



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTA DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Recopilación teórica de las propiedades del factor surfactante”

Tesis para obtener el título de
Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Presenta: Vázquez Duhart Claudia Ivette

Asesora: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

Asesora Externa: QFB Juana Irma Castillo Salazar

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Recopilación teórica de las propiedades del factor surfactante

Que presenta la pasante: Claudia Ivette Vázquez Duhart
Con número de cuenta: 305770011 para obtener el Título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de septiembre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza	
VOCAL	Dr. Francisco López Mejía	
SECRETARIO	Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira	
1er. SUPLENTE	Dr. David Quintanar Guerrero	
2do. SUPLENTE	M. en C. Alberto Natahliel Soto Guevara	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

A Dios nuestro señor por haberme puesto en este camino, pero sobre todo agradecerle por las personas que me acompañaron a lo largo de todos estos años y por medio de las cuales me demostró su amor.

A mi familia cuyo amor, entrega, paciencia y esfuerzos me dieron las herramientas y el impulso necesario para poder cumplir con este sueño; haciendo especial mención a mis padres, hermano, abuelos y mi madrina.

A mis profesores, por sus enseñanzas; con especial agradecimiento a la Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira, quien depositó su confianza en mí, siendo que su dedicación, comprensión y enseñanzas se hicieron latentes en todo momento.

Este trabajo se llevo a cabo en el Laboratorio de Virología del Edificio de Posgrado, bajo la asesoría de la Dra. Susana Mendoza Elvira y con apoyo del proyecto PAPIIT IN209008-2 and GVC-16.<registro de patente 00098987

ÍNDICE

RESUMEN...	5
JUSTIFICACIÓN...	7
OBJETIVOS...	9
UNIDAD 1: FACTOR SURFACTANTE...	10
Fisiología de la producción del factor surfactante...	10
¿Qué es el factor surfactante?...	18
Composición del factor surfactante...	20
UNIDAD 2: IMPORTANCIA MÉDICA DEL FACTOR SURFACTANTE...	25
¿Qué es el síndrome de dificultad respiratoria en recién nacidos?...	25
Cuadro clínico del síndrome de dificultad respiratoria...	28
Tratamiento para el síndrome de dificultad respiratoria...	29
UNIDAD 3: COMPARACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS TIPOS DE FACTOR SURFACTANTE EXÓGENO...	32
Factor surfactante natural...	33
Factor surfactante sintético...	37
UNIDAD 4: Forma de producción del surfactante natural exógeno...	40
Antecedentes del proceso de producción...	40
Fundamento de la técnica...	41
Forma general de producción...	42
ANÁLISIS DE LA INVESTIGACIÓN...	54
CONCLUSIONES...	58
REFERENCIAS...	60

RESUMEN

Para que los seres humanos logren llevar a cabo el proceso de respiración cuenta con el sistema respiratorio, que tiene como unidad funcional los alveolos, conformados por macrófagos alveolares, neumocitos tipo I y neumocitos tipo II, siendo estos últimos las células capaces de producir, almacenar y secretar el surfactante pulmonar también llamado factor surfactante, el cual tiene como función reducir la tensión superficial que se presenta en la interfase aire-líquido, evita que los pulmones se colapsen al final de la respiración, además de participar en funciones inmunológicas.

El surfactante pulmonar se compone de fosfolípidos (80-90%) y proteínas (10%), siendo la fosfatidilcolina en forma disaturada (50-60%) su principal componente y es la molécula con mayor capacidad tensoactiva, mas requiere del resto de las biomoléculas para formar la monocapa que recubre y protege al alveolo. Dentro de la porción proteica se encuentran las proteínas del surfactante A, B, C y D que también participan en la formación de la monocapa y en el caso de las proteínas A, B y D presentan acción inmunológica; donde A y D son moléculas hidrofílicas, mientras que B y C son hidrofóbicas. Estas moléculas serán sintetizadas en el aparato del Golgi de los neumocitos, con excepción de la proteína A y serán empaquetadas en forma de vesículas denominadas cuerpos lamares, los cuales se van a almacenar dentro de la célula y serán secretados en base a las necesidades del organismo.

La incapacidad de los neumocitos para sintetizar surfactante pulmonar al momento de nacer trae como consecuencia un aumento de la tensión superficial y una incapacidad severa para respirar, considerándose esto una patología antiguamente conocida como Enfermedad de Membrana Hialina (EMH) y en la actualidad es denominada Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR). Esta falla por parte de los neumocitos es consecuencia de una inmadurez pulmonar, que se presenta ante un nacimiento prematuro, pretérmino o bien en neonatos de término con alteraciones respiratorias, considerándose la principal patología entre los recién nacidos prematuros y pretérmino de México, reportando una tasa de mortalidad elevada.

El diagnóstico de este padecimiento se hace en base a la clínica, observándose dificultad para respirar, aleteo nasal y quejido respiratorio durante las primeras horas de vida, que en casos severos se acompaña de cianosis, siendo la aplicación de surfactante exógeno el mejor tratamiento, pudiendo ser profiláctico (aplicación previa a la aparición del SDR) con una dosis única, o bien de rescate (tras la aparición del cuadro clínico) haciendo uso de dosis múltiples dependiendo

la evolución del paciente; tratamientos que se deben acompañar con una ventilación mecánica.

En la actualidad existen dos tipos de surfactante, los sintéticos y los naturales, donde estos últimos son producidos a partir de la manipulación de pulmones bovinos o porcinos, están compuestos de fosfolípidos y proteínas propias del surfactante, reportan una velocidad de acción más rápida y acción desinflamatoria. Los surfactante sintéticos son productos que no provienen de tejidos animales, solo contienen fosfolípidos y logran los mismos resultados clínicos que los productos naturales pero de forma más lenta, por lo que se esta trabajando en complementarlos con moléculas similares a las proteínas del surfactante para hacerlos más competitivos, sin embargo siguen en investigación. Esos productos presentan un costo elevado por lo que no todos tienen acceso a ellos, haciendo necesario seguir trabajando en nuevas alternativas de producción.

El proceso de producción de surfactante natural se trabaja en dos fases la no aséptica y la aséptica, la primera implica una serie de procesos por medio de los cuales se va a ir eliminando el tejido pulmonar innecesario, buscando la obtención de un líquido que contenga las sustancias del surfactante junto con otras moléculas contaminantes, que durante la fase aséptica serán eliminadas ya que el objetivo de esta es purificar y esterilizar el producto. El proceso de obtención de los compuestos del surfactante varia entre las patentes, pero todas se basa en la extracción con solventes orgánicos, técnica que utiliza como base la distinta capacidad de las moléculas para solubilizarse, donde los compuestos lipídicos y las proteínas hidrofóbicas se solubilizaran en el solvente orgánico.

JUSTIFICACIÓN

El factor surfactante o surfactante pulmonar es una mezcla compleja con la finalidad de disminuir la tensión que se produce al momento de realizar el intercambio gaseoso durante el proceso de respiración, evitan el colapso pulmonar en la parte final de la expiración, al mismo tiempo que presenta funciones inmunológicas. Esta mezcla se produce en los neumocitos tipo II, células presentes en los alveolos, la cual es excretada dependiendo de las necesidades del organismo y se almacena en forma de cuerpos lamares en el citoplasma de los neumocitos; donde la falta de madurez pulmonar impide que estas células sean capaces de producir y secretar el surfactante, por lo que una inmadurez pulmonar en los recién nacidos; ya sea a causa de un nacimiento prematuro, pretérmino o en un neonato de término con alteraciones en los pulmones; provoca una incapacidad para respirar adecuadamente, patología a la que se le conoce como Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR), donde los neonatos deben realizar grandes esfuerzos para respirar sin conseguir una oxigenación adecuada y la falta de tratamiento lleva en un colapso pulmonar.

El tratamiento mas aceptado para tratar esta patología es la aplicación de un surfactante exógeno; ya sea natural o sintético; acompañado de asistencia respiratoria mecánica, donde el surfactante exógeno realizará las funciones que debería hacer el surfactante endógeno, al mismo tiempo que estimula a los neumocitos del neonato para que comiencen a sintetizar su propio surfactante. Sin embargo los surfactantes que se comercializan actualmente tienen un costo elevado, haciendo que no todas las instituciones cuenten con acceso a este producto. Actualmente México ha establecido convenios con empresas extranjeras para el abastecimiento de surfactante, debido a que no se produce en nuestro país y se reporta que el SDR es la patología de mayor incidencia entre los recién nacidos prematuros y pretérmino, estadística que va en aumento y presenta una tasa de mortalidad elevada.

México ante la alta incidencia de esta patología y los elevados costos de los productos del mercado, se ve en la necesidad de implementar formas de producción del surfactante, buscando con ello disminuir los costos y garantizar un abastecimiento de todas las instituciones; logrando con ello que los recién nacidos con este síndrome puedan ser tratados oportunamente y así disminuir la mortalidad. Partiendo de esta necesidad se ha realizado una recopilación sobre la información que rodea al surfactante, la cual nos permite conocer sus propiedades, funciones, la alteración fisiológica que produce su ausencia, así como también los distintos productos que se comercializan actualmente y su forma de producción; buscando con esto un mejor y mayor entendimiento de lo que es el factor surfactante, las herramientas para su obtención y las características que se

deben tener en cuenta para su producción, logrando con esta investigación se establezca un precedente como base para en un futuro poder implementar la producción de un surfactante exógeno en nuestro país, ya que actualmente se ha convertido en un producto indispensable en las unidades de neonatología en nuestras instituciones de salud.

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar una investigación teórica acerca de la composición del factor surfactante, sus funciones y su importancia, así como también de las herramientas necesarias para su extracción a partir de tejidos y la producción de un producto exógeno.

Objetivos particulares

1. Investigar la composición del factor surfactante, su función y las alteraciones fisiológicas que produce su ausencia.
2. Realizar una comparación teórica entre los surfactantes exógenos que existen en la actualidad.
3. Realizar una recopilación bibliográfica de las distintas metodologías establecidas para la obtención y producción del surfactante natural exógeno.

UNIDAD 1: FACTOR SURFACTANTE

1.1 Fisiología del factor surfactante

Sistema respiratorio

Para poder comprender el factor surfactante se debe partir de que es una sustancia que se encuentra de forma natural en el tracto respiratorio, específicamente dentro de la porción respiratoria y se produce por los neumocitos tipo II, por lo que es necesario comenzar haciendo una descripción generalizada del sistema respiratorio, que tiene como función el intercambio de gases, proporcionar oxígeno y eliminar dióxido de carbono, proceso que se logra a través de cuatro fenómenos, que en conjunto se conocen como respiración, que son:

- Respiración o ventilación: Flujo de aire hacia los pulmones y desde ellos.
- Respiración externa: Intercambio de oxígeno del aire inspirado por el dióxido de carbono de la sangre.
- Transporte de gases: Transporte de oxígeno y dióxido de carbono hacia las células y desde ellas.
- Respiración interna: Intercambio de dióxido de carbono por oxígeno en la proximidad de las células.

En el caso de la ventilación y respiración ocurren propiamente dentro del aparato respiratorio, mientras que el transporte de gases en el aparato circulatorio y la respiración en todos los tejidos del cuerpo (Gartner & Hiatt, 2008).

Para que este sistema pueda llevar a cabo sus funciones se compone de un grupo de órganos (Tabla 1), los cuales para facilitar su estudio se han dividido en dos porciones; la primera se conoce como porción conductora, que se subdivide en extrapulmonar (fuera de los pulmones) e intrapulmonar (dentro de los pulmones), que en conjunto se encargan de transportar el aire del medio externo a los pulmones. La segunda porción es la respiratoria, localizada dentro de los pulmones y su función es el intercambio real de oxígeno por dióxido de carbono (Tenorio, 2005).

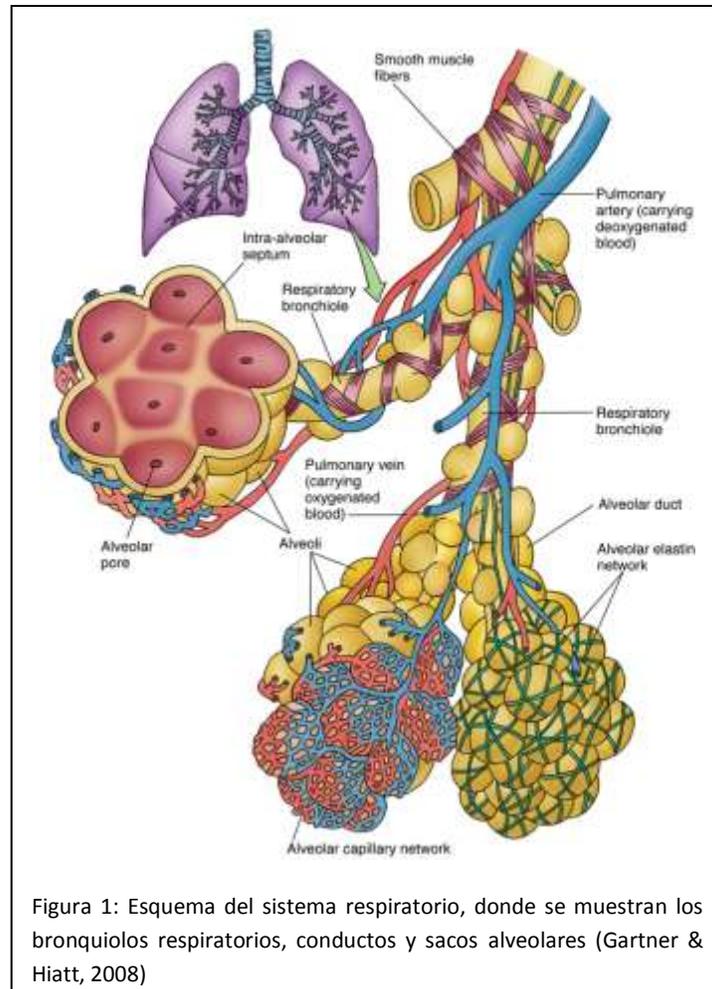
Tabla 1: Divisiones y características distintivas del aparato respiratorio (1 de 3)				
Primera porción				
<i>Conductora extrapulmonar</i>				
Órgano		Características	Epitelio	Tipos celulares
Cavidad nasal	Vestíbulo nasal	Contiene pelos que impiden entren partículas más grandes que el polvo	Escamoso estratificado queratinizado	Epidermis
	Cavidad nasal respiratoria	Vascularizada, posee glándulas seromucosas y elementos linfoides que ayudan a la producción de IgA, IgE e IgG	Respiratorio	Basales, calciformes, ciliadas, en cepillo, serosas
	Cavidad olfatoria	Recubierta por células olfatorias, ayuda a la percepción de olores, contiene las glándulas de Bowman (secretan líquido seroso)	Olfatorio	Olfatorio
Senos paranasales		Espacios que se comunican con la cavidad nasal y arrastran el moco hacia ellos	Respiratorio	Cilíndrico ciliado
Nasofaringe		Contiene las amígdalas, ayuda en la fonación y es el vestíbulo para el aparato respiratorio y digestivo, que comunican el exterior y el interior	Respiratorio	Basales, calciformes, ciliadas en cepillo, serosas

Tabla 1: Divisiones y características distintivas del aparato respiratorio (2 de 3)			
Primera porción			
<i>Conductora extrapulmonar</i>			
Órgano	Características	Epitelio	Tipos celulares
Laringe	Protege las vías respiratorias de la entrada de líquidos o sólidos, es órgano de la voz	Respiratorio y escamoso estratificado no queratinizado	Basales, caliciformes, ciliadas, en cepillo, serosas
Tráquea	Pasaje del aire a los pulmones	Respiratorio	Basales, caliciformes, ciliadas, en cepillo, serosas
Bronquios primarios	Estructura idéntica a la de la tráquea, se divide en 2 y cada parte perfora el hilio del pulmón acompañado de venas, arterias y vasos linfáticos pulmonares	Respiratorio	Basales, caliciformes, ciliadas, en cepillo, serosas
<i>Conductora intrapulmonar</i>			
Bronquios secundarios	El pulmón derecho tiene 2 y el izquierdo 3. Cuenta con glándulas seromucosas y elementos linfoides. Se subdividen en bronquios terciarios o segmentarios, que se ramifican pasando a una sección discreta de tejido pulmonar conocida como segmento broncopulmonar	Respiratoria	Basales, caliciformes, ciliadas, en cepillo, serosas

Tabla 1: Divisiones y características distintivas del aparato respiratorio (3/3)

Primera porción			
<i>Conductora intrapulmonar</i>			
Órgano	Características	Epitelio	Tipos celulares
Bronquiolos primarios	Llevar aire a un lóbulo pulmonar. Carece de glándulas y cartílago, contiene células Clara (protegen el epitelio bronquial)	Cilíndrico simple a cuboides simple	Células ciliadas, células clara, calciformes
Bronquiolos terminales	Parte final de la porción conductora, incluye tejido conectivo fibroelástico, se rodea de capas de células de músculo liso	Cuboide simple	Algunas células ciliadas, muchas células Clara
Segunda porción: Respiratoria			
Bronquios respiratorios	Similar a los terminales, cada uno termina en un conducto alveolar, donde ocurre el intercambio gaseoso	Cuboide simple y escamoso simple muy atenuado	Algunas células cuboides ciliada, células Clara, neumocitos tipo I y II
Conductos alveolares	Son disposiciones lineales de los alveolos	Escamoso simple muy atenuado	Neumocitos tipo I y II
Saco alveolar	Parte final del conducto alveolar, en forma de racimo	Escamoso simple muy atenuado	Neumocitos tipo I y II
Alvéolo	Unidad estructural y funcional primaria del sistema, permite el intercambio de gases	Escamoso simple muy atenuado	Neumocitos tipo I, II y macrófagos alveolares

En este caso se debe hacer un enfoque especial a los alveolos, que son una evaginación pequeña, con aproximadamente 200 micras de diámetro, compuesta por los bronquiolos respiratorios, conductos y sacos alveolares (Figura 1) y se encuentran dentro de los pulmones en la porción respiratoria; formando la unidad estructural y funcional principal del sistema respiratorio, que gracias a sus paredes delgadas permite el intercambio de gases y pese a ser una estructura muy pequeña al existir unos 300 millones por pulmón, le confieren a este su superficie esponjosa y la capacidad de hacer el intercambio gaseoso.



