



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LABORATORIO DE MEDICINA EXPERIMENTAL

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE LICENCIATURA EN MÉDICO
CIRUJANO Y PARTERO:

***“Efecto de surfactante pulmonar exógeno enriquecido con
fosfatidiletanolamina sobre el grado de inflamación en un modelo murino de
asma crónico con remodelación de la vía aérea”***

Presenta:

Grissell de Jesús Guillén Escobar.

Director de Tesis:

D. C. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros

Co-director de tesis:

M.C Patricia López Moreno

Fecha de entrega:

Enero 2020

Departamento de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES GENERALES.....	3
FISIOPATOLOGÍA	3
CLASIFICACIÓN.....	3
INFLAMACIÓN EN EL ASMA Y REMODELACIÓN DE LA VÍA AÉREA.....	4
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	8
SURFACTANTE PULMONAR.....	8
SURFACTANTE PULMONAR Y LA RESPUESTA ALÉRGICA INFLAMATORIA DE LA VÍA AÉREA	10
JUSTIFICACIÓN:.....	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
MATERIAL Y MÉTODOS	16
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	16
UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL.....	16
METODOLOGÍA GENERAL (PARA TODOS LOS OBJETIVOS)	16
Metodología para el objetivo específico 1	20
Metodología para el objetivo específico 2	23
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
ASPECTOS ETICOS.....	24
RESULTADOS	25
ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA MEDICIÓN DEL GRADO DE INFLAMACIÓN EN EL TEJIDO PULMONAR	25
EFECTO DEL SURFACTANTE PULMONAR ENRIQUECIDO CON PE SOBRE EL GRADO DE INFLAMACIÓN PULMONAR EN EL MODELO MURINO DE REMODELACIÓN DE LA VÍA AÉREA.....	27
Efecto de la fosfatidiletanolamina sobre el grado de inflamación alveolar.	28
Efecto de la fosfatidiletanolamina sobre el grado de inflamación peribronquial.	28
Efecto de la fosfatidiletanolamina sobre el grado de inflamación perivascular.....	29
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES	35

TABLA DE ABREVIATURAS

AIOH	Hidróxido de Aluminio
AT-II	Células alveolares tipo 2
BAL	Lavado bronquioalveolar
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
ECH	Extracto Crudo de Huevo
E-H	Hematoxilina-eosina
FMBUAP	Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
GBD	Carga Global de Enfermedades Estudiadas
ICC	Coefficiente de correlación intraclase
ICS	Corticoesteroides inhalados
IP	Intraperitoneal
OMS	Organización Mundial de la Salud
OVA	Ovoalbúmina
PG	Fosfatidilglicerol
PE	Fostatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
SP	Surfactante pulmonar
Th2	Células T cooperadoras tipo 2
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TSLP	Linfopoyetina Estromal Tímica

RESUMEN

El surfactante pulmonar es una mezcla compleja de fosfolípidos y proteínas específicas que tienen muchas funciones esenciales. Su papel en el asma no se ha establecido claramente, pero existe evidencia en modelos murinos del rol que desempeñan las proteínas SP-A y SP-D en la respuesta alérgica inflamatoria de la vía aérea. La fosfatidiletanolamina (PE), es un fosfolípido componente del surfactante pulmonar que resulta de interés especial al existir evidencia de que posee propiedades antifibrosantes en modelos *in vivo* de fibrosis pulmonar (5) así como de inducir decremento en la expresión de fibras de colágena en un modelo murino de asma crónico (7); sin embargo, la función que los fosfolípidos del surfactante pulmonar pudieran tener sobre la inflamación de la vía aérea en el asma en comparación con la función que tienen las proteínas, no está dilucidada.

En el presente estudio, utilizamos un preparado de surfactante pulmonar exógeno enriquecido con el fosfolípido fosfatidiletanolamina, pero carente de las proteínas SP-A y SP-D. Encontramos que nebulizando el surfactante enriquecido con PE a una dosis de 400 mg/Kg de peso, a una concentración de 25 mg/ml como tratamiento en ratones con asma crónico con remodelación de la vía aérea se atenuó visiblemente la inflamación perivascular, peribronquial y del parénquima pulmonar; también se observó que el área de inflamación en los vasos y bronquios disminuyó en comparación con los ratones asmáticos que no recibieron el tratamiento.

INTRODUCCION

El asma es la enfermedad respiratoria crónica más frecuente en el mundo. Se describe como una enfermedad heterogénea usualmente caracterizada por inflamación crónica de la vía aérea, siendo diagnosticada clínicamente por síntomas respiratorios como sibilancias, dificultad respiratoria, opresión en el pecho y tos, que varían en tiempo e intensidad, acompañados con una limitación variable del flujo de aire espirado (1).

Es considerada una de las enfermedades no transmisibles más importantes en el mundo por ser causa de incapacidad en la población que la padece. Contribuye con menos del 1% de todas las muertes en la mayoría de los países. En el 2016, la Carga Mundial de Enfermedades Estudiadas (GBD, por sus siglas en inglés) reportó 420 millones de muertes en el mundo a causa de asma (2). Cifras recientes del Foro Internacional de Sociedades Respiratorias (FIRS, por sus siglas en inglés), estiman que hasta 334 millones de personas en el mundo la padecen.

La prevalencia del asma se está incrementando en todo el mundo. El 14% de los niños en el mundo experimentan síntomas de asma, siendo mayor en los grupos de 10 a 14 años, en los adultos jóvenes (edad de 18-45 años) el porcentaje es del 8.6%. El 4.5% de los adultos jóvenes han sido diagnosticados con asma y/o están tomando un tratamiento para dicha enfermedad (2).

