



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y TEMODINÁMICA DE LOS
CUERPOS LAMELARES AISLADOS DEL SURFACTANTE
PULMONAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

PRESENTA:

ERANDENI XUXUMARAT RODRÍGUEZ PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ALICIA ORTEGA AGUILAR
MIEMBRO DE COMITÉ TUTORAL: DR. RAFAEL ANGEL BARRIO PAREDES
MIEMBRO DE COMITÉ TUTORAL: DR. FIDEL RAMON ROMERO



posgrado en ciencias físicas
u n a m

MÉXICO, D.F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



posgrado en ciencias fís
u n a m

OFICIO: PCF/233/2009
ASUNTO: Designación de jurado

DR. ISIDRO AVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
P R E S E N T E

At'n: L. A. Balfred Santaella Hinojosa
Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado

El Comité Académico del Posgrado en Ciencias Físicas en su sesión 9 de junio del presente ha designado como jurado del estudiante **ERANDENI XUXUMARAT RODRIGUEZ PEREZ** con número de cuenta **508008115**, para dictaminar si el trabajo desarrollado como tesis titulado "*Caracterización estructural y termodinámica de los cuerpos lamelares aislados del surfactante pulmonar*" dirigido por la Dra. Alicia Ortega Aguilar tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA) conforme al plan de estudios 4058.

Propietario: Dra. Alicia Ortega Aguilar

Propietario: Dr. Luis Alberto Medina Velázquez

Propietario: Dra. Noemí Meraz Cruz

Suplente: Dr. Rafael Ángel Barrio Paredes

Suplente: Dr. Carlos Villarreal Lujan

Atentamente.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, D. F., a 10 de junio de 2009.

El Coordinador del Posgrado en Ciencias Físicas

Dr. Manuel Torres Labansat

c.c.p.- Cada miembro del sinodo
c.c.p.- Interesado.
c.c.p.- Expediente.

Resumen

Los neumocitos tipo II son células productoras del surfactante pulmonar (SP), el cual es un agente tensoactivo, que una vez secretado recubre la superficie alveolar evitando el colapso de los alveolos y favorece el intercambio de oxígeno proveniente del aire por el dióxido de carbono en la sangre, proveniente del metabolismo celular. El entendimiento de la composición, la función y el metabolismo de éste, es de esencial en la investigación de surfactantes terapéuticos, ya que la deficiencia del SP es causa de muerte en neonatos por dificultad respiratoria aguda o en adultos por enfermedades pulmonares crónicas. Dentro de la célula, este SP se acomoda en orgánulos especiales llamados cuerpos lamelares (CL), de la organización de estas estructuras depende la secreción de SP. En el presente estudio se aislaron CL de pulmón porcino por centrifugación diferencial y gradientes discontinuos de sacarosa. Se estudió por calorimetría diferencial de barrido las características termodinámicas de los CL con y sin sus proteínas estructurales. Las transiciones de fase de los CL se comparan con las del SP obtenido de lavado bronquio-alveolar porcino, así como el dos surfactantes terapéuticos comerciales. Los cambios en la temperatura de transición (T_m) reflejan una diferencia entre CL y el SP alveolar de 18°C , por lo que el SP alveolar tiene una mayor estabilidad térmica. Una diferencia de 4°C en la T_m , entre los CL con y sin proteína, refleja una estabilidad térmica, además de dos transiciones de fase que corresponderían a la membrana limitante y la zona electrodensa de los CL. La composición lipídica éstos, determinada por cromatografía de líquidos de alto rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas, indica que los componentes predominantes son la fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina y esfingomielina. La composición protéica, determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida de primera y segunda dimensión, indica que las proteínas propias de estas estructuras y del SP alveolar, como SP-A, pro-SP-B, ABCA3 y catepsina H. Finalmente por microscopía de transmisión electrónica se obtuvo una imagen de los CL aislados.

A mi madre
A mi hermano
A mis guías
A mi otra parte

*Hoy has aprendido algo que la
Naturaleza ya sabia hace miles de
años.*

PROF. JOHN D. COBETT

Agradecimientos

Hay distintas personas que merecen mucho más que un simple agradecimiento, ya que sin ellas este proyecto no habría sido posible.

Primeramente quisiera agradecer de forma especial a la Dra. Alicia Ortega por la dirección, paciencia, confianza y recomendaciones durante la realización de este proyecto.

A Rocío Alvarez del Lab. 1 del Dto de Bioquímica de la Facultad de Medicina por su paciencia, consejos, soporte y orientación, dándome las herramientas que me iniciaron en las técnicas utilizadas para la realización de los experimentos.

Al Dr. Fidel Ramón y Dr. Rafael Barrios por aceptar ser parte de mi comité tutorial.

A la Dra. Noemi Meraz por aceptar ser parte de mis sinodales y permitirme realizar algunos de los experimentos de gran importancia para este proyecto, en el Departamento de Investigación del Instituto de Perinatología.

Al Dr. Luis Alberto Medina por aceptar ser parte de mi jurado.

Al Dr. Carlos Villareal, primeramente por ser el primero en darme la bienvenida al posgrado, por su apoyo durante la maestría y por aceptar ser parte de mis sinodales.

Al Dr. Eugenio Quiróz de la Facultad de Veterinaria, por su apoyo en la adquisición de las muestras biológicas para la realización de este proyecto, sin él no hubiera sido posible.

Al Dr. Rodolfo Paredes, por su dedicación para la adquisición de las imágenes de microscopía en el Instituto de Fisiología Celular.

Al Dr. Mohammed El Hafidi, por su apoyo en el análisis lipídico de las muestras, en Departamento de Bioquímica de la torre de Investigación del Instituto Nacional de Cardiología.

Al Dr. Adrian Rondan de la Facultad de Medicina, por sus consejos y facilitarme las soluciones químicas necesarias para microscopía.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por permitirme realizar gran parte de los experimentos en sus instalaciones.

Al Departamento de Bioquímica del Instituto de Perinatología por permitirme realizar los experimentos de microcalorimetría en sus instalaciones, a través del convenio UNAM/INPer Convenio, número: 13867-717 UNAM-INPer 21-VII-03, otorgado como Investigadora Honoraria a la Dra. Alicia Ortega.

Al investigadores del Dto. de Bioquímica del INPer con los cuales he compartido el interés por los surfactantes pulmonares y sus implicaciones en el recién nacido con insuficiencia respiratoria; M.C. Joel Arias, Dr. José Guzmán y Dra. Claudine Irlés.

Al Posgrado del Instituto de Física de UNAM que me abrió sus puertas para poder realizar la Maestría en Ciencias Física Médica.

A la UNAM por sus Programas de Posgrado de alta calidad.

Agradezco el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo financiero durante los dos años de mi programa de maestría.

A la Dirección General del Personal Académico a través del Programa de Apoyo a la Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-IN227106) por apoyar el proyecto y su apoyo durante el tiempo de la terminación de mi trabajo de tesis.

Al Dr. Manuel Torres y Yanalte Herrero, por sus atenciones durante la estancia en el Posgrado de Física.

A todos los profesores de la maestría con quienes tuve la gran fortuna de tomar clases y aprender mucho de ellos.

A las distintas instituciones hospitalarias visitadas en la residencia médica por darme un panorama amplio de la utilidad del físico médico en un hospital.

También quisiera agradecer a las personas cuyos consejos me ayudaron para la realización de los experimentos: Pavel Vázquez, Ricardo Ramírez, Jesús Vega, Felipe Estrada, Selene Durán, Miguel Palacios.

De forma especial a Samanta Campos, por su tiempo, dedicación y consejos que me ayudaron para la realización de los experimentos en electroforesis, y su valiosa amistad.

A mis compañeros del Departamento de Bioquímica por los momentos gratos que compartimos.

Agradezco aquellas personas que me apoyaron de forma personal durante esta etapa de mi vida: Dr. Armando Mansilla, Dra. Leticia Fuchs, M.C. Víctor Jiménez, C.D. Ricardo Arce, C.D. Angel Hernández, L.P. Ma del Carmen Padrón.

A Joel Medina y Jaime Rodríguez por su amistad y los momentos gratos que compartimos.

A mis amigos: Leticia Vera, Diana Rojo, Liliana Rayas, Flora Ventura, Noelia Huape, Gabriela Calvillo, Mónica Luna, Ricardo Landín, Antonio Rendón, Néstor Ortiz, Luis Fernando Villanueva, porque han hecho de cada momento algo especial y valioso en mi vida.

Con mucho aprecio a mi familia, mi madre Reynalda Pérez por su entrega y fortaleza, y a mi hermano Tzintzuni Rodríguez por darme momentos de alegría, además de que han estado a mi lado siempre, por su soporte en todo tiempo y apoyo para poder dedicarme a lo que realmente me gusta.

A Benjamín por estar compartiendo el día a día conmigo, por sus consejos, dedicación, paciencia y amor, endulzando mi vida desde hace tiempo.

Aquellas personas que sin nombre me dieron nombre, que sin sentimiento me dieron sentimientos, que sin ojos me enseñaron a ver, que dormidas me despertaron, que sin voz se dieron a escuchar, que siendo instantáneos quedaron para siempre en mis recuerdos.

A todos mil gracias.

Índice general

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Sistema Pulmonar	3
2.1.1. Pulmón	3
2.1.2. Alveolos	4
2.1.3. Neumocitos Tipo II	5
2.1.4. Surfactante Pulmonar	6
<i>i. Composición del Surfactante Pulmonar</i>	6
<i>ii. Procesamiento y Secreción del Surfactante</i>	7
<i>iii. Función del Surfactante Pulmonar</i>	8
2.2. Surfactante Pulmonar Intracelular	10
2.2.1. Cuerpos Lamelares	10
2.2.2. Composición de los Cuerpos Lamelares	11
<i>i. Composición Lipídica</i>	11
<i>ii. Síntesis de los Componentes Lipídicos del CL</i>	12
<i>iii. Composición Proteica</i>	13
<i>iv. Características Estructurales y Funcionales de las Proteínas del CL</i>	14
<i>Proteína Surfactante Hidrofilica</i>	14
- <i>Proteína Surfactante A</i>	14
<i>Proteínas Surfactante Hidrofóbicas</i>	15

- <i>Proteína Surfactante B</i>	15
- <i>Proteína Surfactante C</i>	17
<i>Proteínas Membranales</i>	18
- <i>Proteína ABCA3</i>	18
- <i>Anexinas</i>	19
2.2.3. Estructura del Cuerpo Lamelar	19
2.3. Lípidos en Fase Lamelar	21
2.3.1. Moléculas Anfifílicas	21
<i>Tensoactivos</i>	22
<i>Cotensoactivos</i>	23
2.3.2. Estados de Agregación	24
2.3.3. Fase de Cristal Líquido	25
2.3.4. Geles Lamelares	26
2.3.5. Fase Lamelar Fluida	27
2.4. Caracterización Fisicoquímica de Vesículas Lamelares	29
2.4.1. Difracción de Rayos X	29
2.4.2. Microscopía	30
<i>Microscopía Electrónica</i>	30
2.4.3. Técnicas de Resonancia Magnética Nuclear	31
2.4.4. Medida de las Fuerzas Interbicapa	31
2.4.5. Calorimetría Diferencial de Barrido	32

2.5. Caracterización Bioquímica de Vesículas Multilamelares	40
2.5.1. Caracterización Proteica. Electroforesis	40
<i>Electroforesis en Gel</i>	41
2.5.2. Caracterización Lipídica. Cromatografía	42
<i>Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento</i>	43
3. Objetivo e Hipótesis	45
<i>Planteamiento del Problema</i>	45
3.1. Objetivo	45
3.1.1. Objetivo Particular	45
3.2. Hipótesis	45
4. Método Experimental	47
4.1. Aislamiento de Cuerpos Lamelares	47
4.1.1. Aislamiento de Cuerpos Lamelares de Pulmón de Rata	47
4.1.2. Aislamiento de Cuerpos Lamelares de Pulmón Porcino	50
4.2. Extracción de Proteínas y Lípidos de Cuerpos Lamelares	50
4.3. Caracterización Termodinámica	51
4.3.1. Calorimetría Diferencial de Barrido	51
<i>Muestras</i>	51
4.4. Caracterización Proteica	52
4.4.1. SDS-PAGE de Primera Dimensión	52
<i>Muestra</i>	52

<i>Electroforesis</i>	52
<i>Tinción con Plata</i>	53
4.4.2. Electroforesis de Segunda Dimensión	54
<i>Muestra</i>	54
<i>Isoelectroenfoque</i>	55
<i>Electroforesis</i>	55
4.5. Caracterización Lipídica	56
4.5.1. HPLC/ESI-MS	56
<i>Muestra</i>	56
4.6. Microscopía Electrónica de Transmisión	57
<i>Muestra</i>	57
4.7. Análisis de Datos	57
4.7.1. Análisis de los Termogramas	57
4.7.2. Análisis de los Geles de Electroforesis	57
5 Resultados y Discusión	59
5.1. Calorimetría	59
5.1.1. Termogramas	59
<i>Termogramas de Cuerpos Lamelares de Pulmón de Rata</i>	59
<i>Termogramas de Cuerpos Lamelares de Pulmón Porcino</i>	60
<i>Termogramas de Lavado Bronquio-Alveolar Porcino</i>	62
<i>Termogramas de Surfactante Terapéutico Curosurf</i>	64
<i>Termogramas de Surfactante Terapéutico Survanta</i>	65
<i>Termogramas de Lavado Bronquio-Alveolar Bovino</i>	67

<i>Termogramas de Lavado Bronquio-Alveolar Humano</i>	68
5.1.2. Parámetros Termodinámicos	69
5.2. Electroforesis	71
5.3. HPLC/ESI-MS	74
5.4. Microscopía Electrónica de Transmisión	78
6. Conclusiones	81
Referencias	83
Índice de Figuras	89

Abreviaturas

SP	Surfactante Pulmonar
CL	Cuerpos Lamelares
DPPC	Dipalmitoil Fosfatidilcolina (<i>Dipalmitoyl Phosphatidylcholine</i>)
DPPG	Dipalmitoil Fosfatidilglicerol (<i>Dipalmitoyl Phosphatidylglycerol</i>)
PC	Fosfatidilcolina (<i>Phosphatidylcholine</i>)
PG	Fosfatidilglicerol (<i>Phosphatidylglycerol</i>)
PI	Fosfatidilinositol (<i>Phosphatidylinositol</i>)
PE	Fosfatidiletanolamina (<i>Phosphatidylethanolamine</i>)
PS	Fosfatidilserina (<i>Phosphatidylserine</i>)
EM	Esfingomielina
DMPC	Dimiristoil Fosfatidilcolina (<i>Dimiristoyl Phosphatidylcholine</i>)
CoA	Coenzima A
SP-A	Proteína Surfactante A (<i>Surfactant Protein A</i>)
SP-B	Proteína Surfactante B (<i>Surfactant Protein B</i>)
SP-C	Proteína Surfactante C (<i>Surfactant Protein C</i>)
SP-D	Proteína Surfactante D (<i>Surfactant Protein D</i>)
LBA	Lavado Bronquio-Alveolar
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
CDB	Calorimetría Diferencial de Barrido
T _m	Temperatura de Transición
ΔH	Cambio en la Entalpía
SDS	Dodecilsulfato de Sodio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE 2D	Electroforesis de Segunda Dimensión

EM	Espectrometría de Masas
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
H ₂ O _D	Agua Desionizada
HPLC/ESI-MS	Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a un Espectrometro de Masas de Ionización por Electrospray

Capítulo 1

Introducción

En los humanos, la superficie alveolar tiene una extensión de aproximadamente 70 a 80 m² de una capa de células, que está estructurada como sacos llamados alveolos pulmonares, donde se tiene lugar el intercambio de gases ($O_2 \leftrightarrow CO_2$), entre el aire inspirado y los gases presentes en la sangre, producto del metabolismo. El endotelio alveolar está formado por dos tipos principales de células: Neumocitos tipo I, que cubre 93-97% de la superficie alveolar donde ocurre el intercambio de gases y, Neumocitos tipo II, donde el surfactante pulmonar (SP) se produce principalmente.

Este SP es un agente activo en la superficie que recubre las paredes alveolares, y con ello se evita el colapso durante la exhalación en la ventilación pulmonar, disminuyendo a valores cercanos a cero la tensión superficial en la interfase aire/agua. A partir de lavar con solución salina la delgada capa de líquido que recubre las paredes alveolares, se puede medir su tensión superficial, que varía de 30 dinas/cm en áreas grandes, a 5 dinas/cm en áreas pequeñas. Esto implica que el surfactante disminuye el retroceso elástico pulmonar debido a la tensión superficial, aún a volúmenes pulmonares altos, por lo que el surfactante ayuda también a estabilizar la tensión superficial entre los alveolos de diferentes tamaños a lo largo del pulmón, igualando la presión en el interior de los mismos al final de la exhalación, contribuyendo a disminuir el trabajo respiratorio, mejorando la distensión pulmonar.

La producción del surfactante en el humano comienza entre las 24 y 28 semanas de gestación; alrededor de la semana 35, la mayoría de los neonatos ya produjeron una cantidad apropiada de surfactante para su vida extrauterina. Al nacer, la primera respiración requiere presiones inspiratorias elevadas para expandir los pulmones. Con los valores del surfactante normales, el pulmón retiene más del 40% del volumen aéreo residual después de la primera respiración; de esta forma, las respiraciones posteriores requieren presiones inspiratorias menores. Cuando hay una deficiencia de surfactante, los pulmones se colapsan en cada respiración sucesiva, por lo que los recién nacidos deben hacer el mismo esfuerzo como en la primera inspiración.

Este SP es una mezcla de componentes tensoactivos que se acomodan en la interfase aire/agua en la superficie luminal de los alveolos, teniendo como función principal la disminución en la tensión superficial del agua para evitar el colapso alveolar durante la exhalación.

Los componentes del SP son fosfolípidos y proteínas, que son determinantes para la estructura de SP en condiciones de presión y temperatura específicos. El SP existe en forma intra y extracelular; dentro de la célula, el SP se acomoda en orgánulos llamados cuerpos lamelares (CL), de estas estructuras dependen de la secreción de SP a la luz alveolar.

Los CL son estructuras de lamelas lipídicas concéntricas, compuesta por múltiples bicapas de fosfolípidos (como el dipalmitoil fosfatidil colina); contiene proteínas específicas del surfactante (proteínas surfactantes A (SP-A), SP-B, SP-C), proteoglicanos y enzimas hidrolasas de origen lisosomal, rodeadas por una membrana limitante enriquecida en la proteína ABCA3; tienen además un alto contenido en calcio y un pH ácido.

Con microscopía electrónica se puede observar en el CL una zona central electro densa, donde se encuentran las proteínas hidrofóbicas. También se puede ver material amorfo entre las lamelas y debajo de la membrana limitante. Se ha demostrado que su composición lipídica es la misma que la encontrada en el SP obtenido de lavados bronquio-alveolares, sin embargo, se desconoce si la proporción entre los diferentes componentes lipídicos es la misma y poco se sabe sobre su composición proteica y del proceso de ensamblaje de proteínas que dan origen a los CL.

El proceso de caracterización de los CL inicia con el aislamiento de estas estructuras por métodos físicos, como la centrifugación diferencial y gradientes discontinuos de sacarosa a partir de homogenado de pulmón. Sus propiedades termodinámicas se estudian experimentalmente por calorimetría diferencial de barrido, que proporciona los parámetros termodinámicos (cambio en la entalpía y de energía de Gibbs) a partir de la determinación de cambios en la capacidad calorífica en función de la temperatura. La composición de los CL se realiza por electroforesis y HPLC/ESI-MS para obtener la composición proteica y de lípidos respectivamente. La morfología de los CL aislados se obtuvo a partir de microscopía electrónica.

En el presente estudio se observa que la transición de fase de los CL en pulmón porcino es de 35°C y la del SP obtenido de lavado bronquio-alveolar porcino es de 53°C. La extracción de las proteínas de los CL resulta en una disminución de la temperatura de transición de 3 °C. La estructura de los CL aislados, estudiados por microscopía de transmisión electrónica revela la formación concéntrica de multicapas lipídicas característica de los CL, sin embargo, pierden su estado de compactación por el procedimiento de aislamiento y fijación.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. Sistema Pulmonar

2.1.1. Pulmón

El organismo necesita de oxígeno (O_2) para mantener el metabolismo, entra a través de los pulmones, cuya función principal es el intercambio entre aire inspirado (O_2) y bióxido de carbono (CO_2) producto del metabolismo, que es transportado por la sangre al pulmón.

Cada pulmón se organiza siguiendo un sistema de vías aéreas que se origina en la bifurcación de la tráquea, dando origen a los bronquios principales, que a su vez se ramifican en bronquiolos que terminan dando origen a los sacos alveolares (véase Fig. 2.1), que son la unidad funcional de los pulmones y en cuyas paredes tiene lugar el intercambio gaseoso.

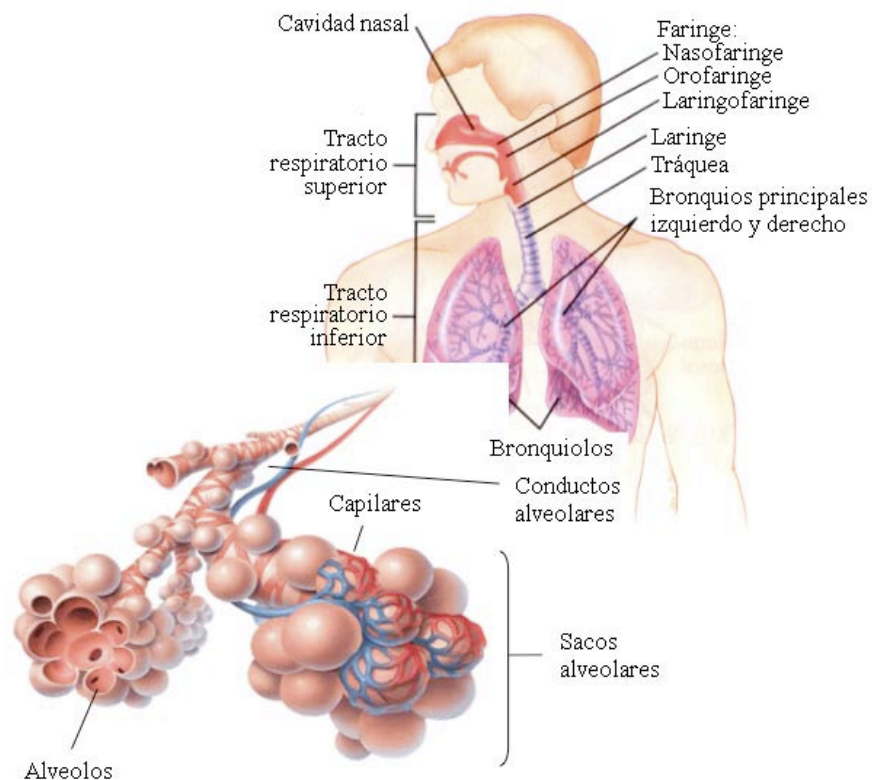


Fig. 2.1 Anatomía Pulmonar.

2.1.2. Alveolos

Los alveolos son la unidad funcional y estructural del sistema respiratorio, tienen forma de pequeños sacos que miden cerca de 200 μm de diámetro y hay aproximadamente 300 millones que salen de las paredes de los bronquiolos en el pulmón de un adulto. La pared alveolar es una barrera celular delgada, que cubre un área de 70 a 80 m^2 donde se lleva a cabo el intercambio de CO_2 por O_2 , entre el aire y la sangre de los capilares. La estructura microscópica de esta pared alveolar (mostrado en la Fig. 2.2) consta, desde la sangre hasta el aire de los siguientes componentes:

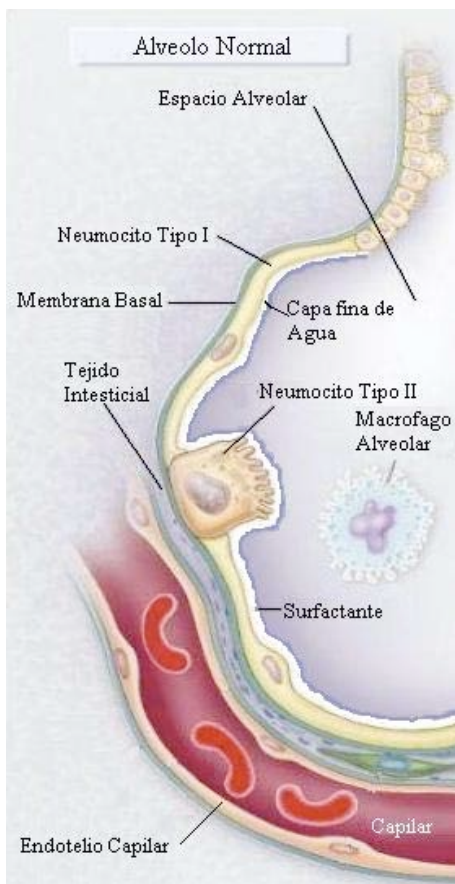


Fig. 2.2 Sección transversal de un saco alveolar.

- Endotelio capilar, que forma a los capilares.
- Membrana basal y tejido intersticial adyacente, que separa las células endoteliales del capilar de las células epiteliales del alveolo.
- Epitelio alveolar, está formado por una capa continua, con dos tipos celulares. Neumocitos **Tipo I**, son células pulmonares planas (escamosas) de 0.1 a 0.3 μm de espesor y 50 μm de diámetro. A través de ellas se lleva a cabo el intercambio gaseoso, por lo que recubren del 93 al 97% de la superficie alveolar. Neumocitos **Tipo II**, son células pulmonares granulares de 9 μm de diámetro, y es en ellas en donde se sintetiza el surfactante pulmonar, sustancia que se secreta al espacio alveolar y evita el colapso del mismo.
- Macrófagos alveolares, adheridos de forma laxa a las células epiteliales o libres dentro de los espacios alveolares, que proceden de los neumocitos sanguíneos y pertenecen al sistema fagocítico mononuclear.

Las paredes alveolares no son continuas, sino que están formadas por numerosos poros llamados poros de Kohn, que permiten el paso de células móviles como bacterias y células del sistema inmunológico entre alveolos adyacentes (véase Fig. 2.3). Los poros permiten el equilibrio de la presión del aire entre los segmentos pulmonares. El tabique interalveolar es la zona entre dos alveolos adyacentes, y está conformado por capilares continuos con sangre de las arterias pulmonares y a la que drenan las venas capilares. La capa que forma el surfactante pulmonar se encuentra junto a la membrana del epitelio pulmonar, en la luz del alveolo, separada de la capa celular por una fina capa de agua, como se observa en la Fig. 2.2.

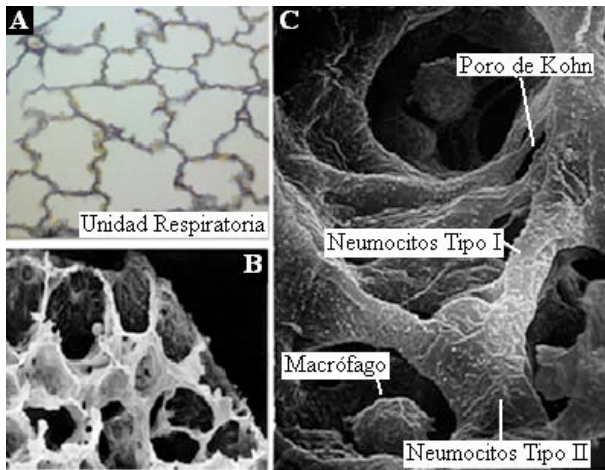


Fig. 2.3 Unidad funcional respiratoria.

(A) Corte transversal de un grupo alveolar, espacios alveolares con capilares en amarillo y tejido conjuntivo en morado. (B) Microscopia electrónica de barrido de los espacios alveolares. (C) Neumocitos tipo I y tipo II. El tipo I, células escamosas, que forman la mayor parte del revestimiento del alveolo, es ahí donde se da la hematosis. Los de tipo II, células granulares, que sintetizan surfactante pulmonar. Se pueden observar células que sobresalen notoriamente en el espacio alveolar desde la pared alveolar, estos son los macrófagos alveolares. También se observan poros de Kohn [3].

2.1.3. Neumocitos Tipo II

Los neumocitos tipo II se encuentran intercalados entre los neumocitos tipo I, formando uniones ocluyentes con ellos; hay de 6 a 7 por alveolo y cubren aproximadamente el 7% de la superficie alveolar. Se ubican donde los alveolos adyacentes están separados por septos [4].

Su superficie apical presenta microvellosidades cortas, su citoplasma se observa granuloso, con múltiples vesículas y cuerpos osmiofílicos densos característicos (véase Fig. 2.4), de aspecto laminar llamados *citomas* o cuerpos lamelares, estos orgánulos constituyen la forma intracelular del surfactante pulmonar, contienen múltiples bicapas de fosfolípidos rodeadas de una membrana limitante y proteínas específicas del surfactante. La función principal de los neumocitos tipo II es la síntesis y secreción del surfactante pulmonar [4].

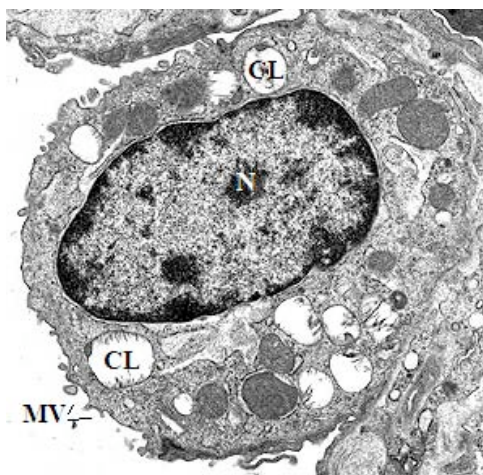


Fig. 2.4 Neumocito Tipo II.

Su superficie apical presenta microvellosidades (MV), en la posición supranuclear se localizan gránulos de secreción revestidos por membrana, en su interior se encuentra el surfactante pulmonar que se dispone en laminillas concéntricas denominadas cuerpos lamelares (CL), que pueden ser tan grandes como su núcleo (N) [5].

2.1.4. Surfactante Pulmonar

Esta sustancia tensoactiva, como se mencionó anteriormente, es sintetizada por los Neumocitos tipo II en forma de cuerpos lamelares, que al ser secretado sufren un cambio morfológico a un arreglo tubular, y ya acomodados en ese arreglo sufren una serie de transformaciones morfológicas hasta adsorberse en la interfase aire/agua. Dicha síntesis comienza tarde en la vida intrauterina del ser humano, iniciando su producción entre las 24 y 28 semanas de gestación, y aproximadamente a las 35 semanas de gestación, la mayoría de los fetos ya han desarrollado una cantidad apropiada de surfactante que será expulsado al espacio alveolar durante la primera inspiración de la vida extrauterina.

i. Composición del Surfactante Pulmonar

El surfactante está compuesto en general por una mezcla heterogénea de fosfolípidos, lípidos neutros, iones y proteínas. El fosfolípido más importante y abundante, es el dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC). Este surfactante tiene una pequeña cantidad de apoproteínas del agente tensoactivo, llamadas proteínas surfactantes A (SP-A), SP-B, SP-C y SP-D, como se muestra en la Fig. 2.5.

Para estudios de composición del surfactante pulmonar, se ha utilizado como material de partida: lavados broncoalveolares, cuerpos lamelares aislados a partir de homogeneizado de pulmón, material secretado por el pulmón fetal al líquido amniótico y material secretado por neumocitos tipo II al medio de cultivo. A partir de estos estudios se ha demostrado que el surfactante pulmonar alveolar, vesículas fosfolipídicas, mielina tubular y cuerpos lamelares tienen una composición lipídica semejante [6] y se diferencian en la composición proteica [7].

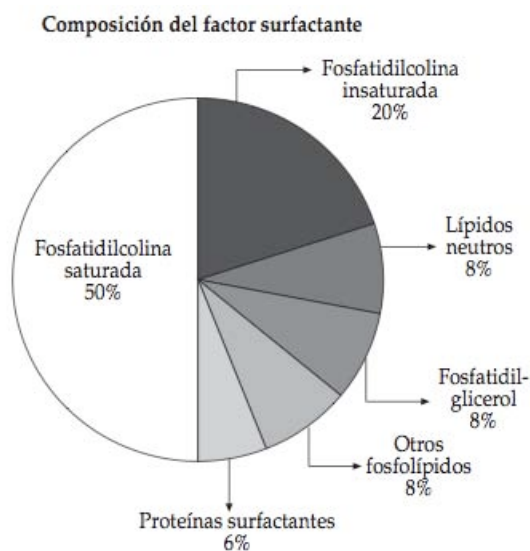


Fig. 2.5 Porcentaje de los distintos componentes del factor surfactante. Las proteínas surfactantes solo suponen un 6%, pero su importancia funcional es muy alta [8].

ii. Procesamiento y Secreción del Surfactante

Los fosfolípidos que componen este tensoactivo se sintetizan en el Retículo Endoplasmático (RE) Liso, salen compactados dentro de cuerpos multivesiculares (CMV) junto con las proteínas surfactantes sintetizadas por RE Rugoso, que pasan por el Sistema de Golgi (SG) a la Región Trans-Golgi (RTG). Luego, estos CMV se fusionan uno con otro, formando Cuerpos Compuestos (CC) y finalmente Cuerpos Lamelares (CL) [9] (mostrado en la Fig. 2.6).

Estos CL son liberados por exocitosis fusionando su membrana con la de la célula, liberando el surfactante, ya afuera sufren un cambio morfológico a un arreglo tubular [10], con sección transversal aproximadamente rectangular, organizados en forma de una malla que se le denomina mielina tubular. [11] (véase Fig. 2.7).

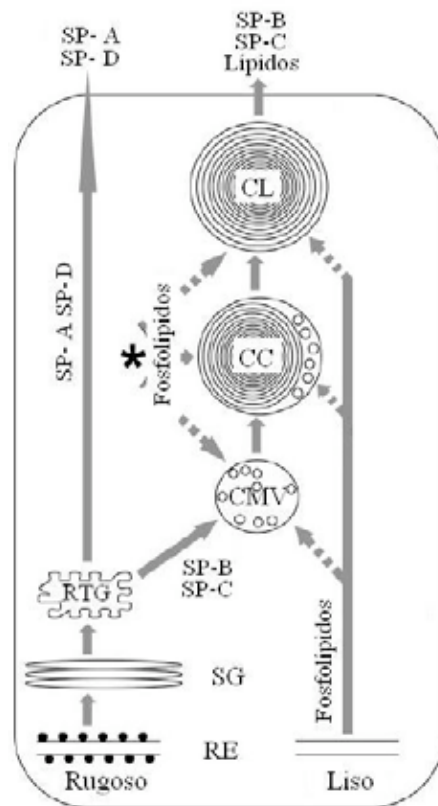


Fig. 2.6 Procesamiento y secreción de los componentes del surfactante. Los cuerpos lamelares (CL) inician como cuerpos multivesiculares (CMV) de fosfolípidos, SP-B y SP-C [9].

