferentes temperaturas con respecto a la tensión mínima alcanzada a 40 °C. A esta temperatura se alcanzan las menores tensiones superficiales, en ausencia de compresión.

Por otra parte, sí pueden alcanzarse tensiones superficiales menores a las de equilibrio cuando las películas interfaciales se someten a ciclos de compresión-expansión en el surfactómetro.

En la **Figura 10** se comparan las isotermas de compresión-expansión en condiciones cuasi-estáticas de las películas de surfactante nativo a diferentes temperaturas. En estas condiciones, la película se comprime y expande lentamente, en etapas discretas, lo que permite la relajación de la estructura interfacial en los diferentes estados de compresión. El comportamiento canónico de las películas de surfactante a 37 °C coincide con lo publicado anteriormente (Schürch et al. 2010). En esas condiciones el surfactante alcanza de manera reproducible tensiones superficiales mínimas por debajo de 2 mN/m (ver **Tabla 3**) como consecuencia de una reducción muy limitada del área. Además, se aprecia una mínima histéresis entre las isotermas de compresión y expansión en el primer ciclo, reduciéndose progresivamente de manera que a partir del 3^{er} ciclo cuasi-estático las isotermas de compresión y expansión son prácticamente superponibles. En ninguno de los ciclos obtenidos a 37 °C se alcanzan tensiones máximas superiores a 30 mN/m. Sin embargo, este comportamiento interfacial óptimo experimenta profundas alteraciones en función de la temperatura.

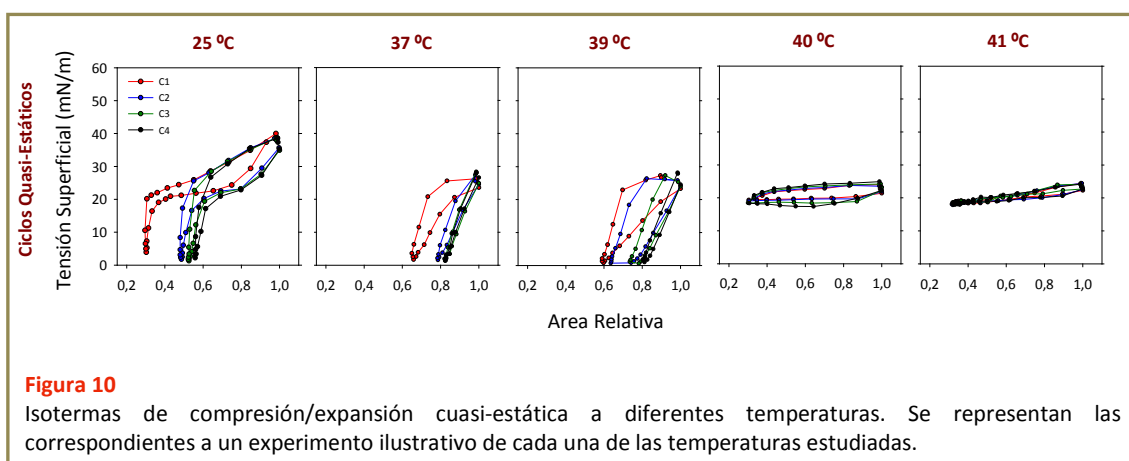


Figura 10 Isotermas de compresión/expansión cuasi-estática a diferentes temperaturas. Se representan las correspondientes a un experimento ilustrativo de cada una de las temperaturas estudiadas.

A 25 °C el comportamiento es totalmente distinto al observado a mayores temperaturas, aunque las isotermas también alcanzan bajas tensiones superficiales. Estas mínimas tensiones sólo se alcanzan tras una reducción del área del orden del 70%, con tensiones superficiales máximas en torno a 40 mN/m y una amplia histéresis, sobre todo en los primeros ciclos. Ello contrasta con el comportamiento tanto a 37 como a 39 °C, en donde se alcanzan mínimas tensiones superficiales con una reducción limitada de área, en torno a 35-40%, con máximas tensiones superficiales que no superan los 30 mN/m y relativamente poca histéresis. A temperaturas mayores a 39 °C no se alcanzan tensiones superficiales menores a 20 mN/m, aún con una reducción de área del 70%. Curiosamente las máximas tensiones tampoco suben más allá de los 25 mN/m.

En el primer ciclo de todas las isotermas obtenidas a 25, 37 ó 39 °C se observa, en mayor o menor medida, una región de pendiente menos inclinada ó plateau, entre los 25 y 15 mN/m durante la compresión, que es menos marcado cuanto mayor es la temperatura. Este plateau se ha interpretado como una consecuencia del “squeeze-out” o reorganización del material interfacial, que incluye la salida de ciertos componentes hacia la subfase (Schürch et al. 1994). A temperaturas por debajo de los 40 °C, el cuarto ciclo de compresión/expansión tiene una forma totalmente diferente en comparación con el primero, con cambios de área muchísimo

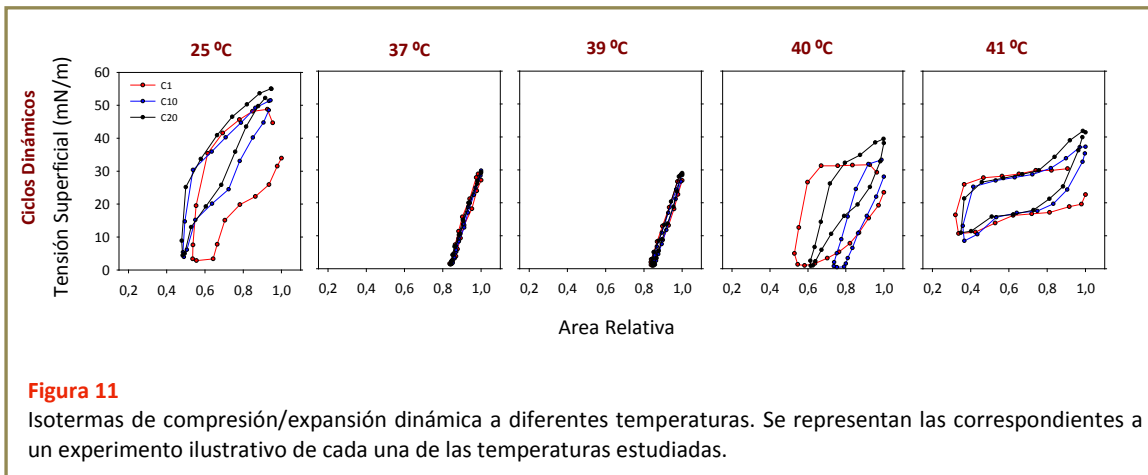
menores y una pequeña o casi nula histéresis que indica que se ha producido un cambio en la estructura u organización lateral de la película tensioactiva. A temperaturas mayores ó iguales a 40 °C el cuarto ciclo no mejora lo observado en el primero.

Ciclos cuasi-estáticos						
Temperatura	γ_{\min} QS1 (mN/m)	ΔA QS1 (%)	γ_{\max} QS1 (mN/m)	γ_{\min} QS4 (mN/m)	ΔA QS4 (%)	γ_{\max} QS4 (mN/m)
25 °C	3,74±0,17	0,44±0,01	37,73±0,51	1,75±0,55	0,77±0,04	38,34±1,50
37 °C	1,38±0,39	0,94±0,05	25,82±1,39	1,09±0,37	1,19±0,03	27,36±0,76
39 °C	0,85±0,07	0,95±0,05	26,69±0,07	0,91±0,10	1,13±0,09	26,56±1,82
40 °C	18,79±0,57	0,48±0,03	23,73±0,28	18,28±0,48	0,56±0,08	24,52±0,34
41 °C	20,32±0,78	0,54±0,03	24,18±1,43	20,16±0,99	0,57±0,09	24,48±0,71

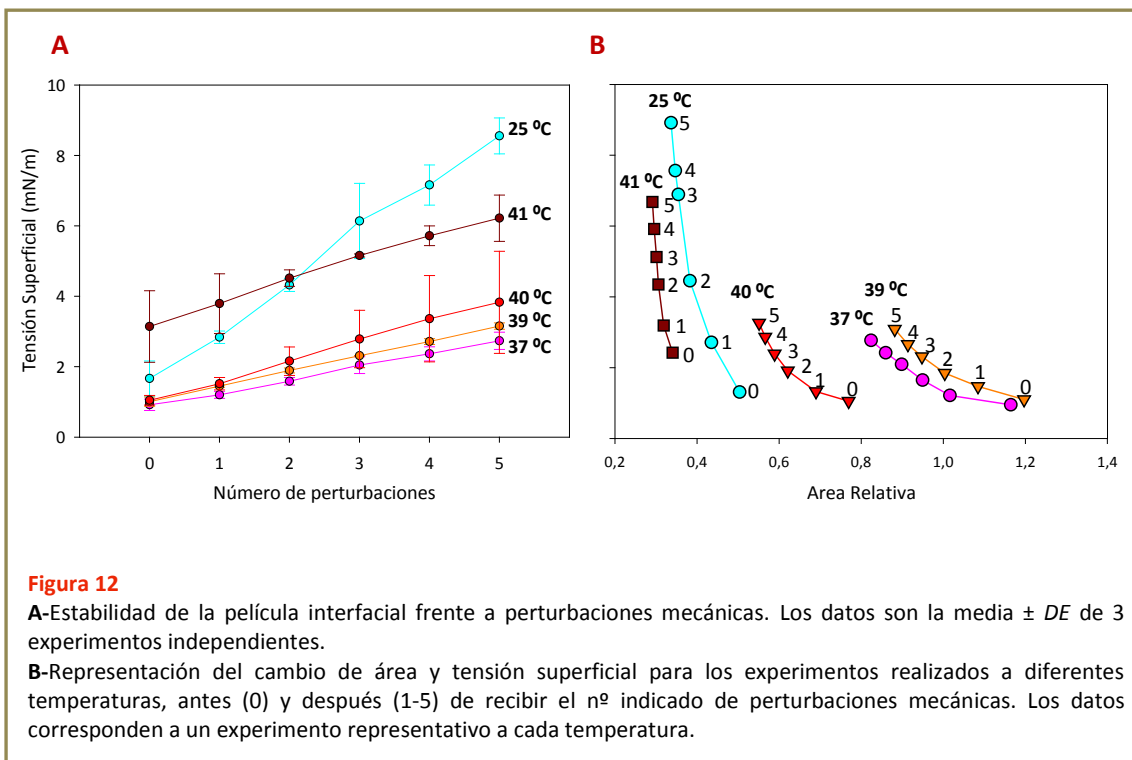
Ciclos dinámicos						
Temperatura	γ_{\min} D1 (mN/m)	ΔA D1 (%)	γ_{\max} D1 (mN/m)	γ_{\min} D20 (mN/m)	ΔA D20 (%)	γ_{\max} D20 (mN/m)
25 °C	2,48±0,49	0,73±0,09	51,79±4,27	3,71±0,97	0,66±0,04	56,74±2,55
37 °C	1,12±0,33	1,21±0,02	28,26±0,53	1,15±0,23	1,18±0,04	29,77±0,74
39 °C	0,74±0,25	1,20±0,04	31,42±4,48	0,73±0,31	1,19±0,04	30,94±3,18
40 °C	1,02±0,16	0,86±0,06	31,40±0,59	0,89±0,47	0,91±0,15	37,58±5,58
41 °C	5,92±2,71	0,59±0,06	32,41±1,87	16,10±4,16	0,58±0,04	48,68±7,01

Tabla 3
Efecto de la temperatura en la compresión/expansión cuasi-estática y dinámica
 ΔA QS1 y 4 (%) es el cambio de área de la película interfacial para lograr la mínima tensión superficial γ_{\min} durante el ciclo cuasi estático 1 ó 4 (QS1-QS4). De manera similar, ΔA D1 y 20 (%) es el cambio de área de la película interfacial para lograr la mínima tensión superficial γ_{\min} para el ciclo dinámico 1 ó 20 (D1-D20).

En la **Figura 11** se pueden observar las isotermas de compresión/expansión dinámica de las películas de surfactante nativo a las diferentes temperaturas ensayadas. A 25 °C se alcanzaron tensiones mínimas en torno a 3-5 mN/m pero con una marcada histéresis, un cambio de área del 55% y tensiones máximas por encima de los 55 mN/m. Tanto a 37 como a 39 °C el comportamiento observado fue óptimo, con mínimas tensiones por debajo de los 2 mN/m tras una reducción de área de sólo el 18%, mientras las máximas tensiones no superan los 30 mN/m sin ninguna histéresis. Es sorprendente el comportamiento de las películas de SN comprimidas en condiciones dinámicas a 40 °C, considerando su deficiente comportamiento en los ciclos cuasi-estáticos. Comprimidas de forma rápida, las películas de surfactante nativo también son capaces de alcanzar mínimas tensiones menores a 2 mN/m, aunque para ello es necesario reducir el área más allá de un 30%. En estas condiciones, las tensiones máximas superan los 30 mN/m y las isotermas presentan una considerable histéresis. La elevación de la temperatura sólo por un grado centígrado más produce un efecto dramático en la actividad del surfactante. Al contrario de lo que ocurre a 40 °C, a 41 °C no es posible alcanzar tensiones superficiales por debajo de 10 mN/m, aún con una reducción de área de hasta el 70%, mientras las máximas tensiones superan los 40 mN/m y las isotermas presentan una marcada histéresis. Es interesante destacar que sólo cuando se comprime la burbuja para reducir su área en más del 50% se logra reducir la tensión superficial hasta llegar a valores en torno a los 10 mN/m.



La **Figura 12** ilustra la estabilidad de las películas de surfactante comprimidas a diferente temperatura cuando se someten a fuertes perturbaciones mecánicas con un martillo pendular. Una vez finalizados los ciclos dinámicos se comprime la burbuja hasta alcanzar la mínima tensión superficial antes del colapso y se realizan cinco golpes sucesivos con el martillo, registrándose la tensión luego de cada perturbación. Se representa en la **Figura 12A** la tensión superficial de las películas antes y después de someter las burbujas a 5 sucesivas perturbaciones. En la **Figura 12B** se relacionan las diferentes tensiones con el área relativa que mantiene la burbuja antes y después de las perturbaciones.



Puede observarse cómo las películas comprimidas a 37-40 °C no sólo alcanzan durante la compresión tensiones superficiales mínimas por debajo de 2 mN/m, sino que son capaces de mantenerla por debajo de 5 mN/m aún tras sufrir sucesivas perturbaciones de choque. Por el

contrario, tanto las películas comprimidas a 25 °C como a 41 °C presentan una marcada inestabilidad. Es curioso que aún alcanzando las películas a 25 °C tensiones superficiales mínimas comparables a las obtenidas a mayores temperaturas, ello no vaya asociado a una estructura estable. La representación de los datos teniendo en cuenta el área relativa de las burbujas, en la Fig. 12B, ilustra un aspecto muy relevante. En todos los experimentos, la relajación parcial de la película interfacial como consecuencia de las sucesivas perturbaciones mecánicas va asociada a una marcada reducción de área. Esto ilustra la importancia del mantenimiento por el surfactante de una baja tensión superficial para maximizar el área de la interfase abierta (que en el pulmón se trasladaría a una mayor superficie operativa para el intercambio gaseoso). La Figura 12B muestra cómo a 37 y 39 °C el surfactante nativo permite la exposición de la mayor superficie interfacial, aún sometido a repetidas perturbaciones mecánicas.

- Películas interfaciales se surfactante formadas a 37 °C y sometidas posteriormente a estrés térmico a diferentes temperaturas

A la vista de los resultados obtenidos anteriormente es interesante plantear otra situación de análisis, que consiste en evaluar la funcionalidad del surfactante pulmonar porcino a diferentes temperaturas de subfase pero habiendo permitido la formación de la película tensioactiva a temperatura fisiológica. Si la estructura de la película interfacial que forma el surfactante nativo a 37 °C es óptima en términos de tensioactividad y estabilidad, cabe preguntarse por la capacidad de esta película para soportar el estrés térmico por hipertermia. Como es obvio, esto es relevante para entender las consecuencias que pueden tener para la función surfactante in vivo la exposición a períodos de hipertermia como los que pueden ir asociados a procesos febriles.

Así, se inyectó en primer lugar el material surfactante a una temperatura de subfase de 37 °C y se dejó formar la película interfacial tras la adsorción de los complejos a la interfase. Posteriormente se elevó la temperatura a la deseada para realizar el resto del experimento en el surfactómetro.

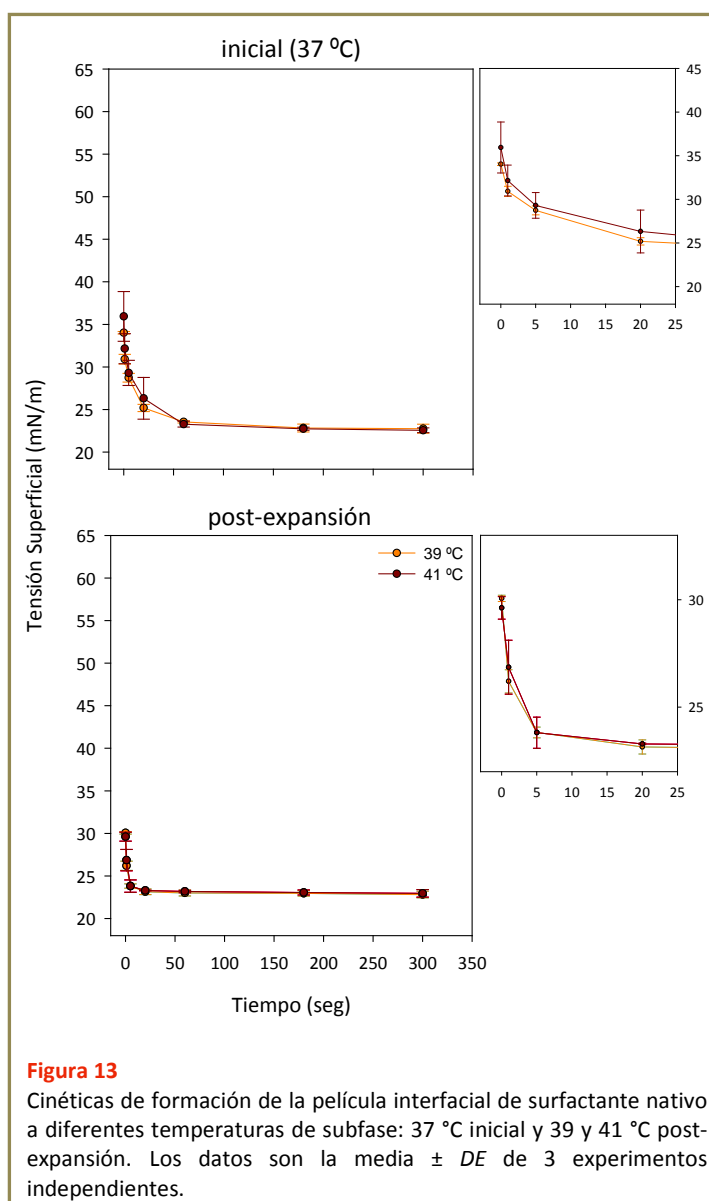
En la Figura 13 se muestran las cinéticas de formación inicial de la película interfacial de surfactante pulmonar porcino a 37 °C y la subsecuente adsorción post-expansión a mayores temperaturas. En todos los casos un exceso de material fue inyectado para asegurar el equilibrio.

En la adsorción inicial se produce una rápida disminución de la tensión superficial a valores de equilibrio de 22-23mN/m en menos de 20 segundos. Transcurridos 5 minutos de la adsorción inicial y formación de la película tensioactiva se procede a expandir rápidamente la burbuja y monitorizar el cambio en la tensión superficial ya a la nueva temperatura. Al igual que en la adsorción inicial, se alcanzan rápidamente tensiones de equilibrio en torno a los 22-23 mN/m.

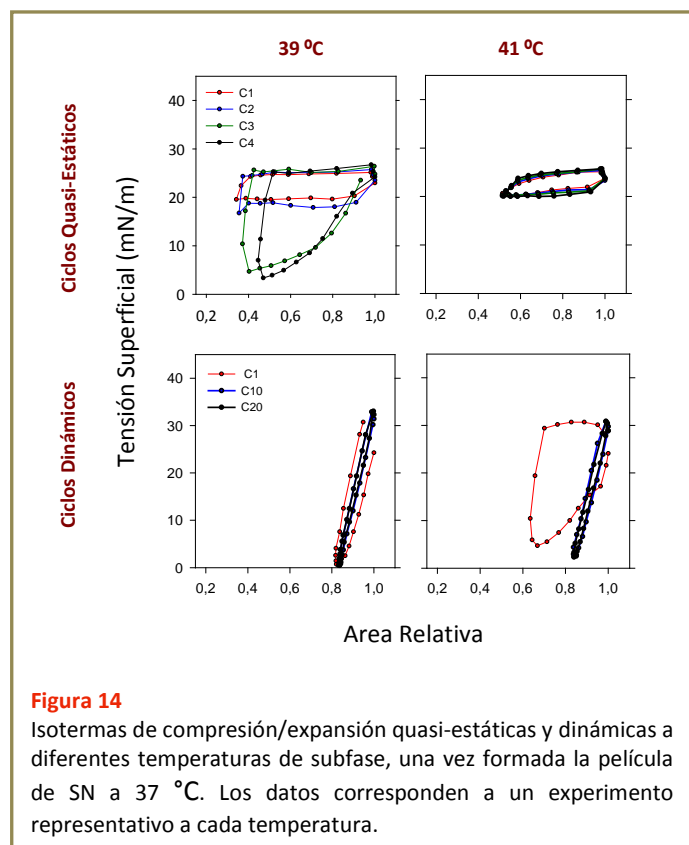
Estos resultados son similares a los obtenidos cuando se realiza el protocolo completo (desde la adsorción inicial) a la temperatura de estudio deseada (ver Fig. 8).

Una vez finalizado el registro de los datos de la adsorción post-expansión se procede a comprimir y expandir la película tensioactiva de manera quasi-estática. En la Figura 14 se

comparan las isothermas de compresión/expansión de los ciclos quasi-estáticos y dinámicos de películas formadas a 37 °C pero comprimidas/expandidas a 39 ó 41 °C. A 39 °C el comportamiento parece algo peor que el observado a 37 °C aunque cualitativamente es comparable. En condiciones cuasi-estáticas se produce una progresiva mejora de los sucesivos ciclos en cuanto al valor mínimo de tensión superficial alcanzado, aunque en este caso no parecen alcanzarse las isothermas sin prácticamente histéresis que se observaban al hacer el experimento a una temperatura constante de 39 °C (ver Fig. 10). En condiciones dinámicas, sin embargo, las películas cicladas a 39 °C producen isothermas comparables a las del surfactante en condiciones óptimas.

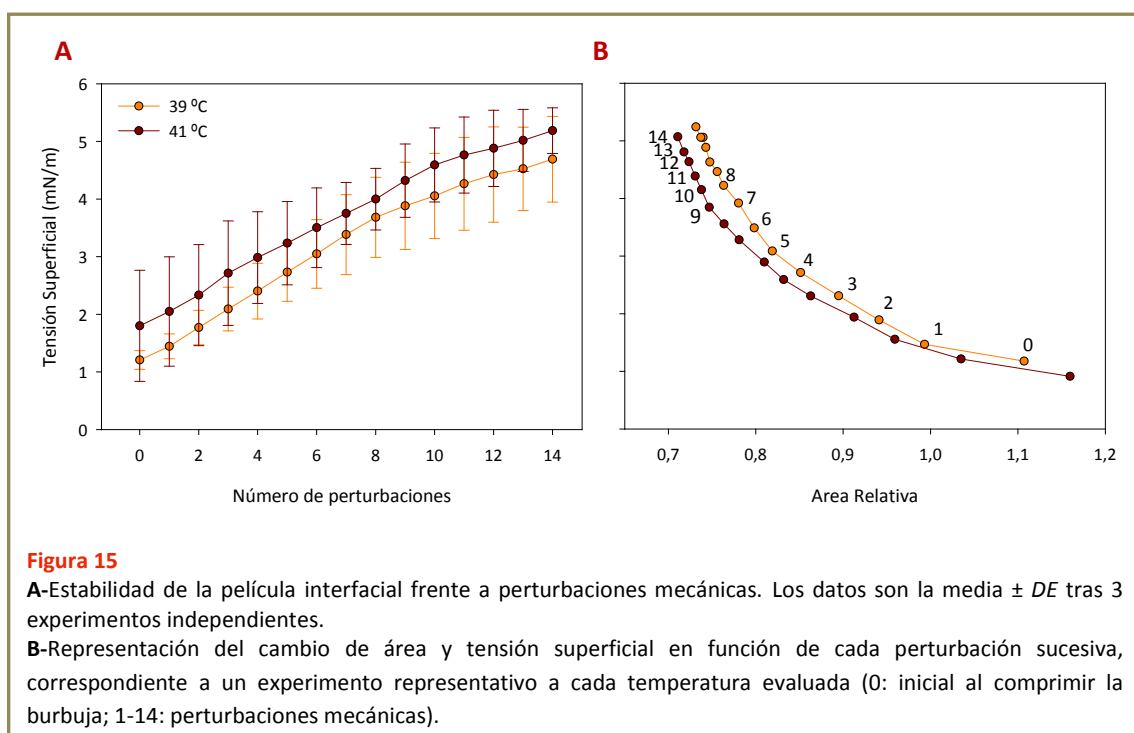


Mucho más destacable es lo que ocurre cuando la temperatura de las películas adsorbidas a 37 °C se eleva a 41 °C. La compresión de estas películas en condiciones cuasi-estáticas no reduce la tensión superficial muy por debajo de la tensión de equilibrio tal y como ocurría cuando el experimento completo se realizaba a 41 °C (ver Fig. 10).



En la **Figura 14** también se pueden observar las isothermas de compresión/expansión dinámicas a las dos temperaturas ensayadas. A 39 °C se alcanzaron tensiones mínimas <1 mN/m, con casi nula histéresis, un cambio de área del 18% y tensiones máximas en torno a los 30 mN/m. Este comportamiento es similar al que se observa al realizar el protocolo completo a esta temperatura (ver **Fig. 11**). Es sorprendente el comportamiento a 41 °C ya que, a diferencia de lo que uno podría esperar al ver lo que ocurre en los ciclos quasi-estáticos, se logra una actividad casi óptima (considerando la capacidad para reducir la tensión superficial) con mínimas tensiones en torno a 2 mN/m prácticamente sin histéresis después de los primeros ciclos, con un cambio de área del 18% y tensiones máximas que no superan los 30 mN/m. Estos resultados son muy diferentes a los obtenidos realizando el protocolo completo a esta temperatura, ya que si la película se formaba ya a 41 °C, ésta no era competente para alcanzar bajas tensiones superficiales (ver **Fig.11**). De alguna manera, el hecho de que la película tensioactiva se forme a temperatura fisiológica permite la organización de una estructura que mantiene su capacidad para reducir la tensión superficial, aún a pesar de aumentos posteriores de temperatura.

En la **Figura 15** se representan los resultados del cambio en la tensión superficial y el área como resultado de sucesivas perturbaciones mecánicas con el martillo pendular. Una vez finalizados los ciclos dinámicos se comprime la burbuja hasta alcanzar la mínima tensión superficial previa al colapso y se realizan golpes sucesivos con el martillo, registrándose la tensión tras cada perturbación.



Con las sucesivas perturbaciones se reduce ligeramente (alrededor de un 30%) el área relativa, al contrario de lo que ocurre con el aumento de la tensión superficial, que llega a alcanzar valores en torno a los 5 mN/m. Estos resultados son bastante diferentes a los que se obtienen cuando se realiza el protocolo completo a la correspondiente temperatura. Como se puede ver en la Fig. 12, las sucesivas perturbaciones reducen el área relativa de forma similar en películas formadas y operadas a 39 °C, pero el aumento en la tensión superficial correspondiente era mucho menor. Por otra parte, al realizar el estudio formando la película a temperatura fisiológica y ensayando su estabilidad a 41 °C se observa también que la capacidad de mantener una extensa superficie abierta es mucho mayor que la que tenían las películas formadas directamente a 41 °C. Esto quiere decir que las condiciones de formación de la película interfacial (por ejemplo 37 °C) son críticas para definir las propiedades de éstas películas para alcanzar mínimas tensiones, mantener una amplia superficie abierta y resistir perturbaciones mecánicas.

