



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE  
LA SALUD

FACULTAD DE MEDICINA

INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD

CAMPO DE LA FARMACOLOGÍA CLÍNICA

EFFECTO DEL SURFACTANTE PULMONAR ENRIQUECIDO CON FOSFATIDILETANOLAMINA EN  
PROCESOS ASOCIADOS A LA FIBROSIS

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

BEATRIZ TLAELPA ROMERO

TUTORES:

D. EN C. LUIS GUILLERMO VÁZQUEZ DE LARA CISNEROS  
FACULTAD DE MEDICINA, BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

D. EN C. MARÍA GUADALUPE HERNÁNDEZ LINARES  
CENTRO DE QUÍMICA, INSTITUTO DE CIENCIAS. HERBARIO Y JARDÍN BOTÁNICO  
UNIVERSITARIO. BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

D. EN C. CRISELDA MENDOZA MILLA  
LABORATORIO DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN, INSTITUTO  
NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS

D. EN C. YAIR ROMERO LÓPEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, NOVIEMBRE 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ÍNDICE

RESUMEN.....	v
ANTECEDENTES GENERALES .....	1
SURFACTANTE PULMONAR .....	1
Fosfatidiletanolamina.....	1
Biofísica del surfactante pulmonar .....	2
Patologías relacionadas con la disfunción del surfactante .....	3
El surfactante como agente terapéutico.....	4
El surfactante en modelos murino.....	5
El papel del surfactante en la fibrosis pulmonar idiopática .....	5
ANTECEDENTES ESPECIFICOS .....	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	9
JUSTIFICACIÓN .....	10
HIPÓTESIS .....	10
OBJETIVOS .....	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
INFRAESTRUCTURA FÍSICA Y HUMANA .....	11
Recursos humanos.....	11
Recursos materiales.....	11
Recursos financieros .....	12
ASPECTOS ETICOS.....	12
Bioética .....	12
Consideraciones de bioseguridad .....	14
MATERIAL Y MÉTODOS .....	15
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	15
CRITERIOS DE SELECCIÓN: .....	15
MODELO <i>IN VITRO</i> .....	15
Criterios de inclusión: .....	15
Criterios de exclusión: .....	15
Criterios de eliminación: .....	15
MODELO <i>IN VIVO</i> .....	15
Criterios de inclusión: .....	15
Criterios de exclusión: .....	15
Criterios de eliminación: .....	15
METODOLOGÍA GENERAL.....	16
Procesamiento del lavado pulmonar de cerdo .....	16
Determinación de fosfolípidos .....	18

Determinación de fósforo .....	18
Estudio microbiológico.....	18
Determinación de las proteínas SP-B y SP-C por electroforesis .....	18
Análisis de las propiedades tensioactivas .....	19
Experimentos de monocapas .....	19
Medición de la tensión superficial con un surfactómetro de burbuja cautiva .....	20
Obtención de los fibroblastos de pulmón humano normal .....	20
Preparación de medio de cultivo de fibroblastos.....	21
Técnica para la propagación de líneas celulares .....	21
Técnica para congelación de fibroblastos .....	21
Medición de apoptosis con citometría de flujo .....	22
Técnica para la medición de proliferación de fibroblastos .....	22
Medición de la expresión de colágena .....	22
Manejo y mantenimiento del modelo murino.....	23
Modelo murino de fibrosis pulmonar con bleomicina .....	24
Medición de colágena por medio de hidroxiprolina .....	24
Preparación histológica .....	25
METODOLOGÍA PARA CADA OBJETIVO ESPECÍFICO .....	26
Metodología para el objetivo específico 1 .....	26
Metodología para el objetivo específico 2 .....	26
Metodología para el objetivo específico 3 .....	28
Metodología para el objetivo específico 4 .....	31
Metodología para el objetivo específico 5 .....	32
TAMAÑO DE LA MUESTRA .....	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	33
Resultados.....	34
Obtención de surfactante pulmonar por medio de lavados pulmonares de cerdo.....	34
Análisis microbiológico .....	36
Análisis químico.....	37
Cuantificación de la concentración de lípidos .....	37
Cuantificación de fósforo .....	38
Cromatografía de capa fina .....	38
Proteínas del SP.....	39
Determinación de las proteínas del surfactante pulmonar: SP-B y SP-C.....	40
Pruebas tensioactivas .....	41
Calorimetría diferencial de barrido .....	41
Experimentos de monocapas .....	43
Experimentos de transferencia de monocapa y microscopía de epifluorescencia de SPP-PE .....	45

Medición de la tensión superficial con un surfactometro de burbuja cautiva .....	48
Síntesis orgánica de la 1,2-dipalmitoil- <i>rac</i> -glicero-fosfoetanolamina .....	50
Efecto del SPP-PE en la proliferación, apoptosis y expresión de colágena en FPHN .....	51
Efecto de la SPP-PE en fibroblastos de pulmón humano normal, evaluación de la apoptosis por citometría de flujo .....	52
Efecto del SPP-PE en fibroblastos de pulmón humano normal sobre la expresión de colágena ...	55
Discusión .....	58
Fortalezas del estudio .....	64
Debilidades .....	64
Conclusión .....	65
Bibliografía .....	66
Anexo .....	78
Figure S1. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of <i>rac</i> -4-[(Benzyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3dioxolane (3) .....	78
Figure S2. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of <i>rac</i> -4-[(Benzyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3dioxolane (3) .....	79
Figure S3. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of <i>rac</i> -3-(Benzyloxy)propane-1,2-diol (4) .....	80
Figure S4. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of <i>rac</i> -3-(Benzyloxy)propane-1,2-diol (4) .....	80
Figure S5. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of <i>rac</i> -1,2- <i>O</i> -dipalmitoyl-3- <i>O</i> -benzyl-glycerol (5) .....	81
Figure S6. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of <i>rac</i> -1,2- <i>O</i> -Dipalmitoyl-3- <i>O</i> -benzyl-glycerol (5) .....	82
Figure S7. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of <i>rac</i> -1,2- <i>O</i> -Dipalmitoyl-glycerol (6) .....	83
Figure S8. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of <i>rac</i> -1,2- <i>O</i> -Dipalmitoyl-glycerol (6) .....	84
Figure S9. <sup>1</sup> H-NMR spectrum of <i>rac</i> -3-[(2-Oxido-1,3,2-oxazaphospholidin-2yl)oxy]propan-1,2-diyl dipalmitate (8) .....	85
Figure S10. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of <i>rac</i> -3-[(2-Oxido-1,3,2-oxazaphospholidin-2yl)oxy]propan-1,2-diyl dipalmitate (8) .....	85
<sup>1</sup> H-NMR spectrum of <i>rac</i> -1,2- <i>O</i> -Dipalmitoil-glicero-3-phosphoetanolamine (1) .....	86
Figure S12. <sup>13</sup> C-NMR spectrum of 1,2- <i>O</i> -Dipalmitoyl- <i>rac</i> -glycero-3phosphoethanolamine (1) .....	87
Figure S13. IR spectrum of <i>rac</i> -4-[(Benzyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane (3) .....	87
Figure S14. IR spectrum of <i>rac</i> -3-(Benzyloxy)propane-1,2-diol (4) .....	88
Figure S15. IR spectrum of <i>rac</i> -1,2- <i>O</i> -Dipalmitoyl-3- <i>O</i> -benzyl-glycerol (5) .....	89
Figure S16. IR spectrum of <i>rac</i> -1,2- <i>O</i> -Dipalmitoyl-glycerol (6) .....	90
Figure S17. IR spectrum of <i>rac</i> -3-[(2-Oxido-1,3,2-oxazaphospholidin-2yl)oxy]propan-1,2-diyl dipalmitate (8) .....	92
Figure S18. IR spectrum of <i>rac</i> -1,2- <i>O</i> -Dipalmitoyl-glycero-3-phosphoethanolamine .....	92
Figure S19. Mass spectrum of <i>rac</i> -4-[(Benzyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane (3) .....	93
Figure S20. HRMS data of <i>rac</i> -4-[(Benzyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane (3) .....	94
Figure S21. Mass spectrum of <i>rac</i> -3-(Benzyloxy)propane-1,2-diol (4) .....	94
Figure S22. HRMS data of <i>rac</i> -3-(Benzyloxy)propane-1,2-diol (4) .....	94
Figure S23. Mass spectrum of <i>rac</i> -1,2- <i>O</i> -Dipalmitoyl-3- <i>O</i> -benzyl-glycerol (5) .....	95
Figure S25. HRMS data of <i>rac</i> -1,2- <i>O</i> -Dipalmitoyl-glycerol (6) .....	96

Figure S26. Mass spectrum of <i>rac</i> -3-[(2-Oxido-1,3,2-oxazaphospholidin-2-yl)oxy]propan-1,2-diyldipalmitate (8) .....	96
Figure S27. HRMS data of <i>rac</i> -3-[(2-Oxido-1,3,2-oxazaphospholidin-2-yl)oxy]propan-1,2-diyldipalmitate (8) .....	97
Figure S28. Mass spectrum of <i>rac</i> -1,2-O-Dipalmitoyl-glycero-3-phosphoethanolamine (1) .....	97
Figure S29. HRMS data of <i>rac</i> -1,2-O-Dipalmitoyl-glycero-3-phosphoethanolamine (1).....	98

## RESUMEN

### Introducción

El surfactante pulmonar (SP) es una mezcla de proteínas y lípidos, en su mayoría fosfolípidos, que le confieren su función principal de reducir la tensión superficial y disminuir el trabajo respiratorio. En el laboratorio, se ha probado el efecto antifibrosante de un beractant enriquecido con fosfatidiletanolamina, ambos de origen comercial. Este trabajo tiene como objetivo extraer un surfactante de origen porcino (SPP) y una 1,2-dipalmitoil-*rac*-glicero-3-fosfatidiletanolamina (PE) obtenida por síntesis orgánica, evaluar su composición, esterilidad y biofísica, y probar su efecto en procesos asociados a fibrosis en modelos *in vitro* e *in vivo*.

### Metodología

Se realizó la extracción orgánica del SPP con (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O) de lavados pulmonares. Se evaluó la composición del SPP mediante cromatografía de capa fina (TLC), la medición de fósforo, la detección de proteínas hidrofóbicas con Western blot SP-B y SP-C, análisis microbiológico y propiedades termodinámicas con calorimetría. La evaluación biofísica se llevó a cabo con la balanza de Langmuir y el surfactómetro de burbuja cautiva. Se realizó la síntesis orgánica de PE a partir de glicerol protegido. El efecto del SPP-PE a las 24 y 48 horas fue evaluado en fibroblastos de pulmón humano normal (FPHN) con WST-1, citometría de flujo (anexina V y Yoduro de propidio) y RT-PCR para medir la expresión de COL1A1. En un modelo murino de bleomicina se evaluó la cantidad de hidroxiprolina y la cantidad de colágeno presente en tejido teñido con tricrómica de Masson y analizado con un software de inteligencia artificial llamado Orbit Imagen.

### Resultados

Se obtuvo un SPP con buena actividad biofísica; las pruebas microbiológicas fueron negativas y se detectó la presencia de SP-B y SP-C. Se logró una ruta de síntesis orgánica de seis pasos para la obtención de PE. El SPP-PE disminuyó la proliferación celular, indujo apoptosis y redujo la expresión de colágeno en FPHN. Además, el SPP-PE disminuyó la cantidad de hidroxiprolina y de colágeno presente en el tejido pulmonar de ratones con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

## **Conclusión**

En conclusión, este estudio demostró que el SPP y la PE obtenida por síntesis orgánica, conocidos como SPP-PE, presentaron una actividad biofísica satisfactoria, confirmada por pruebas microbiológicas y la detección de proteínas clave SP-B y SP-C. El SPP-PE mostró efectos antifibróticos al disminuir la proliferación celular, inducir apoptosis y reducir la expresión de colágeno FPHN. Además, en un modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, el SPP-PE redujo la cantidad de hidroxiprolina y colágeno en el tejido pulmonar. Estos resultados respaldan el potencial terapéutico del SPP-PE en procesos asociados a la fibrosis pulmonar.



## ANTECEDENTES GENERALES

### SURFACTANTE PULMONAR

El SP es un complejo lipoproteico secretado por las células alveolares tipo II (CETII) que tiene la función de reducir la tensión superficial en la interfase aire-agua dentro del alveolo, optimizando el mecanismo de la respiración, evitando el colapso alveolar al final de la espiración (Akella & Deshpande, 2013; Echaide et al., 2017; Perez-Gil & Weaver, 2010).

El SP está compuesto por proteínas específicas conocidas como: la proteína del surfactante A (SP-A) tiene funciones inmunitarias (deMello et al., 1993), la proteína del surfactante B (SP-B) es de tipo hidrofóbica, esencial para la vida, su deficiencia es mortal en recién nacidos (Olmeda et al., 2013), la proteína del surfactante C (SP-C) es una proteína hidrofóbica que estabiliza la película tensioactiva sobre la superficie alveolar (Plasencia et al., 2001) y la proteína del surfactante D (SP-D) tiene funciones inmunitarias (Crouch et al., 1994), estas proteínas conforman el 10% (Borie et al., 2011; Guagliardo et al., 2018). El 90% del SP son lípidos que en su mayoría son fosfolípidos como: la fosfatidilcolina (PC) que es un lípido zwitteriónico que se encuentra a una concentración del 60-70%; también tiene fosfolípidos aniónicos como el fosfatidilglicerol (PG) y el fosfatidilinositol (PI) de un 8-15%, una importante fracción está compuesta de lípidos neutros como el colesterol en un 8-10% (Zuo et al., 2008). La fosfatidiletanolamina (PE) es otro fosfolípido zwitteriónico que se encuentra en un 3% y el resto de los lípidos como la esfingomielina constituyen un 4% (Parra & Pérez-gil, 2015).

#### Fosfatidiletanolamina

La PE es un fosfolípido que contiene un pequeño diámetro de cabeza polar en proporción a sus cadenas de ácidos grasos, está compuesto por un glicerol esterificado en los hidroxilos *sn-1* y *sn-2* por dos ácidos grasos, y en el hidroxilo en *sn-3* con un grupo fosfato que, a su vez, se esterifica con el aminoalcohol etanolamina, el cual es un derivado del etanol (Calzada et al., 2016; Yao et al., 2009). La PE tiene mayoritariamente ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico en la posición *sn-1* y un ácido graso poliinsaturado de cadena larga, como el ácido araquidónico, en posición *sn-2* (Calzada et al., 2016b). Químicamente es conocida como: 1,2-dipalmitoil-*rac*-glicero-3-fosfatidiletanolamina (van

der Veen et al., 2017). La presencia de un carbono asimétrico hace que la molécula pueda presentarse como dos enantiómeros (Allinger, 1976). A nivel biológico la PE es sintetizada a través de descarboxilación, en este proceso que requiere la translocación de fosfatidilserina (PS) desde el retículo endoplásmico a la mitocondria donde la PS es descarboxilada por la fosfatidilserina descarboxilasa (PSD) localizada en el interior de la membrana mitocondrial para obtener PE (Kainu et al., 2013).

La PE está involucrada en procesos biológicos importantes, además, de ser parte de la membrana plasmática y del SP (Raja, 2011). Los experimentos *in vitro* han demostrado que la PE puede formar curvaturas en la membrana, los lípidos que pueden formar tales estructuras aumentan la superficie de la membrana y facilitan la activación de las proteínas (Tuck, 2011; Vance & Tasseva, 2013). Otra de las propiedades de la PE es que puede interactuar con proteínas del SP tales como SP-B y SP-C ambas hidrofóbicas, facilitando la adsorción de SP en una interfase aire-agua dentro del alveolo (Chavarha et al., 2010). En una célula viable la PE se encuentra en mayor concentración en el interior de la cara citosólica de la membrana (Cheng et al., 2012). En la activación de los mecanismos de apoptosis PE y PS, son translocadas por flipasas a la superficie de la membrana plasmática, constituyendo un marcador de apoptosis (Vance & Tasseva, 2013).

### **Biofísica del surfactante pulmonar**

La biofísica del SP se enfoca en cómo las proteínas y lípidos interactúan reduciendo la tensión superficial en los alvéolos, permitiendo la expansión y previniendo el colapso de los pulmones (Sosnowski et al., 2017). Las moléculas de lípidos crean una capa en la interfaz aire-líquido, disminuyendo la tensión superficial (Li et al., 2023a). Las proteínas del SP regulan esta capa, promoviendo una distribución uniforme de surfactante y evitando la agregación (Batenburg & Haagsman, 1998; Li et al., 2023a). Además, las propiedades físicas de esta película, como la compresibilidad y la estabilidad, son fundamentales para la función respiratoria (Schürch et al., 2001). Por lo tanto, un SP debe cumplir con tres propiedades biofísicas importantes: 1) rápida adsorción en la interfaz aire/líquido alveolar del material secretado por las CETIII y su transferencia a la interfaz durante la inhalación, formando una película tensioactiva; 2) reorganización de la película interfacial durante la compresión interfacial que ocurre en la exhalación, lo que permite empaquetar

adecuadamente el SP, reduciendo aún más la tensión superficial en la interfaz a valores extremadamente bajos y evitando así el colapso de los alvéolos; y 3) difusión eficiente de los lípidos empaquetados para redistribuirlos lateralmente durante la expansión de la interfaz aire/líquido en la inhalación posterior (Autilio & Pérez-Gil, 2018; Cañadas et al., 2021; Casals & Cañadas, 2012; Pérez-Gil, 2008; Schürch et al., 2001).

La actividad biofísica del SP se evalúa a través de una serie de parámetros y técnicas que permiten determinar su efectividad en reducir la tensión superficial en los alvéolos pulmonares y, por lo tanto, su capacidad para facilitar la respiración. La medición de la tensión superficial implica evaluar en una interfaz de aire-líquido con y sin la presencia del SP, un menor valor de tensión superficial en presencia de SP esto indica una mejor actividad (Schürch et al., 2001). Las isotermas de compresión evalúan la capacidad del SP para disminuir la tensión superficial durante la expansión y compresión de los alvéolos (Cañadas & Casals, 2013). La microscopía de interfaz permite observar la película de SP en la interfaz aire-líquido y evaluar su uniformidad y estabilidad (Discher et al., 1999). La dinámica de la película del SP durante su reorganización durante la respiración y cómo afecta a la estabilidad alveolar (G. Li et al., 2023). El perfil de difusión en la superficie evalúa la difusión del SP a través de la película en la interfaz aire-líquido (Nakahara et al., 2013). La evaluación de la actividad biofísica del SP es esencial para comprender su eficacia en mantener los alvéolos pulmonares abiertos, reducir la tensión superficial y permitir una respiración eficiente. Estos estudios son cruciales para el desarrollo de terapias relacionadas con problemas pulmonares, como el síndrome de dificultad respiratoria en neonatos o enfermedades pulmonares en adultos (Autilio & Pérez-Gil, 2018; Echaide et al., 2017).

### **Patologías relacionadas con la disfunción del surfactante**

Se ha descrito patologías relacionadas con el SP, que son causa de alta morbimortalidad en neonatos y adultos (Echaide et al., 2017). Ejemplo de ello son las alteraciones en la disminución de la síntesis de SP, las cuales conducen a padecimientos como síndrome de distrés respiratorio (SDR) en niños y en adultos, esta enfermedad incrementa el trabajo respiratorio, disminuye el intercambio de gases, reduce la distensibilidad pulmonar, genera hipoxia y está asociada a otras complicaciones

(Calkovska et al., 2012; Echaide et al., 2017). Otra enfermedad es la proteinosis alveolar pulmonar (PAP), en la que se ha estudiado la acumulación de proteínas de SP en el alveolo obstruyendo el intercambio gaseoso y se pierde la función del SP (Akella & Deshpande, 2013). En la fibrosis quística y en las neumonías los niveles de SP están disminuidos, en especial la porción de las proteínas SP-A y SP-D que son parte del sistema inmune (Wright & Carolina, 2005). En enfermedades parenquimatosas difusas pulmonares, la deficiencia del SP conduce a procesos inflamatorios y anormalidades metabólicas. Este grupo de enfermedades engloba a la sarcoidosis, neumonitis por hipersensibilidad y la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) (Tlatelpa-Romero et al., 2022). En la FPI el contenido lipídico total del SP esta disminuido y aumentada la SP-A, esto nos podría dar un dato muy importante ya que la alteración del surfactante está fuertemente relacionando con el desarrollo de la enfermedad (Akella & Deshpande, 2013; Willis et al., 2005). Las mutaciones en proteína SP-C han sido identificadas como una causa de formas familiares de fibrosis (Wolters et al., 2014).

### **El surfactante como agente terapéutico**

El SP fue el primer fármaco desarrollado exclusivamente para el tratamiento de neonatos. En las últimas cuatro décadas, los avances en neonatología han llevado a un aumento significativo en la supervivencia de los bebés prematuros gracias a la aplicación del SP como terapia (Obladen, 2005). Las patologías que utilizan al SP como terapias son: el SDR, el síndrome de aspiración de meconio y neumonía neonatal (Halliday, 2017).

Con la nueva era de la tecnología se han desarrollado SP sintético y derivados de animales enriquecidos con péptidos que han resultado ser igual de efectivos que los SP derivados de animales, esto demostrado en un ensayo clínico de no-inferioridad probado en infantes prematuros. En términos de eficacia y seguridad resultaron ser útiles para la prevención y el tratamiento de SDR, además este tipo de SP brinda ventajas potenciales a la terapia con surfactante exógeno (Sinha et al., 2005). A pesar de que los SP sintéticos tienen buenos resultados, cuando se evalúa la presión positiva teleespiratoria (PEEP, por sus siglas en inglés) no se obtiene un resultado relevante, por lo tanto, las preparaciones de SP natural son más efectivas para estabilizar las vías respiratorias (Almlén et al., 2008).

Por último, aun se siguen investigando nuevas aplicaciones de SP en modelos animales y para otras patologías.

### **El surfactante en modelos murino**

El efecto terapéutico de SP se ha estudiado en modelos murino con lesiones pulmonares. Por ejemplo, en un modelo de lesión pulmonar aguda producido por la administración intravenosa de ácido oleico, se propuso como tratamiento la administración de SP en aerosol. Los resultados mostraron que el tratamiento de SP aumentó significativamente el contenido de fosfolípidos en el lavado broncopulmonar, mejoró la función pulmonar, redujo el edema pulmonar, disminuyó la concentración total de proteínas, además, de mejorar la lesión pulmonar y la supervivencia (Sun et al., 2009). En otro modelo de lesión pulmonar unilateral con la instilación de ácido clorhídrico del pulmón derecho, se probó el efecto del SP exógeno en ambos pulmones, en este estudio se evaluaron el intercambio de gases, la distensibilidad pulmonar y la inflamación broncoalveolar (células, albúmina y citocinas), se concluyó que el SP mejora el intercambio de gases y la distensibilidad del sistema respiratorio completo (Zambelli et al., 2015). En un modelo de fibrosis pulmonar con bleomicina se ha probado el efecto del surfactante pulmonar enriquecido con PE. Esta mezcla podría tener efectos protectores en una administración temprana durante el desarrollo de la fibrosis pulmonar (Vazquez-de-Lara et al., 2018a).

En resumen, estos estudios nos demuestran el potencial terapéutico del SP para su uso en otras patologías podría ser utilizado en humanos.

### **El papel del surfactante en la fibrosis pulmonar idiopática**

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) pertenece a un grupo de enfermedades conocidas como neumonías intersticiales difusas del pulmón que albergan características en común (Antoniou et al., 2014). La FPI se caracteriza por la restricción pulmonar del intercambio gaseoso de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, el deterioro del intercambio gaseoso en el peor de los casos causa la muerte de los pacientes después de los 5 años de haberse diagnosticado la enfermedad. Las manifestaciones clínicas que presentan los pacientes con FPI son disnea, tiros intercostales, tos no productiva, crepitaciones respiratorias e hipocratismo (Y. M. Liu et al., 2017; Urzua et al., 2012; Wolters et al., 2014).

Para pacientes con reciente diagnóstico de FPI se han identificado niveles aumentados de SP-A (Phelps et al., 2004), así como alteración en la concentración de los fosfolípidos del SP (Günther et al., 2012), pero aún se desconoce si este hallazgo es causa o efecto de la enfermedad. De la misma forma han sido asociados los niveles de la SP-D con el deterioro de la función pulmonar para la FPI (Madhukaran et al., 2015). Algunos estudios han asociado mutaciones del gen de la SP-C con formas familiares de FPI (Chroneos et al., 2010).

La FPI es una enfermedad que aún no tiene descrita su etiología. Sin embargo, se caracteriza por la proliferación de fibroblastos y la remodelación extracelular de la matriz, que deriva en una distorsión irreversible de la arquitectura del pulmón. Los mecanismos patogénicos aún no se han determinado (Feghali-Bostwick et al., 2007; Wang et al., 2014; Wilson & Wynn, 2009). Tradicionalmente, se ha pensado que la FPI es precedida y provocada por un proceso inflamatorio crónico que daña los pulmones, lo que lleva a la etapa terminal de la cicatrización fibrótica (Urzua et al., 2012). Actualmente, se piensa que más que consecuencia de un proceso inflamatorio crónico, se pudiera tratar de un trastorno de la reparación tisular (Pardo & Selman, 2021).

## ANTECEDENTES ESPECIFICOS

El uso de SP exógeno es una opción terapéutica estándar en las patologías neonatales y aún siguen realizando pruebas para su uso en otras patologías pulmonares. Los surfactantes exógenos han sido ampliamente estudiados en modelos animales y ensayos clínicos por su potencial terapéutico (El-Gendy et al., 2013).

El SP es un compuesto de proteínas y lípidos, la interacción entre sus componentes determinará su adecuada función biofísica esencial para reducir la tensión superficial en los alvéolos, permitiendo la expansión pulmonar y evitando el colapso. Su biofísica se centra en la interacción entre lípidos y proteínas, lo que disminuye la tensión superficial al formar una película en la interfaz aire-líquido (Li et al., 2023).

Se ha descrito que alteraciones en su composición se asocian con diversos procesos patológicos, como la FPI. En esta enfermedad, la proteína SP-A se encuentra aumentada y la concentración de lípidos disminuida (Akella & Deshpande, 2013; Phelps et al., 2004).

En estudios previos se probó el efecto del surfactante y la SP-A en fibroblastos de FPHN, se observó que el SP aumentó la colágenasa-1, disminuyó la colágena I e indujo apoptosis en FPHN, con la preparación del SP mezclado con SP-A no se observaron los mismos resultados, la conclusión de este trabajo sugirió que al no ser las proteínas que inducen la colágenasa-1 y la disminución de colágena I, podrían ser algún otro de los componentes como los lípidos del SP los que estarían induciendo este efecto (Vazquez-De-Lara et al., 2000).

Posteriormente, se estudió el efecto de los fosfolípidos del SP, para determinar si alguno de ellos podría estar induciendo la modificación de la expresión de colágena en cultivos de FPHN. Estos fosfolípidos fueron el PC, PG y PE; la PE principalmente disminuyó significativamente la expresión de colágena, además de inducir una señal de calcio intracelular asociada con apoptosis y también se determinó que actúa de manera dosis dependiente. La subespecie de PE que se ha empleado es 1,2-dipalmitoil-*rac*-glicero-3-fosfatidiletanolamina. En el modelo *in vivo* de fibrosis pulmonar se probó el efecto del SP enriquecido con PE y PE. Los resultados mostraron disminución de la concentración de colágena presente en el tejido y al igual en análisis histopatológico se corroboró este

efecto en las lesiones pulmonares causadas por bleomicina (Vazquez-de-Lara et al., 2018).

En el laboratorio se ha trabajado con el efecto que tiene el SP sobre distintos modelos fibróticos tanto *in vivo* como *in vitro* y en ellos se demostró que induce un fenotipo antifibrosante. Esto es importante ya que en FPI, la producción excesiva de colágeno es producida por el crecimiento anormal de fibroblastos, lo que da lugar a tejido fibrótico en los pulmones y esta enfermedad aún no tiene un tratamiento efectivo (Wolters et al., 2014).



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El SP es crucial para la función pulmonar óptima durante toda la vida. Una ausencia, deficiencia o anormalidades en la composición del SP puede conducir a la dificultad respiratoria o fibrosis pulmonar. La disfunción del SP y la enfermedad subyacente no siempre se comprende bien, en el caso de la FPI no tiene un tratamiento efectivo y su etiología no está clara. Lo que se conoce es que varios mecanismos patogénicos participan en el desarrollo de la FPI como la activación de fibroblastos y la deposición de colágena que conducen a la fibrosis pulmonar, el uso de SP exógeno enriquecido con PE puede ser una opción terapéutica por su potencial efecto antifibrosante. Se cuenta con estudios previos sobre el efecto terapéutico antifibrosante del SP enriquecido con PE, ambos de origen comercial. Sin embargo, esta mezcla terapéutica no puede ser comercializada, por tal motivo se propone obtener un SP de origen porcino obtenido por lavado pulmonar y enriquecerlo con una PE obtenida por síntesis orgánica para probar su efecto terapéutico en distintos modelos.

¿Cuál es el efecto del surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina en procesos asociados a la fibrosis?

## JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio se ha proporcionado evidencia de que el SP beractante, regula a la baja la expresión de colágeno, aumenta la expresión del gen de colagenasa e induce apoptosis en FPHN. También se tiene la evidencia de que la PE de uso comercial, disminuye la expresión de colágeno e induce apoptosis *in vitro*. Además, tanto el surfactante enriquecido con PE como la PE sola atenúan la fibrosis pulmonar en el modelo de bleomicina de fibrosis pulmonar en ratones. Por lo tanto, ya se tiene evidencia de que en distintos modelos biológicos el SP enriquecido con la PE tiene efectos antifibrosantes; sin embargo, es importante realizar la elaboración de un SP con sus respectivas pruebas biofísicas en el laboratorio para probar su efecto antifibrosante en los modelos *in vivo* e *in vitro*. Esto con la finalidad de elaborar un fármaco, que además de propiedades tensioactivas, cuente con efectos terapéuticos antifibrosantes.

## HIPÓTESIS

El surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina tiene efecto antifibrosante.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina en procesos asociados a la fibrosis

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Obtener SPP por medio de lavados pulmonares de cerdo.
2. Realizar análisis químico, microbiológico y pruebas biofísicas del surfactante pulmonar de cerdo.
3. Realizar la síntesis orgánica de PE por medio de esterificación.
4. Evaluar el efecto del SPP y PE en la proliferación, apoptosis y expresión de colágena-1 de FPHN.
5. Evaluar el efecto del SPP y PE en un modelo murino de fibrosis pulmonar con bleomicina.

## **INFRAESTRUCTURA FÍSICA Y HUMANA**

### **Recursos humanos**

Se contará con el apoyo de investigadores especialistas en su área y la alumna de doctorado:

- D. en C. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros
- D. en C. Criselda Mendoza Milla
- D. en C. María Guadalupe Hernández Linares
- D. en C. Yair Romero López
- D. en C. Jesús Pérez-Gil
- D. en C. Olga Cañadas
- D. en C. David Atahualpa Contreras Cruz

### **Recursos materiales**

Laboratorio de Medicina Experimental de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Laboratorio de Síntesis de Fármacos, Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, Facultad de Estudios Superiores.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid.

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma México.

**Recursos financieros**

Los recursos se obtendrán de las diferentes convocatorias establecidas para tal fin.

**ASPECTOS ETICOS**

**Bioética**

Este protocolo fue realizado considerando los principios asentados en la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, el Código de Núremberg, la Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM-012-SSA3-2007) y la declaración de Helsinki ajustándose a dichos principios científicos y éticos, así como la Norma Oficial Mexicana NOM-062- ZOO-1999 para el manejo de animales en el laboratorio y los lineamientos establecidos por el Bioterio Central de la BUAP y los principios básicos de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

Acorde al título 3 y 14 de la Ley general de Salud en Materia de Investigación (LGSMI) contribuirá al conocimiento de procesos biológicos y vínculos entre causa y enfermedad; y está siendo realizada por profesionales de la salud bajo la responsabilidad de una institución. Los resultados se publicarán con exactitud, tal y como lo exige el artículo 9 de la declaración de Helsinki. El manejo de productos biológicos será conforme al artículo 77 de la declaración de Helsinki y la NOM-007-SSA3-2011 para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. Fueron tomados en cuenta los principios de beneficencia, no maleficencia y justicia para la elaboración de este protocolo y se procurará la selección de sujetos que lleve a resultados válidos y benéficos para la sociedad.

El empleo de animales se llevará a cabo con un propósito científico debidamente justificado, evitando cualquier forma de crueldad y asegurando su bienestar. Se les proporcionará un cuidado adecuado y respetuoso en todo momento, y su utilización se

limitará exclusivamente a situaciones en las que los estudios previos realizados en fibroblastos humanos justifiquen su necesidad.