Ya acomodados en mielina tubular sufren una serie de transformaciones morfológicas hasta adsorberse en la interfase aire/agua, donde desarrollan su función tensoactiva, recubriendo las paredes alveolares. En cada una de estas fases están involucradas varias proteínas, propias del surfactante, aunque poco se ha estudiado sobre su papel específico, la manera en que intervienen y cómo interaccionan con los lípidos.

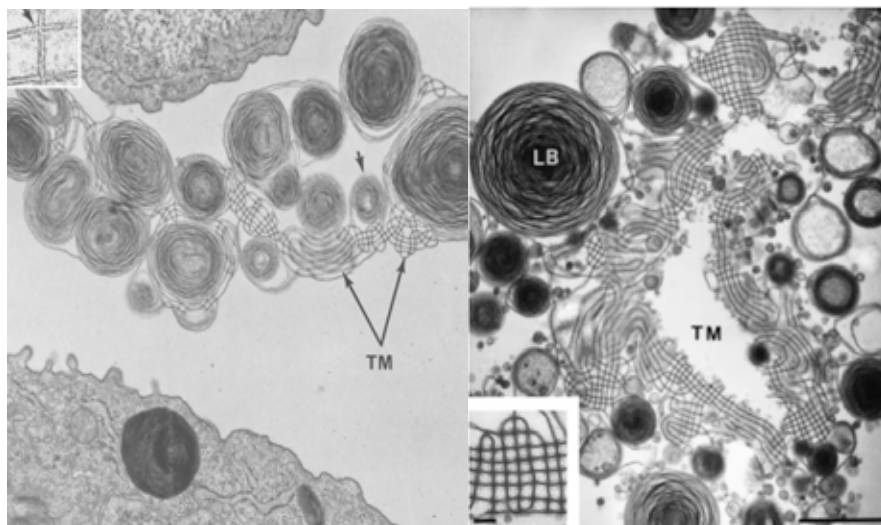


Fig. 2.7 Micrografía electrónica de una sección de pulmón de rata. Cuerpos Lamelares (LB) secretados al espacio alveolar, se observa que algunos se están transformando en Mielina Tubular (TM) [10][11].

La secreción de CL se estimula al momento del nacimiento, pero existen métodos para estimular la secreción, tanto *in vivo* como *in vitro*. La primera estimulación fisiológica tiene que ver con la distensión mecánica de la pared alveolar en la primera inspiración. La distensibilidad del alveolo al parecer es suficiente para producir la secreción de surfactante, este efecto se puede reproducir en un cultivo celular [9]. Por otro lado, existen mediadores químicos, como hormonas y factores de crecimiento, tales como; cortisol, insulina, prolactina, tiroxina y TGF- β^1 [12][13]. Como estimulantes de la secreción, están los agentes purinérgicos, proteína quinasa C, agonistas, adrenérgicos, calcio, vasopresina, regulación colinérgica, histamina y derivados del ácido araquidónico [9]. Cabe mencionar que el papel de los glucocorticoides es especialmente importante [14], ya que inducen la formación de lípidos surfactantes y de proteínas asociadas con el surfactante en el pulmón fetal; la tiroxina actúa de forma sinérgica con los corticoides en este sentido.

iii. Función del Surfactante Pulmonar

Al nacer, la primera respiración requiere presiones inspiratorias elevadas para expandir los pulmones. Con los valores del surfactante normales, el pulmón retiene más del 40% del volumen aéreo residual después de la primera respiración; de esta forma, las respiraciones posteriores requieren presiones inspiratorias mucho menores.

Cuando hay una deficiencia de surfactante, los pulmones se colapsan en cada respiración sucesiva (véase Fig. 2.8), por lo tanto los recién nacidos al respirar deben trabajar igual que como en la primera respiración, pues la función principal del surfactante pulmonar es evitar el colapso durante la exhalación en la ventilación pulmonar, disminuyendo a valores cercanos a cero la tensión superficial en la interfase aire/agua [15][14].

¹ TGF- β Factor Transformante del Crecimiento Tipo beta (*Transforming Growth Factor Beta*)

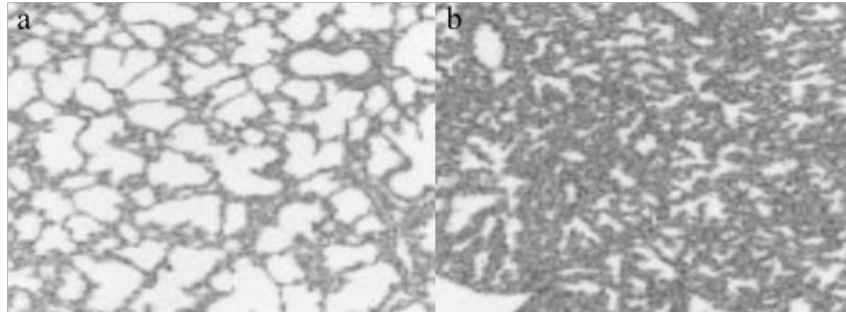


Fig. 2.8 Examinación histológica de los pulmón de raton.
 (a) Sanos y (b) con deficiencia de surfactante pulmonar, se observa en este último atelectasia (fusión alveolar) extensa y congestión pulmonar [14].

La ley de Laplace² explica este fenómeno, en donde la presión requerida para mantener abierto un alveolo depende directamente del doble de la tensión superficial, y de manera inversa al radio alveolar. Entonces si la tensión superficial es elevada y no disminuye durante el cierre del alveolo, éste se colapsará de forma inevitable porque el gradiente de presión irá incrementando durante el cierre. Lo que hace el surfactante es reducir la tensión superficial, sobre todo cuando el radio es más pequeño, y por lo tanto, estabiliza al conjunto de alveolos.

La disminución de la tensión superficial que causa el surfactante no sólo permite la adecuada circulación de aire sino la salida del líquido alveolar hacia el intersticio, que de otra manera se acumularía dentro del mismo [15].

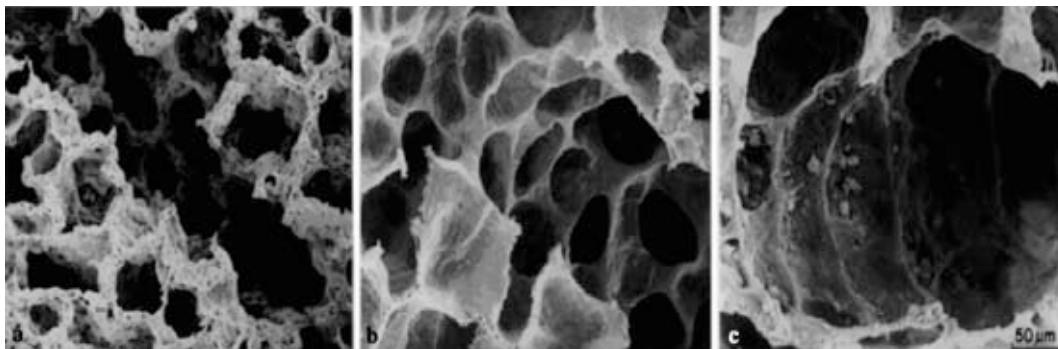


Fig. 2.9 Micrografías electrónica de conductos alveolares. Conductos llenados con a) solución salina, b) aire y c) detergente. Se observa una mayor distensión pulmonar con el detergente, que es un tensoactivo [16].

Al lavar con solución salina la delgada capa de líquido que cubre las paredes alveolares, se puede recuperar el surfactante pulmonar y medir su tensión superficial; la cual varía desde 30 dinas/cm en áreas grandes, hasta 5 dinas/cm en áreas pequeñas; esto implica que el surfactante disminuye el retroceso elástico pulmonar debido a la tensión superficial aún a volúmenes pulmonares altos, estabilizando la tensión superficial entre los alveolos de diferentes tamaños a lo largo del pulmón, igualando la presión en el interior de los mismos al final de la exhalación, por lo anterior, contribuye también a disminuir el trabajo respiratorio al mejorar la distensión pulmonar (véase Fig. 2.9) [15].

² $\Delta P = 2\gamma/r$; donde ΔP es el gradiente de presión, γ es la tensión superficial y r es el radio alveolar.

2.2. Surfactante Pulmonar Intracelular

2.2.1. Cuerpos Lamelares

Los Cuerpos Lamelares (CL) son estructuras de lamelas lipídicas concéntricas con un diámetro de 0.1-2.4 μ m (Fig. 2.10), compuestas de fosfolípidos, proteoglicanos y proteínas, rodeadas por una membrana limitante; contienen enzimas hidrolasas de origen lisosomal [17] [18], tienen un alto contenido en calcio [19.] y un pH ácido (< pH 6.1) [20]. Estos CL son la característica morfológica primordial de los Neumocitos tipo II, constituyendo entre el 18 – 24% del citoplasma celular [21]. Análisis de resonancia magnética nuclear de fracciones de cuerpos lamelares aislados revela un estado de baja hidratación [22].

En un CL se puede observar una zona central electrodensa, donde presumiblemente se encuentran las proteínas hidrofóbicas. También se puede ver material amorfo entre las lamelas y debajo de la membrana. Se ha demostrado que su composición lipídica es la misma que la encontrada en lavados bronquioalveolares [6], sin embargo, poco se sabe sobre la composición proteica y del proceso de ensamblaje de proteínas que dan origen a los cuerpos lamelares.

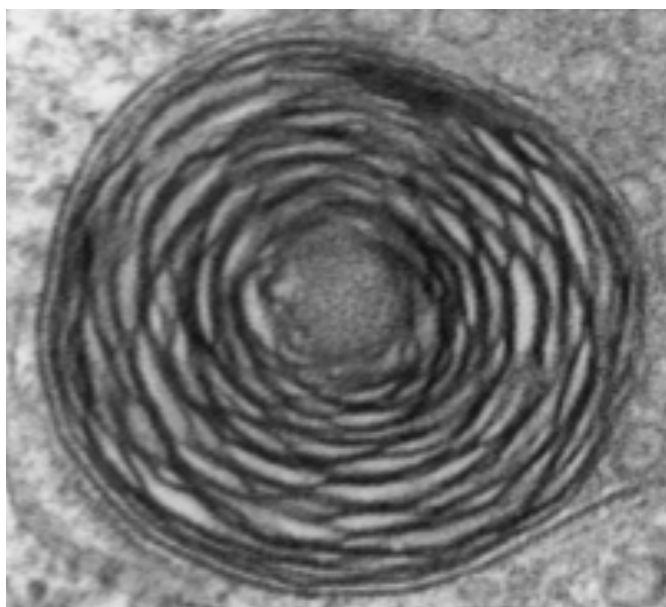


Fig. 2.10 Micrografía electrónica de CL.

Se observan el surfactante pulmonar intracelular acomodado de bicapas lipídica alrededor del centro dando el aspecto de cebolla [23].

2.2.2. Composición de los Cuerpos Lamelares

i. Composición Lipídica

El 90% del peso del surfactante pulmonar está constituido por lípidos. De ellos más del 80% son fosfolípidos (véase Tabla 2.1), responsables de reducir la tensión superficial, y especialmente fosfatidilcolina (PC) junto con fosfatidilglicerol (PG), la mayor parte de PC es dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), de manera que esta especie molecular disaturada constituye un 40 – 45% del peso del surfactante, tanto para el surfactante extracelular como en el intracelular [6].

El DPPC es un fosfolípido característico de las membranas biológicas, la temperatura de transición del estado gel cristalino al estado líquido para el DPPC es elevada (41 °C) comparada con la del resto de los fosfolípidos del surfactante, debido precisamente a la rigidez que le confiere la presencia de los 2 ácidos grasos saturados (véase Fig. 2.11). No es soluble en agua, pero interacciona con la capa superficial del agua debido a que una parte de cada molécula de fosfolípidos es hidrofílica y se disuelve en el agua que reviste a los alveolos, mientras que la porción lipídica de las moléculas es hidrófoba y se orienta hacia el aire. Esta superficie tiene una tensión superficial de entre $1/12$ y $1/2$ de la tensión superficial de una superficie de agua pura³; la tensión superficial exacta depende de la concentración y orientación de las moléculas de agente tensoactivo sobre la superficie. Pero el DPPC no puede funcionar de forma eficaz sin ayuda de otros lípidos y otras sustancias que faciliten su difusión rápida por la superficie, sin interferir en su habilidad de disminuir la tensión superficial a valores cercanos a cero [24].

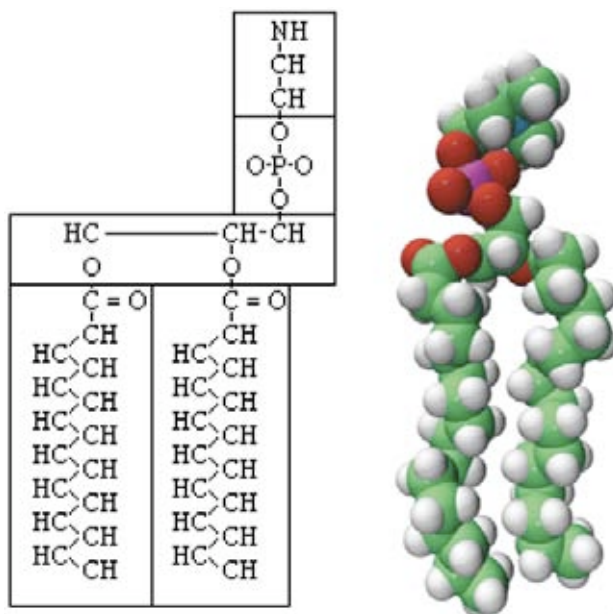


Fig. 2.11 Estructura molecular del DPPC.

³ Tensión del agua pura es de 72 dinas/cm a 25°C.

El fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) se encuentran en proporciones mayores en los cuerpos lamelares, comparando con el surfactante extracelular, probablemente como consecuencia de la existencia de una membrana limitante en estos orgánulos. La fosfatidilserina (PS), la esfingomiolina (SM), junto con PI y PE constituyen aproximadamente el 15% de los fosfolípidos de los cuerpos lamelares. Otros fosfolípidos como lisofosfolípidos, alquilacil y alquenilacil fosfolípidos, se encuentran en un porcentaje menor. Los lípidos neutros como colesterol y ácido palmítico constituyen un 10% de la masa del surfactante [6]. Otros lípidos neutros como diglicéridos y triglicéridos se encuentran en muy baja proporción.

Tabla 2.1 Composición fosfolipídica de lavado broncoalveolar y fracciones subcelulares de pulmón de conejo [6].

	Lavado Broncoalveolar	Cuerpos Lamelares	Mitocondria	Microsomias
	% del total de fosfolípidos PC			
PC	86.2	73.0 ± 2.36	40.4 ± 2.0	47.6 ± 1.66
PE	3	6.8 ± 0.45	26.5 ± 0.92	24.9 ± 2.01
PG	6.2	8.1 ± 0.82	8.5 ± 1.23	5.8 ± 1.69
PI, PS, SM	3.4	7.7 ± 0.69	17.9 ± 1.16	17.9 ± 1.04
Desconocidos	1.2	4.5 ± 1.37	6.7 ± 0.75	3.8 ± 1.18

ii. Síntesis de los Componentes Lipídicos del CL

La biosíntesis de los lípidos del surfactante pulmonar es la misma que se da en otros órganos, salvo en lo que se refiere a la síntesis de DPPC, que es un fosfolípido característico del pulmón. Al igual que en la mayoría de las células, los neumocitos tipo II sintetizan fosfatidilcolina por la vía *de novo* [25].

En los microsomas, el crecimiento del ácido palmítico para la formación de las diferentes PCs se realiza mediante un mecanismo enzimático de desacilación-reacilación. La desacilación se realiza mediante una actividad fosfolipasa A2 dependiente de calcio. La reacilación de la lisofosfatidilcolina resultante se lleva a cabo mediante la actividad palmitoil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa. Comparando con el tejido pulmonar, los neumocitos están enriquecidos en la actividad acil-CoA:lisofosfatidilcolina aciltransferasa, como se muestra en la Tabla 2.2 [26][27]. Además, esta enzima utiliza selectivamente palmitoil-CoA como sustrato frente a otros acil-CoA en los neumocitos tipo II. El proceso de desacilación-reacilación puede llevarse a cabo también mediante una actividad transacilasa, dependiente o independiente de CoA. La actividad transacilasa mejor estudiada es la dependiente de CoA e independiente de ATP [28][29]. Además, existe otra actividad transacilasa en microsomas, que es independiente de CoA y ATP [30].

Tabla 2.2 Actividad aciltransferasa de fracciones subcelulares de neumocitos tipo II [26].

	Cuerpos Lamelares	Microsomias	Mitocondria	Citosol	Actividad Total
LisoPC-palmitoil-CoA aciltransferasa (n=8)	5.6 ± 0.5	41.0 ± 0.8	10.3 ± 0.4	n.d.	3.8
LisoPC-oleoil-CoA aciltransferasa (n=8)	6.0 ± 1.1	37.5 ± 1.0	10.8 ± 0.9	n.d.	3.69
LisoPC-araquidoil-CoA aciltransferasa (n=4)	n. d.	18.8 ± 2.5	4.1 ± 1.7	n.d.	1.65
LisoPC-araquidonoil-CoA aciltransferasa (n=4)	n. d.	7.3 ± 0.9	1.6 ± 0.4	n.d.	0.64
LisoPE-palmitoil-CoA aciltransferasa (n=4)	n. d.	3.6 ± 0.2	0.9 ± 0.2	n.d.	0.33
LisoPE-oleoil-CoA aciltransferasa (n=4)	n. d.	2.2 ± 0.3	0.6 ± 0.2	n.d.	0.21
LisoPC-IisoPC aciltransferasa (n=4)	n. d.	n. d.	n. d.	0.36 ± 0.05	0.13
Egg PC-palmitoil-CoA aciltransferasa (n=4)	2.2 ± 0.5	6.5 ± 0.3	2.0 ± 0.4	n.d.	0.67

En el citosol la formación de DPPC se lleva a cabo mediante la transacilación entre dos moléculas de 1 palmitoil-sn-glicero 3-fosfocolina, reacción catalizada por la enzima lisofosfatidilcolina:lisofosfatidilcolina aciltransferasa [31] [32].

En los CL se ha descrito la existencia de una actividad enzimática que transfiere fosfocolina de PC insaturadas a ceramidas [33]. Esta fosfatidilcolina:ceramida fosfocolina transferasa parece utilizar preferentemente como sustrato 16:0/18:1(PC), y se ha propuesto que puede tener una implicación en la eliminación de especies insaturadas de PCs en favor del aumento de la proporción de especies dipalmitoil-PC. De esta manera contribuye de forma indirecta al aumento de la proporción de DPPC en los cuerpos lamelares.

iii. Composición Proteica

Aunque los lípidos son los participantes directos en el mantenimiento de la tensión superficial, las proteínas propias del surfactante pulmonar son determinantes en la estructura, homeostasis y regulación de la actividad surfactante, pues en su ausencia el DPPC se difunde lentamente por la superficie, y en consecuencia no puede funcionar de forma eficaz. Algunas de estas proteínas son importantes en la formación de CL y en su transporte.

Se ha demostrado que su composición lipídica es la misma que la encontrada en el SP obtenido de lavados bronquio-alveolares, sin embargo, se desconoce si la proporción entre los diferentes componentes lipídicos es la misma y poco se sabe sobre su composición proteica y del proceso de ensamblaje de proteínas que dan origen a los CL.

Hasta el momento se sabe cuáles son las proteínas que constituyen al SP alveolar, que de acuerdo a su solubilidad en disolventes acuosos, hay dos grupos proteicos: hidrofílicas (proteína surfactante A, SP-D) y hidrofóbicas (SP-B, SP-C). De éstas se sabe que la SP-D no se ha detectado en los CL ni en la mielina tubular mediante marcaje con oro coloidal [34], pero mediante la utilización de anticuerpos específicos, se ha demostrado la presencia de SP-A [35] y SP-B en los CL [37][38], y la presencia de SP-C en los CL mediante “Western-Blot” [39]. Además, se ha visto también involucradas proteínas transportadoras como la ABCA (ATP-Binding Casette A) [14].

iv. Características Estructurales y Funcionales de las Proteínas del CL

Proteína Surfactante Hidrofílica

La SP-A, junto con la SP-D, pertenece a un subgrupo de lectinas de mamíferos conocidas como colectinas, caracterizadas por tener un dominio de tipo colágeno, son consideradas como constituyentes importantes del sistema de defensa pulmonar no inmunitaria, sin embargo, se ha demostrado que estas proteínas no tienen un efecto fisiológico inmediato sobre la actividad tensoactiva [40].

– Proteína Surfactante A

La SP-A es la más abundante de las proteínas asociadas al surfactante, constituyendo el 50% de la proteína total, calcio dependiente, es una molécula muy compleja con 18 cadenas peptídicas enlazadas entre sí en forma helicoidal. Está codificada por dos genes muy relacionados (SP-A1 y SP-A2) de 5kb cada uno, localizado en el cromosoma 10q22-q23, ambos genes se necesitan para tener una SP-A madura funcional, la cual es una glucoproteína de colágeno con estructura de orden superior (véase Fig. 2.12). Esta molécula forma una estructura de ramo compuesto por 18 monómeros que se organizan como unidades 6 triméricas, donde cada homotrímero tiene un peso molecular de 26kDa [40].

La SP-A se sintetiza principalmente en las células alveolares tipo II, pero en el pulmón fetal también se expresan a lo largo de las vías aéreas. Se ha observado la presencia de esta proteína en los cuerpos lamelares [35] y en mielina tubular [40] [41]. Se ha observado que en ratones carentes de SP-A, con normalidad de las restantes proteínas surfactantes, no hay alteraciones respiratorias mecánicas, más bien la deficiencia de SP-A repercute más sobre las infecciones que sobre la función respiratoria [42].

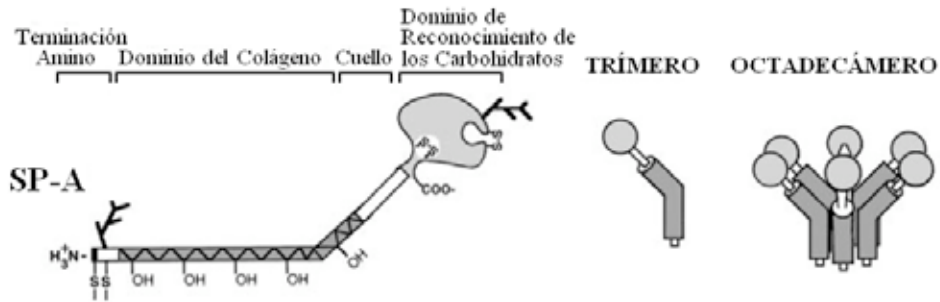


Fig. 2.12 Organización estructural de la SP-A. Cada monómero se organiza en tres, que pueden ser conceptualmente consideradas en: una región parecida a colágeno, un cuello y un dominio de reconocimiento de carbohidratos; dando lugar a un trímero que a su vez tiene un nivel de organización mayor, agrupándose en seis unidades triméricas, lo que da un total de 18 monómeros de SP-A unidades monoméricas de esta. [40].

Dentro de las funciones asociadas a esta proteína, está la participación en la formación de la mielina tubular y de la capa superficial enriquecida en fosfolípidos, la regulación de la secreción de surfactante y de su eliminación del espacio alveolar. Esta proteína tiene un efecto en las características tensoactivas del surfactante; específicamente, en facilitar la adsorción de lípidos a la interfase aire/agua, y aumentar la resistencia a la inhibición del surfactante por proteínas y a causa de aminoácidos catiónicos [43]. Se ha visto también que la SP-A produce una disminución de la tensión superficial mínima y máxima de forma calcio dependiente, porque este ion es necesario para la agregación de los fosfolípidos [41].

En su función de defensa pulmonar no inmunitaria, la SP-A defiende de toxinas inhaladas, así como de agentes patógenos, pues estimula la migración de los macrófagos e incrementa la fagocitosis de bacterias y virus, y produciendo radicales de oxígeno con capacidad bactericida. Es un agente protector del factor surfactante frente a proteasas e inhibidores, por lo que su principal función ocurre en alteraciones y situaciones de agresión [42].

Proteínas Surfactante Hidrofóbicas

La SP-B y SP-C son insolubles en disolventes acuosos y se extraen con los lípidos del surfactante en la fase orgánica. Son proteínas pequeñas que proceden de precursores de mayor tamaño. Se ha estimado que constituyen aproximadamente un 1-2% de la masa del surfactante [44]. Son importantes, pues contribuyen a las propiedades tensoactivas, particularmente, en facilitar la adsorción de los fosfolípidos a la interfase [45].

– Proteína Surfactante B

La SP-B está codificada por un pequeño gen de unas 2,000 pares de bases (pb) situado en el brazo corto del cromosoma 2. Tiene 11 exones y el RNAm definitivo codifica un péptido de 381 aminoácidos que actúa como molécula pre-activa (proSP-B) con masa molecular de 40kDa, luego pierde gran parte de su composición en intermediarios de 39 y 23kDa hasta adquirir la estructura funcionalmente activa de la SP-B de 8kDa, que tiene 79 aminoácidos [37] [38]. Esta molécula activa, prácticamente solo conserva la porción codificada por los exones 6 y 7 (véase Fig. 2.13).

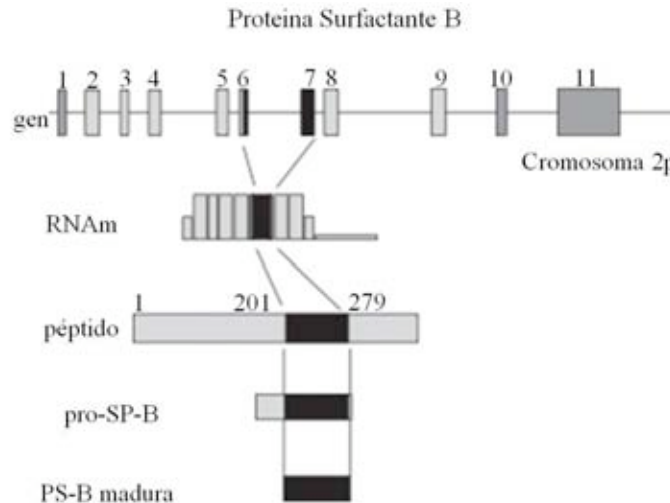


Fig. 2.13 Biosíntesis de la SP-B: el gen de la SP-B tiene 11 exones, en negro se señalan los exones que codifican la proteína madura y en gris los que no se copian en RNAm [8].

Del análisis de su secuencia se puede deducir que tiene un alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos, dos aminoácidos cargados negativamente y diez u once aminoácidos básicos, por lo que la carga neta del péptido es positiva al pH fisiológico. Se conocen más de treinta mutaciones repartidas por todos los exones, excepto el 3, siendo su mecanismo de todos los tipos, mutaciones de lectura errónea, sin sentido, inserciones con cambio de marco, etc. Sin embargo, en casi dos tercios de los casos se encuentra la misma mutación (121ins2) que consiste en la eliminación de 1 par de bases y su sustitución por otras 3, o sea inserción de 2 pb en el exón 4, en el lugar que corresponderá al codón 121 del RNAm [46].

La SP-B, aunque también aparece en epitelio bronquial no ciliado, sólo alcanza funcionalidad plena en las alveolares de tipo II. Los corticoides son el estímulo más potente conocido, mientras que la insulina [13] y el TGF- β inhiben la síntesis de SP-B [12].

Algunas mutaciones ocasionan la ausencia de SP-B, otras codifican una proSP-B anómala, incapaz de convertirse en SP-B madura. En ciertas deficiencias de SP-B hay cantidades anormales de SP-C madura, indicando una relación funcional entre la síntesis de ambas proteínas [47].

La SP-B es una proteína hidrofóbica que se aísla junto con los lípidos en la fase orgánica que resulta de la extracción del surfactante con disolventes orgánicos. Por tanto, se encuentra estrechamente asociada a los lípidos del surfactante y la interacción con ellos modifica sustancialmente algunas propiedades de los lípidos. A saber, la presencia de SP-B promueve la mezcla del componente lipídico entre vesículas. Se sugiere que su localización en el interior hidrofóbico de la bicapa, y que no modifica sustancialmente el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos [48], sin embargo, en ausencia de esta proteína no se forman los cuerpos lamelares [49][23]. La SP-B incrementa la velocidad de adsorción de fosfolípidos a la interfase aire-líquido. Cuando la SP-B se sitúa en la interfase aire-líquido incrementa la inserción de fosfolípidos, añadidos en la interfase [46].

Se le atribuyen funciones, tales como su participación en la formación de la mielina tubular, pues *in vitro* se necesita la presencia de SP-B para reconstituir mielina tubular [50]. Aunque no se conocen los mecanismos que intervienen en la formación de la mielina tubular, se supone que deben existir procesos de fusión de membrana, y dado que la SP-B induce mezcla del componente lipídico entre vesículas, podría estar implicada en esos fenómenos de fusión. También contribuye a las propiedades tensoactivas del surfactante facilitando la adsorción de los fosfolípidos a la interfase aire-líquido [46].

– *Proteína Surfactante C*

La SP-C está codificada por un gen de unos 3,500 pb con 6 exones, situado en el brazo corto del cromosoma 8, que se transcribe en un RNAm de unos 900 pb. La proteína codificada tiene 197 aminoácidos, con una masa molecular de 21kDa y corresponde a la proPS-C que posteriormente se modifica y se convierte en la forma SP-C madura de 35 aminoácidos de 4kDa, que se extiende entre los residuos 24 y 58 del precursor (véase Fig. 2.14). La SP-C madura se encuentra en los cuerpos lamelares de los neumocitos tipo II [39]. Se ha observado que cualquier de las dos moléculas (pro-SP-C y SP-C) expresada de forma incorrecta, resultan tóxicas para los neumocitos tipo II [51].

De las propiedades que se le atribuyen a la SP-C, es una proteína aún más hidrofóbica que la SP-B, soluble únicamente en disolventes orgánicos. Al igual que la SP-B, se aísla junto con los lípidos del surfactante en la fase orgánica resultante de la extracción lipídica del complejo lipoprotéico. Acerca de su interacción con los fosfolípidos, se ha observado que aumenta la adsorción de fosfolípidos a la interfase aire-líquido. Forma monocapas muy estables y cataliza la inserción de fosfolípidos a la interfase aire-líquido desde la subfase, aunque con menor eficacia que la SP-B, aunque no parece inducir mezcla del componente lipídico entre vesículas.

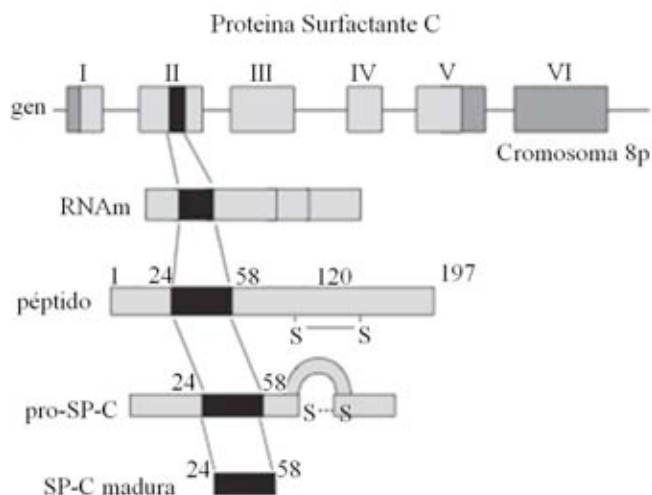


Fig. 2.14 Representación esquemática del gen y biosíntesis de la SP-C. Procesamiento hasta formar la forma madura de la proteína, en negro se señalan los exones que codifican la proteína madura y en gris los que no se copian en RNAm [8].

El modelo de interacción con los lípidos propuesto para la SP-C se basa en la existencia de un dominio hidrofóbico que penetra en el interior de la bicapa, probablemente a través de una α -hélice transmembranal y de la asociación del dominio N-terminal mediante interacciones electrostáticas con las cabezas polares de los fosfolípidos.

Se le atribuyen funciones, tales como el incremento en la velocidad de adsorción de los fosfolípidos a la interfase aire-líquido y el aumento en la estabilidad de la monocapa a los máximos valores de compresión. Aislado la SP-C madura a partir de LBA porcino y combinando con vesículas multilamelares de DMPC, se ha observado que la proteína mejora la tasa de adsorción de los lípidos en la interfaz aire-agua [44].

Una forma de ver la capacidad de la proteína para alterar la organización normal de los lípidos es por medio de calorimetría diferencial de barrido⁴ (CDB) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de deuterio. Por CDB se ha demostrado que la proteína causa una disminución en la temperatura máxima (T_m) y una ampliación de la transición de fase en vesículas puras de DPPC. En una concentración de proteína del 8% (p/p), el cambio en la entalpía de transición disminuye de 4.4 kcal/mol a 6.3 kcal/mol con respecto a lípidos puros [44]. El incremento de T_m es mucho más significativo para vesículas ácidas. Estos resultados indican que la SP-C penetra en el interior de la bicapa, perturbando el empaquetamiento de las cadenas de acilo, y por otra parte, interacciona con las cabezas polares de los fosfolípidos por interacciones electrostáticas.

Utilizando CDB para medir los cambios en las propiedades termodinámicas de vesículas multilamelares se ha demostrado que en presencia de cualquiera de las proteínas SP-B o SP-C (obtenidas de LBA de perro adulto) en DPPC o DPPG el perfil calorimétrico de estas vesículas se amplía y hay una reducción de la entalpía de transición en una forma dependiente de la concentración. Con ambas proteínas, el pico de la transición de fase cambia a un valor más alto, presentando un aumento mayor en DPPG que con DPPC. [45].

Proteínas Membranales

– Proteína ABCA3

La proteína ABCA3, perteneciente a la familia de proteínas transportadoras de diferentes sustancias a través de membranas celulares ABC (*ATP Binding Cassette*), es una molécula de 1,704 aminoácidos, con una masa molecular de entre 150 a 191kDa, dependiendo de la especie. Es una proteína que es propia del pulmón, y se encuentra en la membrana de los cuerpos lamelares de los neumocitos II. Tiene un papel importante en la formación de los cuerpos lamelares y es un transportador de los componentes lipídicos del surfactante pulmonar, principalmente del DPPC. Esta se expresa en los límites de los cuerpos lamelares, y es regulada por glucocorticoides. Al ser secretado el surfactante, esta proteína se queda dentro de la célula.