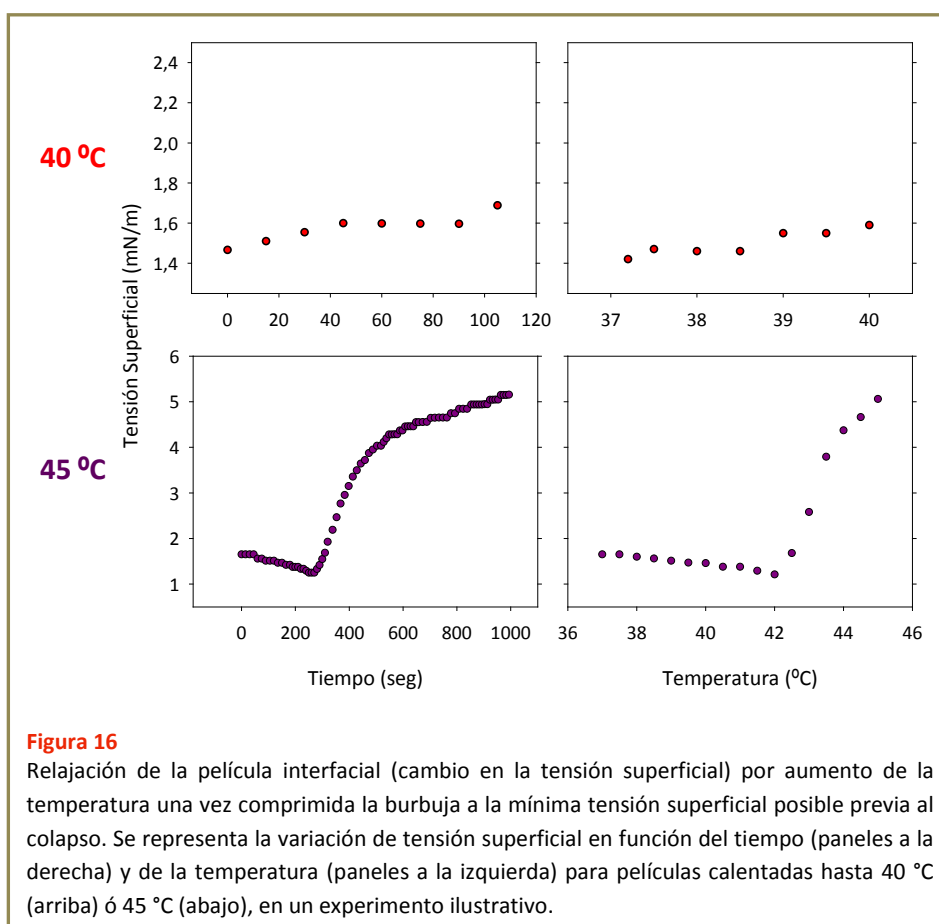
Es posible que la estabilidad de la película interfacial, una vez elevada la temperatura, sólo resulte comprometida a tiempos más largos de los ensayados, si la modificación por efectos termotrópicos de la estructura fuera cinéticamente lenta.

- Efecto de la temperatura en la estabilidad de películas interfaciales formadas y comprimidas a 37 °C.

Para evaluar la posibilidad anteriormente mencionada, se llevó a cabo otro tipo de estudio que consiste en realizar el protocolo completo a temperatura fisiológica, para una vez finalizados los ciclos dinámicos, comprimir la película a la mínima tensión superficial posible (previa al colapso) y elevar la temperatura. Se pretendía registrar la cinética de relajación de la película tensioactiva, realizando 15 minutos después de alcanzar la temperatura deseada el test de

perturbación mecánica. Así, se inyectó material en exceso (2-4 nmoles) a una temperatura de subfase de 37 °C y se evaluó la relajación y estabilidad a 40 y 45 °C.

En la **Figura 16** se muestra la cinética de relajación de la película tensioactiva por aumento de la temperatura, incluyendo el aumento en la tensión superficial que resulta de la pérdida de la capacidad para mantener mínimas tensiones superficiales cuando aumenta la temperatura de subfase. Se representa en la figura la variación de la tensión superficial a lo largo del tiempo que demora el equipo en aumentar la temperatura.

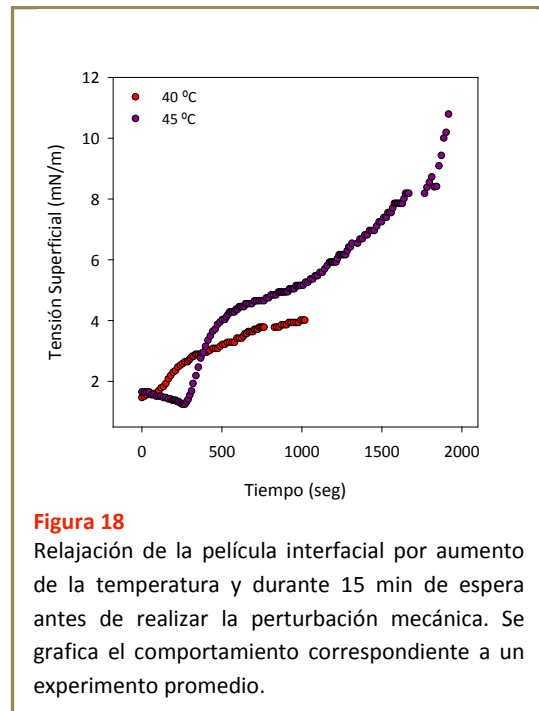
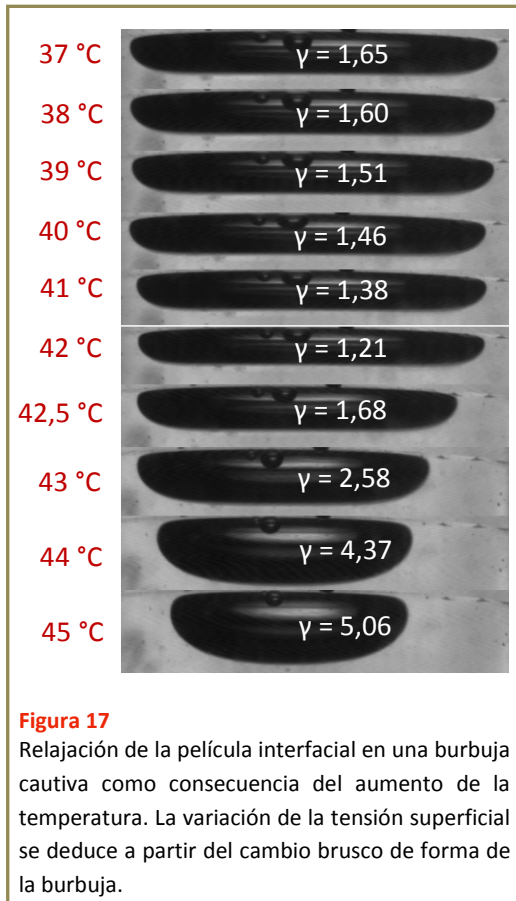


Se puede ver cómo a medida que aumenta la temperatura la tensión superficial también aumenta aunque muy ligeramente hasta temperaturas de 41-42 °C. Una vez alcanzados los 42 °C, se produce una rápida relajación de la película comprimida con un aumento de 5-7 mN/m en la tensión superficial.

Este comportamiento crítico a 42 °C fue muy repetitivo, aunque por simplicidad sólo se representan los resultados correspondientes a un experimento a cada temperatura. El marcado aumento en la tensión superficial que ocurre entre los 42 y 43 °C se aprecia en la **Figura 17** por el brusco cambio asociado en la forma de la burbuja.

En la **Figura 18** se representa la relajación observada en la película comprimida durante el período de aumento de la temperatura y en el transcurso de los 15 minutos de espera (una vez alcanzada la temperatura final) antes de realizar la perturbación mecánica.

Es evidente como a mayor temperatura la variación en la tensión superficial es mayor. Es decir, cuanto mayor es la temperatura, menor es la capacidad que posee la película tensioactiva para mantener bajas tensiones superficiales. Además, puede verse que este cambio en la tensión se da no sólo por la inestabilidad térmica, sino que una vez alcanzada la temperatura deseada la película se sigue relajando aumentando la tensión superficial.

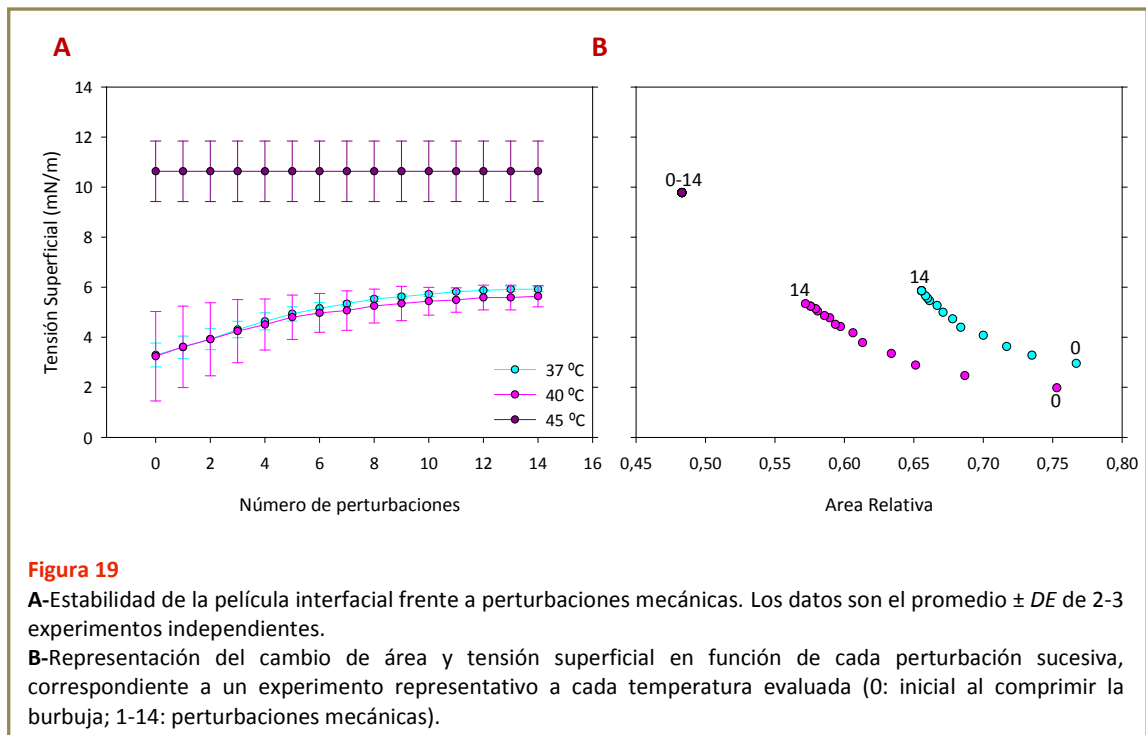


En experimentos control en los que se registró la relajación de la película interfacial en función del tiempo a temperatura fisiológica se obtuvieron cinéticas similares a las obtenidas a 40 °C, con aumentos muy ligeros en la tensión superficial de sólo 1-2 mN/m al cabo del tiempo de espera.

Por último, y una vez transcurridos 15 minutos de alcanzada la temperatura de estudio deseada, se procedió a evaluar la estabilidad de la película de surfactante en el estado en que se encuentra tras la relajación térmica.

En la **Figura 19** se presentan los resultados del cambio en la tensión superficial y el área como resultado de las sucesivas perturbaciones. Los comportamientos son marcadamente diferentes dependiendo de la temperatura estudiada. Tanto a 37 como a 40 °C se observa sólo un leve aumento de hasta 2 mN/m en la tensión superficial como consecuencia de las sucesivas perturbaciones (panel A) alcanzándose un plateau (zona en que la variación es casi nula) al cabo de 10 perturbaciones. A 45 °C el panorama es totalmente distinto, la película se encuentra ya prácticamente relajada y su estructura lateral es tal que no puede mantener bajas tensiones superficiales, no sufriendo de hecho variación con las sucesivas perturbaciones

(panel A). Cuando se evalúa el aumento en la tensión en función de la variación del área (panel B), se puede ver que tanto a 37 como a 40 °C el aumento neto de la tensión superficial es el mismo, alcanzándose valores finales en torno a los 6 mN/m. Sin embargo, a 40 °C el cambio de área es mayor que el observado a temperatura fisiológica.



Puede por tanto concluirse que las películas que forma el surfactante a 37 °C son competentes para alcanzar y mantener bajas tensiones superficiales hasta una temperatura próxima a los 42 °C, lo que resulta fisiológicamente relevante.

DISCUSIÓN

El surfactante pulmonar es una mezcla lipo-proteica compleja que tiene la capacidad de disminuir la tensión superficial en la interfase aire-líquido del alvéolo, permitiendo que se lleve a cabo el proceso respiratorio. La composición del surfactante pulmonar está bastante conservada en los mamíferos. Sin embargo, dentro de una misma especie animal, esta composición puede variar o ser influenciada por el desarrollo, enfermedades, la frecuencia respiratoria y/o la temperatura corporal. No existe una sola composición lipídica que funcione de manera óptima en todos los mamíferos, sino que el surfactante de cada animal es único y apropiado para la función según la biología del animal (Lang et al. 2005).

Los cambios de temperatura pueden alterar el estado físico y la densidad de empaquetamiento de los lípidos en la interfase aire-líquido (Lopatko et al. 1998 y 1999) alterando potencialmente la actividad superficial del surfactante.

En el caso del surfactante pulmonar porcino vemos que su composición lipo-proteica está optimizada para mantener la capacidad de reducir la tensión superficial incluso a temperaturas elevadas. Recordemos que la DPPC es el componente mayoritario del surfactante porcino y que posee la mayor temperatura de melting (en comparación con el resto de los fosfolípidos). Frente al aumento de la temperatura, hasta casi 41 °C, la DPPC permanece aún sin cambiar de fase o estado, por lo tanto, puede segregarse lateralmente conformando estructuras más organizadas o empaquetadas que le confieren al surfactante la capacidad para reducir la tensión superficial a valores cercanos a 1 mN/m.

Cuando se forma la película tensioactiva a temperatura fisiológica y se evalúa la funcionalidad del surfactante pulmonar porcino a mayores temperaturas de subfase, situación más parecida a lo que ocurre *In Vivo* cuando se padece fiebre; vemos que este aumento de temperatura no interfiere en su capacidad para reducir la tensión superficial. Por tanto, la estructura lateral que se obtiene por adsorción a temperatura fisiológica es en cierto modo mantenida a pesar del aumento de la temperatura, para garantizar la correcta funcionalidad del surfactante pulmonar.

El hecho de que la temperatura de melting del surfactante pulmonar se encuentre tan cerca de la temperatura crítica (considerada la de melting de la DPPC, el componente mayoritario del surfactante) demuestra que su composición lipídica se encuentra altamente optimizada de modo que el surfactante pueda sostener simultáneamente propiedades “contradictorias” como la dinámica y la alta estabilidad mecánica a alta compresión que presenta el surfactante pulmonar, incluso frente a variaciones térmicas. En todos los casos hemos visto que el surfactante pulmonar tiene una increíble capacidad para mantener su funcionalidad dentro del rango óptimo, dándonos una idea de que existen mecanismos adaptativos ó de compensación fisiológica que convergen sobre el sistema surfactante ajustando su composición, y por tanto su comportamiento funcional pero sin afectar su capacidad para reducir la tensión superficial a valores cercanos a 1 mN/m.

Capítulo III

EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL SURFACTANTE PULMONAR DE ANIMALES HETEROTERMOS.



Los resultados que se muestran en este capítulo fueron realizados en nuestros laboratorios pero forman parte de un trabajo realizado en colaboración con el equipo del Dr. Ruud Veldhuizen de la **University of Western Ontario** de Canadá y con el equipo de la Dra. Sandra Orgeig de la **University of South Australia** de Adelaide en Australia.

Algunos de estos resultados se incluyen en la siguiente publicación:

Adaptation to low body temperature influences pulmonary surfactant composition thereby increasing fluidity while maintaining appropriately ordered membrane structure and surface activity.

Suri L.N., McCaig L., Picardi M.V., Ospina O.L., Veldhuizen R.A.W., Staples J.F., Possmayer F., Yao L.J., Pérez-Gil J. and Orgeig S.

Sansom Institute for Health Research and School of Pharmacy & Medical Sciences, University of South Australia, Adelaide, Australia; Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain; Lawson Health Research Institute, Department of Biology and Departments of Obstetrics & Gynaecology and Biochemistry, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada.

Biochim Biophys Acta 1818(7):1581-1589. 2012

INTRODUCCIÓN

El surfactante pulmonar es una mezcla compleja de lípidos y proteínas que tiene la capacidad de disminuir la tensión superficial en la interfase aire-líquido de la superficie alveolar, permitiendo que se lleve a cabo el proceso respiratorio. La composición del surfactante pulmonar está bastante conservada en los mamíferos. Sin embargo, dentro de una misma especie animal, esta composición puede variar o estar influenciada por el desarrollo, enfermedades, la frecuencia respiratoria y/o la temperatura corporal. No existe una sola composición lipídica que funcione de manera óptima en todos los mamíferos, sino que el surfactante de cada animal es único y optimizado para la función según la fisiología del animal (Lang et al. 2005).

Los cambios de temperatura pueden alterar el estado físico y la densidad de empaquetamiento de los lípidos en la interfase aire-líquido (Lopatko et al. 1998 y 1999) alterando potencialmente la actividad superficial del surfactante. Existen pequeños mamíferos que disminuyen su temperatura corporal cuando entran en un estado de reducida actividad metabólica conocido como letargo, sin sufrir alteraciones respiratorias aparentes o disfunción del surfactante pulmonar (Codd et al. 2002, Lopatko et al. 1998). Estos animales se conocen como heterotermos. El impacto del letargo en el sistema surfactante de estos animales varía dependiendo de la profundidad, frecuencia y duración del estado de letargo (Lang et al. 2005).

Teniendo en cuenta esta capacidad particular que presentan los animales heterotermos de disminuir su temperatura corporal sin que la función respiratoria se vea afectada, surge la cuestión de comparar este material con el de animales homeotermos para así intentar comprender un poco más sobre la plasticidad que posee el surfactante pulmonar para adaptarse a diversas circunstancias sin comprometer su funcionalidad.

Para llevar a cabo esta investigación se empleó el material surfactante obtenido de tres especies de mamíferos heterotermos, para su comparación con el surfactante pulmonar porcino:

- + surfactante de *dunnarts* (*Sminthopsis crassicaudata*). Estos mamíferos marsupiales tienen la capacidad de entrar en letargo como resultado de cambios en el entorno, como la falta de agua o alimento o los cambios de temperatura. En este estado de actividad metabólica reducida, la temperatura corporal de los animales decae de 35-37 °C hasta aproximadamente 23 °C.

- + surfactante de murciélagos (*Chalinolobus gouldii*). Éstos entran en letargo durante el día y son activos durante la noche. Experimentan así ritmos circadianos térmicos en los que la temperatura corporal oscila entre 37 y 23-25 °C.

- + surfactante de ardillas (*Ictidomys tridecemlineatus*). Estos animales entran en un estado de letargo profundo o hibernación durante el invierno, estado en el que su temperatura corporal decae por debajo de los 10 °C. Durante este período las ardillas

experimentan un ritmo respiratorio lento y episódico, interrumpido periódicamente por breves períodos de vigilia.

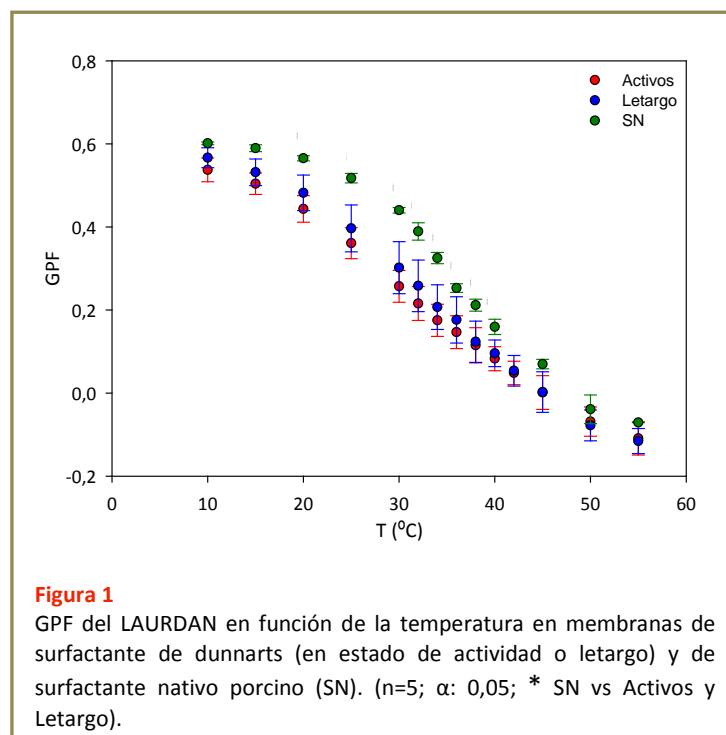
RESULTADOS

1. FLUORESCENCIA

1.1. LAURDAN

Esta sonda tiene la particularidad de ser sensible al entorno que la rodea en membranas. La fluorescencia del LAURDAN es altamente sensible al estado de hidratación de la región de las cabezas polares de los fosfolípidos, la cual a su vez depende del estado de fase, de la organización lateral y del empaquetamiento lipídico, factores que a su vez se ven afectados por la temperatura (Bagatolli 2003, De Vequi-Suplicy et al. 2006, Parasassi et al. 1991).

El espectro de emisión de fluorescencia del LAURDAN está centrado en el azul en la fase gel pero cuando las membranas se hallan en el estado líquido cristalino la emisión se desplaza al verde (Parasassi et al. 1990 y 1991).



En la **Figura 1** se observan los perfiles termotrópicos de las muestras de surfactante de dunnarts, obtenidas durante períodos de actividad o de letargo, en comparación con el perfil del surfactante nativo porcino. Las membranas del surfactante de éstos heterotermos presentan, tanto en procedentes de animales activos como las de animales en letargo, una

marcada y amplia transición, mucho más amplia que la que presenta el surfactante porcino, aunque se extiende en un rango de valores de GPF similar.

La transición corresponde al paso progresivo de las membranas desde estados más ordenados a fases más desordenadas, como ha sido bien caracterizado para el surfactante pulmonar de especies homeotérmicas en trabajos anteriores que han utilizado calorimetría o espectroscopia de infrarrojo (Bernardino de la Serna et al. 2004, Dluhy et al. 1989, Trauble et al. 1974). Esta transición ocurre con un aparente punto de inflexión alrededor de los 32 °C (similar al del SN), no observándose diferencias significativas entre los dos tipos de muestras de surfactante de dunnarts, en actividad o letargo, a todas las temperaturas estudiadas. Sin embargo, ambos grupos presentaron valores de GPF significativamente menores en comparación con los del surfactante porcino a temperaturas entre 20 y 40 °C.

Para la comparación entre los diferentes grupos se realizó un análisis de varianza (One Way ANOVA) y se aplicó el método Holm-Sidak para comparar los grupos con un nivel de significación de 0,05. Este estudio arrojó los resultados que se muestran en la Fig. 1. Entre 20 y 40 °C hay diferencias significativas entre el surfactante porcino y el de ambos grupos de animales heterotermos. A las temperaturas más bajas, el empaquetamiento lipídico en muestras de animales en letargo y de surfactante porcino es similar, según los valores de GPF observados. El material de los dunnarts activos, probablemente posee membranas con un grado de hidratación mayor ya que sus valores de GPF son significativamente menores a los obtenidos para el surfactante porcino.

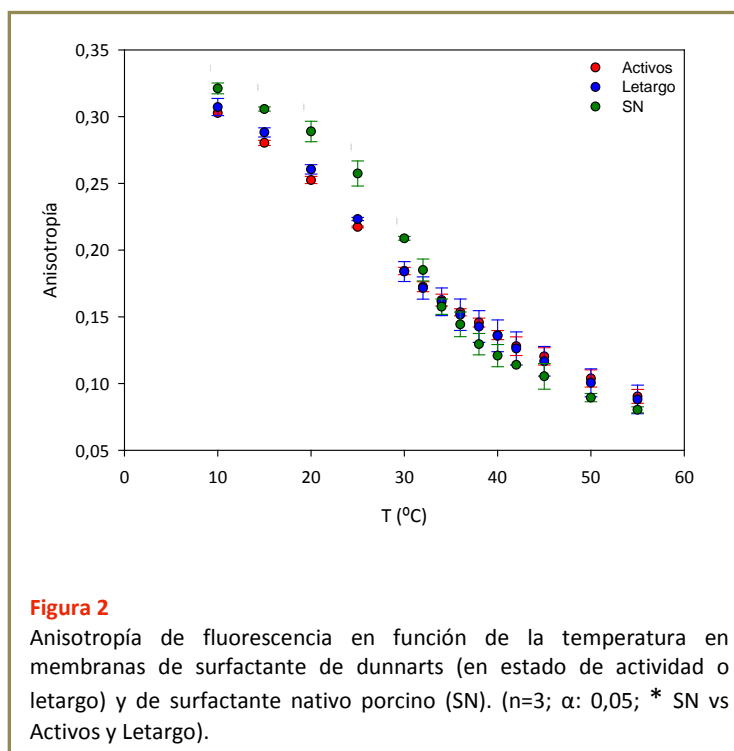
1.2. DPH

Empleando una técnica como la anisotropía de fluorescencia, que da información sobre el grado de fluidez de las membranas, se puede determinar el rango de temperatura en el cual se produce la transición de fase de una muestra, por lo que supone en el paso de las membranas desde un estado de alta viscosidad (a baja T) a uno de alta fluidez (a alta T). La sonda empleada es DPH, que se localiza en la región hidrofóbica de la membrana y es sensible a los cambios en el orden lipídico y en la fluidez de la membrana (Holopainen et al. 1998, Lentz 1993, Repáková et al. 2004). Además, se distribuye en principio homogéneamente en las fases gel y fluida (Sklar et al. 1975, Lentz 1989).

La Figura 2 resume los perfiles termotrópicos del surfactante obtenido de animales homeo y heterotermos. Las membranas de surfactante de heterotermos, tanto en su estado de actividad como de letargo, presentan de nuevo una transición más amplia o ensanchada, en comparación con la del surfactante porcino en lo que se refiere a los cambios a los que es sensible la anisotropía del DPH. Sin embargo, el rango de valores de anisotropía entre los que varían las membranas de los dunnarts, en letargo o actividad, es similar a los que definen la transición termotrópica completa del surfactante porcino.

La transición de fase en lo que se refiere a la anisotropía, ocurre entre los 25 y 40 °C. Esta transición muestra un aparente punto de inflexión alrededor de los 32 °C (similar al del SN), no observándose diferencias significativas entre las muestras de surfactante de dunnarts en actividad y letargo a todas las temperaturas estudiadas. Sin embargo, ambos grupos

presentaron valores de anisotropía significativamente menores en comparación con los del surfactante porcino a temperaturas entre 10 y 30 °C.



2. CALORIMETRÍA

Como la concentración fosfolipídica y el volumen de los lavados broncoalveolares obtenidos de animales individuales eran demasiado reducidos, no pudo realizarse el análisis calorimétrico en muestras individuales. Por tanto, se procedió a combinar el material de entre 5 y 10 animales de cada condición para obtener así una muestra de surfactante procedente de animales en actividad y otra de animales en letargo, a una concentración en torno a 1 mg/mL (0,8-1 mg/mL).

En la **Figura 3** se muestran los termogramas obtenidos para el surfactante pulmonar porcino y para el surfactante combinado de dunnarts en estado de actividad ó de letargo; y en la **Tabla 1** se resumen los valores de los parámetros típicos que describen de manera cuantitativa la transición calorimétrica principal asociada a las muestras estudiadas, obtenidos a partir de los termogramas de la **Figura 3**.

Los termogramas de los mamíferos heterotermos mostraron una entalpía y temperatura de transición de fase sustancialmente reducidas, en comparación con los valores del surfactante pulmonar porcino.