## **Consideraciones de bioseguridad**

Se considerarán todas las medidas de bioseguridad establecidas en la NORMA Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos y la Ley General de Salud. El laboratorio donde se procesarán las muestras contará con campana de bioseguridad y todo el personal del laboratorio adoptará las medidas preventivas para su protección en el almacenamiento, transporte y manejo de sustancias tóxicas o residuos peligrosos biológico-infecciosos tomando en cuenta los requisitos establecidos en los numerales 2.1, 2.3, 2.4 y 2.5 de dicha Norma.

Conforme el decreto por el que se reforman, adiciona y derogan diversas disposiciones del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud ARTÍCULO 14. Se adaptará a los principios científicos y éticos que justifican la investigación médica, especialmente en lo que se refiere a su posible contribución a la solución de problemas de salud y al desarrollo de nuevos campos de la ciencia médica. Se contará con el consentimiento informado del sujeto en quien se realizará la investigación, o de su representante legal, en caso de incapacidad legal de aquél, en términos de lo dispuesto por este Reglamento y demás disposiciones jurídicas aplicables; Se contará con el dictamen favorable de los Comités de Investigación, de Ética en Investigación y de Bioseguridad, en los casos que corresponda a cada uno de ellos, de conformidad con lo dispuesto en el presente Reglamento y demás disposiciones jurídicas aplicables.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### DISEÑO DEL ESTUDIO

---

Por el objetivo general.	Comparativo
Por la asignación de la maniobra.	Experimental
Por la dirección temporal	Transversal
Por la recolección de los datos.	Prospectivo

---

### CRITERIOS DE SELECCIÓN:

#### MODELO *IN VITRO*

***Criterios de inclusión:***

Pacientes con diagnóstico de muerte cerebral (donadores de riñón o multiorgánicos), mayores de edad.

Que se cuente con el consentimiento informado de uno de los familiares.

Que no tenga antecedente de enfermedades pulmonares.

***Criterios de exclusión:***

Cultivo celular primario que no llegue a confluencia.

***Criterios de eliminación:***

Que al realizar el análisis histopatológico presente alguna enfermedad pulmonar que no haya sido reportada en el expediente.

#### MODELO *IN VIVO*

***Criterios de inclusión:***

Ratones macho de la cepa C57/BL, adultos de 6 semanas de edad, con un peso promedio de 20 g.

***Criterios de exclusión:***

Ratones que presenten alopecia por hongos

***Criterios de eliminación:***

Ratones que mueran durante los procedimientos

**Tabla 1. Variables de medición**

Modelo	Variable	Tipo de variable	Instrumento de Medición o técnica	Valor
Surfactante pulmonar	Concentración de proteínas	Nominal	Análisis SD-PAGE y Western Blot	Presente o ausente
	Fosforo	Numérica continua	Absorbancia	mg/mL
	Propiedades termodinámicas	Numérica continua	Calorímetro	Cp (kcal/mol °C)
	Interfaz de superficie	Numérica continua	Balanza de Lagmuir	Tensión superficial (mN/m)
	Monocapa	Ordina	Balanza de Lagmuir	Tensión superficial (mN/m)
	Tensión superficial	Numérica continua	Surfactómetro de burbuja cautiva	Tensión superficial (mN/m)
Ratones C57/BL	Concentración de colágena en tejido	Numérica continua	Lector de ELISA	Absorbancia (550 nm)
	Proporción de tejido fibrótico	Numérica continua	Software Orbit	Porcentaje de tejido dañado
Fibroblastos	Apoptosis	Numérica continua	citometría de flujo	Porcentaje de células vivas, en apoptosis temprana y en apoptosis tardía
	Proliferación	Numérica continua	Kit de WST-1	Absorbancia (450 nm)
	Expresión de colágena	Numérica continua	RT-PCR	Delta-2Ct

## METODOLOGÍA GENERAL

### Procesamiento del lavado pulmonar de cerdo

Se obtuvieron pulmones de cerdo adquiridos de particulares con las siguientes características (sin laringe, sin corazón y sin lesión del tejido). El par de pulmones se colocó en una campana de extracción de gases de manera extendida. Para proseguir con el lavado se colocó 1 L de solución salina al 0.09% en un Kitasato estéril con un tapón de caucho y una pipeta de 5 mL. Se introdujo en la tráquea una manguera de caucho (que quedó aproximadamente a dos cm de la carina y se sujetó con un hilo). Se conectó el Kitasato a una bomba de vacío para generar vacío dentro del Kitasato y la solución salina llenó los pulmones; una vez que se llenaron, se reconectó la bomba para que succionara la solución salina introducida. Durante el retorno se masajeó los pulmones suavemente (este paso se repitió tres veces). El lavado obtenido se centrifugó a 3,500 rpm por 5 minutos para eliminar desechos celulares en frascos de polipropileno de 250 mL. Después,



se decantó y recolectó el sobrenadante en frascos de 200 mL y se centrifugó a 9,000 rpm por 30 min. Los sobrenadantes se desecharon y los pellets se recolectaron hasta obtener uno. Posteriormente se pesó el pellet obtenido al final. Inmediatamente se añadió H<sub>2</sub>O desionizada estéril para mantener una relación de 80 mL de agua por cada 50 g de pellet. Se procedió a calcular el sistema de solventes requerido de acuerdo con el peso del pellet. El primer sistema de solventes se preparó con una mezcla de metanol: cloroformo (2:1). Después se agitó la mezcla por 30 minutos con la ayuda de una plancha magnética. Posteriormente se filtró la mezcla en un embudo de Buchner de 50 mm con un papel filtro humedecido y se colocó previamente en el Kitasato de 250 mL para quitar el exceso de agua. El siguiente paso consistió en la preparación de un segundo sistema de solvente con metanol-cloroformo-agua; CH<sub>3</sub>OH: CHCl<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O (2:1:0.8) para lavar el papel filtro usado. Se realizó una segunda filtración en el embudo de Buchner. El tercer sistema de solventes fue una mezcla de cloroformo-agua (2:1) que se vertió en el Kitasato con la mezcla filtrada. Posteriormente se colocó la mezcla obtenida en un embudo de separación de 250 mL. El embudo se dejó en un soporte de anillo toda la noche. Pasado este tiempo se recolectó la parte clorofórmica en un vaso precipitado estéril de 50 mL y se vertió en un tubo cónico graduado con tapa. Se evaporó el cloroformo en una cámara de nitrógeno hasta gelatinización. Se agregaron 20 volúmenes de acetona fría, se mantuvo la suspensión en hielo. Se centrifugó a 1,500 rpm por 1 minuto, se desechó el sobrenadante. Se evaporó completamente la parte clorofórmica-acetona y el sedimento fue despegado con una espátula fina. Se agregó solución de NaCl-CaCl<sub>2</sub> (100 mM, 5 mM) de acuerdo con la relación de 25 mg/mL. Se sondeó la mezcla hasta obtener una mezcla homogénea. El paso final consistió en esterilizar la mezcla obtenida con la técnica de Flash (120°C por 10 min) en la autoclave (Vázquez de Lara-Cisneros & Iturbide Flores, 1998).

### **Determinación de fosfolípidos**

La determinación de fosfolípidos se realizó con el kit de detección de PC que es el lípido más abundante del SP (ab234050, phospholipid Assay Kit, Colorimetric/Fluorometric). Se siguieron las instrucciones del fabricante.

### **Determinación de fósforo**

Se realizó una dilución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 mg/mL) que se diluyó 1/20 para obtener una concentración final de 0.05 mg/mL. Esta dilución correspondió a la curva de calibración por duplicado con: 0, 10, 40, 70, 100, 250, 400 mg/mL. Las muestras se colocaron con 99  $\mu\text{L}$  con  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$  (1:2) y 1  $\mu\text{L}$  de la muestra de SPP. La curva de calibración y las muestras se colocaron en un baño de arena a 250 °C, hasta que se esperó su evaporación. Después, se agregaron 450  $\mu\text{L}$  de  $\text{HClO}_4$  a la curva y a los tubos de las muestras, y se incubaron los tubos en el baño de arena a 250 °C, tapados con ampollas de vidrio, durante 30 minutos. Se agregaron 3.5 mL de agua desionizada, 500  $\mu\text{L}$  de molibdato amónico al 2.5%, y 500  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico al 10%. Se agitaron todos los tubos en el vortex. Se incubaron los tubos en baño María a 100°C durante 7 minutos. Por último, se colocaron los tubos en agua con hielo para enfriarlos. Se realizó la lectura a 820 nm.

### **Estudio microbiológico**

Se tomaron muestras en alícuotas de 500  $\mu\text{L}$ . Se incubarán a 37°C por siete días y posteriormente se colocarán en agar sangre de carnero y agar McConkey para bacterias aerobias, en agar sangre fenietialcohol y tioglicolato caldo para bacterias anaerobias, en medio Lowenstein-Jensen para micobacterias y por último en medio Sabouraud agar para hongos.

### **Determinación de las proteínas SP-B y SP-C por electroforesis**

Se realizó la preparación de geles de acrilamida al 16% de 10 pocillos en los cuales se colocaron muestras por duplicado de 5, 10 y 15  $\mu\text{g}$  con  $\beta^+$  y  $\beta^-$ . El gel al 16% fue preparado con 2.5mL de Tris HCl 1.5 M pH 8.8, 5.33 mL de acrilamida 30% Bis 0.8%, 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{L}$  DE SDS 100%, temed 5  $\mu\text{L}$  y 50  $\mu\text{L}$  de APS 10%. Para el gel de *stacking* se preparó acrilamida al 4% con: 0.75 mL de Tris HCl 0.5 M pH 6.8, 0.4 mL de acrilamida 30% Bis 0.8%, 1.83 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , 30  $\mu\text{L}$  DE SDS 100%, temed 3  $\mu\text{L}$  y 30  $\mu\text{L}$  de APS 10%. La polimerización tardó 10 minutos. Las muestras fueron corridas con buffer de

carga al 1x se añade SDS 1 g; 6,25 mL Tris 0,5M pH 6,8; 5 mL glicerol; 300  $\mu$ L azul de bromofenol al 5%, en una cámara de electroforesis.

### ***Tinción de plata***

El gel obtenido de la electroforesis se sumergió en una solución fijadora durante 30 minutos, la cual consistía en 200 mL de EtOH, 50 mL de ácido acético y 500 mL de agua. Luego, se sumergió en una solución sensibilizadora compuesta por 150 mL de EtOH, 2.5 mL de glutaraldehído, 1 g de tiosulfato de sodio, 34 g de acetato de sodio y 500 mL de agua. Posteriormente, el gel se lavó tres veces con agua, con intervalos de 5 minutos entre cada lavado. Después, se sumergió en una solución de plata que contenía 0.5 g de nitrato de plata, 200  $\mu$ L de formaldehído y 500 mL de agua durante 20 minutos. Se recuperó la solución de plata y el gel se sumergió en agua, seguido de una solución de paro durante 10 minutos, que consistía en 7.3 g de EDTA y 500 mL de agua.

### ***Western blot***

Se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF (Bio-Rad) mediante un sistema de transferencia en la cámara de electroforesis a 300 mA durante 1 hora. Se emplearon anticuerpos primarios, que incluyeron un SP-B antihumano de conejo diluido a una proporción de 1:5000 (WRAB48604, de SevenHills Bioreagents), así como un SP-C antihumano de conejo diluido en la misma proporción (WRAB-76694, de SevenHills Bioreagents).

### **Análisis de las propiedades tensioactivas**

#### ***Experimentos de monocapas***

Los experimentos de monocapas se llevaron a cabo en una balanza de Langmuir termostatazada. Se realizaron múltiples ciclos de compresión-expansión para evaluar los cambios en la presión superficial ( $\pi$ ) en relación con las isotermas de área y la compresión-expansión cíclica continua. La balanza de Langmuir dispone de un área total de 195 cm<sup>2</sup> y opera con equilibrio de película de barrera de cinta 302RB (NIMA Technologies, Coventry, Reino Unido), fue utilizada en todas las condiciones experimentales, que se mantuvieron a 25°C.

Para obtener isotermas de área de  $\pi$ , se formaron monocapas de SPP-PE en diferentes proporciones (1/0.1, 1/0.3, 1/0.5, 1/0.5, 1/1, 0/1). Se inyectaron 30  $\mu\text{L}$  de soluciones orgánicas lipídicas en una subfase de solución de NaCl/CaCl<sub>2</sub> (100 mM/5 mM). Luego, se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de una preparación de SPP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y PE (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con una jeringa Hamilton de 100  $\mu\text{L}$ . Se permitió que los disolventes se evaporaran durante al menos 10 minutos antes de iniciar la compresión de la monocapa a una velocidad de 50  $\text{cm}^2/\text{min}$ . Para todas las isotermas, se aseguró una distribución equitativa de moléculas de fosfolípidos en la interfaz.

#### **Medición de la tensión superficial con un surfactómetro de burbuja cautiva**

El SP-PE fue evaluado a 37°C. La cámara del surfactómetro contenía Tris-HCl 5 mM, pH 7, NaCl 150 mM y sacarosa al 10%. Después, de que se hubiera formado una pequeña burbuja de aire (0,035–0,040  $\text{cm}^3$ ), aproximadamente 150 nL de surfactante (10  $\text{mg}/\text{mL}$ ) se depositaron debajo de la superficie de la burbuja con un capilar transparente. Luego de la introducción del tensioactivo, se controló el cambio en la tensión superficial ( $\gamma$ ) durante 5 minutos a partir de las alteraciones en la forma de la burbuja. La cámara se selló y la burbuja se expandió rápidamente (en 1 segundo) hasta alcanzar un volumen de 0.15  $\text{cm}^3$ , para registrar la adsorción posterior a la expansión. Cinco minutos después de la expansión, comenzaron los ciclos cuasiestáticos, en los cuales inicialmente se redujo el tamaño de la burbuja (al 20% de su volumen anterior) y luego se amplió gradualmente. Se mantuvo un retraso de 1 minuto entre cada uno de los cuatro ciclos cuasiestáticos y se añadió un retraso adicional de 1 minuto antes de iniciar los ciclos dinámicos, en los que la burbuja se varió continuamente a una velocidad de 20 ciclos por minuto.

#### **Obtención de los fibroblastos de pulmón humano normal**

Se obtuvieron por donación de tejido pulmonar en pacientes de cualquier sexo y edad, con diagnóstico de muerte cerebral secundaria a cualquier causa, programados para donación de órganos, sin antecedente de patología pulmonar, tabaquismo, alergia o atopia reportado por la historia clínica en el expediente, cuyo resultado histopatológico de biopsia pulmonar se había reportado como normal. Para la obtención del tejido, se solicitó a los familiares la firma del consentimiento informado.

### **Preparación de medio de cultivo de fibroblastos**

Se hizo previa asepsia del material y radiación en UV por 1 hora. En un vaso de precipitado en el agitador magnético con 900 mL de agua desionizada esterilizada, se administraron los componentes en el siguiente orden: Nutrimix Ham F-12, bicarbonato de sodio 1.176 g y 10 mL de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma Cat: P0781). Se ajustó el pH de la solución a 7.4, con el potenciómetro, previamente calibrado. Posteriormente se filtró con técnica estéril conectando el equipo de filtración al succionador. Para preparar medio con suero fetal bovino (SFB), a la dilución deseada se agregó el SFB para ser filtrado en el medio de la misma forma, previa inactivación del SFB.

### **Técnica para la propagación de líneas celulares**

Una vez que las células estuvieron en confluencia de más del 80%, se propagaron con HAM F-12 (Sigma Cat: N6760) mediante técnica estéril, y se expusieron al material en rayos UV durante 30 minutos. Se retiró el medio HAM F-12 con SFB y posteriormente se aplicaron 2 mL de tripsina-EDTA 1X (Sigma Cat: T3924). Las células se incubaron durante 2 minutos y se observó al microscopio para verificar que se desprendieran de la superficie, realizando movimientos suaves de agitación para favorecer el desprendimiento de las células. Luego, se inactivó esta reacción con medio HAM F-12 con SFB al 10%, se resuspendió el contenido y se transfirió a un tubo de 50 mL. Se centrifugó a una temperatura de 37°C, a 1800 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, se aspiró el sobrenadante, dejando solo el pellet. Luego se agregaron 10 mL de medio HAM F-12 con SFB al 10% y se resuspendió. Las células se distribuyeron en dos cajas T-25 en partes iguales. Se cambió el medio cada tercer día hasta que las células alcanzaron una confluencia temprana de más del 80% para volver a ser propagadas exponencialmente. Para verificar que la población de células con las que se trabajó eran fibroblastos, se determinó la proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1).

### **Técnica para congelación de fibroblastos**

Para congelar, se extrajo el medio de cultivo de las cajas y se adicionó 1-2 mL de tripsina 1 durante 2 minutos. Bajo la visión en el microscopio invertido, se observó que las células se desprendieron de la superficie de la caja. Una vez que se despegaron de la superficie, se agregaron 2 a 4 mL de medio Ham F-12 con SFB al 10% para inactivar la tripsina. Las células se transfirieron a un tubo de 50 mL y se centrifugaron a 1,800 rpm

durante 10 minutos. Se extrajo cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 mL de SFB y 100  $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfóxido Sigma Cat: D2650). Las células se colocaron en un criotubo para ser almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 1 día y posteriormente se conservaron en nitrógeno líquido para su criopreservación.

#### **Medición de apoptosis con citometría de flujo**

Los FPHN fueron sembrados en placas de 24 pozos a una densidad de 50,000 cel/mL. La evaluación de la apoptosis se realizó con anexina-V (ThermoFisher, A13199), yoduro de propidio (ThermoFisher, P3566), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La medición de la apoptosis por citometría se realizó con el equipo (CytoFlex de Beckman Coulter).

#### **Técnica para la medición de proliferación de fibroblastos**

La técnica de proliferación se realizó utilizando el reactivo WST-1 (sales de tetrazolio/formazan). Se cuantificaron las células con la cámara de Neubauer para determinar su concentración de cel/mL. Se llevó a cabo una curva de calibración con 62,500; 46,875; 31,250; 15,625; 7,813 células/cm<sup>2</sup> en medio Ham-F12 con SFB al 0.1% en una placa de 96 pozos. Para las condiciones experimentales, se sembraron 15,625 células/cm<sup>2</sup> en los pozos. Las células se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Se retiró el medio de cada pozo y se reemplazó por medio fresco, luego se agregaron 10  $\mu$ L de WST-1 previamente descongelado en un baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$ . La placa se incubó durante 2 horas y posteriormente se realizó la medición de absorbancia a 450 nm con un multilector (Sotf Max Pro, Molecular devices).

#### **Medición de la expresión de colágena**

Se realizó la extracción del material genético con solubilidad diferencial utilizando la preparación comercial de TRIzol (Ambion by Life Technologies No. Cat. 15596-026, 100 mL), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se retiró el medio y se homogeneizaron inmediatamente los cultivos con el reactivo en 1 mL de TRIzol por pozo, y se incubaron durante 5 minutos para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos. Luego, se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL libres de RNAsas. Se añadieron 500  $\mu$ L de cloroformo por cada mL de TRIzol y se agitó vigorosamente durante 15 segundos en un vortex. Después, se mantuvo en hielo durante 3 minutos. Las muestras

se centrifugaron a 12,000 g durante 15 minutos a 4°C. Luego, se colocó la fase acuosa de la muestra en tubos de 1.5 mL y se añadieron 0.5 mL de isopropanol, centrifugándolas a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C. Inmediatamente se decantó el sobrenadante de los tubos para dejar solo el botón y se agregó etanol al 75%. Las muestras se agitaron en un vortex y se volvieron a centrifugar a 7,500 g durante 5 minutos a 4°C. Luego, se volvieron a decantar las muestras y se secaron a temperatura ambiente, para posteriormente añadirles 10 µL de agua inyectable. La cantidad de RNAm se midió con un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Las muestras se almacenaron a -70°C.

Para la medición de la expresión genética, se utilizó 1 µg de RNAm. El cDNA se sintetizó mediante transcriptasa reversa del kit Thermo Scientific (RevertAid, H Minus First-Strand cDNA Synthesis Kit). Una vez sintetizado el cDNA, se procedió a realizar RT-PCR en tiempo real. Se preparó una solución por muestra de Master Mix de 5 µL, la sonda específica de la COL1A1 60x (Thermo Fisher Scientific No. Cat. Hs00164004\_m1) de 0.166 µL y 2.834 µL de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas, junto con 2 µL de la muestra de cDNA. Se utilizó el gen constitutivo de referencia Pol2A. Se corrieron las muestras por triplicado, tanto para el gen COL1A1 como para el gen constitutivo de referencia GPDH. Las muestras se procesaron y amplificaron en una placa de 96 pozos, utilizando un termociclador (Life Technologies QuantStudio Flex 7).

#### **Manejo y mantenimiento del modelo murino**

Para este trabajo de investigación se utilizaron ratones macho adultos de la cepa C57BL/6 con un peso promedio de 20 g y una edad de 6-8 semanas. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones de luz-obscuridad (12/12 horas) a una temperatura de 18-26°C. Se les proporcionó libre acceso a agua y comida durante el período de experimentación. El procedimiento de eutanasia se llevó a cabo con anestesia suministrada por el Bioterio Claude Bernard (ketamina/xilacina a una dosis de 0.1 U por 1 g de ratón vía intramuscular). Se procedió a la exanguinación de los ratones con una inyección de 5 mL de solución salina al 0.9% en el corazón, seguido de la sección de la aorta descendente. Esto se hizo con el propósito de limpiar el tejido de sangre y extraer los pulmones para su posterior análisis. Luego, los cadáveres se trasladaron al crematorio



del Bioterio Claude Bernard. El cuidado de los animales cumplió con las regulaciones mexicanas sobre la protección de animales utilizados con fines experimentales y otros con fines científicos, así como con las regulaciones establecidas en la NOM-062-ZOO-1999.

#### **Modelo murino de fibrosis pulmonar con bleomicina**

Se utilizaron ratones adultos de la cepa C57/BL machos con un peso promedio de 20 g. Antes de la administración de bleomicina, se anestesiaron con Ketamina/Xilacina a una dosis de 0.1 U por 10 g de ratón vía intramuscular. La administración de bleomicina se realizó por vía intratraqueal, con una dosis de 3 U/kg diluido en agua inyectable. Se efectuó un corte epitelial en el nivel de la tráquea para hacerla visible, retirando el músculo que la recubría con unas pinzas iris, y luego se inyectó en la tráquea con una jeringa de 1 mL. Al finalizar la administración intratraqueal, se suturó el tejido. Previo a la administración de bleomicina, se pasaron 0.5 mL de aire para limpiar las vías aéreas. El modelo murino tuvo una duración de 20 días, y una vez transcurrido este periodo, se procedió al sacrificio de los ratones. Los ratones fueron anestesiados con Ketamina/Xilacina, utilizando una dosis de 0.1 U por 10 g de ratón vía intramuscular. Posteriormente, se realizó un corte a nivel de la caja torácica para cortar el esternón, llevar a cabo la exanguinación y la extracción del tejido pulmonar. Los cadáveres de los ratones se colocaron en una bolsa amarilla para su posterior traslado al Bioterio Claude Bernard.

#### **Medición de colágena por medio de hidroxiprolina**

Se llevó a cabo la extracción del pulmón derecho, el cual se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes de iniciar la extracción de colágeno en el tejido, se pesaron los pulmones en una balanza analítica. Cada pulmón se colocó en un tubo de vidrio con tapa y se carbonizó en un horno a  $100^{\circ}\text{C}$  durante al menos 10 días. Luego, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de HCl 6N a cada muestra y se mantuvieron en el horno a  $110^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Todas las muestras se transfirieron a nuevos tubos y se ajustaron a un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  con HCl 6N.

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 20 minutos. En una placa de lectura de 96 pozos, se colocó 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se generó una curva estándar de hidroxiprolina utilizando una solución estándar de trabajo de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Tanto las muestras como la curva estándar se dispusieron por triplicado.



Después de la preparación de las muestras, la placa se introdujo en un horno a 80°C dentro de la campana de extracción y se incubó durante 15 minutos, hasta que el líquido se evaporó. Luego, a cada muestra se le añadieron 100 µL de cloramina T y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 100 µL de reactivo de Ehrlich, se cubrió la placa de 96 pozos con una lámina de plástico y se incubó durante 30 minutos a 65°C en un termoblock. Finalmente, las muestras se transfirieron a una nueva placa libre de humedad para su lectura en un lector de placas de ELISA a 550 nm.

### **Preparación histológica**

Se utilizó la técnica tricrómica de Masson para distinguir la cantidad de colágeno presente en el pulmón. Después de la disección de los pulmones, el pulmón izquierdo se sumergió en formol al 10% para el análisis histopatológico. Luego, se sometió a un proceso de deshidratación e inclusión en parafina, seguido de la tinción de los tejidos. Se realizaron cortes histológicos de 3 a 5 µm.

Para llevar a cabo la tinción, se desparafinaron los tejidos y se hidrataron con agua destilada. Posteriormente, se sumergieron en una solución de Bouin durante 1 hora a 58°C o a temperatura ambiente durante toda la noche. Se realizaron lavados hasta eliminar el color amarillo de los tejidos que dejaba la solución de Bouin. A continuación, se tiñeron con hematoxilina de Weigert durante 20 minutos, seguido de un enjuague con agua corriente durante 10 minutos y luego con agua destilada.

Se aplicó el colorante Escarlata de Bibicho durante 10 minutos y se enjuagó con agua destilada. Luego, se sumergieron los tejidos en una solución de ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico durante 15 minutos, seguido de un enjuague con agua destilada. Se añadieron unas gotas de azul de anilina durante 5 minutos y luego se sumergieron los tejidos en ácido acético al 0.5% durante 1 a 2 minutos. Finalmente, los tejidos se montaron en resina sintética para su análisis microscópico.

Un anatomopatólogo especializado evaluó la calidad de la tinción. Las laminillas de los tejidos se fotografiaron con el software MoticCam y las imágenes se analizaron con el software Orbit Image.

## METODOLOGÍA PARA CADA OBJETIVO ESPECÍFICO

### Metodología para el objetivo específico 1

**Objetivo específico 1:** Obtener SP porcino (SPP) por medio de lavados pulmonares.

**Fundamento lógico:** en esta fase de desarrollo se estandarizó la obtención de SPP por medio de extracción orgánica hecha con serie de sistema de solventes con (CH<sub>3</sub>OH:CHCL<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O).

**Metodología:** para esta fase fueron necesarios 6 pares de pulmones, sin lesiones de tejido, para evitar fugas, a los cuales se les realizó lavado pulmonar; de acuerdo con las condiciones metodológicas planteadas por (Vázquez de Lara-Cisneros & Iturbide Flores, 1998) y la extracción orgánica se realizó con la técnica de por (Bligh & Dyer, 1959). La fase orgánica se procedió a recolectar y almacenar a -80°C.

### Metodología para el objetivo específico 2

**Objetivo específico 2:** Realizar; análisis microbiológico, químico y pruebas biofísicas del SPP.

**Fundamento lógico:** El SP es una compleja mezcla de lípidos y proteínas. Es de gran interés identificar la presencia de proteínas hidrofóbicas como SP-B y SP-C, además de determinar la concentración de fosforo para saber la concentración de lípidos total. También es crucial asegurarse de que este componente esté libre de bacterias y hongos, porque será administrado en modelos biológicos.

#### Metodología

##### *Análisis microbiológico*

Tras haber realizado el aislamiento del SPP y resuspendido en solución NaCl-CaCl<sub>2</sub> (100-5 nM) y tratado con la técnica de Flash, se procedió a incubar muestras de 1 mL de SPP durante tres días. Luego se sembraron las muestras en los siguientes medios: agar sangre (BAS) con un 5% de sangre de carnero, agar McConkey, agar dextrosa Sabouraud, medio líquido de tioglicolato y Lowenstein Jensen. Las muestras fueron monitoreadas a las 24 y 72 horas siguientes.

### *Cuantificación de fosfatidilcolina*

Se realizó la cuantificación de PC con el kit (ab234050, Abcam) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se colocaron las muestras por lotes, cada lote contaba con 5 pares de pulmones. Los lotes fueron ajustados a 25 mg/mL de PC.

### *Análisis químico medición de fosforo*

Se realizó la preparación de una curva de calibración por duplicado de fosforo, las muestras fue preparadas inicialmente con el extracto seco y resuspendidas con (metano:cloroformo) a 1 mg/mL, las muestras fueron colocadas por duplicado realizando diluciones de 1/20 y 2/20. Después, se prosiguió con la técnica de valoración de fosforo antes descrita.

### *Cromatografía en capa fina*

Se utilizó una placa de sílice de 20x20 cm la cual fue marcada con los estándares de lípidos: esfingomielina (SM), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), colesterol (CHOL) y fosfatidilcolina (PC).. Las muestras fueron colocadas en fase orgánica: 50, 100, 150, 200 y 250 mg. El corrimiento de las muestras fue con CH<sub>3</sub>OH:CHCl<sub>3</sub> y reveladas en una cámara con yodo sublimado.

### *Electroforesis para detectar proteínas*

Se realizó la preparación de SPP a 1 mg/mL la cual fue corrida en un gel de agarosa al 16% en condiciones reductoras + $\beta$  y no reductoras - $\beta$  con muestras de 5, 10 y 15  $\mu$ g de SPP. El gel fue corrido a 25 A° por 1 hora. Después, fue teñido con plata para la verificación de la presencia de proteínas.

### *Western Blot para la detección de SP-B y SP-C*

El gel de electroforesis fue transferido a una membrana de PVDF para la detección de SPP-B se hizo con anticuerpo de conejo diluido a una proporción de 1:5000 (WRAB48604, de SevenHills Bioreagents), las condiciones experimentales fueron: SPP (10,15  $\mu$ g) en condiciones reducidas y no reducidas. Para la detección de SP-C se requirió colocar 10  $\mu$ g de SP-C como control y 15  $\mu$ g de SPP en condiciones reducidas y no

reducidas. El anticuerpo primario de Sevenhills se diluyó 1:5000 para SP-C. El anticuerpo secundario porcino anti-conejo conjugado con HRP de Dako (Dinamarca) se diluyó a 1:10000. Las membranas fueron reveladas con un fotorevelador.

#### *Balanza de Lagmuir*

Las monocapas y las transferencias experimentales se prepararon utilizando SPP-PE en diversas proporciones (1/0, 1/0.1, 1/0.3, 1/0.5, 1/1, 0/1). Las muestras se dispusieron en la fase orgánica, y cada experimento se llevó a cabo en triplicado. Las muestras destinadas a la transferencia fueron teñidas con rodamina al 1% molar del lípido fluorescente PE-rodamina y se determinó con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000B. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones termoestables a 25°C, de acuerdo con las condiciones previamente mencionadas.

#### *Surfactómetro de burbuja cautiva*

Se prepararon muestras en fase acuosa de SPP-PE (1/0, 1/0.1, 1/0.3, 1/0.5, 1/1, 0/1) que fueron extraídas de una SPP o PE en fase orgánica de 1 mg/mL. El metanol-cloroformo de las muestras fue evaporado con gas nitrógeno y centrifugado en vacío por 2 horas a 3,000 rpm. Después, fueron reconstituidas con NaCl-CaCl<sub>2</sub> (100-5 mM).

### **Metodología para el objetivo específico 3**

**Objetivo específico 3:** Realizar la síntesis orgánica de la fosfatidiletanolamina racémica por medio de una esterificación doble.

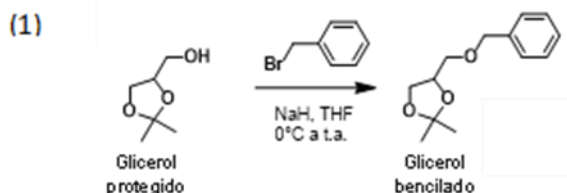
**Fundamento lógico:** La PE es un fosfolípido fundamental para conferirle al SP su propiedad antifibrosante, por lo tanto, es de interés realizar síntesis orgánica de este fosfolípido.

#### **Metodología**

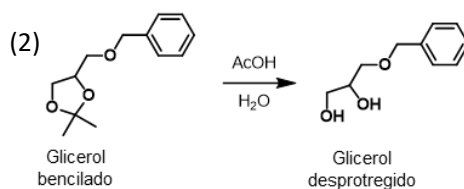
El primer paso en la síntesis orgánica de este compuesto consistió en la bencilación del glicerol protegido (1).