La incidencia anual de asma en México es de 2.78 por 1,000 habitantes. En la ciudad de México de aproximadamente 5% mientras que en Mérida Yucatán es de hasta el 12%. Esta variabilidad también se correlaciona de forma inversa con la altitud de la región y de forma directa con su temperatura. Su frecuencia también se ve incrementada en algunas épocas del año siendo más frecuente entre octubre y enero (3).

A pesar del vasto conocimiento acerca de la enfermedad, aún no existe un tratamiento eficaz que permita erradicarla, además resulta frecuente en la práctica médica el subdiagnóstico que aunado al subtratamiento, incrementan las hospitalizaciones y deteriora la calidad de vida de los pacientes (4).

Algunos estudios han reportado que la administración exógena de surfactante pulmonar tiene efectos positivos en cuanto a la mejora en la función pulmonar en modelos de animales y pacientes con asma. En el Laboratorio de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina BUAP, se ha demostrado que la fosfatidiletanolamina (PE) disminuye la inflamación y la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones (5). Además, se ha visto que la aplicación de surfactante enriquecido con PE por vía inhalada en un modelo murino de fibrosis pulmonar disminuye la concentración de colágena en los pulmones y la inflamación. (6). Se ha encontrado que el

surfactante pulmonar exógeno enriquecido con PE, atenúa la fibrosis inducida por la exposición prolongada a alérgenos en ratones con asma (7).

ANTECEDENTES GENERALES

El asma es una patología compleja de las vías respiratorias con múltiples fenotipos que afecta tanto a niños como a adultos. Es definida por sus características clínicas, fisiológicas e histopatológicas y de acuerdo con la definición de la estrategia global para el manejo y prevención del asma (GINA), es definida como “una enfermedad inflamatoria crónica de la vía aérea, en la cual diversas células y elementos celulares desempeñan un papel importante.

FISIOPATOLOGÍA

En el asma inducida por alérgenos están implicados una variedad de células y mediadores. Las células dendríticas captan a los antígenos, los procesan y los modulan por medio de la secreción de citocinas y quimiocinas, lo que resulta en una respuesta de células T hacia una respuesta de células T cooperadoras tipo 2 (Th2). Las células Th2, a su vez, estimulan a las células B por medio de IL-4, activan a los eosinófilos por medio de IL-5 e inducen la producción de moco y la remodelación tisular por medio de la IL-13. Cuando los alérgenos se unen a la IgE en la membrana de los mastocitos o basófilos, estas células efectoras liberan grandes cantidades de mediadores almacenados intracelularmente, tales como la histamina y los leucotrienos que provocan broncoconstricción. Los genes críticos que determinan posiciones relativas de las citocinas Th2 y median los efectos relevantes del asma están en el proceso de ser definidos (8).

CLASIFICACIÓN

Se han desarrollado distintos fenotipos para abordar las complejidades de la enfermedad. Un fenotipo se refiere a las características clínicas de la enfermedad, pero no muestra la relación entre la etiología y la fisiopatología. Además, diferentes mecanismos patógenos pueden causar síntomas similares de asma y estar presentes en un mismo fenotipo. Estos mecanismos se definen como endotipos. En términos generales, un fenotipo de asma describe las características clínicamente observables, características fisiológicas, morfológicas y bioquímicas sin relación directa con la fisiopatología subyacente. Los endotipos, por el contrario, describen los subtipos de una enfermedad, en base a una etiología concreta y a un mecanismo patógeno consistente (9).

Típicamente, un paciente con asma se analiza en términos de los fenotipos de la enfermedad (10).

De acuerdo con GINA, muchos fenotipos han sido identificados, pudiendo clasificar el asma de acuerdo a ellos como sigue:

- Asma alérgica: fenotipo más fácil de reconocer, que a menudo comienza en la infancia y se asocia con una historia pasada y/o familiar de enfermedades alérgicas, como eczema, rinitis alérgica o alergia a alimentos o medicamentos. El examen del esputo inducido de estos pacientes antes del tratamiento a menudo revela una inflamación eosinofílica de las vías respiratorias. Los pacientes con este fenotipo de asma generalmente responden bien al tratamiento con corticosteroides inhalados (ICS).

- Asma no alérgica: algunos adultos tienen asma que no está asociada con la alergia. El perfil celular del esputo de estos pacientes puede ser neutrófilo, eosinófilo o contener solo unas pocas células inflamatorias.

- Asma de inicio tardío: algunos adultos, especialmente mujeres, se presentan con asma por primera vez en la vida adulta. Estos pacientes tienden a ser no alérgicos y, a menudo, requieren dosis más altas de ICS o son relativamente refractarios al tratamiento con corticosteroides.

- Asma con limitación de flujo de aire fijo: algunos pacientes con asma de larga evolución desarrollan una limitación de flujo de aire fija que se cree que se debe a la remodelación de la pared de las vías respiratorias.

- Asma con obesidad: algunos pacientes obesos con asma tienen síntomas respiratorios prominentes y poca inflamación eosinofílica de las vías respiratorias (1).

Los mecanismos inmunológicos (endotipos), pueden llevar a los síntomas clínicos (fenotipos), por lo que la identificación de estos endotipos, permite desarrollar terapéuticas muy específicas dirigidas a las alteraciones inmunológicas y así tratar de manera efectiva la sintomatología severa (11).