Los alveolos dentro de su estructura tienen dos tipos de células: los macrófagos alveolares y los neumocitos, donde estos últimos se subdividen en tipo I y II. El 95% de la superficie alveolar se integra de neumocitos tipo I, también llamados células alveolares tipo I o células alveolares escamosas, cuyo citoplasma es muy delgado, su núcleo es ancho y contiene una población escasa de organelos celulares, cuya función es formar uniones de unas con otras para evitar el escape del líquido extracelular a la luz alveolar.

Los neumocitos tipo II, también conocidos como células alveolares mayores, células septales o células alveolares tipo II, solo ocupan el 5% de la superficie alveolar, siendo células entremezcladas con los neumocitos tipo I, que presentan un núcleo central, abundante retículo endoplasmático rugoso, un aparato de Golgi bien desarrollado y mitocondrias, siendo su característica más distintiva los cuerpos laminares, también conocidos como cuerpos lamelares o lamares, de 0.2 a 2 μm de diámetro que constituyen un 18 a 24% del citoplasma (Ruiz & Muñoz, 2010) (Figura 2) y contienen el surfactante pulmonar, el cual secreta al interior del alveolo en forma paulatina (Gartner & Hiatt, 2008); por lo cual se consideran como las células responsables de la síntesis, empaquetamiento y secreción del surfactante pulmonar, participando también en su recaptación (Ruiz & Muñoz, 2010).

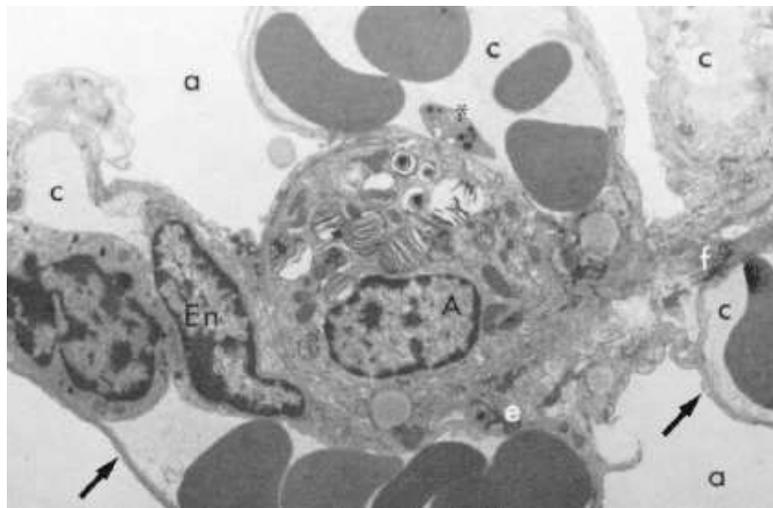


Figura 2: Micrografía electrónica de transmisión de un neumocito tipo II, donde se observa el núcleo (A) rodeado de varios cuerpos laminares, alvéolos (a), capilares (c), donde las flechas representan la barrera alveolo capilar (Gartner & Hiatt, 2008).

Los monocitos tras llegar al intersticio pulmonar se transforman en los macrófagos alveolares, también llamadas células del polvo, los cuales migran entre los neumocitos tipo I y penetran a la luz del alvéolo, donde tendrán la función de fagocitar todo material particulado, como polvo y bacterias, conservando un ambiente estéril dentro de los pulmones; además de ayudar a los neumocitos tipo II en el trabajo de recaptación del surfactante y eliminando el exceso del mismo (Gartner & Hiatt, 2008).

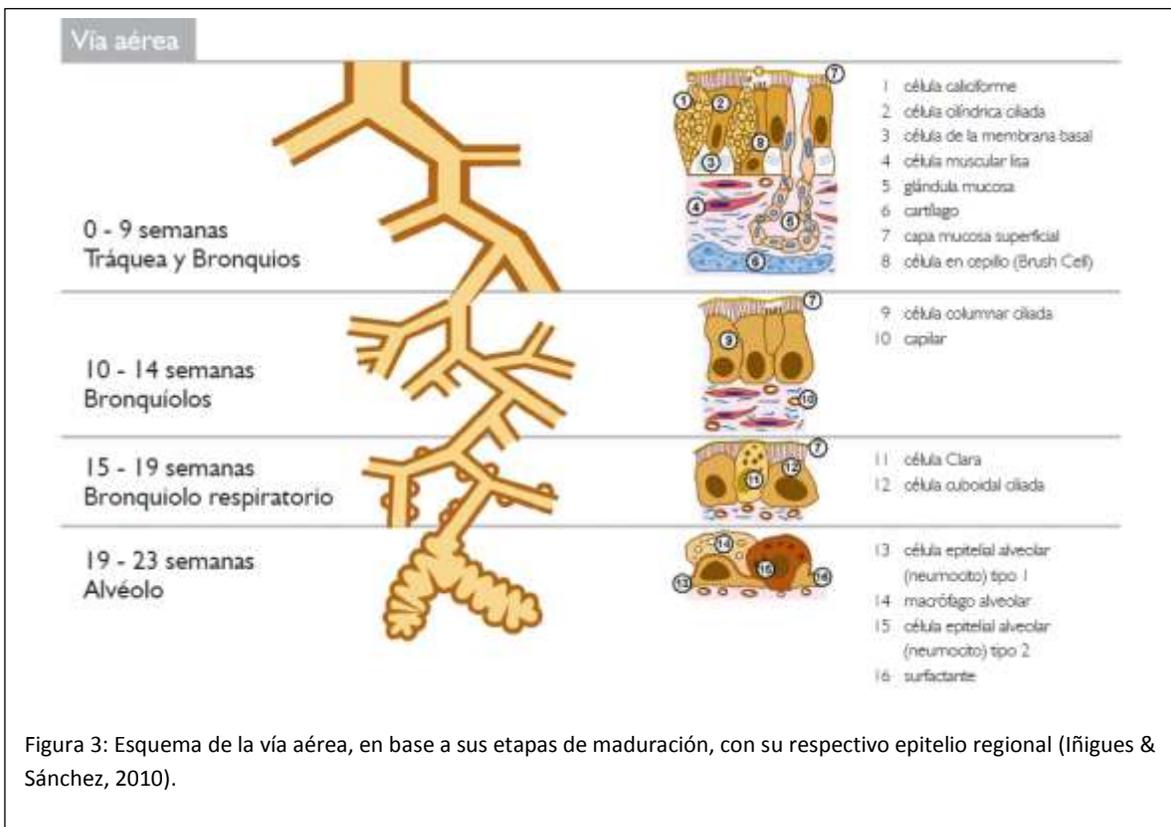
Desarrollo pulmonar

El sistema respiratorio debe contar con un proceso de desarrollo y maduración completo de cada una de sus partes durante la gestación, en especial de los pulmones, ya que contienen a los alveolos, por lo que un proceso completo de maduración pulmonar va de la mano con la formación y maduración adecuada de los alveolos, así como de un funcionamiento correcto del sistema y la compatibilidad con la vida, siendo este un proceso complejo, dinámico y altamente organizado, en el cual se reconocen varias etapas (Tabla 2) (Iñiguez & Sánchez, 2010).

Fase	Edad gestacional o posnatal	Principales eventos
Embrionaria	3-7 semanas	Desarrollo de las vías aéreas mayores
Pseudoglandular ¹	7-17 semanas	Aparición de circulación pulmonar (vasculogenesis) Desarrollo del árbol bronquial hasta el nivel de bronquiolos terminales
Canalicular	17-27 semanas	Formación de acinos Angiogénesis Diferenciación epitelial Aparición del surfactante
Sacular	28-36 semanas	Formación de los espacios aéreos transitorios
Alveolar	36-2 o 3 años	Aparición de septos secundarios, formación de alveolos
Maduración microvascular	0-3 años	Adelgazamiento de la pared intra-alveolar Fusión de la bicapa capilar a una singular
Hiperplasia activa	0-3 años	Aumento del número de alveolos
Hipertrofia	3-8 años	Aumento del tamaño alveolar, con crecimiento celular mayor al corporal

¹El nombre de esta etapa se deriva del aspecto glandular que se ha observado en estudios histológicos, en la cual se lleva a cabo el desarrollo de las vías aéreas principales, a través de sucesivas divisiones (Iñiguez & Sánchez, 2010).

Todas las etapas del desarrollo pulmonar son esenciales, más el paso de un pulmón pre viable a uno viable se da en la etapa canalicular, que comprende entre las 17 y 27 semanas de gestación, a lo largo de la cual se van a presentar tres eventos de gran importancia; el primero es donde los bronquiolos terminales se subdividen para formar los bronquiolos respiratorios, conductos y sacos alveolares, los cuales constituirán las estructuras alveolares. Como segundo evento, se observará un adelgazamiento progresivo del epitelio, con aproximación de los capilares a los alveolos, propiciando la fusión de la membrana basal del epitelio respiratorio y con el vascular para que se logre el intercambio gaseoso en la vida extrauterina. Finalmente, entre las semanas 20 y 22 de gestación se da el proceso de diferenciación del epitelio respiratorio cuboidal, dando origen a los neumocitos tipo I y II (Figura 3), donde las que se diferencian en neumocitos tipo II aumentaran de forma inmediata su maquinaria metabólica para comenzar la producción del surfactante, observándose con gran claridad los cuerpos lamares cerca de las 24 semanas (Torres & Perea, 2001) (Iñiguez & Sánchez, 2010).



1.2 ¿Qué es el factor surfactante?

Definición

El factor surfactante, también denominado surfactante pulmonar, es una sustancia compleja compuesta por fosfolípidos y proteínas que se encuentra de forma normal en el sistema respiratorio de todos los mamíferos (Ruiz & Muñoz, 2010), recubriendo la superficie alveolar de los pulmones, cuya presencia tiene dos funciones principales, la primera es la reducción de la tensión superficial en la interfase aire-líquido, contrarrestando la tendencia del alveolo a colapsarse al final de la respiración (Villalaz, 1997), y la segunda es una acción inmunológica (Cullen & *et.al*, 2007).

Historia

Gracias a un gran número de estudios, realizados por la interacción de muchos investigadores de distintas disciplinas, se ha comprendido mejor la composición y función del surfactante pulmonar, comenzando por Kurt von Neegard (1929) quien especuló que el colapso pulmonar en recién nacidos eran debido a que la tensión superficial de los pulmones era muy elevada (Villalaz, 1997), sin embargo, no fue hasta 1958 con Richard Platte, en Inglaterra, quien al investigar la espuma del edema pulmonar para obtener “agentes anti-espuma”, llega a la conclusión de que los pulmones deberían estar recubiertos con una capa de baja tensión superficial, sugiriendo que la ausencia de la misma podría ser una de las dificultades a las que se enfrentan los recién nacidos con pulmones inmaduros. La investigación de Platte fue confirmada gracias a los estudios de Mary Elen Avery y Jare Mead, en 1959, quienes comprobaron la ausencia de esta sustancia en niños que fallecían bajo el diagnóstico de Enfermedad de Membrana Hialina (EMH) (Ruiz & Muñoz, 2010) (Villalaz, 1997).

Fue Clementes, en 1957, quien realizando estudios de los cambios de tensión superficial, observo que a grandes volúmenes pulmonares la tensión superficial es alta, mientras que a volúmenes bajos la tensión se aproximaba a cero, concluyendo que la materia que presumiblemente se localizaba en la interfase alveolo-aire era la encargada de regular dicha tensión y la denominó “Surfactante pulmonar” considerándola un factor anti-atelactásico (Ruiz & Muñoz, 2010).

Dichas aportaciones han sido la base para que se sigan realizando estudios con el objetivo de conocer y comprender la composición de esta sustancia fundamental del organismo, su relación con algunas enfermedades respiratorias, usos terapéuticos, así como también la forma de obtención, producción y purificación; todo esto ha dado como resultado grandes aportaciones, comenzando por los estudios de Gluck, quien demostró que los lípidos pulmonares pertenecientes al

factor surfactante se pueden aislar de líquido amniótico, aportando información acerca de la maduración del feto, mientras que Adams y Fujiwara en Japón, para 1980, comenzó el uso de surfactante pulmonar bovino como tratamiento para prematuros, instalando este líquido en la tráquea de neonatos con EMH (Villalaz, 1997).

Para 1990 la FDA² aprueba el uso del producto Exosurf en recién nacidos prematuro con EMH por deficiencia de surfactante, cuya composición es el surfactante de pulmón de origen bovino utilizado por Adams y Fujiwara; al año siguiente se aprueba Survanta y en 1994 Infracurf (Cullen & *et.al*, 2007).

Función

La función principal del surfactante es disminuir la tensión superficial dentro del alveolo, previniendo el colapso de los mismos. La ley de Laplace 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, lo que se traduce como el que la presión requerida para que el alveolo no se colapse va a depender del tamaño del alveolo y de la tensión superficial que este tiene, donde dicha tensión se va a relacionar directamente con la presencia o ausencia del surfactante, y cuando esté presente la tensión va a ser cercana a cero, mientras que su ausencia propiciara una tensión tan alta como 70 dinas/cm², permitiendo un colapso alveolar. La disminución de la tensión superficial a causa del surfactante no solo permite la adecuada circulación del aire, sino también la salida del líquido alveolar hacia el intersticio, que de otra manera se acumularía dentro del mismo causando una lesión alveolar.

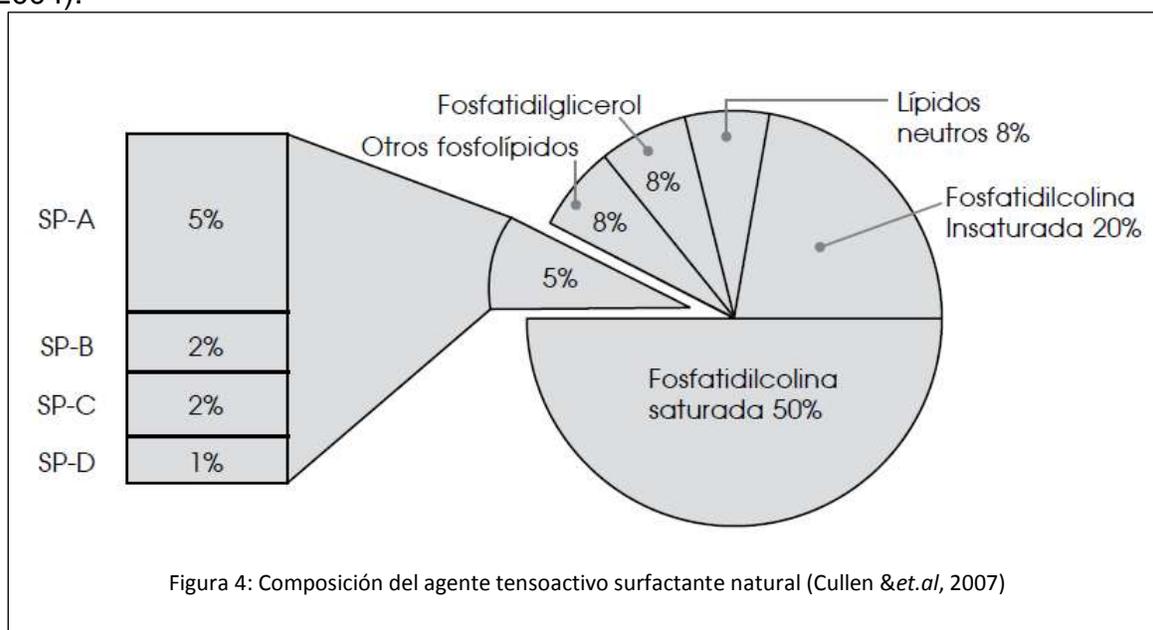
Además de regular la tensión y evitar el colapso, tiene beneficios inmunológicos, uno de ellos es su colaboración con la remoción de partículas de los pulmones ya que gracia a sus propiedades permite mejorar la función ciliar de su epitelio y con ello la eliminación de partículas ajenas al organismo. El resto de los beneficios se adjudican a tres de las cuatro proteínas del surfactante, que tienen propiedades inmunológicas específicas, que se modulan gracias a los propios fosfolípidos del surfactante (Cullen & *et.al*, 2007).

² Food and Drug Administration/ Alimentos y medicamentos de administración.

1.3 Composición del factor surfactante

Agentes que componen el surfactante

La composición bioquímica del surfactante pulmonar consiste en aproximadamente un 90% de lípidos y 10% de proteínas (Figura 4). En el caso de la porción lipídica los que se encuentran en menor proporción son los lípidos neutros, siendo los triglicéridos la molécula que se encuentra en mayor abundancia, cuya función durante la formación de la monocapa es fluidificante y como energía para los neumocitos durante el proceso de reabsorción (Pacheco, 2004).