⁴ Se explica la técnica en la sección 2.4.5

La ausencia de ABCA3 altera el transporte y el metabolismo de las proteínas surfactantes B y C, pero sin mutación de sus respectivos genes codificantes, pues se ha demostrado que al igual que los recién nacidos con deficiencia de SP-B, aquellos con ausencia del gen que codifica a la proteína ABCA3 presentan una deficiencia en la SP-C madura, provocando el síndrome de dificultad respiratoria aguda, por lo tanto los recién nacidos de término no responden al tratamiento exógeno. En la microscopía electrónica se ven depósitos densos en los cuerpos lamelares, además son muy pequeños, lo que sugiere que la ABCA3 participa en su desarrollo estructural (véase Fig. 2.15) [14].

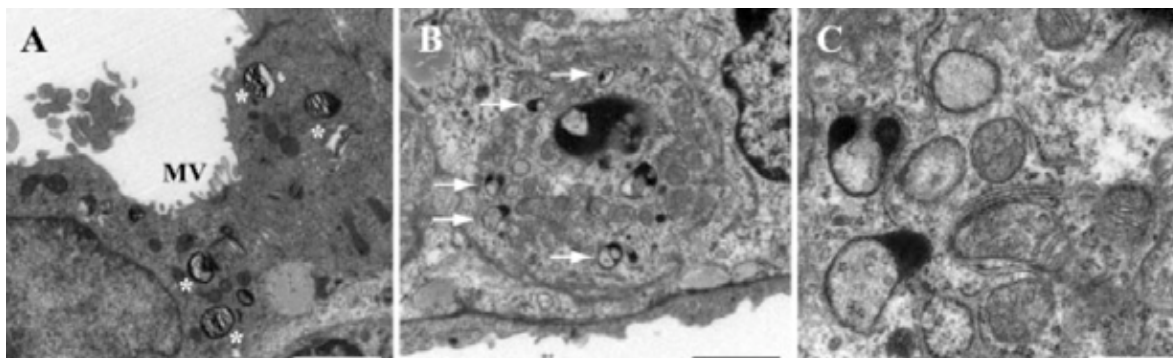


Fig. 2.15 Cuerpos Lamelares malformados. A nivel ultraestructural. (A) Cerca de las microvellosidades (MV), de los neumocitos tipo II control, se observan cuerpos lamelares bien formados, a punto de ser secretados. (B) Neumocitos tipo II con ausencia de la proteína ABCA3, se observan cuerpos lamelares pequeños como organelos distribuidos por toda la célula. (C) Aumento de (B) [14].

– Anexinas

Las proteínas de la familia de las anexinas se caracterizan por su unión a los fosfolípidos de la bicapa lipídica de forma de calcio-dependiente, a través de una estructura altamente conservada, de 70 aminoácidos, llamada *repetición anexina*, éstas están implicadas en la exocitosis. Se ha demostrado que la anexina II es necesaria para la exocitosis de los CL [36], esta puede estar presente en el citoplasma del NTII de dos formas: como monómero de peso de 38kDa o como heterotetrámero (dos monómeros de 38kDa y dos péptidos p11). Estas dos formas de la proteínas estimulan la secreción de PC.

2.2.3. Estructura del Cuerpo Lamelar

Los cuerpos lamelares son el organelo de almacenamiento intracelular del surfactante. El surfactante comienza como cuerpos multivesiculares, que se fusionan dando lugar a los cuerpos lamelares. Se ha demostrado la presencia de precursores de la SP-B en cuerpos multivesiculares, mientras que en los cuerpos lamelares sólo aparece la forma madura de la proteína [37], lo que sugiere que existe una sucesión temporal entre ambos orgánulos [38]. También se ha detectado la presencia de precursores de la SP-C en los cuerpos multivesiculares (véase Fig. 2.16) [52].

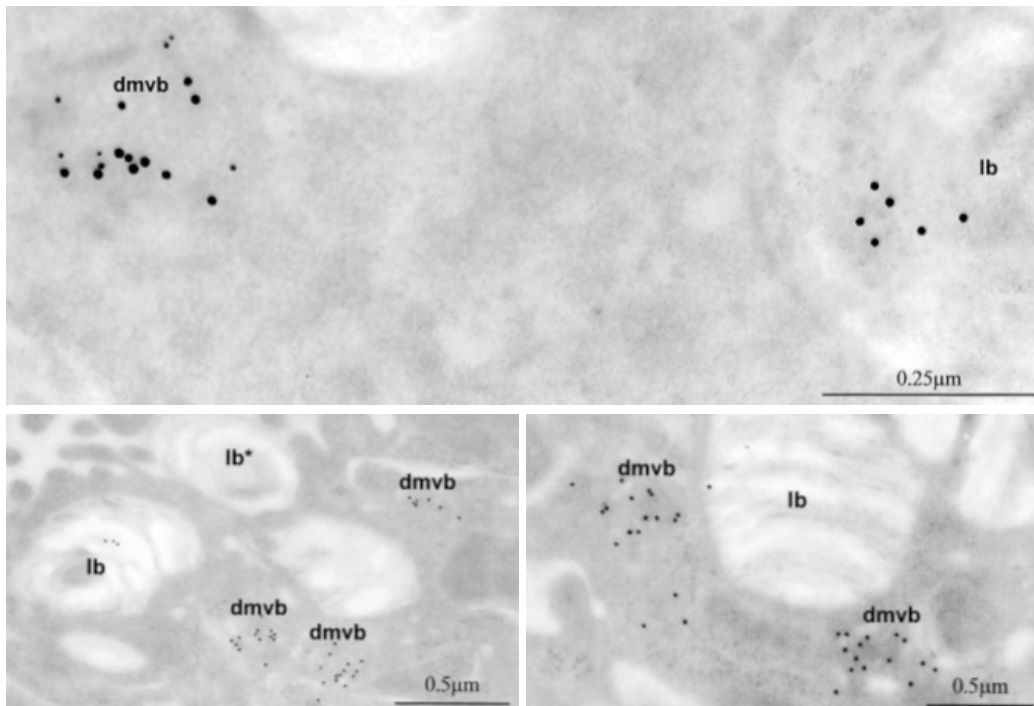


Fig. 2.16 Localización de proSP-C N-terminal en NTII por inmunomicroscopía. A nivel ultraestructural proSP-C N-terminal es detectada en varios cuerpos multivesiculares electrodensos (dmvb) y en poca cantidad en cuerpos lamelares [52].

Se desconoce en dónde se produce el ensamblaje de la SP-A y los fosfolípidos. Aunque los cuerpos lamelares tienen SP-A, es posible que existan dos vías de secreción de la SP-A; una de ellas necesita el ensamblaje con lípidos y las proteínas hidrofóbicas en los cuerpos lamelares, y la otra se produciría por medio de otras vesículas de secreción distintas de los cuerpos lamelares.

Cuando se observan mediante microscopía electrónica los cuerpos lamelares, éstos aparecen como lamelas lipídicas concéntricas rodeadas por una membrana limitante, compuestos de fosfolípidos, proteoglicanos y proteínas. Se observa una zona central electrodensa, donde se encuentran las proteínas hidrofóbicas. También se observa material amorfo entre las lamelas y debajo de la membrana limitante [53].

2.3. Lípidos en Fase Lamelar

2.3.1. Moléculas Anfifílicas

Como cualquier tipo de sustancia, los lípidos pueden, en función de la temperatura y la presión, sufrir cambios de estado, desde la estructura sólida organizada a la estructura líquida desorganizada. No obstante, los lípidos de membrana muestran una característica distintiva que es su particular habilidad para adoptar un estado de agregación intermedio, pues estos forman parte de lo que se conoce como moléculas anfifílicas, las cuales al aumentar de concentración, tenderán a autoasociarse, y este comportamiento puede dar lugar a la formación de distintas estructuras dependiendo de distintos parámetros.

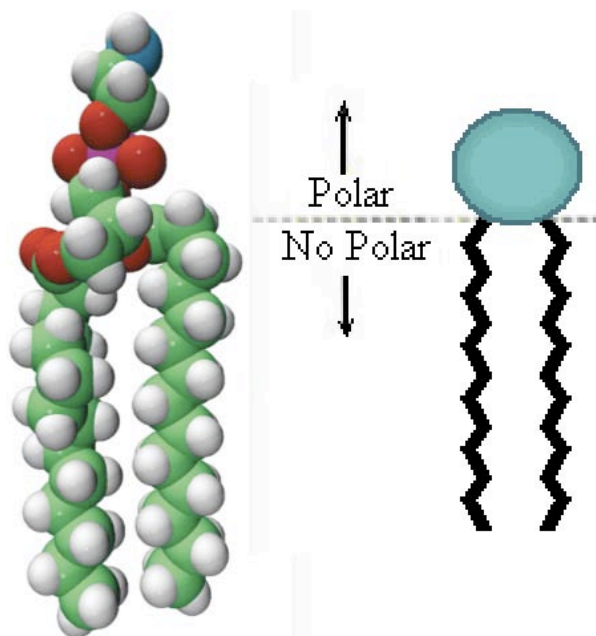


Fig. 2.17 Molécula anfifílica.

Esquema de la estructura de una molécula anfifílica (DPPC), en el que se muestran las regiones denominadas como cabeza hidrofílica (polar) y cola hidrofóbica (no polar).

Estas moléculas anfifílicas poseen una estructura muy característica, la cual se constituye por dos porciones completamente diferentes. Una de ellas forma la cabeza hidrofílica y la otra la cola hidrofóbica, unidas entre sí mediante un enlace covalente (Fig. 2.17). Dentro de un medio acuoso, las moléculas anfifílicas tienden a agruparse formando estructuras supramoleculares. Estas moléculas, primeramente tenderán a encontrarse en la interfase aire-agua. Las cabezas hidrofílicas estarán en contacto con el agua, mientras que las colas hidrofóbicas evitarán el contacto, apuntando hacia el aire (Fig. 2.18).

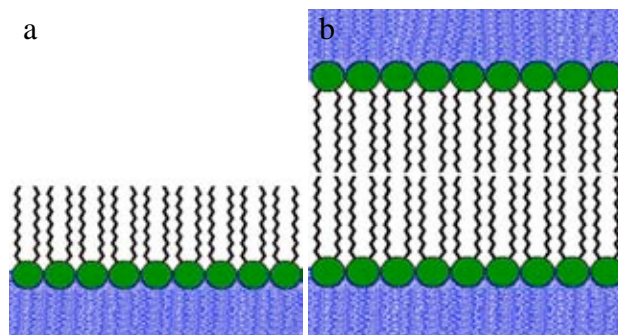


Fig. 2.18 Organización de las moléculas anfifílicas.
 (a) En un medio acuoso forman monocapas y (b) forman bicapas en dos medios acuosos.

Tensoactivos

Dentro de las moléculas anfifílicas se encuentran ciertas sustancias químicas que tienen la propiedad de reducir la tensión superficial de un medio en el que se encuentren disueltos, ya que son adsorbidas en la interfase; a estas sustancias se les denominan tensoactivos.

Los tensoactivos se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de su cabeza polar (Fig. 2.19), en:

- **Iónicos**, que dependiendo de la carga que permanezca en su grupo polar, como resultado de la disociación efectuada al encontrarse en solución acuosa, se dividen en:
 - Aniónicos, que presentan carga negativa en el extremo del grupo hidrófobo, es decir que los constituyentes aniónicos (sulfonatos, sulfatos, fosfatos, etc.) permanecen unidos a la fracción orgánica compuesta por una cadena alquílica lineal o ramificada.
 - Cationicos, se disocian en un catión anfifílico y un anión generalmente del tipo cloruro, bromuro, hidroxilo o sulfato; la cadena hidrofóbica derivada de sales de amonio cuaternario o sales alquilaminas, contiene desde 8 a 25 átomos de carbono.
- **No iónicos o neutros**, que poseen una cabeza polar formada por grupos polares no ionizados tales como alcohol, tiol, éster o éter que se disocian en soluciones no cargadas eléctricamente; esta característica los hace compatibles con otros tipos de surfactantes y permite su incorporación a formulaciones complejas debido a que no interactúan con otros compuestos químicos y/o elementos en solución y en suspensión.
- **Zwiteriónicos**, son aquellos que pueden cargarse tanto positiva como negativamente. Esto se debe a que su cabeza polar posee estructuras que al disociarse pueden presentar tanto carga negativa como positiva. El signo de esta carga dependerá del pH del medio en que se encuentre la molécula, ejemplo de este grupo es la dodecil betaína.

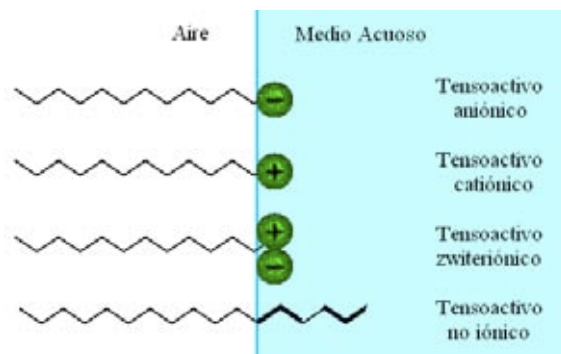


Fig. 2.19 Clasificación de los tensoactivos.

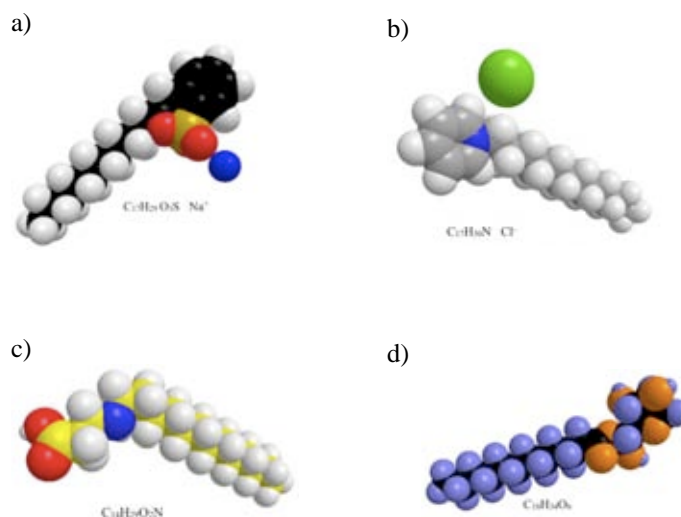


Fig. 2.20 Ejemplos de tensoactivos.

a) Aniónico, dodecil benceno sulfonato de sodio, b) catiónico, cloruro de n-dodecil piridina, c) zwitteriónicos, dodecil betaína, d) no iónico, laurato de sorbitán.

Cotensoactivos

Los cotensoactivos son moléculas pequeñas que poseen una estructura similar a la de los tensoactivos, con su parte polar y otra no polar, pero a diferencia de los tensoactivos no son capaces de autoensamblarse al encontrarse en solución acuosa. Sin embargo, los cotensoactivos afectan de manera notoria las estructuras supramoleculares formadas por los tensoactivos.

Los cotensoactivos utilizados en sistemas de tensoactivos son generalmente alcoholes de cadena corta (entre 5 y 10 carbonos). Estos se acomodan entre las moléculas de tensoactivo ocasionando cambios en la curvatura de los agregados formados por éste último, y por lo tanto, también en la morfología de los mismos (Fig. 2.21).

Las estructuras anfifílicas pueden presentar un comportamiento tipo sólido, de manera general se comportan como fluidos sin perder su organización, es decir, adoptan un estado de agregación intermedio, denominado *crystal líquido*, que es un intermedio entre el estado cristalino y el estado líquido.

Por lo tanto las estructuras anfifílica pueden encontrarse en distintos estados de agregación (Fig. 2.23), como son:

- Fase Cristalina, moléculas perfectamente ordenadas, que existen a temperaturas muy bajas, estando las moléculas inmóviles.
- Fase Gel, los monómeros tienen movilidad intermedia entre las de fase cristalina y de cristal líquido.
- Fase de Cristal Líquido, las moléculas están totalmente desordenadas y sus cadenas interaccionan entre sí y se entrelazan, pero poseen un orden en la orientación molecular; esta es la fase en la que predominan las membranas biológicas.

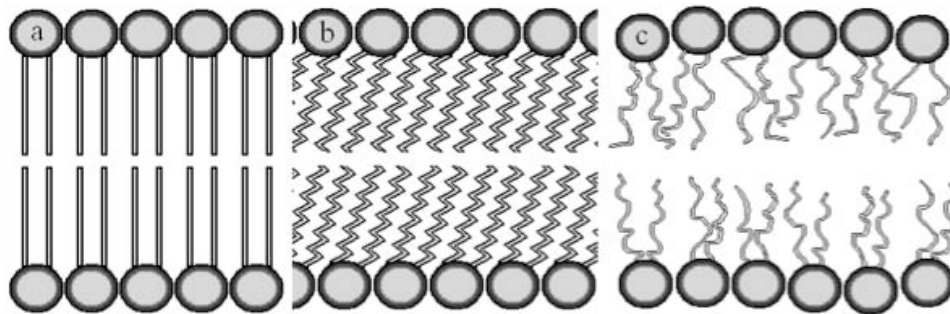


Fig. 2.23 Estados de agregación.
a) fase cristalina, b) fase gel, c) fase cristal líquido.

2.3.3. Fase de Cristal Líquido

A diferencia de los líquidos ordinarios, en los cristales líquidos las moléculas o iones que los forman se disponen de manera relativamente ordenada, poseen un orden de largo alcance en lo que respecta a la orientación molecular y un desorden en lo referente a la posición de las moléculas. Las fases líquido cristalinas se clasifican en dos grandes grupos: termotrópicas y liotrópicas.

Los cristales líquidos termotrópicos (del griego *thérme*, calor, y *tropé*, cambio) se forman al calentar ciertos sólidos a una temperatura característica para cada sustancia [55].

Los cristales líquidos liotrópicos (del latín *lyo*, hacer líquido) se presentan en un intervalo específico de temperatura cuando algunas sustancias se dispersan en un líquido. Para una temperatura fija, este tipo de cristal líquido aparece en un intervalo de concentración [55].

Los sistemas liotrópicos más comunes están constituidos por dispersiones de tensoactivos en agua. También pueden formar parte de las fases liotrópicas otras sustancias anfifílicas, tales como alcoholes y ácidos grasos, aminas y esteroides, cuyas moléculas se mantienen unidas a las del tensoactivo por fuerzas intermoleculares de Van der Waals y enlaces por puentes de hidrógeno. Este tipo de fases líquido cristalinas aparecen en sistemas biológicos, en los que las sustancias dispersas son proteínas, fosfolípidos, colesterol, entre otros [56].

Las fases liotrópicas pueden tener una estructura altamente *ordenada de largo alcance*. Estas estructuras, que poseen reticulados uni, bi y tridimensionales, fueron clasificadas por Luzzati, donde el tipo de red se denota por: L para fases lamelares, H para fases hexagonales y Q para fases cúbicas. Subíndices I y II denotan la topología de la fase, I para fases normales (aceite en agua) y II para fases inversas (agua en aceite). Un sufijo griego denota la conformación de las cadenas hidrocarbonadas: α para tipo líquido, β para conformación ordenada tipo gel, $\alpha\beta$ para coexistencia de líquido y gel, y δ para conformaciones de cadena en forma de hélices, y por último, el sufijo *c* denota empaquetamiento cristalino [57].

También las fases liotrópicas pueden presentar estructuras con *orden de corto alcance*, pues las cadenas hidrocarbonadas pueden adoptar distintas conformaciones, que dependen de la temperatura y del contenido de agua. Las más comunes son: de conformación similar a la de los líquidos (tipo α), que es altamente desordenada; de cadenas elongadas con libre rotación (tipos β y β'), las cadenas hidrocarbonadas, que se encuentran completamente elongadas, se disponen en un retículo bidimensional hexagonal; de cadenas con un enrollamiento helicoidal (tipo δ), las cadenas hidrocarbonadas se encuentran enrolladas, posiblemente formando hélices; de conformaciones mixtas (tipos γ y $\alpha\beta$), la conformación de la cadena es heterogénea y se observan dominios de diferentes tipos de conformación que involucran a cadenas enteras o parte de una cadena. Esta conformación es muy común en los lípidos con cadenas de diferente composición.

De las fases liotrópicas conocidas, sólo se describirán las de importancia para este trabajo, las fases líquido cristalinas liotrópicas y de las fases gel asociadas.

2.3.4. Geles Lamelares

En la fase gel (L_β), las cadenas hidrocarbonadas se disponen perpendicularmente a las capas, con un área disponible para los grupos polares cercano a 0.2 nm^2 por cadena. La fase $L_{\beta'}$ es la versión inclinada de la L_β . La inclinación de las cadenas hidrocarbonadas surge del acomodamiento de las moléculas que poseen grupos polares con áreas transversales elevadas. En la fase gel ondulada ($P_{\beta'}$), las láminas se deforman con una modulación periódica, como se puede observar en la Fig. 2.24.

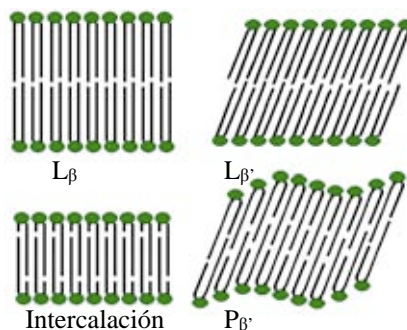


Fig. 2.24 Fases Gel.

2.3.5. Fase Lamelar Fluida

Un cristal líquido liotrópico en fase lamelar (L_a) puede ser descrito como varias membranas fluidas apiladas una sobre otra, separadas por láminas acuosas (Fig. 2.25), caracterizándose por su relativa fluidez a pesar de su alta concentración de moléculas anfifílicas. Esta organización no rígida de la zona hidrófoba, permite la difusión lateral y una cierta libertad de rotación a lo largo del eje de la cadena hidrocarbonada en una larga escala de tiempo. Las fuerzas que actúan entre las bicapas determinan el grosor de la capa acuosa. En algunos sistemas, la distancia promedio (d) entre ellas puede tener un valor de micras, mientras que en otros, es de apenas algunos nanómetros. El espesor de las bicapas es cercano a la longitud máxima de las cadenas hidrocarbonadas.

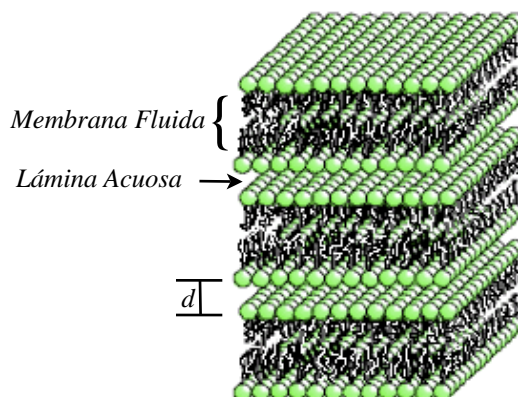


Fig. 2.25 Fase lamelar. Representación esquemática de una fase lamelar, se observan varias membranas fluidas apiladas una sobre la otra, separadas por láminas acuosas.

Al calentar la fase gel por encima de una cierta temperatura, ésta se convierte en fase lamelar fluida, a esta temperatura se le denomina *temperatura de transición* o temperatura de fusión, T_m , que está bien definida si el sistema es monocomponente. En esta transformación, las cadenas hidrocarbonadas experimentan un proceso semejante al de una fusión y adquieren una conformación similar a la de los hidrocarburos líquidos (véase Fig. 2.26). En algunos lípidos, la fase gel pasa por calentamiento a una fase no lamelar, como la hexagonal inversa (H_{II}) o una de las cúbicas [57].

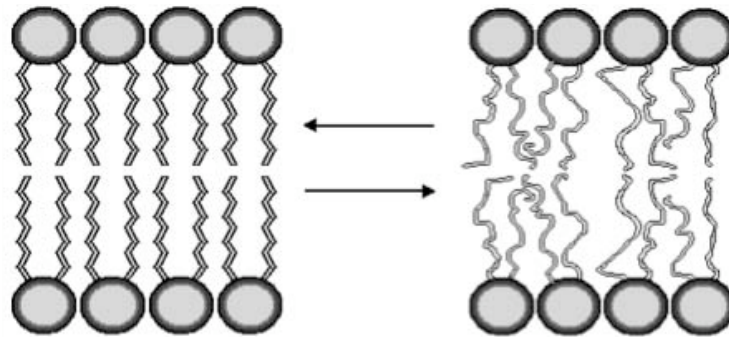


Fig. 2.26 Transición gel–cristal líquido.

Al calentar la fase gel por encima de una cierta temperatura, ésta generalmente se convierte en la fase lamelar fluida, produciendo una ruptura en las interacciones de Van der Waals, por lo que sus cadenas hidrocarbonadas se encuentran en un desorden similar al de los hidrocarburos líquidos.

En disoluciones isotrópicas, la estructura en capas de la fase lamelar puede existir en forma de vesículas. Dependiendo de la naturaleza de estas vesículas, se puede distinguir entre vesículas unilamelares pequeñas, unilamelares grandes y multilamelares (Fig. 2.27).

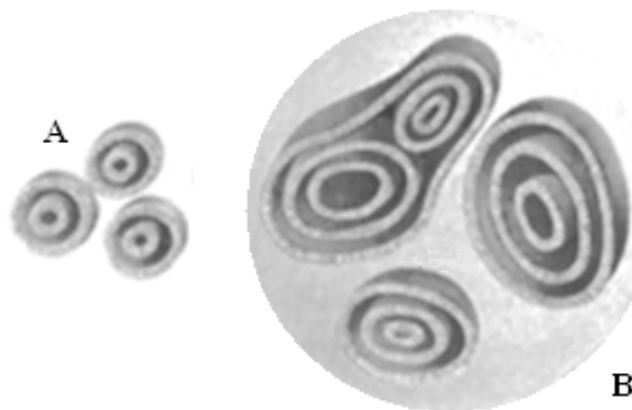


Fig. 2.27 Vesículas lamelares.

(A) Vesículas unilamelares, (B) liposomas multilamelares.

Las vesículas tienden a darse más fácilmente para sistemas con número de agregación de surfactante ligeramente inferior a uno. La diferencia en energía libre entre las diferentes estructuras es con frecuencia muy pequeña, así que pequeños cambios en la temperatura o en la composición del sistema causan la transformación de una estructura en otra.

2.4. Caracterización Fisicoquímica de Vesículas Lamelares

2.4.1. Difracción de Rayos X

Para caracterizar las vesículas lipídicas en fase lamelar, se requiere de técnicas de alta resolución. Entre las técnicas utilizadas y que aportan gran información se encuentra la difracción de rayos X o neutrones, que es muy útil para conocer la distancia de repetición de los componentes de las bicapas. En una fase lamelar, los planos de simetría son paralelos, así que las reflexiones de mayor orden son múltiplos simples de las de primer orden [55].

La difracción de rayos X en pequeño ángulo da información sobre la estructura de cada una de las fases líquido cristalinas. La diferencia con las técnicas de difracción de rayos X convencionales es el reducido valor del ángulo entre la dirección del haz de rayos X incidente y los planos que producen la difracción. Los bajos valores de estos ángulos son una consecuencia de que las distancias entre los planos cristalinos de una misma familia, son apreciablemente mayores en los cristales líquidos que en la mayoría de los sólidos cristalinos [57][58].

Una técnica análoga es la microscopía de luz polarizada, que emplea una platina calentable, pues en cuerpos anisotrópicos, que están en fase cristal líquido no cúbicas, presentan el fenómeno de la birrefringencia, un rayo de luz incidente se divide en otros dos que están polarizados perpendicularmente entre sí. Si el rayo de luz incide paralelamente a una cierta línea, en el eje óptico ocurre una refracción sencilla y no doble. Este fenómeno es el responsable de la imagen adquirida por el microscopio de luz polarizada, denominada textura óptica, que se observa al cruzar los polarizadores. La textura óptica se debe a la orientación superficial de los directores en los límites de la muestra y a los defectos en su estructura cristalina, como se observa en la Fig. 2.28 [59].

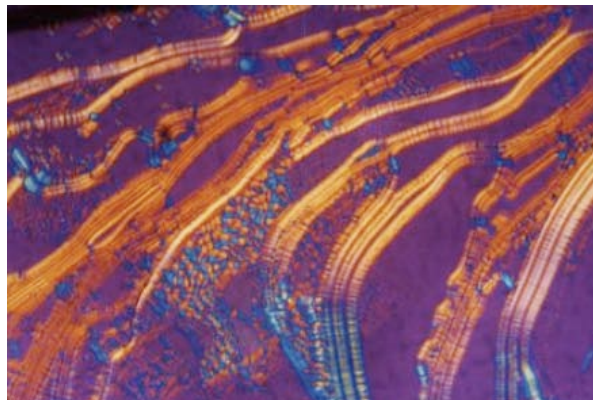


Fig. 2.28 Texturas de la Fase Lamelar.

Se observan como líneas oleosas bajo el microscopio polarizante [60].

2.4.2. Microscopía

Sirve para obtener información cualitativa sobre la estructura de la fase. Muchas técnicas microscópicas aportan una visualización directa de las estructuras de bicapa.

Microscopía Electrónica

Se puede usar microscopía electrónica, que permite ver directamente las vesículas de la muestra, pudiéndose apreciar el tipo de vesículas (simples o formadas por más de una bicapa) y algunas de sus propiedades, por ejemplo, la resistencia de la bicapa o su flexibilidad. Además, al conocer perfectamente la escala de la lente, se puede tener buena idea del tamaño de las partículas o vesículas observadas. La microscopía electrónica de barrido puede mostrar detalles de la superficie del liposoma.

La microscopía electrónica de transmisión (MET) muestra la bicapa en un corte transversal si se analizan cortes finos en una matriz de material plástico. La MET da imágenes de mucha más resolución. Las muestras para la MET se suelen preparar de dos formas que aumentan considerablemente la capacidad de visualizar microestructuras surfactantes. Ambas dependen de la habilidad de congelar una estructura tan rápido que no le dé tiempo a reorganizarse:

- Crio-MET: congelando la muestra a la temperatura del N líquido, pues la estructura en capas de la fase lamelar ya que esta fase es birrefringente y su único eje óptico es perpendicular a las capas [55][61].
- FF-MET: haciendo una réplica de la muestra congelándola, cortándola en vacío y vaporizando sobre ella platino y carbono (Fig. 2.29) [53].



Fig.2.29 FF-MET de un Neumocito Tipo II.

Se observan Cuerpos Lamelares (LB) bien caracterizados, más que otros organelos celulares [53]

2.4.3. Técnicas de Resonancia Magnética Nuclear

Muchas de las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) permiten estudiar el orden molecular en una bicapa, pues es una herramienta muy útil para estudiar la asociación molecular entre los componentes de la estructura en cuestión. Entre las técnicas de RMN esta la espectroscopía de RMN de deuterio, con la que se puede obtener información detallada de cristal líquido laminar.

2.4.4. Medida de las Fuerzas Interbicapa

Las medidas de las fuerzas interbicapa juegan un importante papel a la hora de probar teorías sobre las interacciones superficiales. Para realizar estas medidas se utilizan las siguientes técnicas:

- Técnica del Estrés Osmótico, que consiste en variar la presión osmótica que cambiará el hinchamiento del cristal líquido laminar. Se pueden medir los cambios estructurales por difracción de rayos X, y las medidas dan una relación entre la presión osmótica y la distancia de repetición laminar, lo que puede llevar a conocer el grosor de la capa del solvente, determinando la separación media entre las superficies, mientras que las bicapas son libres para fluir.
- Aparato de Fuerzas Superficiales, se miden las fuerzas que interaccionan en las pequeñas distancias (de 0 a 10^3 nm).
- Técnica de Aspiración de Pipeta, la cual permite determinar las propiedades mecánicas de vesículas aisladas y las energías de contacto de vesículas adherentes.

2.4.5. Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido (CDB) puede usarse para estudiar los cambios de fase en los sistemas de bicapa. Esta técnica permite la caracterización termodinámica de los cambios conformacionales inducidos por cambios de temperatura en proteínas [62][63], ácidos nucleicos [64] biomembranas y membranas artificiales [65].

La CDB, es una técnica que permite la caracterización termodinámica a partir de las transiciones de fases de la materia como cristalización, fusión y evaporación, o con reacciones químicas como hidrólisis y oxidación, como función del tiempo y la temperatura.

La técnica es particularmente importante para analizar la transición de gel a cristal líquido, pues se observa un gran pico en esta transición, debido a la alta entalpía asociada con la fusión de las cadenas hidrocarbonadas; esto a partir de un dispositivo conocido como microcalorímetro, el cual consiste básicamente en dos celdas gemelas, una actúa de referencia (que se llena con la disolución tampón en la que se dializa la biomolécula), y la otra contiene la muestra (la disolución de biomolécula en el tampón de referencia), ambas situadas simétricamente dentro de un caparazón metálico diseñado para crear un entorno casi adiabático (véase Fig. 2.30). La temperatura de este caparazón se controla a través de termosensores y efectores apropiados para que esté en todo momento, muy próxima a la temperatura de las celdas. Una termopila de elevada sensibilidad mide la diferencia de temperatura entre las celdas calorimétricas.

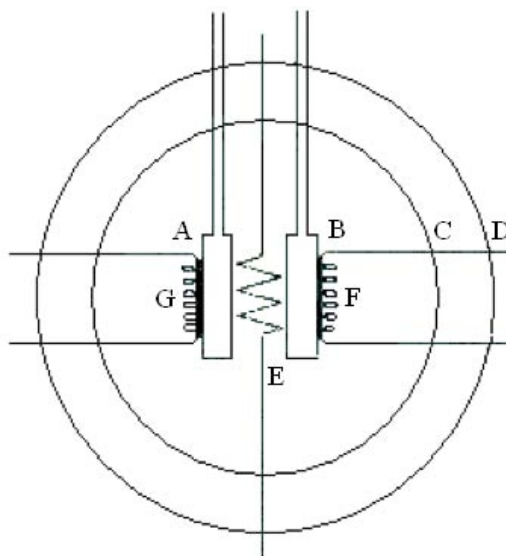


Fig. 2.30 Representación esquemática de un calorímetro: (A, B) celdas donde se coloca la muestra y la solución de referencia, (G, F) termoláminas o resistencia eléctrica laminar para calentar la celda capilar, (E) termopila, (C) cámara interna (adiabática), (D) cámara externa.