INFLAMACIÓN EN EL ASMA Y REMODELACIÓN DE LA VÍA AÉREA

Actualmente, se tiene conocimiento que el asma es una enfermedad inflamatoria de la vía aérea en donde intervienen células inmunitarias, como son los eosinófilos, linfocitos Th y mastocitos. El proceso fisiopatológico de la inflamación se encuentra regulado en la mayoría de los casos, a cargo de la inmunidad tipo 2 estimulada por células Th2. Una vez que el epitelio de la vía aérea entra en contacto con el alérgeno, se liberan citocinas como IL-33 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP) que inducen la expresión del ligando OX40 en las células dendríticas para promover su migración hacia los nódulos linfáticos donde activan a los linfocitos T-CD4+. Una vez activados, los T-CD4+ migran hacia las zonas de células B, donde se diferencian en linfocitos foliculares T

cooperadores y estos migran hacia la circulación para convertirse en linfocitos T cooperadores maduros. Una vez maduros, los Th2 viajan hacia el epitelio de la vía aérea y a la mucosa subepitelial y secretan IL-5 e IL-13 para el reclutamiento y acumulación de eosinófilos (24).

El reclutamiento selectivo de los eosinófilos hacia el epitelio se produce en respuesta a la producción de quimiocinas específicas a eosinófilos como la eotaxina, que ejercen su efecto a través del receptor transmembranal acoplado a proteína G, CCR3. Los eosinófilos son capaces de producir y liberar enzimas y especies reactivas de oxígeno que dañan el epitelio (25). (Figura 3).

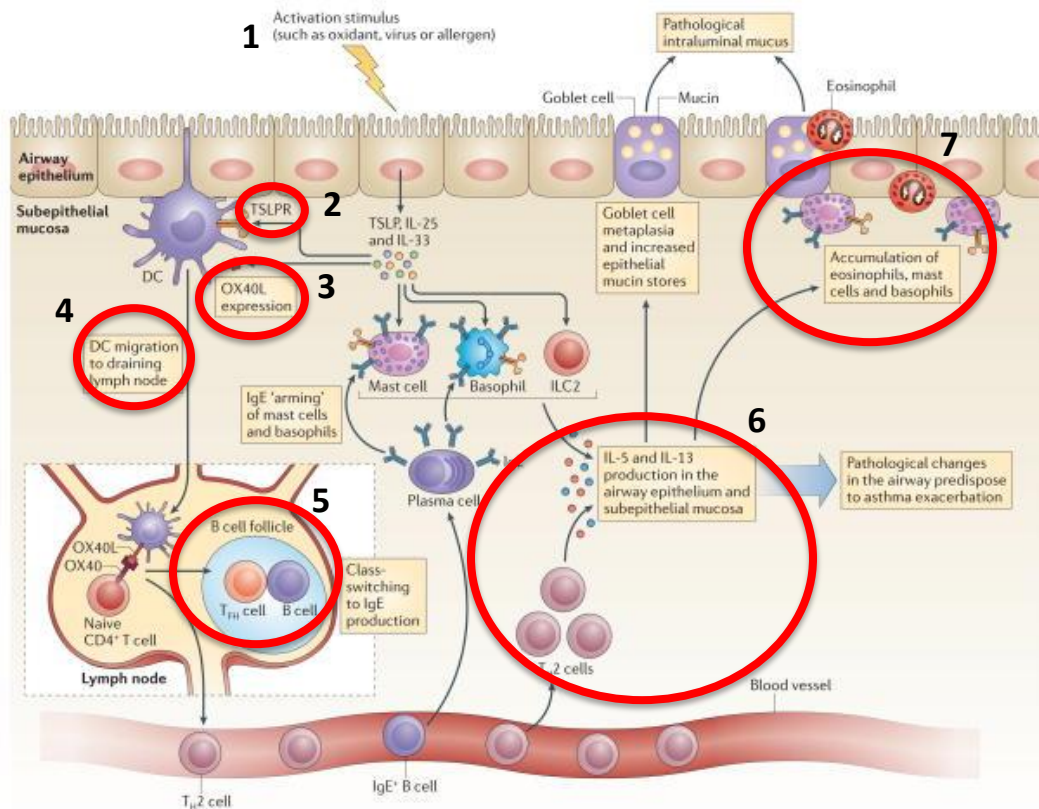


Figura 1. Respuesta inmune tipo 2 en el asma. El estímulo alergénico activa a las células dendríticas (DC) del epitelio de la vía aérea (1), las cuales liberan citocinas como IL-33 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP) (2) que inducen la expresión del ligando OX40 (3) para promover su migración hacia los nódulos linfáticos (4) donde activan a los linfocitos T-CD4+. Una vez activados, los T-CD4+ se diferencian en linfocitos foliculares T cooperadores y estos migran hacia la circulación para convertirse en linfocitos T cooperadores maduros (5). Una vez maduros, los Th2 viajan hacia el epitelio de la vía aérea y a la mucosa subepitelial y secretan IL-5 e IL-13 (6) para el reclutamiento y acumulación de eosinófilos (7). Imagen extraída de Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma-present in most, absent in many. *Nature Reviews Immunology* 2015;15(1):57-65.

Los estudios histopatológicos demuestran variaciones estructurales en la vía aérea de los pacientes afectados en comparación con sujetos sanos, lo cual se ha denominado remodelación de la vía aérea. La remodelación de la vía aérea se define generalmente como cualquier cambio

en la composición, distribución, espesor, masa o volumen y/o número de componentes estructurales observados en la pared de las vías respiratorias de los pacientes en relación con individuos sanos (26).