El surfactante esta conformado principalmente por fosfolípidos, que son los compuestos lipídicos más complejos que existen y pueden conformarse por esfingomielina o glicerol (Champe & et.al, 2007); aquellos que contienen a este último alcohol se conocen como glicerofosfolípidos o fosfogliceridos, constituyendo la clase principal de fosfolípidos en el organismo, cuya estructura contiene ácido fosfatídico (AF) (diacilglicerol con un grupo fostato) unido a un alcohol (Tabla 3), (Champe & et.al, 2007).

Ácido fosfatídico	Alcohol	Nombre del fosfoglicerido
	Serina	Fosfatidilserina
	Etanolamina	Fosfatidiletanolamina (cefalina)
	Colina	Fosfatidilcolina (lecitina)
	Inositol	Fosfatidilinositol
	Glicerol	Fosfatidilglicerol

El fosfolípido de mayor abundancia en el surfactante es la fosfatidilcolina (Díaz & *et.al*, 2008), del cual más de la mitad se encuentra en forma disaturada; molécula que se conoce como dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil o lecitina; y en menor cantidad estará como molécula no saturada. También contendrá fosfatidilglicerol (FG) en un 8% considerándose el tercer fosfolípido de mayor abundancia, y el resto de la composición lipídica estará conformada por escasa cantidad de fosfatidilinositol (FI), fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y glucolípidos (Cullen & *et.al*, 2007) (Travieso, 2006).

Se considera que el fosfolípido de mayor importancia es el DPPC por ser el principal agente capas de disminuir la tensión superficial, seguido por el fosfatidilglicerol que también tiene capacidad tensoactiva, mientras que el resto de los fosfolípidos presentes tendrán un efecto fluidificante y permitirán la adhesión de DPPC durante la formación de la monocapa (Villalaz, 1997).

En investigaciones recientes se ha comprobado que los fosfolípidos también cuentan con una acción inmunomoduladora al inhibir la proliferación linfocitaria y la producción de inmunoglobulinas, modulando la respuesta inflamatoria pulmonar (Cullen & *et.al.*, 2007), sin embargo es un área que aun requiere de estudios.

La porción proteica del surfactante se conforma de las proteínas surfactantes³ A (SP-A), B (SP-B), C (SP-C) y D (SP-D) (Tabla 4), albumina y ácido palmítico, donde las proteínas tiene una función especifica, mientras que al resto de las moléculas no se les conoce un efecto de relevancia en la composición, más se habla de que la albumina puede estar presente con el fin de proporcionar una densidad adecuada a la monocapa (Travieso, 2006).

³ Las proteínas surfactantes se abrevian como SP por su nombre en ingles (Surfactant Protein)

Tabla 4: Características principales de las proteínas contenidas en el surfactante pulmonar			
Proteína	Origen	Tamaño	Función
SP-A	Cromosoma Células tipo I y II	26 kDa	Ayuda la formación de mielina tubular. Regula la secreción del surfactante Promueve la fagocitosis por medio de opsonización Regula la producción de citosinas linfocitarias
SP-B	Cromosoma 2 Células tipo I y II	8.8 kDa	Fusión de fosfolípidos. Resistencia a proteínas plasmáticas Inhibe óxido nítrico y por tanto la inflamación
SP-C	Cromosoma 8 Células tipo II	4.3 kDa	Adsorción de fosfolípidos Da estabilidad a la monocapa
SP-D	Cromosoma # Células tipo I y II	1043 kDa	Unión a patógenos y opsonización. Estabilidad a fosfatidilinositol.

Las proteínas presentes en el surfactante son de dos tipos las hidrofílicas, entre las que encontramos a SP-A y SP-D, e hidrofóbicas que incluyen a SP-B y SP-C. Estas moléculas son consideradas indispensables en la formación de la monocapa ya que le dan estabilidad, permiten la unión de los fosfolípidos, regulan el proceso de secreción y en el caso de las proteínas SP-A, SP-B y SP-D también tienen funciones de defensa pulmonar (Curosurf, 2005).

La proteína SP-A es la que se encuentra en mayor abundancia y se considera como la más relevante por su diversidad de funciones, ya que participa en la formación de mielina tubular (facilitando la adsorción en la interfase), ayuda a

regular la secreción y eliminación del surfactante, así como también de defensa pulmonar, siendo esta última su principal función y consiste en incrementar la actividad de los macrófagos alveolares, por medio de quimiotaxis al unirse a los lipopolisacáridos de bacterias y a proteínas de *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilis influenzae* tipo A, *Pneumocystis carinii*, virus de la influenza y *Candida spp*, estimulando con ello la fagocitosis, al mismo tiempo que fomenta la producción de citosinas linfocitarias (Cullen & *et.al*, 2007).

La SP-D es una proteína de reciente descubrimiento por lo que aun no se ha definido su papel, sin embargo se le atribuyen funciones de defensa pulmonar y se cree participa en dar estabilidad al fosfatidilinositol, sin embargo aun falta camino por dilucidar (Travieso, 2006) (Cullen & *et.al*, 2007).

En el caso de SP-B en su función tensoactiva remueve de forma selectiva los fosfolípidos, propicia la unión del complejo DPPC/FG/SP-B el cual impide la inhibición del surfactante por proteínas plasmáticas, al mismo tiempo que promueve la adsorción de DPPC durante la formación de la monocapa y la salida de FG durante la expiración. Como actividad inmunológica tiene la capacidad de inhibir el óxido nítrico, con lo cual impide la inflamación pulmonar y la formación de radicales libres ya que estos últimos tienen la capacidad de degradar al surfactante (Cullen & *et.al*, 2007).

La SP-C es una proteína que acelera la adsorción de fosfolípidos en la monocapa, es una de las proteínas más hidrófobas y aun esta en proceso de estudio para conocer más acerca de ella (Travieso, 2006).

Síntesis y secreción de los compuestos del surfactante

El proceso por el cual se inicia la producción de surfactante no esta esclarecido pero se cree que su primera formación es a partir de sustancias precursoras que se encuentran dentro del organismo (glucógeno y lípidos) (Campos & *et.al*, 2002), durante las primeras 16 semanas de gestación dando pie a que se lleve acabo la vía de la trimetilación⁴, como única fuente de producción de surfactante y que esta se irá complementando de forma paulatina con la vía de la CDP colina⁵ la cual se encargará de completar el desarrollo pulmonar (Ceriani, 2009).

Para comenzar el proceso de síntesis del surfactante existen estimulantes fisiológicos, donde los de mayor importancia son dados por sustancias hormonales

⁴ La vía de la trimetilación, es un proceso aun no dilucidado, donde se lleva acabo la síntesis de *novo* de los productos requeridos para la producción del surfactante (Carlson, 2000).

⁵ La vía de la CDP colina se presenta en el periodo de Crecimiento Ductual del Pulmón (CDP), en la cual el pulmón no tiene estructura específica apareciendo como glándula, pero contiene los productos que más adelante conformarán el surfactante (Carlson, 2000)

(las catecolaminas y los beta estimulantes); induciendo a que el DNA del neumocito tipo II, inicie la producción del RNA mensajero encargado de promover la síntesis de la enzima ácido fosfatídico fosfatasa, la cual tiene como función aportar diglicéridos para la biosíntesis de la fosfatidilcolina, logrando obtener las moléculas para llevar a cabo la producción de los fosfolípidos, los cuales se sintetizarán junto con las proteínas (excepto SP-A) dentro del aparato de Golgi y serán empaquetadas en cuerpos lamares para ser excretadas de forma paulatina por medio de un proceso de exocitosis, donde la membrana de las vesículas se une a la membrana celular, dejando libre el producto dentro del alveolo.

Una vez en el medio extracelular, aunado a la proteína SP-A y calcio⁶ se forman “grandes agregados”, los cuales se unen para formar la de monocapa conocida como mielina tubular, encargada de reducir la tensión superficial. Dichos agregados por medio de la acción de enzimas se convertirán en “pequeños agregados” poco funcionales, los cuales por el movimiento del aparato respiratorio se rompen en pequeñas vesículas capaces de reabsorberse por los neumocitos tipo II y los macrófagos alveolares (Figura 5) (Agassandia & Mellampalli, 2013) (Bissinger & Carlson, 2006).

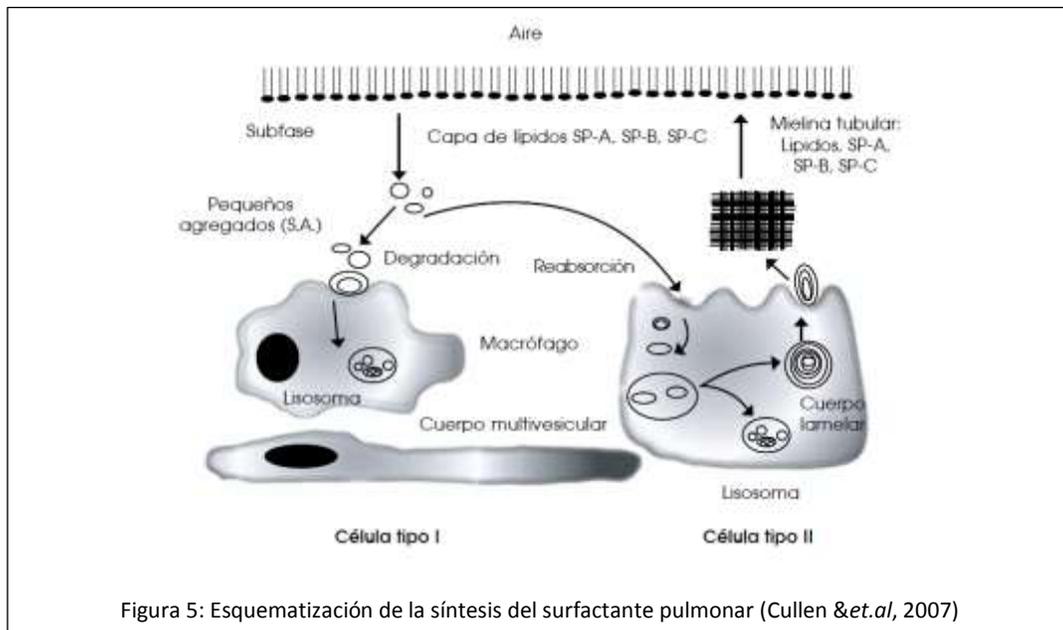


Figura 5: Esquematación de la síntesis del surfactante pulmonar (Cullen & et.al, 2007)

⁶ Elemento que promueve la agregación de fosfolípidos y proteínas.

UNIDAD 2: IMPORTANCIA MÉDICA DEL FACTOR SURFACTANTE

2.1 ¿Qué es el síndrome de dificultad respiratoria en recién nacidos?

Definición de la enfermedad

La enfermedad de membrana hialina (EMH), también conocida como síndrome de distres respiratorio, síndrome de insuficiencia respiratoria idiopática, síndrome de hipoperfusión pulmonar o síndrome de microactelactasias múltiples; actualmente para facilitar su diagnóstico, entendimiento, así como para generalizar mundialmente su diagnóstico se ha sido denominado Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR), por su gravedad se clasifica en base a las alteraciones radiológicas que presenta (Secretaría de salud, 2009). Este síndrome es un tipo de insuficiencia pulmonar que se presenta en neonatos y consiste en una dificultad severa para respirar, causada por la incapacidad de los neumocitos tipo II para sintetizar surfactante pulmonar, ocasionando una disminución del volumen pulmonar y un aumento en la tensión superficial, llevando a un colapso alveolar progresivo (Rodríguez & Gaviria, 2009).

Existen dos circunstancias por las cuales se presenta esta patología; la primera de ellas es el caso de los neonatos prematuros⁷ y pretérmino⁸, los cuales presentan una deficiencia primaria por inmadurez pulmonar; mientras que la deficiencia secundaria corresponde al síndrome de dificultad respiratoria del adulto neonatal y es característico de los neonatos de término con alteraciones respiratorias (Curosurf, 2005).

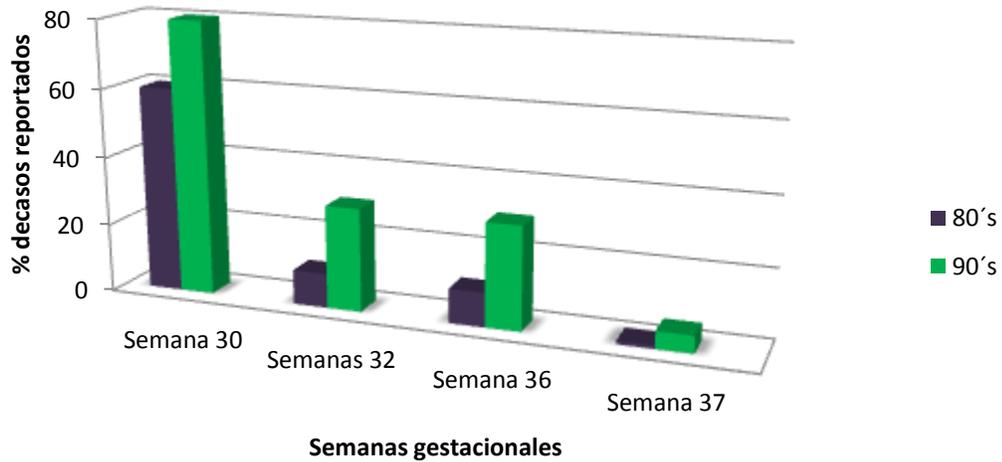
Incidencia del Síndrome de Dificultad Respiratoria

Las cifras de mortalidad por este padecimiento varían dependiendo el país, la calidad de atención brindada al recién nacido y los recursos de cada institución. Estados Unidos reporta que una tasa de mortalidad de 30% en neonatos de término y de un 50-70% en los prematuros (Rodríguez & Gaviria, 2009). En el caso de México es la principal patología entre los recién nacidos prematuros y pretérmino con una elevada mortalidad y su incidencia es difícil precisar por falta de registros, no obstante se sabe que ha aumentado marcadamente ya que por los ochentas se observaba un 50-60% de casos en prematuros menores a 30 semanas, del 10% entre los prematuros de 32-36 y solo 1% en los pretérmino; en los años noventa se reportó que existía una incidencia de un 60-80% en menores de 30 semanas, un 15-30% en los prematuros de 32-36 semanas y de un 5% en los pretérmino (Grafico 1) (Secretaría de salud, 2009).

⁷Ha de definirse como prematuridad el nacimiento del producto antes de haber cumplido las 36 semanas de gestación, presentando un riesgo elevado de sufrir deficiencias en el desarrollo neurológico, complicaciones respiratorias y gastrointestinales (Secretaría de salud, 2009).

⁸ Se habla de neonatos pretérmino cuando el producto nace antes de haber cumplido las 37 semanas de gestación, presentando una inmadurez en su organismo (Secretaría de salud, 2009)

Grafico 1: Comparación de la incidencia en México del SDR



En nuestro país se ha confirmado que el aumento de la incidencia se debe principalmente a la elevación de complicaciones durante el embarazo y al momento del parto, considerando que esto es consecuencia del incremento de embarazos en adolescentes, es por ello que el gobierno ha establecido medidas para mejorar la atención durante el embarazo y el parto buscando la prevención de la enfermedad mas que la cura (Secretaria de salud, 2009).

Etiología del SDR

Para que un producto sobreviva es necesaria una cantidad adecuada de surfactante y una velocidad de producción correcta, pero en el SDR se evidencia una concentración inadecuada del material tensoactivo (Garza & *et.al*, 2001), esto puede deberse a varias situaciones:

- Inmadurez en las células alveolares, donde mientras mas inmaduro se encuentre el pulmón menor numero de células habrá y con ello menor presencia de surfactante.
- En situaciones de estrés fetal durante el embarazo⁹ se observa una disminución o alteración en la velocidad de producción del surfactante.
- Presencia de un defecto en el mecanismo de liberación de los fosfolípidos en la membrana limitante en los neumocitos tipo II.
- Destrucción de los neumocitos tipo II, relacionándose con los casos mas severos de esta enfermedad, donde es inevitable la perdida del paciente. Esta destrucción se relaciona con actividad autoinmune o una lesión aguda a nivel pulmonar irreparable.

⁹ Se ha observado que existe un estrés fetal relacionado con las madres diabéticas (crónicas), con hipertensión arterial descuidada o bien consumo de drogas, que además de producir sufrimiento al feto por encontrarse en condiciones adversas, retrasa el desarrollo del mismo (Secretaria de salud, 2009).

Tras la etapa canalicular se cuenta con un pulmón viable, haciendo pensar que los neonatos de 30 semanas ya deberían de ser viables y no presentar complicaciones de este tipo, sin embargo la medicina basada en evidencias reporta lo contrario, demostrando que aun cuando el pulmón es viable no cuenta con la cantidad necesaria de surfactante para la vida extrauterina y que existen condiciones materno-fetales que retrasan la maduración bioquímica del pulmón, haciendo que neonatos de termino presenten esta patología, entre las que destacan:

- Los hijos de madres diabéticas padecen SDR ya que los niños presentan un retraso en la maduración de aproximadamente 15 días.
- Un lecho inadecuado durante el embarazo¹⁰ impide se desarrolle una superficie de intercambio gaseoso funcional.
- El estrés fetal o durante el parto origina sangrado uterino, hipotensión materna y asfixia perinatal desembocando en hipoxia, la cual produce vasoconstricción y acidosis metabólica; condicionando así la sobrevivencia celular y comprometiendo la viabilidad pulmonar (Rodríguez & Gaviria, 2009).