También se detectó que la entalpía asociada a la transición termotrópica de fase en las membranas de los animales en estado de letargo era ligeramente menor (10-20%) con respecto a la de los animales activos.

La Tm para el surfactante de ambos grupos de animales heterotermos fue similar, en torno a 27,8 °C, pero aproximadamente 5 °C menor que la Tm obtenida para el surfactante porcino (ver **Tabla 1**).

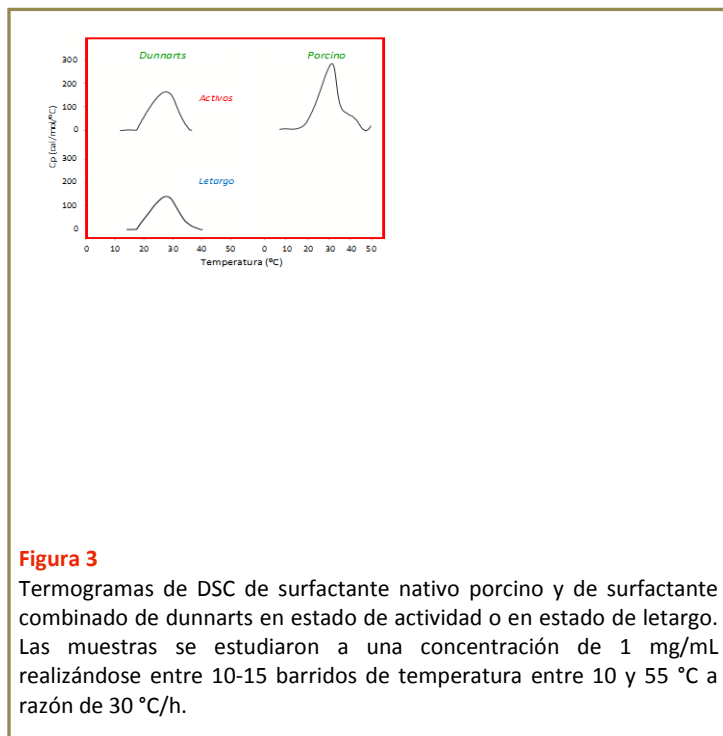


Figura 3

Termogramas de DSC de surfactante nativo porcino y de surfactante combinado de dunnarts en estado de actividad o en estado de letargo. Las muestras se estudiaron a una concentración de 1 mg/mL realizándose entre 10-15 barridos de temperatura entre 10 y 55 °C a razón de 30 °C/h.

DSC	DUNNARTS		PORCINO
	WA	Torpor	
	n=1	n=1	n=4
Tm (°C)	27,8	27,8	32,4±0,3
ΔH (cal/mol/ °C)	1623	1442	2848±211
ΔT _{1/2} (°C)	10,8	10,7	9,4±0,3

Tabla 1

Valores termotrópicos determinados por calorimetría (DSC) de muestras de surfactante nativo porcino y de surfactante combinado de dunnarts en estado de actividad o en estado de letargo.

3. ESTUDIOS FUNCIONALES

Estos ensayos funcionales se realizaron siempre con concentraciones de surfactante pulmonar entre 8 y 11 mg/ml. Estas son las mínimas concentraciones evaluadas que pueden ser empleadas para realizar estudios funcionales, garantizando la presencia de material en exceso en la interfase y por tanto una óptima funcionalidad. Se han evaluado concentraciones menores pero no originaban buena actividad surfactante ni la adecuada reproducibilidad.

En el caso del surfactante obtenido de los dunnarts, fue realmente un desafío poder trabajar con el material correspondiente a animales individuales sin tener que combinar varias muestras de surfactante. Para realizar estos estudios funcionales las muestras de surfactante se procesaron de forma que pudieran obtenerse a la mayor concentración fosfolipídica posible.

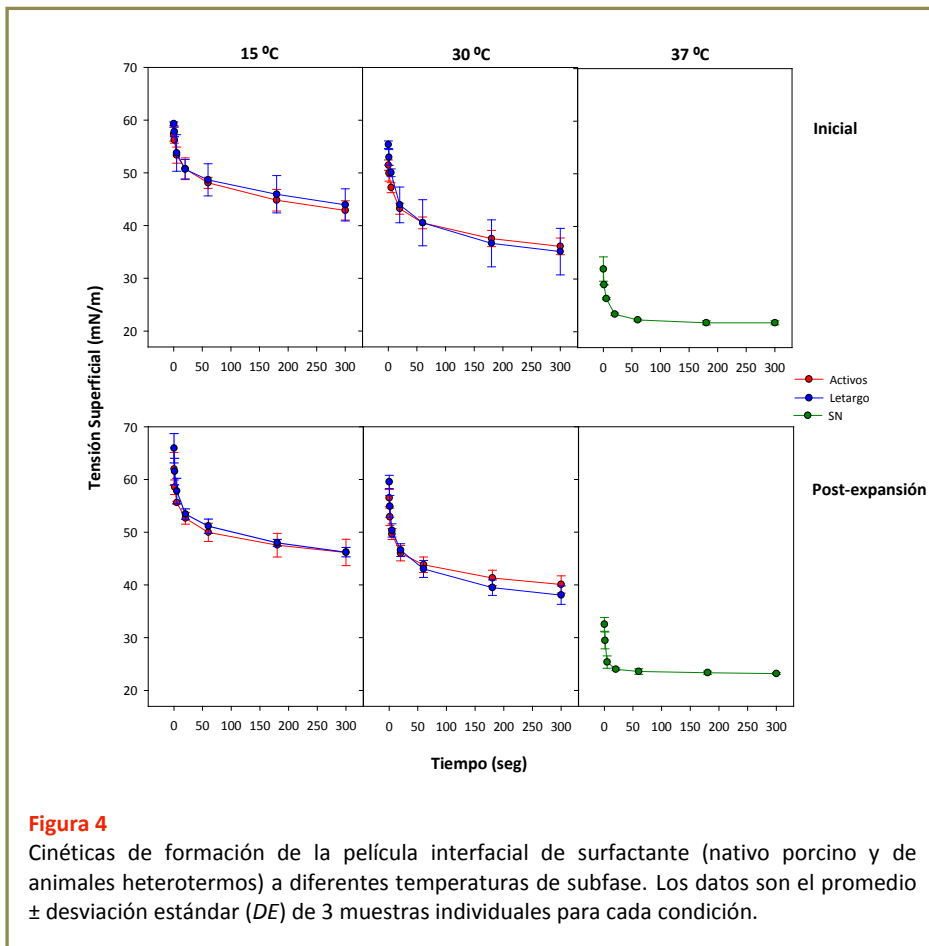
Para evaluar la actividad surfactante del material de los animales heterotermos y poder compararla con la del surfactante nativo porcino se eligieron dos temperaturas de estudio, en función de la temperatura corporal de los animales en el momento de la extracción del material pulmonar. Estas fueron de 15 °C (correspondiente a los animales en letargo) y 30 °C (correspondiente a los animales activos).

Se evaluó así el comportamiento de la película tensioactiva de surfactante y su estabilidad realizando estudios a 15 y 30 °C para el material de los dunnarts, comparándolos con el estudio a 37 °C del surfactante pulmonar porcino.

Se eligieron dichas temperaturas asumiendo que el surfactante funciona de manera óptima a temperaturas similares a la temperatura corporal del animal al momento de la extracción del material (Codd et al. 2000, Lopatko et al. 1998). En el caso del surfactante pulmonar porcino, esto se confirma en los experimentos llevados a cabo en el Capítulo I, donde se vio que a temperaturas por debajo de la fisiológica la funcionalidad del surfactante es muy pobre.

En la Figura 4 se muestran las cinéticas de formación de la película interfacial de surfactante a diferentes temperaturas de subfase. En todos los casos un exceso de material (2-5 nmoles) fue inyectado para asegurar el equilibrio y exceso de material en la interfase.

Durante la adsorción inicial las muestras de los animales heterotermos no alcanzan tensiones superficiales bajas en torno a los 20-21 mN/m en menos de 20 segundos como ocurre con el surfactante pulmonar porcino cuando se ensaya a su temperatura fisiológica. Los surfactantes de los dunnarts no parecen reducir la tensión más allá de los 40 mN/m a 15 °C ni por debajo de los 31 mN/m a 30 °C, necesitándose alrededor de 3 minutos para alcanzar esta condición de equilibrio. Transcurridos 5 minutos de la adsorción inicial y formación de la película tensioactiva se expande rápidamente la burbuja y se monitoriza el cambio en la tensión superficial como resultado de la incorporación de más material surfactante desde los reservorios asociados de la subfase (Schürch et al. 1998). Cabe recordar que la adsorción del surfactante a una superficie en expansión refleja mejor lo que sucede en la superficie alveolar durante la respiración. Además, la adsorción post-expansión es mejor que la inicial en términos de análisis de resultados ya que este proceso no se encuentra sujeto a posibles artefactos experimentales como los derivados de la proximidad de la cánula a la burbuja cuando se inyecta el material (Schürch et al. 2010). Como ocurre con la adsorción inicial, el surfactante de los dunnarts, tanto en estado de actividad como en letargo, se adsorbe y disminuye la tensión superficial a valores en torno a los 44 mN/m a 15 °C y a los 38 mN/m a 30 °C, necesitando alrededor de 3 minutos para alcanzar esta condición. Estos valores de tensión superficial están muy por encima de los 23 mN/m alcanzados por el surfactante nativo porcino.



Cuando se comprimen las películas de ambos materiales de manera quasi-estática (ver [Figura 5](#)) se alcanzan tensiones superficiales mínimas relativamente bajas pero no tanto como las alcanzadas por el surfactante pulmonar porcino que las reduce hasta solo 1-2 mN/m.

Cuando el surfactante obtenido de los animales en estado de letargo se ensaya a 15 °C, éste produce mínimas tensiones en torno a los 3 mN/m con un cambio de área relativa en torno al 40%, moderada histéresis y con tensiones máximas alrededor de los 52 mN/m. Sin embargo, cuando se estudia a 30 °C, la tensión mínima que se alcanza está no baja de los 20 mN/m con un cambio de área del 70% y marcada histéresis, con tensiones máximas en torno a los 48 mN/m. El material de los animales activos produce tensiones mínimas en torno a los 3 mN/m con cierta histéresis y con cambios de área del orden del 55-60%. Como referencia, el surfactante pulmonar porcino alcanza mínimas tensiones superficiales del orden de 1-2 mN/m con un reducido cambio en el área relativa, en torno a 20-30%, con máximas tensiones superficiales que no superan los 30 mN/m y casi nula histéresis.

Los ciclos quasi-estáticos proporcionan información sobre la capacidad de la película para alcanzar bajas tensiones superficiales en condiciones no restringidas cinéticamente, ya que se permite la relajación en diferentes segmentos de la isoterma así como en un breve período de tiempo (segundos) entre las sucesivas compresiones. Puede observarse cómo en todos los casos el primer ciclo requiere una mayor reducción del área relativa necesaria para alcanzar las mínimas tensiones superficiales y por lo general presenta una marcada histéresis. Sin embargo, el cuarto ciclo requiere menor cambio de área para alcanzar bajas tensiones y la

forma del mismo, con menor histéresis, indica que se ha producido un cambio en la estructura u organización lateral de la película tensioactiva.

En la **Figura 5** también se pueden observar las isothermas de compresión/expansión dinámicas a las diferentes temperaturas ensayadas. Puede verse para cada una de las especies animales estudiadas que el material es funcional a la temperatura correspondiente a la temperatura corporal del animal al momento de la extracción del material surfactante. Tanto para el material de los animales en letargo ensayado a 15 °C, como para el procedente de los animales activos, a 30 °C, puede observarse que la tensión superficial alcanza valores relativamente bajos, en torno a los 3 mN/m, con cambios de área del 35-45% y relativamente poca histéresis. Lo llamativo es que las tensiones máximas se encuentran alrededor de los 50-60 mN/m, a diferencia del surfactante pulmonar porcino cuyas tensiones máximas nunca superan los 30 mN/m.

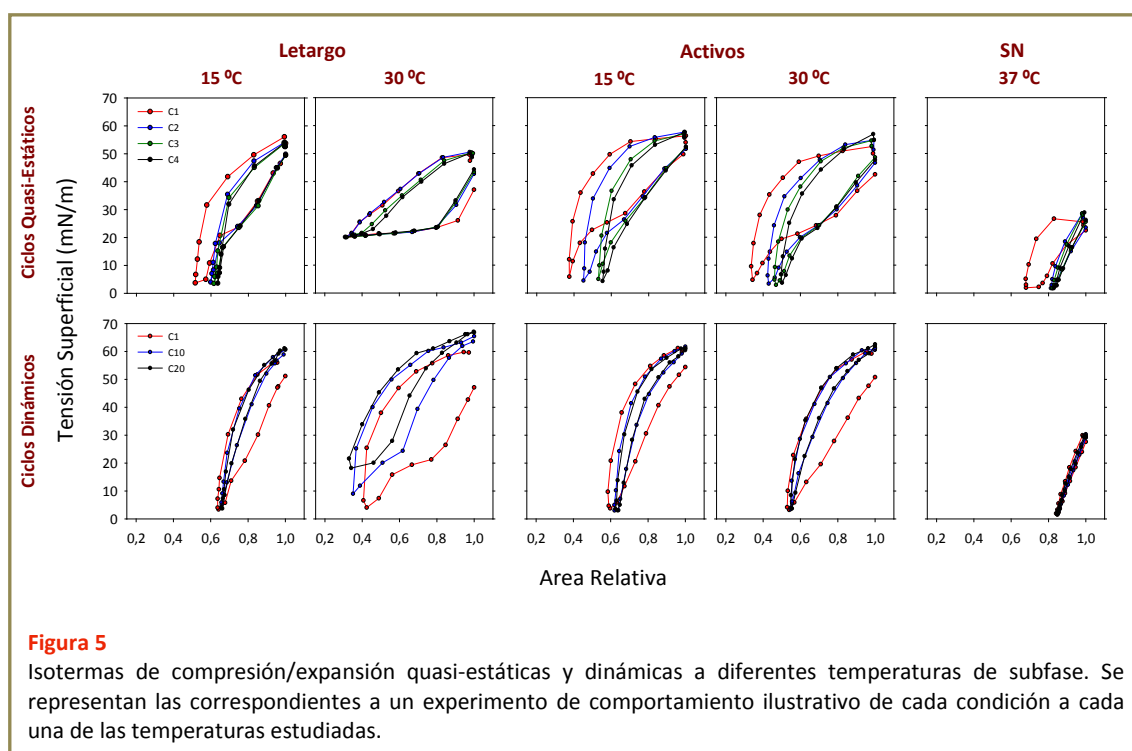


Figura 5

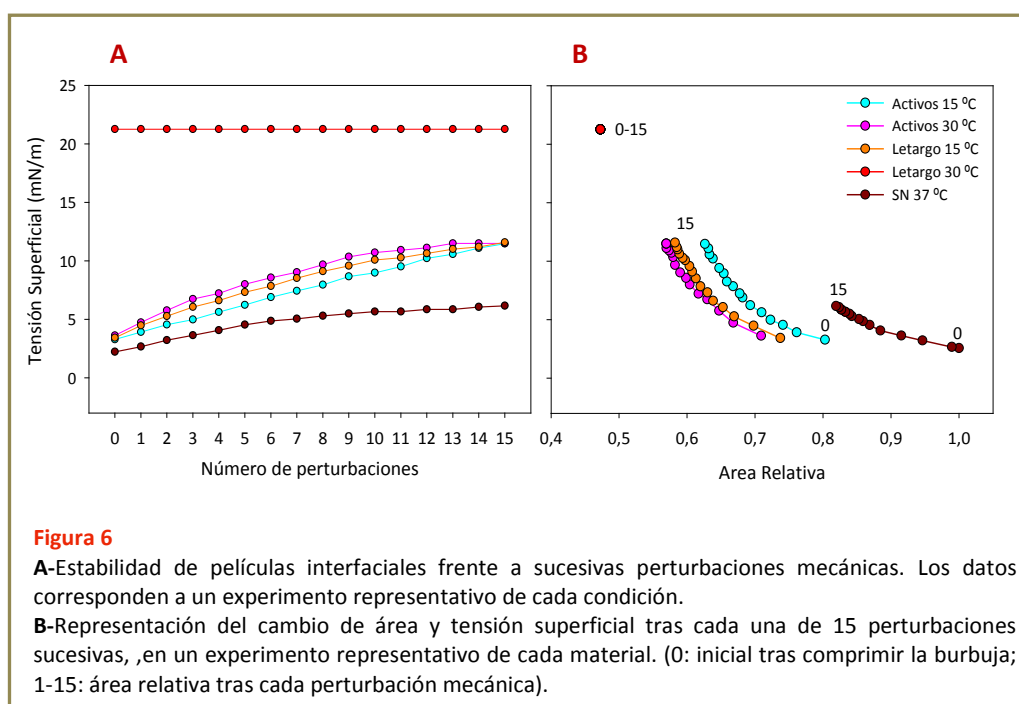
Isothermas de compresión/expansión quasi-estáticas y dinámicas a diferentes temperaturas de subfase. Se representan las correspondientes a un experimento de comportamiento ilustrativo de cada condición a cada una de las temperaturas estudiadas.

El material de los animales en estado de letargo ensayado a 30 °C logra disminuir la tensión superficial a valores en torno a los 3 mN/m en el primer ciclo, requiriendo para ello un gran cambio en el área, alrededor de 60% de compresión y mostrando una marcada histéresis. Sin embargo, en los ciclos sucesivos esta capacidad se pierde. Es quizás sorprendente el resultado obtenido para el material de los animales activos estudiado a 15 °C, ya que el material sigue siendo aparentemente funcional a esta temperatura. Alcanza mínimas tensiones de equilibrio con reducido cambio de área y con poca histéresis; de forma similar a lo observado a 30 °C. Este mismo comportamiento se observó en los ciclos quasi-estáticos.

En la **Figura 6** se grafican los resultados del cambio en la tensión superficial y el área como resultado de quince perturbaciones sucesivas descargadas con un martillo de tipo péndulo

sobre películas comprimidas hasta su tensión superficial mínima. Una vez finalizados los ciclos dinámicos se comprime la burbuja hasta alcanzar la mínima tensión superficial antes del colapso y se realizan los golpes sucesivos con el martillo, registrándose la tensión tras cada perturbación.

Se puede observar cómo para el material de los animales heterotermos es necesario comprimir bastante la burbuja para alcanzar las mínimas tensiones (alrededor de 3 mN/m), mientras la compresión necesaria para que las películas de surfactante porcino alcancen la mínima tensión antes del colapso es mínima. La introducción de sucesivas perturbaciones en las películas de surfactante porcino y en las de los dunnarts activos ensayadas a 15 °C, supone una reducción en el área relativa del orden del 18 %. En las películas de surfactante de los animales activos a 30 °C y de los animales en letargo a 15 °C, el cambio de área es de aproximadamente 14-15%. Las películas de los animales en letargo ensayadas a 30 °C ya se encontraban en una situación próxima al equilibrio, sin capacidad para mantener mínimas tensiones superficiales tras los ciclos dinámicos. Por eso no se pudo comprimir la burbuja a la mínima tensión y con las sucesivas perturbaciones no se registraron cambios en el área relativa.



Las películas de surfactante pulmonar porcino alcanzan mínimas tensiones en torno a 2 mN/m y con las sucesivas perturbaciones se reduce el área relativa pero con un mínimo aumento en la tensión superficial. El comportamiento de las películas formadas por el material de los animales heterotermos cuando son sometidas a perturbaciones mecánicas es muy distinto, produciéndose una gran variación en la tensión con moderadas variaciones en el área relativa tras las sucesivas perturbaciones.

DISCUSIÓN

Las membranas de surfactante de los animales heterotermos parecen tener un estado de deshidratación/empaquetamiento/fluidez semejante a bajas temperaturas (según lo sentido por el LAURDAN y DPH), el cual es también similar al de las membranas de surfactante de animales homeotermos, en este caso el surfactante pulmonar porcino. Este estado de alta deshidratación asociado a un alto grado de empaquetamiento es la característica fundamental de las películas de surfactante que permite alcanzar mínimas tensiones superficiales con la máxima estabilidad (Goerke 1998, Suri et al. 2012). Es posible que este alto empaquetamiento inducido por las bajas temperaturas sea similar a los elevados niveles de empaquetamiento alcanzados por las películas de surfactante durante la compresión al final de la espiración a temperatura fisiológica. Sin embargo, estos estados altamente empaquetados y deshidratados de las membranas de surfactante de los animales heterotermos, alcanzados a bajas temperaturas, tienen valores asociados de anisotropía significativamente menores que las membranas de surfactante porcino (homeotermo). Esto posiblemente esté relacionado con la menor presencia de especies fosfolípídicas disaturadas en el surfactante de los animales heterotermos (Lang et al. 2005). Teniendo esto en cuenta se podría concluir que las membranas de surfactante de los animales heterotermos son más dinámicas a bajas temperaturas, si se las compara con el surfactante de animales homeotermos. Que sean dinámicas asegura un comportamiento fluido y por ende una eficiente adsorción del material a la interfase aire-líquido, permitiendo que se forme rápidamente la película interfacial que permite mantener el pulmón abierto y que se lleve a cabo el intercambio gaseoso necesario para el proceso respiratorio.

La composición del surfactante de los animales heterotermos se mantiene relativamente constante cuando se comparan los estados de actividad y letargo, y la única diferencia que se encontró es una variación en los niveles de colesterol, siendo mayor su concentración en los últimos (Lang et al. 2005). Esta similar composición fosfolípídica explicaría que ambos materiales presenten un perfil termotrópico comparable, que podría ser ajustado en lo fino a las condiciones térmicas de los diferentes estados fisiológicos mediante la modulación de las proporciones de colesterol. Podría decirse que la composición fosfolípídica del surfactante de los animales heterotermos está “optimizada” de forma tal que pueda garantizar la funcionalidad en un amplio rango de temperatura, apropiada para los estados de actividad y letargo, y que los cambios en la concentración de colesterol son necesarios para regular de manera rápida y eficiente el comportamiento mecánico de las películas interfaciales (Orgeig et al. 2003, Orgeig y Daniels 2001).

El efecto de los mayores niveles de colesterol en el surfactante de los animales en estado de letargo, en comparación con los activos, puede verse en los experimentos calorimétricos con una reducción de la entalpía asociada a la transición desde estados ordenados a desordenados de las membranas; sugiriendo nuevamente que el surfactante de los animales en letargo puede ser más fluido.

Estudios previos realizados en el surfactómetro de burbuja cautiva demostraron que el surfactante de los dunnarts es funcional a las temperaturas correspondientes a los estados de actividad y letargo (Lopatko et al. 1998). Los experimentos realizados para esta tesis confirman estos resultados. Sin embargo, llama la atención que el material obtenido de los animales en estado de actividad siga siendo funcional a 15 °C, pues mantiene su capacidad para alcanzar mínimas tensiones de equilibrio con reducido cambio de área y con poca histéresis, de forma similar a lo observado a 30 °C. Esto evidenciaría la plasticidad de la composición de éstos surfactantes para funcionar en un amplio rango de condiciones ambientales y así permitir la relativamente rápida entrada en letargo de estos animales heterotermos.

La comparación funcional del surfactante heterotermo con un surfactante homeotermo como el porcino revela una claramente menor eficiencia, que se manifiesta en menor capacidad de adsorción, la necesidad de una mayor reducción de área para alcanzar las menores tensiones superficiales y mayores tensiones superficiales máximas.

Puede proponerse que la adaptación composicional y estructural a un amplio perfil térmico se hace a costa de perder máxima eficiencia tensioactiva. El surfactante de animales con temperatura fisiológica más constante habría tenido un mayor margen de optimización a lo largo de la evolución adaptativa de su composición lipídica, aunque esto supondría una menor versatilidad a ambientes fisiológicos cambiantes.

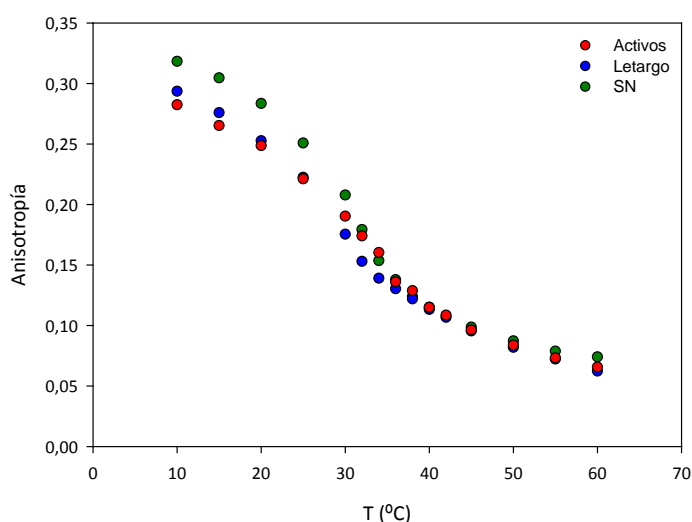
ANEXOS

A continuación se incluyen resultados complementarios obtenidos en el contexto de esta Tesis, que forman parte de un trabajo de colaboración con la Universidad del Sur de Australia, y que suponen también el estudio del comportamiento termotrópico de surfactante de otras especies heterotérmicas. Algunos de estos datos se han incluido en la Tesis Doctoral de Suri Lakshmi Murty, dirigida por la Doctora Sandra Orgeig de dicha universidad. Aunque no deben ser formalmente considerados parte de la presente Tesis, se incluyen aquí por su interés para entender la complejidad de los mecanismos adaptativos del surfactante a diferentes contextos fisiológicos.

MURCIÉLAGOS

Los murciélagos de la especie *Chalinolobus gouldii* experimentan variaciones en su temperatura corporal con un ritmo circadiano. Durante la noche mantienen actividad y una temperatura próxima a 37 °C, mientras durante el día reducen su ritmo metabólico y su temperatura fisiológica decae a alrededor de 23 °C. Resulta por tanto interesante analizar si estos cambios iban asociados a modificaciones significativas del comportamiento termotrópico de su surfactante.

Por escasez del material procedente de estos animales sólo se pudo realizar un experimento de anisotropía con el surfactante de murciélagos tanto activos como en estado de letargo, utilizando para ello muestras que reúnen surfactante de 4 animales de una u otra condición. Por este motivo, aunque no se pudo calcular el promedio y desvío estándar para comparar el perfil termotrópico de las dos poblaciones de murciélagos entre sí y con el surfactante pulmonar porcino, debe entenderse que cada perfil ilustra de alguna manera un comportamiento promedio de varios animales en la misma condición fisiológica.



Anisotropía de fluorescencia del DPH en función de la temperatura en membranas de surfactante de murciélagos en estado de actividad ó letargo y de surfactante pulmonar porcino.

Puede observarse cómo el perfil termotrópico de anisotropía del material de los murciélagos es un poco más ensanchado que el del surfactante nativo. Los valores de anisotropía a bajas

temperaturas, por debajo de 25-30 °C, parecen ser sustancialmente menores que los correspondientes para el surfactante porcino.

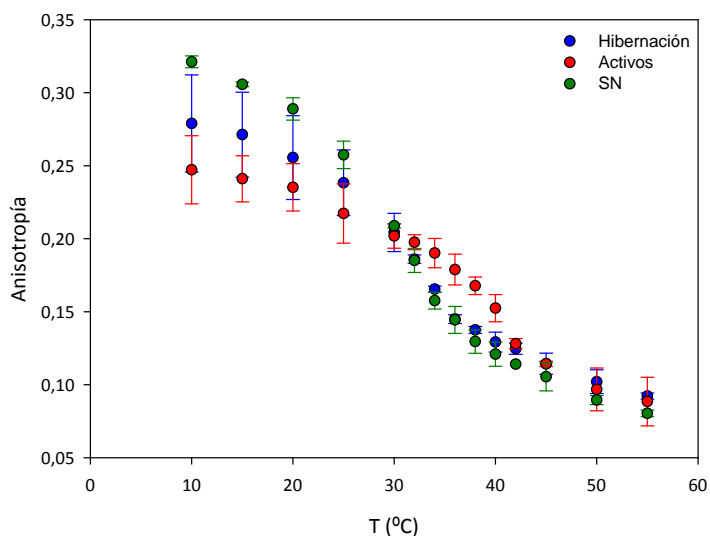
Sin embargo, y al igual que ocurría con el surfactante de los dunnarts, no se aprecia una diferencia importante al comparar los perfiles de animales en estado de actividad y letargo.