La fisiopatología de la remodelación de la vía aérea lleva a cabo dos procesos fundamentales: 1) Regeneración del parénquima dañado para restablecer la estructura y funcionamiento normales del tejido; 2) el reemplazo del tejido dañado por tejido fibroconectivo, el cual puede o no ser funcional (27).

Estos procesos involucran una serie de cambios estructurales como cambios epiteliales, cambios en la membrana basal, cambios en las células productoras de moco, remodelación del cartílago e infiltrado inflamatorio, que como se mencionó anteriormente, es de predominio eosinofílico (28).

La integridad fisiológica del epitelio se mantiene a través de interacciones intercelulares y extracelulares que involucran uniones adherentes, desmosomas y hemidesmosomas, en el asma ocurre disrupción epitelial, descamación y pérdida de superficie. Se provoca un proceso de reparación, que resulta en una regeneración completa del epitelio cilíndrico con una proporción normal de células caliciformes y ciliadas, o si el daño es repetitivo se puede presentar hiperplasia de más células caliciformes o metaplasia de las células ciliadas (29).

La fibrosis subepitelial es considerada un componente importante en la remodelación de la vía aérea por asma tanto en adultos como en pacientes pediátricos. La membrana basal del epitelio respiratorio se compone de dos capas: la lámina basal y la lámina *reticularis*, compuesta de colágeno, en la cual se observan los cambios estructurales. Aunque no se conoce el proceso exacto de estos cambios, algunos estudios han sugerido que los eosinófilos activados se encuentran involucrados en este proceso, a través de la liberación de citocinas tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el cual es una potente citocina proinflamatoria que se sintetiza también en otras células como fibroblastos, macrófagos, linfocitos, células epiteliales, y que estimula la producción de matriz extracelular (30).

Las células caliciformes se encargan de la producción de mucina y secreción de glucoproteínas que funciona como una barrera protectora del epitelio. La hiperplasia de células caliciformes y glándulas submucosas, así como la subsecuente sobreproducción de moco, son componentes importantes en la fisiopatología del asma, la mayoría de las crisis asmáticas se relacionan con el taponamiento de la vía aérea por sobreacumulación de mucosa. Además, se ha observado un fenómeno de metaplasia a causa tanto de la activación de receptores para el factor de crecimiento epidermoide en las células epiteliales, como por el factor de crecimiento

transformante alfa (TGF- α), cuya producción es inducida también por IL-4 e IL-13 durante el proceso de inflamación crónica mediada por células Th2 (31).

La principal función del cartílago es proporcionar estabilidad a la vía aérea. Se ha observado que en pacientes asmáticos existe degradación del cartílago, así como incremento del tejido conectivo, provocando fibrosis peribronquial (27).

Se puede considerar esta remodelación como consecuencia de un proceso inflamatorio crónico que al reparar de forma prolongada la vía aérea produce alteración en su estructura, lo cual puede asociarse a la sintomatología progresiva de la enfermedad, ya que algunos de estos cambios se han relacionado con la severidad del padecimiento y pueden resultar en un estrechamiento irreversible del lumen de la vía aérea (32)

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

SURFACTANTE PULMONAR

El surfactante endógeno es una capa delgada de fluido, que disminuye la tensión superficial entre la interfase gas-aire en los pulmones. Es producido por las células alveolares tipo 2 (AT-II) de los pulmones. Este agente es esencial para el intercambio eficiente de gases y para mantener la integridad estructural alveolar. El surfactante es un producto de secreción, compuesto por lípidos y proteínas. La fosfatidilcolina y el fosfatidilglicerol son los principales lípidos constituyentes y SP-A, SP-B, SP-C y SP-D son cuatro tipos de proteínas asociadas al surfactante (12).

Los datos sobre la composición del SP difieren ligeramente de un estudio a otro, pero las tendencias globales son bastante congruentes. En este sentido, una composición representativa de la sustancia tensioactiva pulmonar sería: 80 a 85% de fosfolípidos (en peso), con elevado contenido de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), 5 a 10% de lípidos neutros, y 5 a 10% de proteínas, parte de ellas en la forma de apoproteínas específicas (13;14). (Figura 1).

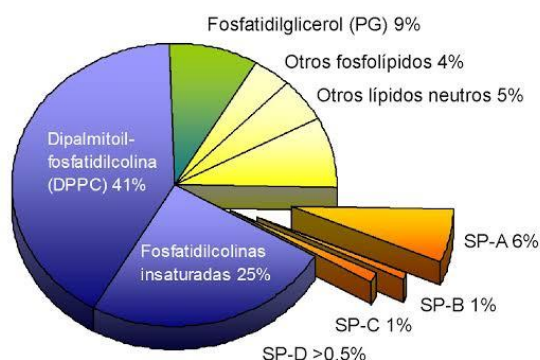


Figura 2. Estructura del surfactante pulmonar. Imagen tomada de Grupo BIOMIL [Internet]. Biofísica de Membranas e Interfases Lipo-proteicas; c2019 Available from: <http://www.bbm1.ucm.es/biomil/index.html> (15)