Fisiopatología

La base de la enfermedad es la incapacidad pulmonar del neonato para producir, almacenar y liberar cantidades suficientes del surfactante, llevando a un colapso pulmonar, donde la producción del surfactante es un proceso biológico sensible a cambios de pH, oxigenación y temperatura, por lo que la hipoxia, acidosis e hipotermia serán factores que afectan en forma adversa su producción durante la vida fetal, teniendo repercusiones en la vida extrauterina (Rodríguez & Gaviria, 2009).

La aparición del SDR requerirá menos de dos horas de respiración para verse reflejada, a través de signos y síntomas. En los pulmones de niños fallecidos a causa de este padecimiento se han encontrado atelectasias alveolares difusa, indistendibilidad pulmonar¹¹ (con reducción del volumen), edema intersticial y ausencia casi completa de lecitina en los neumocitos tipo II. Lo cual disminuye la tasa de ventilación pulmonar, ocasionando hipoxia, un aumento de CO₂, hipercapnia aunada a hipoxemia, que lleva al acúmulo de lactato y por tanto acidosis metabólica, dando como resultado una menor producción de factor surfactante (Curosurf, 2005).

¹⁰ Se habla de lecho inadecuado durante el embarazo, cuando existen complicaciones durante el embarazo ya sea por parte de la madre; como lo es la preclamsia (elevación de la presión arterial durante la gestación); o bien por parte del feto; como por ejemplo el tener circular el cordón umbilical al cuello (Rodríguez & Gaviria, 2009).

¹¹ Se habla de indistendibilidad pulmonar cuando el pulmón no tiene la capacidad de hacer sus movimientos naturales, es decir, pierde la flexibilidad para permitir la entrada y salida del aire, volviéndose más rígido (Gartner & Hiatt, 2008)

2.2 Cuadro clínico del síndrome de dificultad respiratoria

Signos y síntomas

La aparición de la enfermedad, su intensidad y la evolución clínica va a estar relacionada con la edad gestacional del paciente y el peso (Curosurf, 2005), observándose que en pacientes menores de kilo y medio lo presentan casi de forma inmediata y mas severa (Rodríguez & Gaviria, 2009).

La evidencia clínica más concreta que presentan los pacientes es dificultad para respirar, que aumenta durante las primeras horas ya que la hipoxia va siendo mayor, y se acompaña por un quejido al respirar (intermitente o continuo) audible a distancia, presentándose como mecanismo compensatorio en busca de aumentar la presión de aire en la vía aérea al final de la respiración (Secretaria de salud, 2009) (Tabla 5). Al existir una mal oxigenación celular se detecta cianosis¹², que en caso de ser un caso grave se acompañará de hipotensión y puede llegar al colapso circulatorio, teniendo resultados fatales (Ceriani, 2009).

Tabla 5: Signos y síntomas clínicos del síndrome de dificultad respiratoria
Respiración rápida (taquipnea)
Dificultad respiratoria (disnea)
Aleteo nasal
Quejido o gruñido respiratorio
Retracción costal
Hipoxia (sumado a cianosis)
Acidosis respiratoria

Diagnóstico

El Síndrome de Dificultad Respiratoria es una enfermedad que se puede diagnosticar de forma prenatal o bien tras el parto. El diagnóstico prenatal se logra ya que desde antes del nacimiento se puede cuantificar la cantidad de surfactante pulmonar en el líquido amniótico (Ceriani, 2009), permitiendo conocer un aproximado certero de la madurez pulmonar gracias a la relación Lecitina/Esfingomielina (L/E), donde este último es un producto constante tras las 32 semanas, mientras que la lecitina ira en aumento (Villalaz, 1997), donde el índice en un embarazo normal es mayor a 2, si el valor es igual a 2.0 hay muy poca probabilidad de que presente el síndrome, cuando esta en un intervalo de 1.5 a 2.0 existe una probabilidad de un 21% y en caso de que sea menor a 1.5 hay un 80% de probabilidades para que presente el padecimiento (Moreno, 2008). Al tener resultados superiores a 1.5 en la prueba el diagnóstico es inexacto y hasta

¹² Cianosis es un efecto secundario a causa de mala oxigenación celular donde algunos los tejidos se observan azulados, principalmente en las partes mas alejadas del corazón e inclusive en la boca (Ceriani, 2009).

improbable, por lo que solo resultados menores a dicho valor son considerados para un diagnóstico certero, haciendo que esta prueba se considere inexacta y poco factible para el diagnóstico final, por lo que es preferible el diagnóstico posnatal (Secretaría de salud, 2002).

Para el diagnóstico posnatal es suficiente la clínica, que se acompaña estudios radiológicos y gasometría; en el caso de este último es para ayudar a determinar los parámetros ventilatorios con los que se debe tratar el paciente (Rodríguez & Gaviria, 2009), mientras que las imágenes radiológicas dan a conocer la gravedad de la enfermedad, clasificación de la misma y hacer un seguimiento de la evolución del neonato (Tabla 6) (Campos & *et.al*, 2002).

Tabla 6: Clasificación de la gravedad del Síndrome de Dificultad Respiratoria (Campos & <i>et.al</i> , 2002) (Secretaría de salud, 2002).	
Estadio	Características
Estadio I (Leve) 	Se observa opacidad pulmonar poco intensa, permitiendo la distinción de los límites cardiacos Aireación levemente comprometida
Estadio II (Moderado) 	Opacidad pulmonar más severa, la silueta cardiaca tiene bordes borrosos, da la imagen de pulmón pequeño. Aireación pulmonar disminuida
Estadio III (Grave) 	Opacidad intensa, no permite distinguir la silueta cardiaca, disminución del volumen pulmonar. Aireación pulmonar baja

2.3 Tratamiento para el síndrome de dificultad respiratoria

Tipos de tratamiento con factor surfactante

El tratamiento más aceptado para el Síndrome de Dificultad Respiratoria es la aplicación de un surfactante exógeno, el cual se ha dividido en:

- Tratamiento profiláctico: En este caso se administra el surfactante exógeno antes de la aparición del SDR, especialmente en los neonatos de alto riesgo, buscando evitar que se presente la enfermedad. El lapso de

administración es en los primeros 15 a 30 minutos de vida y se hace la aplicación de una dosis única.

- Tratamiento de rescate: Este se administra en las primeras 12 horas de vida extrauterina, basándose en los signos y síntomas del paciente, donde el SDR ya es evidente y se subdivide en dos, el tratamiento de rescate temprano, administrado antes de las dos primeras horas de vida, y el tratamiento de rescate tardío, administrado tras las dos primeras horas de vida, pudiéndose aplicar dosis múltiples en base a la evolución del paciente (Jiménez & Castellanos, 2009).

Para lograr un tratamiento efectivo del SDR la NORMA Oficial Mexicana NOM-034-SSA2-2002, Para la prevención y control de los defectos al nacimiento, indica se debe dar reanimación al neonato (en caso de ser necesario), administración de surfactante exógeno acompañado de ventilación mecánica asistida (para mejorar la distribución del surfactante), aunado a un adecuado manejo de la temperatura.

Beneficios del factor surfactante

Estudios han demostrado que la administración de surfactante exógeno lleva a una rápida mejoría en la oxigenación y disminución en el grado de soporte ventilatorio; estos rápidos cambios son acompañados por un aumento en la capacidad residual funcional¹³, una mejoría en la distendibilidad pulmonar, disminución en la presión arterial pulmonar, aunado a una mejoría radiológica presentando un aclaramiento de los pulmones en forma uniforme, de parches o asimétrico (Sánchez & Torres, 2004).

Efectos secundarios del factor surfactante

Las complicaciones que se han reportado hasta el momento por la aplicación de surfactante exógeno son obstrucción de la vía aérea, reflujo del surfactante hacia la faringe, hipotensión y sangrado pulmonar, donde las tres primeras se adjudican a una rápida administración del producto, necesitándose una aplicación más lenta y un aumento en la concentración de oxígeno durante el procedimiento (Campos & *et.al.*, 2002). La presencia de sangrado se adjudica a una lesión pulmonar causada de forma mecánica o por manejar una presión de oxígeno elevada durante la administración, por lo que es necesario detener el proceso y estabilizar al paciente (Moreno, 2008).

Sugerencias para la aplicación del tratamiento

Esta enfermedad requiere de una monitorización médica periódica, debiendo observar la evolución del paciente de forma constante, ya que la evolución clínica permitirá determinar si es necesario una segunda aplicación en el tratamiento profiláctico, así como una segunda o tercera aplicación en la terapia de rescate

¹³ La capacidad residual funcional es el volumen de gas contenido en las vías aéreas después de una espiración, la cual se mantienen en los pulmones para evitar el colapso pulmonar, también conocido como aire residual (Ceriani, 2009).

(Secretaria de salud, 2009), donde solo a los neonatos con estadio tres de gravedad se les recomienda una tercera aplicación (Bissinger & Carlson, 2006).

La aplicación de la segunda dosis se recomienda sea en un lapso aproximado de 12 horas (Campos & *et.al*, 2002) y en caso una tercera antes de las 24 horas, es necesario tener en cuenta las características del producto y las indicaciones que este recomienda (Tabla 7) (Jiménez & Castellanos, 2009).

En este tratamiento un deterioro pulmonar neonatal tras haber rebasado las 48 horas es un indicativo de que presenta una infección, alguna enfermedad adjunta o bien cuenta con una complicación independiente de este síndrome, por lo que se debe hacer un diagnóstico diferencial y la aplicación de surfactante en este periodo de tiempo esta prohibida (Rodríguez & Gaviria, 2009).

Tabla 7: Comparación de los diferentes tipos de surfactante exógeno y sus recomendaciones específicas				
Nombre comercial	Tipo de surfactante	Dosis	Número de aplicaciones	País
Survanta	Natural de origen bovino	4ml/Kg	Hasta tres dosis (cada 6 horas)	Estados Unidos
Infrasurf	Natural de origen bovino	3ml/Kg	Hasta tres dosis (en máximo 12 horas)	Estados Unidos
Curosurf	Natural de origen porcino	2.5 a 5ml/Kg (como máximo, recomendando usar la dosis mínima)	Hasta tres dosis (12 a 24 horas)	Italia
Exosurf	Artificial	5ml/kg	Hasta dos dosis (a las 12 horas)	Inglaterra
Alveofact	Natural de origen bovino	1.2ml/Kg	Hasta dos dosis (a las 12 horas)	Alemania
Surfacten	Natural	---	---	Japón

UNIDAD 3: TIPOS DE SURFACTANTE EXÓGENO

Antecedentes

Los primeros intentos para obtener un surfactante exógeno ocurrieron en 1960, utilizando dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) en aerosol, sin embargo no se logró demostrar ningún efecto benéfico en la terapia aplicada. No fue hasta 1972 cuando Enhorning obtuvo el primer modelo animal exitoso, obteniendo un surfactante a partir de lavado pulmonar de conejos de edad adulta, el cual se introdujo dentro de la tráquea de conejos prematuros observando una notoria mejoría pulmonar; con lo que demostró la efectividad del tratamiento con productos exógenos y dio pauta para comenzar a trabajar en la estandarización de técnicas (Campos & *et.al*, 2002).

En la actualidad se ha logrado la producción de una variedad de surfactantes que se han clasificado en surfactantes naturales y sintéticos (Tabla 8) de acuerdo a su naturaleza (Blanco, Lugones & *et.al.*, 2012)

Tabla 8: Clasificación y composición de los surfactantes exógenos			
Tipo	Nombre comercial	Nombre genérico	Composición
Sintético	Pumactant	Componente expansor artificial de pulmón	DPPC, PG
	Exosurf	Colofosceril palmitato	DPPC
	Surfaxin ¹⁴	Luscinactant	DPPC+POPG+sinapultide
Naturales	Alveofact	Bovactant (SF-RI-1)	Lavado pulmonar bovino
	BLES	Surfactante de extracto lipídico bovino	Lavado pulmonar bovino
	Infrasurf	Calfactant	Lavado pulmonar bovino
	Newfactant	---	Pulmón bovino
	Surfacten	Surfactant-TA	Pulmón bovino
	Survanta	Beractant	Pulmón bovino
	Curosurf	Poractan alfa	Pulmón porcino
	H1-10 ¹⁵	---	Pulmón porcino
	Natsurf	---	Pulmón porcino
Surfacén	---	Pulmón porcino	

DPPC Dipalmitoil fosfatidilcolina; PG fosfoglicerol; POPG palmitoil fosfatidilglicerol; sinapultide péptido sintético similar a proteína B surfactante

¹⁴ Este producto no se encuentra en el mercado por encontrarse en las últimas fases de investigación para ser aprobada por la FDA

¹⁵ Producto que aun no esta aprobado por la FDA pero se encuentra en la última fase experimental

3.1 Surfactante natural exógeno

Los surfactantes exógenos naturales, o simplemente surfactantes naturales, son aquellos productos que se obtienen a partir de tejidos o fluidos y contienen fosfolípidos y proteínas propias del surfactante, pudiendo o no estar complementados para aumentar su acción terapéutica (Bissinger & Carlson, 2006).

Este tipo de surfactante pueden ser clasificado en dos grandes grupos, homólogos o heterólogos, según sea su origen (Campos & *et.al*, 2002). El surfactante natural homólogo (humanos) hace referencia a líquido amniótico humano como terapia, el cual esta en desuso por ser un producto no viable ya que es difícil obtenerlo, se contamina fácilmente y no puede almacenarse por más de 15 días.

Los productos heterólogos (no humanos), se obtienen a partir de pulmones animales (Villalaz, 1997), los cuales deben pasar por un proceso de examinación y purificación escrupuloso para evitar la posibilidad de un contagio animal-humano (Travieso, 2006), existiendo en el mercado una variedad de productos (Tabla 9) y se clasifican en base a la forma en que manipulan el pulmón o en base a la especie de la que procede el tejido, en el primer caso se cuenta con productos hechos a base de lavado o macerado pulmonar, mientras que en el segundo se habla de productos de origen bovino o porcino, donde todos han demostrado igualdad en su efectividad (Bissinger & Carlson, 2006).

Tabla 9: Surfactantes naturales disponibles en el mercado (2006)		
Nombre comercial	Preparación	Contenido
Alveofact	Lavado pulmonar bovino	DPPC+SPB+SPC
BLES	Lavado pulmonar bovino	DPPC+SPB+SPC
Infrasurf	Lavado pulmonar bovino	DPPC+SPB+SPC
Surfacten	Extracto bovino	DPPC+PG+SPB+SPC
Survanta	Extracto bovino	DPPC+PG+SPB+SPC
Surfacén	Extracto porcino	DPPC+SPB+SPC
Natsurf	Extracto porcino	DPPC+SPB+SPC
Curosurf	Extracto porcino	DPPC+SPB+SPC
Newfactant	Extracto porcino	DPPC+SPB+SPC

DPPC Dipalmitoil fosfatidilcolina; PG fosfoglicerol; SPB proteína surfactante B; SPC proteína surfactante C

En la actualidad se hace uso de pulmones porcinos y bovinos, debido a que su composición bioquímica está conservada en gran medida y es similar a la del humano (Travieso, 2006), además de que al ser animales de gran tamaño

permiten una mayor obtención de fosfolípidos que con los pequeños; más se siguen buscando otras alternativas para obtener mejores rendimientos y reducir costos (Díaz & *et.al.*, 2008). Esto no siempre fue así, en un inicio solo se trabajaba con pulmones de especie bovina, tanto procesos de lavado como macerado pulmonar, siendo a finales de los noventa cuando se introdujo al mercado el primer producto de origen porcino (Italiano), el cual tras demostrar ser equiparable con los productos bovinos fue aceptado como tratamiento clínico, por lo que para el 2006 ya se contaba con tres productos de origen porcino y cinco de origen bovino, con lo cual se ha logrado tener una mayor gama de productos en el mercado, donde todos tienen un costo elevado y solo algunos de ellos ha sido sometidos a estudios comparativos.

El extracto de surfactante natural puede o no estar modificado, donde el surfactante modificado, también conocido como surfactante natural complementado, es un producto obtenido a partir de surfactante natural endógeno que esta tratado para mejorar sus características y logra con ello tener mayores beneficios clínicos; para logra este objetivo el surfactante se puede suplementar con ingredientes activos (fosfolípidos) o purificar por medio de cromatografía (Blanco, Lugones & *et.al.*, 2012). En ambos casos se busca garantizar que el producto tenga la habilidad de disminuir la tensión superficial con gran efectividad y rapidez (Bissinger & Carlson, 2006), siendo esta última una característica que ha tomado gran importancia en los últimos estudios, ya que se ha establecido que mientras más tarde en realizar su acción el tratamiento mas hipoxia sufre el neonato y más se eleva el riesgo de fallecimiento (Rodríguez & Gaviria, 2009). En el caso del extracto de surfactante no modificado contiene solo los componentes que permanecen luego del proceso de extracción, pero estos ya no son tan comunes en el mercado por el hecho de que casi todas las empresas han buscado la manera de mejorar las cualidades de sus productos, por lo que actualmente se consideran la base para producir los modificados.

Los productos naturales que se encuentran en el mercado tienen un contenido de proteínas muy cercano al 1%, ninguno contiene las proteínas A y D (Campos & *et.al.*, 2002) y presentan dipalmitoil-fosfatidilcolina en grandes cantidad (Tabla 10) (Curosurf, 2005). Estos productos, gracias a la presencia de la proteína SP-B, tienen una acción desinflamatoria con lo que ayuda a contrarrestar las molestias causadas por el Síndrome de Dificultad Respiratoria, disminuyen la tensión superficial, estimulan que los pulmones de los neonatos produzcan surfactante por si solos (Rodríguez & Gaviria, 2009), e inhiben la proliferación bacteriana. Hasta el momento ningún paciente ha demostrado rechazo hacia el tratamiento, ni reacciones alérgicas por lo que se consideran el mejor tratamiento que existe en la actualidad (Blanco, 2004), además de que se le adjudica la capacidad de proteger a los neonatos de infecciones pulmonares durante el tratamiento evitando infecciones cruzadas, sin embargo es un área que aun necesita investigarse (Blanco, Lugones & *et.al.*, 2012).