En un matraz bola seco con agitación, se dispusieron 4 mL de THF seco, a los cuales se agregaron 1,2 g de NaH a 0°C, seguido por la adición del glicerol protegido. Posteriormente, se añadió bromuro de bencilo a 0°C y se agitó durante 5 minutos, para

luego mantener a temperatura ambiente. Tras 3 horas a temperatura ambiente, se procedió a la purificación en una columna de sílice, y la estructura química se determinó mediante varias técnicas espectroscópicas. Se realizaron lavados necesarios para la recolección de la fase orgánica con éter. Las fases orgánicas se combinaron y se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se evaporó el éter y se purificó mediante una columna de sílice utilizando el sistema (hexano-diclorometano,  $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 9:1) (1).

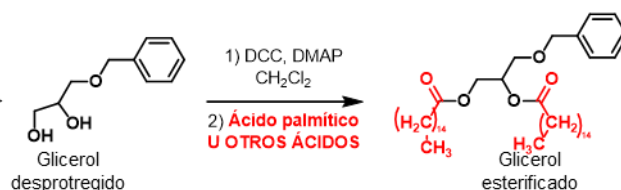


El segundo paso consistió en la desprotección del glicerol bencilado: se trató el glicerol bencilado con ácido acético y agua a  $65^\circ\text{C}$  durante 1 hora. La mezcla resultante se neutralizó en un matraz Erlenmeyer de 5 L con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ . Después de la neutralización, se llevó a un embudo de separación, donde se agregaron 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se agitó y se observó la separación de dos fases. La fase superior fue la acuosa y la inferior, la orgánica. Se procedió al lavado y recolección de la fase orgánica. Estas fases orgánicas recolectadas se colocaron en un vaso de precipitado de 500 mL y se añadieron 3 cucharadas de  $\text{MgSO}_4$ . Luego, se transfirió la mezcla a un matraz bola seco de 500 mL en un rotavapor (2).



El tercer paso implicó la esterificación, utilizando una solución de DCC (1.3g) y DMAP (0.88 g) en 36 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , a la cual se le añadieron 4.41 g de DCC. La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 4.06 g de ácido palmítico y se agitó toda la noche. La suspensión blanca obtenida se filtró en un embudo de Buc(4) hner con Celita, produciendo un líquido

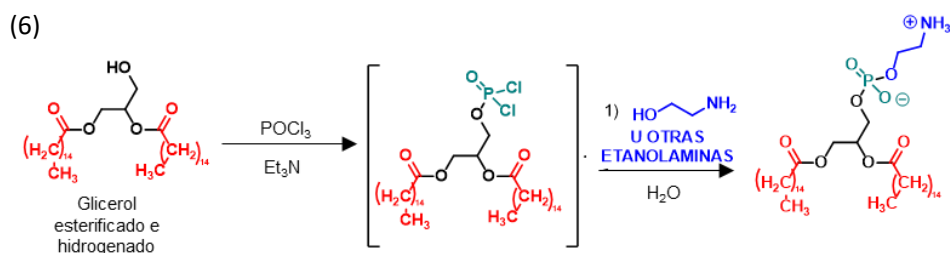
transparente que se colocó en un rotavapor. El producto se purificó utilizando un sistema (hexano-acetato de etilo 9:1) (4).



El cuarto paso consistió en la desbencilación por hidrogenación. En un hidrogenador se colocaron 0.1896 g de diacilglicerol/oBN, 0.016 g de paladio sobre carbono al 5%, 1.15 mL de ácido acético y 5.77 mL de etanol. El hidrogenador se cargó con hidrógeno a 550 psi a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. El producto obtenido se filtró, evaporó y plaqueó para identificar si se obtuvo la mayor cantidad de producto (5).



El último paso fue una reacción tipo *one-pot*, en el cual se hizo reaccionar cloruro de fosforilo (POCl<sub>3</sub>) y trietilamina (Et<sub>3</sub>N) durante 1 hora, seguido de la adición de etanolamina y H<sub>2</sub>O a la mezcla. El compuesto final se caracterizó mediante resonancia magnética nuclear, espectrofotometría de masas y espectroscopia de infrarrojo, además, se determinó un punto de fusión de 192°C (6).



## **Metodología para el objetivo específico 4**

**Objetivo específico 4:** Evaluar el efecto del SPP y PE en la proliferación, apoptosis y expresión de COL1A1 de FPHN.

**Fundamento lógico:** la FPI es una enfermedad compleja, afectada por numerosos factores moleculares y celulares. Esta afección se caracteriza por la presencia de fibroblastos en el espacio aéreo de los alvéolos. Estos fibroblastos tienen una tendencia a proliferar, obstruyendo el intercambio de gases como el oxígeno y el dióxido de carbono. Además, son células especializadas en la formación de una matriz extracelular rica en colágeno y presentan resistencia a entrar en apoptosis.

### **Metodología:**

Experimentos de proliferación: Se llevó a cabo una curva de concentración celular con valores de 62,500; 46,875; 31,250; 15,625; 7,813 cel/cm<sup>2</sup>. Para las condiciones experimentales, se emplearon con 15,625 cel/cm<sup>2</sup>. Las condiciones experimentales incluyeron células de control cultivadas en medio Ham-F12 con TGF-β, células tratadas con SP (500 µg/mL), células tratadas con PE (100 µg/mL) y células tratadas con SP-PE (500 µg/mL-100 µg/mL). La proliferación se midió a las 24 y 48 horas utilizando el kit WST-1 siguiendo las instrucciones del fabricante, y las lecturas se realizaron 2 horas después de la incubación con el reactivo a 550 nm.

Experimentos de apoptosis: Las células se sembraron a una densidad de 15,625 cel/cm<sup>2</sup>, y después de 24 horas, se procedió a aplicar las condiciones experimentales, que incluyeron células de control cultivadas en medio Ham F12 sin suero fetal bovino, células tratadas con SP (500 µg/mL), células tratadas con PE (100 µg/mL) y células tratadas con SP-PE (500 µg/mL-100 µg/mL). La medición de la apoptosis se realizó mediante citometría de flujo, tiñendo las células con anexina V y yoduro de propidio.

Experimentos de expresión de colágena: Las células se sembraron en placas de 6 pozos, y las condiciones experimentales incluyeron células de control cultivadas en medio Ham-F12 sin suero fetal bovino, células tratadas con SP (500 µg/mL), células tratadas con PE (100 µg/mL) y células tratadas con SP-PE (500 µg/mL-100 µg/mL). El tiempo de incubación de las condiciones experimentales fue de 24 y 48 horas. Luego, se realizó la extracción de RNAm utilizando Trizol Reagent siguiendo las instrucciones del fabricante, y

las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La conversión de RNAm a cDNA se llevó a cabo en un termociclador utilizando los reactivos del Kit (*H Minus First Strand cDNA Synthesis kit, Thermo Scientific*). El RT-PCR se realizó utilizando el gen endógeno POL-2 o GDPH y el gen de interés COL1A1. Las muestras se procesaron en un termociclador de *BiosystemApply*.

### **Metodología para el objetivo específico 5**

**Objetivo específico 5:** Evaluar el efecto del SPP y PE en un modelo murino de fibrosis pulmonar con bleomicina

**Fundamento lógico:** Es importante evaluar el SPP y PE en la atenuación de los efectos de la bleomicina.

**Metodología:** Se utilizaron 50 ratones macho adultos que se dividieron en 5 grupos de 10 ratones cada uno. A los ratones se les administró intratraquealmente (3U/kg) en un volumen de 30  $\mu\text{L}$ , el SP de (400 mg/kg) y PE (25 mg/kg). Los grupos experimentales fueron: 1) control, 2) bleomicina, 3) SPP, 4) PE y 5) SPP-PE. Los tratamientos se aplicaron 30 minutos después de la administración de la bleomicina, se les proporcionó el primer tratamiento. Los ratones se sacrificaron por exanguinación 20 días después de la instilación de la bleomicina. El pulmón derecho se destinó para la cuantificación de la concentración de colágeno con hidroxiprolina, y el pulmón izquierdo se utilizó para el análisis histopatológico. Las laminillas se analizaron con un software de código abierto e inteligencia artificial que será usado para evaluar el porcentaje de epitelio dañado.

### **TAMAÑO DE LA MUESTRA**

De acuerdo con los estándares del trabajo experimental, se efectuarán al menos tres experimentos y se harán triplicados en cada uno de ellos. Se considerará que el resultado es reproducible cuando se repita en al menos tres experimentos. Para el cálculo del tamaño de muestra en el experimento con animales, para el cálculo del tamaño de muestra, se empleó como variable blanco la concentración de colágeno. Para que el resultado sea relevante, nosotros definimos el valor de la magnitud del efecto (en ANOVA es la medida de dispersión entre los grupos relativa a la dispersión dentro de los grupos) de 0.7, ya que en los experimentos previos esto fue lo que se observó con la concentración en donde esperamos el menor cambio en relación con el control. Con una probabilidad de



cometer el error tipo 1 de 0.05 y una potencia del 80%, se necesitan 7 ratones para demostrar dicho efecto. Para los cálculos se empleó el programa estadístico SamplePower (IBM) versión 3.0.1. En la experiencia en el laboratorio, tenemos una mortalidad de alrededor del 30% en los ratones tratados con bleomicina, por lo que se emplearán 10 ratones por grupo.

#### **ANALISIS ESTADISTICO**

Los datos obtenidos se presentan con medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental y de los grupos control. El análisis se realizará en el software SPSS versión 23. Se hará ANOVA para comparar la diferencia entre varios grupos, después se realizará prueba de *post hoc* de Dunnett para múltiples comparaciones. Se considerará significativa una  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Obtención de surfactante pulmonar por medio de lavados pulmonares de cerdo

La etapa de estandarización para aislar el SPP a partir de lavados pulmonares implicó la realización de lavados en siete pares de pulmones pertenecientes a cerdos adultos con un peso aproximado de 130-150 kg.

Tabla 2. Información obtenida durante la fase de estandarización con respecto a los ajustes de volumen recolectado del lavado, peso húmedo y peso seco del pellet, así como las notas pertinentes a la fase experimental.

Número de muestra (Pulmón)	Volumen recolectado del lavado (mL)	Peso húmedo (g)	Peso seco (mg)	Notas
1	1000	-	138	El pulmón presentaba lesiones, lo que ocasionaron fuga de líquido
2	2000	1.98	-	No se observó la parte clorofórmica
3	2,700	8.53	-	Se agregó el cloroformo: agua antes del metanol
4	2,600	4.2	230	Se realizó la esterilización del SPP 4 días después del procesamiento
<b>5</b>	<b>2,400</b>	<b>5.2</b>	<b>180</b>	<b>10 minutos de sonicación</b>
6	2,600	11.49	-	La parte clorofórmica se almacenó a -70 °C
7	2,800	2.01	-	

Una vez realizado la fase de estandarización de la técnica se procedió a obtener pares de pulmones con las características deseadas. Por lo tanto, la técnica se describe a continuación.

“1. Obtener pulmones de cerdo sin lesiones y con un peso aproximado de 3-4 kg, que se colocarán en la campana de extracción, donde se corta el tejido sobrante, como la laringe y el corazón (Figura 1. A). 2. Conectar los pulmones a una manguera de caucho unida a un sistema de succión y extracción para bombear solución salina al 0.9% (Figura 1. B). 3. Realizar el lavado pulmonar tres veces, recogiendo y midiendo el volumen final obtenido; en promedio, se obtiene un volumen de 2.3 L (Figura 1. C). 4. Procesar el lavado pulmonar mediante una serie de centrifugaciones: la primera centrifugación se realiza a 3000 g durante 5 minutos, y la segunda a 8000 g durante 30 minutos en volúmenes de 200-250 mL (Figura 1. D). 5. Durante la primera centrifugación, recolectar los

sobrenadantes para desechar los restos celulares, como los glóbulos rojos, y en la segunda centrifugación desechar el sobrenadante hasta obtener un solo pellet (Figura 1. E), el cual se pesa y se resuspende en agua estéril manteniendo una relación de 80 mL de agua por cada 50 g de pellet. Resuspender y agitar el pellet en el sistema de solventes ( $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ ; 2:1) y colocar en agitación por 10 minutos (Figura 1. F). 6. Filtrar la mezcla obtenida con un embudo de Buchner (Figura 1. G). 7. Preparar el tercer sistema de solventes ( $\text{CH}_3\text{OH}:\text{CHCl}_3$ ; 2:1) y colocar la mezcla resultante en un embudo de separación de 250 mL (Figura 1. H). 8. Dejar el embudo de separación con la mezcla en un soporte de anillo durante toda la noche para separar la fase orgánica y la acuosa. 9 Recolectar la fase orgánica-clorofórmica y la evaporar mediante una cámara de nitrógeno (Figura 1. I). 10. Agregar 20 volúmenes de acetona fría y centrifugamos a 1500 RPM durante 1 minuto, desechando el sobrenadante. 11. Evaporar la parte clorofórmo-acetona y despegar el sedimento con una espátula fina. 12. Añadimos el volumen necesario de una solución de  $\text{NaCl-CaCl}_2$  (100-5 mM) en una relación de 25 mg/mL. 13. Sonorizar la mezcla hasta obtener una mezcla homogénea (Figura 1. J). 14. Esterilizar la mezcla obtenida mediante la técnica de Flash (120°C durante 10 minutos) en la autoclave (Figura 1. K). 15. El resultado final es una suspensión espesa de color blanco que será conservado a 4-5°C (Figura 1. L).”



Figura 1. Estandarización del aislamiento del surfactante pulmonar porcino. A) Tejido pulmonar de cerdo conectado a una bomba de vacío. B) Introducción de solución salina al 0.9%. C) Recolección del lavado pulmonar. D) Centrifugación del lavado a 4°C a una velocidad de 3,000 y 8,000 RPM. E) Visualización del pellet. F) Agitación con el sistema de solventes constituido con (metanol: cloroformo: H<sub>2</sub>O). G) Filtración de la mezcla con un embudo de Buchner. H) Visualización de la fase orgánica (clorofórmica). I) precipitación con acetona y evaporación con una cámara de nitrógeno. J) Sonicación de la mezcla. K) Esterilización con la técnica de Flash. L) Visualización del surfactante pulmonar porcino.

### Análisis microbiológico

Se analizaron las muestras de SPP agrupadas por pares de pulmones. Se recogieron 200  $\mu$ L de SPP y se colocaron en tubos Eppendorf, que se incubaron a 37°C durante siete días. Luego, se llevó a cabo el análisis microbiológico y las muestras se sembraron en los siguientes medios de cultivo: agar sangre (BAS) con un 5% de sangre de carnero, agar McConkey para bacterias aerobias, agar tioglicolato para bacterias

anaerobias, medio Lowenstein-Jensen para micobacterias y agar Sabouraud para hongos. No se observó desarrollo de microorganismos (Figura 2).

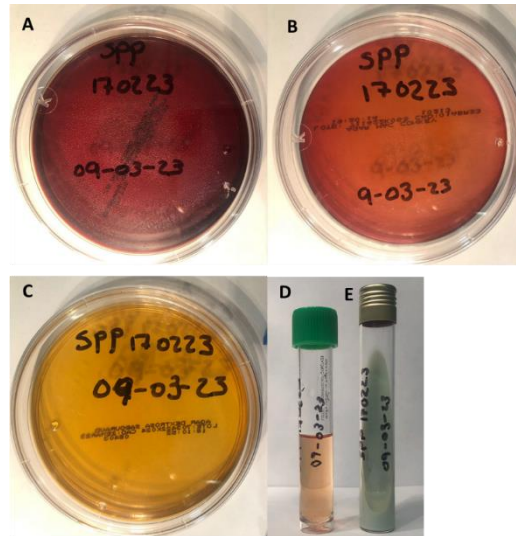


Figura 2. Análisis microbiológico del SPP. Se incubó 200  $\mu$ L de SPP en tubos eppendorff a 37°C. A) Agar Sangre (BAS) CON 5% sangre de carnero. B) Agar MacConkey. C) Agar dextrosa Sabouraud. D) Medio líquido de Tioglicolato. E) Lowenstein Jensen. No se observó crecimiento de ningún tipo de organismo de las muestras sembradas de SPP.

## Análisis químico

### Cuantificación de la concentración de lípidos

La cuantificación de PC se realizó con un kit (Phospholipid Assay Kit, ab234050, Abcam) Se realizó una curva de calibración y de obtuvo un coeficiente de determinación de 0.99 (Figura 3).

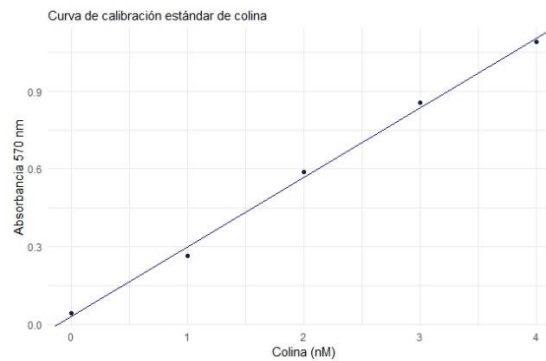
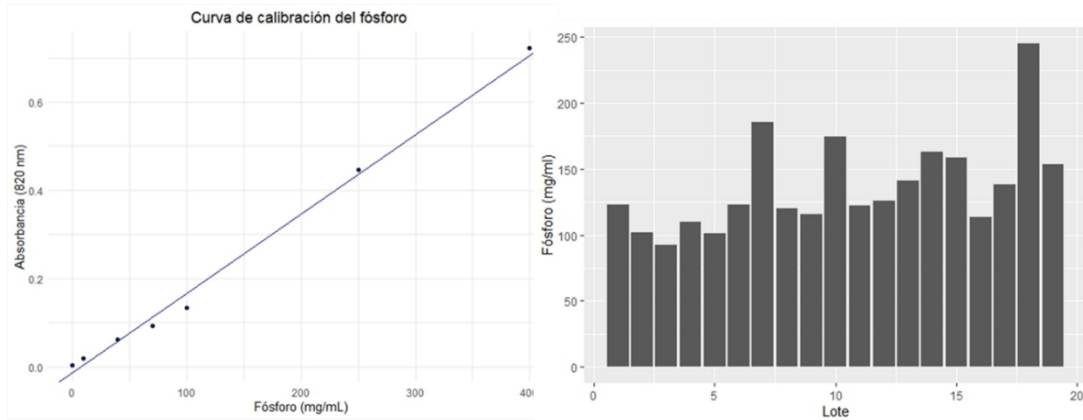


Figura 3. Curva de calibración para la determinación de fosfatidilcolina (PC) con un coeficiente de determinación de  $R^2$  0.9931, pendiente 0.2687 e intercepto=0.0319.

La cantidad de fosfolípidos obtenida de las muestras de SPP analizadas fue de 181.66 nM/ $\mu$ L la cual fue suspendida en a una concentración final de 25 mg/mL.

### Cuantificación de fósforo

El fósforo fue cuantificado por medio de absorbancia y los datos se interpolaron mediante una curva de calibración (Figura 3A.). Se realizó la cuantificación de 19 lotes (Figura 3B.). Se calculó la cantidad de fósforo promedio entre lotes fue de  $137.27 \pm 36.76$  mg/mL.



**Figura 4. Cuantificación de fósforo. A) Determinación de los coeficientes que permiten interpolar la cantidad de fosforo en las muestras, Intercepto=-0.0131, pendiente=0.0018 y coeficiente de determinación=0.9855. B) Cantidad de fósforo por lote.**

### Cromatografía de capa fina

Se depositaron distintas cantidades de SPP en fase orgánica a 50, 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{g/mL}$ , que fueron colocadas en una placa de sílice con fosfolípidos estándares: SM, PI, PS, PE, PG, CHOL y PC. La placa fue revelada en una cámara de yodo sublimado que mostró la presencia de los fosfolípidos de acuerdo con los estándares (Figura 5).

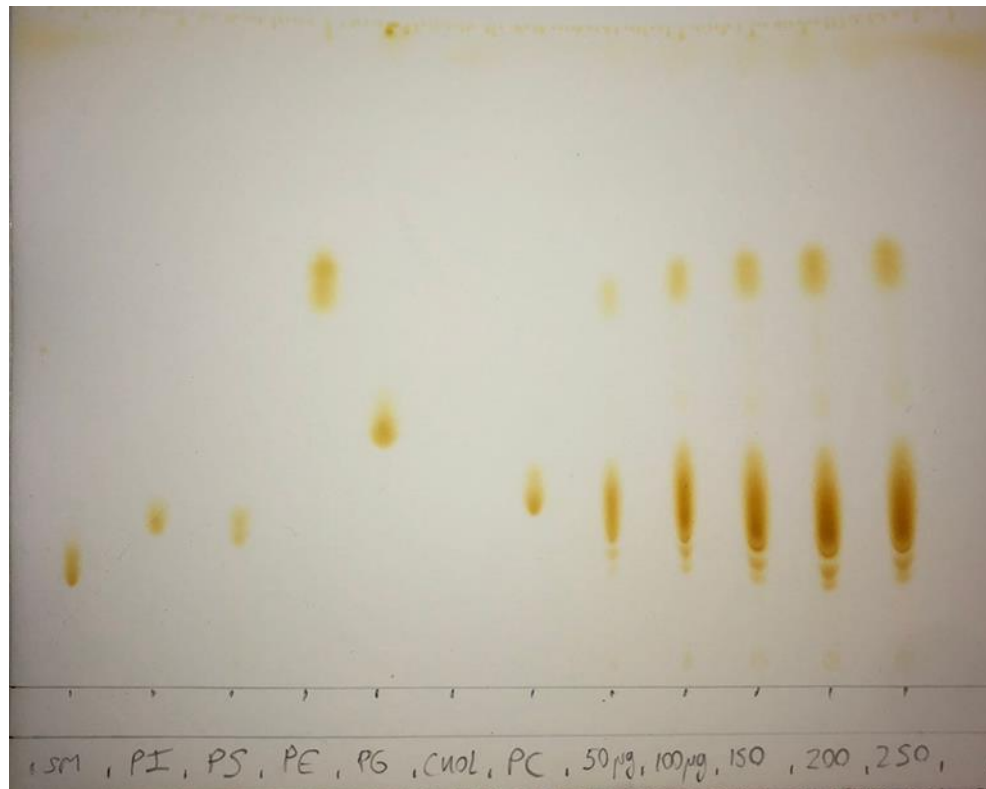


Figura 5. Determinación de los lípidos del SPP por medio de cromatografía de capa fina (TLC). La placa revela la presencia de: esfingomielina (SM), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), colesterol (CHOL) y fosfatidilcolina (PC).

### Proteínas del SP

El SPP fue extraído por medio de una serie de sistema de solventes que capta los elementos hidrofóbicos como las proteínas SP-B y SP-C. La cantidad de proteínas fue ajustada por medio de electroforesis y tinción de plata (Figura 6).



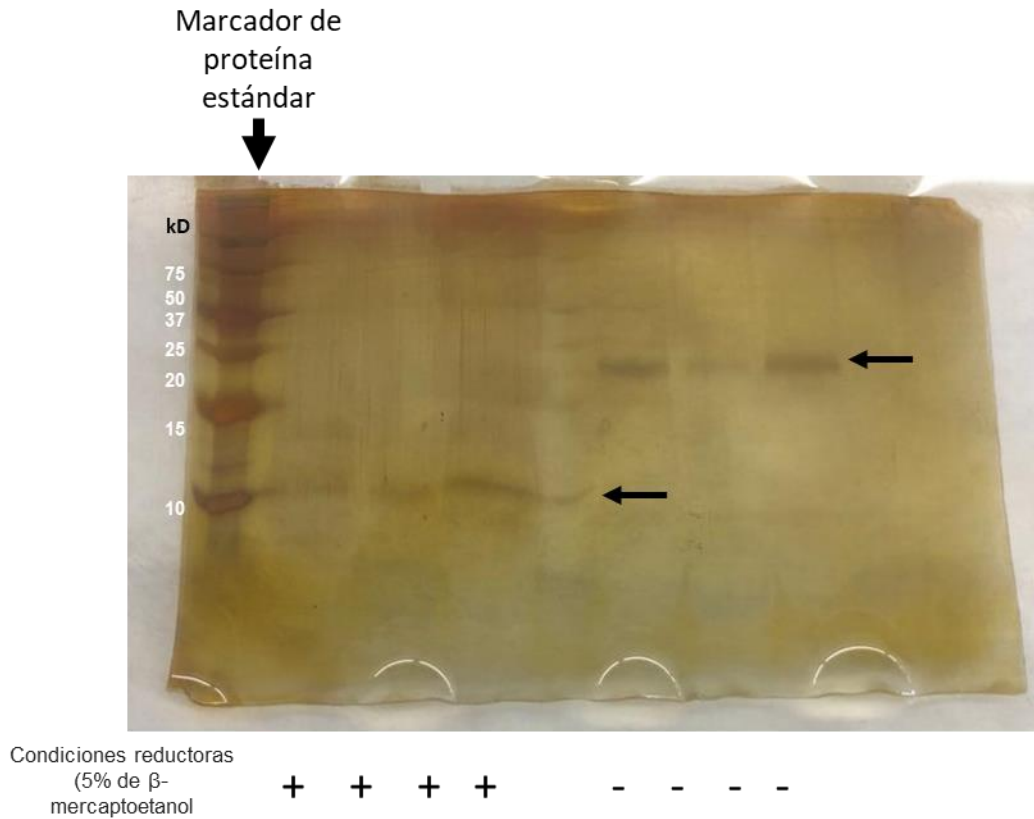


Figura 6. La electroforesis en gel teñido con plata revela la presencia de proteínas en el SPP.

#### **Determinación de las proteínas del surfactante pulmonar: SP-B y SP-C**

La proteína SP-B un componente esencial del SP, desempeña un papel crítico en la estabilidad de los alvéolos al reducir la tensión superficial en la interfaz aire-líquido. Esta proteína consta de 79 aminoácidos y tiene un peso molecular de 8,7 kDa. La SP-B está compuesta por pequeñas proteínas que presentan entre cuatro y cinco hélices  $\alpha$  anfipáticas, estabilizadas mediante tres puentes disulfuro intramoleculares que involucran seis cisteínas altamente conservadas. Cada monómero de SP-B contiene tres de estos puentes disulfuro intramoleculares (Cys-8 a Cys-77, Cys-11 a Cys-71 y Cys-35 a Cys-46). La detección de estas unidades proteicas se realizó mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo policlonal específico de SP-B, lo que permitió identificar tanto la forma monomérica como la dímera de SP-B (Figura 7A).

La SP-C es una proteína asociada a las membranas que representa aproximadamente el 1 al 2% de la masa total del surfactante pulmonar. Se caracteriza por ser uno de los péptidos más hidrofóbicos conocidos y contiene un dominio alfa-helicoidal



con un segmento central de polivalina que se ancla a las bicapas de fosfolípidos. La SP-C tiene un peso molecular de 21 kDa, que se reduce a 3.7 kDa en su forma proteolítica. La detección de la SP-C se realizó tanto en su forma reducida como no reducida (Figura 7B).

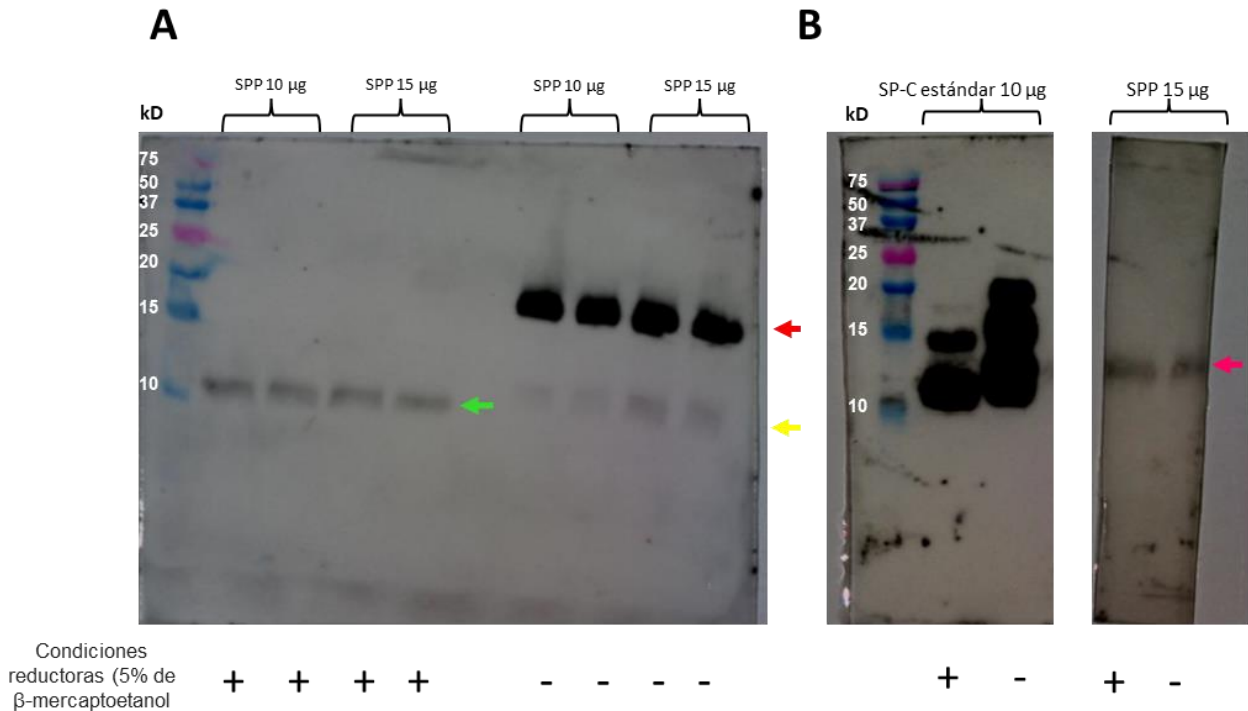


Figura 7. Determinación de las proteínas hidrofóbicas: SP-B y SP-C del SPP por medio de Western blot: A) La SP-B en condiciones reducidas *flecha verde*, la SP-B en su forma desnaturalizada y SP-B hexamérica *flecha roja* y SP-B homodimérica *flecha amarilla*. B) La SP-C se muestra en su forma desnaturalizada y sin desnaturalizar frente a una SP-C estándar.

### Pruebas tensioactivas

Para que un surfactante funcione con óptimas condiciones debe cumplir con ciertas características biomecánicas: 1) muy rápida adsorción interfacial gracias a las proteínas estructurales como la SP-B y SP-C, 2) muy baja tensión superficial durante la compresión dada por los lípidos del SP y 3) eficacia en la recuperación del material durante la inspiración dada por las proteínas.

### Calorimetría diferencial de barrido

Se realizaron termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de SPP y PE, en un calorímetro Microcal VP (MicroCal, Amherst, MA). Los escaneos se realizaron de 15 a 55°C, a 30°C/h. Se evaluó el efecto de la incorporación de cantidades crecientes de PE en las propiedades termotrópicas del SPP. El SPP muestra un pico calorimétrico

entre 40 y 60 °C con una  $T_m$  de  $\sim 55.3 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . La adición de cantidades crecientes de PE, hasta una relación de SPP-PE (1/0.1, 1/0.3) produjo un ensanchamiento de la transición, aumentó la temperatura de transición de fase, mientras que la entalpía de la transición disminuyó. El termograma de la mezcla de SPP con PE (1/0.5) muestra un desplazamiento del pico calorimétrico a temperaturas mayores, entre 45 y 62°C, con una  $T_m$  aparente de  $\sim 57^\circ\text{C}$ . El termograma de SPP con PE (1/1) muestra dos picos entre 50 y 70°C con una  $T_m$  de  $\sim 55^\circ\text{C}$  en el primer pico y una  $T_m$  de  $\sim 65^\circ\text{C}$  en el segundo pico que es más alto. Esta última temperatura de transición de fase coincide con la obtenida para vesículas de PE pura (0/1). La  $\Delta H$  cambian con respecto a la adición gradual de la PE (Figura 8, Tabla 3.)

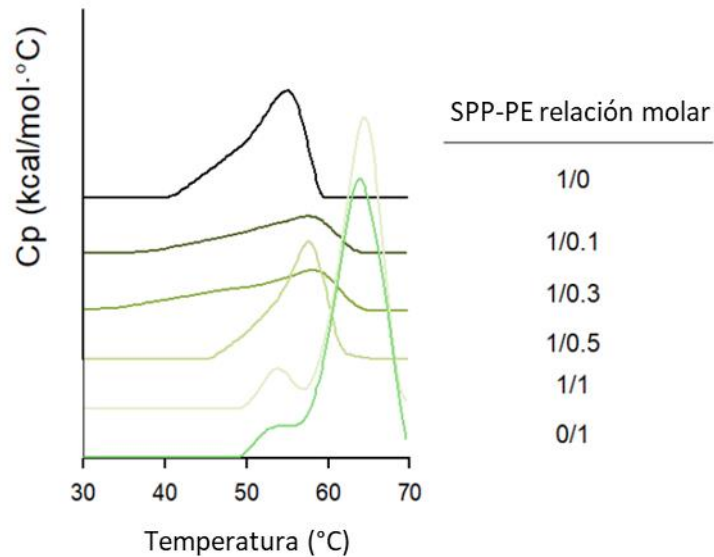


Figura 8. Efecto del PE sobre las propiedades termotrópicas del SPP. Termogramas DSC de SPP-PE(1/0, 1/0.1, 1/0.3, 1/0.5, 1/1, 0/1).