Al comenzar un barrido se disipa la misma potencia térmica en cada celda, mediante la apropiada intensidad de corriente que alimenta a dos resistencias eléctricas de valor idéntico, en íntimo contacto térmico con la superficie de cada celda; el valor de esta corriente está fijado por la velocidad de barrido seleccionada. La medida de la diferencia de capacidad calorífica se realiza utilizando un método de compensación simétrica. Este método consiste en un sistema de retroalimentación que usa como señal de error la señal eléctrica generada por la termopila de células cuando se produce algún efecto térmico en una de ellas; el lazo de control se cierra disipando en la resistencia calefactora de la celda mas fría la potencia térmica necesaria para reestablecer la igualdad de temperaturas. De esta forma las dos celdas se mantienen prácticamente a la misma temperatura durante todo el barrido. Para una velocidad de barrido constante el exceso de potencia disipada en la celda de medida es directamente proporcional a la diferencia de capacidad calorífica entre ambas celdas y constituye la magnitud fundamental medida en este instrumento. El principio básico subyacente a esta técnica es que, cuando la muestra experimenta una transformación física se necesitará que fluya más o menos calor a la muestra que a la referencia para mantener ambas a la misma temperatura. Si en la muestra se produce un proceso endotérmico, como una transición de fase (lípidos) o desnaturalización (proteínas) es necesario calentar más la muestra para mantener la diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia igual a cero. Si en la muestra se produce un proceso exotérmico, se produce la situación inversa.

Lo que registra el calorímetro es, de forma continua, la capacidad calorífica relativa de una disolución en función de la temperatura, obteniéndose lo que se denomina como *termograma* (Fig. 2.31), que generalmente está caracterizado por un pico de absorción de calor correspondiente a un proceso o transición térmicamente inducida, que de acuerdo con la segunda Ley de la Termodinámica, corresponde a un proceso endotérmico. Dependiendo de la conformación estructural de la biomolécula, este proceso puede ser rápido o lento, dependiendo de la estabilidad térmica del sistema (Fig. 2.32).

A partir del termograma se tiene como información fundamental la capacidad calorífica relativa de un sistema en función de la temperatura y a partir de ahí se pueden obtener las siguientes propiedades termodinámicas del sistema:

- La temperatura de transición de fase (T_m) que corresponde a la temperatura en la que se alcanza el valor máximo de C_p .
- La entalpía calorimétrica para la transición de fase (ΔH), que es la cantidad de energía absorbida para que tenga lugar el cambio de fase.

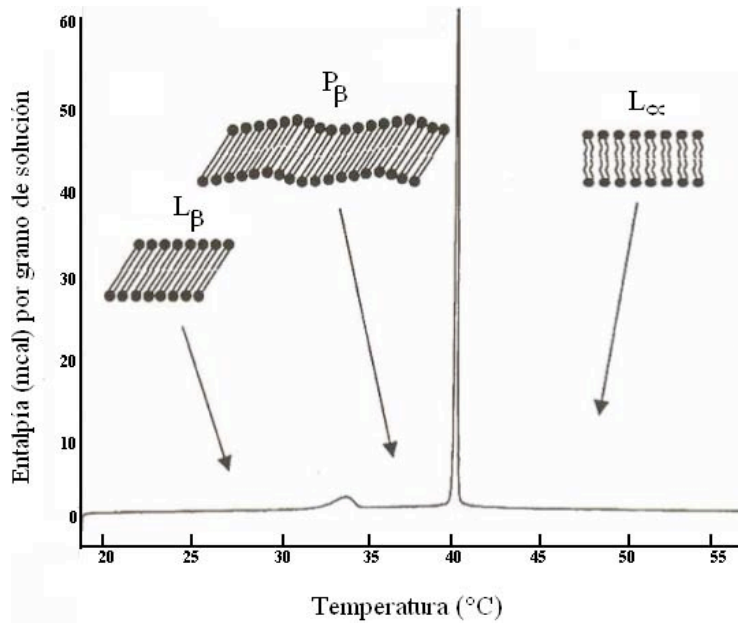


Fig. 2.31 Termograma. Calorimetría de un sistema agua-fosfolípidos (DPPC), se observa que a 34°C pasa del estado gel (L_{β}) a P_{β} , y a 41°C pasa de P_{β} a cristal líquido (L_{α}).

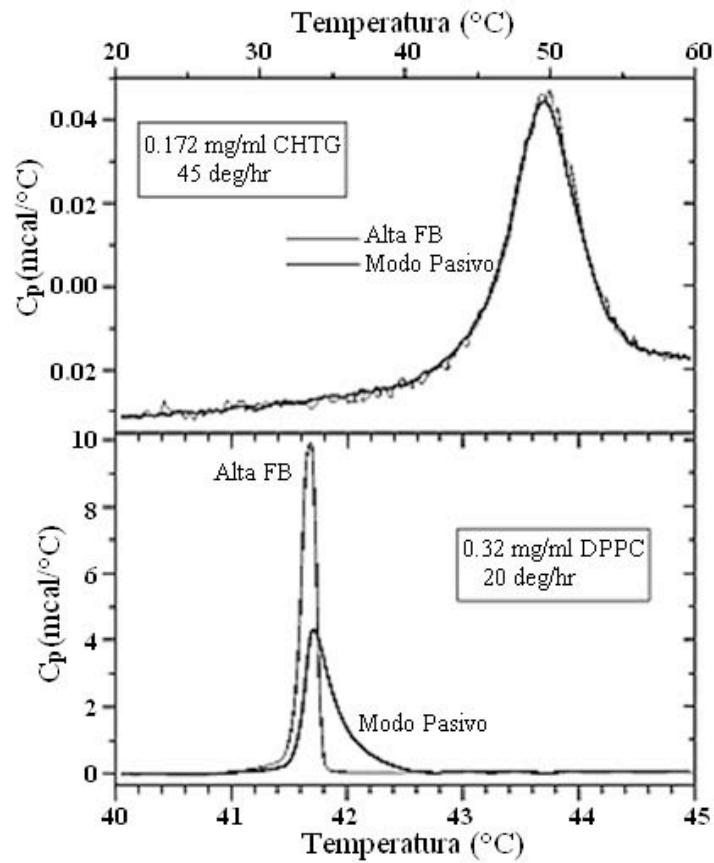


Fig. 2.32 Tiempos de respuesta. (Arriba) Desnaturalización proteica, proceso lento. (Abajo) Transición lipídica, proceso rápido.

A partir de ΔH , se puede obtener la entropía (ΔS) y la energía de Gibbs (ΔG) que en relación con procesos que implican un cambio de fase, determina la espontaneidad de una reacción.

Entonces para poder obtener las propiedades termodinámicas del sistema, a partir de la capacidad calorífica, se considera que:

$$P = cte \quad \text{por lo tanto} \quad dQ = C_P dT,$$

considerando que $dH = dQ + VdP \Rightarrow dQ = dH$ entonces

$$\frac{dQ}{dT} = C_P \Rightarrow \Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_P dT$$

donde T_1 y T_2 son las temperaturas a las que inicia y termina respectivamente el cambio de fase (véase Fig. 2.33). Cabe mencionar que al presentarse discontinuidades en las primeras derivadas de la entalpía libre, indica que ha habido una transición de fase de primer orden.

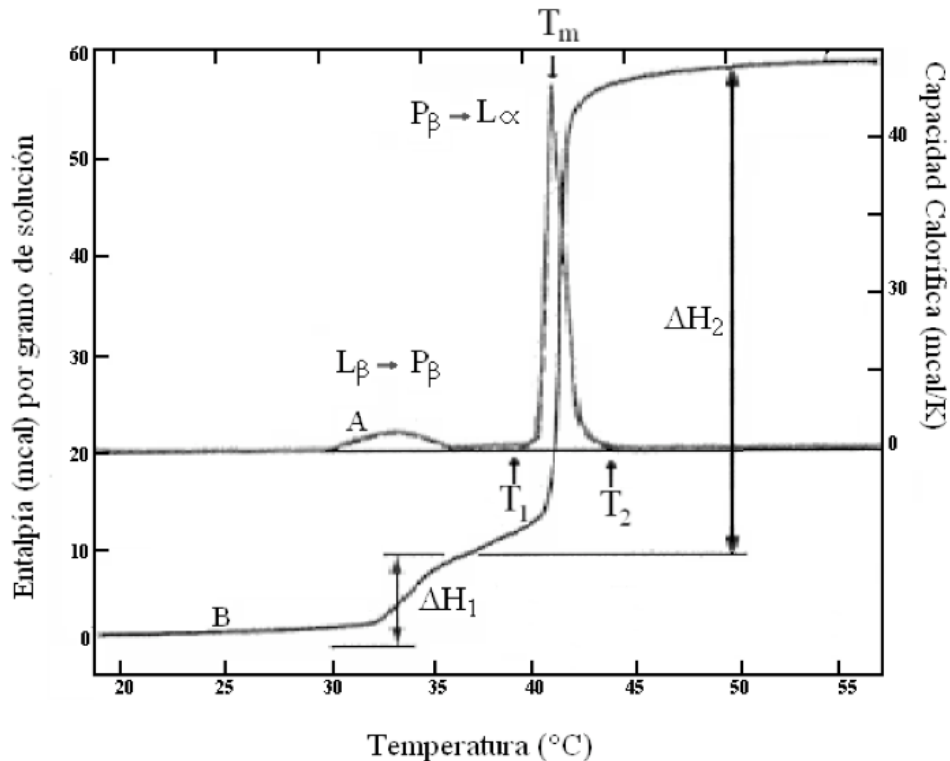


Fig. 2.33 Termograma y curva de Entalpía. Perfil de un sistema agua-lípidos, se observa que en T_1 inicia el cambio de fase, hasta que en T_m pasa de un estado a otro, estabilizándose en T_2 .

Al considerar un proceso reversible, se tiene

$$dG = dH - TdS$$

En $T = T_m$ se tiene que $\Delta G = 0$, entonces a partir de ΔH y T_m se obtiene el valor de entropía, ΔS .

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m}$$

Para cualquier $T > T_m$ se tiene que:

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_m) + \int_{T_m}^T \Delta C_p dT, \quad \Delta S(T) = \Delta S(T_m) + \int_{T_m}^T \Delta C_p d \ln T$$

Calculando la energía de Gibbs para $T > T_m$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T) - T\Delta S(T)$$

Considerando el caso similar para $T < T_m$, se tiene que:

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_m) - (T_2 - T_1)\Delta S(T_m) - T_2 \Delta S(T_2) - T_1 \Delta S(T_1)$$

Los termogramas varían según las propiedades de los lípidos que constituyen la muestra a estudiar, la T_m depende de los distintos grupos de cabeza y ácidos grasos que constituyen los lípidos, para un fosfolípido puro se tiene un valor característico, y en el caso de sistemas compuestos por varios tipos de lípidos, la transición entre los estados sucede en un amplio intervalo de temperaturas.

En el caso de fosfolípidos, aquellos de cadena más larga tendrán una T_m mayor, que aquellos de cadena corta (Fig. 2.34). En caso de tener distintas cadenas saturadas en posición sn-1 y sn-2, se encuentra que la T_m es mayor, si en la posición sn-2 se encuentra la cadena más larga (Tabla 2.3), lo que podría estar relacionado con el empaquetamiento de las cadenas en la bicapa.

En cadena corta o con insaturaciones en sus cadenas hidrocarbonadas produce un descenso de T_m , debido a que una menor longitud de las cadenas reduce la tendencia de las colas a interaccionar entre ellas, y la presencia de dobles enlaces producen torsiones en las colas apolares que pueden facilitar su movilidad. Se sabe que un doble enlace *cis* tiene mayor efecto que un doble enlace *trans*, evitando un gran empaquetamiento, siendo las interacciones de tipo Van der Waals menores, teniendo como consecuencia una T_m menor, aunque también dependerán de la posición del doble enlace. Este efecto es máximo cuando estos dobles enlaces están en medio de la cadena hidrocarbonada [68].

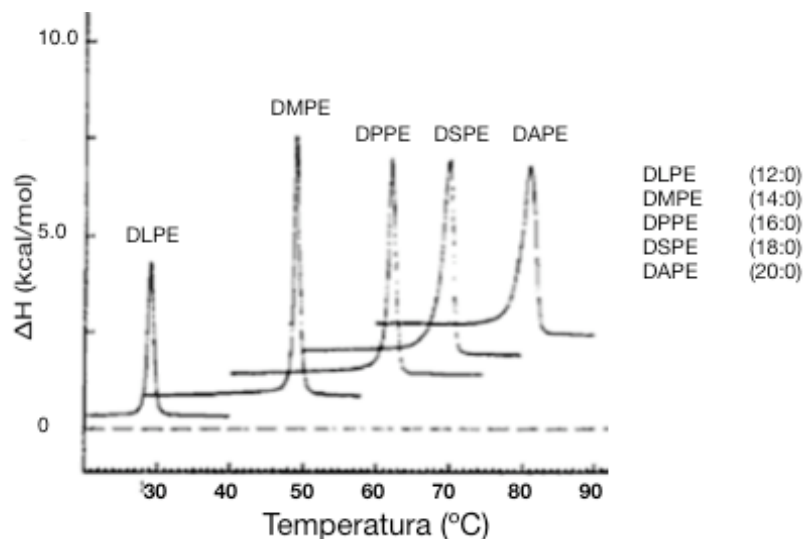


Fig. 2.34 Registros calorimétricos de PE con distintos largos de cadena [67].

Tabla 2.3 Temperatura de transición por tamaño de cadena [67].

sn-1	sn-2	T_m [°C]
PC		
(16:0)	(12:0)	10
(16:0)	(14:0)	28
(16:0)	(16:0)	41
PE		
(16:0)	(16:0)	64
(16:0)	(18:0)	69
(16:0)	(20:0)	72

Los cambios en la cabeza polar afectan a la T_m , ya que cambian la fuerza iónica del medio, pues fuerzas iónicas elevadas reducen las interacciones repulsivas electrostáticas entre los grupos fosfatos en las bicapas (Tabla 2.4). También hay factores que modifican las características de los fosfolípidos, afectando la T_m , como la presencia de cationes divalentes que neutralizan lípidos negativos; y el pH que modifica el grado de ionización de las cabezas polares, como el ácido fosfatídico, un cambio de pH a un valor en que aumenta la carga de la cabeza polar incide en una menor T_m , por ejemplo con un pH de 6 se tiene una $T_m = 65^\circ\text{C}$, con pH de 12, $T_m = 43^\circ\text{C}$ en ácidos fosfatídicos (16:0).

Tabla 2.4 Temperatura de transición cabeza polar. Diferencia de temperatura por cabeza polar del dimiristoil (14:0) [67].

Lípido	T_m [°C]
DMPC	24
DMPE	50
DMPG	23
DMPS	35

Además, la presencia de péptidos también afecta la T_m , pues cuando éstos interaccionan superficialmente ocasionan un incremento en la ΔH y la T_m . Al interaccionar superficialmente, y si hay inserción parcial de éstos en la membrana, producen una disminución en la ΔH y la T_m (Fig. 2.34). Al haber sólo inserción en la membrana, ocasionan una disminución lineal en la ΔH dependiente de concentración de proteína, sin cambios en la T_m (Fig. 2.35) [44][45][69].

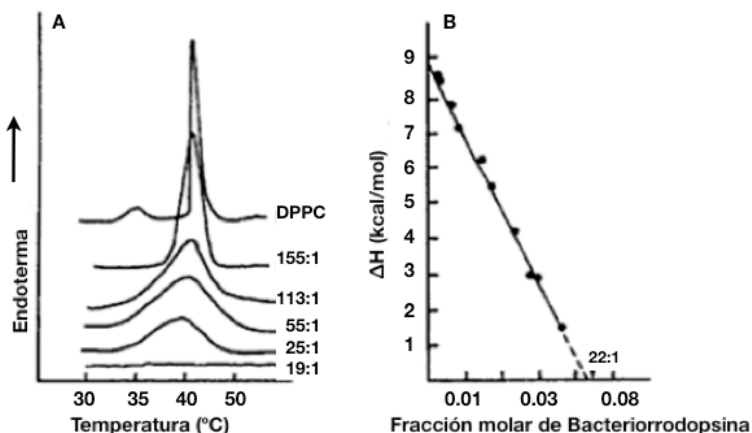


Fig. 2.35 Efecto de péptidos en las transiciones de fase de lípidos.

Al variar las concentraciones de los lípidos, así como agregar péptidos, produce un cambio considerablemente en la T_m del sistema.

(A) Representa el termograma de DPPC pura y mezclas de DPPC y bacteriorrodopsina.

(B) Representa la relación entre ΔH y la fracción molar de la proteína [67].

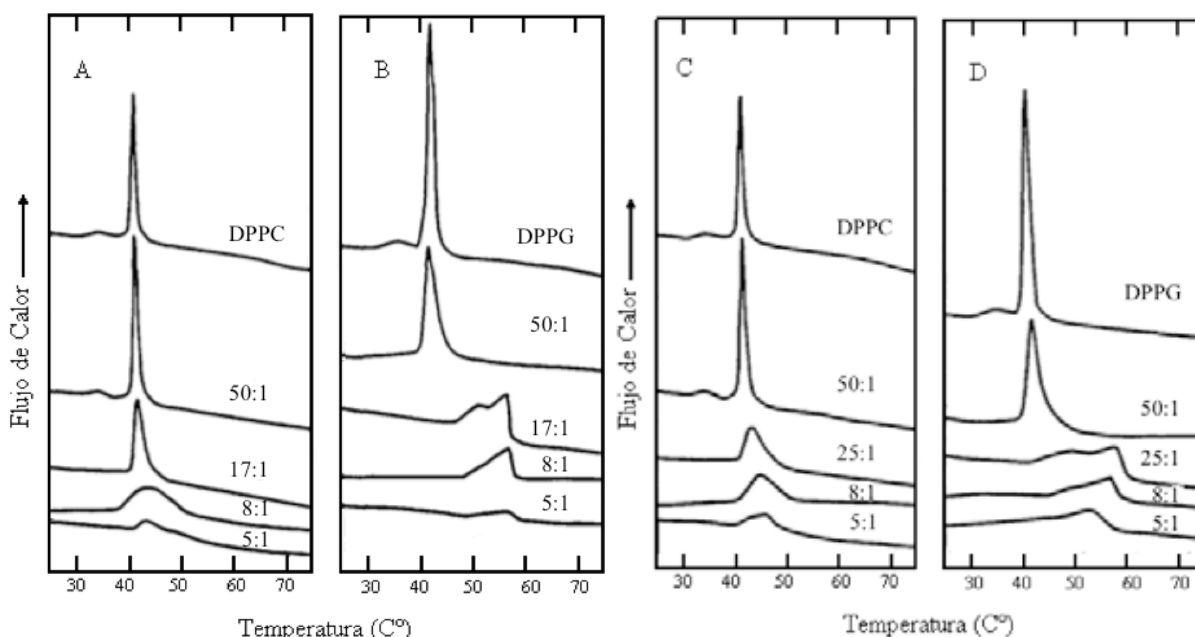


Fig. 2.36 Efectos en la adición de SP-B y SP-C a DPPC y DPPG.

Se presenta el termograma de dos lípidos con distintas concentraciones de proteína (L/P). A: DPPC+SP-B, B: DPPG+SP-B, C: DPPC+SP-C, D: DPPG+SP-C. Se observa una variación en la curva del fosfolípido al ir agregando proteína surfactante [45].

La adición de colesterol a una bicapa de un fosfolípido puro causa un ensanchamiento de la endoterma, la cual desaparece completamente a concentraciones mayores de colesterol (Fig. 2.37). Ésto se debe a que el colesterol reduce el movimiento de las cadenas hidrocarbonadas en bicapas fluidas, disminuyendo la fluidez, en función del volumen de los anillos de la molécula y las interacciones de Van der Waals de la cola hidrocarbonada del colesterol con los ácidos grasos vecinos, pues una molécula de colesterol interactuaría con 7 cadenas hidrocarbonadas y la interacción es mayor con los 9 primeros carbonos saturados de la cadena (Fig. 2.38). En bicapas sólidas el colesterol interfiere con el empaquetamiento *todo trans*, aumentando la fluidez que estaría mediado por el volumen de los anillos de la molécula.

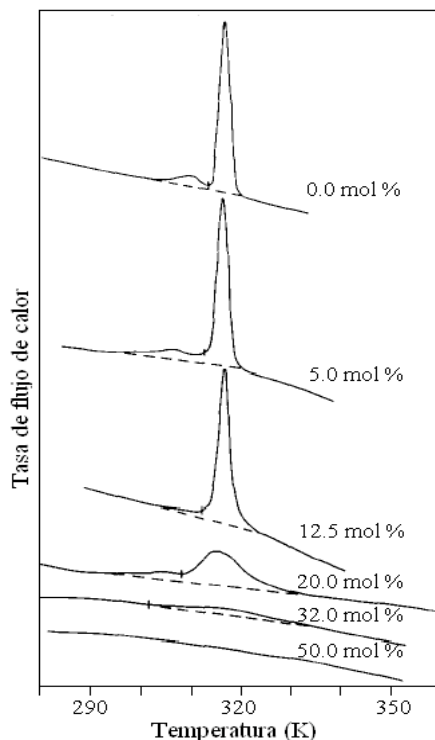


Fig. 2.37 Efecto del colesterol en la transición de fases. Termogramas de soluciones con agua+dipalmitoil-lectina +colesterol, donde los porcentajes indican la cantidad de colesterol en cada solución [69].

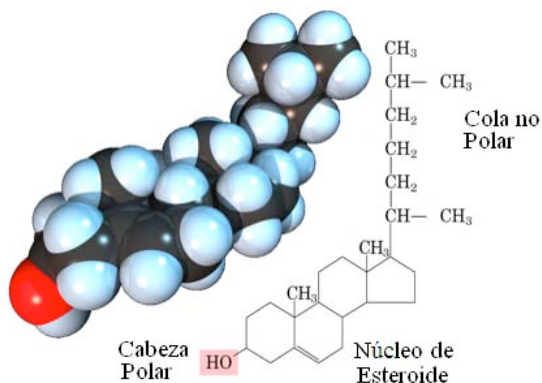


Fig. 2.38 Molécula de colesterol.

2.5. Caracterización Bioquímica de Vesículas Lamelares

2.5.1. Caracterización Proteica. Electroforesis

Una de las técnicas más utilizadas para la caracterización proteica es la electroforesis, la cual es una técnica que consiste en transportar partículas en un campo eléctrico controlado con la finalidad de separarlas según su tamaño y carga eléctrica. Cualquier ión o molécula cargada eléctricamente migrará cuando se someta a la acción de un campo eléctrico. A un pH determinado, muchas moléculas biológicas poseen carga eléctrica, cuya magnitud depende del pH y composición del medio en que se encuentren, por lo cual, es posible separar los diferentes componentes de una mezcla de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas cargadas.

Esta técnica se clasifica en tres tipos:

- Electroforesis de frente móvil o libre, en el que las sustancias a separar se introducen en un tubo en forma de U, disueltas en un tampón de pH y fuerza iónica adecuados. Se colocan dos electrodos para crear un campo eléctrico, de extremo a extremo, provocando que las moléculas de proteína cargadas emigren hacia los electrodos de polaridad opuesta. Las diferentes proteínas se desplazan a velocidades diferentes de acuerdo con sus cargas y coeficientes de fricción respectivos, formándose nubes (o frentes) que se desplazan en la disolución amortiguadora.
- Electroforesis capilar, se lleva a cabo en el interior de tubos capilares (1–10 μm de diámetro). Estos capilares disipan el calor rápidamente permitiendo la aplicación de campos eléctricos elevados, reduciendo así los tiempos de separación.
- Electroforesis de zona, aquí la muestra está obligada a desplazarse sobre un soporte sólido de papel, celulosa o gel. La pequeña cantidad necesaria de muestra permite que las moléculas migren en discretas zonas o bandas. La electroforesis zonal de biomoléculas cargadas, generalmente se lleva a cabo en una disolución estabilizada con un medio que sirve de soporte.

Electroforesis en Gel

Este tipo de electroforesis se halla entre los métodos más resolutivos y convenientes para la separación de macromoléculas. Estos pueden ser de agarosa o poliacrilamida (véase Fig. 2.38), este último se forman por polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Estos geles de poliacrilamida son transparentes, con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante un tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro.

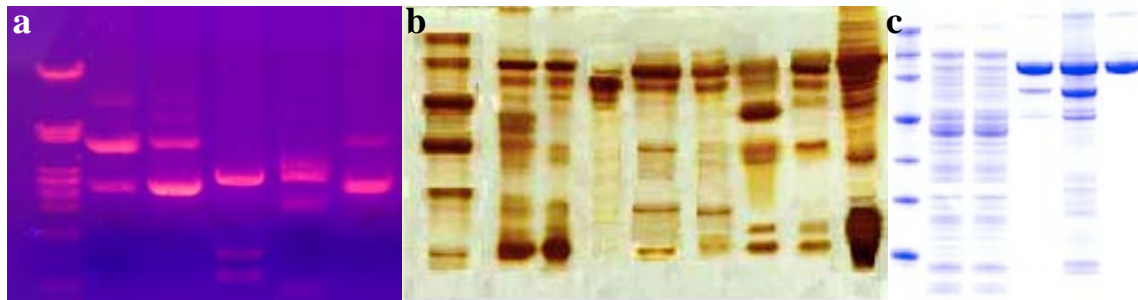


Fig. 2.39 Electroforesis en Gel. (a) Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, (b) Gel de poliacrilamida de 6% teñido con plata, y (c) Gel de poliacrilamida de 12% teñido con azul de Coomassie. La primera banda de la izquierda es un indicador de pesos moleculares, el porcentaje está relacionado con el tamaño del poro, mayor porcentaje indica que los poros son más chicos.

En general estos geles poseen poros de diferentes dimensiones moleculares que delimitan la velocidad de traslado y moléculas trasladadas durante el proceso electroforético. De esta forma, la separación no se produce sólo por las diferentes cargas de las moléculas, sino también por las diferencias de tamaño del poro, que se indica con el porcentaje de acrilamida en gel, mayor porcentaje indica que los poros son más chico (Fig. 2.38b, 2.38c). Los geles están formados por un reticulado de polímeros y el líquido intersticial en el que se encuentra inmersa esta red.

Existe una gran variedad de tipos de electroforesis en gel, que se pueden agrupar en dos categorías:

- Electroforesis en gel en una dimensión (continuo o discontinuo), como son PAGE⁵-nativa, SDS⁶-PAGE (Fig. 2.39) e isoelectroenfoque.
- Electroforesis en gel en dos dimensiones, que combina el isoelectroenfoque (primera dimensión) con la SDS-PAGE (segunda dimensión), como se observa en la Fig. 2.40.

El isoelectroenfoque es un tipo de PAGE en una dimensión que se basa en la separación de moléculas de acuerdo a sus diferentes puntos isoeléctricos.

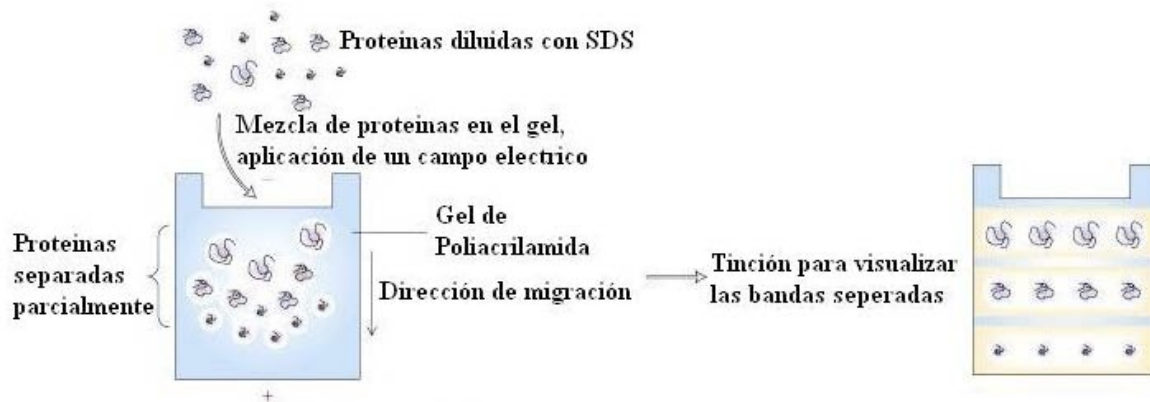


Fig. 2.40 SDS-PAGE. Procedimiento para hacer electroforesis de primera dimensión.

⁵ PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

⁶ SDS: Dodecilsulfato de Sodio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

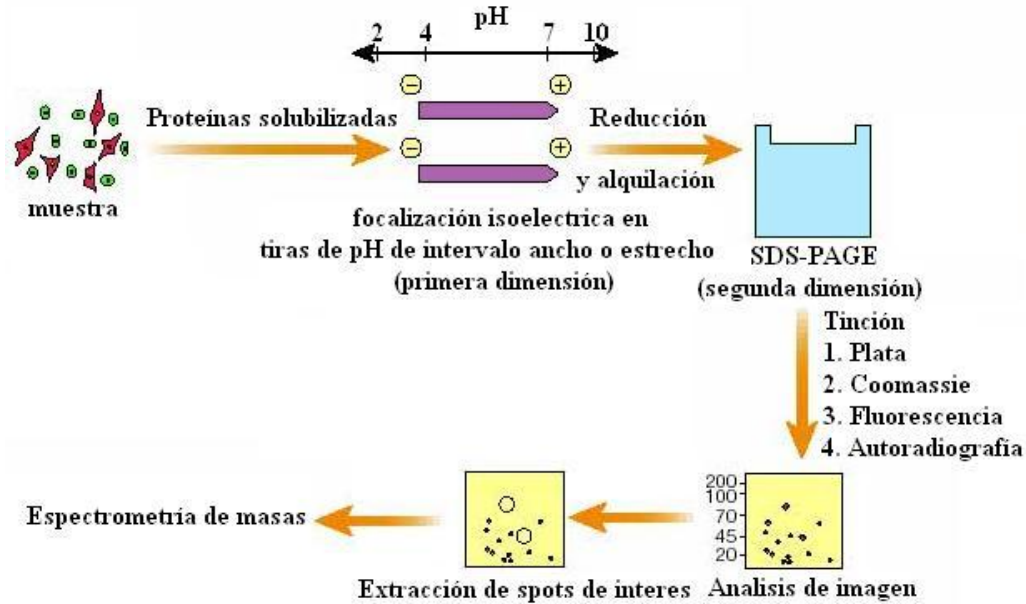


Fig. 2.41 SDS-PAGE 2D. Procedimiento para hacer electroforesis de segunda dimensión.

2.5.2. Caracterización Lipídica. Cromatografía

Entre las técnicas utilizadas para el análisis de lípidos esta la cromatografía, que en general permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos de mezclas complejas. Estos componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye la fase estacionaria, de gran área superficial, que puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido que actúa como soporte, y la otra es un fluido (fase móvil), que puede ser gas, líquido o fluido supercrítico que se usa como portador de la mezcla que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria.

Existen muchas maneras de clasificar los métodos cromatográficos, una clasificación fundamental de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases, de las tres clases generales, está la cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y cromatografía de fluidos supercríticos. Como su nombre indica, las fases móviles en las tres técnicas son líquidos, gases y fluidos supercrítico, respectivamente.

En general la cromatografía líquida se lleva a cabo en una columna de vidrio, la cual está rellena con la fase fija. La separación en columna se hacía usando el flujo gravitatorio como fuerza impulsora de la fase móvil, lo que exigía tiempos de separación largos. La construcción de sistemas impulsores de la fase móvil con mucha presión, y la obtención de rellenos de las columnas cuya actuación es muy eficaz ha permitido tiempos cortos de separación y una gran selectividad.

Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento

Al aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase estacionaria fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. La cromatografía que emplea estos métodos se denomina cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas. Es una de las técnicas de laboratorio más utilizada como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos.

Dependiendo del tipo de fase estacionaria y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, HPLC puede ser:

- a) Cromatografía de adsorción. La fase fija es un sólido y se utiliza casi exclusivamente de sílica; y en mucha menor medida alúmina.
- b) Cromatografía de reparto. Como fase estacionaria se utilizan compuestos unidos químicamente a un soporte sólido de sílica. Se le subdivide en cromatografía en fase normal y fase reversa. En la cromatografía en fase normal, la fase fija es polar y los compuestos menos polares eluyen primero. En la cromatografía en fase reversa, el compuesto unido químicamente es un hidrocarburo alifático y se emplean fases móviles polares. En este caso, las sustancias más polares eluyen primero.
- c) Cromatografía de exclusión por tamaño. La fase fija está formada por partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros y llevan a cabo un fraccionamiento relacionado con el tamaño molecular.
- d) Cromatografía iónica. Se utilizan columnas rellenas con resinas de intercambio iónico para separar y determinar iones, se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase estacionaria.

Por la variedad que ofrece de fases estacionarias, permite una mayor gama de interacciones selectivas y más posibilidades para la separación. Sin embargo, la de fase inversa es la utilizada para lípidos, ya que la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es moderadamente polar. Al agregarle disolventes polares a la fase estacionaria aumenta el tiempo de retención; lo contrario ocurre si se acondicionan disolventes hidrofóbicos. Esta técnica se basa en las interacciones del disolvente polar, analito no polar y fase estacionaria. Si el analito es muy grande puede causar que la interacción no sea completa. El tiempo de retención aumenta conforme al área de hidrofobicidad, que es inversamente proporcional al tamaño del soluto. Una de las ventajas de HPLC es que puede acoplarse en línea con un espectrómetro de masas de ionización por electrospray (HPLC/ESI-MS), pues el volumen de muestra es suficientemente grande (Fig. 2.41).

La ionización por electrospray es una técnica utilizada en espectrometría de masa para producir iones. Es especialmente útil en la producción de iones a partir de macromoléculas, pues supera la propensión de éstas a fragmentarse cuando se ionizan. El espectrómetro de masas mide razones masa/carga de iones (m/z), calentando un haz de material del compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos. El haz de iones produce un patrón específico en el detector, que permite analizar el compuesto o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto, en el caso de analizar una mezcla lipídica, permite determinar las especies de un mismo compuesto (Fig. 2.42).