ARDILLAS

Las ardillas de la especie *Ictidomys tridecemlineatus* suponen un ejemplo ilustrativo de animales que experimentan estados de hibernación estacional, durante los cuales su actividad y ritmo metabólico se reduce al mínimo, mientras su temperatura corporal cae por debajo de los 10 °C durante períodos de tiempo relativamente largos. Durante el período de hibernación, los animales mantienen una respiración funcional, como es obvio, pero ésta sigue un ritmo irregular, alterando largos períodos de hipocapnia con breves momentos de ritmo respiratorio rápido. Resultaba por tanto interesante analizar cómo el sistema surfactante de estos animales se ha adaptado a unas condiciones fisiológicas tan especiales.

En la siguiente figura se muestra el perfil termotrópico de anisotropía de fluorescencia del DPH en membranas de surfactante obtenido de ardillas en estado de actividad o hibernación.

Los datos son el promedio \pm desviación típica tras obtener los perfiles de material procedente de al menos 3 animales diferentes de cada condición.



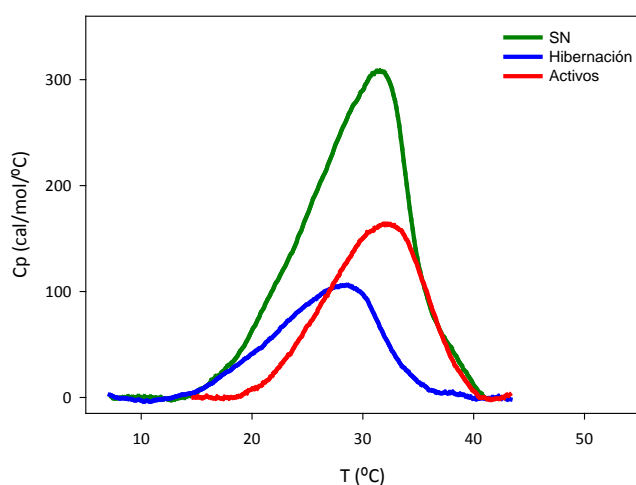
Anisotropía de fluorescencia del DPH en función de la temperatura en membranas de surfactante de ardillas en estado de actividad ó hibernación y de surfactante pulmonar porcino.

Estos resultados de anisotropía de las membranas de surfactante de ardillas muestran una ancha transición de estados ordenados a desordenados. Los valores promedio de anisotropía de las membranas de surfactante de animales en estado de actividad o hibernación no fueron significativamente diferentes hasta una temperatura de 32 °C, siendo ambos ligeramente inferiores a los determinados para el surfactante porcino en este mismo rango de temperatura. Entre los 34 y 40 °C, los valores de anisotropía de las membranas de los animales activos fueron significativamente mayores que los observados para animales en estado de

letargo o el surfactante porcino. Por encima de los 42 °C no se observaron diferencias entre todos los materiales estudiados.

Es decir, el perfil termotrópico del surfactante de los animales en estado de actividad, con mucha mayor temperatura fisiológica, se desplaza aproximadamente 3 °C a mayor temperatura con respecto al perfil del surfactante de los animales en estado de hibernación.

Esta diferencia se aprecia también de manera muy clara en los perfiles calorimétricos obtenidos mediante DSC de los diferentes materiales, y que se muestran de manera ilustrativa en la siguiente figura.



Termogramas de DSC de surfactante nativo (SN) y surfactante de ardillas en estado de actividad ó hibernación. Las muestras se estudiaron a una concentración fosfolipídica en torno a 0,7-0,9 mg/mL y para cada una se realizaron entre 10-15 barridos de temperatura entre 5 y 45 °C a razón de 30 °C/h.

El material empleado para la obtención de cada uno de esos termogramas corresponde al surfactante de un animal, en una concentración fosfolipídica en torno a los 0,7-0,9 mg/mL. En la figura se comparan termogramas de un experimento ilustrativo de un animal de cada condición pero se obtuvieron comportamientos similares en muestras de 3 animales de cada condición.

La entalpía (ΔH) asociada a la transición en el surfactante de los animales en estado de actividad ($1785,1 \pm 58,9$ cal/mol) fue significativamente mayor que la obtenida para el surfactante de los animales en hibernación ($1288,7 \pm 48,4$ cal/mol). La entalpía asociada al surfactante pulmonar porcino ($2847,8 \pm 211,0$ cal/mol) fue significativamente mayor que la correspondiente a cada condición de estos animales heterotermos. La temperatura de transición de fase o T_m del surfactante de los animales activos ($31,6 \pm 0,1$ °C) y del surfactante porcino ($32,4 \pm 0,3$ °C) fue en ambos casos significativamente mayor que la de los animales en hibernación ($29,1 \pm 0,2$ °C). La $\Delta T_{1/2}$ no fue significativamente diferente entre ninguno de los grupos estudiados (Activos: $9,2 \pm 0,6$ °C; Hibernación: $10,6 \pm 0,6$ °C; SN: $9,4 \pm 0,3$ °C). Todos los perfiles muestran una marcada asimetría, con un final de transición bastante abrupto en el lado de las altas temperaturas.

Así, la calorimetría confirma lo determinado mediante anisotropía del DPH; que el perfil termotrópico del surfactante de los animales activos se desplaza a mayores temperaturas con respecto al de los animales en hibernación. Esto contrasta con lo observado en dunnarts y

murciélagos, donde no aparecían diferencias importantes entre animales en actividad y letargo.

Esto sin duda está relacionado con la modificación adaptativa que se revela en la composición fosfolipídica del surfactante a lo largo del régimen estacional de las ardillas.

El surfactante de las ardillas activas posee niveles de DPPC/PC total alrededor del 55% y de PC disaturada/PC total en torno al 65%, valores similares a los de los animales homeotermos. Con la hibernación los niveles de DPPC/PC total disminuyen hasta aproximadamente un 40% y los de PC disaturada/PC total hasta valores menores al 50%, comparables a los niveles observados en los heterotermos que entran en letargo (Suri et al. 2012). No se observaron cambios en la proporción de colesterol entre ambos estados, a diferencia de lo que ocurre con animales heterotermos como los murciélagos y los dunnarts en donde los cambios en la concentración de colesterol parecen ajustar una misma composición fosfolipídica (Codd et al. 2000, Lang et al. 2005, Langman et al. 1996). Todos estos datos sugieren que las estrategias adaptativas deben ser distintas en mamíferos que experimentan cambios en la temperatura corporal por cortos períodos de tiempo en comparación con aquellos que hibernan y sufren fluctuaciones térmicas en respuesta a cambios estacionales. Los cambios en la temperatura corporal por breves períodos de tiempo probablemente no permiten que se ajuste la composición fosfolipídica mediante señales que incidan sobre el metabolismo fosfolipídico modificando el perfil de especies moleculares con las cadenas de acilo de longitud y grado de saturación adecuadas. Así, los animales que deben experimentar cambios de temperatura fisiológica en una escala corta de tiempo han ajustado probablemente su composición fosfolipídica de forma tal que pueda ser modificada por cambios en la concentración de colesterol, lo que aparentemente puede modificarse mucho más rápidamente. En contraste, los animales que hibernan por largos períodos de tiempo poseen una composición fosfolipídica específica que funciona adecuadamente durante el período de hibernación. Queda abierta la cuestión de cómo actúan los “sensores” que detectan la necesidad de modular composición y propiedades del surfactante y la ubicación y mecanismo de activación de los reservorios que movilizan colesterol hacia o desde el surfactante.

La combinación de elevados niveles de especies fosfolipídicas insaturadas y bajos niveles de disaturadas en el surfactante de los animales que hibernan sería la responsable de la menor entalpía asociada a las transiciones termotrópicas en el material de estos animales heterotermos así como de los menores valores de T_m . La presencia de picos asimétricos en los termogramas calorimétricos de las membranas de surfactante probablemente se deba a la presencia de regiones segregadas o dominios con composición lipídica diferente y diferente grado de empaquetamiento orden/fluido, que fusionan a diferentes temperaturas. La particular composición del surfactante de las ardillas que hibernan promovería un mayor nivel de heterogeneidad dando como resultado mayores heterogeneidades de empaquetamiento y como consecuencia, transiciones calorimétricas ensanchadas (Suri et al. 2012).

Capítulo IV

ESTRUCTURA-FUNCIÓN DEL SURFACTANTE
PULMONAR EN MODELOS ANIMALES
MODIFICADOS GENÉTICAMENTE.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y LA DEFICIENCIA
CONGÉNITA DE SP-C.



Los resultados que se muestran en este capítulo fueron realizados en nuestros laboratorios pero forman parte de un trabajo realizado en colaboración con el equipo del Dr. Timothy E. Weaver del **Childrens Hospital Medical Center** en **Cincinnati, Estados Unidos**.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas pulmonares SP-B y SP-C son hidrofóbicas y mejoran las propiedades de las películas fosfolipídicas del surfactante (Weaver 1998). Podría decirse que otorgan las propiedades biofísicas al surfactante pulmonar, particularmente en lo que se refiere a sus aspectos más dinámicos (Weaver y Conkright 2001).

La SP-C es una proteína transmembrana que es expresada exclusivamente por las células epiteliales alveolares de tipo II. Se asocia con los lípidos del surfactante para reducir la tensión superficial en el alvéolo, manteniendo el volumen pulmonar al final de la espiración. Es la proteína más hidrofóbica y su secuencia se encuentra altamente conservada entre las especies de mamíferos. Es la única proteína del surfactante que, en el pulmón, es producida exclusivamente por los neumocitos (Weaver y Whitsett 1991). Se cree que esta proteína promueve y estabiliza los contactos membrana-membrana y membrana-interfase (Creuwels et al. 1995, Ross et al. 2002) facilitando el intercambio de lípidos entre bicapas o entre bi y monocapas.

La biosíntesis de SP-C, que es la más pequeña de las proteínas del surfactante, está estrictamente acoplada a la diferenciación del tejido pulmonar de los mamíferos (Glasser et al. 1990, Hyatt et al. 2007). Este hecho, sumado a la falta de homología entre la SP-C y cualquier otra proteína conocida, hace pensar que ésta proteína podría ser la más específica en términos de actividad biofísica del surfactante pulmonar (Pérez-Gil 2008). Sorprendentemente, los animales que no expresan la SP-C pueden respirar y sobrevivir (Glasser et al. 2001), sugiriendo que la acción de esta proteína no es tan crítica como la de la SP-B. Sin embargo, desde que se comenzó a hacer experimentos desactivando el gen de la SP-C, se vio que la deficiencia de la proteína está asociada a patologías respiratorias severas (Glasser et al. 2003, Lawson et al. 2005, Nogee 2004a), usualmente de condición crónica, sugiriendo que la SP-C podría ser esencial para mantener la apropiada dinámica respiratoria a largo plazo.

Por otro lado, la SP-C podría tener un papel particularmente importante en el mantenimiento de la integridad de la película superficial, otorgando particulares propiedades de estabilidad y resistencia mecánica que sólo las estructuras multicapa altamente empaquetadas pueden soportar (Pérez-Gil 2008). La aparente reducida estabilidad de las películas formadas por el surfactante de los ratones en los que se inactiva la expresión de SP-C (Glasser et al. 2001) podría reforzar esta hipótesis, así como también el hecho de que la falta de una SP-C operativa fue asociada con el desarrollo de fallo respiratorio crónico a largo plazo (Glasser et al. 2003, Nogee 2004b). Sumado a esto, la SP-C podría ser importante en el mantenimiento de la función pulmonar a bajas temperaturas en aquellos animales que entran en períodos de letargo o hibernación, promoviendo una rápida adsorción de los lípidos a la interface aire-líquido (Potter et al. 2007). Por tanto, la SP-C es una buena candidata para identificar la presencia de cambios evolutivos adaptativos en la secuencia aminoacídica primaria en ciertos grupos de mamíferos, como por ejemplo los marinos o los heterotermos, que podrían permitirles sortear los problemas asociados al buceo profundo o las temperaturas corporales variables (Orgeig et al. 2010).

Las preparaciones de surfactante que contienen fosfolípidos y SP-C poseen elevada actividad surfactante *in vitro* (Whitsett et al. 1986, Yu y Possmayer 1990). En este sentido, las terapias de reemplazo de surfactante con preparaciones fosfolípicas enriquecidas con SP-C parecen ser muy efectivas en el tratamiento de trastornos respiratorios (Jobe 1993).

Las propiedades *in vitro*, según mediciones realizadas con el surfactómetro de burbuja cautiva, son mejores para el surfactante que contiene ambas proteínas (SP-B y SP-C). Esto se aplica a la adsorción así como también a las tensiones superficiales mínimas y máximas y a la reducción del área requerida para alcanzar bajas tensiones superficiales durante los ciclos de expansión-compresión (Almlén et al. 2008).

A pesar de que estudios tanto *in vitro* como *in vivo* indican que la SP-C contribuye a la función del surfactante, no se ha terminado de demostrar hasta qué punto esta proteína es requerida para o contribuye a la función pulmonar *in vivo*. Es para discernir este rol de la SP-C en la función pulmonar por lo que se produjeron ratones genéticamente deficientes (-/-) ó “knockout” en SP-C (SPC-KO). Como se ha comentado previamente, estos ratones son viables al nacer y crecen hasta la edad adulta sin anormalidades pulmonares aparentes (Glasser et al. 2001); sin embargo desarrollan signos de enfisema y neumonitis intersticial con el paso del tiempo, lo que sugiere que la SP-B por sí sola es capaz de establecer bajas tensiones superficiales y estabilizar los espacios de aire distales al nacer (Glasser et al. 2003), pero que la SP-C puede participar en la estabilización “fina” de la mecánica alveolar a largo plazo.

Para contribuir a elucidar el posible papel de SP-C en la modulación de las propiedades biofísicas del surfactante, en la presente Tesis se ha realizado una caracterización de las propiedades termotrópicas y funcionales de muestras de surfactante obtenidas de ratones SPC-KO.

RESULTADOS

1. FLUORESCENCIA

1.1. LAURDAN

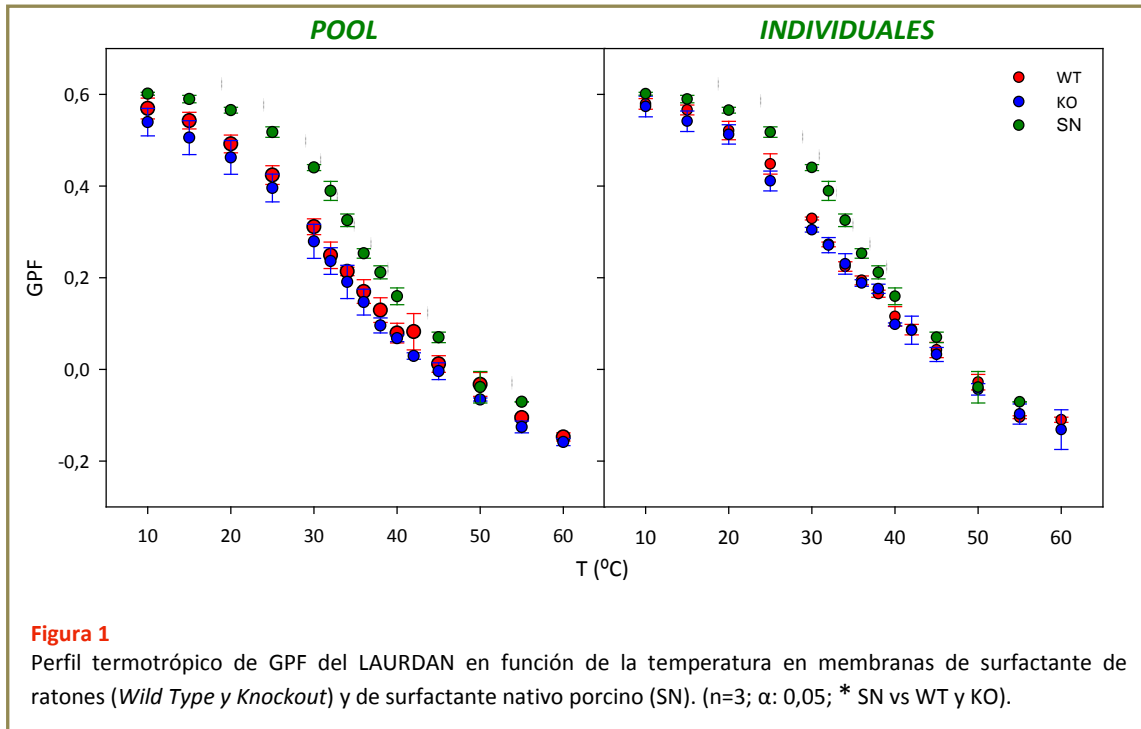
Como ya se ha descrito, el empleo de esta sonda permite evaluar en cierto modo el entorno que la rodea en membranas, ya que su fluorescencia es altamente sensible al estado de hidratación de la región de las cabezas polares de los fosfolípidos, la cual a su vez depende del estado de fase, de la organización lateral y del empaquetamiento lipídico; factores que a su vez son influenciados por la temperatura (Bagatolli 2003, De Vequi-Suplicy et al. 2006, Parasassi et al. 1991).

En la **Figura 1** se resumen los perfiles termotrópicos de las muestras de surfactante de los animales control ó “wild type” y los modificados genéticamente ó “knockout” y del surfactante nativo porcino.

Para realizar estos experimentos se utilizó material de dos tipos:

+ una mezcla de surfactantes de 20 animales de cada condición, lo que denominamos “*pool*” y

+ material proveniente de lavados broncoalveolares de animales individuales de cada condición, lo que denominamos “*individuales*”.



Las membranas de surfactante de estos animales, en ambos casos, presentan una marcada y amplia transición, en comparación con el surfactante porcino; pero se extiende en el mismo rango de valores de GPF que los observados para éste último.

La transición corresponde al paso progresivo desde estados más ordenados a fases más desordenadas, como ha sido bien caracterizado para el surfactante pulmonar porcino en trabajos anteriores por calorimetría o espectroscopia de infrarrojo (Bernardino de la Serna et al. 2004, Dluhy et al. 1989, Trauble et al. 1974). Esta transición ocurre con un aparente punto de inflexión alrededor de los 32 °C (similar al del SN) en el caso del “*pool*” y alrededor de los 34 °C para los “*individuales*”; no observándose diferencias significativas entre ambas muestras de surfactante de ratones a todas las temperaturas estudiadas. Sin embargo, ambos grupos presentaron valores de GPF significativamente menores en comparación con el surfactante porcino a temperaturas entre 20 y 40 °C.

Para la comparación entre los diferentes grupos se realizó un análisis de varianza (One Way ANOVA). Se aplicó el método Holm-Sidak para comparar los grupos con un nivel de significación de 0,05. Este estudio arrojó los resultados que se muestran en la Fig. 1. Entre 20 y 40 °C hay diferencias significativas entre el surfactante porcino y el de ambos grupos de ratones.

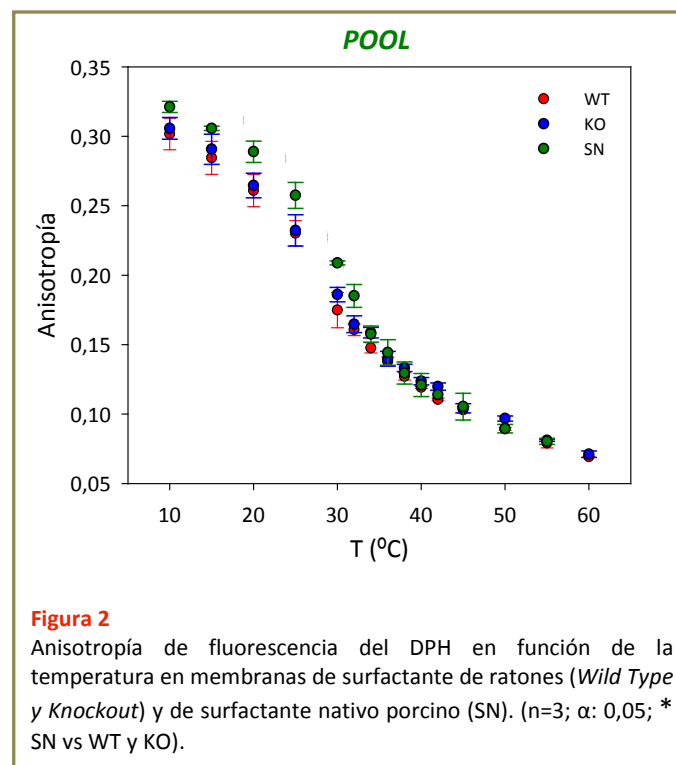
1.2. DPH

La anisotropía es una técnica que da información sobre la fluidez de las membranas y permite determinar el rango de temperatura en el cual se produce la transición de fase de una muestra. La sonda empleada es DPH, que se distribuye al azar en la región hidrofóbica de la membrana y es sensible a los cambios en el orden lipídico y fluidez de la membrana (Holopainen et al. 1998, Lentz 1993, Repáková et al. 2004). Además, se distribuye uniformemente en las fases gel y fluida (Sklar et al. 1975, Lentz 1989).

Para realizar este estudio sólo pudo utilizarse el material correspondiente al “pool” de surfactantes.

La Figura 2 resume y compara los perfiles termotrópicos del surfactante obtenido de los ratones y de lavado broncoalveolar porcino. Las membranas de surfactante de ratón, en ambos casos, presentan una transición ligeramente más ensanchada, en comparación con el surfactante porcino; pero se extiende en el mismo rango de valores de anisotropía que los observados para éste último.

Es posible determinar un rango de temperatura entre los 20 y 40 °C donde se lleva a cabo la transición de fase. Esta transición ocurre con un aparente punto de inflexión alrededor de los 30 °C (cercano al del SN), no observándose diferencias significativas entre ambas muestras de surfactante de ratón a todas las temperaturas estudiadas. Sin embargo, ambos grupos presentaron valores de anisotropía significativamente menores en comparación con el surfactante porcino a temperaturas entre 20 y 32 °C.



Para la comparación entre los diferentes grupos se realizó un análisis de varianza (One Way ANOVA). Se aplicó el método Holm-Sidak para comparar los grupos con un nivel de significación de 0,05. Este estudio arrojó los resultados que se muestran en la Fig. 2; entre los 20 y 32 °C hay diferencias significativas entre el surfactante porcino y el de ambos grupos de ratones.

2. ESTUDIOS FUNCIONALES

Todos los experimentos se realizaron con concentraciones de surfactante pulmonar entre 7 y 13 mg/ml, garantizando material en exceso en la interfase y por tanto una óptima funcionalidad. Se trabajó con el material de animales individuales sin tener que combinar varias muestras de surfactante. Para realizar estos estudios funcionales las muestras de surfactante se procesaron de forma que pudieran obtenerse a la mayor concentración fosfolipídica posible.

Para evaluar la actividad surfactante del material de los animales “wild type” y “knockout” y poder compararla con la del surfactante nativo porcino se eligieron varias temperaturas de estudio, en función de la temperatura corporal de los animales al momento de la extracción del material pulmonar y por debajo y encima de la misma. Estas fueron: 30 °C, 34 °C (correspondiente a la temperatura corporal del animal al momento de la extracción del surfactante) y 41 °C.

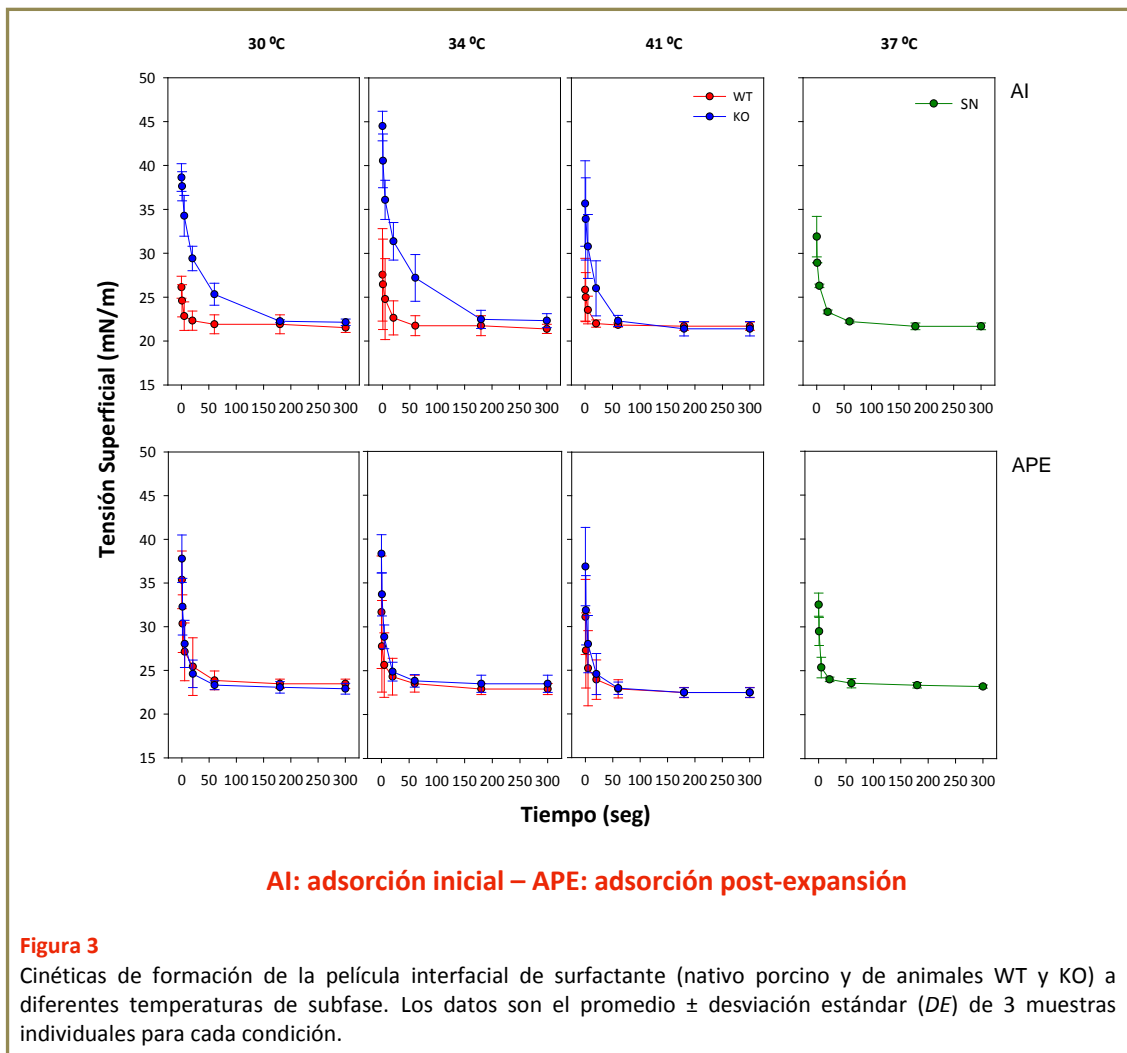
Se evaluó el comportamiento de la película tensioactiva de surfactante y su estabilidad realizando:

+ Estudios a 30, 34 y 41 °C para el material de los animales modificados genéticamente.

+ Estudios a 37 °C para el surfactante pulmonar porcino.

Se eligieron dichas temperaturas asumiendo que el surfactante funciona de manera óptima a temperaturas similares a la temperatura corporal del animal al momento de la extracción del material (Codd et al. 2000, Lopatko et al. 1998). Para el surfactante pulmonar porcino, esto se ha evidenciado en los experimentos llevados a cabo en el Capítulo I, donde se vio que a temperaturas por debajo de la fisiológica la funcionalidad del surfactante es muy pobre.

En la Figura 3 se muestran las cinéticas de formación de la película interfacial de surfactante a diferentes temperaturas de subfase. En todos los casos un exceso de material (2-5 nmoles) fue inyectado para asegurar el equilibrio y exceso de material en la interfase.