Tabla 3. Datos obtenidos de los termogramas.

SPP-PE (%)	$T_m$	$T_{1/2}$	$\Delta H(\text{kcal/mol})$
1/0	$55.3 \pm 0.5$	$7.0 \pm 2$	$10 \pm 3$
1/0.1	$57.7 \pm 0.3$	$15 \pm 1$	$6.8 \pm 0.9$
1/0.3	$58.3 \pm 0.9$	$19 \pm 2$	$7 \pm 2$
1/0.5	$59.0 \pm 1$	$5 \pm 2$	$9 \pm 1$
1/1	$64.8 \pm 0.4$	$4.5 \pm 0.7$	$1 \pm 3$
0/1	$69.9 \pm 0.1$	$4.6 \pm 0.05$	$3 \pm 4$

### **Experimentos de monocapas**

Se caracterizó el efecto de PE en los ciclos de compresión/expansión de SPP. Para ello se prepararon monocapas de mezclas de SPP y PE en diferentes proporciones molares (1/0, 1/0.1, 1/0.3, 1/0.5, 1/1, 0/1) sobre una subfase compuesta por una disolución acuosa de NaCl 100 mM y CaCl<sub>2</sub> 5 mM. Los experimentos se realizaron por triplicado a 25°C con una velocidad de compresión de 84 cm<sup>2</sup>/min.

Al someter a las monocapas de SPP a cinco ciclos de compresión/expansión se observó un desplazamiento de las isothermas de compresión hacia valores de área menores (Figura 9A), indicativo de la pérdida de material. El material expulsado de la película interfacial no fue capaz de reincorporarse en la monocapa durante la expansión de la misma, lo que produjo una considerable histéresis y disminuyó la presión superficial máxima y mínima alcanzada en cada ciclo (Figura 9A y F). El hecho de que la presión superficial máxima disminuya a lo largo de los ciclos indica que la compresión produce una pérdida de moléculas de DPPC. Por otro lado, las isothermas de SPP presentan una meseta a una presión superficial próxima a los 42 mN/m, indicativa del refinamiento en la composición de la película interfacial debido a la formación del reservorio (Casals & Cañadas, 2012; Possmayer et al., 2023).

La adición de cantidades crecientes de PE dio lugar a monocapas estables con una histéresis mayor que la observada para las películas de SPP solo (Figura 9A). Las isothermas mostraron varias mesetas: una en torno a los 40 mN/m indicativa de la formación del reservorio, y otra a presiones superficiales mayores de 60 mN/m, indicativa del colapso de la monocapa enriquecida en DPPC. El hecho de que un aumento en la cantidad de PE incorporada en la monocapa de SPP produzca un aumento en la longitud de esta segunda meseta (Figura 9B-E) y aumente los valores de presión máxima alcanzados en cada ciclo (Figura 9G) sugiere que este lípido (i) podría favorecer la retención de la DPPC o (ii) tendría actividad tensioactiva debido a sus cadenas de acilo saturadas. Para evaluar la posible actividad tensioactiva de la PE, se recogieron los ciclos de compresión/expansión de monocapas de PE pura. Los resultados mostrados en la Figura 9F indican que este fosfolípido forma monocapas estables capaces de disminuir la tensión superficial hasta valores muy bajos sin que sea necesario comprimir mucho la película.

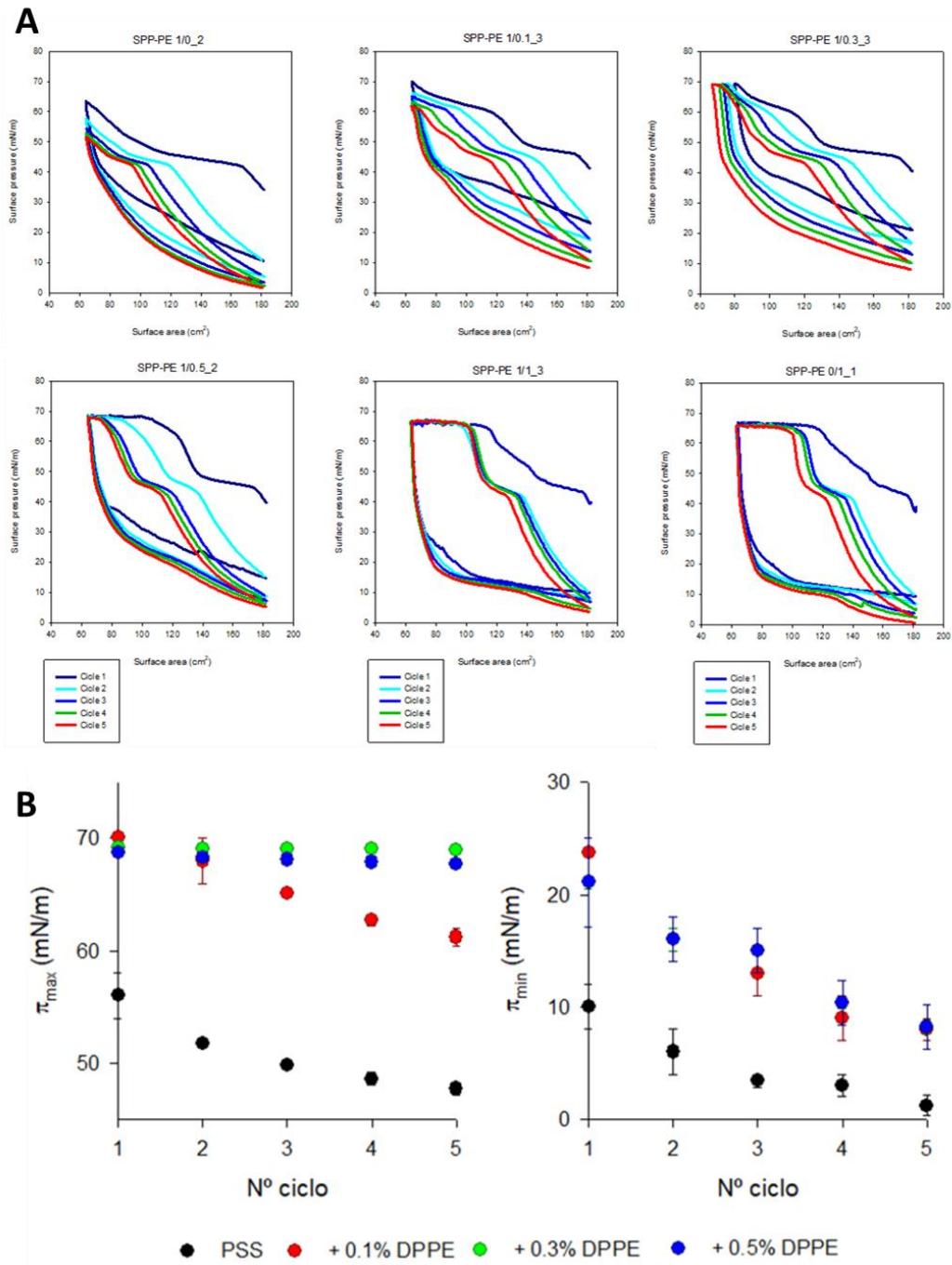


Figura 9. Evaluación de los ciclos de compresión-expansión el SPP-PE en la balanza de Lagmuir en una subfase: NaCl-CaCl<sub>2</sub> (100-5 mM). La velocidad de compresión 84 cm<sup>2</sup>/min, T=25°C. A) Las imágenes muestran las isotermas obtenidas de cinco ciclos de cada condición experimental. Las graficas ciclicas a  $\pi \leq 40$  mN/m es la monocapa, de 40-50 mN/m es la transición de monocapa a multicapa, de >50 mN/m es en multicapa y los colapsos para SPP-PE (1/0) ~ 57 mN/m, mientras que el resto de las condiciones experimentales fue por arriba de los 68 mN/m. B) Efecto de la PE en la presión máxima ( $\pi_{max}$ ) y presión mínima ( $\pi_{min}$ ) que alcanza el SPP aislado de lavados pulmonares de cerdo durante los ciclos de compresión.

### **Experimentos de transferencia de monocapa y microscopía de epifluorescencia de SPP-PE**

Para caracterizar el efecto de PE en la estructura y coexistencia de fases lipídicas de SPP se prepararon monocapas marcadas con un 1% molar del lípido fluorescente RhPE (fosfatidiletanolamina etiquetada con la sonda fluorescente N-(Lissamina rodamina B sulfonil)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina). Las monocapas se transfirieron a un soporte sólido (portaobjetos de vidrio) en la balanza de Langmuir utilizando la técnica COVASP LB (Echaide et al., 2020). Brevemente, se depositó la disolución de los lípidos sobre la subfase acuosa (disolución de NaCl 100 mM y CaCl<sub>2</sub> 5 mM) y, tras 10 minutos en los que se permitió la evaporación del disolvente y la consiguiente formación de la monocapa, se procedió a transferirla mientras se comprimía a una velocidad de 25 cm<sup>2</sup>/min. Las monocapas transferidas se observaron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con una cámara digital Hamamatsu. La presencia de la sonda fluorescente en la molécula de Rh-PE impide que este lípido pueda incorporarse en las fases líquido condensado (LC) donde se producen numerosas interacciones entre las cadenas de acilo de fosfolípidos adyacentes, por lo que únicamente se incorpora en la fase líquido expandido (LE) al ser más fluida.

A presiones superficiales muy bajas, próximas a 0 mN/m, las monocapas de SPP puras aparecieron uniformemente coloreadas en rojo, lo que indica que a esas presiones la monocapa se encuentra en la fase LE. Un pequeño aumento en la presión superficial, hasta los 4 mN/m, resultó en la aparición de pequeños dominios oscuros que excluyen la sonda, es decir, a esta presión comienza la coexistencia de fases LE/LC. Al continuar aumentando la presión superficial se observó un ligero aumento en el número y tamaño de los dominios oscuros. Por otro lado, la monocapa de PE pura se caracteriza por encontrarse en la fase LE hasta una presión superficial de 13 mN/m a la cual se observó la aparición de algunos dominios oscuros de pequeño tamaño. La compresión de la monocapa hasta presiones superficiales mayores de 30 mN/m produjo un pequeño aumento en el tamaño de los dominios LC, sin afectar a su número. La incorporación de cantidades crecientes de PE en la monocapa de SPP produjo una fluidificación de esta, haciendo necesario comprimir la monocapa hasta presiones superficiales mayores (13

mN/m) para poder observar la aparición de dominios LC, los cuales tenían un tamaño mayor que el observado en ausencia de PE (Figura 10).

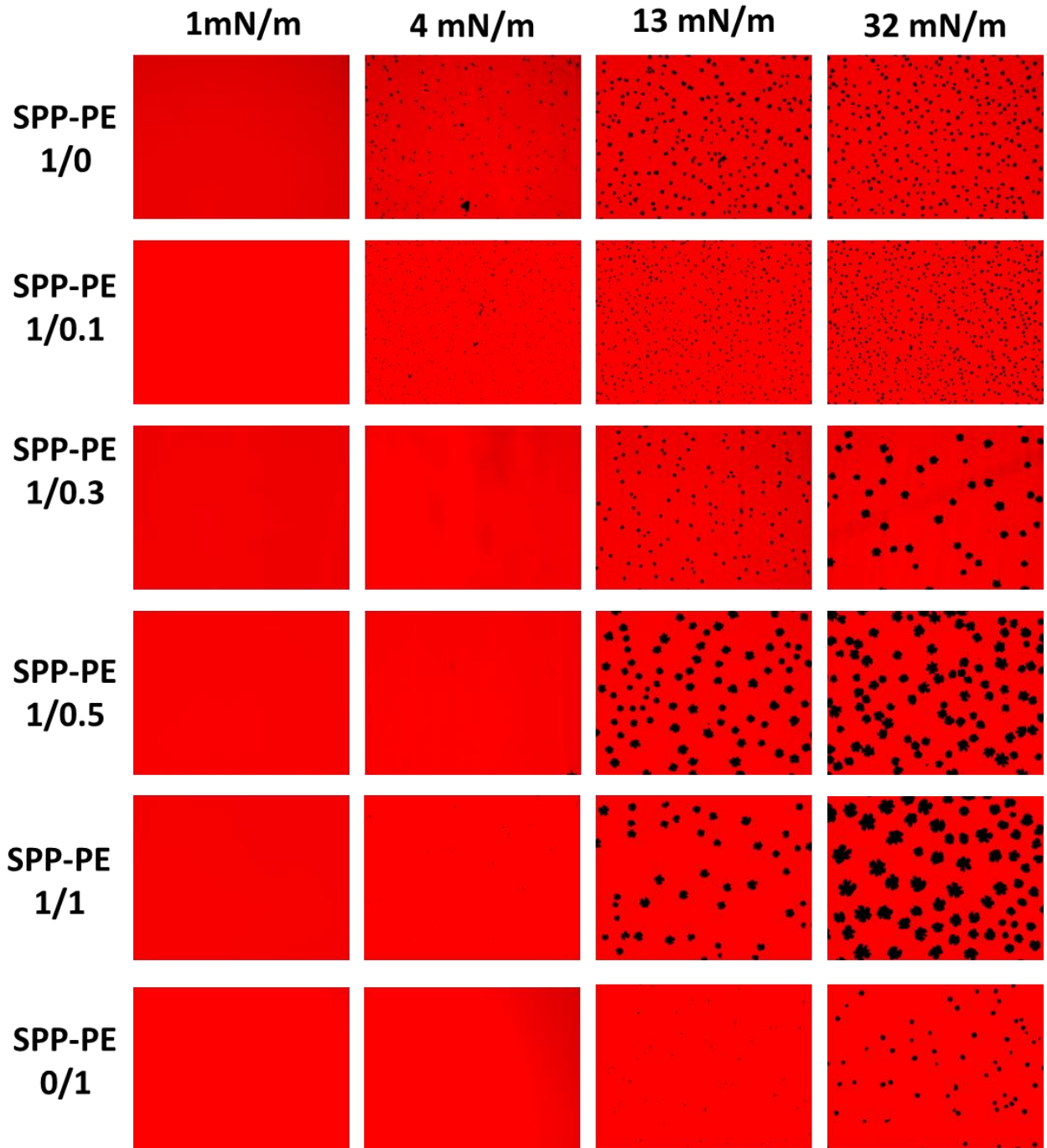


Figura 10. Microfotografías obtenidas de la transferencia de SPP-PE (1/0, 1/0.1, 1/0.3, 1/0.5, 1/1, 0/1) teñidas con Rho-DPPE, experimentos realizados en la balanza de Langmuir. Se obtuvieron imágenes de SPP, solo y en presencia de PE. Las transferencias de las películas interfaciales se realizaron en portaobjetos de vidrio y la observación bajo un microscopio de epifluorescencia. Las monocapas en una fase líquido expandido (LE) homogénea se muestra a 1 mN/m. Una mayor compresión de la monocapa dio como resultado la nucleación y crecimiento de dominios en la fase cristal (FC) con la incorporación gradual de PE a SPP.



### **Medición de la tensión superficial con un surfactómetro de burbuja cautiva**

Se evaluó la tensión superficial del SPP enriquecido con PE en diferentes proporciones molares (1/0, 1/0.1, 1/0.3, 1/0.5, 1/1, 0/1) utilizando un surfactómetro de burbuja cautiva. La medición de la tensión superficial ( $\gamma$ ) se realizó en varios puntos, incluyendo la adsorción inicial, la adsorción posterior a la expansión, ciclos cuasiestáticos y la compresión-expansión dinámica (primer ciclo, décimo ciclo y vigésimo ciclo) en ausencia y en presencia de PE. Los resultados se muestran como isothermas de tensión superficial en función del tiempo después de la aplicación (adsorción inicial) y después de una rápida expansión (adsorción posterior a la expansión), promediando tres experimentos y representando la desviación estándar. El SPP redujo significativamente la tensión superficial en menos de 1 s tanto en condiciones estáticas (adsorción inicial) como postexpansión, lo que indica una rápida adsorción interfacial, requiriendo unos 20 s para alcanzar una tensión de equilibrio de 25 mN/m. La incorporación de cantidades crecientes de PE no afectó a la capacidad de SPP de adsorberse rápidamente a la interfase aire/agua en ninguna de las condiciones estudiadas (Figura 11).

Por otro lado, se utilizaron dos regímenes de compresión/expansión para caracterizar el efecto de PE en el comportamiento tensioactivo de SPP: un régimen cuasiestático, que proporciona información sobre el proceso de exclusión de lípidos que tiene lugar durante la compresión, y un régimen dinámico que proporciona información sobre la actividad superficial en condiciones que mimetizan los ciclos respiratorios. Durante los ciclos cuasiestáticos se produjo un refinamiento en la composición de SPP durante el primer ciclo que hizo que fuese necesario comprimir menos al SP para alcanzar valores de tensión superficial en torno a 2 mN/m en los siguientes ciclos. Este refinamiento en la composición no se observó en los ciclos dinámicos, ya que no se produjo histéresis en ninguno de los 20 ciclos realizados. La incorporación de cantidades crecientes de PE produjo un ligero aumento en la histéresis durante los ciclos cuasiestáticos, pero no afectó a la compresión requerida para disminuir la tensión superficial hasta valores próximos a 0



mN/m

(Figura

11).

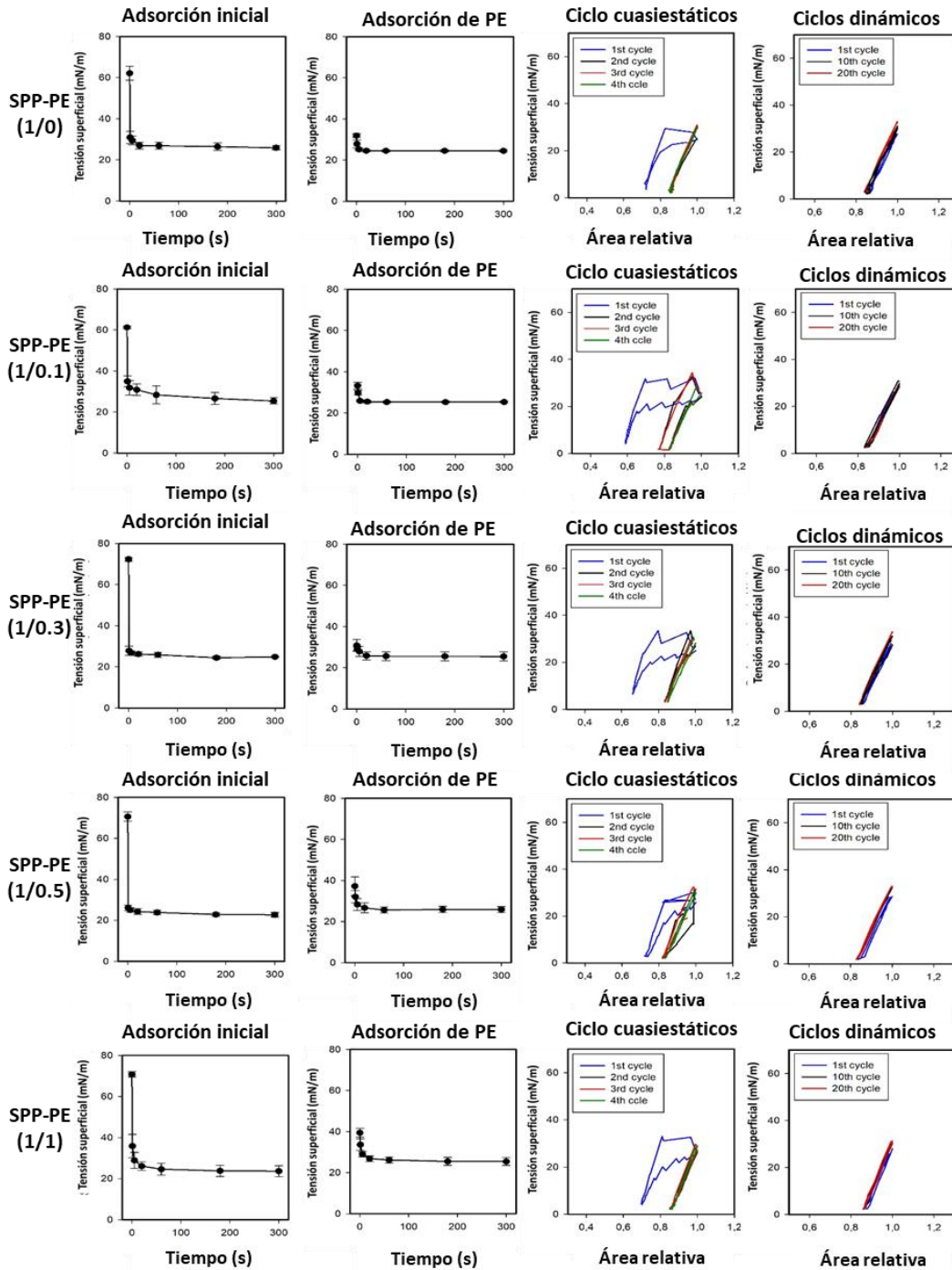


Figura 11. Efecto de la PE en la actividad superficial de SPP evaluado con el Surfactómetro de Burbuja Cautiva. Las gráficas muestran: la adsorción inicial, adsorción de PE, los ciclos cuasiestáticos y ciclos dinámicos. Las gráficas muestran el promedio y la desviación estándar de experimentos realizados por triplicado.

### Síntesis orgánica de la **1,2-dipalmitoil-*rac*-glicero-fosfoetanolamina**

La fórmula química de la PE es 1,2-dipalmitoil-*rac*-glicero-fosfoetanolamina. La ruta de síntesis se marcó con seis pasos para obtener el compuesto propuesto. Se partió de un glicerol protegido (DL-1,2- isopropilideno glicerol) que reacciono con bromuro de bencilo para obtener *rac*-4-[(benciloxi)metil]-2,2- dimetil1,3-dioxolano (**3**), rendimiento de esta reacción fue del 81%. El segundo paso fue la desprotección del glicerol bencilado (*rac*-4-[(benciloxi)metil]-2,2- dimetil1,3-dioxolano) (**4**) en condiciones acidas con ácido fórmico, el rendimiento de esta reacción fue del 49%. El tercer paso de reacción fue la esterificación con ácido palmítico y el glicerol desprotegido para obtener (*rac*-1,2-0-dipalmitoil-3-O-bencil-glicerol) (**5**) con un rendimiento de 69%. El cuarto paso de reacción fue obtener (*rac*-1,2-O-dipalmitoil-glicerol) (**6**) por medio de hidrogenación para quitar el grupo bencilo del compuesto, esta reacción demostró un rendimiento del 97%. El quinto y sexto paso de reacción fue del tipo one-pot, estos pasos de reacción partieron del (*rac*-3[(2-Oxido-1,3,2-oxazafosfolidina-2-il-oxo]oxilpropano-1,2- diil-dipalmitato) (**7,8**) con cloruro de fosforilo (POCl<sub>3</sub>) y trietilamina (Et<sub>3</sub>N) por 1 hora para obtener la molécula final **1,2-dipalmitoil-*rac*-glicero-fosfoetanolamina** con un rendimiento del 80% se determinó un punto de fusión de 192°C (Figura 12).

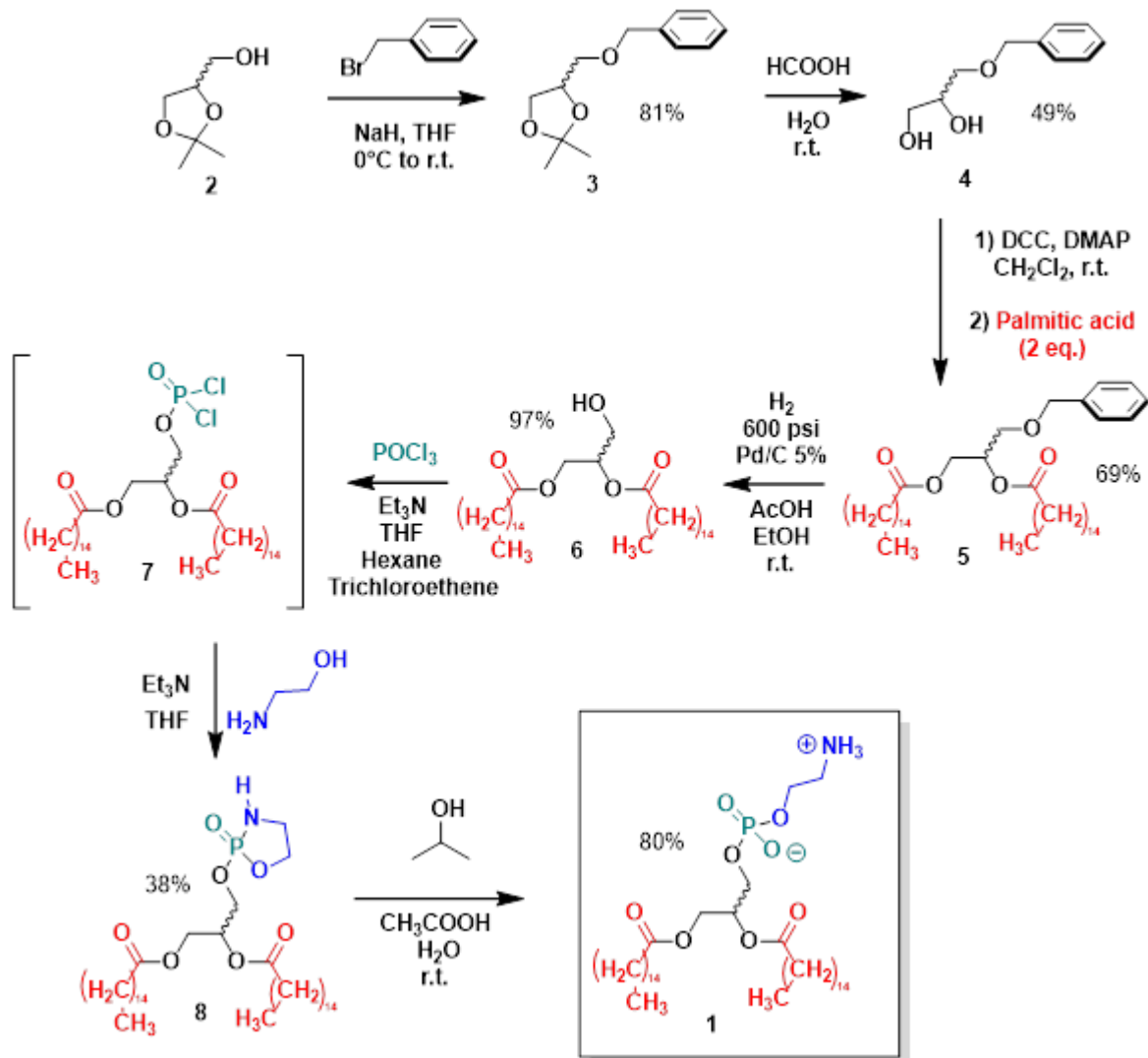


Figura 12. Esquema de la síntesis de la 1,2-dipalmitoil-*rac*-glicero-fosfoetanolamina.

## Efecto del SPP-PE en la proliferación, apoptosis y expresión de colágena en FPHN

### Evaluación de la proliferación celular

Los resultados muestran la tasa de crecimiento a las 24 horas con TGF- $\beta$  fue del  $67.72 \pm 7.12\%$  vs de SPP de  $49.47 \pm 4.35\%$   $p < 0.001^{**}$ , PE  $53.43 \pm 2.33\%$   $p < 0.001^{**}$  y SPP-PE  $48.15 \pm 7.33\%$   $p < 0.0001^{***}$ . La tasa de crecimiento a las 48 horas de TGF- $\beta$  fue del

96.65±3.28 vs de SPP fue de 49.07±4.35% p<0.001\*\*, PE 50.03±3.24 p<0.001\*\*y SPP-PE 35.04±5.07 p<0.0001\*\*\* (Figura13).

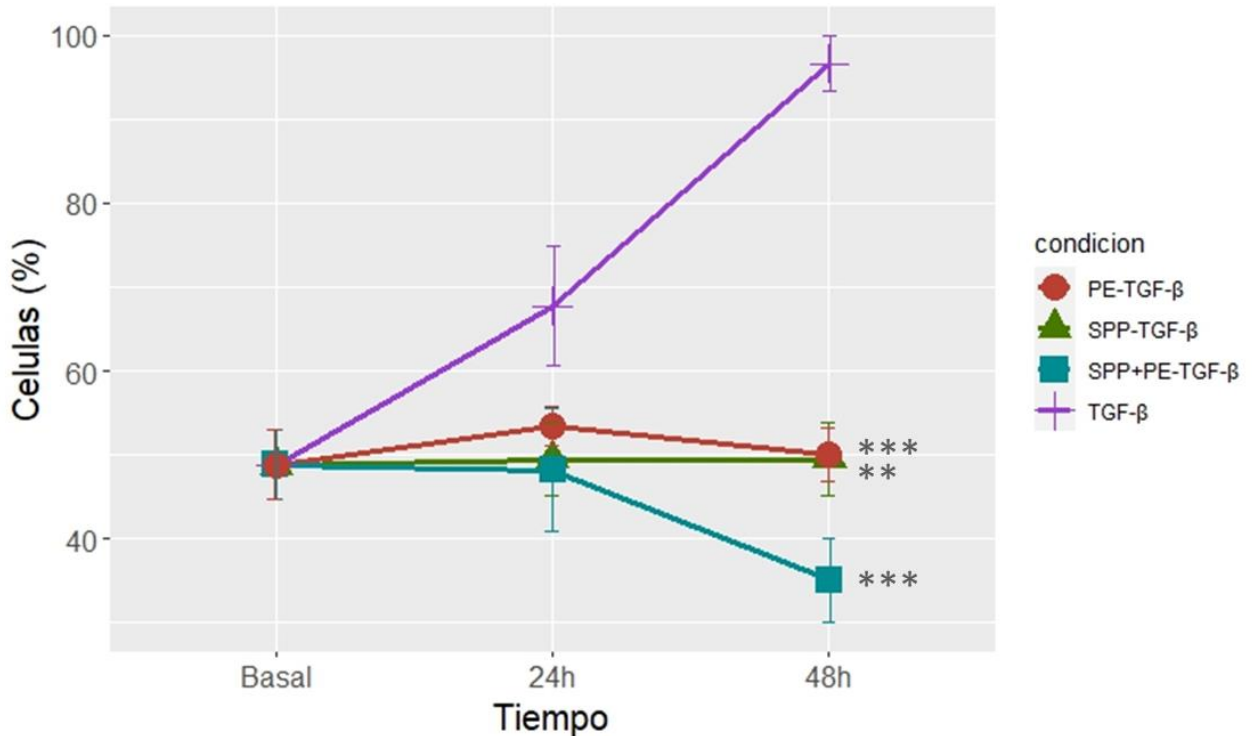


Figura 13. El SPP enriquecido con PE disminuye la proliferación celular en FPHN. La tasa de crecimiento fue evaluada con WST-2 en tres líneas celulares de FPHN a las 24 y 48 h en células a las que se les añadió TGF-β como inductor del crecimiento y proliferación celular. Los datos mostrados son de tres experimentos independientes. p<0.001\*\*, p<0.0001\*\*\*.

**Efecto de la SPP-PE en fibroblastos de pulmón humano normal, evaluación de la apoptosis por citometría de flujo**

En la FPI los fibroblastos se resisten a entrar en apoptosis, un proceso crucial para la adecuada reparación del epitelio. La apoptosis es un proceso que se puede evaluar en varios momentos durante la muerte celular. Uno de estos puntos de evaluación es la presencia de fosfatidilserina en la membrana externa, que puede ser detectada mediante el uso de anexina V. Además, el yoduro de propidio (IP) se une al material genético de una célula con membrana dañada. Ambos fluorocromos se utilizan para detectar células en estado de apoptosis tardía.