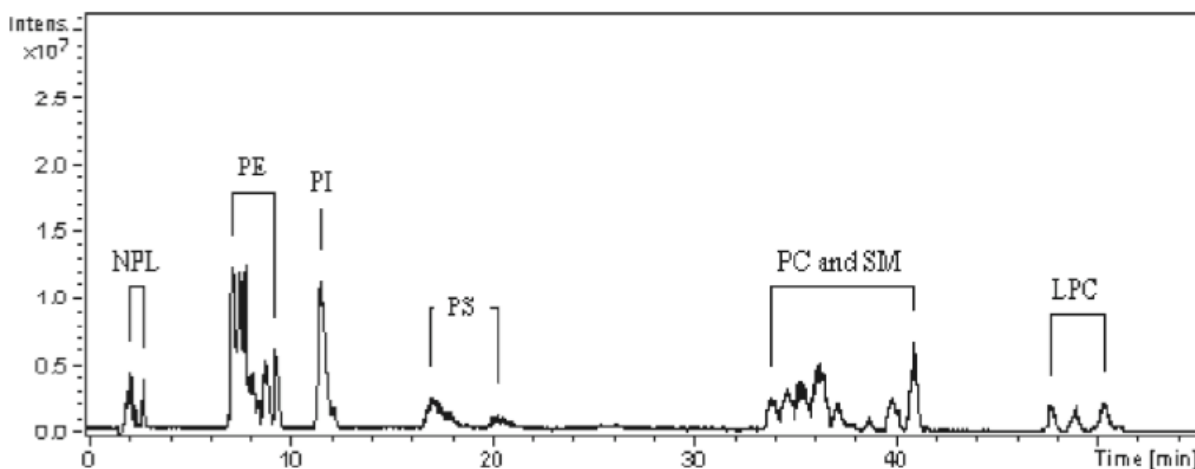


Fig. 2.42 HPLC/ESI-MS. Cromatograma base del extracto de lípidos de la superficie peritoneal de rata. La identificación de los picos es marcada [71].

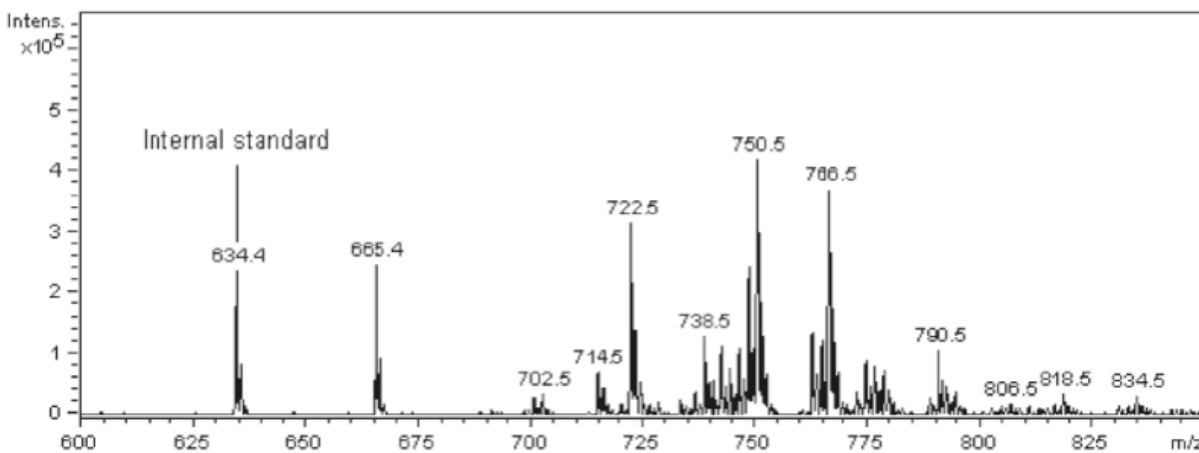


Fig. 2.43 Espectrometría de masas negativa de la etanolamina. Análisis de glicerofosfolípidos de etanolamina de la superficie peritoneal de rata.[71].

Capítulo 3

Objetivo e Hipótesis

Planteamiento del Problema

Debido a la importancia del surfactante (SP) en la función pulmonar y cuya disfunción es causa de importantes trastornos que pueden provocar la muerte al momento del nacimiento, es necesario conocer la composición y propiedades fisicoquímicas de las estructuras que resultan de la síntesis y almacenamiento intracelular del SP, ya que de estas estructuras depende la secreción de un SP funcional en el espacio alveolar.

3.1. Objetivo

Caracterizar termodinámica y bioquímicamente al surfactante pulmonar intracelular, organizado en cuerpos lamelares aislados de pulmón porcino.

3.1.1. Objetivos Particulares

- Determinar la temperatura de transición y calcular, a partir del termograma obtenido por CDB la entalpía y la energía de Gibbs de los CL aislados de pulmón porcino, de sus lípidos y proteínas.
- Comparar los parámetros termodinámicos anteriores para surfactante alveolar, obtenido de lavado bronquio-alveolar de tres especies animales (porcino, bovino y humano), así como de de dos surfactantes naturales terapéuticos de origen porcino (Curosurf) y bovino (Survanta).
- Determinar la composición proteica de los CL aislados de pulmón porcino por electroforesis de segunda dimensión.
- Determinar la composición lipídica de los CL aislados de pulmón porcino por HPLC/ESI-MS.

3.2. Hipótesis

Las características termodinámicas de los cuerpos lamelares de origen porcino son diferentes a las del surfactante alveolar, y se verán modificadas al extraer sus proteínas estructurales.

Capítulo 4

Método Experimental

4.1. Aislamiento de Cuerpos Lamelares

4.1.1. Aislamiento de Cuerpos Lamelares de Pulmón de Rata

Estudios preliminares para estandarizar la técnica de aislamiento de los CL se llevaron a cabo en pulmón de rata. Se sacrificaron 23 ratas Wistar hembras adultas (250-300 gr), por dislocación cervical, conforme a la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad Nacional Autónoma de México, siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se perfundió con buffer Trismalato (20mM pH 7.4) el pulmón de la rata, inyectando la solución por la aurícula derecha y vaciando por la aurícula izquierda, por 5 min.

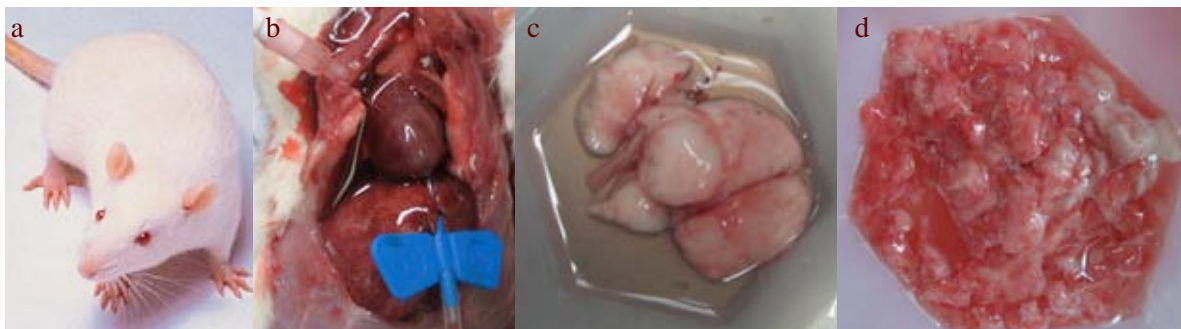


Fig. 4.1 Modelo experimental 1. a) Rata Wistar. b) Perfusión del pulmón. c) Pulmón extraído. d) Disección del pulmón.

Se disecaron los pulmones y se procedió siguiendo la metodología propuesta por Gilder et. al. [72], pero realizando algunas modificaciones. En breve, se agregó 1.5 partes de sacarosa 0.5M y se homogeneizó con un equipo Polytron a 2,000 rpm por 5s, 3 veces. El homogeneizado se centrifugó por 10 min (2,200 rpm, 4°C) en una centrifuga Sorval R5C con un rotor SS34 (Fig. 4.2). Posteriormente el sobrenadante se filtró con cuatro capas de gasas (Fig. 4.3). El sedimento se disolvió con sacarosa 0.33M (1:4), y se repitió el proceso. Teniendo como concentración final de sacarosa 0.33M, la muestra se lleva a una concentración de sacarosa 1M, utilizando sacarosa 2M.



Fig. 4.2 Centrífuga Sorval R5C y rotor SS34. Equipo utilizado para obtener el homogenado de pulmón.

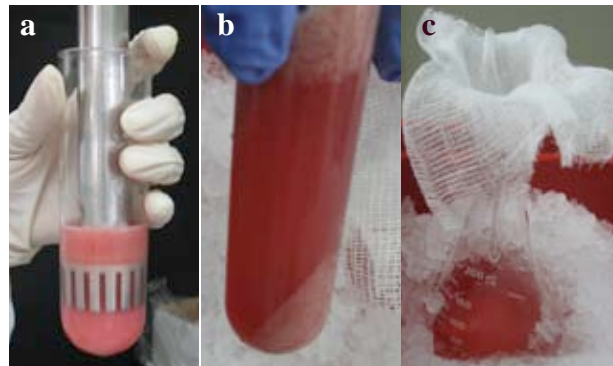


Fig. 4.3 Homogenado de pulmón de rata.
a) Se homogenizó el pulmón disecado, b) se centrifuga y c) se decanta, filtrando con cuatro gasas.

Se realizaron gradientes discontinuos de sacarosa: 1M (muestra), 0.6M y 0.33M de sacarosa (véase Fig. 4.4), con volúmenes iguales, se centrifugó a 23,000 rpm por 3 horas a 4°C, en una ultracentrífuga Beckman XL-90, XL-100 K con un rotor de columpio SW-28 (Fig 4.5).

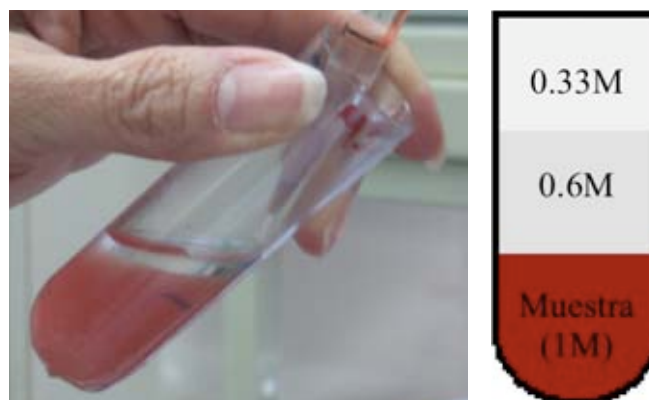


Fig. 4.4 Gradientes discontinuos de sacarosa.

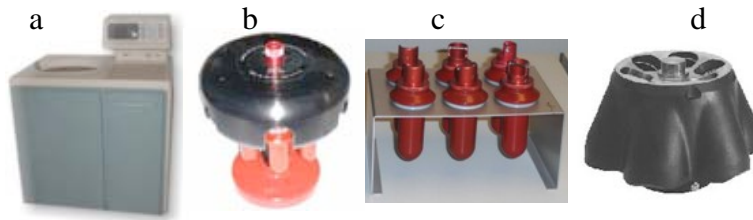


Fig. 4.5 Ultracentrífuga y sus rotores. a) Ultracentrífuga Beckman XL-90, b) rotor SW-28, y c) camisas del rotor SW-28 utilizados para los gradientes discontinuos de sacarosa y d) rotor 45Ti utilizado para lavar los cuerpos lamelares.

Los cuerpos lamelares, por lo reportado en la literatura [72][73][74], se sabe que están suspendidos en la interfase entre 0.33M y 0.6M (Fig. 4.6). Se extrajeron y se lavaron llevando al doble del volumen con buffer Trismalato, se centrifugó por 40 min (35,000 rpm, 4°C) en la ultracentrífuga con el rotor 45Ti, finalmente el precipitado (Fig. 4.7) se suspendió en buffer.

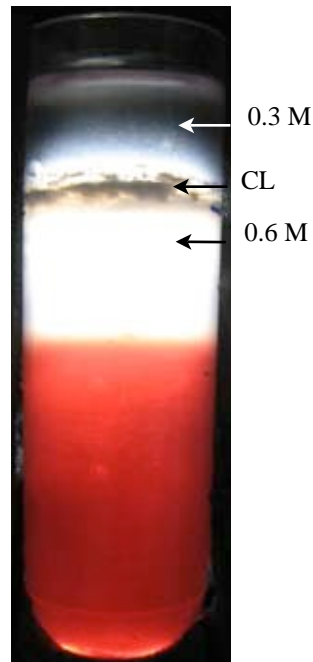


Fig. 4.6 Cuerpos Lamelares aislados. Están suspendidos en la interfase entre 0.33M y 0.6.

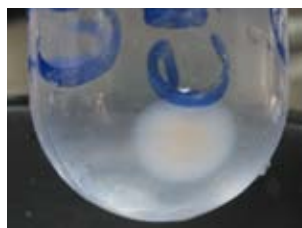


Fig. 4.7 Cuerpos Lamelares lavados. Los cuerpos lamelares se precipitaron al lavar.

4.1.2. Aislamiento de Cuerpos Lamelares de Pulmón Porcino

Los pulmones se adquirieron tres cerdos híbridos York Shire+Landrace machos criptocpidos de dos meses de edad, provenientes de la granja de puercos de la Facultad de Veterinaria, UNAM. Los pulmones se colocaron en buffer Trismalato para su traslado, posteriormente se lavó 5 veces con buffer, y se disecó, manteniendo una temperatura de 4°C.

Por las dimensiones del pulmón, se tuvo que modificar la técnica anterior, de la siguiente forma: se tomaron 70g de pulmón y se les agregó 1.5 partes de sacarosa 0.5M y se homogeneizó a 2500 rpm por 10s, 3 veces. Posteriormente se centrifugó por 10 min (2,200 rpm, 4°C), posteriormente el sobrenadante se filtró. El sedimento se llevó al doble del volumen con sacarosa 0.33M, se homogeneizó, se centrifugó y el sobrenadante se filtró. La solución final se llevó a una concentración de sacarosa 0.75M. Se realizaron gradientes discontinuos de sacarosa colocando 15 ml de la muestra, 9 ml (0.6M) y 6 ml (0.33M) de sacarosa. Se centrifugó por 3 horas (23,000 rpm, 4°C). Se extrajeron los cuerpos lamelares, se lavaronn, y se suspenden en buffer.

4.2. Extracción de Proteínas y Lípidos de Cuerpos Lamelares

Por cada 100 µl de muestra de cuerpos lamelares, se agregó 1 ml de Cloroformo-Metanol (3:1). Se agita por 12s y se deja reposar 5 min a 4°C, se centrifuga a 5000 rpm por 5 min. Se extrajo la parte acuosa junto con la interfase, se agitó y volvió a centrifugar. Finalmente se separó la parte acuosa (proteínas en H₂O+MeOH) de la orgánica (lípidos en Cloroformo) (Fig. 4.8). Se evaporó el Cloroformo de la fase orgánica con Nitrógeno a presión baja, y se suspendió en 600 µl buffer Trismalato.

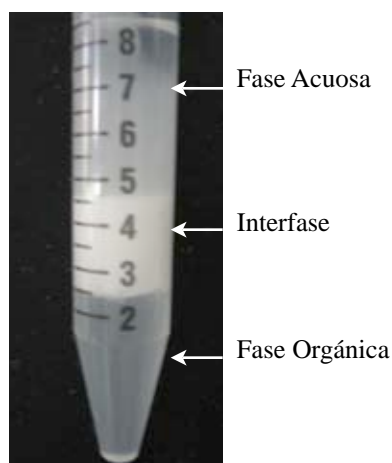


Fig. 4.8 Fases formadas de los cuerpos lamelares con el Cloroformo-Metanol. Se formaronn dos fases, orgánica que corresponde a la parte hidrofóbica (lípidos), y la fase acuosa donde esta lo hidrofílico (proteínas).

4.3. Caracterización Termodinámica

4.3.1. Calorimetría Diferencial de Barrido

Se utilizó un MicroCalorimeter VP-DSC, del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Perinatología, SSA. A una velocidad de barrido de 1°C/min (25-100°C), con una presión de 25 p.s.i. Se hizo un doble barrido, para identificar procesos reversibles (lípidos) e irreversibles (proteínas).



Fig. 4.9 Microcalorímetro. MicroCalorimeter VP-DSC (Valery Plotnikov Differential Scanning Calorimeter)

Muestra

Se tomaron 600 µl de cuerpos lamelares (de pulmón de rata y porcino) y de lípidos suspendidos en buffer Trismalato, como solución de referencia el mismo buffer. Se tomaron 600 µl de proteínas en fase acuosa y utilizando como solución de referencia H₂O+MeOH. Se tomaron cantidades iguales de lavado bronco-alveolar (LBA) de porcino, bovino y humano, de surfactante pulmonar comercial de origen porcino (Curosurf) y bovino (Survanta); así como de sus lípidos y proteínas.



Fig. 4.10 Surfactantes Terapéuticos Naturales.
(a) Curosurf de origen porcino, (b) Survanta, origen bovino.

4.4. Caracterización Proteica

4.4.1. SDS-PAGE de Primera Dimensión

Se utilizó equipo para electroforesis de primera dimensión BioRad para hacer geles de 10×10 cm² y marcador de pesos moleculares Precision Plus Dual Color de la misma marca.



Fig. 4.11 Equipo de electroforesis 1D. a) Equipo para hacer geles de poliacrilamida de 10×10 cm² y b) marcador de pesos moleculares.

Muestra

Se precipitó proteína con Ácido Tricloracético (ATC) para tener como concentración final 25% de ATC en la fase acuosa, se agitó y se dejó reposar 5 min a 4°C. Se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min. El precipitado se lavó dos veces con 1 ml de buffer Trismalato, centrifugando 14,000 rpm por 10 min. El precipitado se suspende en 30 µl de buffer, se agregó 3 µl de SDS 1% y 5 µl de buffer de digestión (6x). Finalmente se calentó la muestra a 100°C por 5 min y se colocó en los pozos del gel, dejando uno de ellos para el marcador de peso molecular (7 µl).

Electroforesis

Se prepararon dos geles de poliacrilamida de 6 y 12% de concentración de 10×10 cm², tal como se indica en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Concentración de los geles.

Gel Separador	6%	12%	Gel Concentrador	
Buffer separador	1.25 ml	1.25 ml	Buffer concentrador	500 µl
H ₂ O _D	2.73 ml	1.76 ml	H ₂ O _D	1.09 ml
Acrilamida	0.97 ml	1.94 ml	Acrilamida	390 µl
SDS 10%	50 µl	50 µl	SDS 10%	20 µl
Persulfato de Amonio	50 µl	50 µl	Persulfato de Amonio	20 µl
Temed	5 µl	5 µl	Temed	2 µl

H₂O_D Agua Desionizada

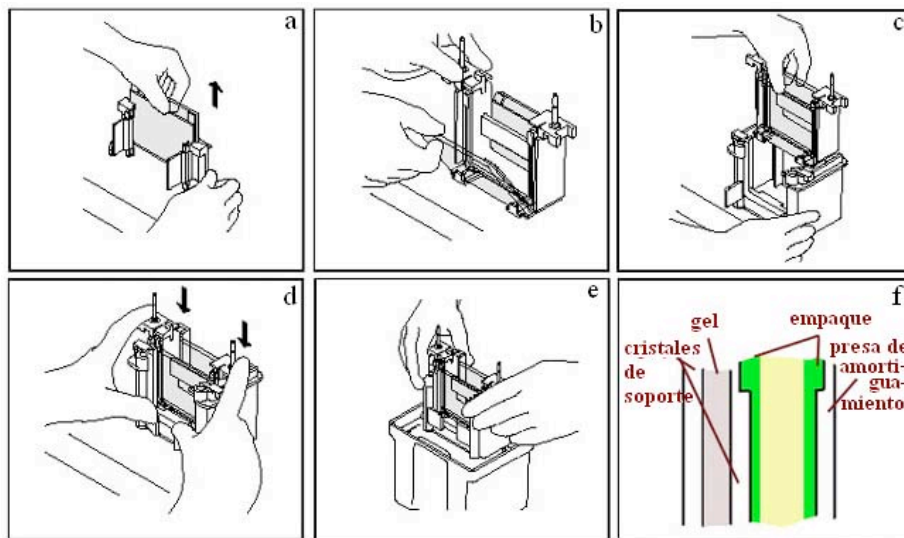


Fig. 4.12 Colocación del gel en la cámara. a) desmontaje de los cristales de soporte con el gel del marco, b) colocación del gel en el electrodo, c) colocación del electrodo y el gel en el marco de sujeción, d) sujeción, e) colocación en la cámara, f) vista transversal.

Una vez colocado el gel en la cámara (Fig. 4.12), se llenó con buffer de corrida (Trizma base 0.025M, Glicina 0.192M, 0.1% SDS), y se corrió la muestra a 120V.



Fig. 4.13 Suministrador de corriente. Colocado el gel en la cámara se conecta al equipo corriendo el gel a 120V.

Tinción con plata

Para teñir el gel y se le agregó el fijador (40% MeOH, 5% Formaldehído, 55% H₂O_D), se dejó agitando por 30 min. Se lavó dos veces con H₂O_D estando agitación durante 5 min. Se pretrató (Na₂S₂O₃·5H₂O_D 0.02%) por 1 min. Se lavó dos veces con H₂O_D rápido. Se agregó AgNO₃ 0.1%, estando en agitación por 15 min. Se lavó una vez con H₂O_D rápido. Se agregó el desarrollador de color (NaCO₃ 3%, Formaldehído 0.05%, Na₂S₂O₃·5H₂O_D 0.0004%), se mantuvo en agitación hasta que las bandas de proteínas aparecieron y se interrumpió la reacción con Ácido Cítrico 2.3M. Finalmente se lava con H₂O_D.

4.4.2. Electroforesis de Segunda Dimensión

Para realizar la primera dimensión se utilizó un equipo Ettan IPGphor 3 GL Healthcare, del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Perinatología, SSA. También se utilizó un equipo para electroforesis de segunda dimensión BioRad para hacer geles de $10 \times 10 \text{ cm}^2$, un kit para eliminar impurezas (2D Clean-Up Kit), un kit para determinar proteína (2D-Quant Kit), tiras de isoelectroenfoque (7cm, pH 3-10NL), aceite de recubrimiento PlusOne de Amersham Biosciences y un espectrómetro Beckman.



Fig. 4.14 Equipo para primera dimensión.
Ettan IPGphor 3 GL Healthcare

Muestra

Se precipitó proteína en fase acuosa con ATC (25% final), se agitó y se dejó reposar 5 min a 4°C . Se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 4°C . El precipitado se lavó dos veces con buffer, se suspendió en 150 μl de buffer, se lavó con el 2D Clean-Up Kit y se suspendió en 200 μl de buffer de rehidratación (urea 12g, CHAPS 0.5g, IPG 500 μl , $\text{H}_2\text{O}_\text{D}$). Se determinó proteína con el 2D-Quant Kit. Posteriormente, a la muestra se le agregó 2 μl de azul de bromofenol 0.2%, 11.2 μl de un *stock* (DTT 10mg, $\text{H}_2\text{O}_\text{D}$ 200 μl) y 1 μl de buffer IPG (pH 3-10NL) y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. Finalmente se colocó la muestra sobre la tira de isoelectroenfoque, con 10 ml de aceite PlusOne (véase Fig. 4.15a), y se dejó hidratando toda la noche.

Isoelectroenfoque

La tira fue equilibrada con dos lavados de 15 min en buffer de equilibrio, con DTT y Yodo Acetamida, cada uno. La tira se colocó en un carril de cerámica en la plancha del equipo, se cubrió 50 ml de aceite PlusOne y en sus extremos se colocó unos *pads* y se sujetó, como se muestra en la Fig. 4.15.

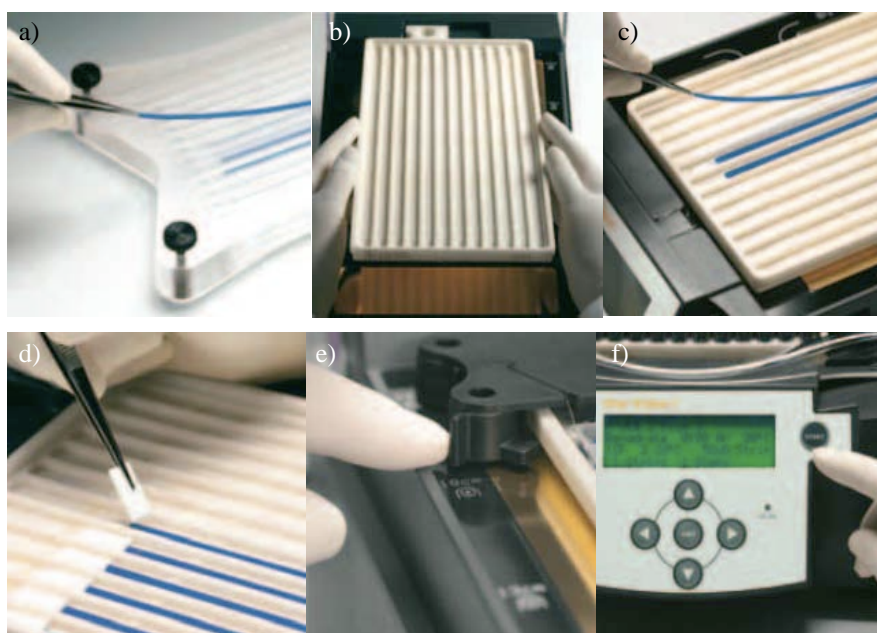


Fig. 4.15 Preparación de la muestra y del equipo para la primera dimensión. a) Hidratación de la tira de pH, b) colocación de la plancha de cerámica, c) colocación de la tira, d) colocación de los pads, e) sujetadores, f) programación del equipo.

Electroforesis

Se hizo un gel de poliacrilamida de 12% de concentración de 10×10 cm². Se corrió la muestra a 110V. Al término se tiñó con plata como un gel de primera dimensión.

4.5. Caracterización Lipídica

4.5.1. HPLC/ESI-MS

El análisis de los fosfolípidos se realizó en un cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento acoplado a un espectrómetro de masas equipado con ionización por electrospray y con trampa de iones marca Varian, modelo 1200L, del Instituto Nacional de Cardiología, SSA. Se utilizó una columna de fase normal de sílica gel (150 mm x 2.1 mm). La separación de los diferentes fosfolípidos se realizó aplicando un gradiente de 100% de fase móvil A (Cloroformo-Metanol, 90-10, v/v) a 100% de fase móvil B (Metanol-H₂O, 90-10, V/V) en 15 min. Durante el resto del tiempo del análisis (10 min) se aplicó solamente la fase B. Al final del análisis que dura 25 min la fase móvil, se regresa a 100% de A en 1 min y se equilibra la columna con la misma fase durante 5 min. Las dos fases móviles contienen 5 mmol/L de Formato de Amonio. La temperatura de la columna fue de 40°C. La ionización por electrospray se realizó a 3000V con el N₂ como gas nublizante y secante a 200°C. El intervalo de detección en masas fue de 650 a 1500 m/z.

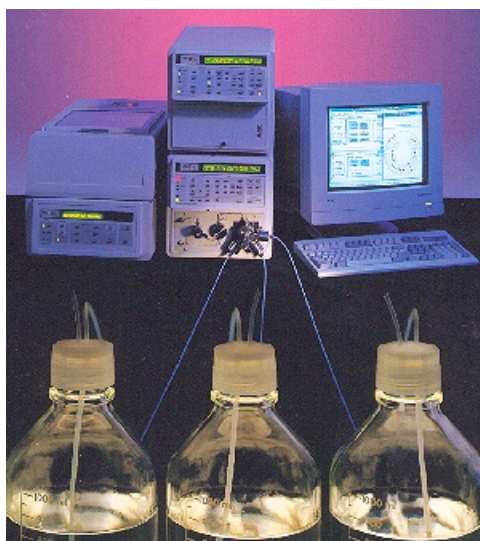


Fig. 4.16 HPLC/ESI-MS.
Varian modelo 1200L.

Muestra

Al extraer los cuerpos lamelares, éstos fueron diluidos en buffer Trismalato en un volumen tal, que la concentración final de proteína fuera aproximadamente 1 mg/ml. Se tomaron 500 y 100 µl de muestra, se extrajo lípidos y proteínas, como se explicó en la sección 4.2, con la diferencia de que se agregaron antioxidantes a la muestra de CL. Al tener la fase orgánica se lavó tres veces con cloroformo, para obtener una solución lipídica más pura, se evaporó el Cloroformo inyectando nitrógeno a presión baja y se pesaron los lípidos. Se preparó un diluyente de Hexano-Isopropano, y se le agregó a la muestra en una proporción 100 µl/mg de diluyente/lípido.

4.6. Microscopía Electrónica de Transmisión

Se utilizó un Microscopio de Transmisión Electrónica Jeol 1200EXII, del Departamento de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Operando el equipo a 80 kV.



Fig. 4.17 Microscopio de Transmisión Electrónica. Jeol 1200EXII.

Muestra

La preparación de la muestra para microscopía, se procedió siguiendo la metodología propuesta por Brasch et al [52]. Los cuerpos lamelares (800 μ l), sin lavar, se embebieron en 2 ml de agarosa de bajo punto de fusión en una concentración de 0.5% en buffer de Cacodilatos (0.1M, pH 7.4). Se congeló la muestra para poder hacer los cortes. Éstos fueron fijados con una solución (1.5% de Paraformaldehído, 1.5% de Glutaraldehído en buffer de Cacodilato) por 2 hrs. Se postfijó con Tetróxido de Osmio (1% en buffer de Fosfatos 0.1M) por 5 hrs. Se hizo una tinción en bloque con Acetato de Uranilo acuoso (2%). Se deshidrató con soluciones de alcohol diluido. Se dejó en rotación con una solución 1:1 de resina epoxi Epon alcohol por 2.5 hr, después en se hizo una infiltración de Epon con Óxido de Propileno 1:1. Finalmente se incluyó en Epon, una muestra se dejó polimerizar por 48 hrs a una temperatura de 60°C, y otra por 96 hrs. Se cortaron secciones ultradelgadas de 90Å y fueron bañadas con Citrato de Plomo.

4.7. Análisis de Datos

4.7.1. Análisis de los Termogramas

Se usó el programa OriginLab 7.5 (OriginLab Corporation) se calculó la integral de cada uno de los termogramas obtenidos con el microcalorímetro, para tener el cambio en la entropía y calcular la energía de Gibbs.

4.7.2. Análisis de los Geles de Electroforesis

Se usó el programa ImageJ 1.42q (Wayne Rasband) se adquirió el perfil promedio del carril del marcador de peso molecular y de la muestra en el gel de 6 y 12%, para estimar el peso en el que se encuentran las bandas de la muestra, y se analizó el gel de segunda dimensión para obtener peso y punto isoeléctrico de las huellas de las proteínas de interés con el programa ImageMaster 2D Premium (GE HEALTHCARE).

Capítulo 5

Resultados y Discusión

5.1. Calorimetría

5.1.1. Termogramas

Las siguientes gráficas muestran los termogramas obtenidos para cada muestra de surfactante con y sin proteínas. La Fig. 5.1 corresponde a CL aislados de pulmón de rata; la Fig. 5.2 y 5.3 a CL de pulmón porcino. La Fig. 5.4 al lavado bronco-alveolar (LBA) de origen porcino. La Fig. 5.5 al surfactante pulmonar comercial proveniente de pulmón porcino (Curosurf) y la Fig. 5.6 al de origen bovino (Survanta). La Fig. 5.7 al LBA bovino y la 5.8 al LBA humano.

Termogramas de los Cuerpos Lamelares de Pulmón de Rata.

Estudios preliminares para el aislamiento de los CL se llevaron a cabo en pulmón de rata, y la comprobación de la composición por estudios termodinámicos a través de calorimetría diferencial de barrido. La Fig. 5.1a muestra la transición de fase de CL con una $T_m = 35.52^\circ\text{C}$, esta transición es reversible después de hacer un segundo barrido. En la Fig. 5.1b se muestra la transición de CL sin proteína (lípidos) con una $T_m = 34.71^\circ\text{C}$. La Fig. 5.1c muestra la transición de las proteínas extraídas de los CL con una $T_m = 54^\circ\text{C}$, transición que no es reversible después del enfriamiento de la muestra.

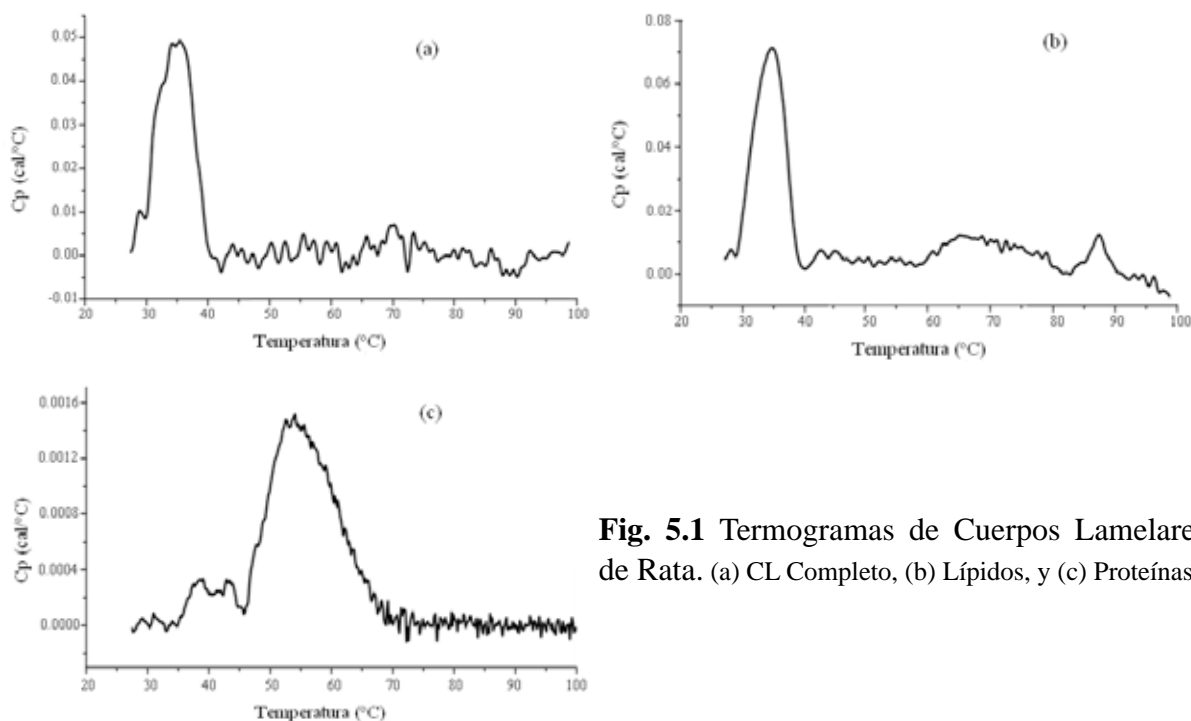


Fig. 5.1 Termogramas de Cuerpos Lamelares de Rata. (a) CL Completo, (b) Lípidos, y (c) Proteínas.