La fosfatidilcolina conforma aproximadamente el 80% de los lípidos totales y cerca de dos terceras partes del total del surfactante. En condiciones normales, aproximadamente el 70% de sus ácidos grasos están saturados, siendo el ácido palmítico el más común. Otros lípidos que componen al SP son: fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) entre otros; el 10 % restante está compuesto por otros lípidos principalmente colesterol y fosfatidilserina, esfingomielina y lisofosfatidilcolina. La DPPC se considera el compuesto más activo para disminuir la tensión superficial alveolar, pero la presencia de otros componentes, como el fosfatidilglicerol, o fosfatidilinositol, así como las proteínas, resultan imprescindibles para una adecuada disposición

espacial, redistribución y probablemente reutilización del surfactante (16;17). Actualmente, se reconoce la presencia de al menos 4 apoproteínas, denominadas SP-A, SP-B, SP-C y SP-D (18). En general, son moléculas con propiedades antipáticas o francamente hidrofóbicas, la mayoría de ellas con muchas modificaciones postraduccionales, cuyas funciones más importantes son las siguientes: a) aumento de la actividad biofísica del SP; b) asociación con otros componentes del SP; c) formación de la mielina tubular; d) participación en los fenómenos de secreción, recambio y aclaramiento del SP en el alvéolo; e) como moduladores de los mecanismos de defensa del pulmón (19). La combinación de estas propiedades es fundamental para el comportamiento dinámico de los alvéolos y evitar el colapso de estos durante la espiración (13).

La principal función del surfactante pulmonar es la reducción de la tensión superficial dentro del alvéolo durante los movimientos respiratorios, con la participación de las proteínas SP-B y SP-C en la adsorción de los fosfolípidos. La tensión superficial de un líquido es la energía necesaria para disminuir su superficie por unidad de área. De esta manera impide el colapso de los alvéolos durante la espiración. Esto se expresa por medio de la ley de la Laplace para una superficie esférica:

$$P = \frac{2\gamma}{r}$$

Donde γ representa la tensión superficial. Por medio de esta ecuación podemos entender la dinámica de los movimientos respiratorios; durante la inspiración el radio del alvéolo aumenta y con ello disminuye la presión. Por lo tanto, en cada ciclo existe una mayor presión intraalveolar antes de llevarse a cabo la inspiración, así como también para los alvéolos más pequeños. Gracias a las propiedades del surfactante pulmonar, esta presión se reduce y se evita el colapso alveolar (Figura 2). Los fosfolípidos del SP tienen la característica de poseer propiedades antipáticas (un grupo polar y uno no-polar), que permite la organización y desorganización de una película en la interfaz agua-aire durante los movimientos respiratorios (18;20-22).

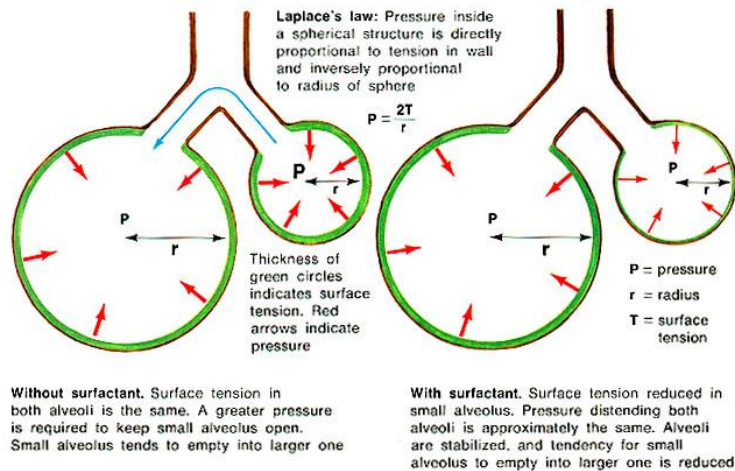


Figura 3. Función del surfactante pulmonar explicada por la ley de Laplace. Imagen tomada de: **Universidad Autónoma de Barcelona** [Internet]. **Fisiología Respiratoria: Introducción y ventilación**; c2019 Available from: <https://www.studocu.com/es/u/2463872>. (23)

SURFACTANTE PULMONAR Y LA RESPUESTA ALÉRGICA INFLAMATORIA DE LA VÍA AÉREA

Para iniciar la inflamación alérgica de la vía aérea se requiere la inhalación de partículas alergénicas y la deposición de éstas en el tracto respiratorio bajo, es entonces cuando estas partículas entran en contacto con el surfactante pulmonar. Existen estudios que evidencian la participación de las proteínas SP-D y SP-A del surfactante en este proceso, uniéndose efectivamente a un alérgeno común derivado del ácaro del polvo doméstico (33). Posteriormente, en otro estudio más reciente se mostró que la liberación de óxido nítrico (NO) de los macrófagos estimulados con Der p, un alérgeno derivado del ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, se inhibió posteriormente en presencia de SP-D (34).

Durante la inflamación, cuando se daña el epitelio, la interacción entre las células dendríticas inflamatorias invasoras y la proteína SP-D podría aumentar. Como se mencionó anteriormente, las células dendríticas, son células presentadoras de antígeno que sensibilizan al epitelio e inducen el inicio de la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que SP-A y SP-D inhiben la maduración de células dendríticas (35).

También se ha visto que las proteínas del surfactante tienen un efecto de supresión en la función de linfocitos T. Por ejemplo, un estudio en un modelo murino de asma, demostró que la proliferación de linfocitos T como respuesta a un alérgeno fue inhibida en presencia de SP-A y SP-D, lo cual se vio reflejado por la reducción en la producción de IL-2 por los linfocitos (36).