Se sembraron 50,000 células en cajas de 24 pozos, y estas células fueron expuestas a SPP, PE y SPP-PE durante 24 y 48 horas. La evaluación de la apoptosis se llevó a cabo mediante citometría de flujo, lo que permitió la valoración de la apoptosis temprana en el panel Q2-UR y la apoptosis tardía en el panel Q2-LR (Figura 14A). El

porcentaje de apoptosis celular en el grupo de control fue del  $1.94\% \pm 1.79\%$  a las 24 horas y del  $0.40\% \pm 0.40\%$  a las 48 horas, respectivamente. En comparación, en el grupo tratado con SPP, se observó un porcentaje de apoptosis del  $28.67\% \pm 3.49\%$  a las 24 horas y del  $54.83\% \pm 5.30\%$  a las 48 horas ( $p < 0.0001^{***}$ ). En el grupo tratado con PE, se registró un porcentaje de apoptosis del  $37.14\% \pm 4.41\%$  a las 24 horas y del  $55.19\% \pm 2.46\%$  a las 48 horas ( $p < 0.0001^{***}$ ). Por último, en el grupo tratado con SPP-PE, se encontró un porcentaje de apoptosis del  $41.41\% \pm 3.56\%$  a las 24 horas y del  $61.12\% \pm 8.64\%$  a las 48 horas ( $p < 0.0001^{***}$ ) (Figura 14B). La detección de la apoptosis temprana ocurre cuando la anexina V se une a la fosfatidilserina (PS) que ha translocado a la membrana externa de las células, lo que resulta en una fluorescencia teñida de color verde. Por otro lado, la apoptosis tardía se detecta mediante la unión del yoduro de propidio al material genético que ha quedado expuesto debido a la degradación de la membrana celular (Figura 14C).



### Efecto del SPP-PE en fibroblastos de pulmón humano normal sobre la expresión de colágena

Este estudio se evaluó la expresión de colágena de COL1A1 en tres líneas de FPHN las condiciones experimentales fueron: SPP, PE y SPP-PE por 24 y 48 horas. La expresión del gen de la colágena evaluado fue COL1A1 mediante RT-PCR y el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra y los valores Ct del control, el gen endógeno como control interno fue GAPDH.

El promedio de la expresión de COL1A1 a las 24 horas en el grupo de control fue de  $9 \pm 0.49 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , mientras que en el grupo de SPP fue de  $10.61 \pm 0.36 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , en el grupo de PE fue de  $10.47 \pm 1.02 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , y en el grupo de SPP-PE fue de  $7.72 \pm 0.93 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los grupos SPP y SPP-PE ( $p < 0.0001^{***}$ ), así como entre el grupo de control y el grupo SPP-PE ( $p < 0.001^{**}$ ). A las 48 horas, el promedio de expresión de COL1A1 en el grupo de control fue de  $9 \pm 0.71 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , en el grupo de SPP fue de  $9.16 \pm 0.52 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , en el grupo de PE fue de  $3.41 \pm 0.14 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , y en el grupo de SPP-PE fue de  $3.15 \pm 0.67 2^{-\Delta\Delta Ct}$ . El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos SPP y SPP-PE ( $p < 0.0001^{***}$ ), entre los grupos SPP y PE ( $p < 0.01^*$ ), y entre el grupo de control y el grupo SPP-PE ( $p < 0.001^{**}$ ).

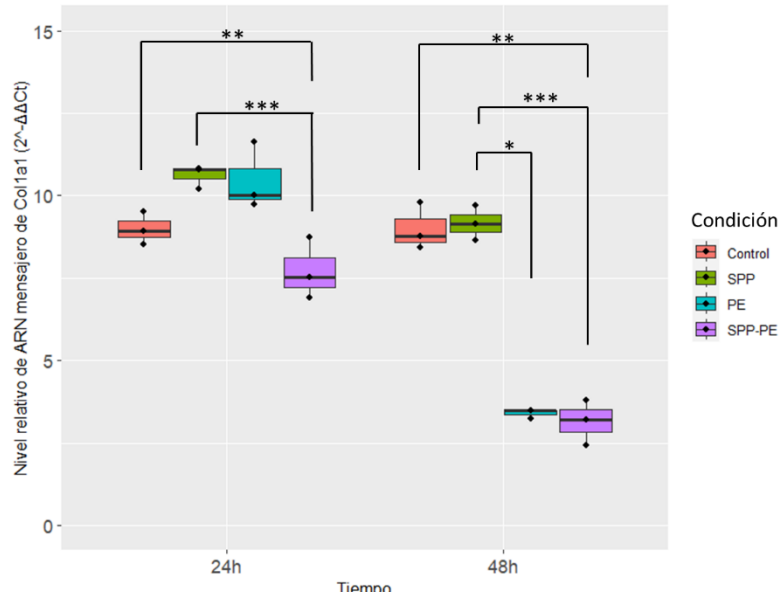


Figura 15. El efecto de la SPP enriquecida con PE en fibroblastos de pulmón humano normal sobre la expresión de colágeno (COL1A1) se determinó mediante RT-PCR. Los resultados gráficos revelan que, a las 24 y 48 horas, la combinación de SPP-PE conlleva una disminución significativa en la expresión de COL1A1 en los fibroblastos de pulmón humano normal. Es importante destacar que cuando el SPP se enriquece con PE, se potencia de manera notable su efecto inhibitor en la expresión de COL1A1

***Determinación de colágena por la cuantificación de hidroxiprolina y por medio de microfotográfico con machine learning Orbit Imagen en ratones tratados con bleomicina***

El colágeno es una proteína estructural compuesta por regiones ricas en hidroxiprolina, un aminoácido que puede cuantificarse mediante un método colorimétrico. En el grupo de control (n=9), el promedio de hidroxiprolina fue de  $2.31 \pm 0.55$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ , en comparación con el grupo de bleomicina (n=6) que registró un valor de  $3.93 \pm 0.70$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ . El análisis estadístico reveló diferencias altamente significativas ( $p < 0.001^{***}$ ) entre estos dos grupos. En el grupo que recibió tratamiento con SPP (n=2), se observó un valor de  $3.03 \pm 0.64$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de hidroxiprolina, sin diferencias significativas en comparación con el grupo de bleomicina. Por otro lado, el grupo tratado con PE (n=6) presentó un valor de  $2.75 \pm 0.81$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de hidroxiprolina, con una diferencia significativa frente al grupo de bleomicina ( $p < 0.05^*$ ). En el caso del grupo tratado con SPP-PE (n=6), se registró un valor de  $2.52 \pm 0.84$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de hidroxiprolina, con diferencias significativas en comparación con el grupo de bleomicina ( $p < 0.01^{**}$ ) (Figura 16A).

En este estudio, se empleó un programa de inteligencia artificial de código abierto llamado *Orbit Image Analysis*, el cual fue previamente entrenado para identificar fibras de colágeno con tonalidades azules. A través del modelo de análisis de datos excluyente, se determinó el porcentaje de colágeno presente en el tejido parenquimal y alrededor de los bronquios y la zona baso (Figura 16C). Los resultados revelaron diferencias significativas en los niveles de colágeno entre los grupos evaluados. El grupo de control mostró un porcentaje de colágeno del  $13.19 \pm 3.06\%$ , mientras que el grupo de bleomicina alcanzó un porcentaje de  $28.94 \pm 5.70$  ( $P < 0.0001^{***}$ ). Por su parte, el grupo tratado con SPP registró un porcentaje de  $24.01 \pm 9.31$ , el grupo de PE obtuvo un valor de  $18.57 \pm 3.97$  ( $**P < 0.001$ , en comparación con el grupo de bleomicina), y el grupo de SPP-PE presentó un porcentaje de  $20.24 \pm 3.45$  (Figura 16B).



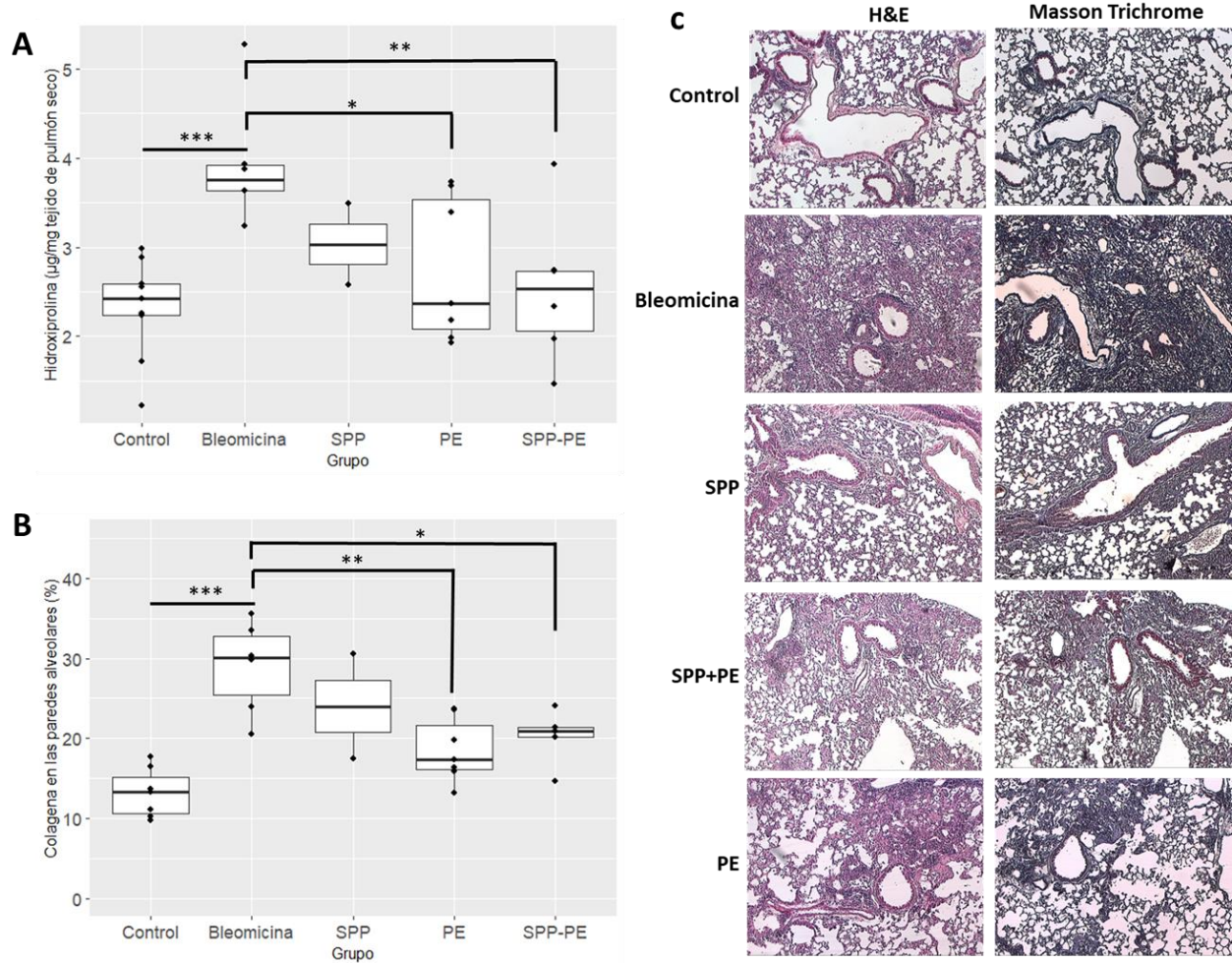


Figura 16. Efecto profiláctico del SPP-PE en un modelo de daño epitelio-alveolar con bleomicina. A) Cantidad de Hidroxiprolina. B) Porcentaje de colágena. C) Fotografías representativas de cada grupo experimental con H&E y Tricromica de Masson.

## Discusión

Los resultados de este estudio respaldan la eficacia terapéutica del SPP-PE en procesos relacionados con la fibrosis pulmonar. Se realizó el aislamiento de un SP de origen porcino, obtenido de lavados pulmonares de cerdo, al cual se le realizaron pruebas químicas, microbiológicas y biofísicas. Además, se llevó a cabo la síntesis orgánica de la 1,2-dipalmitoil-*rac*-glicero-fosfoetanolamina (PE). El SPP-PE fue evaluado en FPHN y en ratones tratados con bleomicina.

El SPP aislado a partir de lavados pulmonares de cerdo se consiguió utilizando la técnica de solubilidad diferencial con solventes orgánicos, los SP que son aislados de por esta manera tienen buena actividad en la superficie (Casals & Cañadas, 2012). Esta metodología, inspirada en el método de (Bligh & Dyer, 1959), se emplea con el propósito de capturar componentes hidrofóbicos, como las proteínas SP-B y SP-C, cuya detección se llevó a cabo mediante la técnica de Western Blot. La identificación de estas proteínas reviste gran importancia, dado que desempeñan un papel esencial en la prevención del colapso de los alvéolos pulmonares durante el proceso respiratorio, al reducir la tensión superficial en la interfaz aire-líquido de los pulmones (Liekkinen et al., 2023). El SPP se puede emplear en el tratamiento del síndrome de distrés respiratorio, ya que para tratar esta enfermedad es esencial contar con fármacos que contengan las proteínas SP-B y SP-C (Basabe-Burgos et al., 2021). Entre los componentes aislados del lavado pulmonar de cerdo, se encontraron lípidos del SP como: SM, PI, PS, PE, PG, CHOL y PC por medio de TLC. La TLC reveló la presencia de una gran cantidad de SM y PE, que podrían provenir de la sangre del pulmón del porcino. Por lo tanto, en futuros experimentos se utilizará un gradiente de NaBr (al 13% en NaCl al 0.9%) para una purificación óptima del SP (Da Silva et al., 2021).

Las pruebas microbiológicas demostraron que el SPP aislado no contenía ningún tipo de microorganismo como bacterias o hongos, por lo tanto, podemos decir que la técnica de flash a 120°C por 10 minutos en autoclave es eficiente para la esterilidad del SPP (Vázquez de Lara-Cisneros & Iturbide Flores, 1998).

El surfactante pulmonar (SP) está principalmente compuesto por fosfolípidos. Por ende, se emplearon dos técnicas para medir su concentración. La primera técnica utilizó

un kit para cuantificar la PC. En esta metodología, se llevó a cabo una reacción acoplada a una enzima para hidrolizar la PC y liberar colina. Luego, la colina se oxidó utilizando la sonda OxiRed para generar una absorbancia. El resultado obtenido para la concentración de PC fue de 181.66 nM/ $\mu$ L. Además, se aplicó la técnica de Ames para cuantificar el contenido total de fósforo en diferentes lotes. El promedio de la cuantificación fue de 137.27 $\pm$ 36.76 mg/mL (Ames, 1966). El objetivo de determinar la cantidad total de fósforo es para ajustar la concentración de fosfolípidos deseados para cada experimento. Una vez realizado el análisis químico y microbiológico se procedió a realizar las pruebas biofísicas del SPP y PE.

La actividad del SP se caracteriza por tres propiedades esenciales durante la respiración: 1) rápida adsorción en la interfaz aire/fluido alveolar, 2) reorganización de la película interfacial en la exhalación para reducir la tensión superficial y 3) propagación eficiente de los lípidos durante la inhalación subsiguiente. Estas propiedades previenen el colapso de los alvéolos. En este estudio se evaluó las propiedades biofísicas del SPP-PE. Las condiciones experimentales consistieron en la adición gradual de PE a SPP.

Durante la evaluación de las fases de transición por medio de calorimetría, se observó un incremento en la  $T_m$  aparente a medida que se incorporaba PE al SPP, lo que llevaba a la transición del estado gel al estado líquido, mientras que la  $\Delta H$  iba disminuyendo. El aumento de la  $T_m$  aparente podría deberse a la presencia de ácidos grasos, específicamente el ácido palmítico, en la estructura de la PE saturada (Tlatelpa-Romero et al., 2023). Un ejemplo de otro lípido saturado perteneciente al SP con una alta  $T_m$  es la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), esto es relevante porque las cadenas de ácido palmítico pueden ser empaquetadas a una densidad muy alta en la interfaz aire-agua, lo que proporciona la importante reducción de las tensiones superficiales necesaria para prevenir el colapso alveolar al final de la espiración (Casals & Cañadas, 2012).

Las isotermas de compresión han resultado ser una herramienta fundamental para comprender la respuesta del SP a la compresión lateral en la superficie alveolar durante la respiración. En esencia, nos permiten analizar cómo varía la tensión superficial en la interfaz aire-líquido a medida que las moléculas del surfactante pulmonar se comprimen en la superficie alveolar. Estas isotermas suelen dividirse en cuatro regiones distintas en

un gráfico: la región I, que corresponde a la monocapa y  $\pi \leq 40$  mN/m; la región II, abarca la transición de monocapa a multicapa en el rango de  $40 \leq \pi \leq 50$  mN/m; la región III, que engloba la multicapa y  $\pi \geq 50$  mN/m; y la región IV, que se refiere al colapso (Baoukina & Tieleman, 2011; Keating et al., 2012; Zhang et al., 2011). Durante el primer ciclo el SPP-PE (1/0) alcanzó un colapso a una  $\pi$  de aproximadamente  $\sim 57$  mN/m, una cifra comparable al colapso observado en otro SP conocido como Surfacten obtenido por lavado pulmonar de cerdo, que alcanzó una presión de colapso de  $\sim 56$  mN/m (Pérez-Gil, 2022; Verwijlen et al., 2014). El SPP que contiene PE alcanza una  $\pi$  de colapso de  $\sim 68$ , lo cual es muy similar a las obtenidas con otros surfactantes pulmonares comerciales como Survanta, Curosurf o BLES (El-Gendy et al., 2013). Por lo tanto, podemos decir que la adición de PE a SPP mejora la dinámica respiratoria durante los ciclos de compresión-expansión la cual tiene que abarcar un rango de  $\pi$  de 45 a 70 mN/m durante la exhalación es decir durante la compresión de la película esto cobra relevancia desde un punto de vista fisiológico (Li et al., 2023a; Schief et al., 2003).

Un elemento crucial en la biofísica del SP es la formación de dominios que contribuyen a la estabilidad de la película de superficie y a la reducción de la tensión superficial. En este estudio, evaluamos la formación de estos dominios utilizando la fluorescencia con Rodamina-DPPE y observándolos a través de un microscopio de fluorescencia. La formación de dominios con SPP-PE (1/0) comenzó a ser visible a una tensión superficial de 4 mN/m y se volvió más abundante en dominios a 32 mN/m. La aparición de numerosos dominios de forma circular, característicos de la coexistencia de fases de cristal líquido ordenadas y desordenadas, desempeña un papel importante en el mantenimiento de una película interfacial estable (Casals & Cañadas, 2012). Conforme se añadía PE a SPP, pudimos observar la formación de dominios de mayor tamaño y una estructura de tipo 'ramificada', característica de la fase condensada que se produce durante la mezcla de dos sustancias. Este fenómeno se ha observado previamente en mezclas de DPPC y dimiristoilfosfatidiletanolamina (Discher et al., 1999; Weidemann & Vollhardt, 1995). Además, la PE por sí sola también mostró la presencia de dominios, aunque en menor cantidad y de menor tamaño. Estos resultados indican que la PE en el SPP favorece la formación de dominios más grandes. Es importante destacar que la

formación de dominios se debe también a la presencia de las proteínas estructurales SP-B y SP-C.

El surfactómetro de burbuja cautiva es útil para probar otras propiedades físicas importantes del sistema del SP, como la rápida formación de películas, la baja compresibilidad de las películas y la efectiva reposición de las mismas durante la expansión (Schürch et al., 2001). En este estudio, hemos demostrado que el SPP reduce la tensión superficial en cuestión de segundos después de su aplicación en la película interfacial, lo que demuestra un comportamiento óptimo. En los primeros ciclos cuasiestáticos se observa una mayor histéresis en comparación con los ciclos posteriores. En cuanto a los ciclos dinámicos, muestran un funcionamiento normal, ya que logran una reducción del área y una tensión superficial baja. Este comportamiento también se ha observado en otros surfactantes obtenidos mediante extracción orgánica, como es el caso de Surfacen (Lugones et al., 2018). Además, observamos que la adición gradual de PE al SPP no afectaba la composición ni el comportamiento de la película interfacial del SPP; de hecho, la optimizaba en comparación con el SPP sin la adición de PE. Estos datos concuerdan con los experimentos previamente discutidos.

Es fundamental destacar que el SP es esencial para la vida, especialmente en enfermedades pulmonares como la FPI, donde se produce una restricción en la función respiratoria (Y. M. Liu et al., 2017, 2017; Pardo & Selman, 2021; Wolters et al., 2014). En esta enfermedad, se ha observado una asociación entre genes del SP que podrían contribuir al desarrollo y progresión de la enfermedad, tales como los genes SFTPA1, SFTPA2, SFTPC, ABCA3 y NKX2-1 (Ban et al., 2007; Carre et al., 2009; Lin et al., 2018; Tlatelpa-Romero et al., 2022). Además, en la FPI la presencia del SP resulta crucial para mantener la homeostasis alveolar, dado que el parénquima alveolar se vuelve rígido debido a la acumulación de colágeno madura en el intersticio, característico del proceso de fibrosis. Estudios previos han demostrado que el SP reduce la proliferación celular (Thomassen et al., 1996), induce la expresión de la colagenasa-1, reduce la expresión de colágeno e induce la apoptosis en los fibroblastos pulmonares (Vazquez-De-Lara et al., 2000). Uno de los componentes del SP que induce este efecto es la PE (Vazquez-de-Lara et al., 2018b).



En este estudio, evaluamos la proliferación celular estimulada por TGF- $\beta$ , un factor clave en el desarrollo de la FPI. El TGF- $\beta$  puede estimular la proliferación celular y por lo tanto la producción de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular, estos datos provienen del análisis de tejido de pacientes con diagnóstico de FPI. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que SPP y PE son capaces de disminuir la proliferación celular, y el efecto sinérgico de SPP y PE en la reducción de la proliferación en células estimuladas con TGF- $\beta$ . Los tratamientos aprobados por la FDA para tratar la FPI se dirigen a la inhibición de este factor de crecimiento (Bi et al., 2021). Además, se demostró que SPP-PE inducen apoptosis y disminuyen la expresión de colágeno (Col1a) de manera dosis dependiente (Tlatelpa-Romero et al., 2023; Vazquez-de-Lara et al., 2018a). A continuación, proponemos un posible mecanismo de acción de SPP-PE en la proliferación, apoptosis y expresión de colágena I. El TGF- $\beta$  se une a su receptor ligando por la vía canónica y activa a MEK1/2 mediante fosforilación; luego, MEK1/2 fosforilado activa ERK1/2 por fosforilación. El ERK fosforilado se internaliza en el núcleo para activar genes de la matriz extracelular, como alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) o colágeno (Col1a) (Lopez-Rodriguez et al., 2016). Previamente en el laboratorio, se comprobó que SP induce una señal de Ca<sup>2+</sup> intracelular, y el principal componente que induce este efecto es PE (Vazquez-de-Lara et al., 2018a). Esta señal de Ca<sup>2+</sup> se activa mediante la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular del retículo endoplásmico por los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3Rs) fosforilados y la entrada de Ca<sup>2+</sup> al espacio citosólico (Guzmán-Silva et al., 2015). También, se comprobó que la disminución inducida por PE en la expresión de colágeno se atenuó al bloquear la fosfolipasa C (PLC). La PLC se activa a través de dos vías: por los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que requiere de la separación de la subunidad  $\alpha$  y  $\beta/\gamma$  para que esta subunidad de lugar a PLC o directamente a IP3 y por los receptores de tirosina quinasa (RTK) que se puede activar por autofosforilación iniciando cascadas de señalización intracelular que regulan diversas funciones celulares, como la proliferación, la diferenciación y la supervivencia (Bae\* & Schlessinger, 2010). En los sitios autofosforilados se une a la proteína 2 asociada al receptor del factor de crecimiento GRB2-SOS, SOS facilita el intercambio de guanina nucleótidos en RAS que estimula la liberación de guanosina difosfato (GDP) y favorece la unión de guanosina trifosfato (GTP) a RAS, activándolo RAS-GTP que después activará a PLC (Feng et al., 2019). En otros

estudios, se ha caracterizado el mecanismo molecular por el cual PE tiene un efecto en la disminución de la proliferación y apoptosis en células cancerígenas. La PE aumenta la actividad de dos fosfatasas, Proteína Fosfatasa 2A (PP2A) y proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), que desfosforilan a MEK y, por ende, a ERK fosforilado (Kaku et al., 2014) bloqueando la internalización de ERK al núcleo (Bae\* & Schlessinger, 2010). En otro estudio han reportado que PE bloquea ERK, que fosforila BCL-2 una proteína antiapoptótica, y aumenta Bax una proteína proapoptótica. Esto resulta en la disminución del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), liberación de citocromo C previamente por la activación de la caspasa-3 (Xue et al., 2014) (Figura 17).

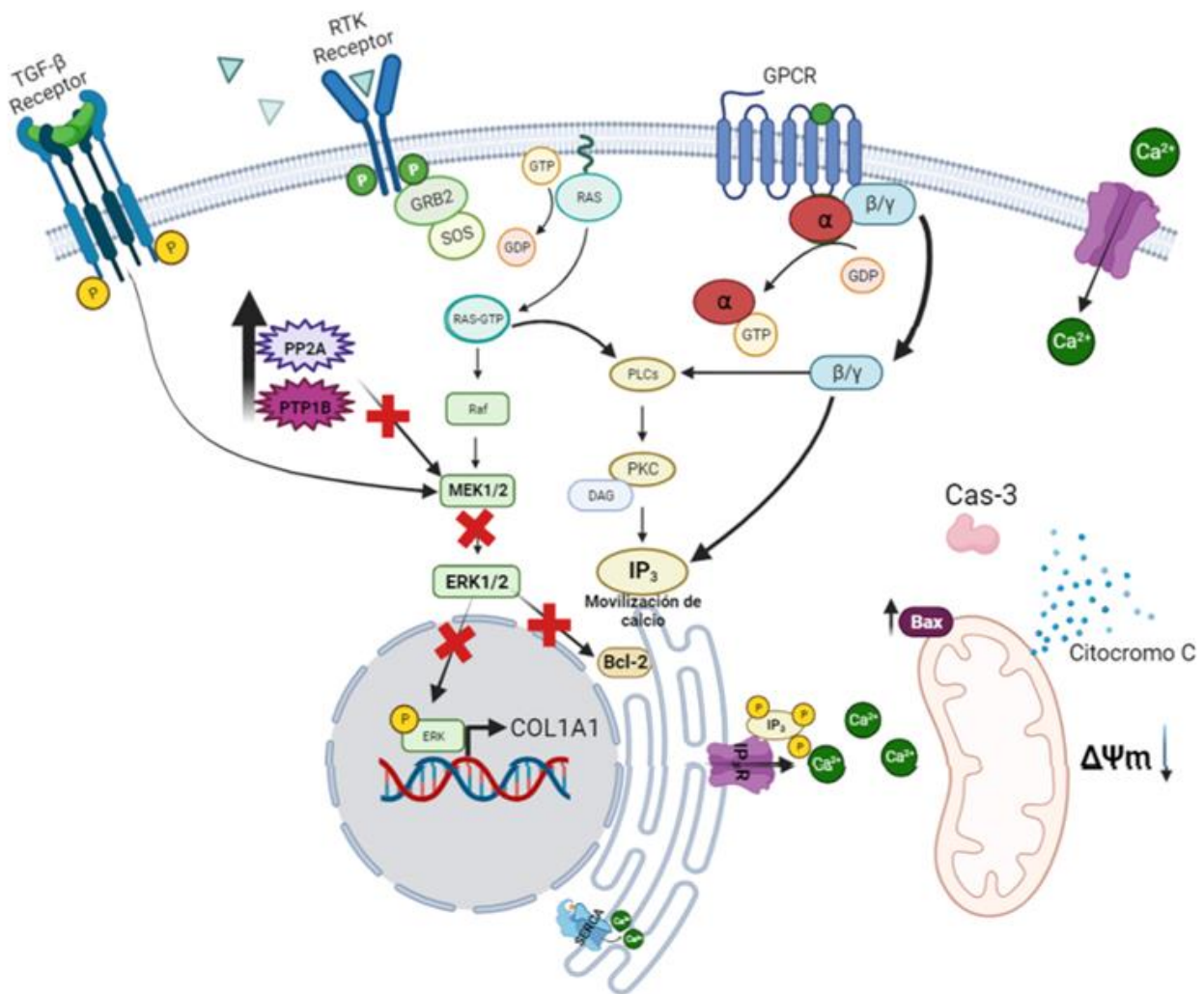


Figura 17. Mecanismo de acción de PE como principal componente del SPP en la disminución de la proliferación, inductor de apoptosis e inhibición de la expresión de colágena (COL1A1). La PE ejerce su acción en la vía de

señalización de TGF- $\beta$  induce una señal de Ca<sup>2+</sup> intracelular, mediada por la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico y la entrada de Ca<sup>2+</sup> al citosol a través de los receptores IP3Rs fosforilados. La PE también disminuye la expresión de colágeno mediante la inhibición de PLC, bloqueando así la señalización de proliferación y apoptosis. Además, PE activa fosfatasa, desfosforilando MEK y ERK, afectando la internalización nuclear de ERK y regulando la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas como BCL-2 y Bax.

En el modelo de bleomicina, confirmamos la reducción de colágeno mediante la cuantificación de hidroxiprolina, un aminoácido presente en el colágeno, y la tinción tricrómica de Masson, que resalta las fibras de colágeno en azul brillante en ratones tratados con PE y SPP-PE. Este modelo en ratones ofrece datos esenciales para progresar en la investigación y tratamiento de la fibrosis pulmonar (Della Latta et al., 2017; Hatipoglu et al., 2021; T. Liu et al., 2017).

### **Fortalezas del estudio**

En esta investigación, se creó un SPP con una sólida actividad biofísica y una PE obtenida mediante síntesis orgánica. Ambos componentes demostraron inducir los efectos biológicos esperados en FPHN estimulados con TGF- $\beta$  y en el modelo murino de fibrosis pulmonar con bleomicina. Los resultados obtenidos son coherentes tanto en el modelo *in vivo* como *in vitro*, destacando la consistencia en los hallazgos entre ambas configuraciones experimentalmente.

### **Debilidades**

El SPP aislado de lavados pulmonares de cerdo contiene concentraciones considerables de SM y PE, por lo que se sugiere la utilización de un gradiente de NaBr-NaCl para preservar los componentes del SP en concentraciones nativas. Se propone la síntesis de una PE insaturada, ya que la PE obtenida con ácido palmítico es saturada, para evaluar su actividad biológica, considerando que el SP contiene tanto componentes saturados como insaturados, además de sintetizar PE enantioméricamente pura partiendo de un isómero *R* de glicerol, ya que es probable que su actividad sea mejor que la racémica.

El SPP, derivado de fuentes animales, plantea posibles implicaciones inmunológicas debido a la presencia de péptidos de las proteínas SP-B y SP-C. Estos péptidos podrían activar la respuesta inmune humoral de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Las células CD4, también conocidas como células T cooperadoras, desempeñan un papel



crucial al reconocer péptidos presentados en la superficie de las células presentadoras de antígenos. Una vez activadas, estas células CD4<sup>+</sup> liberan señales y citocinas que estimulan a las células B, promoviendo la producción de anticuerpos esenciales para la respuesta humoral. Estos anticuerpos tienen la capacidad de dirigirse y neutralizar los antígenos presentes en los fármacos que contienen péptidos de origen animal. Por lo tanto, se sugiere abordar cuidadosamente estos aspectos antes de aplicar el SPP, ya sea solo o enriquecido con PE, en seres humanos.

Aunque este estudio se centró en la proliferación, apoptosis y expresión de colágeno, se sugiere evaluar las vías moleculares involucradas en la FPI y la PE, como las vías MAP, RTK y GPCR, así como la vía de las caspasas. Además, se recomienda evaluar otras moléculas de interés en el modelo murino, como la fibronectina,  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  y las interleucinas inflamatorias.

### **Conclusión**

- El SPP analizado contiene en su composición SP-B y SP-C que son indispensables para su funcionalidad.
- El SPP analizado contiene SM, PI, PS, PE, PG, colesterol y PC, estos componentes le dan al SPP su propiedad de disminuir la tensión superficial.
- La incorporación de la PE en el SPP mantuvo la presión superficial en los ciclos de comprensión-expansión.
- El incremento de PE en SPP evidenció la formación de dominios más extensos, lo que sugiere la posibilidad de que estos actúen de manera sinérgica.
- La ruta de síntesis de seis pasos es una vía corta para la obtención de PE que puede ser escalada eficiente a nivel industrial.
- El SPP-PE muestra efectos significativos en los FPHN, disminuyendo la proliferación, induciendo apoptosis y reduciendo de manera dependiente del tiempo y la dosis la expresión de colágeno.
- La PE y SPP-PE atenúa el daño epitelial causado por la bleomicina.