Tabla 10: Comparación del contenido entre los tres surfactantes naturales mas utilizados mundialmente						
Nombre comercial	Preparación	Contenido				
		Total fosfolípidos (mg/ml)	DPPC (%)	Total proteínas (mg/ml)	SP-B (mg/ml)	SP-C (mg/ml)
Survanta	Tejido pulmonar bovino	25	50	1.0	0.01	0.99
Infrasurf	Lavado pulmonar bovino	35	53	0.65	0.26	0.39
Curosurf	Tejido pulmonar porcino	80	35	1.0	0.3	0.7

Tabla comparativa obtenida del artículo "Surfactant" de Bissinger & Carlson

Todos los productos naturales han demostrado resultados satisfactorios de forma individual, por lo que algunos investigadores se han dado a la tarea de compararlos para observar las diferencias entre ellos no existiendo evidencia que establezca una diferencia significativa (Sánchez & *et.al*, 2004), ya que todos han logrado disminuir la mortalidad de los neonatos con el padecimiento casi en la misma proporción (Sánchez & Torres, 2004).

Las comparaciones entre los productos más comercializados han permitido establecer algunas recomendaciones para el uso de los productos, comenzando por tener en cuenta el peso del recién nacido, ya que la evidencia demuestra que el producto Curosurf es más recomendable en neonatos de muy bajo peso al nacer (menos de 1500 gramos), presentando un menor número de complicaciones en este tipo de pacientes (Fehlmann & *et.al*, 2010), mientras que el producto Survanta e Infrasurf son los más recomendados para neonatos de bajo peso (1500-2500 gramos) demostrando tener las mejoras clínicas deseadas de forma más rápida en niños con este parámetro de peso (Jiménez & Castellanos, 2009); observándose que el Survanta presenta mayor eficacia y eficiencia que Infrasurf, diferencia adjudicada al distinto contenido proteico de los productos (Tabla 8) (Bissinger & Carlson, 2006), más el producto Infrasurf es el que reporta menor número de complicaciones (Cheng, 2012), lo cual puede estar relacionado con la viscosidad de los productos, por lo que sin importar cual se utilice se reportan resultados similares (Seger & Soll, 2009). Estas diferencias de mejoría relacionadas con el peso han hecho que varios países consideren como una opción tener por lo menos dos productos en todas sus instituciones con el objetivo de mejorar la calidad de los tratamientos (Willson & Notter, 2011). En México no

existe la posibilidad de trabajar con dos productos dentro de las instituciones ya que solo es posible realizar licitaciones con una sola empresa debido a su costo, por lo que se trabaja con el producto que el gobierno les brinde, sin embargo actualmente por tener mayor población de neonatos que presentan muy bajo peso se ha preferido trabajar con Curosurf, buscando garantizar la mejoría clínica (Salinas & *et.al*, 2012).

La razón por la que se prefieren los productos Survanta, Infracurf y Curosurf es que son los primeros de su clase (Bissinger & Carlson, 2006), por lo que aun falta someter el resto de los productos a estudios comparativos para comprobar sus cualidades, sin embargo todos tienen un alto costo el cual esta estrechamente relacionado con la dificultad que existe para su extracción y purificación (Moreno, 2008), siendo este un obstáculo a superar, pues impide tener acceso a ellos. Los costos de cada producto no se pueden establecer ya que varían de acuerdo al país, las condiciones de mercado (mayoreo o menudeo), convenios con las empresas o gobiernos, entre otras cosas, por lo que solo se pueden manejar precios aproximados de los productos que pueden ir de 400 a 6000 dólares (Salinas & *et.al*, 2012), donde el Curosurf es el que se encuentra en los rangos más bajos de precios y el Infracurf entre los más elevados (Jobe, 2000), sin embargo para efectos de comparación se considera mejor maneja el costo de estancia de los neonatos en las instituciones y no el precio individual, que se genera por los siguientes conceptos:

- El valor total de tratamiento con surfactante
- El valor total de los litros de oxígeno utilizados
- El valor total de los días de ventilación mecánica
- El valor total de días cama en unidad de cuidados intensivos

Los cuales arroja datos de que los neonatos con SDR tienen un promedio de costo de 1500 pesos mexicanos por día de estancia (Salinas & *et.al*, 2012), haciendo que los días cama sean el parámetro de mayor relevancia para determinar los costos, ya que mientras más días este internado mayor es el costo. Este concepto va a depender de varios parámetros que no siempre van a poder ser manipulables, como lo es la velocidad de evolución del paciente, el que no se presente complicaciones, los neonatos alcancen un peso adecuado para ser egresados, infecciones cruzadas, la presencia de alguna enfermedad adjunta o alguna malformación (Fehlmann & *et.al*, 2010), donde tomando en cuenta los pesos de los pacientes se dividen en dos grupos, los de muy bajo peso con un tiempo de estancia que va de los 19 a 61 días y los de bajo peso que reportan de 7 a 21 días (Gutiérrez & *et.al*, 2012), haciendo que el costo del tratamiento oscile entre 50,000 y 300,000 pesos mexicanos (Salinas & *et.al*, 2012).

Al comparar los surfactantes naturales y los sintéticos, se ha demostrado que no existe diferencia en el resultado final, es decir ambos mejoran el índice de oxigenación en el paciente, con la diferencia de que los surfactantes naturales actúan mas rápido debido a su contenido proteico (Sánchez & Torres, 2004), otorgando una ventaja a los productos naturales sobre los sintéticos, ya que al

actuar de forma rápida resulta en una evolución mejor del neonato, evita complicaciones, previene infecciones y disminuye costos por lo que el tratamiento con productos naturales es considerado más eficaz, económico y factible (Cheng, 2012).

Dentro de los productos naturales existe un amplio campo de investigación para mejorar el método de extracción, comenzándose a trabajar en nuevas opciones como lo es el producto llamado HL-10 una preparación de origen porcino que contiene las proteínas hidrófobas y los fosfolípidos, el cual surge a partir de una novedosa tecnología y es complementado tecnológicamente, desconociéndose mas información acerca del mismo ya que aun no esta aprobado como tratamiento y se encuentra en fase II¹⁶ del ensayo clínico, por lo que aun falta comparar su eficiencia y eficacia con los productos ya existentes (Blanco, 2004).

3.2 Surfactante exógeno sintético

Los surfactantes sintéticos son aquellos productos que no se extraen del surfactante endógeno animal y solo están constituidos por fosfolípidos, pudiendo o no estar complementados (Tabla 11) (Cheng, 2012).

Tabla 11: Surfactantes sintéticos		
Nombre comercial	Nombre genérico	Contenido
Exosurf	Colofosceril palmitoato Hexadecanos tyloxapol	DPPC
Pneumactant	Componente expansor artificial de pulmón (ALEC/Adsurf)	DPPC+PG
Surfaxin	Luscinactant	DPPC+POPF+sinapultide+ácido palmítico
Venticute ¹⁷	Surfactante rSP-C	DPPC+POPG+rSP-C+ácido palmítico
DDPC dipalmitoil-fosfatidilcolina; PG fosfatidil glicerol; POPG palmitoil fosfatidilglicerol; sinapultide igual a KL-4 péptido (simula proteína B), rSP-C proteína surfactante C recombinante		

Los productos sintéticos se consideran una nueva alternativa de tratamiento para el SDR ya que la terapia con surfactantes naturales, pese a ser un tratamiento revolucionario y satisfactorio, resultan excesivamente costosos y suponen un cierto riesgo para la salud, debido a la posibilidad que existe de que contenga agentes infecciosos (aun que hasta el momento no se ha reportado ningún caso) (Moreno, 2008), donde esta nueva alternativa inicio con el producto Exosurf el cual solo contiene fosfolípidos y comprobó ser capaz de disminuir la tensión superficial

¹⁶ La fase II de ensayos clínicos en los productos farmacéuticos implica el estudiar los efectos del producto en adultos sanos (Blanco, 2004)

¹⁷ Este producto aun no se encuentra en el mercado ya que aun esta en investigación

de los pulmones de manera eficaz y en la misma proporción que los productos naturales, sin embargo el efecto deseado no se da de forma tan rápida, lo que resulta una desventaja (Cheng, 2012), que desde el punto de vista clínico puede tener un desenlace fatal, sobre todo si se habla de un estadio tres de la enfermedad, donde la gravedad de la misma exige que la solución terapéutica sea lo más rápida, eficaz y eficiente posible (Christian & *et.al*, 2007), por lo que se ha trabajado en la producción de nuevos productos sintéticos, pero hasta el momento no se han tenido resultados favorables al respecto (Jobe, 2000).

Con el objetivo de eliminar las desventajas de los productos sintéticos y hacerlos tan competitivos como los naturales se han hecho estudios sobre el motivo que causa esta diferencia, demostrando que se debe a la falta de proteínas en el producto sintético (Sánchez & *et.al*, 2004) (Jiménez & Castellanos, 2009) donde no solo se observa acción más lenta, sino que también hace que carezca de propiedades antiinflamatorias (Blanco, 2004). De igual forma se ha demostrado que no es necesario que los productos contengan suplemento de las cuatro proteínas propias del surfactante endógeno, pero si es indispensable que contenga las dos proteínas hidrofóbicas (SP-B y SP-C), donde la falta de alguna disminuye la eficacia del producto aun que otorga una acción es más rápida que la sola presencia de fosfolípidos (Brockman & *et.al*, 2003).

En busca de igualar la función de los productos sintéticos a los naturales se ha trabajado en hacer que estos también cuenten con las propiedades de las proteínas SP-B y SP-C (Ríos, 2012), para lo cual se han intentado distintas alternativas, donde las más destacadas:

- Complementar los fosfolípidos con agentes estimulantes de proteínas, es decir, agregar sustancias capaces de estimular a los neumocitos para que estos produzca las proteínas de forma natural y que dichas proteínas se logren complementar con los fosfolípidos que se agregan como parte del producto. Esta aun que una alternativa osada e innovadora todavía no se obtiene el éxito deseado, ya que no se han encontrado agentes estimuladores satisfactorios, pero pese a los resultados fallidos no se deja de lado esta alternativa, ya que hasta el momento podría ser una opción viable (Willson & Notter, 2011).
- Se ha trabajado, con resultados más favorables que el resto de los productos, en complementar los fosfolípidos con péptidos sintético funcionalmente análogos, es decir, que tengan función y actividad similar al de las proteínas (Blanco, 2004), en este aspecto ya se cuenta con la molécula sinapultide y el péptido KL-4, donde ambos simulan el patrón de cargas positivas y negativas de la proteína SP-B, que en el caso de la

primera de estas moléculas se ha agregado como compuesto del producto Surfaxin, el cual se espera pueda ser un producto equiparable con los naturales, por los resultados que ha arrojado hasta el momento. Este se encuentra en la fase III de ensayo clínico, donde se tienen resultados clínicos favorables, aun que los estudios realizados hasta el momento son investigaciones piloto, que hay que respaldar para lograr su aprobación como tratamiento clínico (Cullen & *et.al*, 2007), siendo este el producto complementado que se encuentra más cerca de poder ser comercializado; donde la falta de un compuesto análogo parecido a la proteína SP-C hace que siga siendo levemente más tardío los naturales (Willson & Notter, 2011). El el costo estimado de este producto sigue reportando es elevado, posiblemente cercano al del Curosurf, por lo que no solo se puede considerar igual de competitivo que los naturales, sino también igual de costoso (Jobe, 2000).

- Finalmente, se ha buscado complementar los productos con proteínas de origen recombinantes (proteínas tipo B y tipo C) (Blanco, 2004), cuyo proceso de producción a comenzado a tener un auge importante (Jiménez & Castellanos, 2009), existiendo la tentativa de llevar a producción el primer producto de este tipo bajo el nombre de Vaticute, que contendrá la proteína recombinante C. El mayor problema de este producto los resultados heterogéneos que ha arrojado, ya que se han logrado observa mejoras significativas en algunas poblaciones, mientras que en otras no se presenta la mejora deseada, algo que hasta el momento no se ha logrado esclarecer, por lo que aun requiere de mas estudios y trabajos para lograr comprender su funcionamiento y que logre su aprobación como producto de uso clínico (Blanco, 2004).

La causa que impide tener estos tipos de productos en el mercado, es que hasta la fecha no se ha descrito ningún método que permita obtener SP-B madura recombinante en cantidad y con la pureza necesaria para la aplicación clínica, debido a su elevada hidrofobicidad y compleja estructura terciaria y cuaternaria; mientras que la proteína SP-C, al ser más pequeña y de estructura más simple, si ha sido obtenida como proteína recombinante a partir de su expresión en *E. coli*. (Willson & Notter, 2011).

En la actualidad los productos sintéticos son poco recomendados y se habla de que están en desuso (Chistian & *et.al*, 2007), sin embargo se espera mucho de ellos para el futuro, dado a que han comenzado a tener un auge tecnológicamente hablando (Ríos, 2012), pero de momento se siguen considerando a los productos naturales como la mejor opción de tratamiento (Chistian & *et.al*, 2007).

UNIDAD 4: FORMAS DE PRODUCCIÓN DEL SURFACTANTE NATURAL EXÓGENO

4.1. Antecedentes del proceso de producción

Posterior a la aprobación, en la década de los setenta, para utilizar el factor surfactante natural exógeno como tratamiento en el Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR), se realizaron un gran número de investigaciones a fin de comprender mejor cuales son sus componentes, las propiedades de los mismos y la manera más factible de extraerlos; dando como resultado que la forma mas viable de obtención es a partir de materia prima de origen animal, es decir, haciendo uso de pulmones porcinos o bovinos (Pérez & *et.al*, 2010), donde la elección de pulmones, la forma de manipularlo para obtener su contenido, el proceso de extracción y el método mas adecuado para llevar acabo la purificación han sido un reto difícil de superar, debido a que cada paso debe garantizar que el producto final cumple con la funcionalidad deseada, no contiene sustancias contaminantes y se encuentra estéril (Wilma, Díaz & Manzanares, 2001).

Los primeros trabajos de extracción que se realizaron encontraron tres dificultades principales, la primera de ellas era obtener un surfactante con una cantidad de fosfolípidos, proteínas y lípidos neutros similar a la del humano¹⁸, observando que el uso de surfactantes exógenos con una proporción significativamente distinta no presentaban ninguna mejoría e inclusive podían propiciar una obstrucción alveolar (Encinar, 1993), mientras que el uso de un surfactante con proporciones semejantes al del humano otorgaba resultados satisfactorios como tratamiento (Díaz & *et.al*, 2008).

En segundo lugar se reporto problemas relacionados con la forma de esterilización (Villalaz, 1997), es decir, la manera de garantizar la ausencia de cualquier microorganismo o pirógeno¹⁹, a causa de que los componentes de surfactante son moléculas termolábiles²⁰ (Wilma, Díaz & Manzanares, 2001), haciendo necesario prescindir del uso de calor en cualquiera de las etapas de producción, por lo tanto aun cuando se lograba la obtención de los productos deseados en las proporciones adecuadas no se conseguía otorgarles las condiciones de esterilidad necesarias para emplearlos como tratamiento (Travieso, 2004).

¹⁸ El surfactante endógeno o humano tiene una composición de 81% de fosfolípidos y 18% de lípidos neutros, cantidades a tener en cuenta para la producción de productos

¹⁹ Se denomina pirógeno a los restos celulares de bacterias Gram negativas, que por si solos son capaces de inducir una respuesta inmunológica

²⁰ Termolábil hace referencia a que las moléculas se modifican estructuralmente ante los cambios de temperatura (Gallo, 2007)

El tercer inconveniente reportado en la literatura es referente al contenido final del producto, donde se encontraba que junto con las moléculas deseadas existían otras consideradas contaminantes, como lo es la proteína albumina²¹ y algunas estructuras lipídicas indeseadas que incluía la lisofosfatidilcolina²² y colesterol en altas cantidades, cuya presencia modifica la densidad del producto y otorgar un carácter antigénico al producto, elevando la posibilidad de reacciones alérgicas o rechazo al tratamiento (Seger & Soll, 2009), llegando a la resolución de que era necesario la implementación de una etapa de purificación rigurosa tras el proceso de obtención, aun cuando durante la misma se perdiera una cantidad significativa de los componentes deseados (Wilma, Díaz, Manzanares, 2001).

Los anteriores inconvenientes hacían que el surfactante producido a principios de los ochenta se considerara mas contraproducente que benéfico (Blanco, 2004) por lo que se limito su uso a la par que se aumentaban las investigaciones para conseguir superar dichos inconvenientes, mas no fue hasta fines de esta década cuando el investigador Fujiwara obtuvo los primeros resultados satisfactorios (Travieso, 2006), con la obtención de un surfactante altamente puro y estéril, sin necesidad de hacer uso de la esterilización por calor (Travieso, 2004); su procedimiento incluía separaciones mecánicas, lavados múltiples del órgano, extracciones con solventes orgánicos y trabajar en condiciones asépticas al final del procedimiento (Fujiwara, Chida & Watebe, 1980), probando ser el producto con mejores efectos terapéuticos (Cullen & *et.al*, 2007). Esta metodología es la más aceptada hasta la fecha, por lo que actualmente se utiliza como base para el establecimiento de nuevos procesos de producción, donde dependiendo la patente se logran observar distintas modificaciones del procedimiento principal, realizadas con el objetivo de mejorar el proceso.