En otro estudio, se demostró que SP-D se unió a los eosinófilos activados e inhibió la degranulación de los mismos (37).

Podemos concluir que los principales componentes del surfactante que desempeñan un rol importante en la inflamación alérgica son las proteínas solubles SP-A y SP-D, pues regulan y se unen a una variedad de células inmunitarias/efectoras presentes en el curso de la inflamación alérgica de la vía aérea.

Algunos estudios han puesto en evidencia que las proteínas hidrofílicas SP-D y SP-A del surfactante pulmonar desempeñan un rol como inmunomoduladores de la respuesta inflamatoria inducida por alérgeno, por lo que tal vez podrían ayudar a reducir o resolver la inflamación de la vía aérea (38). En modelos experimentales de asma en ratones deficientes de SP-A o SP-D, se reveló la importancia que tienen estas proteínas para atenuar la respuesta alérgica de la vía aérea. Se ha reportado que estos ratones son más susceptibles a la inducción de inflamación alérgica aguda de la vía aérea, lo que resulta en un fenotipo inflamatorio más severo (35). Además, se ha visto que la SP-D es capaz de inhibir la quimiotaxis eosinofílica hacia la eotaxina (citocina quimiotáctica de eosinófilos) (39).

En otros estudios experimentales realizados en modelos biológicos con asma, se analizaron los niveles de SP-A y SP-D en el lavado broncoalveolar (BAL) de ratones sensibilizados con OVA y en no sensibilizados, donde la concentración de SP-D fue significativamente más elevada en el modelo asmático en comparación con el grupo control (40;41).

En contraste, en otro estudio se ha informado que la inflamación de la vía aérea inducida por alérgenos de ácaros, disminuyen los niveles de SP-A y SP-D en BAL de ratones sensibilizados (42).

La discrepancia de estos hallazgos aún no está bien aclarada, pero podría deberse a los diferentes métodos de muestreo de lavado; sin embargo, ambos estudios concluyen en que las proteínas hidrofílicas actúan como amortiguadores de la inflamación.

El proceso de inflamación presente en el asma es debido principalmente a la respuesta eosinofílica, coordinada por linfocitos Th2 que activa los linfocitos B específicos para la síntesis de IgE específica hacia el alérgeno (4). Los eosinófilos se infiltran hacia el epitelio pulmonar, y al ser parte de la respuesta inmune hacia agentes patógenos, son capaces de producir y liberar enzimas y especies reactivas de oxígeno que dañan el epitelio (25).

La fibrosis subepitelial es un rasgo característico de la remodelación de la vía aérea. Este cambio involucra el espacio subepitelial y el engrosamiento puede ser desde 7 hasta 23 mm en

sujetos con asma, contra 4 a 5 mm en sujetos controles. La membrana basal epitelial consta de 2 estratos: la lámina basal y la lámina reticular. El engrosamiento del espacio subepitelial corresponde a un incremento en el depósito de colágeno tipo I, III, V así como fibronectina, laminina y tenascina, además de otras sustancias incluyendo elastina y proteoglicano (43).

En el Laboratorio de Medicina Experimental, se ha observado la disminución de la deposición de fibras de colágena en la fibrosis subepitelial, en un grupo de ratones tratados con surfactante pulmonar exógeno (beractante) enriquecido con PE, a los cuales se les indujo remodelación de la vía aérea mediante sensibilización y reto crónico con extracto crudo de huevo (7).

Es importante mencionar que la composición de beractante es a base de tensioactivo pulmonar bovino (fosfolípidos derivados de extractos lipídicos de pulmón bovino estandarizado por adición de colfolsceril palmitato, tripalmitina y ácido palmítico), careciendo de las proteínas SP-A y SP-D.

Hasta el momento, existen pocos estudios acerca de la acción que podría tener el surfactante pulmonar exógeno (carente de SP-A y SP-D) enriquecido con PE sobre la inflamación en un modelo murino asmático, por lo que en el presente estudio nos hemos interesado en probar su efecto.

JUSTIFICACIÓN:

El asma es una enfermedad respiratoria crónica con inflamación de las vías aéreas que puede afectar a cualquier ser humano y que presenta una alta prevalencia en el mundo, el 14% de los niños en el mundo experimentan síntomas de asma, en los adultos jóvenes 8.6%. Se estima que alrededor de 334 millones de personas la padecen. Para el año 2011, en México, la mortalidad estimada fue de 0.5 casos por cada 100,000 muertes de los 5 a los 34 años (mortalidad general), y de 14.5 fallecimientos al año por cada 100,000 casos de asma.

En un estudio publicado en el 2002, se definieron los factores de riesgo generales para la mortalidad, los cuales son: la severidad del cuadro, el acceso a la atención médica, la adherencia al tratamiento y los factores psicosociales relacionados.

La severidad del padecimiento está estrechamente relacionada con la progresión de los cambios irreversibles en la remodelación de la vía aérea como respuesta a la inflamación crónica.