## Bibliografía

- Akella, A., & Deshpande, S. B. (2013). Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51(1), 5-22.
- Allinger, N. L. (1976). Organic Chemistry: Stereochemistry. En W. publishers Inc. (Ed.), *Organic chemistry: Stereoisomerism* (Second). <https://doi.org/10.1002/9780470608852>
- Almlén, A., Stichtenoth, G., Linderholm, B., Haegerstrand-Björkman, M., Robertson, B., Johansson, J., & Curstedt, T. (2008). Surfactant proteins B and C are both necessary for alveolar stability at end expiration in premature rabbits with respiratory distress syndrome. *Journal of Applied Physiology*, 104(4), 1101-1108. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00865.2007>
- Ames, B. N. (1966). [10] Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. En *Methods in Enzymology* (Vol. 8, pp. 115-118). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(66\)08014-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(66)08014-5)
- Antoniou, K. M., Margaritopoulos, G. A., Tomassetti, S., Bonella, F., Costabel, U., & Poletti, V. (2014). Interstitial lung disease. *European Respiratory Review*, 23(131), 40-54. <https://doi.org/10.1183/09059180.00009113>
- Autilio, C., & Pérez-Gil, J. (2018). Understanding the principle biophysics concepts of pulmonary surfactant in health and disease. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, fetalneonatal-2018-315413. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2018-315413>
- Bae\*, J. H., & Schlessinger, J. (2010). Asymmetric Tyrosine Kinase Arrangements in Activation or Autophosphorylation of Receptor Tyrosine Kinases. *Molecules and Cells*, 29(5), 443-448. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0080-5>
- Ban, N., Matsumura, Y., Sakai, H., Takanezawa, Y., Sasaki, M., Arai, H., & Inagaki, N. (2007). ABCA3 as a Lipid Transporter in Pulmonary Surfactant Biogenesis\*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13), 9628-9634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611767200>

- Baoukina, S., & Tieleman, D. P. (2011). Lung surfactant protein SP-B promotes formation of bilayer reservoirs from monolayer and lipid transfer between the interface and subphase. *Biophysical Journal*, *100*(7), 1678-1687. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.019>
- Basabe-Burgos, O., Landreh, M., Rising, A., Curstedt, T., & Jan Johansson. (2021). Treatment of Respiratory Distress Syndrome with Single Recombinant Polypeptides that Combine Features of SP-B and SP-C. *ACS Chemical Biology*, *16*(12), 2864-2873. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00816>
- Batenburg, J. J., & Haagsman, H. P. (1998). The lipids of pulmonary surfactant: Dynamics and interactions with proteins. *Progress in Lipid Research*, *37*(4), 235-276. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(98\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(98)00011-3)
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Borie, R., Danel, C., Debray, M.-P., Taille, C., Dombret, M.-C., Aubier, M., Epaud, R., & Crestani, B. (2011). Pulmonary alveolar proteinosis. *European Respiratory Review*, *20*(120), 98-107. <https://doi.org/10.1183/09059180.00001311>
- Calkovska, A., Linderholm, B., Haegerstrand-björkman, M., & Curstedt, T. (2012). *Properties of modified natural surfactant after exposure to fibrinogen in vitro and in an animal model of respiratory distress syndrome*. *72*(3). <https://doi.org/10.1038/pr.2012.80>
- Calzada, E., Onguka, O., & Claypool, S. M. (2016a). Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. En *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 321, pp. 29-88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.001>
- Calzada, E., Onguka, O., & Claypool, S. M. (2016b). Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. En *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 321). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.001>

- Cañadas, O., & Casals, C. (2013). Differential Scanning Calorimetry of Protein–Lipid Interactions. En J. H. Kleinschmidt (Ed.), *Lipid-Protein Interactions* (Vol. 974, pp. 55-71). Humana Press.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-62703-275-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-275-9_4)
- Cañadas, O., García-García, A., Prieto, M. A., & Pérez-Gil, J. (2021). Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Pulmonary Drug Delivery: Interaction with Lung Surfactant. *Nanomaterials*, *11*(6), 1482.  
<https://doi.org/10.3390/nano11061482>
- Carre, A., Szinnai, G., Castanet, M., Sura-Trueba, S., Tron, E., Broutin-L’Hermite, I., Barat, P., Goizet, C., Lacombe, D., Moutard, M.-L., Raybaud, C., Raynaud-Ravni, C., Romana, S., Ythier, H., Leger, J., & Polak, M. (2009). Five new TTF1/NKX2.1 mutations in brain-lung-thyroid syndrome: Rescue by PAX8 synergism in one case. *Human Molecular Genetics*, *18*(12), 2266-2276.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp162>
- Casals, C., & Cañadas, O. (2012). Role of lipid ordered/disordered phase coexistence in pulmonary surfactant function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1818*(11), 2550-2562.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.024>
- Chavarha, M., Khoojinian, H., Schulwitz, L. E., Biswas, S. C., Rananavare, S. B., & Hall, S. B. (2010). Hydrophobic surfactant proteins induce a phosphatidylethanolamine to form cubic phases. *Biophysical journal*, *98*(8), 1549-1557. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.4302>
- Cheng, K. H., Virtanen, J., & Somerharju, P. (2012). Calorimetric behavior of phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine bilayers is compatible with the superlattice model. *The journal of physical chemistry. B*, *116*(6), 1802-1811.  
<https://doi.org/10.1021/jp2078488>
- Chronos, Z. C., Sever-Chroneos, Z., & Shepherd, V. L. (2010). Pulmonary surfactant: An immunological perspective. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, *25*(1), 13-26. <https://doi.org/10.1159/000272047>

- Crouch, E., Persson, A., Chang, D., & Heuser, J. (1994). Molecular structure of pulmonary surfactant protein D (SP-D). *Journal of Biological Chemistry*, 269(25), 17311-17319.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32556-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32556-5)
- Da Silva, E., Autilio, C., Hougaard, K. S., Baun, A., Cruz, A., Perez-Gil, J., & Sørli, J. B. (2021). Molecular and biophysical basis for the disruption of lung surfactant function by chemicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1863(1), 183499.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183499>
- Della Latta, V., Cabiati, M., Burchielli, S., Frenzilli, G., Bernardeschi, M., Cecchetti, A., Viglione, F., Morales, M.-A., & Del Ry, S. (2017). Lung inflammation after bleomycin treatment in mice: Selection of an accurate normalization strategy for gene expression analysis in an ex-vivo and in-vitro model. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 88, 145-154.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.05.016>
- deMello, D. E., Heyman, S., Phelps, D. S., & Floros, J. (1993). Immunogold localization of SP-A in lungs of infants dying from respiratory distress syndrome. *The American Journal of Pathology*, 142(5), 1631-1640.
- Discher, B. M., Schief, W. R., Vogel, V., & Hall, S. B. (1999). Phase Separation in Monolayers of Pulmonary Surfactant Phospholipids at the Air–Water Interface: Composition and Structure. *Biophysical Journal*, 77(4), 2051-2061. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77046-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77046-3)
- Echaide, M., Autilio, C., Arroyo, R., & Perez-Gil, J. (2017). Restoring pulmonary surfactant membranes and films at the respiratory surface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(9, Part B), 1725-1739. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.015>
- Echaide, M., Autilio, C., López-Rodríguez, E., Cruz, A., & Pérez-Gil, J. (2020). In Vitro Functional and Structural Characterization of A Synthetic Clinical Pulmonary Surfactant with Enhanced Resistance to Inhibition. *Scientific Reports*, 10(1), 1385. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58248-4>

El-Gendy, N., Kaviratna, A., Berkland, C., & Dhar, P. (2013). Delivery and performance of surfactant replacement therapies to treat pulmonary disorders. *Therapeutic Delivery*, 4(8), 951-980.  
<https://doi.org/10.4155/tde.13.72>

Feghali-Bostwick, C. A., Tsai, C. G., Valentine, V. G., Kantrow, S., Stoner, M. W., Pilewski, J. M., Gadgil, A., George, M. P., Gibson, K. F., Choi, A. M. K., Kaminski, N., Zhang, Y., & Duncan, S. R. (2007). Cellular and humoral autoreactivity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(4), 2592-2599.

Feng, J., Armillei, M. K., Yu, A. S., Liang, B. T., Runnels, L. W., & Yue, L. (2019). Ca<sup>2+</sup> Signaling in Cardiac Fibroblasts and Fibrosis-Associated Heart Diseases. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 6(4), 34. <https://doi.org/10.3390/jcdd6040034>

Guagliardo, R., Pérez-Gil, J., De Smedt, S., & Raemdonck, K. (2018). Pulmonary surfactant and drug delivery: Focusing on the role of surfactant proteins. *Journal of Controlled Release*, 291, 116-126.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.10.012>

Günther, A., Korfei, M., Mahavadi, P., von der Beck, D., Ruppert, C., & Markart, P. (2012). Unravelling the progressive pathophysiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 21(124), 152-160.  
<https://doi.org/10.1183/09059180.00001012>

Halliday, H. L. (2017). The fascinating story of surfactant. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 53(4), 327-332. <https://doi.org/10.1111/jpc.13500>

Hatipoglu, O. F., Uctepe, E., Opoku, G., Wake, H., Ikemura, K., Ohtsuki, T., Inagaki, J., Gunduz, M., Gunduz, E., Watanabe, S., Nishinaka, T., Takahashi, H., & Hirohata, S. (2021). Osteopontin silencing attenuates bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis by regulating epithelial–mesenchymal transition. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111633.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111633>

- Kainu, V., Hermansson, M., Hänninen, S., Hokynar, K., & Somerharju, P. (2013). Import of phosphatidylserine to and export of phosphatidylethanolamine molecular species from mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, 1831(2), 429-437.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2012.11.003>
- Keating, E., Zuo, Y. Y., Tadayyon, S. M., Petersen, N. O., Possmayer, F., & Veldhuizen, R. A. W. (2012). A modified squeeze-out mechanism for generating high surface pressures with pulmonary surfactant. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1818(5), 1225-1234.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.007>
- Li, G., Xu, X., & Zuo, Y. Y. (2023a). Biophysical function of pulmonary surfactant in liquid ventilation. *Biophysical Journal*, 122(15), 3099-3107. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.06.014>
- Li, G., Xu, X., & Zuo, Y. Y. (2023b). Langmuir-Blodgett transfer from the oil-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 630(Pt B), 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.10.063>
- Liekkinen, J., Olżyńska, A., Cwiklik, L., Bernardino de la Serna, J., Vattulainen, I., & Javanainen, M. (2023). Surfactant Proteins SP-B and SP-C in Pulmonary Surfactant Monolayers: Physical Properties Controlled by Specific Protein-Lipid Interactions. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 39(12), 4338-4350. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c03349>
- Lin, Z., Thorenoor, N., Wu, R., DiAngelo, S. L., Ye, M., Thomas, N. J., Liao, X., Lin, T. R., Warren, S., & Floros, J. (2018). Genetic Association of Pulmonary Surfactant Protein Genes, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SFTPC, and SFTPD With Cystic Fibrosis. *Frontiers in Immunology*, 9.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02256>
- Liu, T., De Los Santos, F. G., & Phan, S. H. (2017). The Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis. En L. Rittié (Ed.), *Fibrosis* (Vol. 1627, pp. 27-42). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_2)

- Liu, Y. M., Nepali, K., & Liou, J. P. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis: Current status, recent progress, and emerging targets. *Journal of Medicinal Chemistry*, *60*(2), 527-553.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00935>
- Lugones, Y., Blanco, O., López-Rodríguez, E., Echaide, M., Cruz, A., & Pérez-Gil, J. (2018). Inhibition and counterinhibition of Surfacten, a clinical lung surfactant of natural origin. *PLoS One*, *13*(9), e0204050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204050>
- Madhukaran, S. P., Kishore, U., Jamil, K., Choolani, M., & Lu, J. (2015). Decidual expression and localization of human surfactant protein SP-A and SP-D, and complement protein C1q. *Molecular Immunology*, *66*(2), 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.001>
- Nakahara, H., Hirano, C., & Shibata, O. (2013). Two-component Langmuir monolayers and LB films of DPPC with partially fluorinated alcohol (F8H9OH). *Journal of Oleo Science*, *62*(12), 1029-1039.  
<https://doi.org/10.5650/jos.62.1029>
- Obladen, M. (2005). History of Surfactant up to 1980. *Biology of the Neonate*, *87*(4), 308-316.  
<https://doi.org/10.1159/000084878>
- Olmeda, B., García-Álvarez, B., & Pérez-Gil, J. (2013). Structure–function correlations of pulmonary surfactant protein SP-B and the saposin-like family of proteins. *European Biophysics Journal*, *42*(2-3), 209-222. <https://doi.org/10.1007/s00249-012-0858-9>
- Pardo, A., & Selman, M. (2021). The Interplay of the Genetic Architecture, Aging, and Environmental Factors in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *64*(2), 163-172. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0373PS>
- Parra, E., & Pérez-gil, J. (2015). *Composition , structure and mechanical properties de fi ne performance of pulmonary surfactant membranes and fi lms*. *185*, 153-175.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.09.002>



- Pérez-Gil, J. (2008). Structure of pulmonary surfactant membranes and films: The role of proteins and lipid–protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(7), 1676-1695. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.05.003>
- Pérez-Gil, J. (2022). A recipe for a good clinical pulmonary surfactant. *Biomedical Journal*, 45(4), 615-628. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2022.03.001>
- Perez-Gil, J., & Weaver, T. E. (2010). Pulmonary Surfactant Pathophysiology: Current Models and Open Questions. *Physiology*, 25(3), 132-141. <https://doi.org/10.1152/physiol.00006.2010>
- Phelps, D. S., Umstead, T. M., Mejia, M., Carrillo, G., Pardo, A., & Selman, M. (2004). Increased surfactant protein-A levels in patients with newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 125(2), 617-625.
- Plasencia, I., Cruz, A., Casals, C., & Pérez-Gil, J. (2001). Superficial disposition of the N-terminal region of the surfactant protein SP-C and the absence of specific SP-B-SP-C interactions in phospholipid bilayers. *Biochemical Journal*, 359(Pt 3), 651-659.
- Raja, M. (2011). Do small headgroups of phosphatidylethanolamine and phosphatidic acid lead to a similar folding pattern of the K(+) channel? *The Journal of membrane biology*, 242(3), 137-143. <https://doi.org/10.1007/s00232-011-9384-4>
- Schief, W. R., Antia, M., Discher, B. M., Hall, S. B., & Vogel, V. (2003). Liquid-Crystalline Collapse of Pulmonary Surfactant Monolayers. *Biophysical Journal*, 84(6), 3792-3806.
- Schürch, S., Bachofen, H., & Possmayer, F. (2001). Surface activity in situ, in vivo, and in the captive bubble surfactometer. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 129(1), 195-207. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00316-6](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00316-6)
- Sinha, S. K., Lacaze-Masmonteil, T., Valls i Soler, A., Wiswell, T. E., Gadzinowski, J., Hajdu, J., Bernstein, G., Sanchez-Luna, M., Segal, R., Schaber, C. J., Massaro, J., & d'Agostino, R. (2005). A Multicenter, Randomized, Controlled Trial of Lucinactant Versus Poractant Alfa Among Very Premature Infants

at High Risk for Respiratory Distress Syndrome. *PEDIATRICS*, 115(4), 1030-1038.

<https://doi.org/10.1542/peds.2004-2231>

Sosnowski, T. R., Kubski, P., & Wojciechowski, K. (2017). New experimental model of pulmonary surfactant for biophysical studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 519, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.06.044>

Sun, Y., Yang, R., Zhong, J., Fang, F., Jiang, J., Liu, M., & Lu, J. (2009). Aerosolised surfactant generated by a novel noninvasive apparatus reduced acute lung injury in rats. *Critical care (London, England)*, 13(2), R31. <https://doi.org/10.1186/cc7737>

Thomassen, M. J., Antal, J. M., Barna, B. P., Divis, L. T., Meeker, D. P., & Wiedemann, H. P. (1996). Surfactant downregulates synthesis of DNA and inflammatory mediators in normal human lung fibroblasts. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 270(1), L159-L163. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.270.1.L159>

Tlatempa-Romero, B., Cázares-Ordoñez, V., Oyarzábal, L. F., & Vázquez-de-Lara, L. G. (2022). The Role of Pulmonary Surfactant Phospholipids in Fibrotic Lung Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 326. <https://doi.org/10.3390/ijms24010326>

Tlatempa-Romero, B., Contreras-Cruz, D. A., Guerrero-Luna, G., Hernández-Linares, M. G., Ruiz-Salgado, S., Mendoza-Milla, C., Romero, Y., Paredes, R. de-la-Rosa, Oyarzábal, L. F., Mendoza-Sámano, D. A., Galván-León, J. A., & Vázquez-de-Lara, L. G. (2023). Organic synthesis of 1,2-dipalmitoyl-rac-glycero-3-phosphatidylethanolamine and its effect on the induction of apoptosis in normal human lung fibroblasts. *Chemistry and Physics of Lipids*, 105349. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2023.105349>

Tuck, S. (2011). Extracellular vesicles: Budding regulated by a phosphatidylethanolamine translocase. *Current biology : CB*, 21(24), R988-90. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.009>

- Urzua, U., Tapia, V., Geraldo, M. P., Selman, A., Vega, M., & Romero, C. (2012). Nerve growth factor stimulates cellular proliferation of human epithelial ovarian cancer. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*, 44(9), 656-661.  
<https://doi.org/10.1055/s-0032-1304617>
- van der Veen, J. N., Kennelly, J. P., Wan, S., Vance, J. E., Vance, D. E., & Jacobs, R. L. (2017). The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1859(9, Part B), 1558-1572.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.04.006>
- Vance, J. E., & Tasseva, G. (2013). Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1831(3), 543-554.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbali.2012.08.016>
- Vázquez de Lara-Cisneros, L. G., & Iturbide Flores, V. (1998). Aislamiento de sustancia tensioactiva de pulmones de cerdo. Análisis químico y evaluación in vitro e in vivo de la actividad de superficie. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 55(1), 4-10.
- Vazquez-De-Lara, L. G., Becerril, C., Montan, M., Ramos, C., Maldonado, V., Mele, J., Phelps, D. S., Pardo, A., Selman, M. S., Lara, D., Becerril, C., Ramos, C., Maldonado, V., Me-, J., Phelps, D. S., & Pardo, A. (2000). Surfactant components modulate fibroblast apoptosis and type I collagen and collagenase-1 expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, 950-957.
- Vazquez-de-Lara, L. G., Tlatelpa-Romero, B., Romero, Y., Fernández-Tamayo, N., Vazquez-de-Lara, F., M Justo-Janeiro, J., Garcia-Carrasco, M., de-la-Rosa Paredes, R., Cisneros-Lira, J. G., Mendoza-Milla, C., Moccia, F., & Berra-Romani, R. (2018a). Phosphatidylethanolamine Induces an Antifibrotic Phenotype in Normal Human Lung Fibroblasts and Ameliorates Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), E2758.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19092758>

- Vazquez-de-Lara, L. G., Tlatelpa-Romero, B., Romero, Y., Fernández-Tamayo, N., Vazquez-de-Lara, F., M Justo-Janeiro, J., Garcia-Carrasco, M., de-la-Rosa Paredes, R., Cisneros-Lira, J. G., Mendoza-Milla, C., Moccia, F., & Berra-Romani, R. (2018b). Phosphatidylethanolamine Induces an Antifibrotic Phenotype in Normal Human Lung Fibroblasts and Ameliorates Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Mice. *International journal of molecular sciences*, *19*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092758>
- Verwijlen, T., Imperiali, L., & Vermant, J. (2014). Separating viscoelastic and compressibility contributions in pressure-area isotherm measurements. *Advances in Colloid and Interface Science*, *206*, 428-436. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.09.005>
- Wang, F., Meng, W., Wang, B., & Qiao, L. (2014). Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Letters*, *345*(2), 196-202. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.016>
- Weidemann, G., & Vollhardt, D. (1995). Long range tilt orientational order in phospholipid monolayers: A comparison of the order in the condensed phases of dimyristoylphosphatidylethanolamine and dipalmitoylphosphatidylcholine. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *100*, 187-202. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(95\)03162-7](https://doi.org/10.1016/0927-7757(95)03162-7)
- Willis, B. C., Liebler, J. M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A. G., Crandall, E. D., du Bois, R. M., & Borok, Z. (2005). Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: Potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*, *166*(5), 1321-1332.
- Wilson, M. S., & Wynn, T. A. (2009). Pulmonary fibrosis: Pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal immunology*, *2*(2), 103-121. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.85>
- Wolters, P. J., Collard, H. R., & Jones, K. D. (2014). Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Annual review of pathology*, *9*, 157-179. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104706>
- Wright, J. R., & Carolina, N. (2005). *IMMUNOREGULATORY FUNCTIONS OF SURFACTANT PROTEINS*. *5*(January), 58-68. <https://doi.org/10.1038/nri1528>

Yao, Y., Huang, C., Li, Z.-F., Wang, A.-Y., Liu, L.-Y., Zhao, X.-G., Luo, Y., Ni, L., Zhang, W.-G., & Song, T.-S.

(2009). Exogenous phosphatidylethanolamine induces apoptosis of human hepatoma HepG2 cells via the bcl-2/bax pathway. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 15(14), 1751-1758.

<https://doi.org/10.3748/wjg.15.1751>

Zambelli, V., Bellani, G., Amigoni, M., Grassi, A., Scanziani, M., Farina, F., Latini, R., & Pesenti, A. (2015).

The effects of exogenous surfactant treatment in a murine model of two-hit lung injury.

*Anesthesia and analgesia*, 120(2), 381-388. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000549>

Zhang, H., Wang, Y. E., Fan, Q., & Zuo, Y. Y. (2011). On the Low Surface Tension of Lung Surfactant.

*Langmuir*, 27(13), 8351-8358. <https://doi.org/10.1021/la201482n>

Zuo, Y. Y., Veldhuizen, R. A. W., Neumann, A. W., Petersen, N. O., & Possmayer, F. (2008). Current

perspectives in pulmonary surfactant—Inhibition, enhancement and evaluation. *Biochimica et*

*biophysica acta*, 1778(10), 1947-1977. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.03.021>

## Anexo

Figure S1.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of *rac*-4-[(Benzyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane (3)

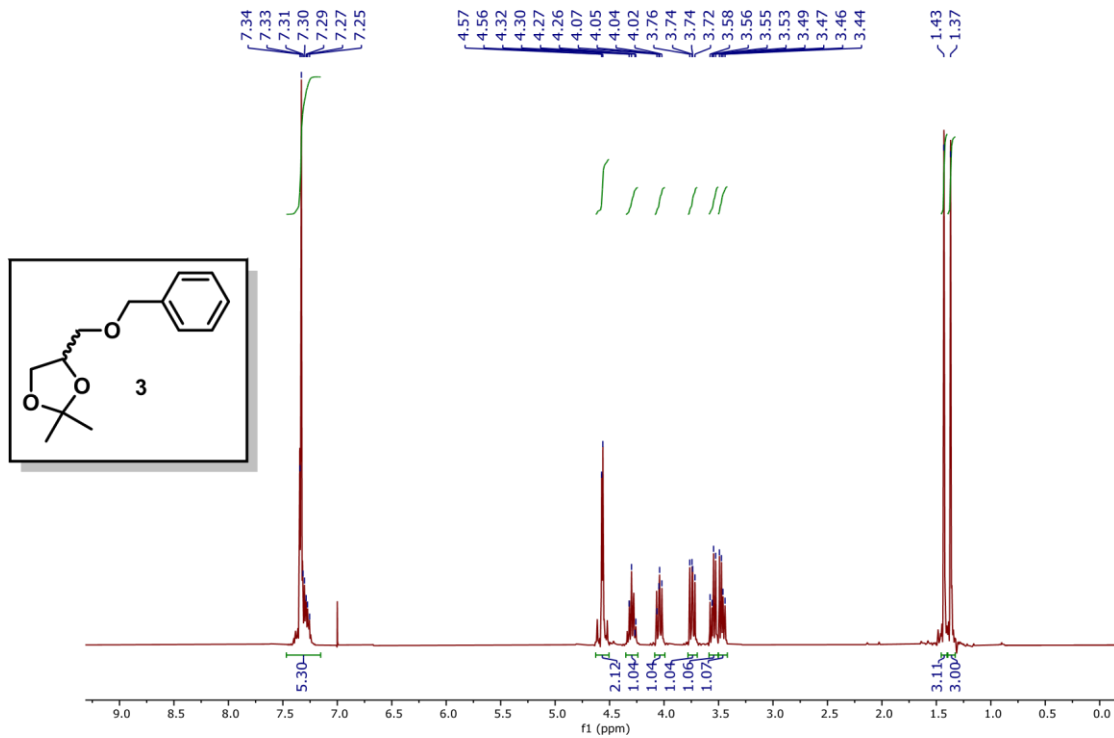


Figure S2.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of *rac*-4-[(Benzyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3dioxolane (3)

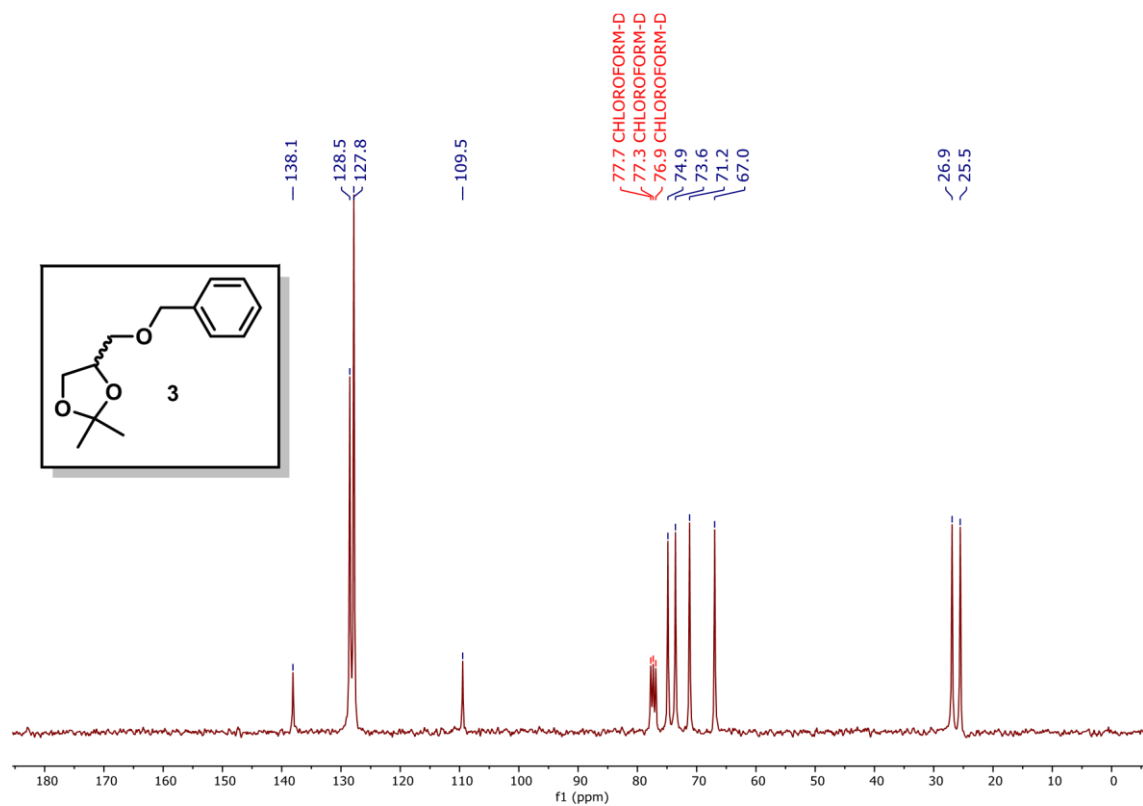


Figure S3.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of *rac*-3-(Benzyloxy)propane-1,2-diol (4)

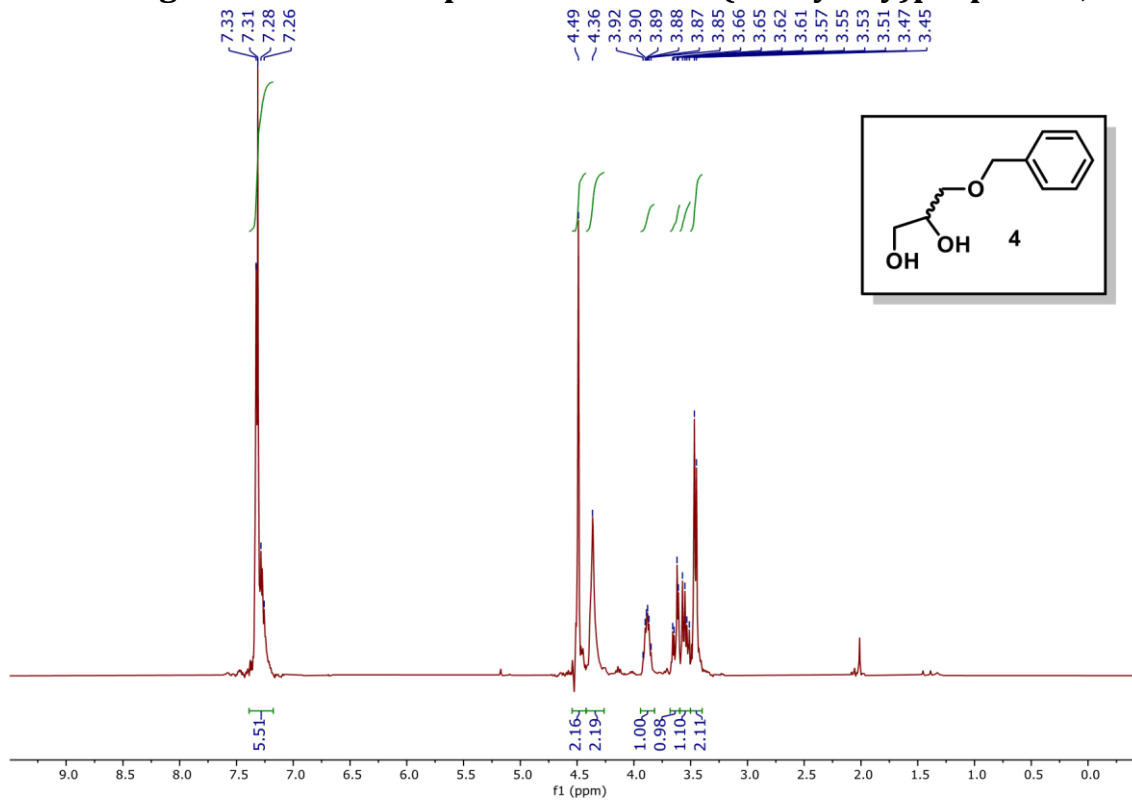


Figure S4.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of *rac*-3-(Benzyloxy)propane-1,2-diol (4)