4.2. Fundamento de la técnica

Dado que todas las patentes se siguen apegando al proceso inicial, todas se basan en el fundamento de partida que utilizo Fujiwara, el cual consiste en que los compuestos lipídicos son el único grupo de biomoléculas con la capacidad de solubilizarse en solventes orgánicos como el cloroformo, metanol o benceno y prácticamente insolubles en agua (Laguna & Piña, 2007), por lo que pueden ser separados fácilmente de otras moléculas aprovechando sus cualidades de solubilidad, ya que el resto son altamente solubles en agua.

²¹ La albumina se considera una proteína contaminante del factor surfactante por elevar la densidad del producto impidiendo que este último se absorba adecuadamente, pudiendo producir una obstrucción alveolar

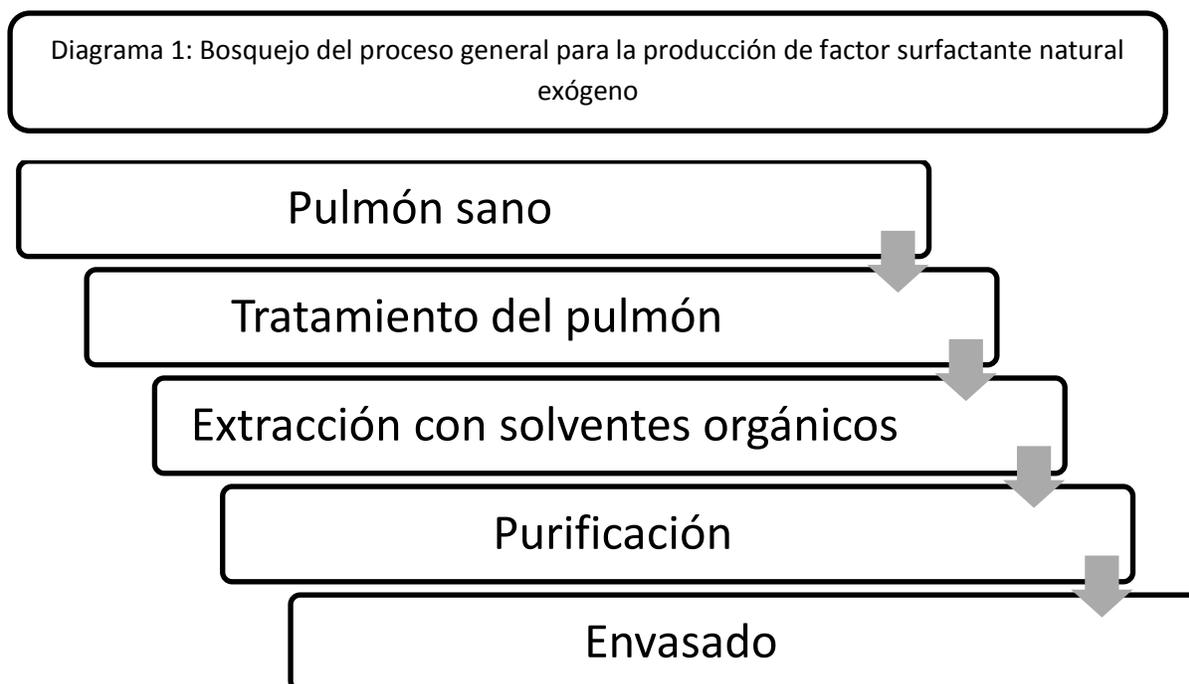
²² Producto de degradación de la fosfatidilcolina presente en la membrana celular, la cual se considera toxica en niveles superiores a 10mg/kg de peso por inhibir la actividad de los fosfolípidos del surfactante (Travieso, 2006).

La técnica de extracción con solventes orgánicos es la ideal para separa los compuestos lipídicos, sin embargo existen algunas moléculas que también comparten este carácter hidrofóbico, como lo son algunas proteínas, las cuales se solubilizarán en solventes orgánicos junto con los lípidos (Rendina, 1974), esta propiedad de algunas proteínas es una ventaja en el proceso de producción del surfactante, debido a que las proteínas que se obtendrán en el solvente serán la proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C del surfactante, las cuales son de interés en el producto por sus características y funciones.

4.3. Forma general de producción

Pasos generales del proceso

El procedimiento para lograr la producción del surfactante natural exógeno varia de una patente a otra, información que no se encuentra del todo disponible debido a que la mayoría de las patentes siguen vigentes, existiendo un acceso restringido a dichos datos, más con la información que se encontró disponible se puede saber que todas parten de un pulmón tratado, utilizan para su proceso de extracción el cloroformo y al final del proceso trabajan en técnica estéril, permitiendo diseñar un bosquejo general de etapas que se deben llevar acabo para el proceso de producción (Diagrama 1), donde cada una debe de ser estandarizada, validada y tener establecidos los puntos críticos que podrían modificar los resultados esperados (Riverón &et.al, 2009).



Fases del proceso

Este proceso general se divide en dos fases (Tabla 12) en base a las medidas de asepsia que se deben implementar, siendo la primera de ellas la fase no aséptica, la cual abarca de la obtención del pulmón sano hasta la extracción con solventes lipídicos (Riverón & *et.al*, 2009), considerándose de esta índole por tratarse de una fase donde se trabaja directamente con los órganos haciéndose presentes residuos hemáticos, de tejido, entre otros (Fujiwara, Chida & Watebe, 1980), cuyo objetivo es eliminar la mayoría de los componentes innecesarios del pulmón, finalizando en la obtención una mezcla de compuestos lipídicos y proteínas hidrófobas, donde es necesario trabajar bajo condiciones de higiene y los productos finales deben almacenarse con limpieza y temperatura adecuada (Riverón & *et.al*, 2009).

Tabla 12: Fases de asepsia que se deben aplicar al proceso general de producción de surfactante natural exógeno		
Fase de asepsia	Pasos del procedimiento	Observaciones
No aséptica	Obtención de pulmón sano	Durante esta fase se deben tomar medidas de limpieza adecuada y desecho correcto de residuos
	Tratamiento del pulmón	
	Extracción con solventes orgánicos	
Aséptica	Purificación	En esta fase se debe trabajar bajo condiciones de esterilidad
	Envasado	

La segunda fase de este proceso es la aséptica, la cual abarca las etapas de purificación y envasado, se denomina de esta manera debido a que los procedimientos se deben realizar bajo técnica de esterilidad (Riverón & *et.al*, 2009). Esta fase parte de la mezcla obtenida en la fase anterior y su objetivo es la eliminación de moléculas indeseadas para solo quedarse con los componentes del surfactante, los cuales deben estar libres de cualquier microorganismo, pirógeno y solvente (Riverón & *et.al*, 2009).

Descripción de los pasos generales

Pulmón sano

Para poder iniciar el proceso de producción se debe obtener la materia prima adecuada, en este caso pulmones, por ser el único órgano donde se produce el surfactante, pudiendo ser de origen bovino o porcino (Travieso, 2006), ya que han

demostrado, por medio de lavados bronquiales y análisis de su composición, ser las especies con mas similitud a la del humano (Tabla 13) (Encinar, 1993), donde su baja cantidad de lípidos neutros ayuda al proceso de purificación y la cantidad de fosfolípidos que se logran extraer permiten contar con una concentración ideal para el tratamiento.

Tabla 13: Comparación de la cantidad de fosfolípidos presentes en el surfactante del humano con las especies utilizadas para producción de surfactante exógeno			
Compuestos (%)	Especie animal		
	Hombre	Cerdo	Vaca
Fosfolípidos	81	85	84
Lípidos neutros	18	15	16

Al comparar estas especies, desde el punto de vista de producción, se puede observar que el cerdo presenta una mayor cantidad de fosfolípidos que la vaca y una menor cantidad de lípidos neutros, por lo que el producto final porcino siempre presentará una mayor concentración de fosfolípidos (Manzanares & *et.al*, 2009), dando como resultado que los productos de origen bovino muestren alrededor de 65mg de fosfolípidos por mililitro de producto (Survanta, 2013), mientras que los de origen porcino un aproximado de 72mg de fosfolípidos por mililitro de producto (Curosurf, 2005), diferencia que desde el punto de vista clínico es irrelevante, pero si lo es desde el punto de vista de la producción, haciendo que la especie porcina sea considerada como una mejor opción de materia prima, debido a que permite optimizar el proceso, al disminuir la cantidad de reactivos y pulmones necesarios para la obtención de un producto final adecuado. Sin embargo aun existe controversia sobre los pulmones porcinos, por tratarse de una especie cuyo lugar de crianza y hábitos conductuales hace que sean altamente susceptible a padecer trastornos respiratorios de índole viral y bacteriano (Pérez & *et.al*, 2010), que pudieran implicar un riesgo al propiciar un contagio animal-humano (Noval & Ruiz, 2012), es por ello que la mayoría de las patentes siguen prefiriendo trabajar con la especie bovina, que se considera más saludable por reportar menos cantidad de enfermedades respiratorias (Wilma, Díaz & Manzanares, 2001), aun cuando se obtenga menor cantidad de fosfolípidos.

En esta primera etapa del proceso se debe tener en cuenta que el objetivo es obtener la materia prima necesaria para llevar acabo la producción de un principio activo, el cual debe cumplir con estándares de calidad, entre los que destaca la integridad y funcionalidad del producto, sumado a una ausencia de contaminantes (Noval & Ruiz, 2012). Para garantizar dicha calidad se debe realizar un minucioso análisis a lo largo de todo el proceso, incluyendo la elección de la materia prima, donde las principales características que debe cumplir es asegurar que los

pulmones no presenten contaminación de microorganismos patógenos (a causa de manipulación o almacenamiento), no se encuentren en descomposición y que provengan de animales sanos, o de lo contrario el microorganismo causante de la enfermedad pueden encontrarse latente en el tejido, contaminando el proceso y alterando la integridad del producto (Pérez & *et.al*, 2010).

Previo a la obtención de materia prima se deben establecer los criterios de elección para los animales a los cuales se les sacrificará, abarcando edad, peso, genero, condiciones de crianza y la salud del animal, buscando homogeneizar la población a trabajar (González & *et.al*, 2007), evitando con ello que la materia presente características cambiantes, difíciles de controlar y que pudieran afectar en el proceso (Manzanares & *et.al*, 2009), sin embargo se debe tener en cuenta que existe una baja disponibilidad de lugares que permitan la obtención de los pulmones con todas las características deseadas, haciendo que la dificultad de obtención de pulmones ideales sea el principal motivo por el cual se buscan nuevas fuentes de producción (Villalaz, 1997). Este inconveniente se debe a que en las granjas comunes la mayoría de los animales han padecido por lo menos una enfermedad respiratoria antes de su sacrificio quedando lesiones²³ de distinta gravedad, siendo las mas comunes por presencia de *Streptococcus spp* e influenza (Cabrera & *et.al*, 2006), trayendo como consecuencia una disminución de la cantidad y calidad del surfactante a obtener; además de correrse el riesgo de que exista algún patógeno presente en el tejido como consecuencia de una enfermedad resiente (Cabrera & *et.al*, 2006). Ante estas dificultades se ha recomendado recurrir a las “granjas controladas”, las cuales son sitios de crianza que cuentan con las condiciones de salubridad adecuadas para los animales, sometándose a un gran número de exigencias y cumpliendo con una serie de normas de calidad (Noval & Ruiz, 2012), por lo que son establecimientos capaces de certificar que los animales a sacrificar están sanos, bien alimentados, cuentan con un control de peso-edad²⁴ adecuado, que las enfermedades sean poco frecuentes, en caso de presentarse alguna se garantiza un diagnostico y tratamiento oportuno, al mismo tiempo que se busca evitar su propagación entre la población, a lo cual se le suma unas condiciones de sacrificio poco dolorosas y más higiénicas (Noval & Ruiz, 2012); facilitando la obtención de tejidos ideales para el proceso de producción, donde contar con este tipo de granjas no descarta el establecimiento de características para la población a sacrificar (Riverón & *et.al*, 2009).

²³ Las enfermedades del tracto respiratorio produce lesiones pulmonares que desembocan en cicatrizaciones, es decir, la muerte de neumocitos, haciendo que la presencia de surfactante sea menor (Cabrera & *et.al*, 2006), por lo que a mayor cantidad de lesiones menor surfactante se extraerá

²⁴ En las granjas controladas se supervisa que los animales tengan el peso adecuado para su edad, donde un problema de desnutrición puede estar relacionado con una parasitosis u otra enfermedad (Noval & Ruiz, 2012)

En caso de contar con granjas controladas se encontrarán menos dificultades para obtener los tejidos homogéneos y de calidad, más en las granjas comunes se encontrará un elevado número de dificultades dadas por las condiciones de crianza, inconvenientes que se podrían evitar si se trabaja con animales de recién destete, debido a que mientras mas joven sea el animal menos posibilidad existirá de que haya tenido contacto con algún padecimiento respiratorio, propiciando la obtención de pulmones sanos (Pérez & *et.al*, 2010), pero por desgracia los animales de edad adulta representan una posibilidad económica más fácil de conseguir (González & *et.al*, 2007).

Tratamiento del pulmón

El tejido obtenido para proceder a realizar el producto se considera contaminado por contener compuestos indeseados capaces de alterar la función del surfactante (Cullen & *et.al*, 2007), haciendo necesario un tratamiento del tejido como etapa previa a la extracción de los componentes, teniendo como objetivo la eliminación de todo residuo pulmonar innecesario (Díaz & *et.al*, 2008), para lo cual se han implementado dos técnicas el lavado y el triturado pulmonar (Travieso, 2006).

Este tratamiento debe realizarse al poco tiempo de haber obtenido la materia prima, pues dada su naturaleza comenzará un proceso de degradación y putrefacción que hará del tejido una materia indeseable; en caso de que no vaya a trabajarse de forma pronta se debe proceder al almacenamiento, el cual debe realizarse bajo condiciones de limpieza y temperatura adecuada (Travieso, 2004), la refrigeración deberá ser entre 4 y 6 grados centígrados de temperatura, teniendo en cuenta que este tipo de almacenamiento no puede exceder las 24 horas ya que rebasado el mismo comenzará el proceso de descomposición; donde también se puede optar por la congelación a -20°C, logrando un almacenaje más prolongado, recomendado no exceder las dos semanas (pasado este tiempo se dejará de considerarse un tejido fresco), pero no es el método más recomendado debido a que si se descongela de forma rápida los cristales de hielo propiciarán la ruptura de los componentes del surfactante (Wilma, Díaz & Manzanares, 2001), pudiendo evitarlo si se hace de forma gradual, sin embargo sigue considerándose una metodología riesgosa (Gallo, 2007). Para garantizar el proceso de almacenaje es necesario realizar un monitoreo constante de la temperatura para comprobar la viabilidad del tejido, pero también es necesario llevar acabo uno de índole microbiológico con el objetivo verificar la inexistencia de algún microorganismos que pudieran contaminar (Riverón & *et.al*, 2009).

Para comenzar el proceso de manipulación pulmonar se debe partir de un tejido a temperatura ambiente que debe ser seccionados en varias partes, estandarizando el peso de cada muestra (Díaz & *et.al*, 2008), logrando partir de muestras

homogéneas, facilitando establecer la cantidad de soluciones a utilizar por cada una de ellas y también determinar el rendimiento (Wilma, Díaz & Manzanares, 2001).

La muestra predeterminada de pulmón se debe someter a un proceso de lavado o triturado, en el primer caso lo que se busca es la extracción del contenido existente en el saco pulmonar, es decir, recolectar el surfactante presente en el tejido como consecuencia de la excreción natural de los neumocitos, por medio de lavados con soluciones electrolíticas (Travieso, 2006), siendo la más recomendada la solución fisiológica (Manzanares & *et.al*, 2009). En el caso del triturado los pedazos de tejido son macerados y posteriormente lavados con soluciones electrolíticas, cuyo objetivo es recolectar el surfactante excretado por los neumocitos y el surfactante que se encuentra dentro de las células en forma de cuerpos lamares (Travieso, 2006), buscando obtener mayor cantidad de surfactante (Bissinger & Carlson, 2006).

El lavado pulmonar es una técnica sencilla de llevar acabo y que necesitar un proceso de purificación poco riguroso (Travieso, 2006), esto gracias a que durante el proceso de lavado la ruptura de membrana es escasa (Travieso, 2004), recomendándose realizarlo con la menor manipulación posible, las soluciones se deben ir colocando poco a poco, tienen que ser isotónicas, estar a temperatura ambiente y durante la agitación se debe tener cuidado de lesionar lo menos posible el tejido, con el fin de evitar la presencia de residuos hemáticos (Wilma, Díaz & Manzanares, 2001), donde una vez terminados los lavados se usa un proceso sencillo y poco riguroso de purificación para eliminar los residuos celulares, siendo el más recomendado la centrifugación a baja gravedad, de aproximadamente 1000 rpm (Manzanares & *et.al.*, 2009).

En el caso del triturado se macera el tejido y después es sometido a un proceso de lavado, obteniendo una abundante cantidad de residuos celulares (Travieso, 2006), cuya presencia es indeseada por elevar el carácter antigénico del producto (Blanco, 2004), por lo que el producto final debe ser sometidos a métodos rigurosos de purificación, no existiendo un proceso específico (Travieso, 2004), lo cual permite que cada investigador pueda estandarizar su propia técnica, haciéndose la recomendación de hacer uso de más de una debido a que las membranas celulares se conforman de moléculas distinta (Gallo, 2007),

recomendándose el uso de la centrifugación , lixiviación²⁵, filtración y la cromatografía²⁶ (Díaz & *et.al*, 2008).