En el laboratorio de medicina experimental de la Facultad de medicina BUAP se mostró profundo interés por el proceso de remodelación de la vía aérea en pacientes con asma. Se buscan posibles dianas terapéuticas para el cambio anormal producido en el epitelio a causa de ciclos repetidos de daño y reparación, por lo que se desarrolló un modelo murino de asma crónico con remodelación de la vía aérea a partir de la sensibilización con ovoalbúmina presente en el extracto crudo de huevo. De entre los numerosos antígenos utilizados en la inducción de asma en ratones, el más común ha sido la ovoalbúmina que de manera natural, accede espontáneamente al organismo, sobre todo por vía digestiva para desencadenar alergias de origen alimentario. El primer contacto de un individuo atópico con el alérgeno ovoalbúmina induce la producción de anticuerpos anafilácticos específicos frente a ese alérgeno. El principal anticuerpo anafiláctico es la IgE, una molécula cuyo aumento se observa en la mayoría de los pacientes asmáticos. La IgE producida, se une a los mastocitos del sistema respiratorio y los sensibiliza. Tras un nuevo contacto con el alérgeno, los mastocitos activados y sensibilizados con IgE en su superficie, contribuyen tanto al broncoespasmo como a la inducción del proceso inflamatorio mediante la liberación de mediadores proinflamatorios. El infiltrado de células Th, eosinófilos, neutrófilos y mastocitos, interactúan con fibroblastos, células de músculo liso, células epiteliales y endoteliales presentes en la vía aérea a través de la secreción de moléculas de señalización, que, en condiciones crónicas, causan remodelación de la vía aérea.

Vázquez de Lara y cols. demostraron que el surfactante exógeno beractante disminuye la expresión de colágeno y provoca la muerte de fibroblastos mediante apoptosis (Becerril et al., 2017), posteriormente, en otro estudio desarrollado por ellos, dilucidaron que el fosfolípido

mayormente implicado en ese proceso es la PE a través de una señal intracelular de calcio en los fibroblastos de pulmón.

Es por ello que en el laboratorio nos interesamos por investigar como posible atenuante del grado de inflamación histopatológica al surfactante pulmonar exógeno enriquecido con PE administrado en un modelo murino asmático con remodelación de la vía aérea y sensibilizado con ovoalbúmina.

La evaluación de nuevas dianas terapéuticas como el surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina, puede mejorar la calidad de vida de miles de personas que cursan con dicha enfermedad tanto en el estado de Puebla como a nivel mundial y así mismo disminuir significativamente la tasa de mortalidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El proceso de remodelación de la vía aérea en respuesta a la inflamación crónica en el asma desencadena alteraciones de los componentes tisulares estructurales, tal como la fibrosis subepitelial.

En modelos experimentales de ratones con asma, se ha demostrado que las proteínas hidrofílicas del surfactante pulmonar SP-A y SP-D, tienen un efecto inmunorregulador sobre la inflamación; sin embargo, actualmente no forman parte como componentes de productos surfactantes exógenos.

En un estudio previo realizado en el laboratorio de Medicina Experimental de la FMBUAP, se encontró que la administración inhalada de surfactante pulmonar exógeno enriquecido con fosfatidiletanolamina (PE), atenúa la fibrosis inducida por la exposición prolongada a alérgenos en un modelo murino de asma crónico sensibilizado con extracto crudo de huevo, lo cual fue corroborado mediante la medición del área de tejido conectivo por tres observadores cegados, en donde se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en la medición en el área de fibrosis del grupo de controles positivos comparado con el grupo experimental ($p < 0.05$) tratado con surfactante enriquecido con PE, sin embargo, hasta el momento no es bien conocido el efecto del surfactante exógeno sobre la inflamación en un modelo de asma crónico. Lo que nos llevó a plantear la siguiente interrogante:

¿Cuál es el efecto del surfactante pulmonar exógeno enriquecido con fosfatidiletanolamina sobre el grado de inflamación histopatológica en un modelo murino asmático sensibilizado con extracto crudo de huevo?

HIPÓTESIS

El grado de inflamación histopatológica se atenúa con la administración de surfactante pulmonar exógeno enriquecido con fosfatidiletanolamina en un modelo murino asmático sensibilizado con extracto crudo de huevo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del surfactante pulmonar exógeno enriquecido con fosfatidiletanolamina sobre el grado de inflamación histopatológica en un modelo murino de asma sensibilizado con extracto crudo de huevo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar una técnica de medición del grado de inflamación.
2. Medir el grado de inflamación de la muestra de pulmón del modelo murino asmático sensibilizado con ovoalbúmina de extracto crudo de huevo, con tinción hematoxilina-eosina con los programas Moticam 2300 y Orbit Image Analysis

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

- Por el objetivo: comparativo
- Por la asignación de la maniobra: experimental
- Por la temporalidad: transversal
- Por la obtención de los datos: prolectivo

UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de medicina experimental de la FMBUAP, en el periodo comprendido de enero de 2019 a julio 2019.

METODOLOGÍA GENERAL (PARA TODOS LOS OBJETIVOS)

Para el modelo experimental, se emplearon ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 semanas de edad, con un peso de 16-19 gr, siguiendo los estándares del Bioterio Central de la BUAP y se utilizó el modelo descrito por Fraga-Iriso y cols., el cual utiliza ovoalbúmina. En el laboratorio se empleó extracto crudo de huevo (ECH) que contiene 60% de ovoalbúmina.