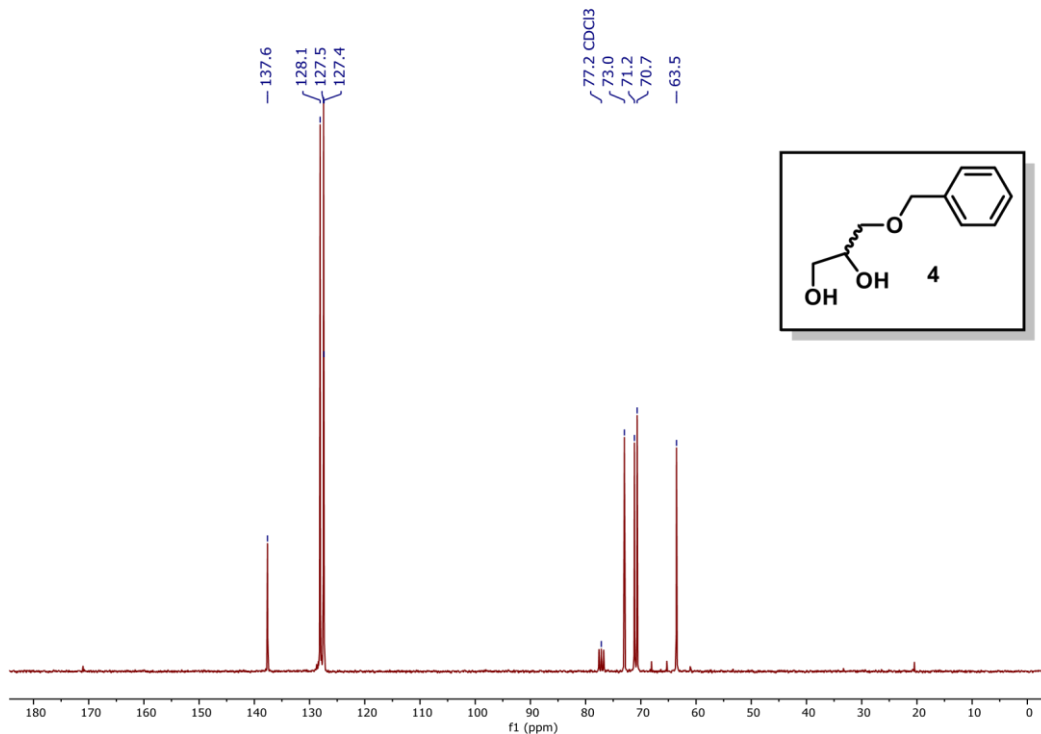
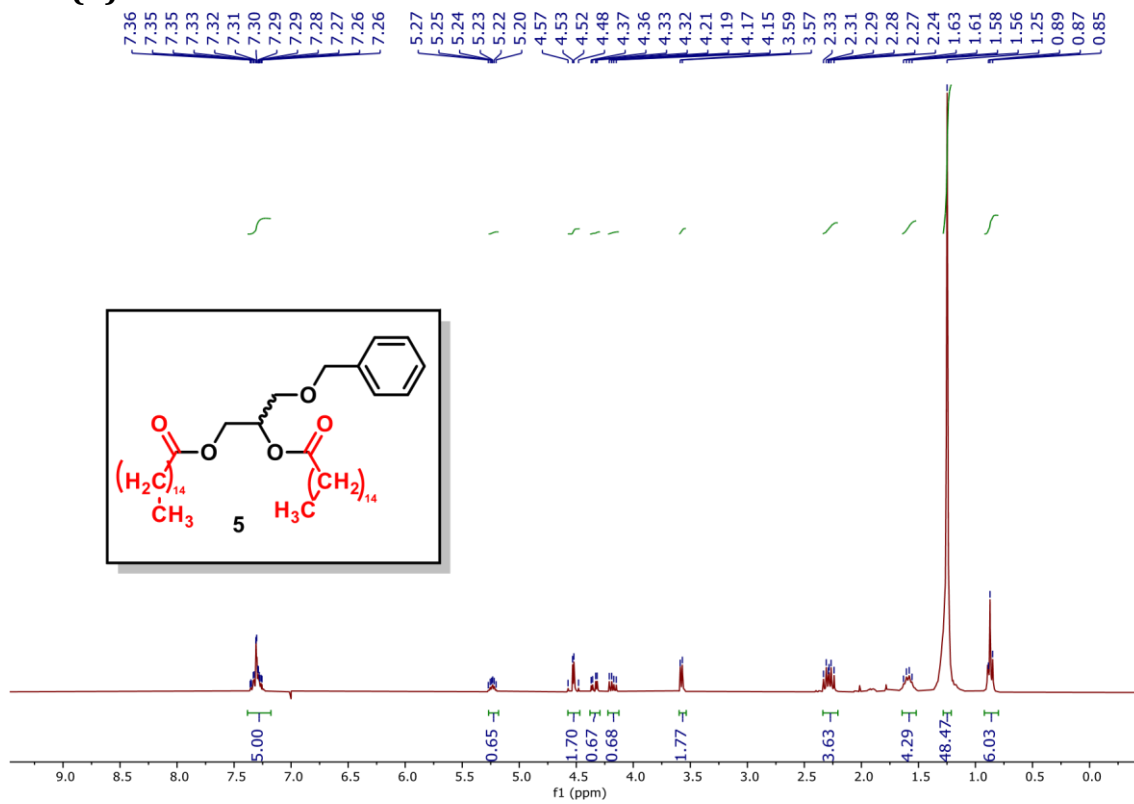


Figure S5. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of *rac*-1,2-*O*-dipalmitoyl-3-*O*-benzyl-glycerol (5)



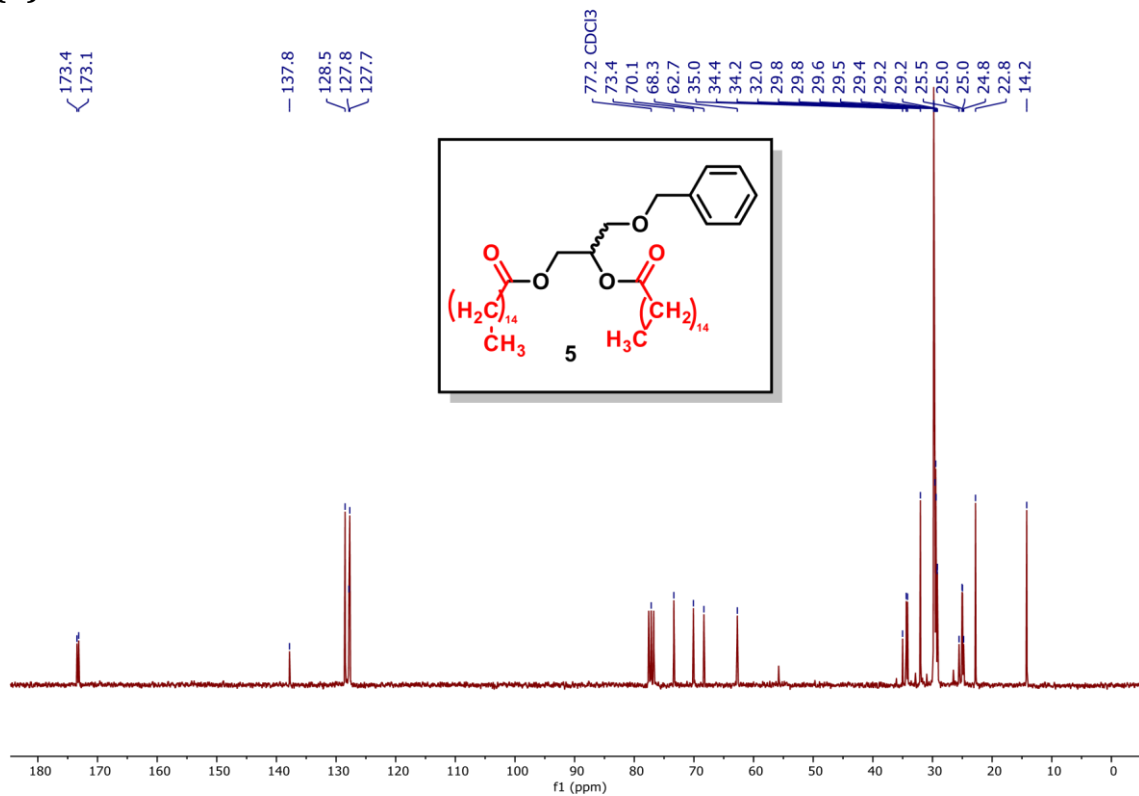
**Figure S6.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of *rac*-1,2-*O*-Dipalmitoyl-3-*O*-benzyl-glycerol (5)**

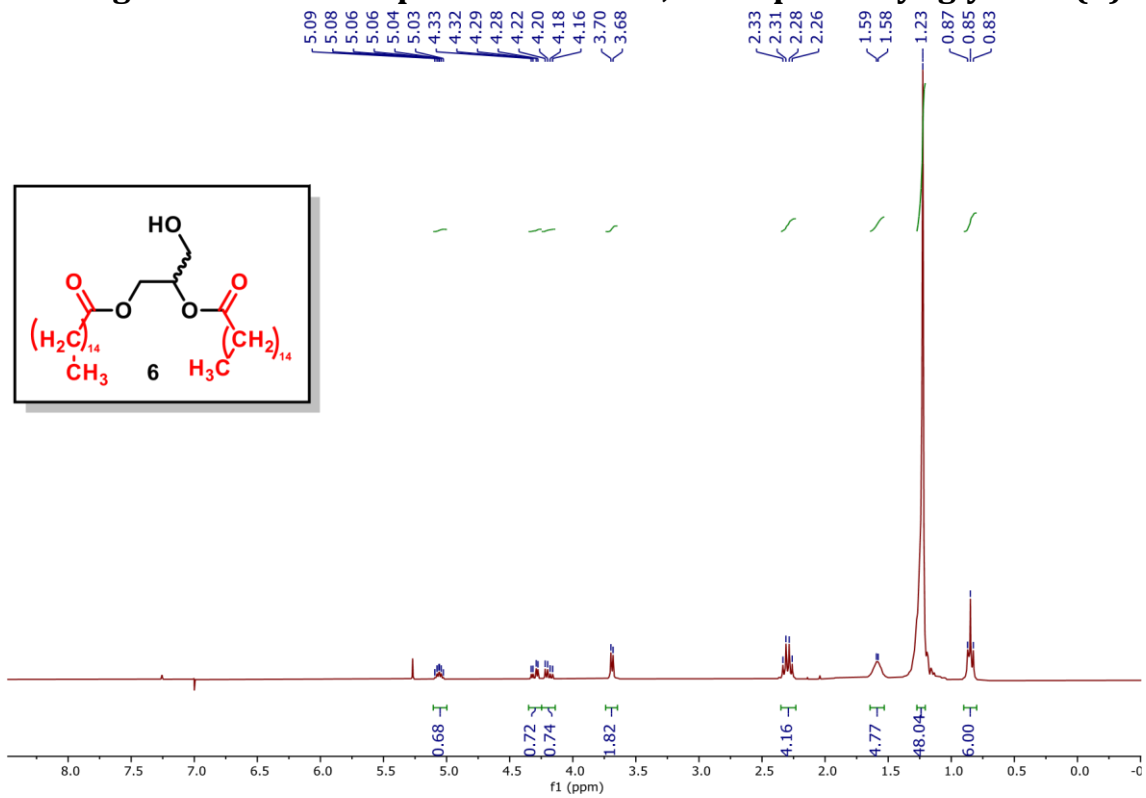
Figure S7.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of *rac*-1,2-*O*-Dipalmitoyl-glycerol (6)

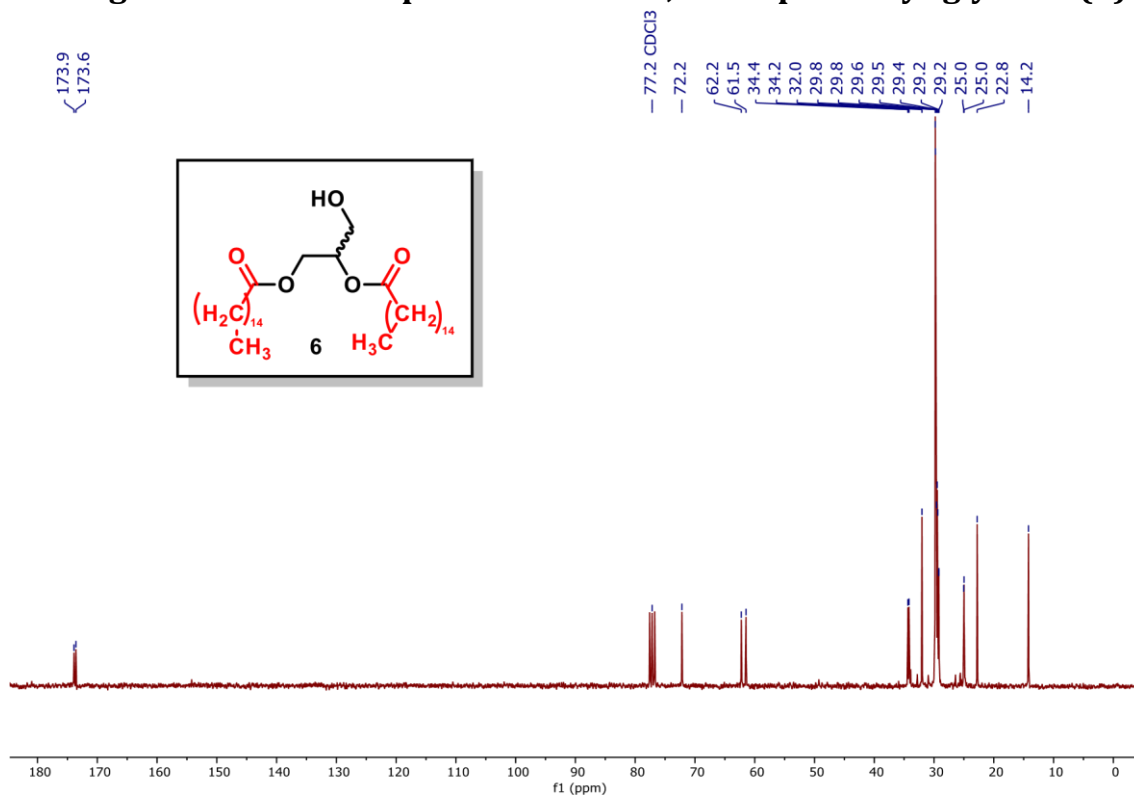
Figure S8.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of *rac*-1,2-*O*-Dipalmitoyl-glycerol (6)

Figure S9.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of *rac*-3-[(2-Oxido-1,3,2-oxazaphospholidin-2yl)oxy]propan-1,2-diyl dipalmitate (8)

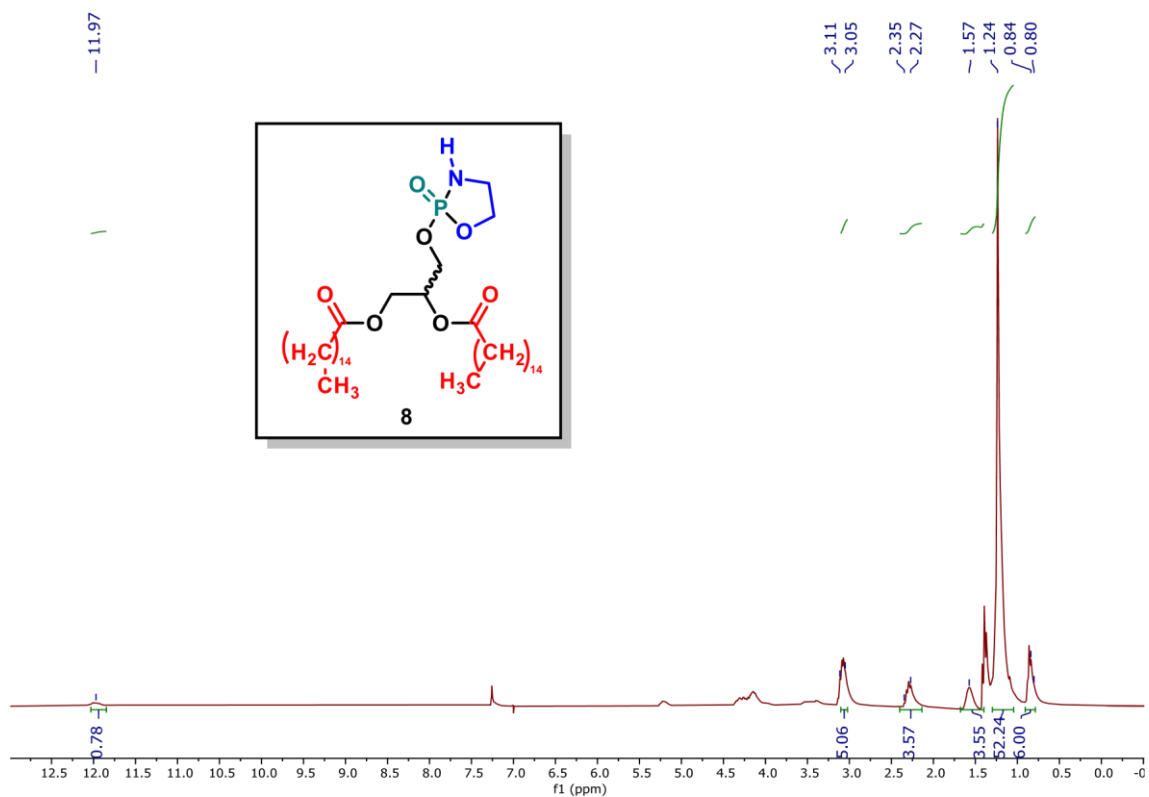
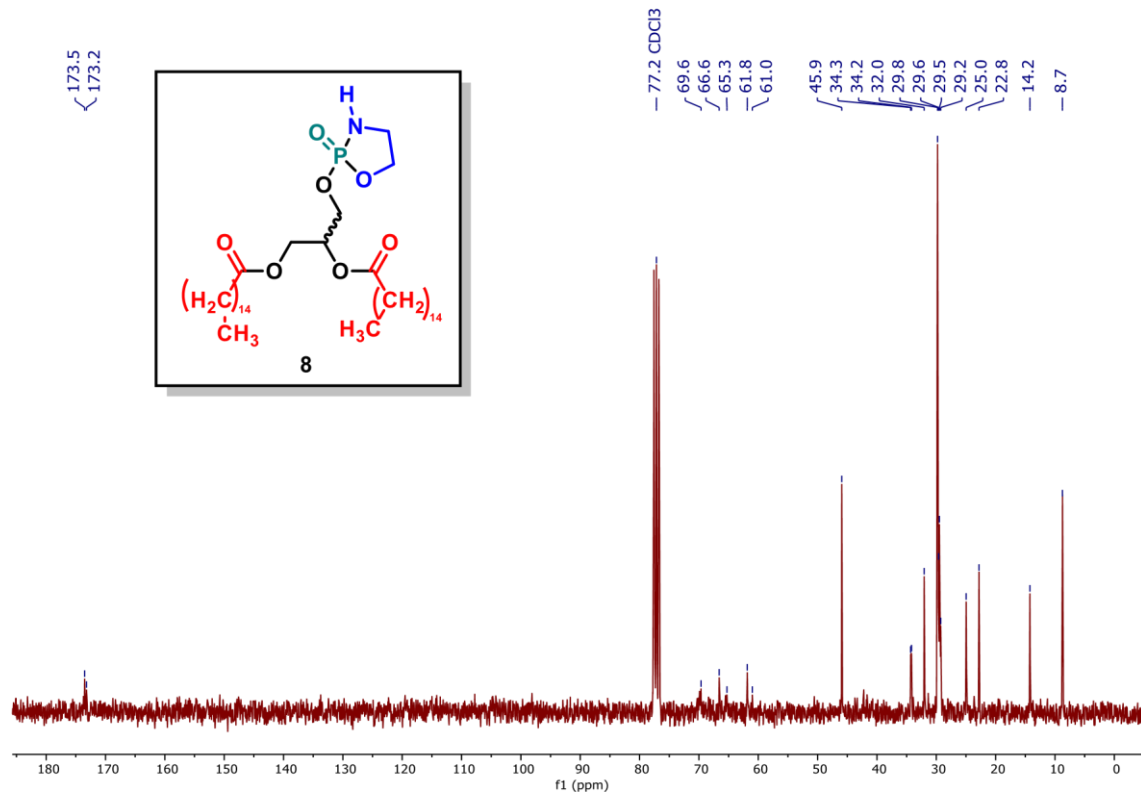


Figure S10.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of *rac*-3-[(2-Oxido-1,3,2-oxazaphospholidin-2yl)oxy]propan-1,2-diyl dipalmitate (8)



**<sup>1</sup>H-NMR spectrum of *rac*-1,2-*O*-Dipalmitoyl-glicero-3-phosphoethanolamine (1)**

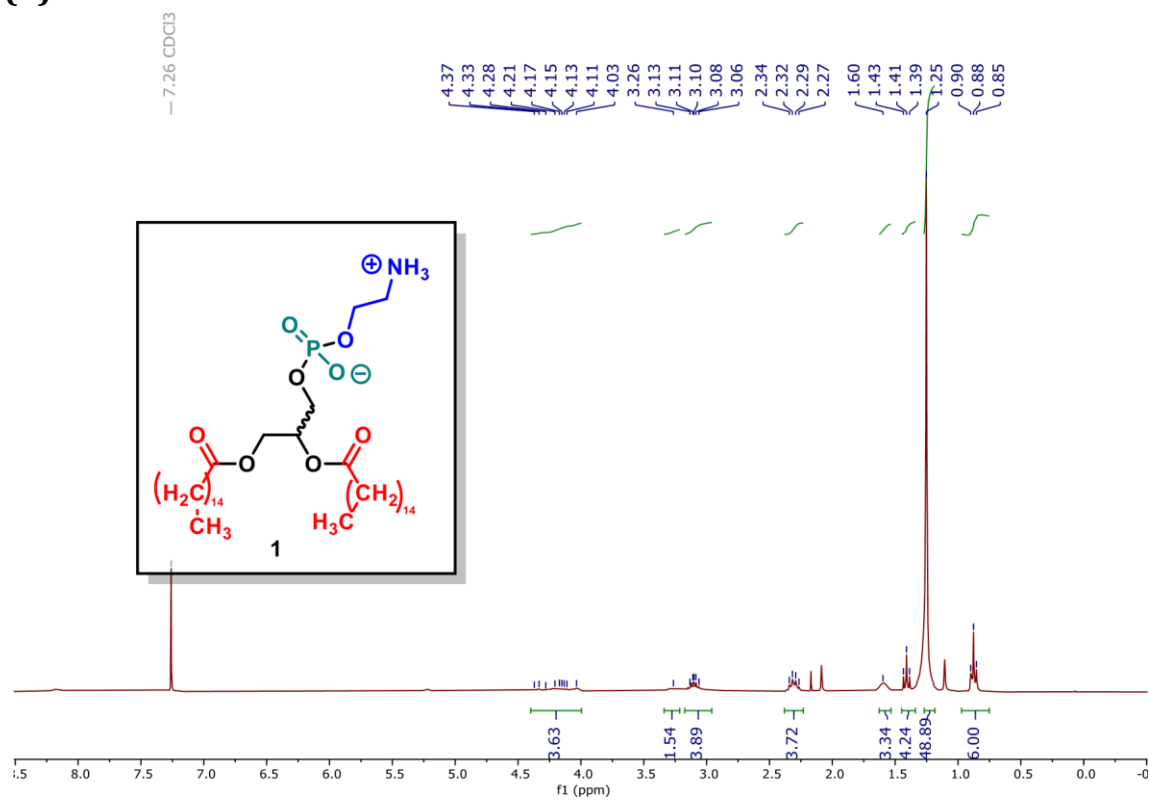


Figure S12.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of 1,2-*O*-Dipalmitoyl-*rac*-glycero-3phosphoethanolamine (1)

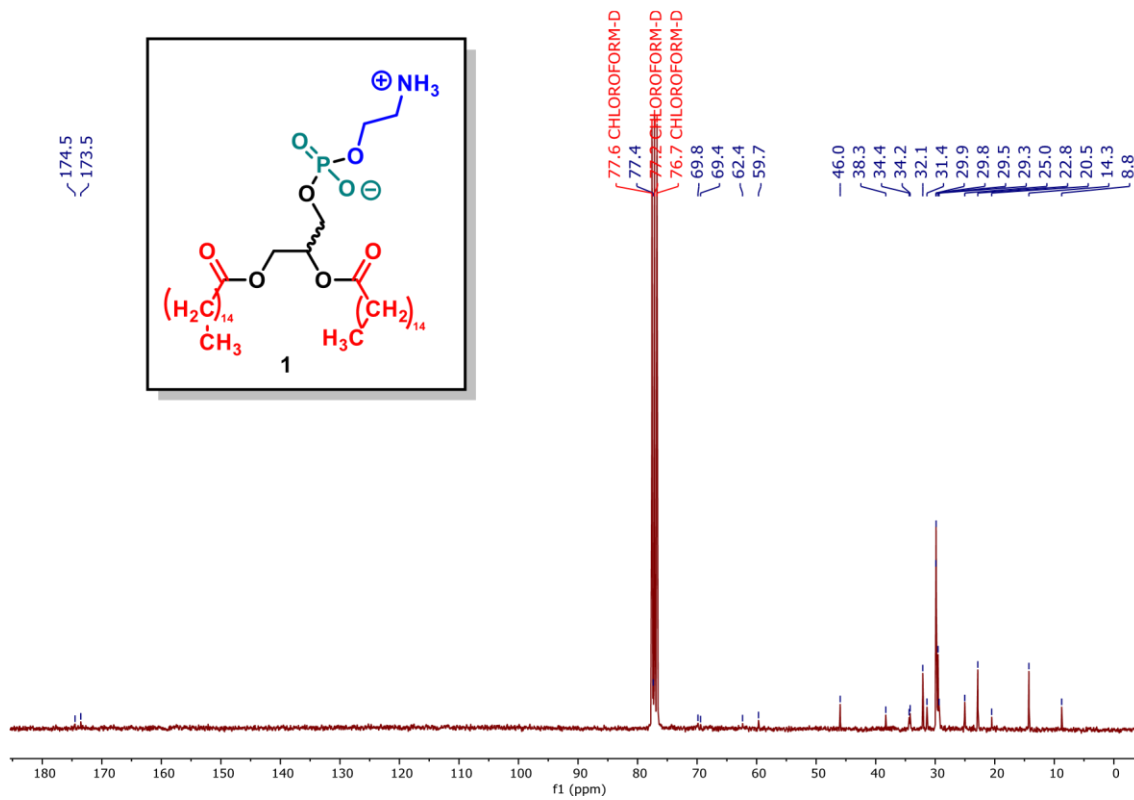


Figure S13. IR spectrum of *rac*-4-[(Benzyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane (3)

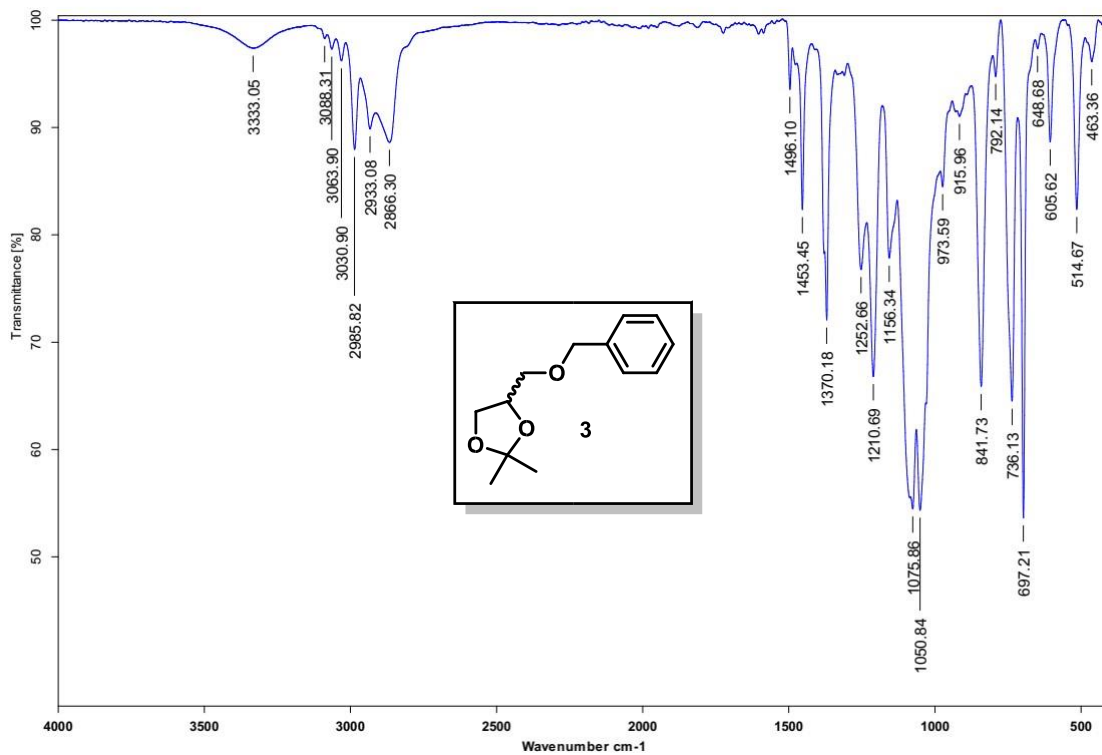


Figure S14. IR spectrum of *rac*-3-(Benzyloxy)propane-1,2-diol (4)



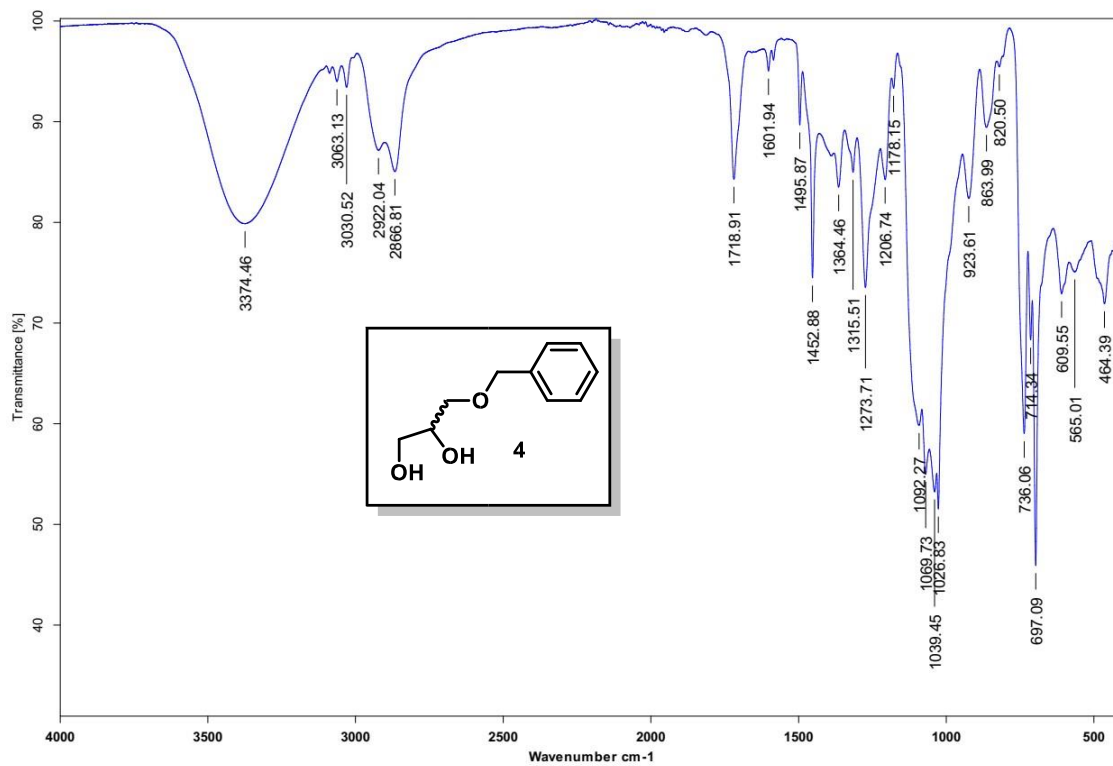


Figure S15. IR spectrum of *rac*-1,2-*O*-Dipalmitoyl-3-*O*-benzyl-glycerol (5)