Durante la adsorción inicial a las temperaturas de subfase estudiadas, se observan diferencias significativas entre las muestras de los animales WT y KO. El surfactante de animales WT alcanza una tensión superficial en torno a los 21-22 mN/m en menos de 20 segundos como ocurre con el surfactante pulmonar porcino a su temperatura fisiológica, sin embargo el surfactante de los animales KO para SP-C alcanzan estos valores de equilibrio sólo al cabo de 3 min a 30 y 34 °C y al cabo de 1 min a 41 °C. Transcurridos 5 minutos de la adsorción inicial y formación de la película tensioactiva, la burbuja se expande rápidamente y se monitoriza el cambio en la tensión superficial como resultado de la incorporación de material surfactante adicional desde los reservorios asociados de la subfase (Schürch et al. 1998).

A diferencia de lo que ocurre en la adsorción inicial, durante la post-expansión el surfactante de ambos, animales WT y KO, se adsorbe rápidamente y disminuye la tensión superficial a valores de equilibrio en torno a los 21 mN/m necesitando menos de un minuto para alcanzar esta condición. Estos valores de tensión superficial son semejantes a los alcanzados por el surfactante pulmonar porcino.

Cuando se comprimen las películas de ambos materiales de manera quasi-estática (ver [Figura 4](#)) en ciertas ocasiones se alcanzan tensiones superficiales mínimas semejantes a las alcanzadas por el surfactante porcino, alrededor de los 1-2 mN/m.

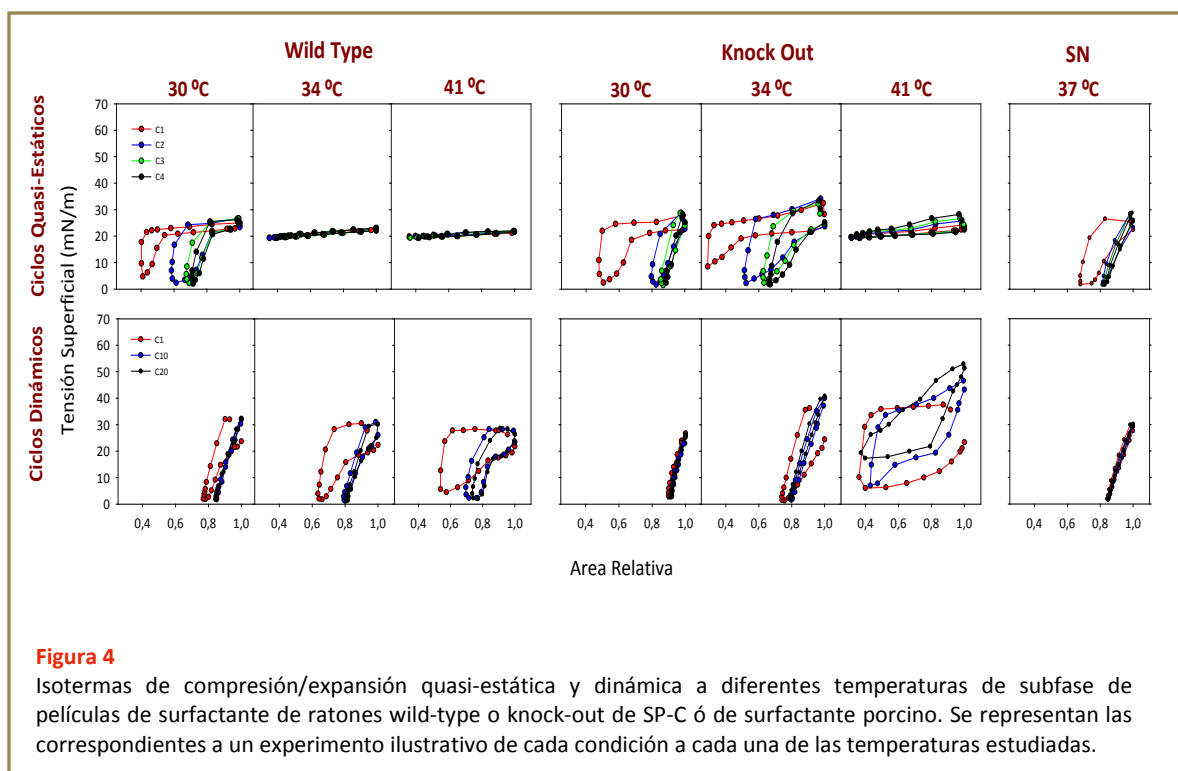


Figura 4

Isotermas de compresión/expansión quasi-estática y dinámica a diferentes temperaturas de subfase de películas de surfactante de ratones wild-type o knock-out de SP-C ó de surfactante porcino. Se representan las correspondientes a un experimento ilustrativo de cada condición a cada una de las temperaturas estudiadas.

Observando la isoterma de compresión/expansión correspondiente al primer ciclo quasi-estático vemos que existen importantes diferencias a las temperaturas estudiadas.

En el caso de los animales **“Wild Type”**, cuando se ensaya el material a 30 °C se alcanzan mínimas tensiones en torno a los 2 mN/m con un cambio de área relativa alrededor del 60%, una histéresis que se va reduciendo progresivamente con los ciclos y tensiones máximas alrededor de los 27 mN/m. Este comportamiento es totalmente distinto al observado a mayores temperaturas, ya que en este último caso no se alcanzan suficientemente bajas tensiones superficiales. Esto supone una actividad surfactante deficiente ya que las mínimas tensiones alcanzadas están en torno a los 19 mN/m aún con un cambio de área del 70%.

En el primer ciclo a 30 °C se observa, en mayor o menor medida en todos los ciclos, una región de pendiente reducida ó plateau ([Schürch et al. 1994](#)) entre los 20 y 25 mN/m durante la compresión y expansión. El cuarto ciclo de compresión/expansión tiene una forma bastante diferente en comparación con el primero, con cambios de área muchísimo menores (en torno al 28%) y menor histéresis, lo que indica que se ha producido un cambio en la estructura u organización lateral de la película tensioactiva. Cuando se estudia el material a 34 y 41 °C da la impresión de que este plateau nunca llega a superarse.

En el caso del material de los animales **“Knockout”**, se ve que tanto a 30 como a 34 °C pueden llegar a alcanzarse tensiones mínimas en torno a los 2 mN/m con un cambio de área relativa

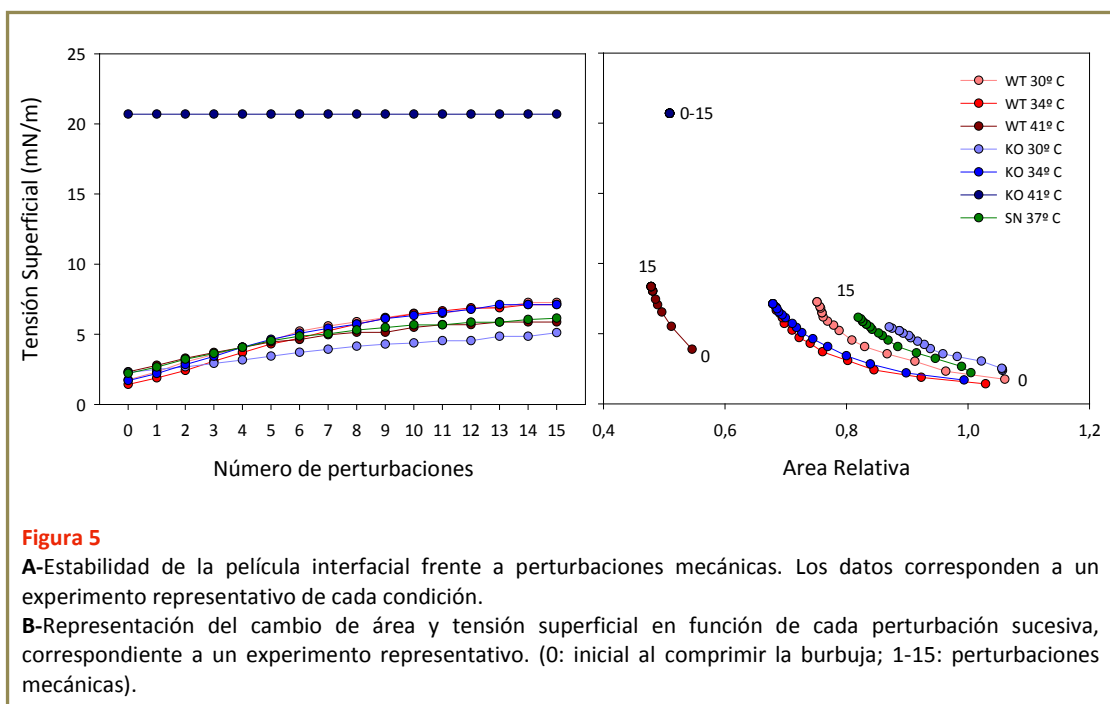
alrededor del 60-70%, cierta histéresis y con tensiones máximas por encima de los 27 mN/m. A 41 °C esta actividad desaparece ya que las mínimas tensiones alcanzadas están en torno a los 19 mN/m.

Es decir, que en condiciones quasi-estáticas las películas de surfactante murino sólo alcanzan tensiones superficiales bajas cuando operan a temperaturas por debajo de un umbral en torno a los 30-34 °C, siendo esta temperatura límite aparentemente superior para el surfactante que no contiene SP-C.

En la **Figura 4** también se pueden observar las isothermas de compresión/expansión dinámica a las diferentes temperaturas estudiadas. Puede verse que el material es funcional a todas las temperaturas cuando procede de los animales WT, mientras que el de los animales KO deja de ser funcional a temperaturas por encima de los 34 °C.

Es interesante que las películas formadas por el material de los animales WT presenta siempre un primer ciclo con cierta histéresis cuando se comprime en condiciones dinámicas, que se pierde progresivamente en los sucesivos ciclos, de forma que al final alcanzan tensiones mínimas con reducción de área 20% en isothermas que se parecen a las que genera el surfactante porcino desde la primer compresión dinámica.

En la **Figura 5** se representa el cambio en la tensión superficial y el área como resultado de la descarga sobre la burbuja de quince perturbaciones sucesivas con un martillo de tipo péndulo. Una vez finalizados los ciclos dinámicos se comprime la burbuja hasta alcanzar la mínima tensión superficial antes del colapso y se realizan los golpes sucesivos con el martillo, registrándose la tensión después de cada perturbación.



Puede observarse claramente cómo en los casos en los que el material es funcional la tensión superficial inicial está en torno a los 2 mN/m y aumenta con las sucesivas perturbaciones hasta

alcanzar valores entre 5 y 7 mN/m. La gran diferencia se observa en el cambio de área relativa. Para ambos materiales de origen murino, cuando las películas operan a temperaturas por debajo de los 41 °C se observa un comportamiento similar al del surfactante pulmonar porcino. No es necesario comprimir demasiado la burbuja para alcanzar las mínimas tensiones y el aumento del área es relativamente proporcional al aumento de la tensión con las perturbaciones. Sin embargo, el cambio de área registrado para el surfactante porcino y el material de los KO a 30 °C es del orden del 18%, mientras que para el resto de las temperaturas y materiales el cambio de área registrado está en el orden del 30%.

DISCUSIÓN

Los componentes del surfactante que son críticos para que éste sea funcional incluyen, junto con el fosfolípido predominante DPPC, las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C (Nogee 2004). Ambas proteínas mejoran la actividad del surfactante, en particular la formación inicial de la película y su reextensión cíclica, que son claves para un apropiado comportamiento dinámico durante los sucesivos ciclos respiratorios (Serrano y Pérez Gil 2006).

Ambas proteínas poseen estructuras muy diferentes, con lo que cabría esperar que cumplieren diferentes roles funcionales o que sus efectos se potencien mutuamente. Una manera de evidenciar las funciones de cada una de las proteínas es bloquear o anular su síntesis mediante modificaciones genéticas, obteniendo animales que sintetizan sólo una de las proteínas hidrofóbicas. Se intentó crear animales deficientes en SP-B pero estos no llegaban a término o morían al nacer. Sin embargo, los deficientes en SP-C respiran perfectamente al nacer y crecen hasta la edad adulta sin aparentes problemas respiratorios.

La supervivencia de los ratones deficientes en SP-C indica que esta proteína no es requerida estrictamente para la adecuada funcionalidad de las películas fosfolípídicas alveolares que intervienen en la función respiratoria *in vivo*. Sin embargo, pequeñas anomalías en la mecánica pulmonar y la inestabilidad del surfactante de los ratones deficientes a bajos volúmenes de burbuja demuestran la importancia de la SP-C en la función pulmonar a bajos volúmenes pulmonares (Glasser et al. 2001).

La actividad del surfactante de los ratones deficientes en SP-C fue relativamente normal en lo que se refiere a su capacidad para alcanzar tensiones de equilibrio y mínimas tensiones superficiales similares a las del surfactante de los animales no deficientes. Estos resultados concuerdan con lo previamente concluido a partir del estudio de diferentes combinaciones de lípidos y proteínas hidrofóbicas en presencia de diferentes combinaciones de proteína. Se observó que la SP-B es la proteína más activa para promover la actividad superficial y el mantenimiento de una película estable ante perturbaciones mecánicas; por su parte, la SP-C estaría implicada en la formación de la película interfacial y su reextensión (Schürch et al. 2010). Al comparar ambos tipos de surfactante en los experimentos de esta Tesis puede verse que en presencia de ambas proteínas la tensión superficial de equilibrio se alcanza

significativamente más rápido que cuando sólo está presente la SP-B. Esto sugiere un efecto combinado de ambas proteínas para reducir la tensión superficial de manera óptima y rápida.

Una vez formadas las películas interfaciales, no se observan grandes diferencias en cuanto al comportamiento en compresión-expansión de los materiales en presencia o ausencia de SP-C. Sí cabe destacar la dificultad para que las películas de surfactante murino alcancen bajas presiones cuando se comprimen en condiciones cuasi-estáticas, algo que sí ocurre si se comprimen y expanden en condiciones dinámicas. Puede plantearse que éstas películas tengan un carácter relativamente más fluido que las formadas por el surfactante porcino, tal y como parece deducirse de los experimentos con LAURDAN. La mayor fluidez puede impedir que las películas alcancen estados de alto empaquetamiento, baja compresibilidad y reducida tensión superficial si no se comprimen a velocidad suficientemente alta. Ello explicaría por qué existe un umbral de temperatura por encima del cual no se alcanzan bajas tensiones si se comprimen las películas a velocidad lenta. El hecho de que este umbral térmico sea menor en presencia de SP-C puede sugerir que la proteína también facilita el plegamiento o squeeze-out de la película interfacial durante la compresión, relajándola e impidiendo que se alcancen las mínimas tensiones.

A velocidades de compresión alta, como la utilizada en los ciclos dinámicos, los estados de alto empaquetamiento y baja tensión superficial se alcanzarían a mayor velocidad que la que define la relajación de las películas, lo que permitiría al surfactante ser operativo.

La diferencia en el comportamiento entre las películas murinas y porcinas podría estar definida por la diferente frecuencia respiratoria de mamíferos pequeños como el ratón, que puede alcanzar 200 ciclos respiratorios por minuto ó animales de mayor tamaño. En este sentido, la presencia de SP-C en las películas de surfactante expuesto a exigentes dinámicas respiratorias puede ser particularmente importante.

Capítulo V

RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN EL SURFACTANTE PULMONAR DE UN MODELO ANIMAL DE SURFACTANTE MODIFICADO POR DIETA.



Los resultados que se muestran en este capítulo fueron obtenidos en nuestros laboratorios pero forman parte de un trabajo realizado en colaboración con el equipo del Dr. Wolfgang Bernhard de la **Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen** de Alemania.

Algunos de estos resultados se incluyen en la siguiente publicación:

Myristate is selectively incorporated into surfactant and decreases dipalmitoylphosphatidylcholine without functional impairment.

Pynn C.J., Picardi M.V., Nicholson T., Wistuba D., Poets C.F., Schleicher E., Pérez-Gil J. and Bernhard W.

Departments of Neonatology and Internal Medicine IV, Faculty of Medicine, and Department of Chemistry, Eberhard-Karls-University, Tübingen, Germany; and Department of Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

[Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 299\(5\):R1306-1316. 2010.](#)

INTRODUCCIÓN

La capacidad del surfactante pulmonar para oponerse a las fuerzas de tensión superficial se evidencia en la interfase aire-líquido, independientemente de la anatomía precisa del pulmón (Adams et al. 1970, Ikegami y Jobe 1983). Sin embargo, la composición molecular del surfactante parece variar en función de las diferencias en la fisiología, la anatomía y el desarrollo pulmonar (Bernhard et al. 2001a y 2007, Ridsdale 2005).

En la mayoría de los análisis composicionales del surfactante se identifican altas concentraciones de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) que se reconoce como el principal componente capaz de disminuir la tensión superficial. Sin embargo, recientes estudios lipídicos han revelado la importante contribución de otras especies de fosfatidilcolina, como son la palmitoilmiristoilfosfatidilcolina (16:0/14:0, PMPC) y la palmitoilpalmitoleoilfosfatidilcolina (16:0/16:1, PPPC). Estos componentes aparecen en una proporción importante en el espacio alveolar, pudiendo suponer hasta el 15 y 28%, respectivamente, del surfactante de ciertas especies y en contraste con la DPPC se encuentran en estado fluido a 37 °C (Bernhard et al. 2001b y 2007, Lang et al. 2005).

En los humanos el contenido de PMPC aumenta desde la alveolarización intrauterina, mientras que en la rata este aumento ocurre durante la alveolarización postnatal. Además, es relevante que la concentración de PMPC en el surfactante de los neonatos correlaciona mejor que la de DPPC con la madurez pulmonar (Bernhard et al. 2001b y 2007).

Se ha demostrado que los lípidos de las lipoproteínas plasmáticas pueden estimular la formación de surfactante en ratas (Ryan et al. 2002), por tanto podría decirse que los cambios composicionales de PC que ocurren en el surfactante dependen del aporte exógeno de lípidos. Los neumocitos tipo II tienen la capacidad de sintetizar surfactante obteniendo los sustratos necesarios para tal fin de 3 maneras diferentes: 1) tienen la capacidad de adquirir los sustratos colina, fosfato y glucosa de la circulación; 2) son capaces de sintetizar ácidos grasos y glicéridos a partir de la glucosa y glucógeno almacenado (Rooney et al. 1986) y 3) reciben el aporte de ácidos grasos de los triglicéridos almacenados en las células intersticiales del pulmón así como también de las lipoproteínas y ácidos grasos libres del torrente sanguíneo (McGowan et al. 1987, Ryan et al. 2002, Tordet et al. 1981). Durante la maduración del pulmón, la concentración de PMPC aumenta en el surfactante a expensas de DPPC, mientras que cuando se pasa de la lactancia a una dieta basada en carbohidratos las proporciones de PMPC disminuyen mientras los de DPPC aumentan hasta alcanzar los valores de un adulto (Ridsdale et al. 2005).

Como la leche de rata es rica en ácidos grasos de cadena corta (conteniendo menos de 16 carbonos), específicamente en ácido láurico y mirístico (Bernhard et al. 2001b y 2007, Skottová et al. 1977) el aporte exógeno de ácidos grasos podría influenciar el perfil molecular de la PC del surfactante pulmonar. Para demostrar que los cambios en las especies moleculares de la PC del surfactante pulmonar pueden regularse con la dieta se llevaron a cabo experimentos en los cuales se alimentó a un cierto número de ratas (entre los días 19 y 26) con una dieta

suplementada con triglicéridos monoespecíficos: con un 2% (p/v) de Trimiristina (C14:0₃) ó un 2% (p/v) de Trioleína (C18:1₃).

Mediante cromatografía de gases y HPLC se estudió el cambio en el perfil de la PC pulmonar, evaluando la composición en triglicéridos y ácidos grasos del tejido pulmonar y en plasma.

COMPOSICION DE PC SEGUN DIETA SUMINISTRADA			
DIETA TRIOLEINA			
16:0/16:0	16:0/14:0	14:0/14:0	16:0/16:1
48%	11,5%	0,2%	22,9%
DIETA TRIMIRISTINA			
16:0/16:0	16:0/14:0	14:0/14:0	16:0/16:1
28,8%	44,6%	7%	12,8%

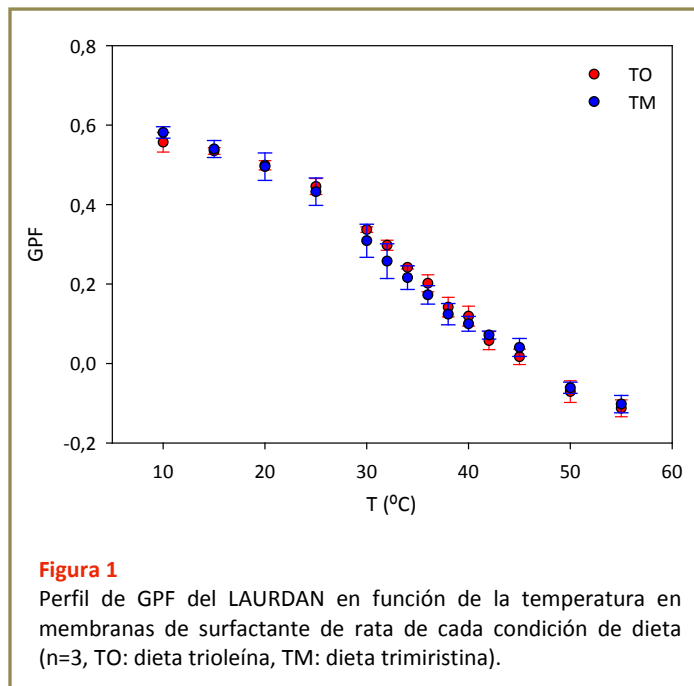
Los resultados obtenidos por el grupo del Dr. Bernhard sugieren que el enriquecimiento de la PC en ácido mirístico (C14:0) está asociado a su incremento en pulmón, ya sea directamente o por elongación de C12:0. El aporte elevado de C14:0 induce la formación de DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina) y eleva la proporción de PMPC o de su isómero MPPC (miristoilpalmitoilfosfatidilcolina). Hay que destacar que este aumento de PMPC a expensas de DPPC no produce ningún efecto sobre el crecimiento del animal, su respiración o la función *In Vitro* de su surfactante (Pynn et al. 2010).

RESULTADOS

1. FLUORESCENCIA

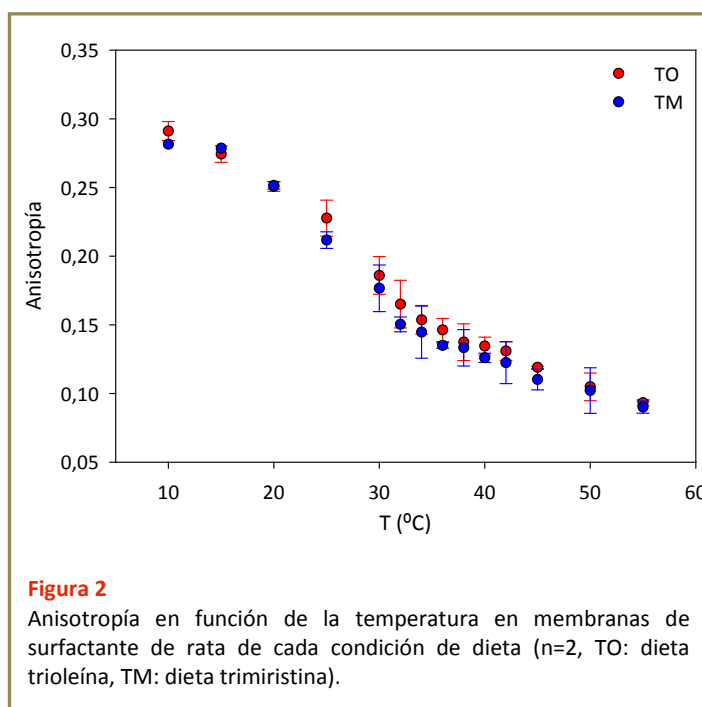
1.1. LAURDAN

En la **Figura 1** se resumen los perfiles termotrópicos de las muestras de surfactante obtenidas de ratas sometidas a una u otra dieta. Las membranas de surfactante presentan en ambos casos, una marcada y amplia transición desde estados ordenados a fases más desordenadas. Esta transición ocurre con un aparente punto de inflexión alrededor de los 34 °C, no observándose diferencias significativas al comparar ambas muestras a todas las temperaturas estudiadas.



1.2. DPH

La Figura 2 resume los perfiles termotrópicos del surfactante obtenido de animales alimentados con ambas dietas. Es posible determinar un rango de temperatura entre los 30 y 40 °C donde se lleva a cabo la transición de fase. Las membranas de surfactante de ambas dietas presentan una marcada y amplia transición, tal y como se observaba en los perfiles termotrópicos del LAURDAN. La transición definida por el cambio de anisotropía del DPH ocurre con un punto de inflexión alrededor de los 30 °C, y no se observan diferencias significativas entre ambas muestras a todas las temperaturas estudiadas



2. ESTUDIOS FUNCIONALES

Estos experimentos se realizaron con surfactante nativo de rata extraído de animales individuales. Se emplearon concentraciones entre 7 y 11 mg/ml que corresponden a las obtenidas por concentración del material extraído de cada animal (resuspensión del precipitado de surfactante, una vez valorada la concentración fosfolipídica, en el mínimo volumen posible de solución salina).

Con el objetivo de comparar el surfactante de las ratas que fue modificado por las dos dietas propuestas, se estudió el comportamiento de la película tensioactiva de surfactante y su estabilidad realizando dos tipos de experimentos:

+ *Estudios funcionales a 37, 39 y 41 °C.*

+ *Estudios de relajación por aumento de la temperatura, una vez completado el protocolo de ensayo funcional a temperatura fisiológica y habiendo comprimido la burbuja a la mínima tensión superficial posible previa al colapso.*

En la **Figura 3** se muestran las cinéticas de formación de la película interfacial de surfactante a diferentes temperaturas de subfase. En todos los casos un exceso de material (2-5 nmoles) fue inyectado para asegurar el equilibrio y exceso de material en la interfase.

Durante la adsorción inicial, a todas las temperaturas de subfase, todas las muestras alcanzaron una tensión superficial en torno a los 20-21 mN/m en menos de un minuto. Transcurridos 5 minutos de la adsorción inicial y formación de la película tensioactiva se procede a expandir rápidamente la burbuja y monitorizar el cambio en la tensión superficial como resultado de la incorporación de material surfactante adicional desde los reservorios asociados de la subfase (Schürch et al. 1998). Como ocurre con la adsorción inicial, el surfactante se adsorbe rápidamente y disminuye la tensión superficial a valores de equilibrio en torno a los 21-22 mN/m al cabo de 20 segundos. Para evaluar la posible existencia de diferencias significativas entre el surfactante ensayado a diferentes temperaturas se realizó un análisis de varianza (One Way ANOVA) y no se encontraron diferencias significativas, ya sea para las muestras procedentes de los animales alimentados con la dieta de trioleína como los alimentados con trimiristina.

Cuando se comprimen las películas de uno y otro material de manera quasi-estática (ver **Figura 4**) se alcanzan tensiones superficiales no menores de 18-20 mN/m aún reduciendo el área hasta un 70%.

Sin embargo, al observar las isotermas de compresión/expansión en condiciones dinámicas a las diferentes temperaturas de subfase (ver **Figura 4**) puede comprobarse cómo ahora sí ambos surfactantes son capaces de producir tensiones superficiales mínimas a temperatura fisiológica (37 °C).