Los termogramas de CL aislados de pulmón de rata se utilizaron para confirmar que el aislamiento de CL rinde una preparación enriquecida en estas estructuras, pues la transición de fase es reversible después del primer barrido de temperatura y no muestra un cambio notable por la desnaturalización de las proteínas que lo componen. En el caso de las proteínas extraídas de los CL, éstas presentan una desnaturalización irreversible con estabilidad térmica de 20°C mayor a la de los lípidos.

Lo anterior sugiere que la contribución energética en el termoanálisis de los CL es la de los lípidos, por lo tanto éstos serían el componente predominante de estas estructuras, lo cual es muy diferente en otras membranas biológicas, donde la contribución energética de las proteínas de membrana es mayoritaria [77].

Termogramas de Cuerpos Lamelares de Pulmón Porcino

Las siguientes gráficas muestran el promedio de tres preparaciones. La Fig. 5.2a muestra la transición de fase de CL con una $T_m = 35.92 \pm 0.15^\circ\text{C}$, la Fig. 5.2b muestra la transición de fase de los lípidos de los CL ocurre una $T_m = 31.89 \pm 0.41^\circ\text{C}$. Finalmente la Fig. 5.2c muestra la transición de fase de las proteínas con una $T_m = 72.18 \pm 2.11^\circ\text{C}$.

El componente principal de las membranas biológicas, incluido el surfactante pulmonar y los CL, es el DPPC, que tiene una $T_m = 41^\circ\text{C}$ [67], otro componente importante de los CL es el DPPG, con una $T_m = 41^\circ\text{C}$ [82]. Aunque estos lípidos son el componente predominante en el termograma de los CL, se tiene una T_m promedio menor, de $35.92 \pm 0.15^\circ\text{C}$ ($n = 3$). Además, se observa una asimetría en la endoterma, lo que sugiere la contribución de más de una especie de lípidos con distinta estabilidad térmica. Cabe mencionar que por la cantidad de proteínas propias de los CL, su transición no se ve reflejada en el perfil calorimétrico de los CL, pero se observa su influencia, por la interacción de éstas con los lípidos, al obtener el termograma del total (Fig. 5.2a) muy diferente en comparación con el de los lípidos (Fig. 5.2b), como en el caso de DPPC y DPPG, que se ha demostrado, que en presencia de proteínas propias de los CL modifican su T_m , presentando asimetría en la endoterma [45].

En el termograma de los lípidos extraídos de los CL se tiene una sola endoterma con $T_m = 31.89 \pm 0.41^\circ\text{C}$, la cual es 4°C menor que la de los CL, lo cual demuestra que hay una diferencia significativa en el comportamiento de los lípidos con las proteínas. Aunque se sabe que el fosfolípido predominante es DPPC, cualquier composición con otro lípido [69] o proteínas [45] y cambio en la insaturación de los ácidos grasos [68] modifica la T_m . Cabe mencionar, que además se tiene la endoterma principal con $T_m = 31.89^\circ\text{C}$ y una transición más pequeña en $T = 52.0^\circ\text{C}$, lo que podría indicar otra transición de fase lipídica.

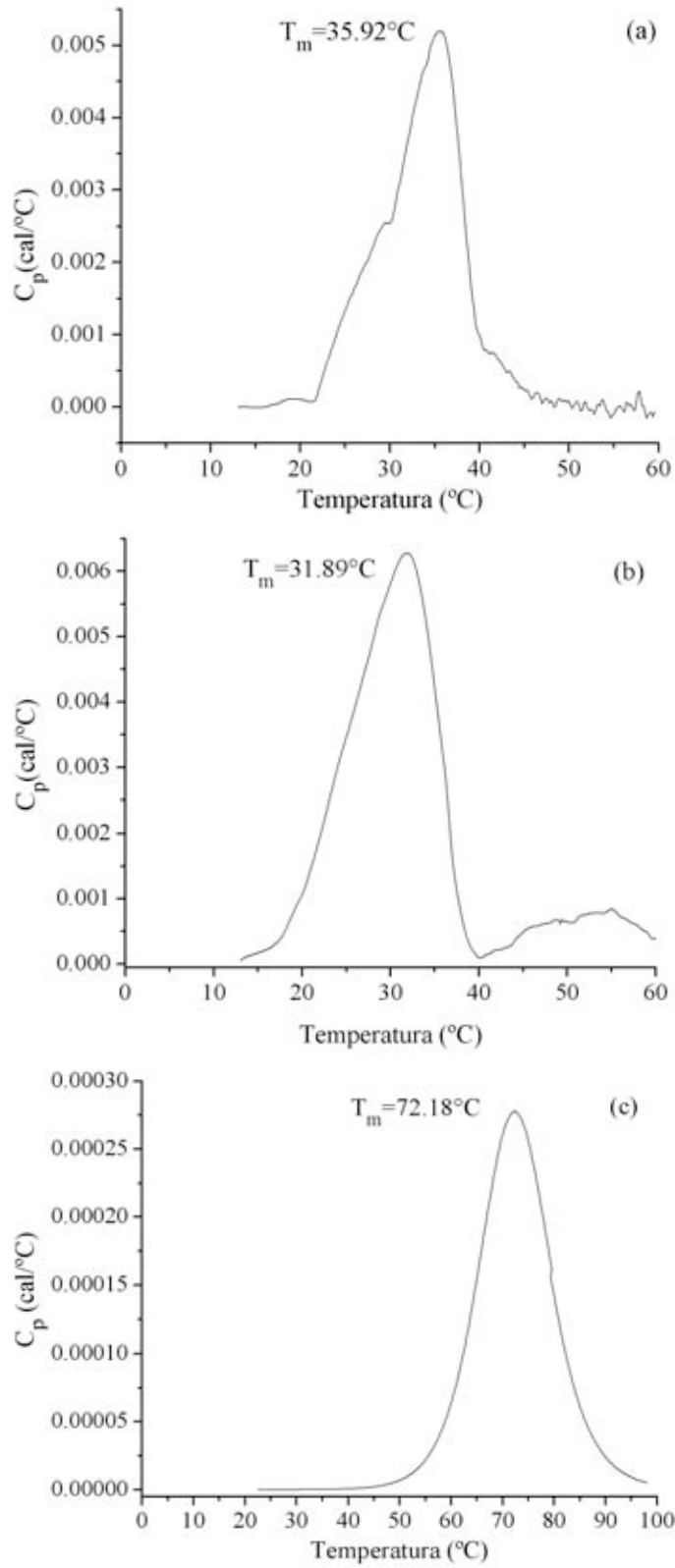


Fig. 5.2 Termograma de Cuerpos Lamelares Porcino. Promedio de los perfiles calorimétricos de las tres muestras de CL obtenidos. (a) CL Completo, (b) Lípidos, y (c) Proteínas.

Debido a que se observa en el termograma promedio de los CL (Fig. 5.2a) dos endotermas superpuestas, y de igual forma en los lípidos, la Fig. 5.3 muestra los termogramas de una preparación que tiene una mayor definición en las dos transiciones de fase. De lo anterior se infiere que las proteínas asociadas a los lípidos lo hacen de manera diferente dependiendo de la interacción con éstos, como sería en la zona electrodensa del CL, donde se sugiere que están las proteínas hidrofóbicas, o como en el caso de las proteínas que se encuentran en la membrana limitante del CL, siendo ésta última la que hace transición primero con $T_{m1} = 27.55$ °C y la zona electrodensa a $T_{m2} = 35.82$ °C (Fig. 5.3a). Los lípidos también presentan dos endotermas en ausencia de proteínas, lo que sugiere la presencia de dos diferentes mezclas lipídicas con diferente estabilidad térmica con $T_{m1} = 32.10$ °C y $T_{m2} = 55.18$ °C (Fig. 5.3b).

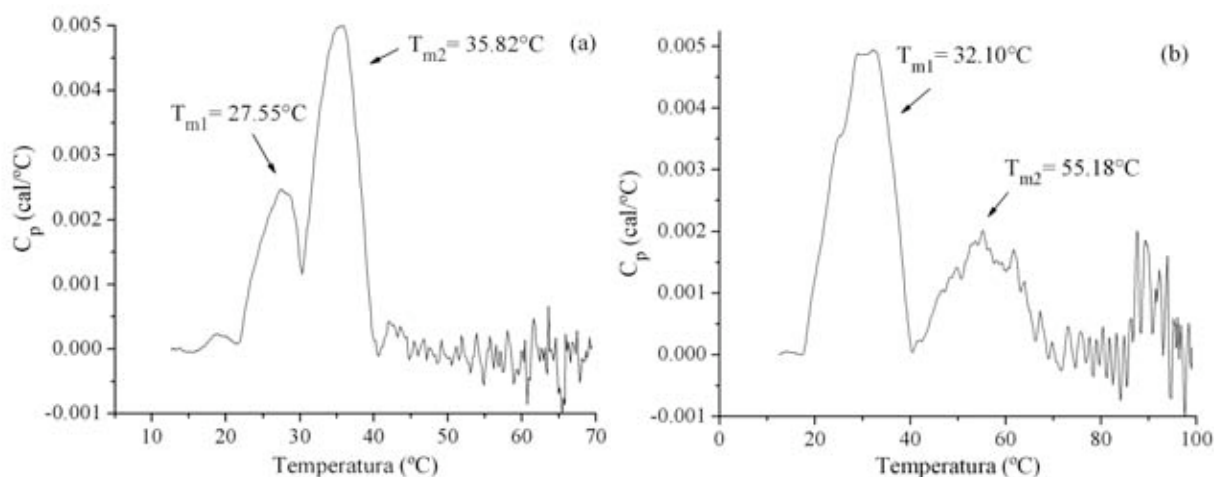


Fig. 5.3 Termogramas de la Preparación 3. (a) CL y (b) Lípidos de CL aislados de pulmón porcino.

Termogramas de Lavado Bronquio-Alveolar Porcino

De igual forma que con los CL aislados, se hizo la caracterización termodinámica de surfactante extralveolar de origen porcino, obtenido de LBA. La Fig. 5.4a muestra la transición de fase de surfactante extralveolar con una $T_{m1} = 53.77$ °C, la Fig. 5.4b muestra la transición de fase de los lípidos extraídos del LBA, los cuales tienen una $T_{m1} = 52.73$ °C. Finalmente la Fig. 5.4c muestra la transición de fase de las proteínas extraídas de los LBA con una $T_m = 88.42$ °C.

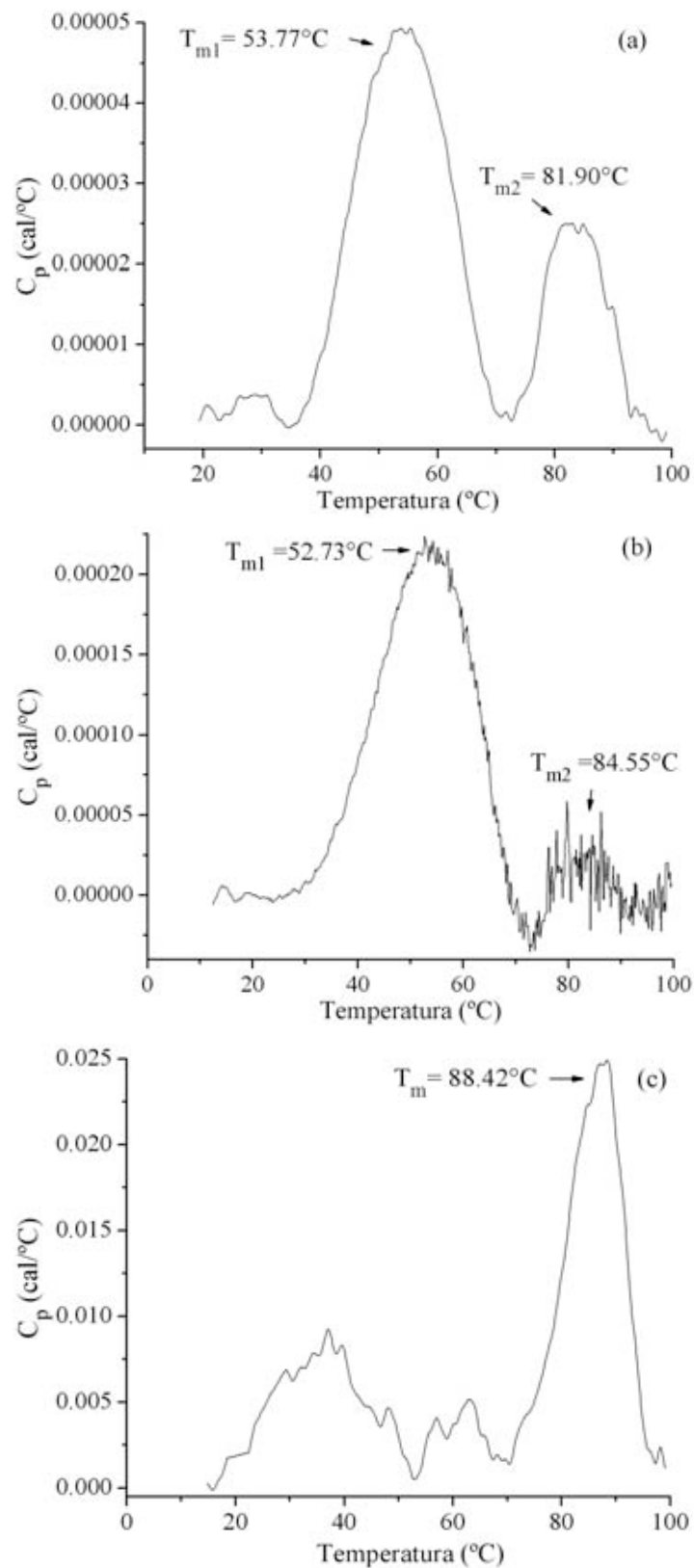


Fig. 5.4 Termogramas de LBA Porcino.
 (a) LBA Completo, (b) Lípidos, y (c) Proteínas.

Comparando el termograma de los CL (Fig. 5.2a) y el obtenido para el surfactante alveolar extraído de LBA (Fig. 5.4a), se tiene un cambio considerable en T_m de las principales endotermas, siendo LBA mayor que los CL por 18°C. Se ha sugerido que la composición de lípidos es la misma en ambos surfactantes, alveolar (LBA) e intracelular (CL), sin embargo, la composición proteica de ambos surfactantes aún está bajo estudio. Hasta ahora se sabe que los CL no tienen SP-D [34] y presentan poca cantidad de SP-A [35], por lo tanto la interacción de estas proteínas con la composición lipídica del LBA le proporcionan una T_m mayor que la correspondiente a los CL. Cabe mencionar que en el termograma de LBA se observa una transición irreversible con una $T_{m2} = 81.90$ °C, lo que podría corresponder a la desnaturalización de la fracción proteica, ya que esta transición es parecida a la obtenida en el termograma de la fracción proteica extraída del LBA con una $T_m = 88.42$ °C, considerando que la extracción del surfactante por LBA es propensa a contener otras proteínas contaminantes, provenientes de fluidos del árbol respiratorio. De esta forma no se puede descartar una contribución variable de la composición de proteínas en el LBA, a diferencia de las proteínas que se encuentran en los CL. Hay que considerar también que la proteína ABCA3, encargada del transporte y secreción de los CL, debería de estarse expresando mayoritariamente con respecto a otras proteínas en los CL, por lo que se infiere que la contribución energética de la proteína ABCA3 es predominante, lo que resultaría en un comportamiento termodinámico distinto que el de las proteínas del LBA porcino, reflejado una diferencia en la T_m , siendo mayor de 16°C para LBA(Fig. 5.4c).

Termogramas de Surfactante Terapéutico Curosurf

La Fig. 5.5a muestra la transición de fase de Curosurf con una $T_m = 27.15$ °C, y en la Fig. 5.5b, muestra la transición de fase de lípidos con una $T_m = 27.21$ °C.

Curosurf es un surfactante natural, preparado a partir de pulmón porcino, que contiene casi exclusivamente lípidos polares, en particular DPPC (alrededor del 70% del contenido total de fosfolípidos) y cerca de un 1% de proteínas hidrófobas específicas de bajo peso molecular, SP-B y SP-C, de acuerdo con el fabricante [78].

En el termograma de lípidos se tiene una T_m mucho menor que la temperatura corporal humana (~37°C), lo que implica que al administrar este surfactante los lípidos están en una fase que biológicamente no sería funcional. Comparando el perfil calorimétrico de lípidos de LBA porcino (Fig. 5.4b) con el correspondiente a Curosurf (Fig. 5.5b) se observa una disminución en el ancho de la endoterma, considerando que la transición de fase de cualquier fosfolípido al variar la concentración de colesterol aumenta el ancho de la endoterma conforme aumenta la concentración de colesterol, la cantidad de colesterol en Curosurf es despreciable, como lo indica el fabricante. No se podría inferir que la estrechez de la endoterma se deba a tener una mayor concentración del fosfolípido más abundante, que en este caso sería DPPC; pues si fuera el caso, la T_m sería cercana a la T_m de DPPC, lo que sugiere que su composición principal no es DPPC, como se ha indicado en trabajos previos donde se reporta que el 21% de los fosfolípidos corresponde a este compuesto [79].

Se realizó la calorimetría para las proteínas, pero no presentan una transición de fase (no se presenta gráfica), por lo que se considera que vienen desnaturalizadas en este surfactante, ya que se ha demostrado por métodos de electroforesis la presencia de estas proteínas [73].

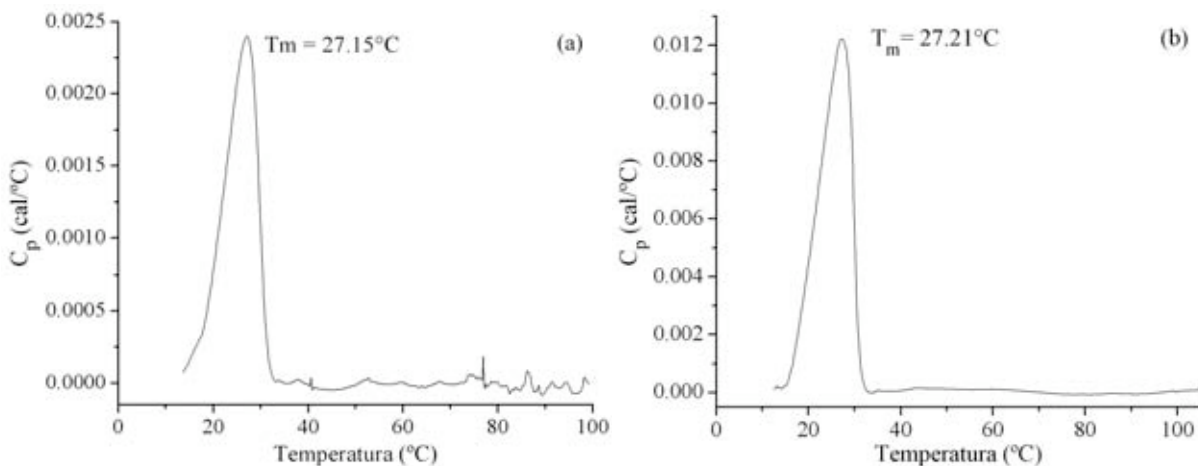


Fig. 5.5 Termogramas de Curosurf.
(a) Curosurf Completo, y (b) Lípidos.

Considerando que Curosurf es considerado un surfactante de origen natural preparado a partir de LBA porcino; obteniéndose el surfactante por centrifugación, extracciones de Cloroformo:Metanol (2:1) y cromatografía líquido-gel. Al comparar con los termogramas de LBA porcino no se tiene semejanza alguna, además de que el perfil de Curosurf y de sus lípidos es parecido. Se infiere que el proceso de preparación hace que se pierdan los compuestos que harían de éste, un surfactante terapéutico funcional. Además, se tiene que es importante que las proteínas no estén desnaturalizadas, para tener un valor de T_m que haga de éste un surfactante terapéutico funcional.

Termogramas de Surfactante Terapéutico Survanta

Como control comparativo, en surfactante terapéutico, la Fig. 5.6a muestra la transición de fase de Survanta con una $T_m = 50.36^\circ\text{C}$, la Fig. 5.6b muestra la transición de fase de sus lípidos con una $T_m = 47.53^\circ\text{C}$ y la Fig. 5.6c muestra la transición de fase de sus proteínas con una $T_m = 50.61^\circ\text{C}$.

Survanta es preparado a partir de pulmón bovino, tiene una composición aproximadamente de 25 mg/ml de fosfolípidos totales; ácidos grasos libres de 1.4 – 3.5 mg/ml; triglicéridos de 0.5 – 1.75 mg/ml; proteína de 0.1 – 1.0 mg/ml. Su contenido proteico consiste en 2 proteínas surfactante-asociadas hidrofóbicas de bajo peso molecular (SP-B y SP-C). No contiene la proteína surfactante-asociada hidrofílica de gran peso molecular (SP-A), de acuerdo con el fabricante [80].

Se sabe que durante el proceso de adquisición de Survanta se le reduce la cantidad de colesterol y se le adiciona DPPC, ácido palmítico y tripalmitina, razón por la cual la T_m (47.53°C) de lípidos es cercana a la T_m del DPPC, que constituye el 53% de este fosfolípido reportado en estudios previos [79].

En el termograma de proteínas (Fig. 5.6c) se tienen dos endotermas con $T_{m1} = 50.61^\circ\text{C}$ y $T_{m2} = 62.33^\circ\text{C}$. La estrechez de las endotermas del termograma de proteínas indica que hay la presencia de al menos dos proteínas, una en mayor proporción que la otra, que corresponderían a SP-B y SP-C, considerando lo indicado por el fabricante.

Haciendo la comparación entre surfactantes terapéuticos se observa una mayor estabilidad térmica con Survanta, por lo tanto es más funcional como surfactante terapéutico, ya que tanto sus lípidos, como el Survanta completo, tienen T_m mayores a la temperatura corporal.

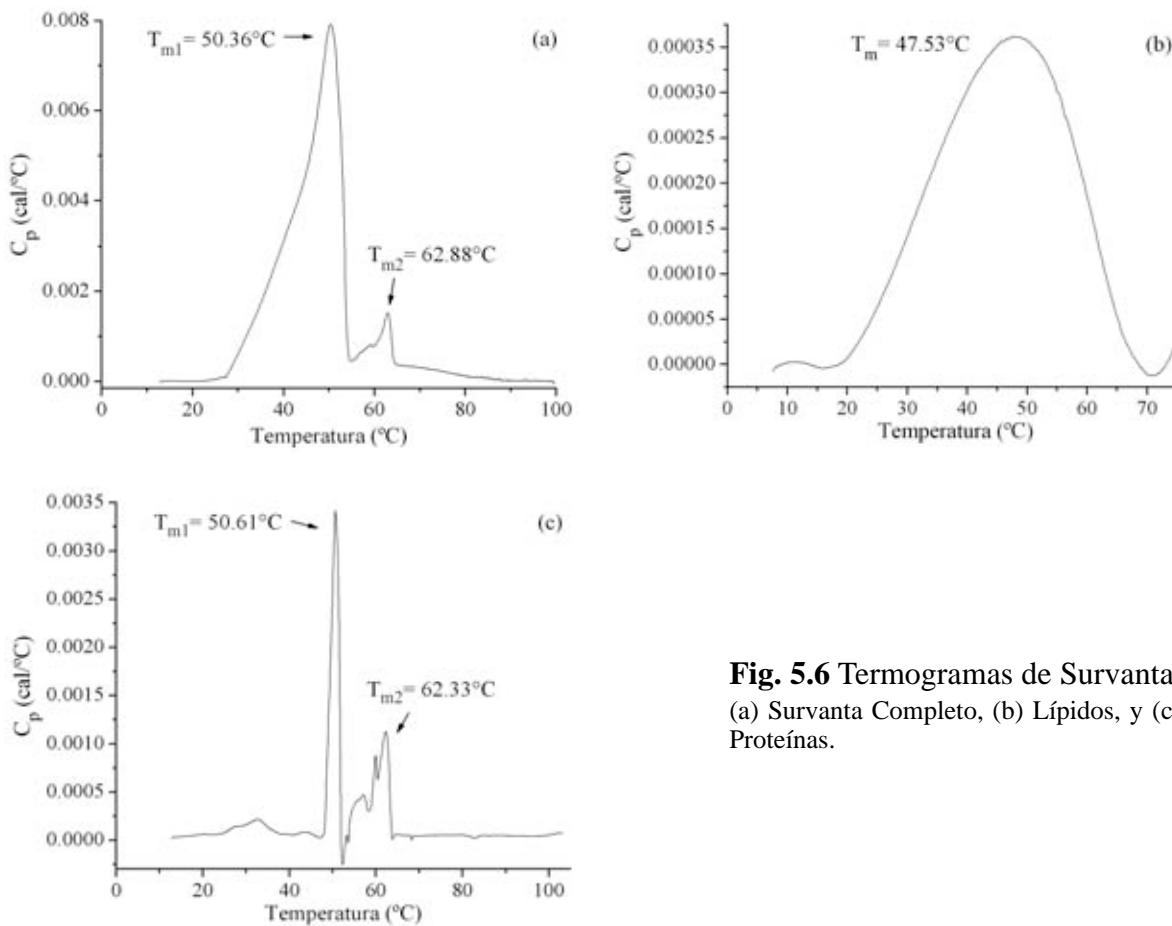


Fig. 5.6 Termogramas de Survanta. (a) Survanta Completo, (b) Lípidos, y (c) Proteínas.

Termogramas de Lavado Bronquio-Alveolar Bovino

La Fig. 5.7a muestra la transición de fase de LBA de origen bovino con una $T_m = 50.61^\circ\text{C}$, la Fig. 5.7b muestra la transición de fase de lípidos con una $T_m = 48.10^\circ\text{C}$ y la Fig. 5.7c muestra la transición de fase de proteínas con una $T_m = 67.61^\circ\text{C}$.

Al comparar el surfactante terapéutico proveniente de pulmón bovino (Fig. 5.6) y el LBA (Fig. 5.7), se tiene sólo una diferencia en la forma de las endotermas, pues sus T_m son parecidas entre sí. Por lo tanto, a pesar de sólo tener dos proteínas surfactantes SP-B y SP-C, éstas son suficientes para darle la estabilidad térmica para considerarlo un surfactante terapéutico funcional.

Al observar el termograma de LBA (Fig. 5.7a) se tiene un ensanchamiento de la endoterma, debido a la mezcla heterogénea de compuestos, entre los que se tiene colesterol (3%) [79]. Lo mismo ocurre para los lípidos (Fig. 5.7b). En el caso de las proteínas sí hay una diferencia en cuanto a la temperatura y forma de la endoterma, lo cual era de esperarse por la contribución de las proteínas del árbol bronquial.

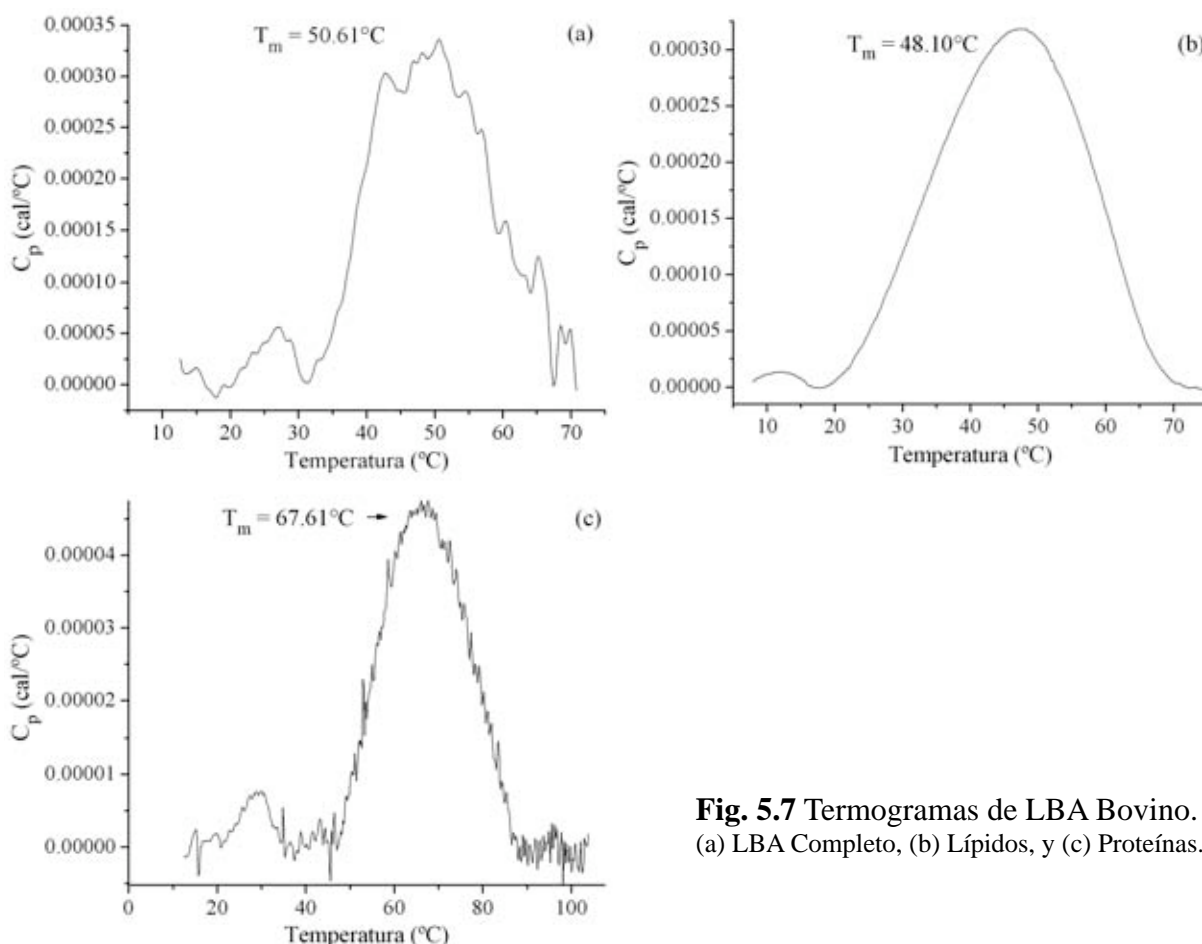


Fig. 5.7 Termogramas de LBA Bovino. (a) LBA Completo, (b) Lípidos, y (c) Proteínas.

Termogramas de Lavado Bronquio-Alveolar Humano

Los termogramas siguientes son un ejemplo de una muestra de LBA de un paciente neonatal humano. La Fig. 5.8a muestra la transición de fase de LBA con una $T_m = 72.82^\circ\text{C}$, la Fig. 5.8b muestra la transición de fase de lípidos con una $T_m = 39.74^\circ\text{C}$ y la Fig. 5.8c muestra la transición de fase de proteínas con una $T_m = 72.65^\circ\text{C}$.

Como se ha observado en los LBA de porcino (Fig. 5.4a) y humano (Fig. 5.8a), la desnaturalización de las proteínas se observa en el termograma del LBA, que en el caso del humano es una componente que sobresale con respecto de los lípidos, por tratarse de un paciente cuyo sistema inmunológico está actuando, haciéndose presente una cantidad considerable de proteínas.

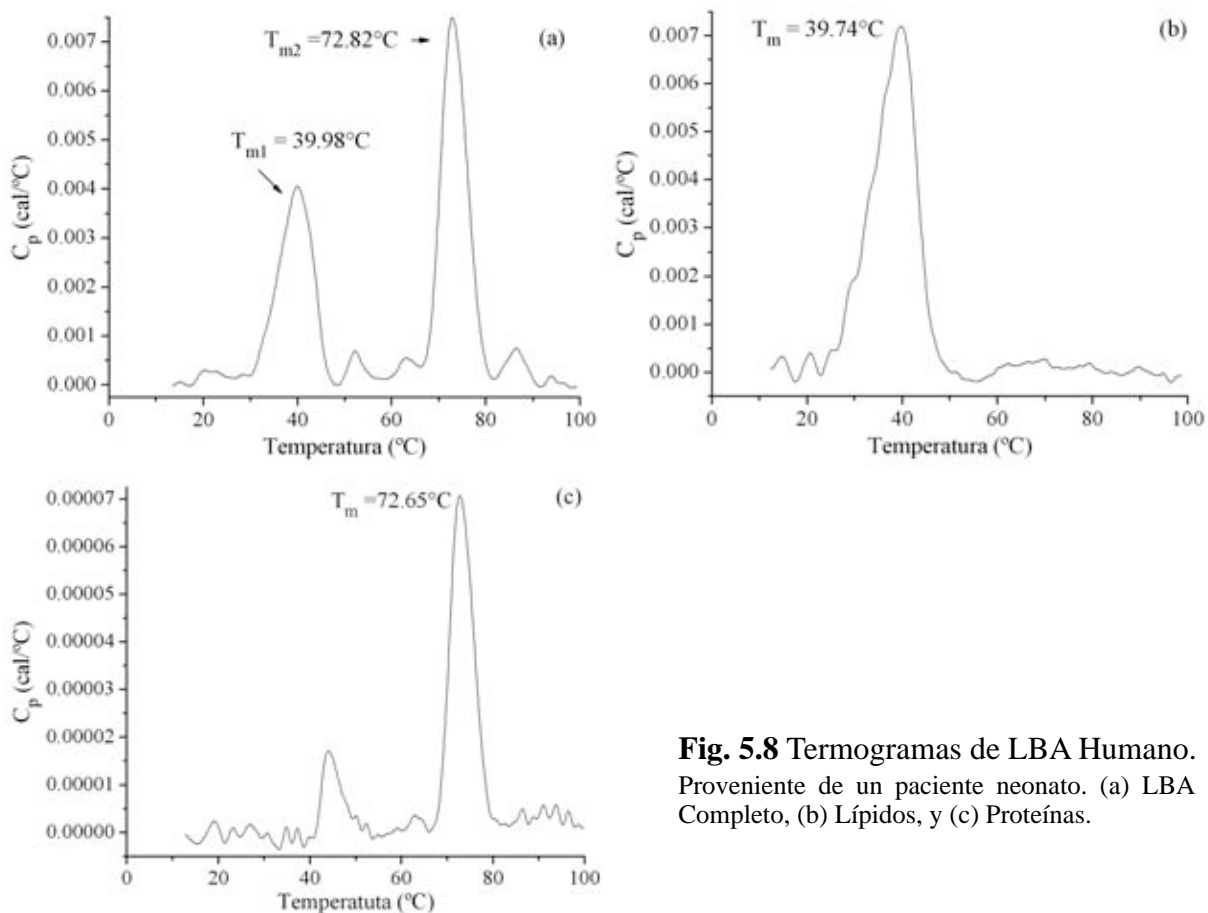


Fig. 5.8 Termogramas de LBA Humano. Proveniente de un paciente neonato. (a) LBA Completo, (b) Lípidos, y (c) Proteínas.