A lo largo de esta etapa del proceso se debe trabajar en condiciones de higiene adecuadas, donde el área, material y reactivos no estén contaminados de grasas, ya que estas últimas son moléculas que afectarán el proceso de extracción (Riverón & *et.al*, 2009). Así mismo se debe de observar los lavados obtenidos en la parte final de esta etapa y si las suspensiones obtenidas son de coloración rosa es indicativo de residuos hemáticos, capaces de inactivar el surfactante, por lo que deben ser desechados (Manzanares & *et.al*, 2009), lo adecuado es obtener suspensiones de color amarillo claro, debiendo ser tamizadas para garantizar que no contengan ningún patógeno proveniente de los pulmones (Tabla 14), si los resultados son satisfactorios podrá almacenarse en condiciones de refrigeración (2-8°C) por no más de diez días, pero en caso de que el tamizado indique la presencia de alguno de estos patógenos deben ser desechadas (Riverón & *et.al*, 2009), por tratarse de microorganismo que afectan al humano y cuentan con la capacidad de modificar en estructura y funcionalidad a los componentes del surfactante (sobre todo de las proteínas) (Cabrera & *et.al*, 2006).

Tabla 14: Principales microorganismos contaminantes de tejidos pulmonares que implican un riesgo para el humano e inactivan el surfactante
<i>Streptococcus spp</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Salmonella spp</i>
<i>Pasterella multocida</i>
<i>Corynebacterium pyogenes</i>
<i>Pseudomona spp</i>
<i>Staphylococcus spp</i>
<i>Aeromona hydrocaviae</i>
Virus de la influenza

Extracción con solventes orgánicos

Tras realizar un tratamiento pulmonar se logra obtener una materia homogénea a partir de la cual se puede realizar un proceso de extracción para obtener los fosfolípidos y proteínas hidrofóbicas deseadas, haciendo uso de sus propiedades de solubilidad (Blanco, Faure & *et.al*, 2005), donde los solventes mas recomendados para garantizar el proceso son el cloroformo y el metanol, debido a

²⁵ Se denomina lixiviación al proceso de extracción sólido-líquido, en el que un disolvente líquido pasa a través de un sólido, logrando extraer uno o varios solutos del sólido

²⁶ La cromatografía, según la IUPAC, se define como un método de separación en la cual los componentes se dividen en dos fases, una estacionaria y otra móvil, permitiendo la migración de partículas.

que los lípidos de membrana permanecerán en el metanol, mientras que los no unidos a membranas al extraerse con mayor facilidad por solventes menos polares permanecerán en el cloroformo (Champe & *et.al*, 2007), donde los componentes pertenecientes al surfactante (fosfolípidos y proteínas) quedarán disueltos en el cloroformo, junto con algunos otros lípidos (Wilma, Díaz, Manzanares, 2001).

La información obtenida por algunas de las patentes indica que la extracción se realiza por medio de cloroformo y metanol en proporciones estandarizadas, y aun cuando no se especifica el uso de un método específico se conocen varios métodos de extracción con solventes, existiendo tres principales métodos de extracción los que garantizan la integridad de los compuestos que se logran obtener, siendo el método de Folch y el método del Bligh and Dyer los mas comunes y se trabajan a temperatura ambiente o en frio, mientras que el método de Soxhlet es una técnica menos empleada pero igual de útil, aplicando calor en el proceso (Champe & *et.al*, 2007).

- Método de Folch: Este método busca extraer los fosfolípidos de una muestra homogénea con una solución de cloroformo y metanol en proporción 2:1, donde los lípidos se recogen en la fase orgánica, la cual se debe evaporar para poder obtener el contenido total de grasas (García & Díaz, 2001). Este método se recomienda en la manipulación de tejidos por permitir una separación de los lípidos (Folch, Lees & Stanley, 1957), teniendo la desventaja de no tomar en cuenta la humedad de las muestras, por lo que la muestra de inicio no siempre es homogénea, resultando en un rendimiento menor al esperado (Rendina, 1974).
- Método de Bligh and Dyer: Es una variante del método de Folch, en la que la proporción de cloroformo y metanol se puede modificar a 1:1 o 1:2 dependiendo de la humedad de la muestra (García & Díaz, 2001). Al igual que el método de Folch permite la extracción de lípidos a partir de tejidos, pero en este caso se agrega una proporción de agua a la mezcla de metanol-cloroformo para asegurar que se parta de una sola fase homogénea (Instituto de salud publica de Chile, 2013), que al añadir alícuotas de cloroformo y agua logra la separación de fases, permitiendo la extracción de los fosfolípidos con un alto rendimiento (Begazo, 2013).
- Método de Soxhlet: Proceso de extracción semicontinua donde se calienta el solvente, volatiliza y condensa en un sistema cerrado, donde el goteo del se da sobre la muestra, dejándola sumergida durante varios ciclos para que se lleve acabo la extracción, cuyo número de ciclos dependerá de lo que se este extrayendo y los solventes a utilizar, sin embargo hasta el momento solo es una técnica utilizada en materia vegetal (Núñez, 2013).

Hasta el momento se ha reportado que el método de Bligh and Dyer es la mejor opción para la obtención de los componentes del surfactante (Blanco, Faure & *et.al*, 2005), observándose que la proporción de cloroformo-metanol 1:2 es la que permite mayor rendimiento en comparación a las proporciones de 2:1 y sin agua del método de Folch (Iverson, Lang & Cooper, 2001). Las patentes actuales utilizan este método o modificaciones del mismo como base para su producción (Bissinger & Carlson, 2006), donde las modificaciones se han logrado estandarizar en base a ensayo y error, información que no se proporciona, pero se habla de que aun cuando el proceso de extracción se logra desde la primera vez que se realiza, es más recomendado repetir el proceso por triplicado (Wilma, Díaz & Manzanares, 2001).

En el caso del método de Soxhlet no se ha reportado como método de trabajo pese a ser considerado una buena técnica de extracción al permitir el reciclamiento del solvente y otorgar altos rendimientos, sin embargo es probable que si se logra estandarizar disminuya la cantidad de solvente a utilizar (Willson & Notter, 2011).

Es posible ir realizando el almacenaje de los productos finales obtenidos de las extracciones, para después poder concentrar todas las fases orgánicas y proceder a la purificación (Travieso, 2004). En caso de que el almacenaje se realice a temperatura ambiente no puede ser por un tiempo mayor a 24 horas; mientras que en condiciones de refrigeración de entre 8 y 15°C permite que sea por un periodo no mayor a 5 días, considerándose esta última la mejor opción ya que impide que el solvente se volatilice; descartándose la posibilidad de utilizar la congelación en esta fase del proceso (Manzanares & *et.al*, 2009). Durante el periodo de almacenaje se debe hacer un monitoreo microbiológico para asegurar que las fases orgánicas no están contaminadas por el proceso de almacén, que en caso de encontrarse hongos será mejor desechar las muestras (Travieso, 2004) y si se trata de bacterias distintas a las mencionadas en la Tabla14, se pueden conservar por tratarse de contaminantes que se pueden eliminar y su presencia no afecta al surfactante, teniendo la obligación de asegurar, por medio de un análisis microbiológico posterior al proceso de purificación, que efectivamente fueron eliminadas y no existe residuos de las mismas (Riverón & *et.al.*, 2009)

Purificación

Esta parte del proceso se debe dividir en tres pasos debido a que el surfactante debe ser purificado de tres tipos de contaminantes, el primero es la presencia de moléculas indeseadas, seguido de la eliminación de patógenos y finalmente los solventes que se utilizaron para la extracción.

Moléculas indeseadas

La fase orgánica que se obtiene en el proceso de extracción reporta altas concentraciones de colesterol y lípidos neutros, que implican un riesgo antigénico e impiden un buen intercambio gaseoso (Blanco, 2004), por lo que deben ser disminuidos hasta lograr cumplir con el estándar establecido por la FDA, donde lípidos neutros no deben encontrarse en un rango mayor al 10%, mientras que el colesterol tiene que reportar un porcentaje menor o igual al 1.5% (Manzanares & *et.al*, 2009).

El colesterol y los lípidos neutros, por sus características de solubilidad, siempre permanecerán en la fase clorofórmica, haciendo necesario llevar a cabo un segundo proceso de separación, el cual puede variar de una patente a otra, sin embargo son dos los métodos más reconocidos hasta el momento por el alto grado de pureza que otorgan; uno de ellos es la precipitación con acetona y el segundo es el proceso de purificación por cromatografía, donde el primero es el método más utilizado por ser más económico y producir pocos desechos (Wilma, Díaz & Manzanares, 2001), el cual utiliza la insolubilidad de la lecitina y las proteínas hidrófobas B y C en la acetona para llevar a cabo la separación (Anónimo, 2013) por lo que al poner en contacto la fase clorofórmica con acetona en una proporción 2:1 por un tiempo mínimo de contacto de 6 horas se logra una precipitación de los componentes casi en su totalidad (Díaz & *et.al*, 2008), lográndose un aproximado del 8% para los lípidos neutros y 1.4% de colesterol (Survanta, 2013), debiendo resuspender en cloroformo los productos obtenidos para garantizar su estabilidad y facilitar su manipulación. En el caso de la cromatografía de filtración en gel es un método de reciente incorporación al proceso de producción de surfactante, que consume cantidades elevadas de solventes orgánicos clorados (Travieso, 2006) y solo es utilizado por la patente Curosurf reportando un 5% de lípidos neutros y 1.0% de colesterol (Curosurf, 2005).

Al finalizar este proceso la muestra solo debe de contener las moléculas deseadas para el surfactante en concentraciones adecuadas (Tabla 16), haciendo necesario la implementación de técnicas que avalen el contenido del producto (Riverón & *et.al.*, 2009).

Tabla 16: Composición aprobada por la FDA para la composición del surfactante natural exógeno		
Compuesto	Porcentaje	Concentración (mg/ml)
Compuestos lipídicos	90-95	60-80
Fosfolípidos	90-95	54-76
Lípidos neutros	5-10	3-8
Proteínas del surfactante	5-10	0.4-1.0

Eliminación de patógenos

Gracias a las medidas de higiene y monitorización que se van tomando a lo largo del proceso, al llegar a esta fase se garantiza la inexistencia de microorganismos capaces de degradar el surfactante, por lo que el objetivo de este proceso se enfoca en la eliminación de los microorganismos o restos de los mismos que pudieran encontrarse presentes como resultado de la manipulación y almacenaje que implican un riesgo para la salud (Riverón & *et.al.*, 2009), haciéndose necesario comprobar la esterilidad del producto antes de salir a la venta (Cabrera & *et.al.*, 2006).

Para lograr el objetivo de esta fase se parte de las extracciones clorofórmicas puras de moléculas indeseadas, debiendo encontrarse en estado líquido y a temperatura ambiente, permitiendo llevar a cabo el proceso de esterilización por medio del sistema de filtrado a alta presión (Curosurf, 2005), técnica utilizada para esterilizar líquidos, los cuales se hacen pasar a través de mallas de celulosa, porcelana, asbesto, que presentan un poro tan pequeño que no permite el paso de microorganismos, reteniendo la contaminación, logrando obtener un líquido estéril (Díaz & *et.al.*, 2008).

Este proceso se realiza utilizando campana de flujo, para garantizar la esterilidad del producto final, haciendo necesario el uso de estas condiciones de esterilidad en el resto del proceso de producción.

Eliminación de solventes

Los solventes orgánicos son utilizados para poder separar los lípidos de otras sustancias y facilitar la esterilización de los mismos, sin embargo son sustancias tóxicas para el humano (Rendina, 1974), haciendo que el solvente sea un componente indeseado en el producto final (Seeger & Soll, 2009), es por ello que se debe trabajar en la eliminación total de estos productos, donde algunas patentes mencionan que lo más recomendado es el proceso de evaporación por medio del uso de desecadores (Curosurf, 2005), procedimiento basado en el conocimiento de que el cloroformo se evapora a temperatura ambiente (entre 20 y 25°C) (UNAM, 2013) al mismo tiempo que los fosfolípidos y proteínas son estables

hasta los 80°C (Bissinger & Carlson, 2006), por lo que la aplicación de un ligero calor permite evaporar el solvente sin modificar la estructura o características de los componentes (Curosurf, 2005).

Finalizando el proceso de secado, se puede realizar el análisis de rendimiento tomando en cuenta el peso inicial del pulmón, la cantidad de muestra que se peso al inicio del proceso y el peso final de los fosfolípidos, por lo que se recomienda el diseño de herramientas que faciliten el trabajo (Montes de Oca, Villoch & Roque, 2010).

Envasado

El producto final puede tener dos presentaciones la forma líquida, donde los componentes obtenidos tras el proceso de purificación son suspendidos en agua inyectable y embotellados, debiéndose agitar antes de su aplicación y almacenar en condiciones de refrigeración de entre 2 y 8°C, por un tiempo no mayor a 2 meses. Esta presentación es la menos comercializada por permitir poco tiempo de almacenaje, además de considerarse que el surfactante puede perder su estabilidad con una gran facilidad (Manzanares & *et.al.*, 2009).

La otra presentación es la liofilizada, que contiene los componentes del surfactante en forma desecada, brindándoles mayor estabilidad (Manzanares & *et.al.*, 2009) y permite un almacenado de entre 6 y 8 meses en condiciones de refrigeración (2-8°C) debiendo resuspender con agua inyectable instantes previos a su aplicación (Curosurf, 2005).

En ambas presentaciones se comercializan en embotellados con volúmenes no mayores a los 3 mililitros por tratarse de un medicamento para neonatos, cuyas dosis a aplicar son pequeñas y colocar mas volumen en el envase resultaría en un desperdicio. Estos productos una vez abiertos deben ocuparse y desechar los sobrantes ya que los cambios de temperatura inactivan el producto y un almacenaje una vez abierto propicia su contaminación, por lo que no es posible su almacenaje para un segundo tratamiento (Ballesteros & Rodríguez, 2005).

ANÁLISIS DE LA INVESTIGACIÓN

Por medio de esta investigación se logro comprender el factor surfactante de manera más detallada, en base a lo cual se puede definir como una sustancia producida por los neumocitos tipo II, compuesta principalmente de fosfolípidos, una pequeña cantidad de proteínas y de lípidos neutros, que tiene como función combinarse para formar una monocapa denominada mielina tubular, con la finalidad de recubrir la superficie interna de los alveolos y así disminuir la tensión superficial que se produce en la interfase aire-líquido, impidiendo que las paredes alveolares se colapsen al final de la respiración, además de contar con una función inmunológica, por lo que se puede considerar indispensable para que se lleva acabo la respiración.

Todas las definiciones existentes en la actualidad manejan que el surfactante solo se compone de fosfolípidos y proteínas, sin embargo se incluyen los lípidos neutros (pese a su baja concentración) ya que cumplen una función importante como nutrientes; existen escasos reportes de su función y los pocos autores que mencionan estas moléculas las consideran componentes secundarios no esenciales, pero desde el punto de vista de la definición anterior cualquier molécula que aportar energía es de relevancia. Por otra parte, en gran cantidad de investigaciones se ha demostrado que la función del surfactante se da principalmente por los fosfolípidos que lo componen, en los últimos años se llego a la conclusión de que las proteínas también participan al dar estabilidad a la monocapa, ya que tres de ellas participan en actividad inmunomoduladora por lo que se adjudica una función inmunológica al surfactante; sin embargo, pese a todos los avances, se considera necesario seguir realizando investigaciones para poder comprender mejor la función de los componentes que conforman esta mezcla, la manera en que sintetizan, si cuentan con alguna otra función inmunológica o tensoactiva, así como la presencia de alguna otra biomolécula.

Esta investigación también permite comprender que al Síndrome de dificultad Respiratoria (SDR) se debe a la deficiencia de surfactante en los recién nacidos, aun cuando su incidencia y tasa de mortalidad en nuestro país se desconocen (por falta de registros) es una patología que va en aumento, comprobándose que lo anterior es consecuencia del incremento de partos prematuros y pretérmino, siendo que estos últimos se han elevado proporcionalmente al aumento de embarazos en adolescentes; las cuales presentan un gran número de complicaciones; razón por la que se han establecido programas de control del embarazo para monitorear todo el proceso y prevenir los nacimientos prematuros. Esta es la principal patología entre los recién nacidos prematuros y pretérmino, siendo lo anterior datos alarmantes que hacen evidente la necesidad de contar con productos exógenos en todas las instituciones de salud, y el que se pudiera

implementar la producción de este producto dentro de nuestro país permitiría que todas las instituciones tengan accesibilidad a este recurso, logrando con ello una disminución de la mortalidad por este padecimiento; lo anterior hace pensar que es necesario implementar trabajos de investigación y estandarización de técnicas para lograr la producción de surfactante en México.

La investigación sobre los distintos productos actuales en el mercado, para poder realizar una comparativa teórica entre ellos, fue un trabajo difícil por varias razones: la primera de ellas se debió a que existen pocas publicaciones, en segundo lugar las comparativas realizadas por los productores solo destacan los beneficios de su producto, sin esclarecer la existencia de deficiencias en comparación a los demás o la presencia de efectos secundarios y los pocos que mencionan la existencia de estos últimos los adjudican a una mala administración y no a las propiedades del surfactante, información que hace necesario realizar un análisis más minucioso al respecto, sobre todo con el fin de buscar puntos de mejora en los productos. En el caso de los estudios comparativos existentes realizados por investigadores ajenos a los productores se basan en análisis de casos en forma retrospectiva, donde afirman una igualdad (clínicamente hablando) entre todos los productos exógenos naturales, conclusiones que se considera como la información más evidente con la que se puede contar actualmente; sin embargo al ser comparativas que solo incluyen los tres productos más comercializados en el mercado, se puede concluir que hace falta realizar estudios que abarquen todos surfactantes.