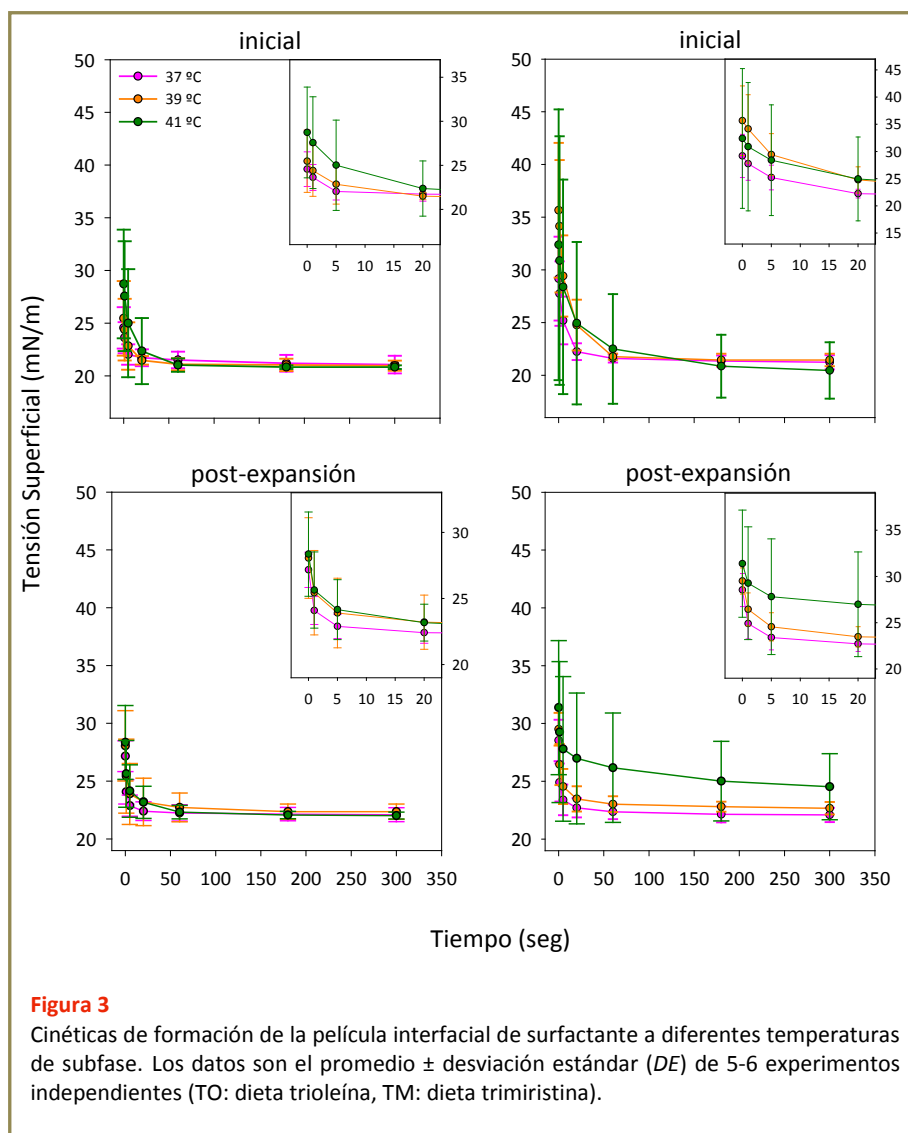


Figura 3

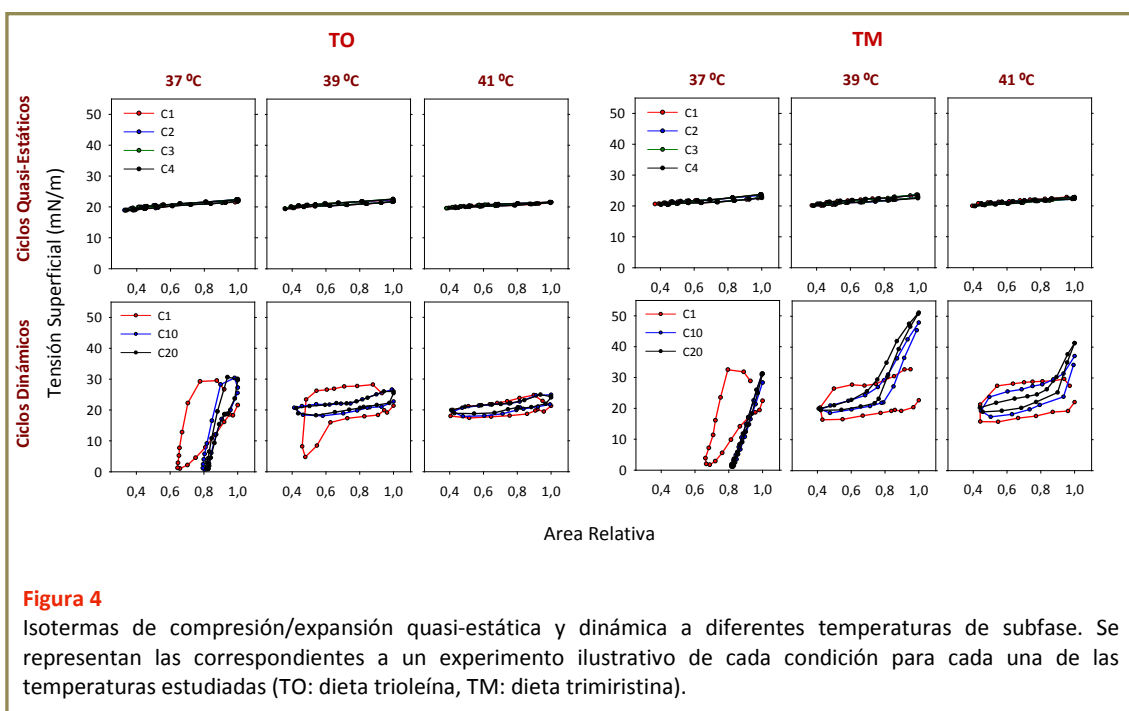
Cinéticas de formación de la película interfacial de surfactante a diferentes temperaturas de subfase. Los datos son el promedio \pm desviación estándar (DE) de 5-6 experimentos independientes (TO: dieta trioleína, TM: dieta trimiristina).

A esta temperatura, el surfactante de las ratas sometidas a la **dieta con trioleína** fue capaz de alcanzar tensiones mínimas en torno a 1 mN/m con cambios de área del 18-20%, y máximas tensiones que no superan los 35 mN/m con una leve histéresis. Es sorprendente que en el primer ciclo a 39 °C se produce una disminución de la tensión a valores en torno a 5 mN/m pero sin embargo esta capacidad se pierde en los ciclos sucesivos y es necesario reducir el área más allá de un 50% para lograrlo. A 41 °C no es posible disminuir la tensión superficial más allá de los 18 mN/m.

El surfactante de los animales sometidos a la **dieta con trimiristina**, alcanzó a temperatura fisiológica tensiones mínimas en torno a 1 mN/m con cambios de área del 18-20%, con tensiones máximas que no superan los 35 mN/m y nula histéresis. Este surfactante no logra disminuir la tensión a valores menores a 18 mN/m cuando se comprime a 39 ó 41 °C.

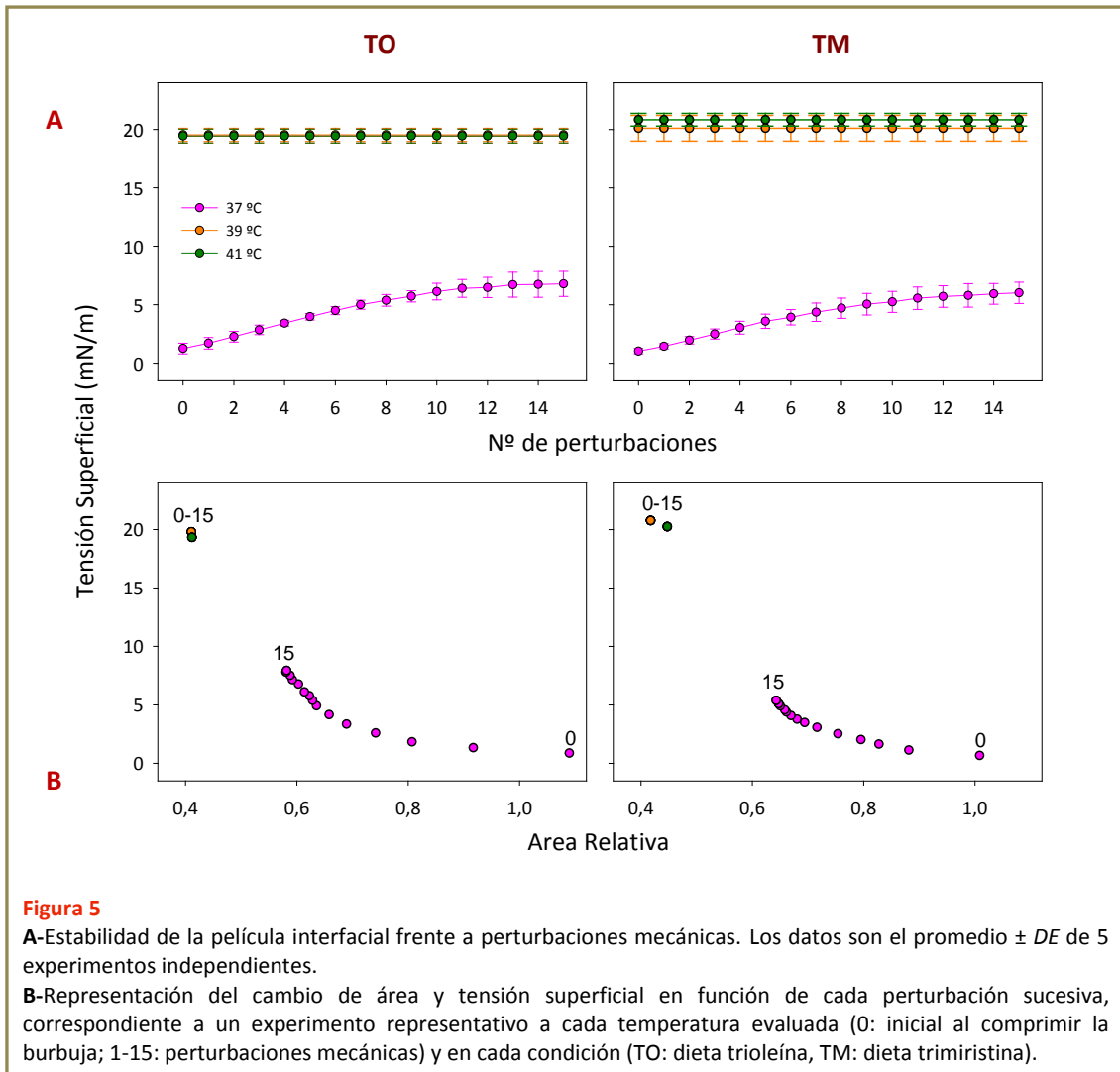
En la **Figura 5** se resumen los resultados del cambio en la tensión superficial y el área como resultado de perturbaciones sucesivas de las películas interfaciales con un martillo de tipo péndulo. Una vez finalizados los ciclos dinámicos y con la película comprimida hasta la mínima

tensión superficial previa al colapso se realizan golpes sucesivos con el martillo, registrándose la tensión tras cada perturbación.



Se puede ver cómo a temperatura fisiológica se alcanzan mínimas tensiones <2 mN/m y cómo con las sucesivas perturbaciones aumenta el área relativa con un relativamente reducido aumento en la tensión superficial. A cabo de 10-12 perturbaciones, se alcanza un plateau donde la tensión prácticamente no varía con sucesivas perturbaciones adicionales. Dicho plateau se halla entre los 5 y 8 mN/m para las muestras analizadas de ambas dietas. Asimismo, el cambio de área observado está en torno a un 45-50% (datos correspondientes a 6-8 experimentos para cada dieta, sólo se muestra el comportamiento de un experimento representativo por razones de simplicidad). Por el contrario, a mayor temperatura la película interfacial es completamente inestable y se encuentra en un estado totalmente relajado. Por más que se intenta comprimir la burbuja no se reduce la tensión superficial, observándose valores en torno a 19-20 mN/m. El área de la burbuja es mayor y las sucesivas perturbaciones no producen mayores cambios en la tensión superficial.

En oro tipo de estudios se formaron y comprimieron las películas interfaciales a temperatura fisiológica, para posteriormente elevar la temperatura y registrar la posible relajación de la película tensioactiva. Transcurridos 15 minutos después de que se alcanza la temperatura objeto de estudio se realiza el test de perturbación mecánica. El material se inyectó en exceso (2-4 nmoles) a una temperatura de subfase de 37 °C y se evaluó la relajación y estabilidad de las películas a 37 y 45 °C.

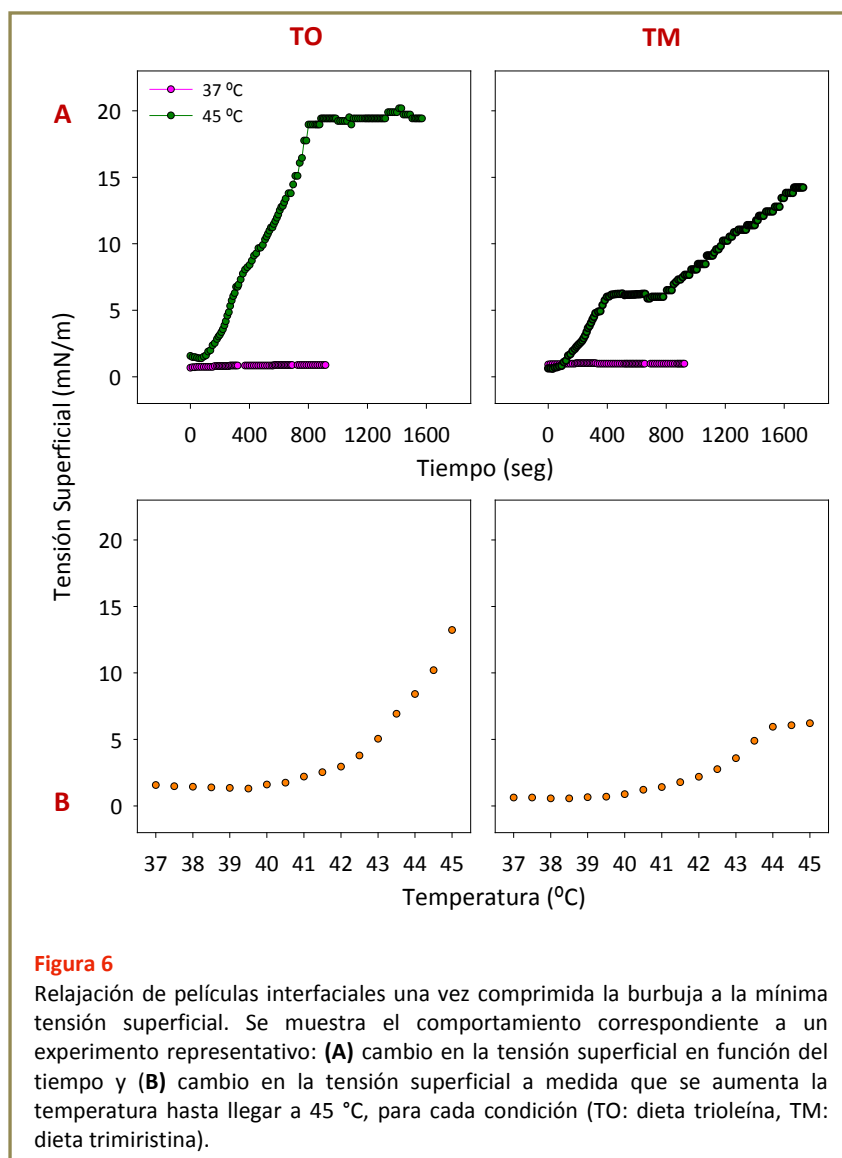


En la **Figura 6** se muestra la relajación de la película tensioactiva como consecuencia del aumento de la temperatura. El aumento de la tensión superficial es el resultado de la pérdida de la capacidad de estas películas para mantener mínimas tensiones superficiales una vez que aumenta la temperatura de subfase. En la figura puede observarse la variación de la tensión superficial durante el tiempo que demora el equipo en aumentar la temperatura y a lo largo de los 15 minutos de espera antes de realizar las perturbaciones mecánicas.

A temperatura fisiológica la relajación de la película interfacial en función del tiempo es mínima (aumento en la tensión superficial correspondiente a 1-2 mN/m al cabo del tiempo de espera). Sin embargo, cuanto mayor es la temperatura, menor es la capacidad que posee la película tensioactiva para mantener bajas tensiones superficiales. Este comportamiento se observa en las películas formadas por el surfactante obtenido de animales alimentados por ambas dietas pero es muy llamativa la existencia de un plateau a diferentes valores de tensión superficial para cada uno de los dos tipos de películas estudiadas. Para las muestras de la dieta TO se observa un aumento muy abrupto, cuasi-exponencial, de la tensión superficial hasta alcanzar un plateau alrededor de los 19-20 mN/m. Por el contrario, para las muestras de la dieta TM se observa al inicio un aumento en la tensión superficial que se detiene entre los 5 y 8 mN/m. Este plateau comienza cuando se alcanza una temperatura de 44 °C y continúa por un

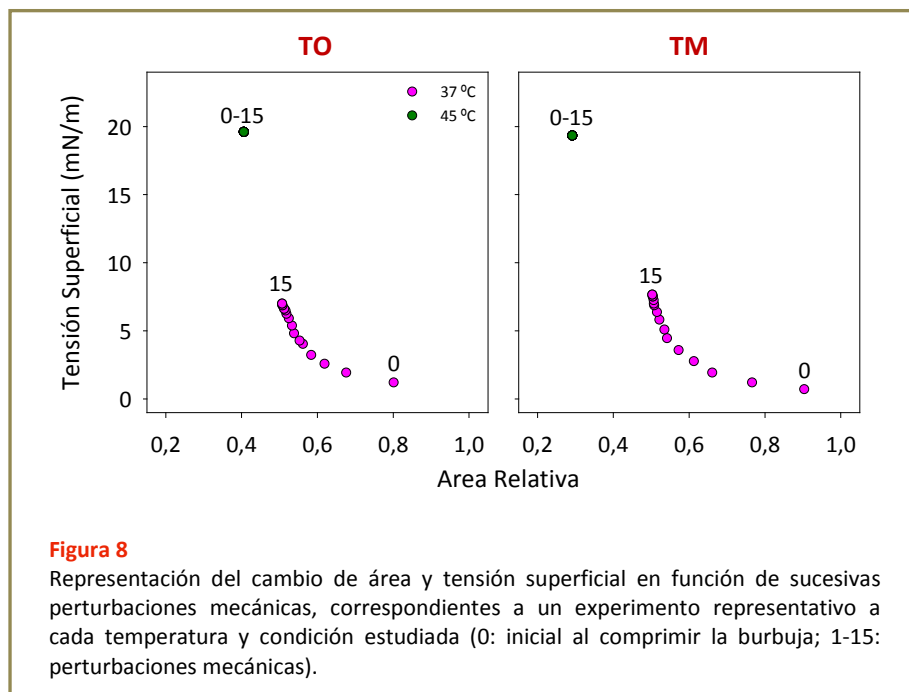
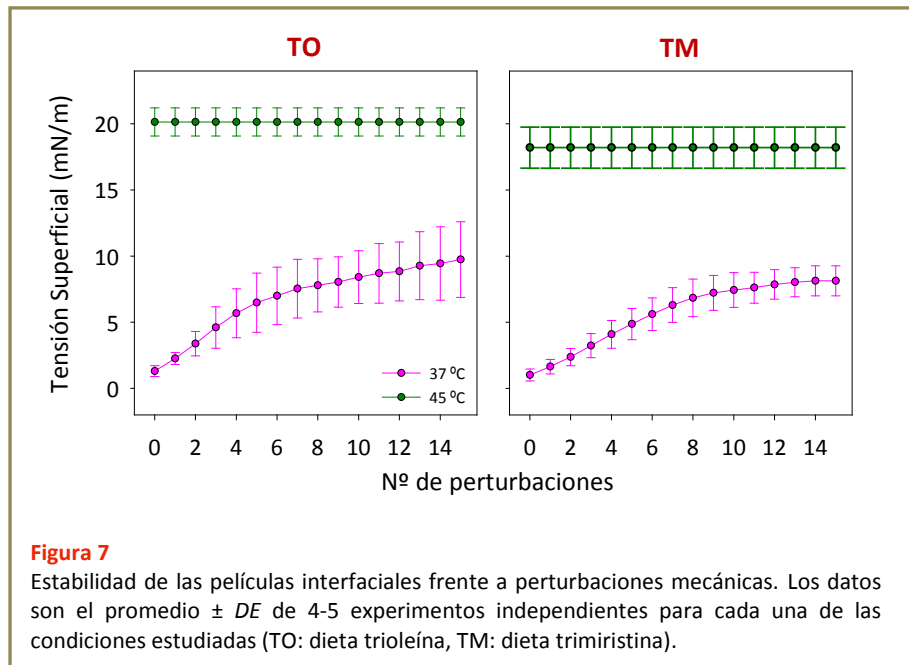
lapso de tiempo una vez alcanzados los 45 °C para luego observarse un nuevo incremento abrupto de la tensión superficial hasta alcanzar valores en torno a los 15-19 mN/m. Este comportamiento fue similar en todas las repeticiones que se realizaron con cada tipo de muestra.

Una vez transcurridos 15 minutos tras alcanzar la temperatura de estudio deseada se procedió a evaluar la estabilidad de la película de surfactante en el estado en que se encuentra, sin comprimir de nuevo la burbuja.



En la **Figura 7** se representan los resultados del cambio en la tensión superficial como resultado de las sucesivas perturbaciones. Los comportamientos son marcadamente diferentes dependiendo de la temperatura estudiada. Tanto para los materiales procedentes de la dieta TO como los de la dieta TM, producen películas en las que se observa un aumento progresivo de la tensión superficial con sucesivas perturbaciones introducidas a 37 °C, alcanzándose valores máximos de tensión superficial en torno a los 10 mN/m. Sin embargo, a 45 °C el

comportamiento es completamente diferente; la película se encuentra ya totalmente relajada y su estructura lateral es tal que no puede mantener bajas tensiones superficiales (valores en torno a los 19-20 mN/m) de forma que la tensión no sufre ya variación con las sucesivas perturbaciones.



Cuando se evalúa el aumento en la tensión superficial en función de la variación del área (ver Figura 8), se puede ver que las películas formadas por materiales de ambas dietas tienen un comportamiento similar a 37 °C, con un aumento neto de la tensión superficial comparable, alcanzándose valores finales en torno a los 7 mN/m. Sin embargo, cuando se aumenta la

temperatura hasta 45 °C las películas interfaciales se relajan totalmente hasta alcanzar valores en torno a los 19 mN/m siendo el área de la burbuja mayor. Estas películas no son capaces de mantener bajas tensiones superficiales y como se encuentran en un estado totalmente relajado no se observan cambios en la tensión superficial como resultado de sucesivas perturbaciones mecánicas.

DISCUSIÓN

A temperatura fisiológica, la funcionalidad del surfactante pulmonar con menor contenido en DPPC, ensayado *In Vitro*, no fue diferente de la observada para un surfactante con elevado contenido de este fosfolípido, ya sea durante la adsorción inicial o después de la expansión. Ambos surfactantes alcanzan tensiones de equilibrio en torno a los 20-21 mN/m en un lapso menor de 20 segundos. Además, alcanzan mínimas tensiones superficiales con valores por debajo de los 5 mN/m cuando se someten a compresión. Bajo condiciones quasi-estáticas no se observaron diferencias entre ambos surfactantes, ya que no se alcanzaron tensiones mínimas mucho menores a las de equilibrio. Sin embargo, durante los ciclos de compresión/expansión dinámica, las películas de ambos surfactantes fueron capaces de disminuir la tensión superficial hasta alcanzar valores mínimos en torno a 1 mN/m. La única diferencia que se observó es que el surfactante obtenido de animales alimentados con la dieta TO presentó una leve histéresis, frente a la nula o casi nula del surfactante de animales alimentados con la dieta TM. En ambos casos, sólo fue necesaria una compresión del 18-20% para lograr mínimos valores de tensión superficial (Fig. 4).

A temperaturas mayores que la fisiológica ambos surfactantes perdieron la capacidad de disminuir la tensión superficial, alcanzando valores mínimos en torno a 20 mN/m. Sin embargo, se observa una diferencia en la capacidad para mantener máximas tensiones relativamente bajas. El surfactante de la dieta TO es capaz de mantener tensiones superficiales máximas que no superan los 30 mN/m, mientras que el de la dieta TM produce valores máximos que con frecuencia son superan los 40 mN/m.

Es importante destacar que las temperaturas de transición de fase de PC14:0/14:0, PC16:0/14:0 y PC14:0/16:0 se encuentran todas por debajo de la temperatura fisiológica, siendo respectivamente de: 23 °C, 27 °C y 35 °C, a diferencia de la PC16:0/16:0, cuya temperatura de transición es de 41,5 °C (Huang 2001). Esto supone que a temperatura fisiológica la viscosidad de las películas del surfactante enriquecido en PC16:0/14:0 y PC14:0/16:0 sería menor, lo que facilitaría su relajación y un incremento rápido de la tensión superficial durante la expansión. Las diferencias observadas cuando las películas interfaciales son expuestas a elevadas temperaturas pueden deberse probablemente a diferencias estructurales. Es posible que las películas más ricas en DPPC presenten una marcada coexistencia de fases ordenadas/desordenadas a temperatura fisiológica, tal y como ha sido descrito para el surfactante nativo (Bernardino de la Serna et al. 2004 y 2009). La desorganización de los dominios ordenados cuando las películas se calientan por encima de la

temperatura fisiológica puede suponer una fuente adicional de inestabilidad. Sin embargo, es probable que la estructura de las películas ricas en fosfolípidos miristoilados sea mucho más homogénea, o presente dominios mucho más pequeños y dinámicos, lo cual puede tener un impacto diferente en la estabilidad interfacial ante oscilaciones térmicas.

La caracterización de la estructura lateral de estas diferentes películas mediante técnicas como la microscopía de fluorescencia ó el AFM puede aportar datos sobre el diferente efecto de la temperatura y su impacto sobre la estabilidad interfacial.

En cualquier caso, resulta sorprendente que un surfactante significativamente menos rico en DPPC puede mantener un comportamiento funcional a temperatura fisiológica. Esto puede ser relevante en el diseño de surfactantes terapéuticos. La sustitución de una fracción de la DPPC por PC's miristoiladas podría reducir significativamente la viscosidad de las suspensiones lipoproteicas que se utilizan en el tratamiento de deficiencias en surfactante (Rüdiger et al. 2005), sin comprometer su funcionalidad. Esto facilitaría la administración terapéutica, cuyo mayor problema está asociado con complicaciones derivadas de la obstrucción ventilatoria transitoria originada por la introducción endotraqueal del bolo de surfactante exógeno.

DISCUSIÓN GENERAL.

El surfactante pulmonar es una mezcla compleja de lípidos y proteínas que tiene como función primordial facilitar el intercambio gaseoso, reduciendo la tensión superficial en la interfase aire-líquido del alvéolo para evitar el colapso de las cavidades respiratorias durante la espiración.

La composición del surfactante pulmonar está bastante conservada en los mamíferos. Sin embargo, dentro de una misma especie animal, esta composición puede variar o ser influenciada por el desarrollo, enfermedades, la frecuencia respiratoria y/o la temperatura corporal. No existe una sola composición lipídica que funcione de manera óptima en todos los mamíferos, sino que el surfactante de cada animal es único y apropiado para la función según la biología del animal.

Hemos visto que este sistema surfactante es capaz de mantener su funcionalidad frente a diversas necesidades fisiológicas como así también frente a ciertos condicionantes ambientales. Cabe recordar que a lo largo de esta Tesis hemos analizado la funcionalidad del surfactante frente a:

+ fluctuaciones térmicas: el surfactante porcino es funcional a temperatura fisiológica e incluso a temperaturas mayores (por debajo de los 41 °C), lo cual parece importante para que no se vea afectado el proceso respiratorio durante, por ejemplo, los períodos de hipertermia (fiebre). En algunos de los animales heterotermos estudiados, el surfactante es funcional tanto a la temperatura de actividad como de letargo (reducida actividad metabólica) de los animales. Es interesante el hecho de que el surfactante extraído de los animales activos es también funcional a la temperatura corporal de los animales en estado de letargo, indicando que el surfactante posee una composición tal que le permite adaptarse a la situación de rápida entrada en letargo, como ocurre en el caso de los Dunnarts.

En otros animales en los que la escala temporal en la que se produce el cambio de temperatura fisiológica es mucho más larga, como ocurre en las ardillas, los animales han optimizado un surfactante “de verano” y otro “de invierno” con propiedades interfaciales óptimas para cada contexto ambiental.