5.1.2. Parámetros Termodinámicos

Las tablas que se presentan a continuación muestran los cálculos de los parámetros termodinámicos obtenidos para cada caso estudiado. La Tabla 5.1 reporta la T_m de cada componente de los surfactantes analizados, considerando que se obtuvo la T_m como la temperatura asociada a C_{pmax} . La Tabla 5.2 muestra el cambio en la Entalpía (ΔH) de la endoterma de cada componente de los surfactantes analizados, obtenida al calcular el área bajo el pico de cada uno de los termogramas anteriores, integrando desde T_1 (inicio de transición de fase) a T_2 (final de la transición de fase) de la endoterma correspondiente a la T_m . La Tabla 5.3 muestra el cambio en la Energía de Gibbs (ΔG) de cada componente de los surfactantes analizados.

Tabla 5.1 Temperatura de transición de cada componente de las muestras de surfactante.

Componentes	T_m (°C)				
	Porcino			Bovino	
	CL	LBA	Curosurf	Survanta	LBA
Total	35.92 ± 0.15	53.77	27.15	50.36	50.61
Lípidos	31.89 ± 0.41	52.73	27.21	47.53	48.1
Proteínas	72.18 ± 2.11	88.42	-	50.61	67.61

De acuerdo con la T_m obtenida para el surfactante intracelular (CL), ésta es mucho menor comparado con el surfactante alveolar (LBA), lo que sugiere que el SP es susceptible a cambios fisicoquímicos debido a su composición, por mínima que ésta sea, pues en caso del LBA se tiene más SP-A y SP-D, y en el caso de los CL esta la presencia de la proteína ABCA3. Aunque las proteínas constituyen menos del 10% de los componentes del surfactante pulmonar, la participación de estas proteínas se refleja en los parámetros termodinámicos obtenidos a partir de la microcalorimetría. La presencia de las proteínas propias del surfactante pulmonar alveolar le proporcionan a la fase lipídica una T_m mayor que la correspondiente a la fase lipídica de los CL. De igual forma, la T_m de los lípidos extraídos de los CL (sin proteínas) es menor que la T_m de los CL íntegros, lo que sugiere que las proteínas presentes en los CL le confieren a los lípidos una mayor estabilidad térmica y estructural.

Con respecto a los surfactantes terapéuticos de origen natural, se ha observado que hay muy poca diferencia entre el T_m del SP de origen bovino (Survanta) y el SP del LBA de bovino. Sin embargo al comparar al SP de origen porcino (Curosurf) con el SP del LBA porcino sí se encuentran diferencias, ya que Curosurf, aunque tiene a las proteínas surfactantes SP-B y SP-C, estas proteínas están desnaturalizadas, demostrándose que al no tener transición de fase en los estudios calorimétricos. lo que sugiere que para ser un surfactante terapéutico funcional, es decir que forme la fase lipídica funcional, se requiere que las proteínas estructurales del surfactante pulmonar estén en una conformación adecuada y no de una forma desestructurada.

Tabla 5.2 Entalpía de cada componente de las muestras de surfactante.

Compuestos	ΔH (mcal)				
	Porcino			Bovino	
	CL	LBA	Curosurf	Survanta	LBA
Total	52.19 \pm 0.005	0.95	2.01	109.2	7.04
Lípidos	73.61 \pm 0.009	4.68	106.56	9.94	8.66
Proteínas	4.55 \pm 0.002	338	-	13	1.1

Aunque la determinación de la cantidad de lípidos y proteínas no se realizó al inicio de éste estudio, se trato de mantener la concentración de los CL de una manera normalizada. La determinación de la energía almacenada de los componentes del surfactante se realizó integrando la capacidad calorífica en función de la temperatura, y no integrando el calor específico en función de la temperatura, el cual requiere de manera obligada la concentración molar de los componentes, por lo que estrictamente no son comparables. Sin embargo, se hizo una aproximación, considerando que se usaron los mismos volúmenes en las preparaciones, para llevarla a una concentración final similar.

Entonces, el valor de la entalpía de los CL es mayor que la del LBA, lo que indica que almacena una cantidad mayor de energía, probablemente para tomar la conformación de multicapa, lo que no sucede con la forma extendida del surfactante alveolar. Comparando la entalpía de los lípidos extraídos de los CL y la entalpía de los CL completos, hay una disminución en la entalpía, lo que sugiere una disminución en la energía almacenada debido a las proteínas constitutivas de los CL, que le confieren a la fase lipídica una mayor estructura. En el caso de los surfactantes naturales obtenidos de LBA porcino, se observa una disminución en la energía al comparar la entalpía de los lípidos extraídos del surfactante y la entalpía del surfactante completo.

Es importante notar, que ésta disminución en la entalpía por la ausencia de proteínas no se observa en los Surfactantes Terapéuticos (Curosurf y Survanta), por lo que se puede pensar que las proteínas presentes en estos surfactantes no interactúan de la misma forma con los lípidos como lo hacen en los Surfactantes Naturales, por lo que no se observa un cambio importante entre sus energías.

Para un análisis cuantitativo de la contribución en entalpía entre los componentes del LBA y los CL, se tiene que considerar que la expresión calórica de la entalpía, depende de la concentración molar de los compuestos de la mezcla, como se mencionó anteriormente; además, que en el caso de muestras biológicas la complejidad de la muestra varía de manera considerable, especialmente en lo que se refiere al surfactante alveolar, ya que existe la contribución de secreciones de otros tipos celulares en el tracto respiratorio. Debido a que el cálculo de los parámetros termodinámicos depende de esto, por el momento no se cuenta con las condiciones para hacer un estudio estadístico significativo que nos lleve a concluir cuales son las diferencias cuantitativas desde el punto de vista del cálculo de la entalpía en éstos sistema.

Tabla 5.3 Energía de Gibbs de cada componente de las muestras de surfactante.

Compuestos	$\Delta G_{T1 \rightarrow T2}$ (mcal)				
	CL	Porcino LBA	Curosurf	Bovino Survanta	LBA
Total	- 14.06 ± 0.14	-0.6	-10.61	-28.36	-4.58
Lípidos	- 44.79 ± 0.01	-3.21	-52.42	-9.68	-8.99
Proteínas	- 3.42 ± 0.001	-47.54	-	-1.53	-0.64

En la tabla 5.3 se presenta el resultado de ΔG , que para todos los casos es negativa, lo que indica que se trata de procesos espontáneos. Sin embargo, para cada mezcla se tendrá una energía diferente que depende de la complejidad del sistema.

En el caso de los CL se tendrá que impartir una mayor cantidad de energía al sistema comparando con los lípidos extraídos de los CL (sin proteína), por lo tanto las proteínas de los CL le confieren a esta estructura una mayor estabilidad térmica. Al comparar los valores obtenidos de la ΔG de LBA porcino con los de los CL, los CL presenta una mayor estabilidad térmica. Como era de esperarse al comparar LBA bovino contra Survanta, el LBA requiere de una mayor energía para llevar a cabo una transición de fase, probablemente por la presencia de proteínas provenientes de las secreciones del árbol respiratorio. Finalmente al observar los valores de ΔG para las proteínas aisladas ya sea de LBA o CL, se esperaba tener valores bajos cercanos a cero, ya que aunque la energía que requiere las proteínas es mucha, la concentración de proteína en estas mezclas es muy baja.

5.2. Electroforesis

La Fig. 5.9a muestra un gel al 12% y la Fig. 5.9b el perfil de la banda de pesos moleculares (estándar) y una banda de la muestra, para poder determinar el peso molecular de las bandas de proteínas presentes en los CL. La Fig. 5.10a muestra un gel al 6% y la Fig. 5.10b el perfil de cada banda, para ver si hay la presencia de proteínas de alto peso molecular. La Fig. 5.11 muestra la electroforesis de segunda dimensión, con la que se tiene la huella de las proteínas propias de los CL por peso molecular y punto isoeléctrico, y se reporta en la Tabla 5.5 las proteínas que se identificaron con el programa ImageMaster 2D Premium, y la información teórica reportada en el banco de datos proteico (servidor suizo) para pulmón porcino (*Sus scrofa*) [81].

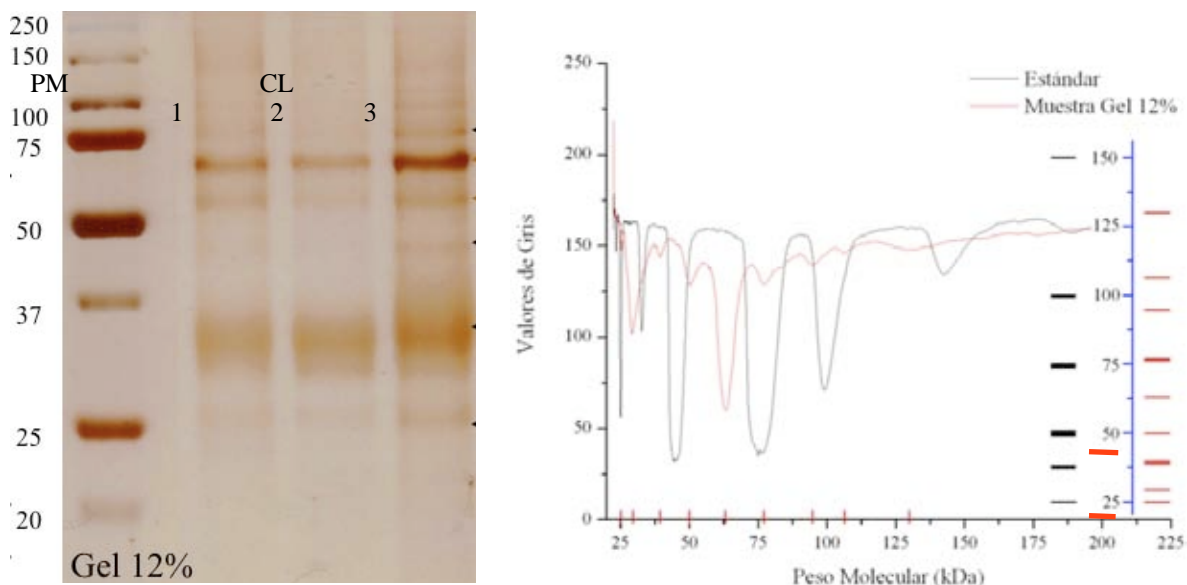


Fig. 5.9 SDS-PAGE de primera dimensión al 12%. (a) Se presenta la electroforesis de primera dimensión de las proteínas extraídas de los CL aislados de pulmón porcino, donde la primera banda es el indicador de pesos moleculares (PM) y las tres bandas siguientes a las tres preparaciones realizadas. (b) Perfil de la banda 3.

De lo obtenido en SDS-PAGE al 12 % se tienen bandas de proteínas con pesos moleculares en un intervalo de 150kD a 20kD, siendo la de peso aproximado a 31kD la más abundante, junto con la de peso aproximado a 70kD. De las bandas obtenidas sólo aquellas con peso menor a 40kD se puede inferir que corresponden a proteínas propias a los CL. Por ello se hizo SDS-PAGE 2D aumentando la concentración de proteína para tener una mayor definición de las proteínas focalizadas de menor peso.

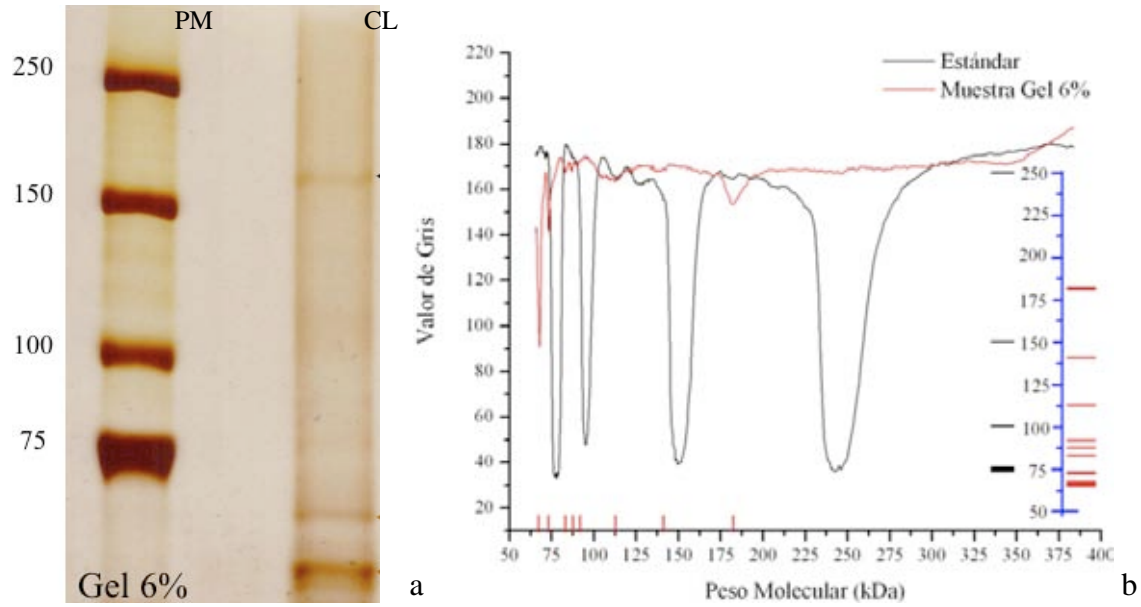


Fig. 5.10 SDS-PAGE de primera dimensión al 6%. (a) Se presenta la electroforesis de primera dimensión de las proteínas extraídas de los CL aislados de pulmón porcino, donde la primera banda es el indicador de pesos moleculares (PM) y segunda es la banda de proteínas de una de preparaciones realizadas. (b) Perfil de la banda proteica.

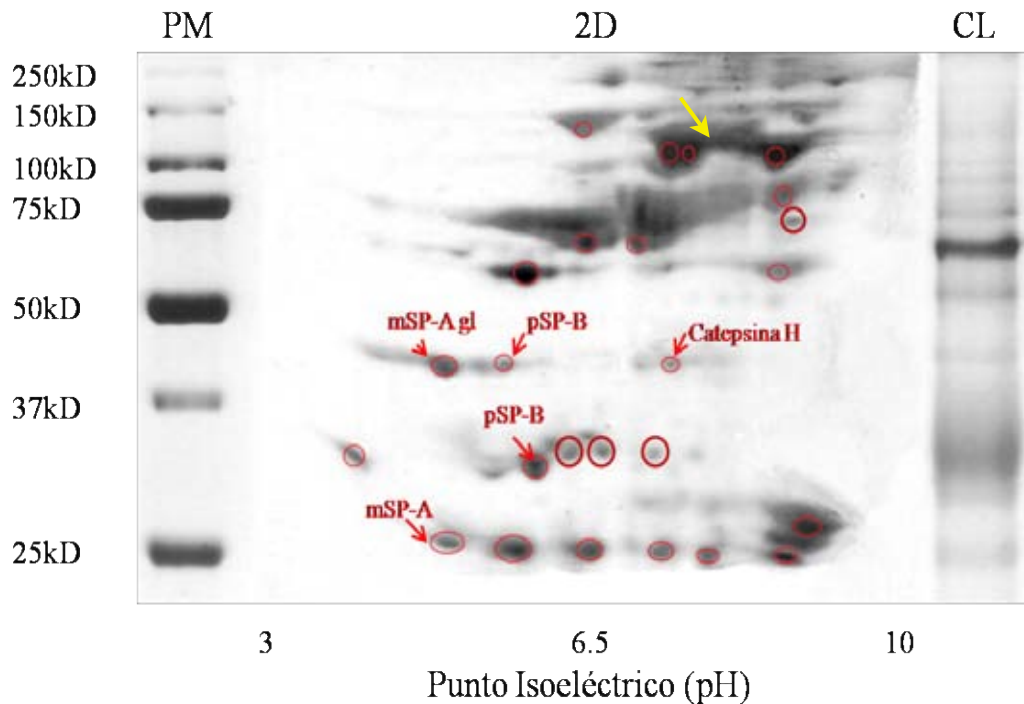


Fig. 5.11 SDS-PAGE 2D. Electroforesis 2D de cuerpos lamelares aislados de cerdo, de 12%, los spots son visualizados con tinción en plata. En la banda del lado izquierdo están los pesos moleculares (PM) y en la banda del lado derecho están las bandas de las proteínas de los CL. En medio se tiene la segunda dimensión, donde se observan spots, de entre los que se destacan proteínas propias de los CL como el monómero SP-A (mSP-A) y el glucosilado (mSP-A gl) precursores de SP-B (proSP-B), y Catapsina H. La flecha en amarillo indica una proteína con peso molecular de 136kD y pH 7.5

Para saber de qué proteínas se trata en la electroforesis de segunda dimensión (Fig. 5.11) se localizan proteínas que corresponden a los CL, que están en un intervalo de entre 4-8 pH en 40kD y 20kD.

Tabla 5.5 Proteínas obtenidas de 2D-PAGE, con los datos teóricos y experimentales.

N° Ref	Nombre de las proteínas	Teórico		Experimental	
		PM	pI	PM	pI
A7MAK5	Precursor SP-B	38.7	5.9	38.0	5.7
B2D1T2	Catepsina H	37.5	8.0	38.0	7.6
	Monómero SP-A Glucosilado		4.9	38.0	4.8
A7MAK6	Precursor SP-B	31.2	6.8	31.0	6.0
P49874	Monómero SP-A	26.7	4.9	26.0	4.8

De lo obtenido por SDS-PAGE 2D se identifican sólo cuatro proteínas, que son proteínas propias de los CL aislados, de acuerdo con la base de datos proteico, éstas corresponden a las proteínas propias de los CL como SP-A, precursores de SP-B y Catepsina H, como se reporta en la literatura [35][52].

Como se sabe la proteína SP-A es una proteína de gran tamaño, formada por 6 homotrímeros, considerando que la preparación de la proteína es un ambiente reducido, la SP-A se identifica como monómeros de 26kD. Sin embargo, por la forma en que se sintetiza, la SP-A se puede encontrar glucosilada (mSP-A gl), manteniendo un pH similar pero con diferente peso molecular, por lo tanto se infiere que la proteína con peso de 38kD y con pH 4.8 correspondería a mSP-A gl.

En el SDS-PAGE 2D se observan varias huellas de proteínas, de las que no se tiene referencia en la base de datos proteico para pulmón porcino. Se observar un proteína con peso molecular de 136kD y pH 7.5, que al comparar con otras especies (ratón y humano) podría tratarse de la proteína ABCA3, que debería ser abundante en CL. Pero la identidad de esta proteína se podrá confirmar por espectrometría de masas la proteína extraída del spot.

5.3. HPLC/ESI-MS

Las gráficas siguientes muestran el análisis de lípidos de CL aislados de pulmón porcino, por HPLC/ESI-MS. La Fig. 5.12 muestra el cromatograma de ionización negativa. De éste se realizó espectrometría de masas (EM) de los picos más representativos, siendo la Fig. 5.14: (a) EM al tiempo de retención (t_r) 9.873 min, (b) EM a $t_r = 10.756$ min, (c) EM a $t_r = 11.350$ min, (d) EM a $t_r = 12.738$ min, y (e) EM a $t_r = 13.673$ min. La Fig. 5.15 muestra la cromatograma de ionización positiva, cuya EM se muestra en la Fig. 5.16, correspondiendo: (a) EM a $t_r = 12.526$ min, (b) EM a $t_r = 12.838$ min, (c) EM a $t_r = 13.007$ min, (d) EM a $t_r = 13.573$ min, y (e) EM a $t_r = 13.744$ min.

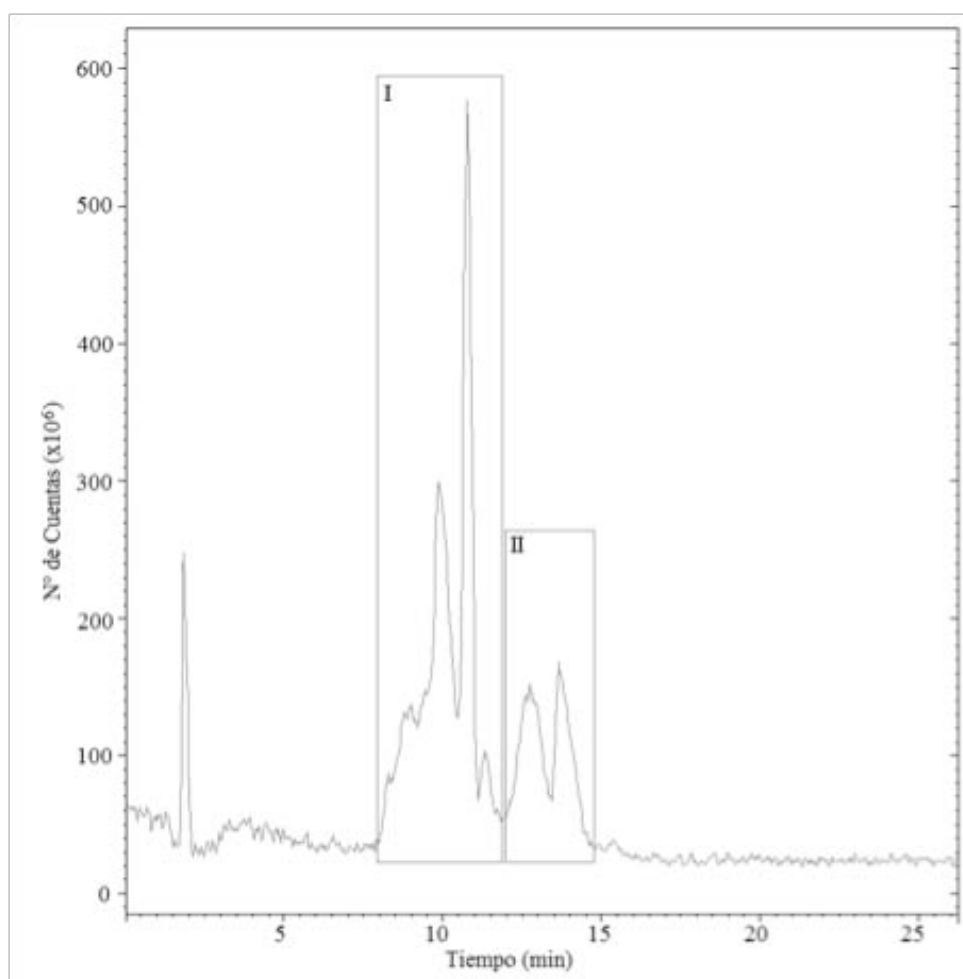


Fig. 5.12 Cromatograma de ionización negativa.

En la cromatografía de ionización negativa se presentan cinco picos en un intervalo de tiempo de 9-14 min, de los cuales se tiene que los picos en I corresponden a PE, y los picos en II corresponden a PI (Fig. 5.12), teniéndose una mayor proporción de PE con respecto a PI, 60% y 29% del total de lípidos en ionización negativa, respectivamente.

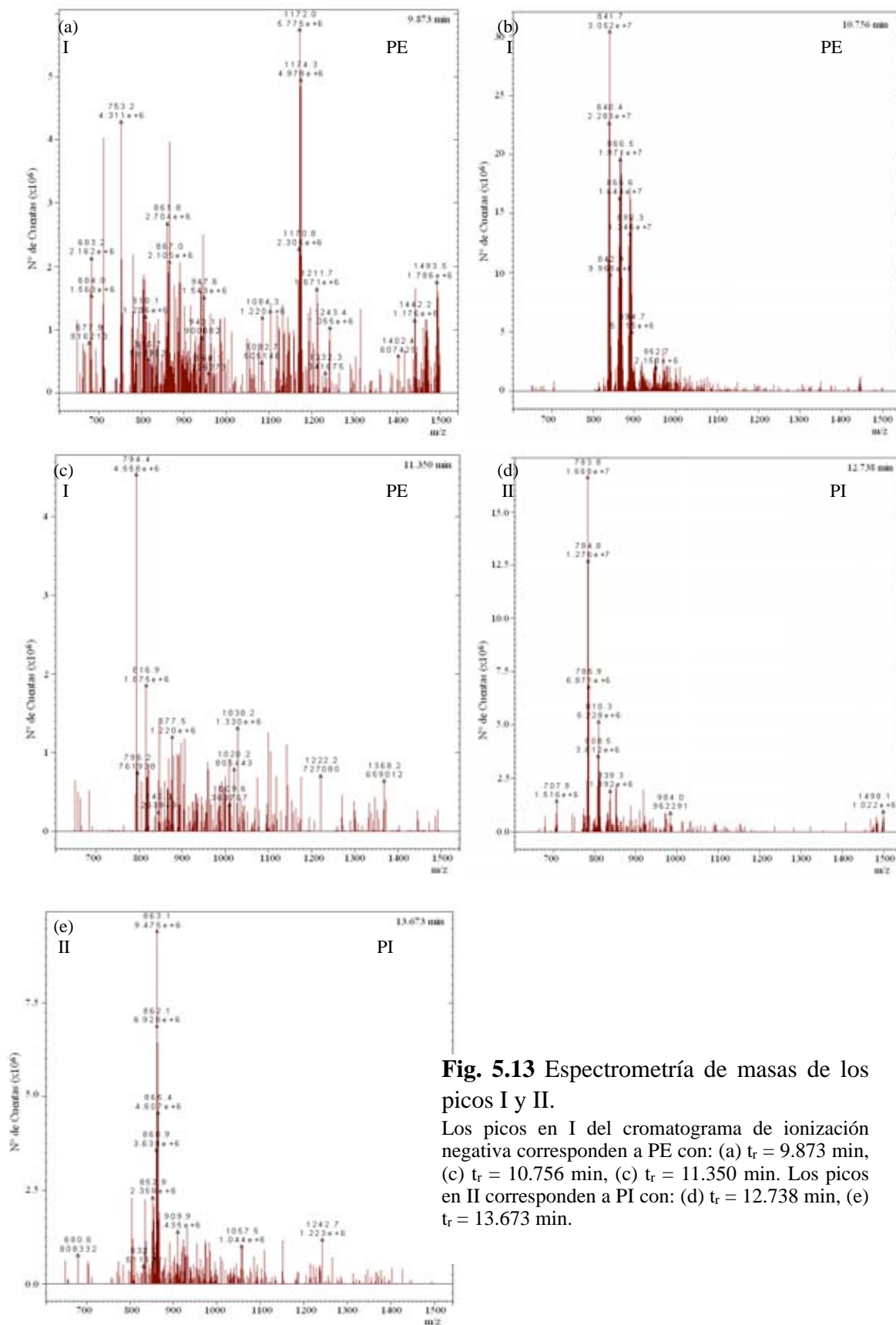


Fig. 5.13 Espectrometría de masas de los picos I y II.

Los picos en I del cromatograma de ionización negativa corresponden a PE con: (a) $t_r = 9.873$ min, (c) $t_r = 10.756$ min, (c) $t_r = 11.350$ min. Los picos en II corresponden a PI con: (d) $t_r = 12.738$ min, (e) $t_r = 13.673$ min.

De la EM se tienen tres espectros que presentan las diferentes especies que componen la PE, estando en $t_r = 10.756$ min la de mayor abundancia con peso de 841.7 (Fig. 5.13c). La EM correspondiente a PI, se tienen dos espectros que presentan dos especies de mayor abundancia, cada uno, con t_r de 12.738 min y 13.673 min, con peso de 783.8 y 863.1, respectivamente (Fig. 5.13d, 5.13e).

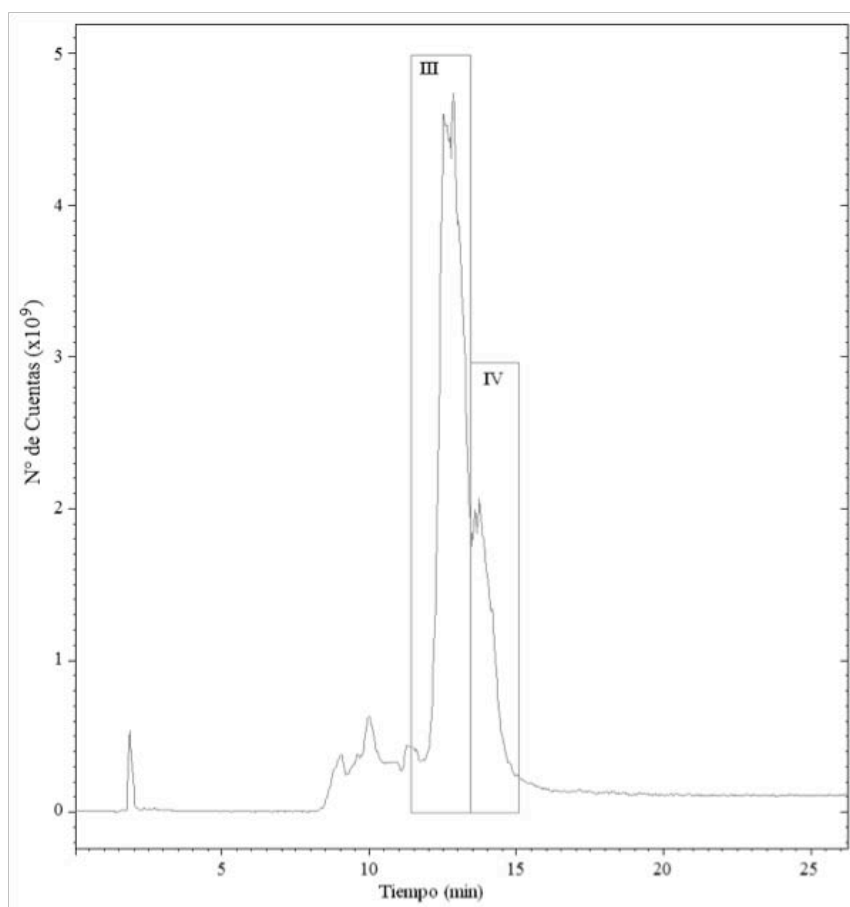


Fig. 5.14 Cromatograma de ionización positiva.

En la cromatografía de ionización positiva se presentan cuatro picos en un intervalo de tiempo de 12-14 min, de los cuales se tiene que los picos en III corresponden a PC, y los picos en IV corresponden a SM (Fig. 5.14), teniéndose una mayor proporción de PC con respecto a SM.

De la EM se tienen dos espectros que presentan las diferentes especies que componen la PC, estando en t_r de 12.526 min y 12.838 min, una especie de mayor abundancia con peso de 752 y 722, respectivamente (Fig. 5.15a, 5.15b). La EM correspondiente a SM, se tienen tres espectros, siendo la más abundante en $t_r = 13.007$ min de peso 723.4 (Fig. 5.15c).

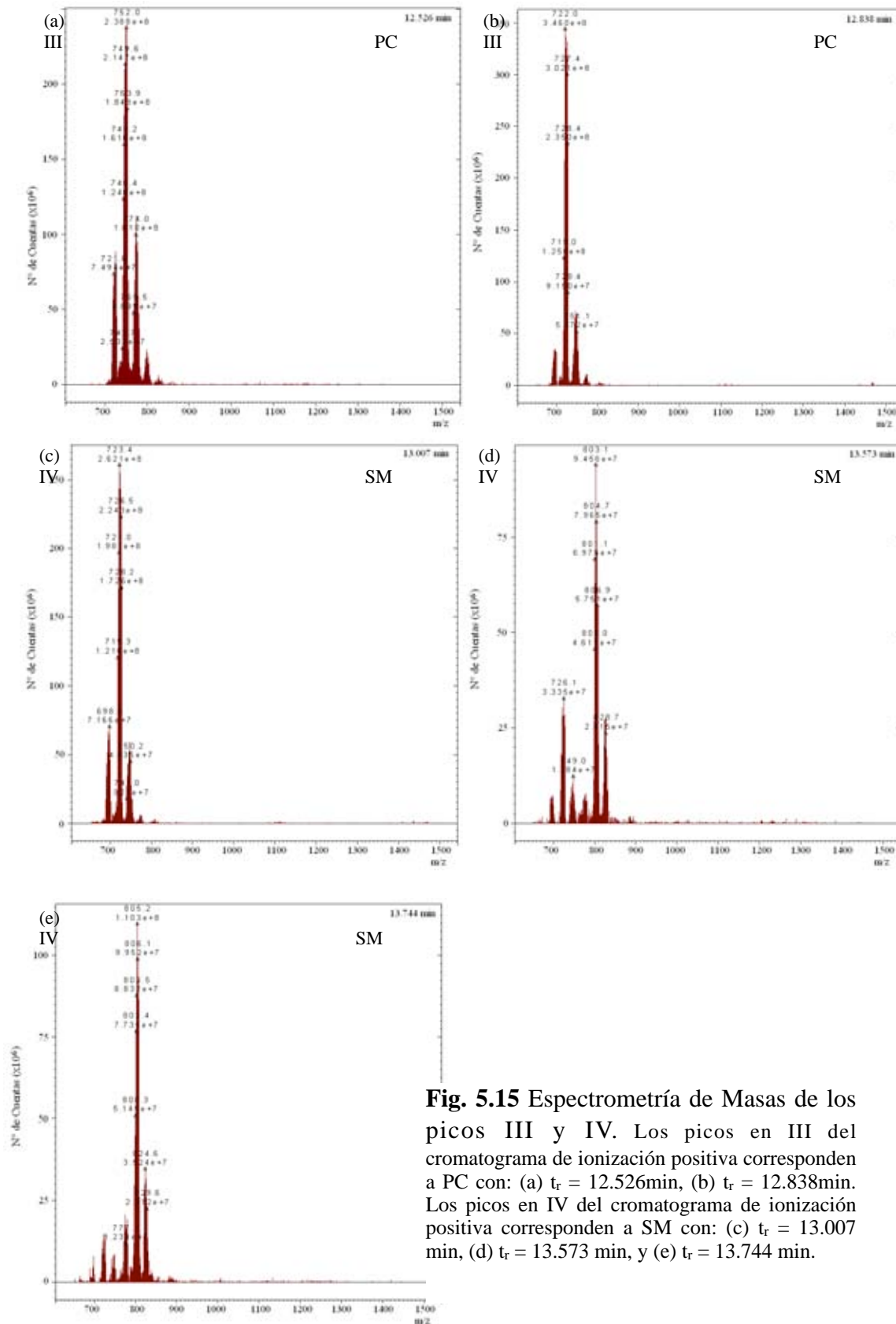


Fig. 5.15 Espectrometría de Masas de los picos III y IV. Los picos en III del cromatograma de ionización positiva corresponden a PC con: (a) $t_r = 12.526$ min, (b) $t_r = 12.838$ min. Los picos en IV del cromatograma de ionización positiva corresponden a SM con: (c) $t_r = 13.007$ min, (d) $t_r = 13.573$ min, y (e) $t_r = 13.744$ min.

Por lo anterior se tiene una relación $PC > SM > PE > PI$, como especies predominantes, que por EM muestra heterogeneidad en la composición lipídica de los CL, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura en otras especies [6], que en este caso el fosfolípido predominante es PC.