En la comparativa de los productos sintéticos se encontró que existen investigaciones concretas en animales y algunos análisis retrospectivos de casos en neonatos por parte de algunas instituciones, detectándose que los productos sintéticos son más lentos que los naturales; lo que llevo a la búsqueda de nuevas alternativas para este tipo de productos que si se logra podría aportar una nueva perspectiva a la producción de surfactantes sintéticos, más aun falta trabajo por realizar para lograrlo.

Las patentes de todos los productos naturales en el mercado se encuentran vigentes, situación que no permite conocer sus técnicas de producción y la información que proporcionan es muy general y ambigua, lo que hace necesario establecer los pasos mínimos que deben llevarse a cabo para lograr la obtención del surfactante natural, que se describieron buscando dar una idea concreta de lo que se debe realizar en cada una de ellas y algunos de los cuidados que se deben de tomar en cuenta; al ser tan poco específicas surgen cuestionamientos que solo un trabajo práctico permitirá despejarlas, lo que si se logra detectar es la necesidad de tomar en cuenta en estas etapas generales los siguientes aspectos:

- La dificultad para obtener materia prima adecuada.
- Se utilizan grandes cantidades de solventes orgánicos y no es posible reciclarlos debido a que contienen las moléculas deseadas.
- Contar con una zona estéril y capacitación sobre el manejo de la misma.
- Trabajar con rapidez los tejidos dado que se degradan.
- Tener cuidado para no alterar las propiedades del surfactante al hacer uso de la temperatura.

Hace falta trabajar en estandarizar nuevas técnicas que permitan la disminución de desechos clorofórmicos, costos y con ello lograr que este producto este más accesible.

Pese a que el descubrimiento del surfactante data de más de 50 años aun existe mucho por investigar y este proceso de investigación requiere de un equipo multidisciplinario para lograr conocer y entender más acerca del surfactante. Esperando que esta recopilación teórica permita conocer la información con la que se cuenta actualmente, los avances que se han dado al respecto, pero también las áreas en las que hace falta indagar.

Puedo decir que mi investigación aun que me permitió comprender mejor el surfactante, su función, la patología que produce su ausencia, conocer los productos que existen en el mercado, lo importante que es contar con un producto exógeno dentro de las instituciones de salud y me aporó conocimientos de como se puede implementar su producción, también me dejo cuestionamientos que este trabajo no me permite resolverlos, entre ellos:

- ¿Por qué no considerar a los lípidos neutros como parte importante de la mezcla que conforma al surfactante?
- ¿Sólo existen 4 proteínas surfactantes?
- ¿La proteína SP-A en verdad es multifuncional o existen varios tipos de proteína SP-A?
- ¿Si los lípidos neutros hasta ahora se consideran fluidificantes por qué se busca eliminarlos casi en su totalidad en los surfactantes exógenos?
- ¿En el lavado y macerado pulmonar no se pueden recuperar las proteínas hidrosolubles?
- ¿Por qué no buscar incluir las proteínas hidrosolubles en los productos exógenos?
- ¿Por qué si la proteína SP-A se considera la proteína más importante del surfactante no se ha incluido en ningún producto exógeno?
- ¿La obtención de fosfolípidos solo se puede realizar con solventes orgánicos?

- ¿La hipertensión arterial que se llega a presentar en los neonatos no se deberá a que el producto es muy denso y no a una rápida aplicación?
- ¿La proteína SP-C no tendrá también función inmunológica?
- ¿Por qué la proteína SP-B es menos efectiva sin SP-C?
- ¿Existe alguna sustancia que permita inducir la producción de las proteínas del surfactante o el propio surfactante?
- ¿Si los prematuros tienen escasa cantidad de surfactante al nacer no se debería de tener en cuenta en la aplicación de las dosis y no solo el peso?

Probablemente ya exista la respuesta a alguna de estas preguntas, pero no están documentadas o no tenemos accesibilidad a ellas y muchas de estas requieren de investigación práctica, aunado a la necesidad de ampliar mis conocimientos me veo limitada a despejar estos cuestionamientos. Lo que me motiva a continuar ésta investigación, convirtiéndose en un impulso para un nuevo comienzo.

CONCLUSIONES

- El factor surfactante es una mezcla de fosfolípidos y proteínas, indispensable en el proceso respiratorio, ya que se encarga de disminuir la tensión superficial, evitando el colapso alveolar, además de tener una actividad inmunológica; siendo necesario seguir investigando cada uno de sus componentes para lograr comprender mejor su función.
- La escases de surfactante se debe a una inmadurez pulmonar, que origina al Síndrome de Dificultad Respiratoria, principal patología entre los recién nacidos; que produce una incapacidad para respirar con facilidad, puede llevar a un colapso pulmonar y el fallecimiento del neonato. En México la incidencia de esta enfermedad va en aumento, presentando una elevada tasa de mortalidad, por lo que se deben tomar medidas para poder brindar un tratamiento adecuado.
- El surfactante exógeno, acompañado de una asistencia respiratoria mecánica, es el mejor tratamiento para el Síndrome de Dificultad Respiratoria, recomendándose el de uso dosis múltiples en el tratamiento de rescate y una dosis en el profiláctico; sin embargo los productos del mercado tienen costos elevados, impidiendo la accesibilidad a los mismos, razón por la cual no todas las instituciones médicas mexicanas tienen acceso a estos productos.
- Los surfactantes naturales se pueden considerar como los mejores productos del mercado, ya que actúan de manera más rápida que los sintéticos y disminuyen la inflamación; donde los productos bovinos y porcinos han demostrado ser equiparables. En este respecto es necesario seguir buscando fuentes de obtención y metodologías de producción que permitan la elaboración de nuevos surfactantes, con igual efectividad que los ya existentes, pero con menores costos.
- México tiene un acceso restringido a los surfactantes exógenos del mercado, haciendo necesario la implementación de medidas para impulsar la producción de un surfactante exógeno, permitiendo una mayor accesibilidad a este tratamiento.
- La forma actual de obtener el surfactante de los pulmones animales es por medio de la extracción con solventes orgánicos, tras un proceso de lavado o macerado pulmonar, garantizado obtener los fosfolípidos y proteínas

hidrófobas del surfactante, por lo que se considera como la mejor técnica a implementar para llevar a cabo el proceso de producción.

- Durante el proceso de producción de los surfactantes es necesario la implementación de medidas de purificación adecuadas para garantizar que el contenido final cuente con los estándares de calidad tanto en concentración de cada una de las moléculas, así como de esterilidad, por lo que es necesario un control de calidad a lo largo del proceso.

REFERENCIAS

- Agassandian, M., & Mellampalli, R. (2013). Surfactant phospholipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 612-625.
- Anonimo. (Junio de 2013). *Informe de la lecitina*. Obtenido de http://informe_lecitina.pdf
- Ballesteros, C., & Rodríguez, A. (2005). Administración del surfactante exógeno en el síndrome de distres respiratorio agudo. *Revista cubana de medicina intensiva*, 5(1), 51-63.
- Begazo, A. (Junio de 2013). *Análisis de alimentos, fundamentos y técnicas*. Recuperado el Marzo de 2013, de Naálisis de alimentos, fundamentos y técnicas: <http://es.scribd.com/doc/42854211/23/Metodo-de-Bligh-Dyer#page=22>
- Bissinger, R., & Carlson, C. (2006). Surfactant. *Newborn and Infant Nursing Reviews*, 6(2), 87-93.
- Blanco , O., Lugones, Y., & et.al. (2012). An update on clinical surfactant preparations and respiratory disease. *Biotecnología aplicada*, 29(2), 54-60.
- Blanco, O. (2004). Propiedades antiinflamatorias del surfactante pulmonar y su aplicación en la clínica. *Biotecnología aplicada*(21), 70-76.
- Blanco, O., Faure, R., & et.al. (2005). *Surfacen y SP-A. Estudios preclínicos que fundamentan su uso terapéutico en el síndrome de distrés respiratorio agudo*. La Habana, Cuba: Centro de investigación y evaluaciones biológicas.
- Brockman, J., & et.al. (2003). Effect of hydrophobic surfactant proteins SP-Band SP-C on binary phospholipid monolayers. *Biophysical Journal*, 84, 326-340.
- Cabrera, Y., & et.al. (2006). Principales microorganismos aislados en el tracto respiratorio de cerdos jóvenes criados para producir pulmones sanos. *Revista computarizada de producción porcina*, 13(3), 84-88.
- Campos, A., & et.al. (Agosto de 2002). *Surfactante exógeno y síndrome de dificultad respiratoria en recién nacidos prematuros*. Recuperado el Marzo de 2013, de http://www.clinicapediatrica.fcm.unc.edu.ar/biblioteca/revisiones_monografia_s/revisiones/Surfactante%20Pulmonar.pdf
- Carlson, B. (2000). *Embriología humana y biología del desarrollo* (cuarta ed.). Barcelona, España: Elseviere.
- Ceriani, C. (2009). *Neonatología práctica*. México, DF: Editorial médica panamericana.

- Champe, P., & et.al. (2007). *Bioquímica* (cuarta ed.). (R. D. M., Trad.) Philadelphia: Wlters Kluwer.
- Cheng, C. (2012). The role of Surfactant in Respiratory Distress Syndrome. *The open respiratory medicine journal*, 44-53.
- Christian, L., & et.al. (2007). Respiratory Distress in the newborn. *Smerican Family Physician*, 76(7), 987-994.
- Cullen, B., & et.al. (septiembre-octubre de 2007). Surfactante pulmonar. *Vacunación HOY*, 15(85), 19-28.
- Curosurf. (Enero de 2005). *Monografía del producto Surfactante de origen porcino para el tratamiento de distrés respiratorio*. Recuperado el Marzo de 2013, de http://www.bgipharma.com/documentos/CURO_Monograph_alta_spanish.pdf
- Diaz, C., & et.al. (octubre-diciembre de 2008). Obtención de fosfolípidos con actividad surfactante pulmonar. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 39(4), 26-31.
- Encinar, A. (1993). *Metodos enzimáticos para la detrmianción de los fosfolípidos en el surfactante pulmonar de rata*. Universidad de Salamanca: Facultad de Biología.
- Fehlmann, E., & et.al. (2010). Impacto del síndrome de dificultad respiratoria en recién nacidos de muy bajo peso de nacimiento: estudio multicentrico sudamericano. *Argentin Pediatric*, 5(108), 393-400.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of totall lipides from animal tissues. *Biological Chemistry*, 497-509.
- Fujiwara, T., Chida, S., & Watebe, y. (1980). Artificial Surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet*, 55-59.
- Gallo, C. (2007). Purificación y cuantificación de lípidos de membrana. *Bioquímica y biología molecular de la universidad peruana Ceyetano Heredia*, 1-3.
- Garcia, R., & Díaz, I. (2001). Nuevas tendencias en el análisis de ácidos grasos. *Química alimetaria*, 121-127.
- Gartner, L., & Hiatt, J. (2008). *Texto y atlas de histología* (tercera ed.). México: Mc Graw Hill-Interamericana.
- Garza, A., & et.al. (2001). Prevalencia del Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda en la unidad de cuidados intensivos pediátrica polivalente. *Obstet Gynecol*, 12-15.

- González, D., & et.al. (2007). Estudio preliminar de la composición bioquímica del surfactante pulmonar de cerdos jóvenes. *Revista de salud animal*, 29(1), 65-68.
- Gutierrez, S., & et.al. (2012). Eficiencia y eficacia de los surfactantes pulmonares en recién nacidos con síndrome de dificultad respiratoria en la unidad de cuidado intensivo neonatal. *Gerencia política de salud*, 11(22), 67-75.
- IMSS. (Octubre de 2010). *Síndrome de dificultad respiratorio (Enfermedad de membrana hialina), guía de diagnóstica y tratamiento*. Recuperado el Marzo de 2012, de http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/pediatria/neonato/3_sindrome_dificultad_respiratoria.pdf
- Instituto de salud pública de Chile. (Junio de 2013). *Determinación de grasas Método de Bligh y Dyer*. Recuperado el 25 de Febrero de 2013, de http://www.ispch.cl/lab_amb/met_analitico/doc/ambiente%20pdf/Grasa_BlighDyer.pdf
- Iñigues, F., & Sánchez, I. (enero de 2010). *Desarrollo pulmonar*. Recuperado el Marzo de 2013, de <http://www.neumología-pediátrica.cl>
- Iverson, S., Lang, S., & Cooper, M. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for total lipids determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, 36(11), 1283-1287.
- Jiménez, J., & Castellanos, R. (2009). Surfactante pulmonar en el síndrome de dificultad respiratoria. *Revista mexicana de pediatría*, 76(5), 231-236.
- Jobe, A. (2000). Which surfactant for treatment of respiratory distress syndrome. *The lancet*, 1380-1381.
- Laguna, J., & Piña, E. (2007). *Bioquímica de Laguna* (sexta ed.). México, DF: EL Manual Moderno.
- Manzanares, T., & et.al. (2009). *Patente nº ES 2092969A1*. España.
- Montes de Oca, N., Villoch, A., & Roque, E. (2010). Metodología para elaborar el plan maestro de validación de los procesos de producción del centro nacional de sanidad agropecuaria. *Revista cubana de farmacia*, 44(2), 144-152.
- Moreno, O. (Enero de 2008). Surfactante y enfermedad de membrana hialina. *Revista cubana de pediatría*, 80(2), 20-29. Recuperado el Abril de 2013
- NOM 034-SSA2-2002 Para la prevención y control de los defectos al nacimiento. (Abril de 2013).

- Noval, N., & Ruiz, A. (2012). Gestión de calidad en una granja porcina productora de materia prima para elaborar Surfacen. *reviata computarizada de producción porcina*, 19(4), 264-267.
- Núñez, E. (Junio de 2013). *Extracción con equipos soxhlet*. Obtenido de [Http://www.cenunez.com.ar](http://www.cenunez.com.ar)
- Pacheco, D. (2004). *Bioquímica médica*. México: Limusa.
- Pérez, A., & et.al. (2010). efecto de la duración de crianza en la prevalencia de la neumonía en cerdos y en la materia prima para la fabricación de un producto farmacéutico. *Revista computarizada de producción porcina*, 17(3), 238-243.
- Rendina, G. (1974). *Técnicas de bioquímica aplicada*. México: Interamericana.
- Ríos, P. (Marzo de 2012). *Biología molecular de proteínas de membrana*. Recuperado el Abril de 2013, de <http://www.bbm1.ucm.es/biomil/biolmolprot.html>
- Riverón, Y., & et.al. (2009). Validación de puntos críticos de la producción de Surfacen. *Revista cubana de farmacia*, 43(2), 20-30.
- Rodríguez, U., & Gaviria, M. (2009). *Guías de pediatría práctica basada en evidencias* (segunda ed.). DF, México: Editorial medica panamericana.
- Ruiz, I., & Muñoz, L. (2010). Composición del surfactante, desarrollo pulmonar y pruebas de maduración del feto. *Universidad Nacional de Colombia*, 1-25.
- Salinas, G., & et.al. (2012). Economic evaluation of the use of exogenous pulmonary surfactants in preterm newborns in a Mexican population. *Salud pública de México*, 54(1), 73-81.
- Sánchez, C., & Torres, J. (2004). Surfactante pulmonar. *Revista pediátrica electrónica del hospital clínico de Niños Roberto del Río*, 45-50.
- Sánchez, M., & et.al. (2004). Estudio controlado del tratamiento de la enfermedad de membrana hialina del recién nacido pretérmino con factor surfactante pulmonar exógeno (porcino vs. bovino). *Gaceta Médica México*, 141(4), 267-262.
- Secretaría de salud. (2009). *Guía clínica para el diagnóstico y tratamiento*. Recuperado el Marzo de 2013, de http://www.hgm.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/pediatrica/neonato/3_sindrome_dificultad_respiratoria.pdf
- Segeer, N., & Soll, S. (2009). Extracto de surfactante derivado de animales para el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria. *The Cochrane Library*(3), 10-58.

- Survanta. (febrero de 2013). *Product monograph survanta*. Obtenido de <http://www.jahanbehbood.com/Survanta.pdf>
- Tenorio, O. (Junio de 2005). *Pulmón*. Recuperado el Febrero de 2013, de Sistema respiratorio: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/anatomia/computo/pulmon/index.html>
- Torres, J., & Perea, A. (2001). Maduración pulmonar fetal. *Neonatología clínica de Chile*, 129-134.
- Travieso, M. (2004). *Obtención y caracterización de materiales de referencia internos para el control de calidad del SURFACEN*. Habana, Cuba: Instituto de Farmacia y Alimentos.
- Travieso, M. (2006). Después de medio siglo de estudio del sistema surfactante pulmonar. *Revista Cubana de Investigación Biomed*, 2(25), 28-39.
- UNAM. (Junio de 2013). *Hoja de seguridad de reactivos*. Obtenido de <http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/7cloroformo.pdf>
- Villalaz, R. (1997). El surfactante pulmonar en neonatología. *Revista Medica de Panama*, 22(2), 22-30.
- Willson, D., & Notter, R. (2011). The future of exogenous surfactant therapy. *Respiratory care*, 59(9), 1369-1388.
- Wilma, A., Diaz, E., & Manzanares, T. (2001). Estudio comparativo de dos metodos de obtención del principio activo de un agente tensoactivo pulmonar. *Tecnología y ciencia*, 16(2), 77-83.