+ cambios en la composición fosfolipídica inducida por la dieta: en el caso que hemos estudiado en esta Tesis, el surfactante de las dos condiciones de dieta parece ser funcional en un rango muy estrecho de temperatura fisiológica; por encima de esta temperatura se pierde toda la actividad surfactante. El ejemplo de ratas sometidas a dietas ricas en oleico o mirístico ilustra la plasticidad del sistema surfactante y su adaptabilidad a condicionamientos ambientales diversos. Esta adaptabilidad podría hacerse a costa de perder flexibilidad frente a entornos ambientales cambiantes. En cualquier caso, los ejemplos analizados abren nuevas posibilidades a la exploración de sistemas surfactantes terapéuticos alternativos que podrían tener ciertas ventajas en cuanto a su facilidad de administración o su estabilidad.

+ cambios en la composición proteica: en el caso de los animales modificados genéticamente el surfactante deja de ser funcional a temperaturas elevadas. Sin embargo, el de los animales control es funcional en un rango mucho más amplio de temperatura, incluyendo estados de

hipertermia. Ello supondría en ejemplo más de que la composición y estructura del surfactante podría estar optimizada no sólo para desarrollar su actividad biofísica en condiciones óptimas, sino también para adaptarse a una cierta variabilidad ambiental. La alteración de la composición lipídica y/o proteica óptima podría suponer una pérdida de flexibilidad que podría manifestarse particularmente en condiciones de estrés (hipertermia, alta demanda mecánica, inflamación y reducida distensibilidad pulmonar, etc), lo que contribuiría al agravamiento de la patología.

La respuesta de los diferentes materiales estudiados a la hipertermia puede tener una particular relevancia.

Cuando se forma la película tensioactiva a temperatura fisiológica y se evalúa la funcionalidad del surfactante pulmonar porcino cuando se alcanzan mayores temperaturas de subfase, se simula una situación análoga a lo que ocurre *In Vivo* en procesos de piresis. Es relevante el hecho de que este aumento de temperatura no interfiere en la capacidad del surfactante para mantener una baja tensión superficial.

En el caso de los animales heterotermos, vemos que cuando el animal entra en letargo el surfactante sufre pequeñas pero rápidas modificaciones composicionales que le permiten mantener el surfactante en un estado funcional en un amplio rango de temperatura.

Puede destacarse que en la mayor parte de los ejemplos estudiados, y aunque el surfactante puede mantener una aceptable capacidad tensioactiva a temperaturas por encima de las fisiológicas, aparece un umbral crítico en torno a los 41°C. Esta temperatura coincide con la temperatura a la que se produce el cambio de fase en la DPPC pura. Ello sugiere que la funcionalidad del surfactante podría estar estrechamente ligada a la existencia de estructuras organizadas prácticamente por DPPC que segregaría en una escala espacial que podría abarcar desde lo nano- a lo meso- o microscópico, posiblemente en función de composiciones fosfolipídicas específicas o estados ambientales variables. La desaparición de los núcleos de DPPC pura, por ejemplo a $T > 41$ °C, estaría indefectiblemente ligada a la incapacidad de las películas de surfactante para producir tensiones superficiales suficientemente bajas.

Este concepto recapitula los modelos más sencillos, propuestos hace décadas, sobre la estructura del surfactante, cuando se pensaba que estaba constituido por poco más que una monocapa de DPPC.

Numerosos estudios han mostrado después la complejidad real de las películas de surfactante, incluyendo segregación composicional en el plano de membranas y monocapas, y complejidad tridimensional de estructuras en multicapas interconectadas probablemente por las proteínas. Queda por determinar cómo se integra en esa compleja estructura la existencia de dominios o clústers de DPPC y cómo están éstos relacionados con el comportamiento del sistema en su conjunto cuando se somete a la exigente demanda de la mecánica respiratoria.

CONCLUSIONES.

- 1- En monocapas de DPPC existe una fuerte correlación entre los valores calculados de GPF del LAURDAN y la presión superficial, que demuestra la sensibilidad de esta sonda frente al empaquetamiento lipídico.
- 2- La máxima compresión de películas de surfactante conduce a la formación de estructuras altamente empaquetadas enriquecidas en DPPC, puesto que el nivel de hidratación del LAURDAN en películas interfaciales de surfactante se asemeja al entorno de la sonda en películas de DPPC.
- 3- A 25 °C el entorno del LAURDAN en películas comprimidas de surfactante es similar al que encuentra en películas de DPPC en términos de empaquetamiento y deshidratación.
- 4- A 37 °C las películas de surfactante están menos condensadas y deshidratadas que las de DPPC pura.
- 5- La fluorescencia del LAURDAN está estrictamente definida por el empaquetamiento lipídico, independientemente de la composición lipídica particular de las películas y de posibles diferencias en términos de la organización lateral.
- 6- Ciertas proporciones de colesterol ayudan a alcanzar estados altamente condensados y deshidratados en películas complejas como las formadas por surfactante nativo entero, particularmente en condiciones de temperatura fisiológica, como lo demuestran los valores más altos de GPF obtenidos por compresión de películas conteniendo colesterol a 37 °C.
- 7- La formación de las películas de surfactante puede ser cuantificada y monitorizada en diversas muestras siguiendo el incremento progresivo de GPF del LAURDAN en la interfase.
- 8- Las proteínas en las mezclas naturales están formando complejos con los lípidos que afectan al ordenamiento de los mismos, haciendo que sea necesario aportar menos energía en forma de calor para pasar a un estado más desorganizado.
- 9- En balanzas de superficie, a medida que aumenta la temperatura la capacidad de adsorción interfacial del surfactante es mayor, pero por encima de los 40 °C la funcionalidad del surfactante decae.
- 10- La composición lipo-proteica del surfactante pulmonar porcino está optimizada para mantener la capacidad de reducir la tensión superficial a valores cercanos a 1 mN/m incluso a temperaturas mayores que la fisiológica y hasta los 41 °C.
- 11- La composición fosfolipídica del surfactante de los animales heterotermos está "optimizada" de forma tal que pueda garantizar la funcionalidad del material en un amplio rango de temperatura, apropiada para los estados de actividad y letargo.
- 12- La adaptación composicional y estructural a un amplio perfil térmico, como en el caso de los animales heterotermos, se hace a costa de perder máxima eficiencia tensioactiva.
- 13- La presencia de las proteínas SP-B y SP-C en el surfactante es crucial para mantener la capacidad de reducir la tensión superficial de manera óptima y rápida.

- 14- A temperaturas por encima de los 34 °C el surfactante de los ratones deficientes en SP-C pierde la capacidad de reducir la tensión superficial a valores cercanos a 1-2 mN/m.
- 15- Un surfactante significativamente menos rico en DPPC puede mantener un comportamiento funcional a temperatura fisiológica.
- 16- Las películas de surfactante obtenido de los animales alimentados con dietas ricas en trioleína o en trimiristina son incapaces de disminuir la tensión superficial hasta alcanzar valores mínimos en torno a 1 mN/m a temperaturas mayores que la fisiológica.

BIBLIOGRAFÍA.

- Acosta E.J., Gitiafroz R., Zuo Y.Y., Policova Z., Cox P.N., Hair M.L. and Neumann A.W. 2007. "Effect of humidity on lung surfactant films subjected to dynamic compression/expansion cycles." *Respir Physiol Neurobiol* 155:255-267.
- Adams F.H., Fujiwara T., Emmanouilides G.C. and R ih  N. 1970. "Lung phospholipids of human fetuses and infants with and without hyaline membrane disease." *J Pediatr* 77:833-841.
- Adamson A. W. and Gast A. P. 1997. "Physical chemistry of surfaces." Willey-Interscience, New York.
- Allain C. C., Poon L. S., Chan C. S., Richmond W. and Fu P. C. 1974. "Enzymatic determination of total serum cholesterol." *Clin Chem* 20:470-475.
- Alml n A., Stichtenoth G., Linderholm B., Haegerstrand-Björkman M., Robertson B., Johansson J. and Curstedt T. 2008. "Surfactant proteins B and C are both necessary for alveolar stability at end expiration in premature rabbits with respiratory distress syndrome." *J Appl Physiol.* 104:1101-8.
- Amrein M., von Nahmen A. and Sieber M. 1997. "A scanning force- and fluorescence light microscopy study of the structure and function of a model pulmonary surfactant." *Eur Biophys J* 26:349-357.
- Arrais D. and Martins J. 2007. "Bilayer polarity and its thermal dependency in the l(o) and l(d) phases of binary phosphatidylcholine/cholesterol mixtures." *Biochim Biophys Acta* 1768:2914-2922.
- Augusto L.A., Li J., Synguelakis M., Johansson J. and Chaby R. 2002. "Structural basis for interactions between lung surfactant protein C and bacterial lipopolysaccharide." *J Biol Chem* 277:23484-23492.
- Augusto L.A., Synguelakis M., Johansson J., Pedron T., Girard R. and Chaby R. 2003. "Interaction of pulmonary surfactant protein C with CD14 and lipopolysaccharide." *Infect Immun* 71:61-67.
- Baatz J. E., Elledge B. and Whitsett J. A. 1990. "Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers." *Biochemistry* 29:6714-6720.
- Bachofen H., Gerber U., Gehr P., Amrein M. and Schürch S. 2005. "Structures of pulmonary surfactant films adsorbed to an air-liquid interface in vitro." *Biochim Biophys Acta* 1720:59-72.
- Bagatolli L. A. 2006 . "To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy." *Biochim Biophys Acta* 1758:1541-1556.
- Bagatolli L.A. 2003. "Direct observation of lipid domains in free standing bilayers: from simple to complex lipid mixtures." *Chem Phys Lipids* 122:137-145.
- Bagatolli L.A and Gratton E. 2001. "Direct observation of lipid domains in free-standing bilayers using two-photon excitation fluorescence microscopy." *J. Fluorescence* 11: 141-160.

- Bagatolli L.A., Parasassi T., Fidelio G.D. and Gratton E. 1999. "A model for the interaction of 6-lauroyl-2-(N,N-dimethylamino)naphthalene with lipid environments: implications for spectral properties." *Photochem Photobiol* 70:557-564.
- Baritussio A.G., Magoon M.W., Goerke J. and Clements J.A. 1981. "Precursor-product relationship between rabbit type II cell lamellar bodies and alveolar surface-active material. Surfactant turnover time." *Biochim Biophys Acta* 666:382-393.
- Barlic A., Gutierrez-Aguirre I., Caaveiro J.M., Cruz A., Ruiz-Arguello M.B., Pérez-Gil J. and Gonzalez-Manas J.M. 2004. "Lipid phase coexistence favors membrane insertion of equinatoxin-II, a pore-forming toxin from *Actinia equina*." *J Biol Chem* 279:34209-34216.
- Baumgart F., Ospina O. L., Mingarro I., Rodríguez I. and Pérez-Gil J. 2010. "Palmitoylation of pulmonary surfactant protein SPC is critical for its functional cooperation with SPB to sustain compression/expansion dynamics in cholesterol-containing surfactant films." *Biophys J* 99:3234-43.
- Beers M.F. and Mulugeta S. 2005. "Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease." *Annu Rev Physiol* 67:663-696.
- Benson B.J., Hawgood S. and Williams M.C. 1984. "Role of apoprotein and calcium ions in surfactant function." *Exp Lung Res* 6:223-236.
- Bernardino de la Serna J., Orädd G., Bagatolli L.A., Simonsen A.C., Marsh D., Lindblom G., Pérez-Gil J. 2009. "Segregated phases in pulmonary surfactant membranes do not show coexistence of lipid populations with differentiated dynamic properties." *Biophys J* 97:1381-1389.
- Bernardino de la Serna J., Pérez-Gil J., Simonsen A.C. and Bagatolli L.A. 2004. "Cholesterol rules: direct observation of the coexistence of two phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures." *J Biol Chem* 279:40715-40722.
- Bernhard W., Schmiedl A., Koster G., Orgeig S., Acevedo C., Poets C.F. and Postle A.D. 2007. "Developmental changes in rat surfactant lipidomics in the context of species variability." *Pediatr Pulmonol* 42:794-804.
- Bernhard W., Gebert A., Vieten G., Rau G.A., Hohlfeld J.M., Postle A.D. and Freihorst J. 2001a. "Pulmonary surfactant in birds: coping with surface tension in a tubular lung." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R327-R337.
- Bernhard W., Hoffmann S., Dombrowsky H., Rau G.A., Kamlage A., Kappler M., Haitsma J.J., Freihorst J., von der Hardt H. and Poets C.F. 2001b. "Phosphatidylcholine molecular species in lung surfactant: composition in relation to respiratory rate and lung development." *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:725-731.
- Blanco O. and Pérez-Gil J. 2007. "Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat Respiratory Distress Syndrome: role of the different components in an efficient pulmonary surfactant." *Eur J Pharmacol* 568:1-15.

- Bligh E. G., Dyer W. J. 1959. "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can J Med Sci* **37**:911-917.
- Botas C., Poulain F., Akiyama J., Brown C., Allen L., Goerke J., Clements J., Carlson E., Gillespie A.M., Epstein C. and Hawgood S. 1998. "Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D." *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:11869-11874.
- Bourbon J.R. and Chailley-Heu B. 2001. "Surfactant proteins in the digestive tract, mesentery, and other organs: evolutionary significance." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **129**: 151-161.
- Brewer J., de la Serna J.B., Wagner K. and Bagatolli L.A. 2010. "Multiphoton excitation fluorescence microscopy in planar membrane systems." *Biochim Biophys Acta* **1798**:1791–1798.
- Brockman J.M., Wang Z., Notter R.H. and Dluhy R.A. 2003. "Effect of hydrophobic surfactant proteins SP-B and SP-C on binary phospholipid monolayers: II. Infrared external reflectance-absorption spectroscopy." *Biophys J* **84**:326-340.
- Brockman H. 1999. "Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions?" *Curr Opin Struct Biol* **9**:438-443.
- Bruhn H. 2005. "A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins." *Biochem J* **389**(Pt 2):249-257.
- Caaveiro J.M., Echabe I., Gutierrez-Aguirre I., Nieva J.L., Arrondo J.L. and Gonzalez-Manas J.M. 2001. "Differential interaction of equinatoxin II with model membranes in response to lipid composition." *Biophys J* **80**:1343-1353.
- Casals C. and García-Verdugo I., Eds. 2005. "Molecular and functional properties of surfactant protein A." In *Developments in Lung Surfactant Dysfunction in Lung Biology in Health and disease*. New York, Marcel Dekker.
- Cevc, G. 1987. "How membrane chain melting properties are regulated by the polar surface of the lipid bilayer." *Biochemistry* **26**:6305-6310.
- Chavarha M., Khoojinian H., Schulwitz L. E. Jr., Biswas S. C., Rananavare S. B. and Hall S. B. 2010. "Hydrophobic surfactant proteins induce a phosphatidylethanolamine to form cubic phases." *Biophys J* **98**:1549-57.
- Christopher J. Pynn, M. Victoria Picardi, Tim Nicholson, Dorothee Wistuba, Christian F. Poets, Erwin Schleicher, Jesús Pérez-Gil and Wolfgang Bernhard. 2010. "Myristate is selectively incorporated into surfactant and decreases dipalmitoylphosphatidylcholine without functional impairment." *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **299**:1306-1316.
- Clark J.C., Wert S.E., Bachurski C.J., Stahlman M.T., Stripp B.R., Weaver T.E. and Whitsett J.A. 1995. "Targeted disruption of the surfactant protein B gene disrupts surfactant homeostasis, causing respiratory failure in newborn mice." *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7794-7798.
- Clements J.A. 1977. "Functions of the alveolar lining." *Am Rev Respir Dis* **115**:67-71.

- Clements J. A., Hustead R. F., Johnson R. P. and Gribetz I. 1961. "Pulmonary surface tension and alveolar stability." *J Appl Physiol* **16**:444-450.
- Clements J.A., Brown E.S. and Johnson R. P. 1958. "Pulmonary surface tension and the mucus lining of the lungs: some theoretical considerations." *J Appl Physiol* **12**:262-268.
- Clements J. A. 1957. "Surface tension of lung extracts." *Proc Soc Exp Biol Med* **95**:170-172.
- Codd J. R., Schürch S., Daniels C. B. and Orgeig S. 2002. "Torpor-associated fluctuations in surfactant activity in Gould's wattled bat." *Biochim Biophys Acta* **1580**: 57-66
- Codd J.R., Slocombe N.C., Daniels C.B., Wood P.G. and Orgeig S. 2000. "Periodic fluctuations in the pulmonary surfactant system in Gould's wattled bat (*Chalinolobus gouldii*)." *Physiol Biochem Zool* **73**:605-612.
- Creuwels L. A., Boer E. H. and Haagsman H. P. 1995. "Neutralization of the positive charges of surfactant protein C. Effects on structure and function." *J. Biol. Chem.* **270**:16225–16229.
- Crouch E. and Wright J.R. 2001. "Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense." *Annu Rev Physiol* **63**: 521-554.
- Crouch E.C. 1998. "Structure, biologic properties, and expression of surfactant protein D (SP-D)." *Biochim Biophys Acta* **1408**:278-289.
- Cruz A. and Pérez-Gil J. 2007. "Langmuir films to determine lateral surface pressure on lipid segregation." *Methods Mol Biol* **400**:439-57.
- Cruz A., Schürch D., Picardi M.V., Vazquez L. and Pérez-Gil J. 2007. "Compression-driven segregation of micro- and nano-domains in pulmonary surfactant layers." *Biophys J Suppl.* **S**:423A.
- Cruz A., Vazquez L., Velez M. and Pérez-Gil J. 2005. "Influence of a fluorescent probe on the nanostructure of phospholipid membranes: dipalmitoylphosphatidylcholine interfacial monolayers." *Langmuir* **21**:5349-5355.
- Cruz A., Casals C., Plasencia I., Marsh D. and Pérez-Gil J. 1998. "Depth profiles of pulmonary surfactant protein B in phosphatidylcholine bilayers, studied by fluorescence and electron spin resonance spectroscopy." *Biochemistry* **37**:9488-9496.
- Cruz A., Casals C., Keough K. M. and Pérez-Gil J. 1997. "Different modes of interaction of pulmonary surfactant protein SP-B in phosphatidylcholine bilayers." *Biochem J* **327** :133-138.
- Curstedt T., Jornvall H., Robertson B., Bergman T. and Berggren P. 1987. "Two hydrophobic low-molecular-mass protein fractions of pulmonary surfactant. Characterization and biophysical activity." *Eur J Biochem* **168**:255-262.
- Daniels C.B. and Orgeig S. 2003. "Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing." *News Physiol Sci* **18**:151-157.
- Daniels C.B. and Orgeig S. 2001. "The comparative biology of pulmonary surfactant: past, present and future." *Comp Biochem Physiol* **129**:9-36.

- De Vequi-Suplicy C.C., Benatti C.R. and Lamy M.T. 2006. "Laurdan in fluid bilayers: position and structural sensitivity." *J Fluoresc* 16:431-439.
- Diemel R.V., Snel M.M., Waring A.J., Walther F.J., van Golde L.M., Putz G., Haagsman H.P. and Batenburg J.J. 2002. "Multilayer formation upon compression of surfactant monolayers depends on protein concentration as well as lipid composition. An atomic force microscopy study." *J Biol Chem* 277:21179-21188.
- Dietl P., Haller T., Mair N. and Frick M. 2001. "Mechanism of surfactant exocytosis in alveolar type II cells in vitro and in vivo." *News Physiol Sci* 16:238-243.
- Discher B.M., Schief W.R., Vogel V. and Hall S.B. 1999. "Phase separation in monolayers of pulmonary surfactant phospholipids at the air-water interface: composition and structure." *Biophys J* 77:2051-2061.
- Discher B.M., Maloney K.M., Schief W.R. Jr., Grainger D.W., Vogel V. and Hall S.B. 1996. "Lateral phase separation in interfacial films of pulmonary surfactant." *Biophys J* 71:2583-2590.
- Dluhy R.A., Reilly K.E., Hunt R.D., Mitchell M.L., Mautone A.J. and Mendelsohn R. 1989. "Infrared spectroscopic investigations of pulmonary surfactant. Surface film transitions at the air-water interface and bulk phase thermotropism." *Biophys J* 56:1173-1181.
- Filippov A., Oradd G. and Lindblom G. 2004. "Lipid lateral diffusion in ordered and disordered phases in raft mixtures." *Biophys J* 86:891-896.
- Finot E., Markey L., Hane F., Amrein M. and Leonenko Z. 2013. "Combined atomic force microscopy and spectroscopic ellipsometry applied to the analysis of lipid-protein thin films." *Colloids Surf B Biointerfaces*. 104:289-93.
- Fisher A. B. 2011. "Peroxiredoxin 6: A Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A(2) Activities." *Antioxid Redox Signal*.
- Follows D., Tiberg F., Thomas R.K. and Larsson M. 2007. "Multilayers at the surface of solutions of exogenous lung surfactant: direct observation by neutron reflection." *Biochim Biophys Acta* 1768:228-235.
- Ganter G.G., Jakob S.M. and Takala J. 2006. "Pulmonary capillary pressure. A review." *Minerva Anesthesiol* 72:21-36.
- García-Verdugo I., García de Paco E., Espinassous Q., Gonzalez-Horta A., Synguelakis M., Kanellopoulos J., Rivas L., Chaby R. and Pérez-Gil J. 2009. "Synthetic peptides representing the N-terminal segment of surfactant protein C modulate LPS-stimulated TNF- α production by macrophages." *Innate Immun* 15:53-62.
- Glasser S.W., Detmer E.A., Ikegami M., Na C.L., Stahlman M.T. and Whitsett J.A. 2003. "Pneumonitis and emphysema in SP-C gene targeted mice." *J Biol Chem* 278:14291-14298.

- Glasser S.W., Burhans M.S., Korfhagen T.R., Na C.L., Sly P.D., Ross G.F., Ikegami M. and Whitsett J.A. 2001. "Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:6366-6371.
- Glasser S.W., Korfhagen T.R., Bruno M.D., Dey C. and Whitsett J.A. 1990. "Structure and expression of the pulmonary surfactant protein SP-C gene in the mouse." *J. Biol. Chem.* **265**:21986–21991.
- Goerke J. 1998. "Pulmonary surfactant: functions and molecular composition." *Biochim Biophys Acta* **1408**:79-89.
- Gómez-Gil L., Schürch D., Goormaghtigh E. and Pérez-Gil J. 2009. "Pulmonary surfactant protein SP-C counteracts the deleterious effects of cholesterol on the activity of surfactant films under physiologically relevant compression-expansion dynamics." *Biophys J* **97**:2736-45.
- Gopal A. and Lee K. Y. C. 2001. "Morphology and collapse transitions in binary phospholipid monolayers." *J. Phys. Chem.* **105**:10348-10354.
- Gunasekara L., Schürch S., Schoel W. M., Nag K., Leonenko Z., Haufs M. and Amrein M. 2005. "Pulmonary surfactant function is abolished by an elevated proportion of cholesterol." *Biochim Biophys Acta* **1737**: 27-35
- Haagsman H.P. and Diemel R.V. 2001. "Surfactant-associated proteins: functions and structural variation." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **129**:91-108.
- Haagsman H.P. and van Golde L.M. 1991. "Synthesis and assembly of lung surfactant." *Annu Rev Physiol* **53**:441-464.
- Hawco M.W., Coolbear K.P., Davis P.J. and Keough K.M. 1981a. "Exclusion of fluid lipid during compression of monolayers of mixtures of dipalmitoylphosphatidylcholine with some other phosphatidylcholines." *Biochim Biophys Acta* **646**:185-187.
- Hawco M.W., Davis P.J. and Keough K.M. 1981b. "Lipid fluidity in lung surfactant: monolayers of saturated and unsaturated lecithins." *J Appl Physiol* **51**:509-515.
- Hawgood S. 1997. *Surfactant: composition, structure and metabolism*. Philadelphia W.J. Crystal R.G., Weibel E.R., Barnes P.J. Lippincott-Raven. Publishers.
- Heimburg T. and Jackson A.D. 2005. "On soliton propagation in biomembranes and nerves." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9790-9795.
- Herzog E. L., Brody A. R., Colby T. V., Mason R. and Williams M. C. 2008. "Knowns and unknowns of the alveolus." *Proc Am Thorac Soc* **5**:778-82.
- Holopainen J.M., Subramanian M. and Kinnunen P.K. 1998. "Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane." *Biochemistry* **37**:17562-17570.
- Hook G.E., Spalding J.W., Ortner M.J., Tombropoulos E.G. and Chignell C.F. 1984. "Investigation of phospholipids of the pulmonary extracellular lining by electron paramagnetic

resonance. The effects of phosphatidylglycerol and unsaturated phosphatidylcholines on the fluidity of dipalmitoyl phosphatidylcholine." *Biochem J* 223:533-542.

- Huang C.H. 2001. "Mixed-chain phospholipids: structures and chain-melting behavior." *Lipids* 36:1077-1097.

- Hyatt B.A., Resnik E.R., Johnson N.S., Lohr J.L. and Cornfield D.N. 2007. "Lung specific developmental expression of the *Xenopus laevis* surfactant protein C and B genes." *Gene Expr. Patterns* 7:8-14.

- Ikegami M., Elhalwagi B.M., Palaniyar N., Dienger K., Korfhagen T., Whitsett J.A. and McCormack F. X. 2001. "The collagen-like region of surfactant protein A (SP-A) is required for correction of surfactant structural and functional defects in the SP-A null mouse." *J Biol Chem* 276:38542-38548.

- Ikegami M., Rebello C.M. and Jobe A.H. 1996. "Surfactant inhibition by plasma: gestational age and surfactant treatment effects in preterm lambs." *J Appl Physiol* 81:2517-2522.

- Ikegami M. and Jobe A. 1983. "Surfactant function in respiratory distress syndrome." *J Pediatr* 102:443-447.

- Ingenito E.P., Mora R. and Mark L. 2000. "Pivotal role of anionic phospholipids in determining dynamic behavior of lung surfactant." *Am J Respir Crit Care Med* 161:831-838.

- Jobe A.H. 1993. "Pulmonary surfactant therapy." *N Engl J Med.* 328:861-8. Review.

- Johansson J. and Curstedt T. 1997. "Molecular structures and interactions of pulmonary surfactant components." *Eur J Biochem* 244:675-93.

- Johnson M. D. 2007. "Ion transport in alveolar type I cells." *Mol Biosyst* 3:178-86.

- Karagiorga G., Nakos G., Galiatsou E. and Lekka M.E. 2006. "Biochemical parameters of bronchoalveolar lavage fluid in fat embolism." *Intensive Care Med* 32:116-123.

- Keating E., Zuo Y.Y., Tadayyon S.M., Petersen N.O., Possmayer F. and Veldhuizen R.A. 2012. "A modified squeeze-out mechanism for generating high surface pressures with pulmonary surfactant." *Biochim Biophys Acta.* 1818:1225-34.

- Keating E., Rahman L., Francis J., Petersen A., Possmayer F., Veldhuizen R. and Petersen N.O. 2007. "Effect of cholesterol on the biophysical and physiological properties of a clinical pulmonary surfactant." *Biophys J* 93:1391-1401.

- Keough K.M., Parsons C.S., Phang P.T. and Tweeddale M.G. 1998. "Interactions between plasma proteins and pulmonary surfactant: surface balance studies." *Can J Physiol Pharmacol* 66:1166-1173.

- Khubchandani K.R. and Snyder J.M. 2001. "Surfactant protein A (SP-A): the alveolus and beyond." *Faseb J* 15:59-69.