Se determinó que los lípidos son el componente predominante, con una proporción lípidos/proteína de 12:1, lo que confirma que contribución energética en el termoanálisis de los CL es la de los lípidos. Además se tiene que 92% de la composición de los CL son lípidos, lo cual es reportado en la literatura [6].

5.4 Microscopía Electrónica de Transmisión

Las figuras 5.16 – 5.18 muestran las imágenes adquiridas de CL aislados. Desde el punto de vista morfológico, los CL resisten al procedimiento de aislamiento, conservando su forma multilamelar semiconcéntrica. Sin embargo, el proceso de fijación de estas estructuras para su análisis por microscopía electrónica de transmisión, descomprimen a las capas de los CL mostrando sus componentes concéntricos, con separaciones entre capas, pero conservando esta estructura sólida bien configurada.

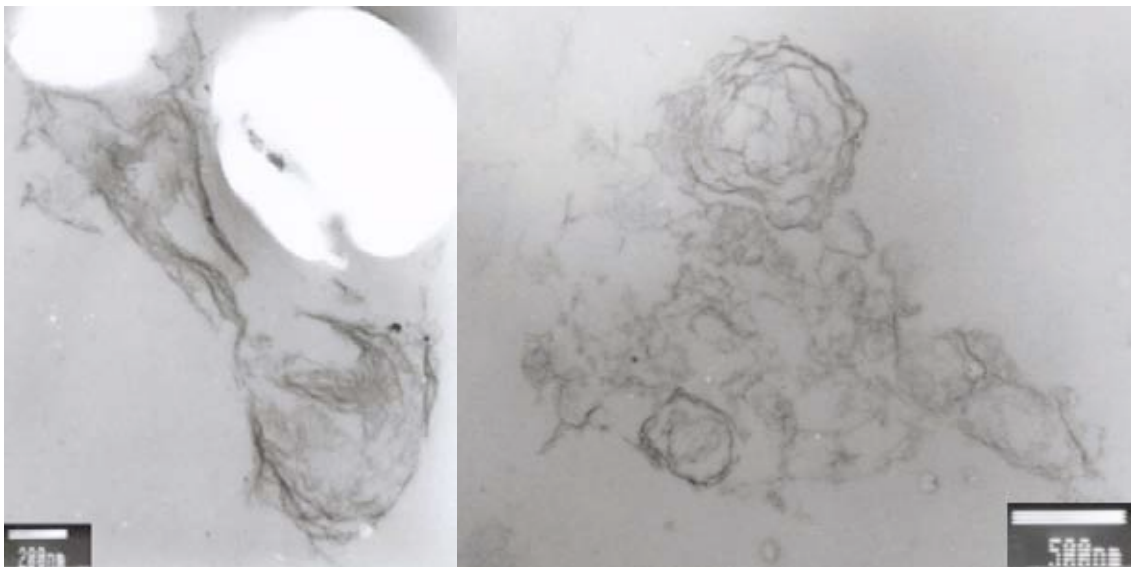


Fig. 5.16 MET de CL aislados de pulmón porcino.

Esta es una imagen adquirida de un corte ultrafino del bloque a 48hrs a 60°C. Se observa la formación concéntrica de multicapas lipídicas característica de los CL, sin embargo, pierden su estado de compactación y estructura por estar cerca de huecos en los cortes, debido al procedimiento de fijación.

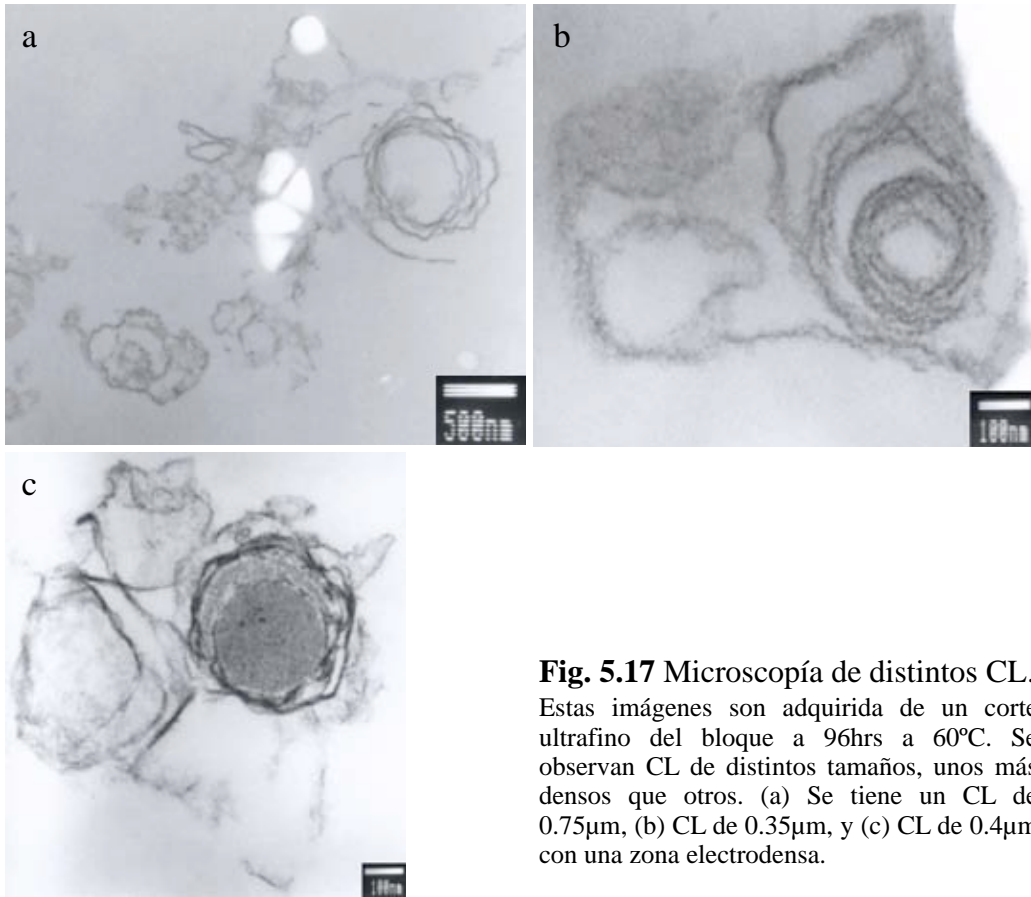


Fig. 5.17 Microscopía de distintos CL. Estas imágenes son adquirida de un corte ultrafino del bloque a 96hrs a 60°C. Se observan CL de distintos tamaños, unos más densos que otros. (a) Se tiene un CL de 0.75 μ m, (b) CL de 0.35 μ m, y (c) CL de 0.4 μ m con una zona electrodensa.

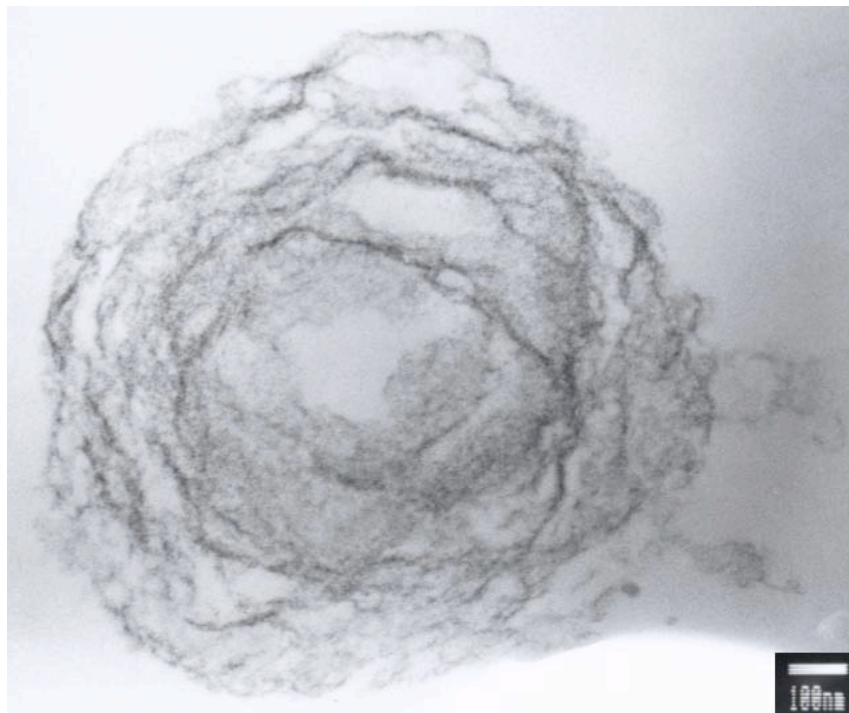


Fig. 5.18 Cuerpo Lamelar.

Microscopía de un cuerpo lamelar de gran tamaño (1.1 μ m), se observan separaciones entre capas, pero conserva una estructura sólida bien configurada.

Capítulo 6

Conclusiones

La importancia de las características químicas y físicas del fluido que compone al surfactante pulmonar estriba en que de ellas depende la función del intercambio de gases entre el aire y los gases que se liberan al torrente circulatorio durante el metabolismo celular, como primera función en la vida independiente de los vertebrados.

Se determinó que la relación fosfolípido/proteína (12:1) en los CL aislados de pulmón porcino es la misma que para SP alveolar. Se demostró la presencia de proteínas en los CL como SP-A, común en el SP alveolar y CL, proSP-B, ABCA3 y la catepsina H, características de los CL. En cuanto a su composición lipídica, se obtuvo una relación $PC > SM > PE > PI$, como lípidos predominantes.

La caracterización termodinámica del surfactante demostró que el SP que se encuentra en el espacio alveolar (LBA), es diferente del surfactante sintetizado y almacenado en los neumocitos tipo II (CL), lo que sugiere una composición química similar pero no idéntica. Las proporciones en cuanto a las diferentes especies de lípidos y la composición proteica son diferentes dependiendo del origen del SP; ya sea intracelular o en el espacio alveolar, en donde ejerce su función al estar en contacto en la interface aire-agua, disminuyendo la tensión superficial y favoreciendo el intercambio de O_2 por CO_2 . El cambio de fase de los lípidos de los CL resulta en una endoterma con una capacidad calorífica que cubre a la endoterma originada por la desnaturalización de las proteínas del CL, esto es comprensible si se comparan la proporción de lípido/proteína.

La determinación de la temperatura de transición de fase del surfactante alveolar porcino y los CL muestra una diferencia de $18^\circ C$, lo cual demuestra una mayor estabilidad térmica de los LBA, esto podría deberse a la interacción con otras proteínas como la SP-A y de la SP-D que se encuentran más abundantes en el LBA.

Del trabajo se concluye que las proteínas presentes en los CL dan una mayor estabilidad térmica a los lípidos con esa estructura. La presencia de dos endotermas en los CL sugiere la coexistencia de diferentes mezclas lípido/proteínas en la misma estructura del CL, que correspondería a los lípidos de la membrana limitante de los CL y los de la zona electrodensa.

La energía de Gibbs calculada en los CL y sus lípidos determina un proceso espontáneo en la transición de fase, siendo menor la energía que se le debe impartir a los lípidos de los CL para llevar a cabo un cambio de fase.

De igual forma que a los CL aislados y el LBA de pulmón porcino, se determinó un cambio en la temperatura de transición de Curosurf, surfactante terapéutico de origen porcino, cuya T_m es 26°C menor que el surfactante de LBA porcino, además las proteínas presentes en este surfactante no tienen T_m en los estudios calorimétricos, lo que indica que se encuentran en estado desnaturalizado, ya que se sabe están presente como fue determinado por inmunoblot.

Survanta, de origen bovino, muestra una temperatura de transición parecido al LBA bovino, a pesar de sólo tener dos proteínas surfactantes SP-B y SP-C, estas proteínas son suficientes para darle la estabilidad térmica necesaria y probablemente estructural en el espacio alveolar, para ser un surfactante terapéutico funcional.

El estudio de las características fisicoquímicas del surfactante pulmonar intracelular (CL), fundamental para el entendimiento de la función de éste fluido, que es esencial durante la primera exposición de un pulmón al aire (neonatos) y la presión atmosférica. Los CL representan una ventaja para analizar la función de futuros surfactantes terapéuticos.

Referencias

- [1] KUMAR, Vinay, ABBAS, Abul K., FAUSTO, Nelson 2005 “Robbins y Cotran Patología estructural y funcional”, Cap. 10,15: 485, 716 – 717.
- [2] GUYTON, Arthur C., HALL, John E. 1997 “Tratado de Fisiología Médica”, Cap. 37: 522 – 523.
- [3] Boya Venge Atlas de histología y organografía microscópica. 2^{da} edición. Editorial Medicina Panamericana. 2004 Madrid, España.
- [4] WANG Dachun, HAVILAND David L., BURNS Alan R., ZSIGMOND Eva, WETSEL Rick A. 2007 “A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells” en *PNAS*, 104(11): 4449 – 4454
- [5] SINAUER ASSOCIATES 2009 <<http://www.sinauer.com>>
- [6] ROONEY S. A., PAGE-ROBERTS B. A., MOTOYAMA E. K. 1975 “Role of lamellar inclusions in surfactant production: studies on phospholipid composition and biosynthesis in rat and rabbit lung subcellular fractions” en *Journal of Lipid Research*, 16: 418 – 425.
- [7] WRIGHT J.R., BENSON Bradley J., WILLIAMS Mary C., CLEMENTS John A. 1984 “Protein composition of rabbit alveolar surfactant subfractions” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 791, 320 – 332.
- [8] BLANCO Quiroz A. 2007 “Deficiencia genética de proteínas surfactantes y patología pulmonar” en *Boletín Pediátrico*, 47(Supl. 2): 38 – 47.
- [9] ANDREEVA Alexandra V., KUTUZOV Mikhail A., and VOYNO-YASENETSKAYA Tatyana A. 2007 “Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells” en *American Journal of Physiology Lung Cell Mol Physiol*, 293: L259 – L271.
- [10] WILLIAMS Mary C. 1977 “Conversion of lamellar body membranes into tubular myelin in alveoli of fetal rat lungs” en *The Journal of Cell Biology*, 72: 260 – 277.
- [11] GOERKE Jon 1998 “Pulmonary surfactant : functions and molecular composition” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408: 79 – 89.
- [12] LI Changgong, ZHU Nian-Ling, TAN Rosemarie C., BALLARD Philip L., DERYNCK Rik, MINOO Parviz 2002 “TGF- β Inhibits Pulmonary Surfactant Protein-B Gene Transcription Through SMAD3 Interactions with NKX2.1 and HNF-3 Transcription Factors” en *Journal of Biological Chemistry*
- [13] SNYDER J. M., MENDELSON C. R. 1987 “Insulin inhibits the accumulation of the major lung surfactant apoprotein in human fetal lung explants maintained in vitro” en *Endocrinology*, 120: 1250 – 1257.
- [14] BAN Nobuhiro, MATSUMURA Yoshihiro, SAKAI Hiromichi, TAKANEZAWA Yasukazu, SASAKI Mayumi, ARAI Hiroyuki, INAGAKI Nobuya 2007 “ABCA3 as a Lipid Transporter in Pulmonary Surfactant Biogenesis” en *The Journal of Biological Chemistry*, 282(13): 9628 – 9634.

- [15] PISON Ulrich, HEROLD Ralf, SCHFIRCH Samuel 1996 “The pulmonary surfactant system: biological functions, components, physicochemical properties and alterations during lung disease” en *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 114: 165 – 184.
- [16] BACHOFEN H., SCHÜRCH S. 2001 *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 129 183-193.
- [17] HOOK Gary E.R., GILMORE Linda B. 1982 “Hydrolases of pulmonary lysosomes and lamellar bodies” en *The Journal of Biological Chemistry*, 257(15): 9211 – 9220.
- [18] DE VRIES Alfons C. J., SCHRAM André W., VAN DEN BERG Marlene, TAGER Joseph M., BATENBURG Joseph J., VAN GOLDE Lambert M.G. 1985 “An improved procedure for the isolation of lamellar bodies from human lung. Lamellar bodies free of lysosomes contain a spectrum of lysosomal-type hydrolases” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 922: 259 – 269.
- [19.] ECKENHOFF Roderic G., SOMLYO Andrew P. 1988 “Rat lung type II cell and lamellar body: elemental composition in situ” en *American Journal of Physiology*, 254: C614 – C620.
- [20] CHANDER Avinash, JOHNSON Robert G., REICHERTER Jayne, FISHER Aron B. 1986 “Lung lamellar bodies maintain an acidic internal pH” en *The Journal of Biological Chemistry*, 261(13): 6126 – 6131.
- [21] SCHMITZ Gerd, MULLER Gertraud 1991 “Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids” en *Journal of Lipid Research*, 32: 1539 – 15705.
- [22] GRATHWOHL C., NEWMAN G.E., PHIZACKERLEY P.J.R., TOWN M-H 1979 “Structural studies on lamellated osmiophilic bodies isolated from pig lung: ³¹P NMR results and water content” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 552: 509 – 518.
- [23] STAHLMAN Mildred T., PHILLIPS Gray Mary, FALCONIERI Mary W., WHITSETT Jeffrey A., WEAVER Timothy E. 2000 “Lamellar Body Formation in Normal and Surfactant Protein B-Deficient Fetal Mice” en *Lab Invest*, 80(3):395 – 403.
- [24] INGENITO E. P., MARK L., MORRIS J., ESPINOSA F. F., KAMM R. D., JOHNSON M. 1999 “Biophysical characterization and modeling of lung surfactant components” en *Journal of Applied Physiology*, 86: 1702 – 1714.
- [25] DEN BREEJEN J. N., BATENBURG Joseph J., VAN GOLDE Lambert M.G. 1989 “The species of acyl-CoA in subcellular fractions of type II cells isolated from adult rat lung and their incorporation into phosphatidic acid” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 1002: 277 – 282.
- [26] CRECELIUS C. A., LONGMORE W. J. 1984 “Acyltransferase activities in adult rat type II pneumocyte-derived subcellular fractions” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 795: 238 – 246.
- [27] GILFILLAN A. M., ROONEY S. A. 1986 “Leukotrienes stimulate phosphatidylcholine secretion in cultured type II pneumocytes” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 876: 22 – 27.
- [28] NIJSSEN J. G., VAN DEN BOSCH H. 1986 “Cytosol-stimulated remodeling of phosphatidylcholine in rat lung microsomes” en *Biochimica et Biophysica Acta (Lipids and Lipid Metabolism)*, 875: 450 – 457.

- [29] NIJSSEN J. G., VAN DEN BOSCH H. 1986 “Coenzyme A-mediated transacylation of sn-2 fatty acids from phosphatidylcholine in rat lung microsomes” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 875: 458 – 464.
- [30] STANFORD G. L., FROSOLONO M. F. 1981 “1-acyl-2-lysophosphatidylcholine: phosphatidylglycerol-2-acyltransferase in lung microsomes and type ii pneumocyte-derived cultures” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 665: 339 – 344.
- [31] BRUMLEY, VAN DEN BOSCH H. 1977 “Lysophospholipase--transferase from rat lung: isolation and partial purification” en *Journal of Lipid Research*, 18: 523 – 532.
- [32] CASALS C., ACEBAL C., CRUZ-ALVAREZ M., ESTRADA P., ARCHE R. 1982 “Lysolecithin:Lysolecithin acyltransferase from rabbit lung: Enzymatic properties and kinetic stud” en *Arch. Biochem. Biophys.* 217: 422 – 433.
- [33] LECERF Jean, FOUILLAND Loïc, GAGNIARRE Jérôme 1987 “Evidence for a high activity of sphingomyelin biosynthesis by phosphocholine transfer from phosphatidylcholine to ceramides in lung lamellar bodies” ” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 918, 48 – 59.
- [34] VOORHOUT Wim F., VEENENDAAL Tineke, KUROKI Yoshio, OGASAWARA Yoshinori, VAN GOLDE Lambert M. G., GEUZE Hans J. 1992 “Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung” en *Journal Histochemistry Cytochemistry*, 40(10): 1589 – 1597.
- [35] FARRELL Philip M., BOURBON Jacques R., NOTTER Robert H., MARIN Lea, NOGEE Lawrence M., WHITSETT Jeffrey A. 1990 “Relationships among surfactant fraction lipids, proteins and biophysical properties in the developing rat lung” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 1044: 84 – 90.
- [36] LIU Lin, WANG Mengshu, FISHER Aron B., ZIMMERMAN Un-Jin P. 1996 “Involvement of annexin II in exocytosis of lamellar bodies from alveolar epithelial type II cells” en *American Journal of Physiology*, 270 (*Lung Cell Mol. Physiol.* 14): L668 – L676.
- [37] VOORHOUT Wim F., VEENENDAAL Tineke, HAAGSMAN H.P., WEAVER Timothy E., WHITSETT Jeffrey A., VAN GOLDE Lambert M. G., GEUZE Hans J. 1992 “Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment” en *American Journal of Physiology*, 263: L479 – L486.
- [38] WEAVER Timothy E., WHITSETT Jeffrey A. 1989 “Processing of hydrophobic pulmonary surfactant protein B in rat type II cells” en *American Journal of Physiology*, 257(*Lung Cell Mol. Physiol.* 1): L100 – L108.
- [39] VORBROKER Diane K., VOORHOUT Wim F., WEAVER Timothy E., WHITSETT Jeffrey A. 1995 “Posttranslational processing of surfactant protein C in rat type II cells” en *American Journal of Physiology*, 269 (*Lung Cell Mol Physiol* 13): L727 – L733.
- [40] MASON Robert J., GREENE Kelly, VOELKER Dennis R. 1998 “Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease” en *American Journal of Physiology*, 275 (*Lung Cell Mol Physiol* 13): L1 – L13.
- [41] POULAIN Francis R., ALLEN Lennell, WILLIAMS Mary C., HAMILTON Robert L., HAWGOOD Samuel 1992 “Effects of surfactant apolipoproteins on liposome structure: implications for tubular myelin formation” en *American Journal of Physiology*, 262 (*Lung Cell Mol Physiol* 6): L730 – L739.

- [42] HAAGSMAN Henk P. 1998 “Interactions of surfactant protein A with pathogens” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408:264 – 277
- [43] SÁENZ Alejandra, CAÑADAS Olga, BAGATOLLI Luís A., SÁNCHEZ-BARBERO Fernando, JOHNSON Mark E., CASALS Cristina 2007 “Effect of Surfactant Protein A on the Physical Properties and Surface Activity of KL4-Surfactant” en *Biophysical Journal* 92:482 – 492.
- [44] SIMATOS G. A., FORWARD K. B., MORROW M. R., KEOUGH K. M. W. 1990 “Interaction between perdeuterated dimyristoylphosphatidylcholine and low molecular weight pulmonary surfactant protein SP-C” en *Biochemistry*, 29(24): 5807 – 5814.
- [45] SHIFFER Kathleen, HAWGOOD Samuel, HAAGSMAN Henk P., BENSON Bradley, CLEMENTS John A., GOERKE Jon 1993 “Lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, alter the thermodynamic properties of phospholipid membranes: a differential calorimetry study” en *Biochemistry*, 32(2): 590 – 597.
- [46] WHITSETT Jeffrey A., NOGEE Lawrence M., WEAVER Timothy E., HOROWITZ Ann D. 1995 “Human Surfactant Protein B: Structure, Function, Regulation, and Genetic Disease” en *Physiological Reviews*, 75(4): 749 – 757.
- [47] VORBROKER Diane K., PROFITT Sherri A., NOGEE Lawrence M., WHITSETT Jeffrey A. 1995 “Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency” en *American Journal of Physiology*, 268 (*Lung Cell Mol Physiol* 12): L647 – L656.
- [48] BAATZ John E., ELLEDGE Barry, WHITSETT Jeffrey A. 1990 “Surfactant protein SP-B induces ordering at the surface of model membrane bilayers” en *Biochemistry*, 29: 6714 – 6720.
- [49] FOSTER Cherie D., ZHANG Peggy X., GONZALES Linda W., GUTTENTAG Susan H. 2003 “In Vitro Surfactant Protein B Deficiency Inhibits Lamellar Body Formation” en *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*, 29: 259 – 266.
- [50] WILLIAMS Mary C., HAWGOOD Samuel, HAMILTON Robert L. 1991 “Changes in lipid structure produced by surfactant proteins SP-A, SP-B, and SP-C” en *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*, 5: 41 – 50.
- [51] BEERS Michael F., MULUGETA Surafel 2005 “Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease” en *Annual Review of Physiology*, 67: 663 – 696.
- [52] BRASCH Frank, BRINKE Anja ten, JOHNEN Georg, OCHS Matthias, KAPP Nadine, MÜLLER Klaus M., BEERS Michael F., FEHRENBACH Heinz, RICHTER Joachim, BATENBURG Joseph J., BÜHLING Frank 2002 “Involvement of Cathepsin H in the Processing of the Hydrophobic Surfactant-Associated Protein C in Type II Pneumocytes” en *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 26:659 – 670.
- [53] WILLIAMS Mary C. 1982 “Ultrastructure of Tubular Myelin and Lamellar Bodies in Fast-Frozen Adult Rat Lung” en *Experimental Lung Research* 4: 37 – 46.
- [54] PASQUALI Ricardo C., BREGNI Carlos, SERRAO Rosa 2005 “Estructura de las Principales Fases Líquido-Cristalinas Liotrópicas” en *Acta Farm. Bonaerense* 24(3): 453 – 457.

- [55] HYDE S. T. 2001 “Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases”, en “Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry” (K. Holmberg, editor) John Wiley & Sons, Ltd.: 299 – 332.
- [56] FONTELL K. 1978 “Liquid crystalline behavior in lipid-water systems” en *Prog. Chem. Fats other Lipids* 16: 145 – 62.
- [57] SEDDON J. M., R. H. TEMPLER 1995 “Polymorphism of Lipid-Water Systems”, en “Handbook of Biological Physics” (R. Lipowsky & E. Sackmann, eds.). Volumen 1, Elsevier Science B. V., 98 – 160.
- [58] WINSOR P.A. 1968 “Binary and multicomponent solutions of amphiphilic compounds. Solubilization and the formation, structure, and theoretical significance of liquid crystalline solutions” en *Chemical Reviews* 68(1): 1 – 40.
- [59] PASQUALI Ricardo 2006 “Estructuras líquida cristalinas y sus aplicaciones farmacéuticas y cosméticas”, *Tesis*, Universidad de Buenos Aires.
- [60] PASQUALI Ricardo 2009 “ Los cristales líquidos y sus aplicaciones farmacéuticas” en *Industria Farmacéutica* A003:1 – 10.
- [61] BURDUCEA G. 2004 “Lyotropic liquid crystals I. Specific structures” en *Romanian Reports in Physics* 56(1): 66 – 86.
- [62] PRIVALOV P. L., KHECHINASHVILI N. N. 1974 “A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study” en *Journal Molecular Biology* 86: 665 – 684.
- [63] PRIVALOV P. L., POTEKHIN S. A 1986 “Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in protein” en *Methods Enzymol* 131: 4 – 51.
- [64] PRIVALOV P. L., FILIMONOV V. V. 1978 “Thermodynamic analysis of transfer RNA unfolding” en *Journal Molecular Biology* 122(4): 447 – 464.
- [65] MABREY S., STURTEVANT J. M. 1978 “High sensitivity differential scanning calorimetric study of mixtures of cholesterol with dimyristoyl and dipalmitoylphosphatidylcholines” en *Methods Membrane Biology* 9: 237.
- [66] ZEMANSKY M. W., DITTMAN R. H. *Calor y Termodinámica*. U.S.A: McGraw-Hill.
- [67] LATORRE Ramón 1996 ”Biofísica y Fisiología Celular”, Apéndice 1.2: 485, 39 – 43.
- [68] KOYAMA T. M., STEVENS C. R., BORDA E. J., GROBE K. J., CLEARY D. A. 2000 “Characterizing the Gel to Liquid Crystal Transition in Lipid-Bilayer Model Systems” en *The Chemical Educator* 5(3): S1430 – 4171.
- [69] LADBROOKE B. D., WILLIAMS R. M., CHAPMAN D. 1968 “Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 150: 333 – 340.
- [70] DEVLIN, Thomas M. 2004 *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. España: Reverté.
- [71] GAO Fei, TIAN Xinkui, WEN Dawei, LIAO Jie, WANG Tao, LIU Huwei 2006 “Analysis of phospholipid species in rat peritoneal surface layer by liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap mass spectrometry” en *Biochimica et Biophysica Acta* 1761:667 – 676.

- [72] GILDER Helena, HASCHEMEYER Rudy H, FAIRCLOUGH Gordon F., MYNARCIK Jr., MYNARCIK Dennis C. 1981 “Isolation and characterization of lamellar body material from rat lung homogenates by continuous linear sucrose gradients” en *Journal of Lipid Research*, 22: 1277 – 1285.
- [73] WRIGHT Jo Rae, WAGER Ruth E., HAMILTON Robert L., HUANG May, CLEMENTS John A. 1986 “Uptake of lung surfactant subfractions into lamellar bodies of adult rabbit lungs” en *Journal of Appl. Physiol.* 60(3): 817 – 825.
- [74] MAGOON Martha W., WRIGHT Jo Rae, BARITUSSIO Aldo, WILLIAMS Mary C., GOERKE Jon, BENSON Bradley J., HAMILTON Robert L., CLEMENTS John A. 1983 “Subfraction of lung surfactant implication for metabolism and surface activity” en *Biochimica et Biophysica Acta*, 750: 18 – 31.
- [75] Bio-Rad *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Instruction Manual*. U.S.A: GE Bio-Rad Laboratories.
- [76] GE Healthcare 2004 *2-D Electrophoresis Principles and Methods*. Alemania: GE Healthcare.
- [77] JACOBSON Ken, MOURITSEN Ole G., ANDERSON Richard G. W. 2007 “Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics” en *Nature Cell Biology* (9): 7 – 14.
- [78] CHIESI 2009 <<http://www.trinity-chiesi.co.uk>>
- [79] ARCINIEGA C. Marcelino 2009 “Estudio de monocapas de Langmuir de surfactantes pulmonares utilizados en el tratamiento del síndrome de deficiencia respiratoria neonatal” *Tesis*, Universidad Nacional Autónoma de Mexico.
- [80] ABBOTT 2009 <<http://www.abbott.com>>
- [81] EXPASY PROTEOMICS SERVER 2009 <<http://www.expasy.ch>>
- [82] AVANTI POLAR LIPIDS 2009 <<http://www.avantilipids.com>>

Índice de Figuras

2.1 Anatomía Pulmonar.	3
2.2 Sección transversal de un saco alveolar.	4
2.3 Unidad funcional respiratoria.	5
2.4 Neumocito Tipo II.	5
2.5 Porcentaje de los distintos componentes del factor surfactante.	6
2.6 Procesamiento y secreción de los componentes del surfactante.	7
2.7 Micrografía electrónica de una sección de pulmón de rata.	8
2.8 Examinación histológica de pulmón de ratón.	9
2.9 Micrografías electronica de conductos alveolares.	9
2.10 Micrografía electrónica de CL.	10
2.11 Estructura molecular del DPPC.	11
2.12 Organización estructural de la SP-A.	15
2.13 Biosíntesis de la SP-B.	16
2.14 Representación esquemática del gen y biosíntesis de la SP-C.	17
2.15 Cuerpos Lamelares malformados.	19
2.16 Localización de pro SP-C N-terminal en NTII por inmunomicroscopía	20
2.17 Molécula anfifílica.	21
2.18 Organización de las moléculas anfifílicas.	22
2.19 Clasificación de los tensoactivos.	23
2.20 Ejemplos de tensoactivos.	23
2.21 Bicapas flexibles.	24
2.22 Diagrama de fases.	24
2.23 Estados de agregación.	25

2.24 Fases Gel.	27
2.25 Fase lamelar.	27
2.26 Transición gel–cristal líquido.	28
2.27 Vesículas lamelares.	28
2.28 Texturas de la Fase Lamelar.	29
2.29 FF-MET de un Neumocito Tipo II.	30
2.30 Representación esquemática de un calorímetro.	32
2.31 Termograma.	34
2.32 Tiempos de respuesta.	34
2.33 Termograma y curva de Entalpía.	35
2.34 Registro calorimétrico de PE con distintos largos de cadena.	37
2.35 Efecto de péptidos en las transiciones de fase de lípidos.	38
2.36 Efectos en la adición de SP-B y SP-C a DPPC y DPPG.	38
2.37 Efecto del colesterol en la transición de fases.	39
2.38 Molécula de colesterol.	39
2.39 Electroforesis en gel.	41
2.40 SDS-PAGE.	41
2.41 SDS-PAGE 2D.	42
2.42 HPLC/ESI-MS.	44
2.43 Espectrometría de masas negativa de la etanolamina.	44
4.1 Modelo experimental 1.	47
4.2 Centrífuga Sorval R5C y rotor SS34.	48
4.3 Homogenado de pulmón de rata.	48
4.4 Gradientes discontinuos de sacarosa.	48

4.5 Ultracentrífuga y sus rotores.	49
4.6 Cuerpos Lamelares aislados.	49
4.7 Cuerpos Lamelares lavados.	49
4.8 Fases formadas de los cuerpos lamelares con el Cloroformo-Metanol.	50
4.9 Microcalorímetro.	51
4.10 Surfactantes Terapéuticos Naturales.	51
4.11 Equipo de electroforesis 1D.	52
4.12 Colocación del gel en la cámara.	53
4.13 Suministrador de corriente.	53
4.14 Equipo para primera dimensión.	54
4.15 Preparación de la muestra y del equipo para la primera dimensión.	55
4.16 HPLC/ESI-MS.	56
4.17 Microscopio de Transmisión Electrónica.	57
5.1 Termogramas de los Cuerpos Lamelares de Rata.	59
5.2 Termogramas de Cuerpos Lamelares de Porcino.	61
5.3 Termogramas de la Preparación 3.	62
5.4 Termogramas de LBA Porcino.	63
5.5 Termogramas de Curosurf.	65
5.6 Termogramas de Survanta.	66
5.7 Termogramas de LBA Bovino.	67
5.8 Termogramas de LBA Humano.	68
5.9 SDS-PAGE de primera dimensión al 12%.	72
5.10 SDS-PAGE de primera dimensión al 6%.	73
5.11 SDS-PAGE 2D.	73

5.12 Cromatografía de ionización negativa.	75
5.13 Espectrometría de masas de los picos I y II.	76
5.14 Cromatografía de ionización positiva.	77
5.15 Espectrometría de masas de los picos III y IV.	78
5.16 MET de CL aislados de pulmón porcino.	79
5.17 Microscopía de distintos CL.	80
5.18 Cuerpo Lamelar.	80