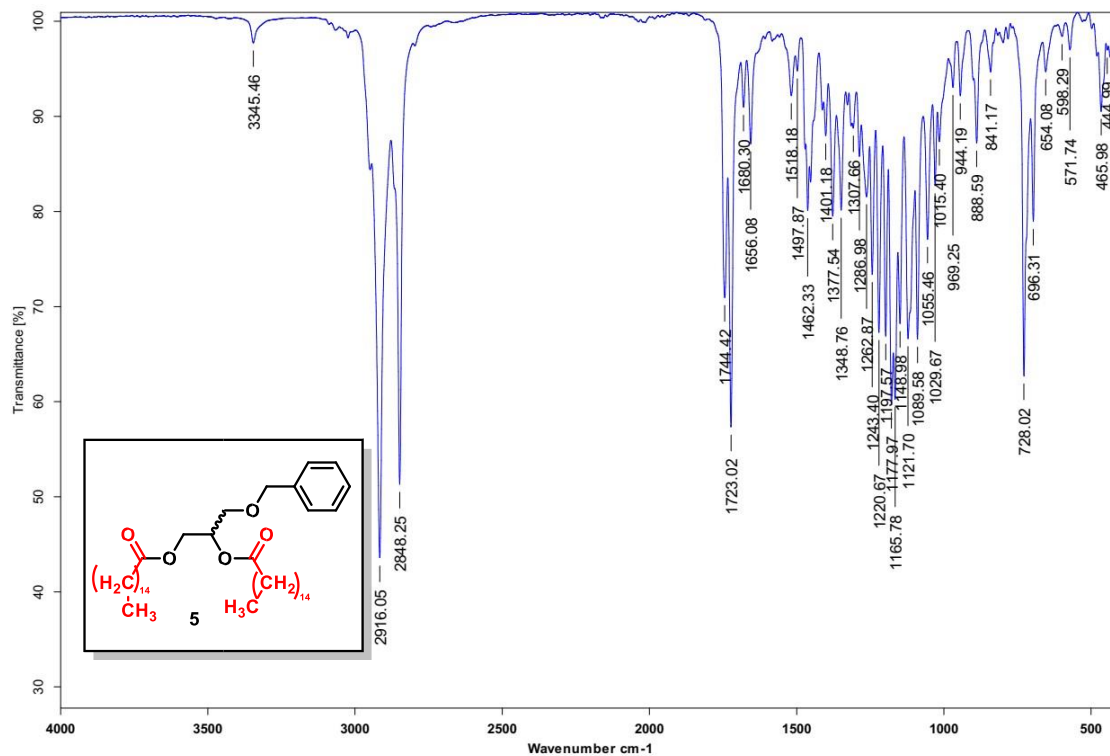
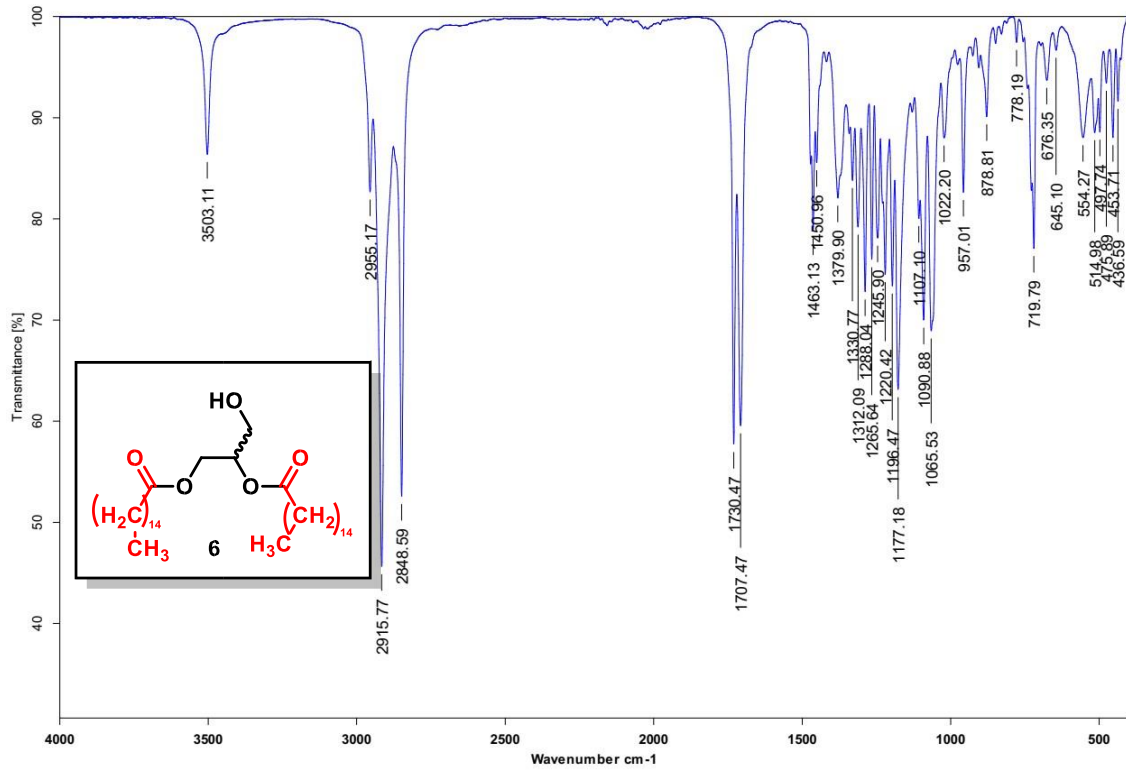
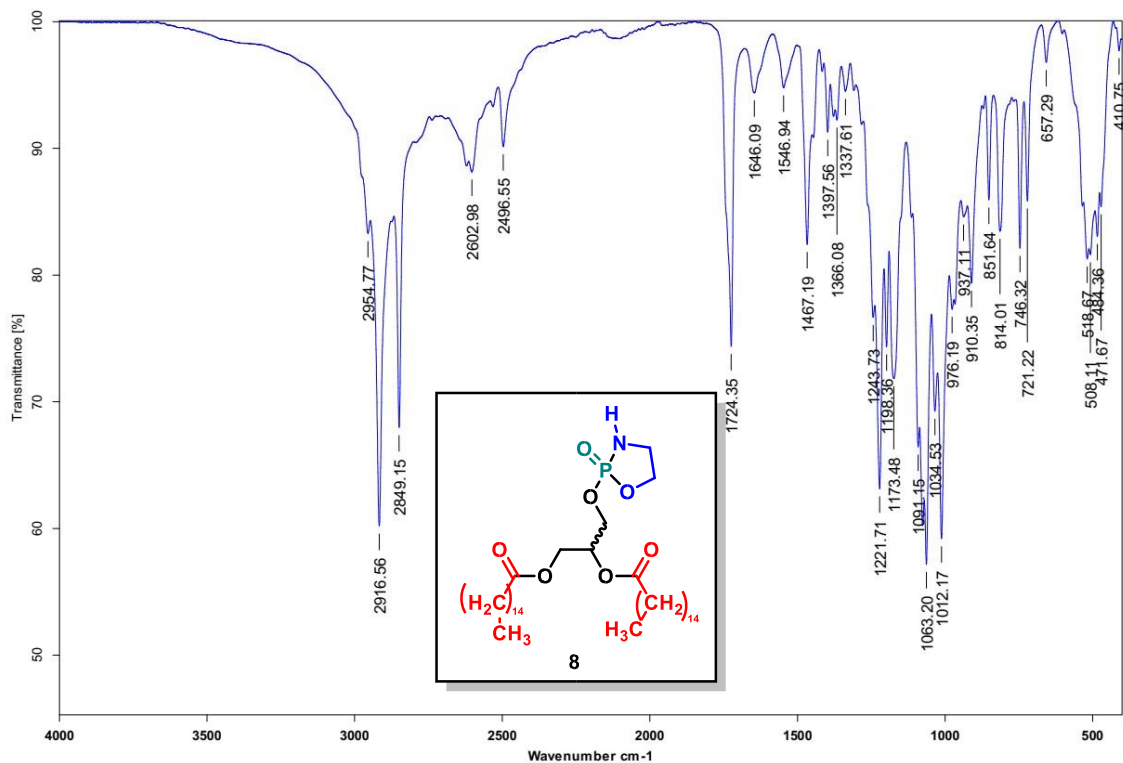


Figure S16. IR spectrum of *rac*-1,2-*O*-Dipalmitoyl-glycerol (6)



**Figure S17. IR spectrum of *rac*-3-[(2-Oxido-1,3,2-oxazaphospholidin-2yl)oxy]propan-1,2-diyl dipalmitate (8)**



**Figure S18. IR spectrum of *rac*-1,2-*O*-Dipalmitoyl-glycero-3-phosphoethanolamine**

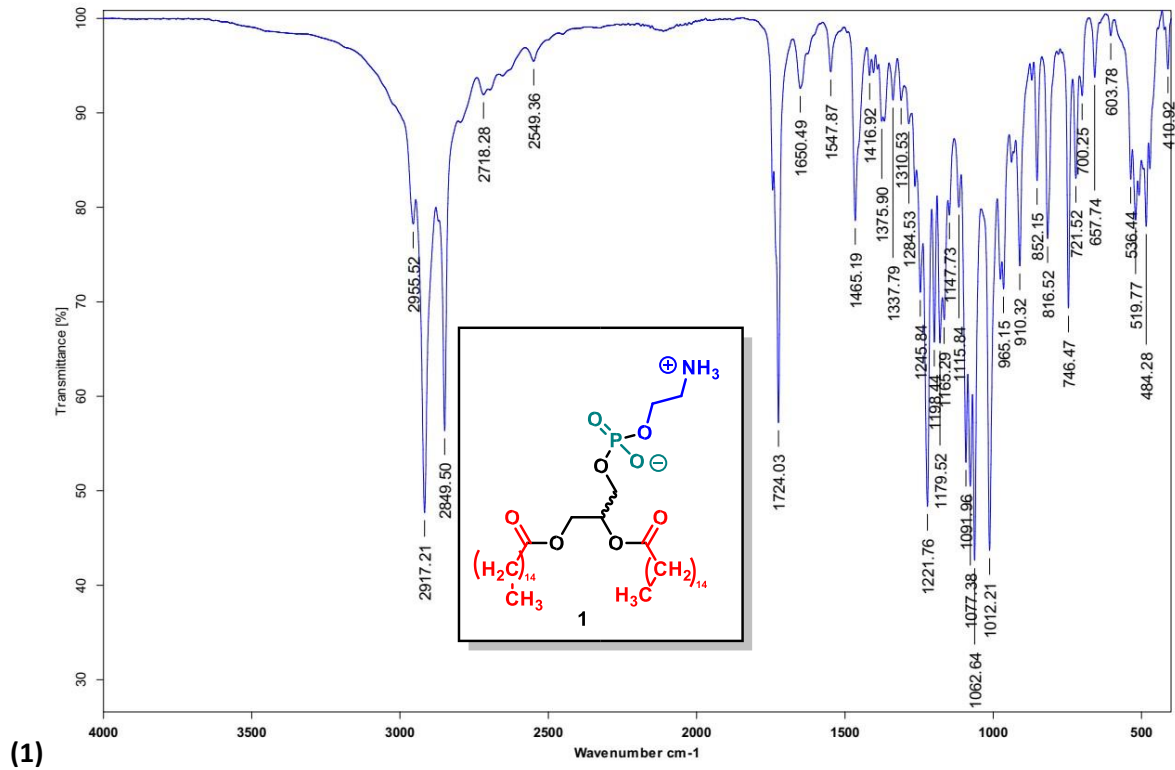
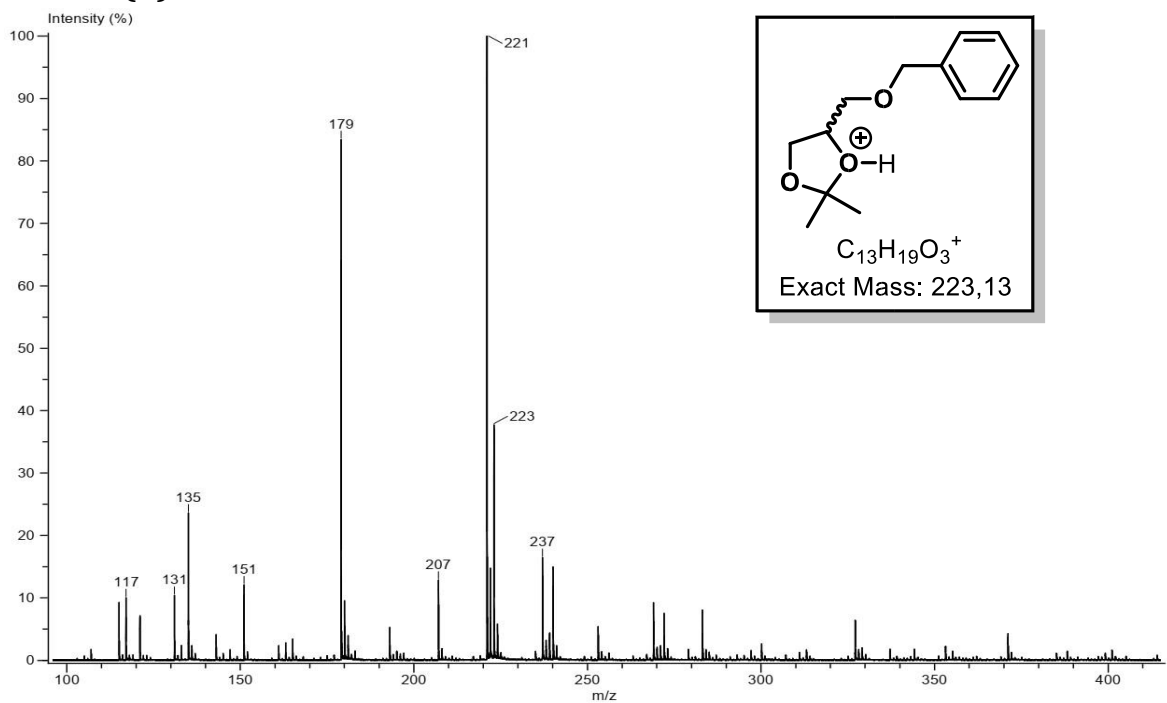
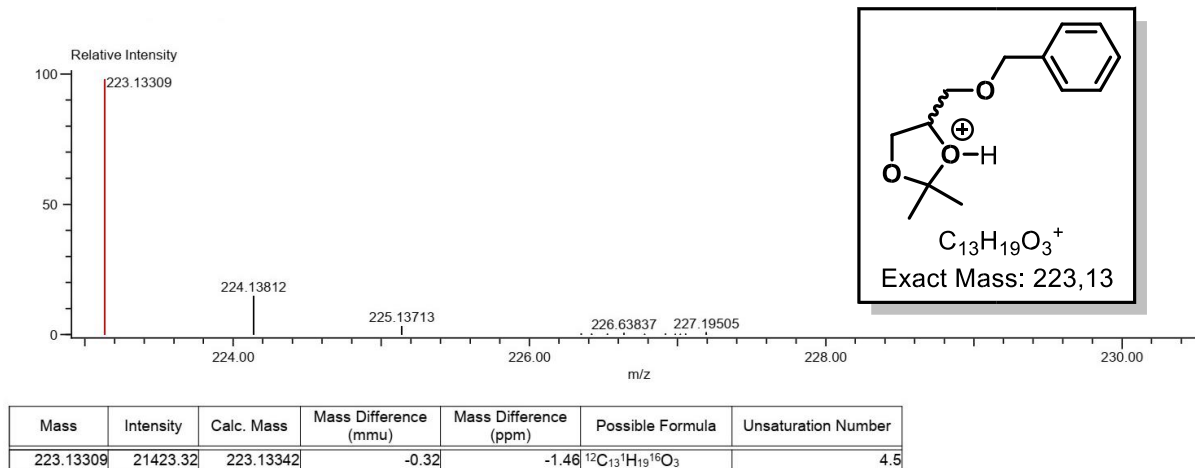


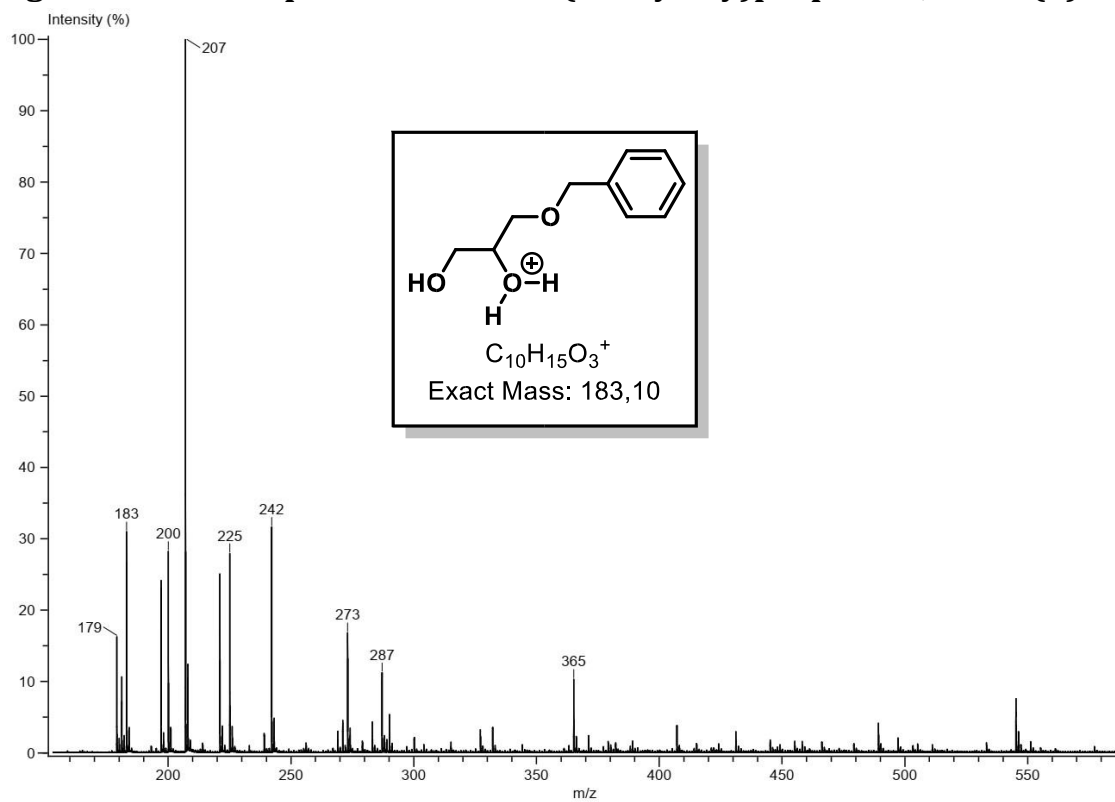
Figure S19. Mass spectrum of *rac*-4-[(Benzyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane (3)



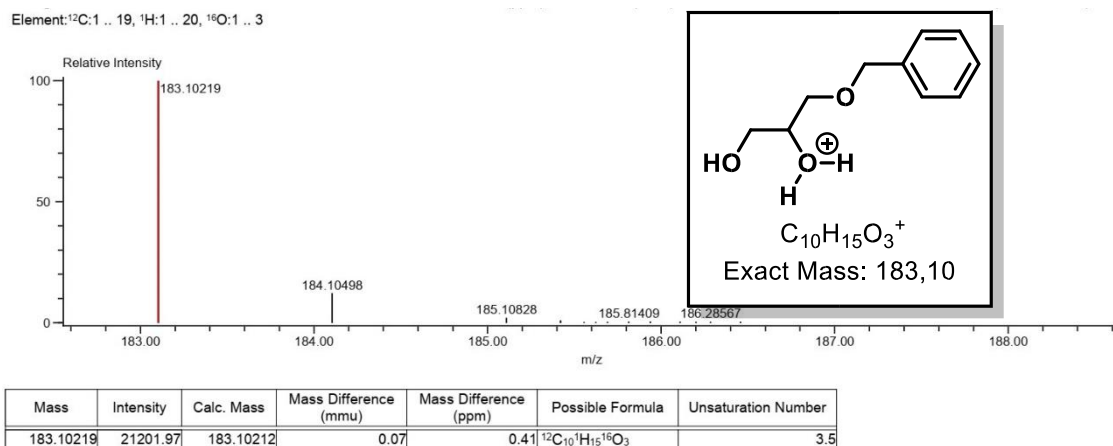
**Figure S20. HRMS data of *rac*-4-[(Benzyloxy)methyl]-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane (3)**



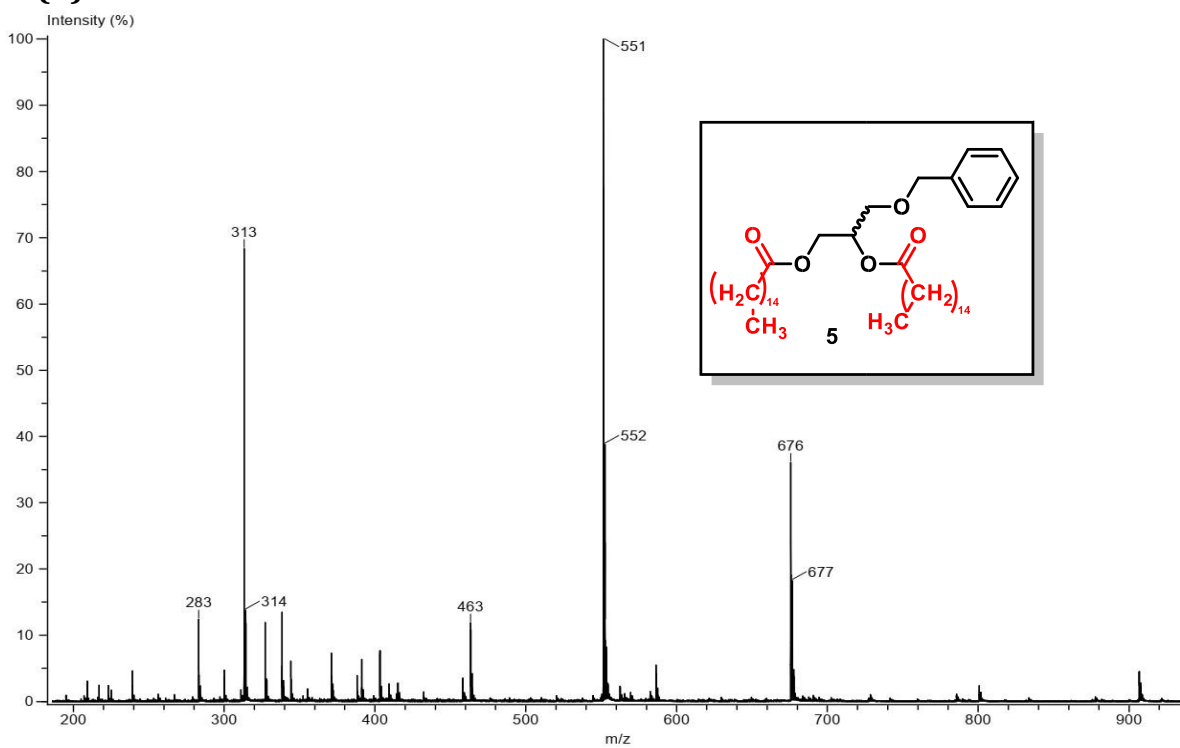
**Figure S21. Mass spectrum of *rac*-3-(Benzyloxy)propane-1,2-diol (4)**



**Figure S22. HRMS data of *rac*-3-(Benzyloxy)propane-1,2-diol (4)**



**Figure S23. Mass spectrum of *rac*-1,2-*O*-Dipalmitoyl-3-*O*-benzyl-glycerol (5)**



**Figure S24. Mass spectrum of *rac*-1,2-*O*-Dipalmitoyl-glycerol (6)**

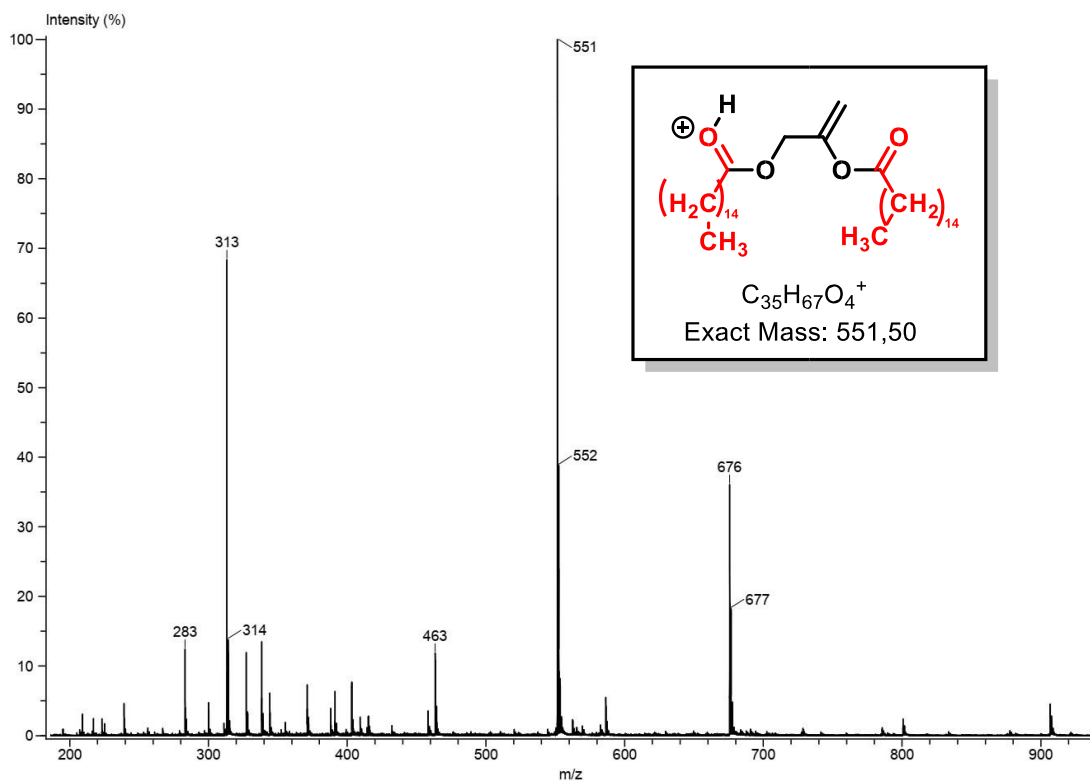


Figure S25. HRMS data of *rac*-1,2-*O*-Dipalmitoyl-glycerol (6)

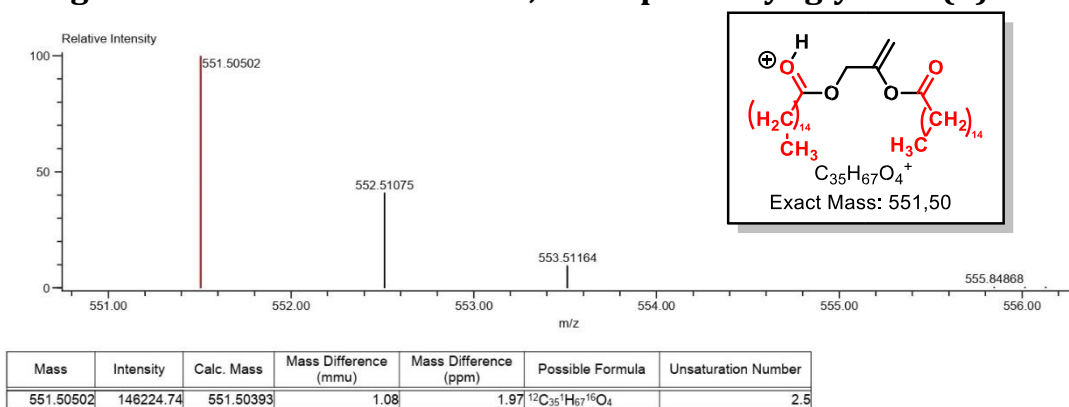


Figure S26. Mass spectrum of *rac*-3-[(2-Oxido-1,3,2-oxazaphospholidin-2-yl)oxy]propan-1,2-diyl dipalmitate (8)



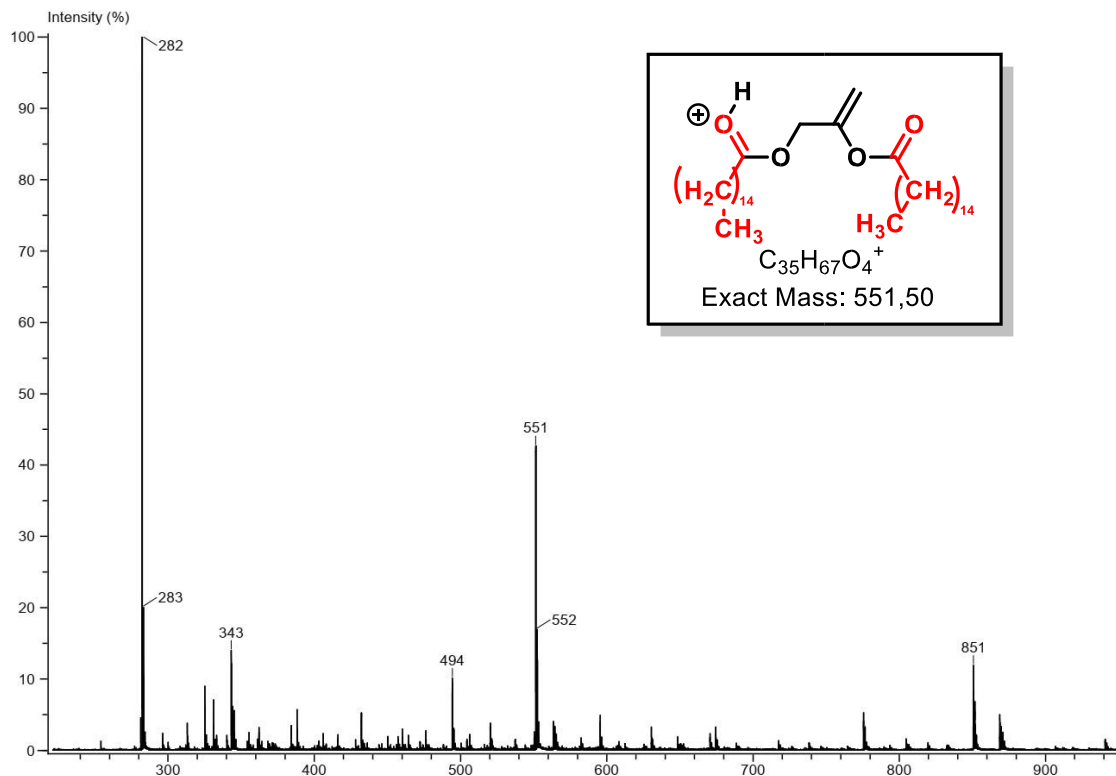


Figure S27. HRMS data of *rac*-3-[(2-Oxido-1,3,2-oxazaphospholidin-2-yl)oxy]propan-1,2-dioldipalmitate (8)

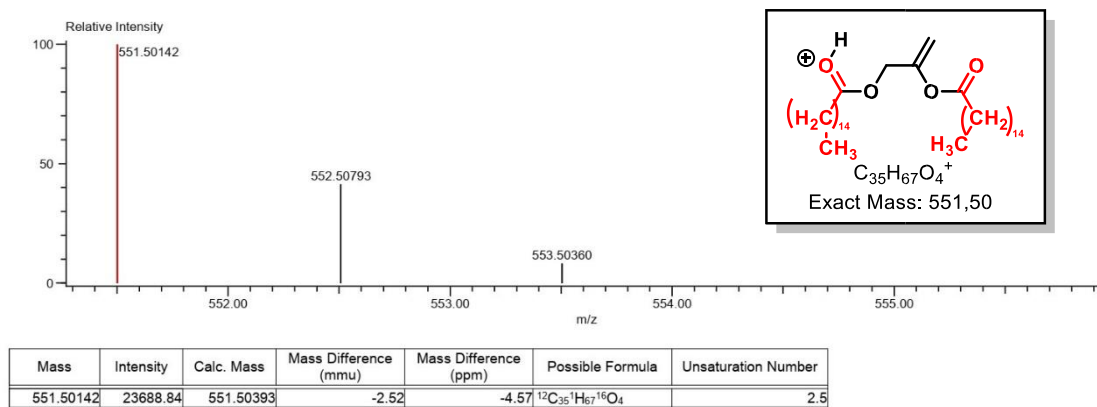


Figure S28. Mass spectrum of *rac*-1,2-*O*-Dipalmitoyl-glycerol-3-phosphoethanolamine (1)

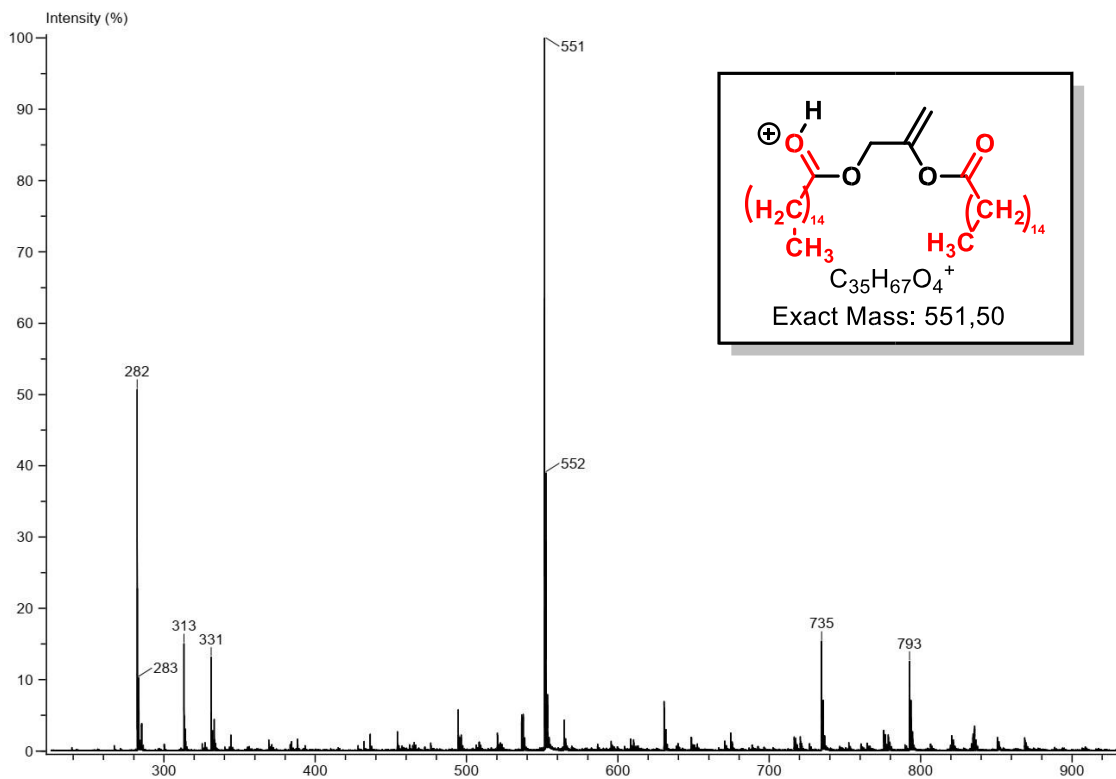


Figure S29. HRMS data of *rac*-1,2-O-Dipalmitoyl-glycero-3-phosphoethanolamine (1)