- King R.J. and MacBeth M.C. 1981. "Interaction of the lipid and protein components of pulmonary surfactant. Role of phosphatidylglycerol and calcium." *Biochim Biophys Acta* 647:159-168.
- King R.J. 1974. "The surfactant system of the lung." *Fed Proc* 33:2238-2247.
- Korfhagen T.R., Bruno M. D., Ross G. F., Huelsman K.M., Ikegami M., Jobe A.H., Wert S.E., Stripp B.R., Morris R.E., Glasser S.W., Bachurski C.J., Iwamoto H.S. and Whitsett J.A. 1996. "Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice." *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9594-9599.
- Korimilli A., Gonzales L.W. and Guttentag S.H. 2000. "Intracellular localization of processing events in human surfactant protein B biosynthesis." *J Biol Chem* 275:8672-8679.
- Kramer A., Wintergalen A., Sieber M., Galla H.J., Amrein M. and Guckenberger R. 2000. "Distribution of the surfactant-associated protein C within a lung surfactant model film investigated by near-field optical microscopy." *Biophys J* 78:458-465.
- Kramer B.W. and Speer C.P. 2003. "Surfactant proteins A and D: major factors of the immune response of the lung." *Z Geburtshilfe Neonatol* 207: 41-47.
- Krol S., Ross M., Sieber M., Kunneke S., Galla H.J. and Janshoff A. 2000. "Formation of threedimensional protein-lipid aggregates in monolayer films induced by surfactant protein B." *Biophys J* 79: 904-918.
- Kucerka N., Liu Y., Chu N., Petrache H.I., Tristram-Nagle S. and Nagle J.F. 2005. "Structure of fully hydrated fluid phase DMPC and DLPC lipid bilayers using X-ray scattering from oriented multilamellar arrays and from unilamellar vesicles." *Biophys J* 88:2626-2637.
- Lacaze-Masmonteil T. 2003. "Exogenous surfactant therapy: newer developments." *Seminars in Neonatology* 8:433-440.
- Laemmli U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227:680-685.
- Lang C., Postle A., Orgeig S., Possmayer F., Bernhard W., Panda A., Jurgens K., Milsom W., Nag K. and Daniels C. 2005. "Dipalmitoylphosphatidylcholine is not the major surfactant phospholipid species in all mammals." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R1426-R1439.
- Langman C., Orgeig S. and Daniels C.B. 1996. "Alterations in composition and function of surfactant associated with torpor in *Sminthopsis crassicaudata*." *Am. J. Physiol.* 271:R437-R445.
- Langmuir I. 1920. "The mechanism of the surface phenomena of flotation." *Trans. Faraday Soc.* 15:62-74.
- Lawson W.E., Polosukhin V.V., Stathopoulos G.T., Zoia O., Han W., Lane K.B., Li B., Donnelly E.F., Holburn G.E., Lewis K.G., Collins R.D., Hull W.M., Glasser S.W., Whitsett J.A. and Blackwell T.S. 2005. "Increased and prolonged pulmonary fibrosis in surfactant protein C-deficient mice following intratracheal bleomycin." *Am. J. Pathol.* 167:1267-1277.

- Lentz B.R. 1989. "Membrane fluidity as detected by diphenylhexatriene probes." *Chem. Phys. Lipids* 50:171-190
- Lentz B.R. 1993. "Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers." *Chem Phys Lipids* 64:99-116. Review.
- Leonenko Z., Gill S., Baoukina S., Monticelli L., Doehner J., Gunasekara L., Felderer F., Rodenstein M., Eng L.M. and Amrein M. 2007. "An elevated level of cholesterol impairs self-assembly of pulmonary surfactant into a functional film." *Biophys J* 93:674-683.
- LeVine A.M., Bruno M.D., Huelsman K.M., Ross G.F., Whitsett J.A. and Korfhagen T.R. 1997. "Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection." *J Immunol* 158:4336-4340.
- Lhert F., Yan W., Biswas S.C. and Hall S.B. 2007. "Effects of hydrophobic surfactant proteins on collapse of pulmonary surfactant monolayers." *Biophys J* 93:4237-4243.
- Lopatko O.V., Orgeig S., Palmer D., Schürch S. and Daniels C.B. 1999. "Alterations in pulmonary surfactant after rapid arousal from torpor in the marsupial *Sminthopsis crassicaudata*." *J Appl Physiol* 86:1959–1970.
- Lopatko O.V., Orgeig S., Daniels C.B. and Palmer D. 1998. "Alterations in the surface properties of lung surfactant in the torpid marsupial *Sminthopsis crassicaudata*." *J Appl Physiol* 84:146–156.
- Mabrey S., Mateo P. L. and Sturtevant J. M. 1978. "High-sensitivity scanning calorimetric study of mixtures of cholesterol with dimyristoyl- and dipalmitoylphosphatidylcholines." *Biochemistry* 17:2464-2468.
- Mason R. J. and Shannon J. M. 1997. Alveolar type II cells. In *The lung: scientific foundations*. Crystal R. G., West J. B., Barnes P. J. and Weibel E. R. Lippincott-Raven, Philadelphia
- McCormack F.X. and Whitsett J.A. 2002. "The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung." *J Clin Invest* 109:707-712.
- McGowan S.E. and Torday J.S. 1997. "The pulmonary lipofibroblast (lipid interstitial cell) and its contributions to alveolar development." *Annu Rev Physiol* 59:43-62.
- Melton K.R., Nesselin L.L., Ikegami M., Tichelaar J.W., Clark J.C., Whitsett J.A. and Weaver T.E. 2003. "SP-B deficiency causes respiratory failure in adult mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:543-549.
- Meyer K.C. and Zimmerman J.J. 2002. "Inflammation and surfactant." *Paediatric Respiratory Reviews* 3:308-314.
- Miller N.J., Postle A.D., Orgeig S., Koster G. and Daniels C.B. 2006. "The composition of pulmonary surfactant from diving mammals". *Respir Physiol Neurobiol* 152:152-168.

- Nag K., Pao J.S., Harbottle R.R., Possmayer F., Petersen N.O. and Bagatolli L.A. 2002. "Segregation of saturated chain lipids in pulmonary surfactant films and bilayers." *Biophys J* 82:2041-2051.
- Nag K., Munro J.G., Hearn S.A., Rasmusson J., Petersen N.O. and Possmayer F. 1999a. "Correlated atomic force and transmission electron microscopy of nanotubular structures in pulmonary surfactant." *J Struct Biol* 126:1-15.
- Nag K., Munro J.G., Inchley K., Schürch S., Petersen N.O. and Possmayer F. 1999b. "SP-B refining of pulmonary surfactant phospholipid films." *Am J Physiol* 277(6 Pt 1):1179-1189.
- Nag K., Pérez-Gil J., Ruano M.L., Worthman L.A., Stewart J., Casals C. and Keough K.M. 1998. "Phase transitions in films of lung surfactant at the air-water interface." *Biophys J* 74:2983-2995.
- Nagle J.F. and Tristram-Nagle S. 2000. "Structure of lipid bilayers." *Biochim Biophys Acta* 1469:159-195.
- Noguee L.M. 2004a. "Alterations in SP-B and SP-C expression in neonatal lung disease." *Annu. Rev. Physiol.* 66:601–623.
- Noguee L.M. 2004b. "Genetic mechanisms of surfactant deficiency." *Biol Neonate* 85:314–318.
- Norlen L. 2001. "Skin barrier structure and function: the single gel phase model." *J Invest Dermatol* 117:830-836.
- Notter R. 2000. "Lung Surfactants: Basic Science and Clinical Applications." Lenfant, C. Bethesda, Maryland.
- Notter R.H., Finkelstein J.N. and Taubold R.D. 1983. "Comparative adsorption of natural lung surfactant, extracted phospholipids, and artificial phospholipid mixtures to the air-water interface." *Chem Phys Lipids* 33:67-80.
- Oosterlaken-Dijksterhuis M.A., Haagsman H.P., van Golde L.M. and Demel R.A. 1991. "Characterization of lipid insertion into monomolecular layers mediated by lung surfactant proteins SP-B and SP-C." *Biochemistry* 30:10965-71.
- Orgeig S., Hiemstra P.S., Veldhuizen E.J., Casals C., Clark H.W., Haczku A., Knudsen L. and Possmayer F. 2010. "Recent advances in alveolar biology: evolution and function of alveolar proteins." *Respir Physiol Neurobiol.* 173:43-54. Review.
- Orgeig S., Daniels C.B., Johnston S.D. and Sullivan L.C. 2003. "The pattern of surfactant cholesterol during vertebrate evolution and development: does ontogeny recapitulate phylogeny?" *Reproduction, Fertility and Development* 15:55-73.
- Orgeig S. and Daniels C.B. 2001. "The roles of cholesterol in pulmonary surfactant: insights from comparative and evolutionary studies." *Comparative Biochemistry and Physiology part A, Molecular and Integrative Physiology* 129:75-89.

- Paananen R., Glumoff V., Sormunen R., Voorhout W. and Hallman M. 2001a. "Expression and localization of lung surfactant protein B in Eustachian tube epithelium." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:214-220.
- Paananen R., Sormunen R., Glumoff V., van Eijk M. and Hallman M. 2001b. "Surfactant proteins A and D in Eustachian tube epithelium." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:660-667.
- Palaniyar N., Ridsdale R.A., Hearn S.A., Heng Y.M., Ottensmeyer F.P., Possmayer F. and Harauz G. 1999a. "Filaments of surfactant protein A specifically interact with corrugated surfaces of phospholipid membranes." *Am J Physiol* 276(4 Pt 1):631-641.
- Palaniyar N., Ridsdale R.A., Hearn S.A., Possmayer F. and Harauz G. 1999b. "Formation of membrane lattice structures and their specific interactions with surfactant protein A." *Am J Physiol* 276(4 Pt1):642-649.
- Parasassi T., De Stasio G., Ravagnan G., Rusch R.M. and Gratton E. 1991. "Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence." *Biophys J* 60:179-189.
- Parasassi T., De Stasio G., d'Ubaldo A. and Gratton E. 1990. "Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence." *Biophys J* 57: 1179-1186.
- Pattle R.E. 1965. "Surface Lining of Lung Alveoli." *Physiol Rev* 45:48-79.
- Pattle, R.E. 1955. "Properties, function and origin of the alveolar lining layer." *Nature* 175:1125-1126.
- Pérez-Gil J. and Weaver T. E. 2010. "Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions." *Physiology* 25:132-41.
- Pérez-Gil J. 2008. "Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions." *Biochim Biophys Acta* 1778:1676-1695. Review.
- Pérez-Gil J. 2002. "Molecular interactions in pulmonary surfactant films." *Biol Neonate* 81 Suppl 1:6-15.
- Pérez-Gil J. and Keough K.M. 1998. "Interfacial properties of surfactant proteins." *Biochim Biophys Acta* 1408:203-217.
- Pérez-Gil J., Casals C. and Marsh D. 1995. "Interactions of hydrophobic lung surfactant proteins SP-B and SP-C with dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylglycerol bilayers studied by electron spin resonance spectroscopy." *Biochemistry* 34:3964-3971.
- Pérez-Gil J., Cruz A. and Casals C. 1993. "Solubility of hydrophobic surfactant proteins in organic solvent/water mixtures. Structural studies on SP-B and SP-C in aqueous organic solvents and lipids." *Biochim Biophys Acta* 1168:261-270.

- Phillips M.C. and Chapman D. 1968. "Monolayer characteristics of saturated 1,2,-diacyl phosphatidylcholines (lecithins) and phosphatidylethanolamines at the air-water interface." *Biochim Biophys Acta* **163**:301-313.
- Phizackerley P.J., Town M.H. and Newman G.E. 1979. "Hydrophobic proteins of lamellated osmiophilic bodies isolated from pig lung." *Biochem J* **183**:731-736.
- Piknova B., Schief W.R., Vogel V., Discher B.M. and Hall S.B. 2001. "Discrepancy between phase behavior of lung surfactant phospholipids and the classical model of surfactant function." *Biophys J* **81**:2172-2180.
- Possmayer F., Nag K., Rodriguez K., Qanbar R. and Schürch S. 2001. "Surface activity in vitro: role of surfactant proteins." *Comp Biochem Physiol* **129**(PartA):209-220.
- Possmayer F. 1988. "A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins." *Am Rev Respir Dis* **138**:990-998.
- Postle T. and Bernhard W. 2004. "Lung surfactant phospholipid molecular species in health and disease." *Lung surfactant function and disorder*. Nag, K. Claude Lenfant, Bethesda, Maryland.
- Potter S., Orgeig S., Donnellan S. and Daniels C.B. 2007. "Purifying selection drives the evolution of surfactant protein C (SP-C) independently of body temperature regulation in mammals." *Comp. Biochem. Physiol. D* **2**:165-176.
- Poulain F.R., Allen L., Williams M.C., Hamilton R.L. and Hawgood S. 1992. "Effects of surfactant apolipoproteins on liposome structure: implications for tubular myelin formation." *Am J Physiol* **262**(6 Pt 1):730-739.
- Presti F.T. and Chan S. I. 1982. "Cholesterol-phospholipid interaction in membranes. 1. Cholestane spin-label studies of phase behavior of cholesterol-phospholipid liposomes." *Biochemistry* **21**:3821-3830.
- Ravasio A., Olmeda B., Bertocchi C., Haller T. and Pérez-Gil J. 2010. "Lamellar bodies form solid 3-dimensional films at the respiratory air-liquid interface." *J Biol Chem.* **285**:28174-82.
- Ravasio A., Cruz A., Pérez-Gil J. and Haller T. 2008. "High-throughput evaluation of pulmonary surfactant adsorption and surface film formation." *J. Lipid Res.* **49**:2479-2488.
- Repáková J., Holopainen J.M., Morrow M.R., McDonald M.C., Capková P. and Vattulainen I. 2005. "Influence of DPH on the structure and dynamics of a DPPC bilayer." *Biophys J* **88**:3398-3410
- Repáková J., Capková P., Studenovský M. and Ilavský M. 2004. "Characterization of molecular structures and properties of polyurethanes using molecular dynamics simulations." *J Mol Model* **10**:240-249.

- Ridsdale R., Roth-Kleiner M., D'Ovidio F., Unger S., Yi M., Keshavjee S., Tanswell A.K. and Post M. 2005. "Surfactant palmitoylmyristoylphosphatidylcholine is a marker for alveolar size during disease." *Am J Respir Crit Care Med* 172:225-232.
- Roberts G. G. 1990. "Langmuir-Blodgett Films." Plenum publishing corporation, New York.
- Roberts G. G., Vincett P. S. and Barlow W. A. 1981. "Technological applications of Langmuir-Blodgett films." *Physics in Technology* 12:69-75.
- Roeschlau P., Bernt E. and Gruber W. 1974. "Enzymatic determination of total cholesterol in serum." *Z Klin Chem Klin Biochem* 12:226.
- Rooney S. A. 2001. "Regulation of surfactant secretion." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129:233-243.
- Rooney S.A., Gobran L.I. and Chu A.J. 1986. "Thyroid hormone opposes some glucocorticoid effects on glycogen content and lipid synthesis in developing fetal rat lung." *Pediatr Res* 20:545-550.
- Ross M., Krol S. and Galla H. J. 2002. "Kinetics of phospholipid insertion into monolayers containing the lung surfactant proteins SP-B or SP-C." *Eur. Biophys. J.* 31:52-61.
- Rouser G., Fkeischer S. and Yamamoto A. 1970. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5(5):494-6.
- Rouser G., Siakotos A. N. and Fleischer A. S. 1966. "Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots." *Lipids* 1:85-86.
- Ruano M.L., Miguel E., Pérez-Gil J. and Casals C. 1996. "Comparison of lipid aggregation and self-aggregation activities of pulmonary surfactant-associated protein A." *Biochem J* 313 (Pt 2):683-689.
- Rüdiger M., Tölle A., Meier W. and Rüstow B. 2005. "Naturally derived commercial surfactants differ in composition of surfactant lipids and in surface viscosity." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L379-L383.
- Ryan A.J., Medh J.D., McCoy D.M., Salome R.G. and Mallampally R.K. 2002. "Maternal loading with very low-density lipoproteins stimulates fetal surfactant synthesis." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L310-L318.
- Saenz A., Canadas O., Bagatolli L. A., Johnson M. E. and Casals C. 2006. "Physical properties and surface activity of surfactant-like membranes containing the cationic and hydrophobic peptide KL4." *Febs J* 273:2515-27.
- Sankaram M.B. and Thompson T.E. 1991. "Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes." *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8686-8690.
- Schenkel J. H. and Kitchener J. A. 1958. "Contamination of surfaces by conductivity water from ion exchange resins." *Nature* 182:131.

- Schief W. R., Antia M., Discher B. M., Hall S. B. and Vogel V. 2003. "Liquid-crystalline collapse of pulmonary surfactant monolayers." *Biophys J* 84:3792-3806.
- Schoel W. M., Schürch S. and Goerke J. 1994. "The captive bubble method for the evaluation of pulmonary surfactant: surface tension, area, and volume calculations." *Biochim Biophys Acta* 1200:281-290
- Schürch D., Ospina O. L., Cruz A. and Pérez-Gil J. 2010. "Combined and independent action of proteins SP-B and SP-C in the surface behavior and mechanical stability of pulmonary surfactant films." *Biophys J* 99:3290-3299.
- Schürch S., Green F.H. and Bachofen H. 1998. "Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry." *Biochim Biophys Acta* 1408:180-202.
- Schürch S., Qanbar R., Bachofen H. and Possmayer F. 1995. "The surface-associated surfactant reservoir in the alveolar lining." *Biol Neonate* 67:61-76.
- Schürch S., Schürch D., Curstedt T. and Robertson B. 1994. "Surface activity of lipid extract surfactant in relation to film area compression and collapse." *J Appl Physiol* 77:974-986.
- Schürch S., Possmayer F., Cheng S. and Cockshutt A. M. 1992. "Pulmonary SP-A enhances adsorption and appears to induce surface sorting of lipid extract surfactant." *Am J Physiol* 263(2 Pt 1):210-218.
- Schürch S., Bachofen H., Goerke J. and Possmayer F. 1989. "A captive bubble method reproduces the in situ behavior of lung surfactant monolayers." *J Appl Physiol* 67:2389-2396
- Schürch S., Bachofen H. and Weibel E.R. 1985. "Alveolar surface tensions in excised rabbit lungs: effect of temperature." *Respir Physiol* 62:31-45.
- Schürch S., Goerke J. and Clements J.A. 1978. "Direct determination of volume- and time-dependence of alveolar surface tension in excised lungs." *Proc Natl Acad Sci USA* 75:3417-3421.
- Schürch S., Goerke J. and Clements J.A. 1976. "Direct determination of surface tension in the lung." *Proc Natl Acad Sci USA* 73:4698-4702.
- Serrano A.G. and Pérez-Gil J. 2006. "Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system." *Chem Phys Lipids* 141:105-118.
- Shiffer K., Hawgood S., Haagsman H.P., Benson B., Clements J.A. and Goerke J. 1993. "Lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, alter the thermodynamic properties of phospholipid membranes: a differential calorimetry study." *Biochemistry* 32:590-597.
- Shiffer K., Hawgood S., Duzgunes N. and Goerke J. 1988. "Interactions of the low molecular weight group of surfactant-associated proteins (SP 5-18) with pulmonary surfactant lipids." *Biochemistry* 27:2689-2695.

- Sklar L.A., Hudson B.S. and Simoni R.D. 1975. "Conjugated polyene fatty acids as membrane probes: preliminary characterization." *Proc Natl Acad Sci USA* **72**:1649-1653.
- Skottová N., Palkovic M. and Macho L. 1977. "Effect of premature weaning on the fatty acid composition of rat adipose tissue." *Physiol Bohemoslov* **2**:97-101.
- Smith E.C., Crane J.M., Laderas T.G. and Hall S.B. 2003. "Metastability of a supercompressed fluid monolayer." *Biophys J* **85**:3048-3057.
- Suri L.N., McCaig L., Picardi M.V., Ospina O.L., Veldhuizen R.A., Staples J.F., Possmayer F., Yao L.J., Pérez-Gil J. and Orgeig S. 2012. "Adaptation to low body temperature influences pulmonary surfactant composition thereby increasing fluidity while maintaining appropriately ordered membrane structure and surface activity." *Biochim Biophys Acta* **1818**:1581-1589.
- Suzuki Y., Fujita Y. and Kogishi K. 1989. "Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant." *Am Rev Respir Dis* **140**:75-81.
- Suzuki Y. 1982. "Effect of protein, cholesterol, and phosphatidylglycerol on the surface activity of the lipid-protein complex reconstituted from pig pulmonary surfactant." *J Lipid Res* **23**:62-69.
- Tausch H.W., de la Serna J.B., Pérez-Gil J., Alonso C. and Zasadzinski J.A. 2005. "Inactivation of pulmonary surfactant due to serum-inhibited adsorption and reversal by hydrophilic polymers: experimental." *Biophys J* **89**:1769-1779.
- Taneva S. and Keough K.M. 1997. "Cholesterol modifies the properties of surface films of dipalmitoylphosphatidylcholine plus pulmonary surfactant-associated protein B or C spread or adsorbed at the air-water interface." *Biochemistry* **36**:912-922.
- Taneva S.G. and Keough K.M. 1994. "Dynamic surface properties of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C and their mixtures with dipalmitoylphosphatidylcholine." *Biochemistry* **33**:14660-14670.
- Theunissen J.J., Jackson R.L., Kempen H.J. and Demel R.A. 1986. "Membrane properties of oxysterols. Interfacial orientation, influence on membrane permeability and redistribution between membranes." *Biochim Biophys Acta* **860**:66-74.
- Thuduppathy G.R., Terrones O., Craig J.W., Basanez G. and Hill R.B. 2006. "The N-terminal domain of Bcl-xL reversibly binds membranes in a pH-dependent manner." *Biochemistry* **45**:14533-14542.
- Tordet C., Marin L. and Dameron F. 1981. "Pulmonary di-and-triacylglycerols during the perinatal development of the rat." *Experientia* **37**:333-334.
- Trauble H., Eibl H. and Sawada H. 1974. "Respiration: a critical phenomenon? Lipid phase transitions in the lung alveolar surfactant." *Naturwissenschaften* **61**:344-354.
- Usha Raj J. 1987. "Alveolar liquid pressure measured by micropuncture in isolated lungs of mature and immature fetal rabbits." *J Clin Invest* **79**:1579-1588.

- van Golde L.M.G. and Casals C. 1997. *Metabolism of lipids in the lung*. Philadelphia, R.G. Crystal, West J.B., Barnes P.J., Weibel E.R. Lippincott-Raven, Publishers.
- van Iwaarden J.F., Claassen E., Jeurissen S.H., Haagsman H.P. and Kraal G. 2001. "Alveolar macrophages, surfactant lipids, and surfactant protein B regulate the induction of immune responses via the airways." *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:452-458.
- Vandebussche G., Clercx A., Clercx M., Curstedt T., Johansson J., Jornvall H. and Ruyschaert J.M. 1992. "Secondary structure and orientation of the surfactant protein SP-B in a lipid environment. A Fourier transform infrared spectroscopy study." *Biochemistry* 31:9169-9176.
- Veldhuizen E.J., Diemel R.V., Putz G., van Golde L.M., Batenburg J.J. and Haagsman H.P. 2001. "Effect of the hydrophobic surfactant proteins on the surface activity of spread films in the captive bubble surfactometer." *Chem Phys Lipids* 110:47-55.
- Veldhuizen J.A. and Haagsman H.P. 2000a. "Role of pulmonary surfactant components in surface film formation and dynamics." *Biochim Biophys Acta* 1467:255-270.
- Veldhuizen E.J., Batenburg J.J., van Golde L.M. and Haagsman H.P. 2000b. "The role of surfactant proteins in DPPC enrichment of surface films." *Biophys J* 79:3164-3171.
- Veldhuizen R., Nag K., Orgeig S. and Possmayer F. 1998. "The role of lipids in pulmonary surfactant." *Biochim Biophys Acta* 1408:90-108.
- Vernoux N., Maniti O., Besson F., Granjon T., Marcillat O. and Vial C. 2007. "Mitochondrial creatine kinase adsorption to biomimetic membranes: a Langmuir monolayer study." *J Colloid Interface Sci* 310:436-445.
- von Neergaard K.Z. 1929. "Die retraktionskraft der lunge, abhängig von der oberflächenspannung in den alveolen." *Gesamte Exp Med* 66:373-394.
- Voorhout W.F., Veenendaal T., Haagsman H.P., Verkleij A. J., van Golde L.M. and Geuze H.J. 1991. "Surfactant protein A is localized at the corners of the pulmonary tubular myelin lattice." *J Histochem Cytochem* 39:1331-1336.
- Vorbroker D.K., Profitt S.A., Noguee L.M. and Whitsett J.A. 1995. "Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency." *Am J Physiol* 268(4 Pt 1):L647-656.
- Wadsworth S.J. and Chander A. 2000. "H⁺-and K⁺-dependence of Ca²⁺ uptake in lung lamellar bodies." *J Membr Biol* 174:41-51.
- Walters R.W., Jenq R.R. and Hall S.B. 2000. "Distinct steps in the adsorption of pulmonary surfactant to an air-liquid interface." *Biophys J* 78:257-266.
- Weaver T.E., Na C.L. and Stahlman M. 2002. "Biogenesis of lamellar bodies, lysosome- related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant." *Semin Cell Dev Biol* 13:263-270.
- Weaver T.E. and Conkright J.J. 2001. "Function of surfactant proteins B and C." *Annu. Rev. Physiol.* 63:555-578.

- Weaver T.E. 1998. "Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C." *Biochim Biophys Acta.* 1408:173-9. Review.
- Weaver T. E. and Whitsett J. A. 1991. "Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins." *Biochem. J.* 273:249–264.
- Whitsett J.A., Ohning B.L., Ross G., Meuth J., Weaver T., Holm B.A., Shapiro D.L. and Notter R.H. 1986. "Hydrophobic surfactant-associated protein in whole lung surfactant and its importance for biophysical activity in lung surfactant extracts used for replacement therapy." *Pediatr Res.* 20:460-7.
- Wilhelmy L. 1863. "Über die Abhängigkeit des Capillaritäts-Constanten des Alkohols von Substanz und Gestalt des Benetzten Festen Körpers." *Ann. phys. Chem.* 119:177-217.
- Williams M.C., Hawgood S. and Hamilton R.L. 1991. "Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C." *Am J Respir Cell Mol Biol* 5:41-50.
- Wright J.R. 2005. "Immunoregulatory functions of surfactant proteins." *Nat Rev Immunol* 5:58-68.
- Wright J.R. 1997. "Immunomodulatory functions of surfactant." *Physiol Rev* 77:931-962.
- Wrobel S., Clements J.A. and Jobe A.H. 2004. "Bubbles, babies and biology: the story of surfactant." *Breakthroughs in Bioscience, FASEB*:1-16.
- Wustneck R., Pérez-Gil J., Wustneck N., Cruz A., Fainerman V.B. and Pison U. 2005. "Interfacial properties of pulmonary surfactant layers." *Adv Colloid Interface Sci* 117:33-58.
- Yan W., Biswas S.C., Laderas T.G. and Hall S.B. 2007. "The melting of pulmonary surfactant monolayers." *J Appl Physiol* 102:1739-1745.
- Yan W., Pikhova B. and Hall S.B. 2005. "The collapse of monolayers containing pulmonary surfactant phospholipids is kinetically determined." *Biophys J* 89:306-314.
- Young S.L., Fram E.K. and Larson E.W. 1992. "Three-dimensional reconstruction of tubular myelin." *Exp Lung Res* 18:487-504.
- Yu S.H. and Possmayer F. 2003. "Lipid compositional analysis of pulmonary surfactant monolayers and monolayer-associated reservoirs." *J. Lipid Res.* 44:621–629.
- **Yu S.H.** and **Possmayer F.** 1990. "Role of bovine pulmonary surfactant- associated proteins in the surface-active property of phospholipid mixtures." *Biochim. Biophys. Acta.* 1046:233-41.
- Zuo Y.Y., Keating E., Zhao L., Tadayyon S.M., Veldhuizen R.A., Petersen N.O. and Possmayer F. 2008. "Atomic force microscopy study of functional and dysfunctional pulmonary surfactant films. I. Micro- and nano- structures of functional pulmonary surfactant films and the effect of SP-A." *Biophys J.* 95:2779–2791. Review.
- Zuo Y.Y. and Possmayer F. 2007. "How does pulmonary surfactant reduce surface tension to very low values?" *J Appl Physiol* 102:1733-1734.

- Zuo Y. Y., Acosta E., Policova Z., Cox P. N., Hair M. L. and Neumann, A. W. 2006. "Effect of humidity on the stability of lung surfactant films adsorbed at air-water interfaces." *Biochim Biophys Acta* **1758**:1609-1620.
- Zuo Y.Y., Gitiafroz R., Acosta E., Policova Z., Cox P.N., Hair M.L. and Neumann A.W. 2005. "Effect of humidity on the adsorption kinetics of lung surfactant at air-water interfaces." *Langmuir* **21**:10593-10601.