Preparación del extracto crudo de huevo. La preparación del ECH consistió en obtener 4 gr de ECH de un huevo, se utilizó un batidor manual de cocina para homogeneizar la clara de huevo hasta obtener una consistencia espumosa la cual se colocó en la incubadora Felisa a una temperatura de 45° durante 48 horas. Posteriormente se pulverizó el desecado, se pesó y se colocó en un frasco estéril. Para la preparación del ECH para la sensibilización intraperitoneal se pesaron 800 mg de hidróxido de aluminio en un tubo de 50 ml y se le añadieron 20 mg del ECH, después se añadió 50 ml de solución salina y se resuspendió con una pipeta estéril de 10 ml. Se almacenaron a -20°C muestras alícuotas de 5 ml en tubos estériles. La preparación de la solución del ECH para nebulizar consistió en pesar 2.5 mg de ECH en un matraz aforado de 100 ml con un imán en el fondo. Se agregaron 100 ml de solución salina y se colocó en la plancha de calor y rotatoria "Thermolyne Cimarec" por 30 minutos. Se micronebulizaron 5 ml y se almacenó la solución restante en alícuotas.

Preparación del surfactante: Para el tratamiento con surfactante se utilizó beractante (Abbott), que se expende a una concentración de 25 mg de fosfolípidos por ml.

La PE se preparó con medio de cultivo (Ham F12 sin suero) a una concentración de 20 mg/ml, utilizando un homogeneizador ultrasónico (CPX-400, Cole-Parmer, EUA) con una punta de

13 mm, que opera a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud de 90 μ m, se sonicó a 4 °C por 2 minutos.

Para el enriquecimiento de surfactante con PE se duplicó la concentración nativa de 0.75 mg/ml. Se suspendió la PE (Sigma) en medio F-12 Ham sin suero fetal bovino mediante sonicación. Se usaron 300 μ l de PE en 8 ml de surfactante para una concentración final de PE añadida de 0.75 mg/ml.

Técnica para sensibilizar al modelo murino con extracto crudo de huevo (ECH). Se dividieron a los ratones en 3 grupos, grupo I o grupo control negativo formado por 8 ratones, grupo II o grupo control positivo asmático de 18 ratones y el grupo III o grupo asmático tratado con SP enriquecido con PE de 6 ratones

La técnica consistió en 3 fases: fase de sensibilización, fase de reto y tratamiento y fase de sacrificio.

Fase de sensibilización: Se administraron intraperitonealmente 0.4 mg/ml de ECH más 16 mg/ml de hidróxido de aluminio (AlOH) mezclados en la misma jeringa los días 0 y 14. Los controles negativos fueron sometidos al mismo procedimiento, pero en lugar de ECH, se administró solución salina.

Fase de tratamiento y reto: Grupo I: los ratones fueron tratados con solución salina y 30 minutos después fueron retados con la misma solución. Grupo II: los ratones fueron tratados con solución salina y 30 minutos después fueron retados con la inhalación de 5 ml de una solución de ECH al 2.5% nebulizada en NaCl al 0.9%. Grupo III: se administró SP enriquecido con PE en nebulización, a una dosis de 400 mg/Kg de peso a una concentración de 25 mg/ml, 30 min antes de cada reto con solución de OVA. Se realizaron 24 retos los días 21, 22, 23, 28, 29, 30, 35, 36, 37, 42, 43, 44, 49, 50, 51, 56, 57, 58, 63, 64, 65, 70, 71 y 72

Sacrificio: Los animales fueron anestesiados con pentobarbital intramuscular a una dosis de 15 mg/Kg de peso y se exanguinaron mediante sección de la aorta.

Preparación de los pulmones. Se disecó el pulmón izquierdo y se insufló con formol amortiguado al 10% para el análisis histopatológico. Se realizaron las tinciones de hematoxilina y eosina (rutina), azul de toluidina para observar los gránulos de las células cebadas, PAS (ácido peryodico de Schiff) para teñir los mucopolisacáridos del moco del epitelio bronquial y tricrómico de Masson, para distinguir la cantidad de colágena presente en el tejido pulmonar

Las muestras del tejido pulmonar fueron sometidas al procesamiento de deshidratación e inclusión en parafina. Posteriormente se hicieron cortes histológicos de 3 a 5 micras los cuales

fueron teñidos con hematoxilina y eosina de acuerdo con las técnicas de tinción estandarizadas en el Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina de la BUAP. Se obtuvieron un total de 32 laminillas, cada una representando 1 ratón.

Cortes Histológicos: Se utilizaron 32 laminillas las cuales fueron obtenidas de los 3 grupos de ratones grupo I (grupo control negativo), grupo II (grupo control positivo) y grupo III (grupo asmático tratado con surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina). Se utilizó la tinción de hematoxilina- eosina para teñir células de infiltrado inflamatorio.

Cuantificación de vasos, bronquios e inflamación: Se utilizaron 2 métodos. En el primer método por microscopía óptica, se analizaron las 32 laminillas al microscopio óptico, por 2 observadores distintos. Primero se separaron 3 laminillas de controles positivos y negativos donde se mostrará o no, la presencia de inflamación. Una vez localizadas, se colocó cada laminilla con su cinta de identificación de lado derecho sobre la platina del microscopio. Se evaluó primero en objetivo 4x haciendo una evaluación por campo iniciando en el cuadrante superior derecho, siguiendo el sentido de arriba hacia abajo y de derecha a izquierda. Posteriormente se evaluó la misma laminilla del paso anterior en objetivo 10X, donde se buscaron y contaron los vasos y bronquios por campo, iniciando en el cuadrante superior derecho, siguiendo el sentido de arriba hacia abajo y de derecha a izquierda. Una vez localizado en un campo el número de vasos y bronquios, se evaluó la presencia o no de inflamación y a partir de una escala cualitativa estandarizada, se asignó un valor numérico al grado de inflamación observado. En el segundo método, se utilizó el software *Orbit Image Analysis*, para lo cual, se obtuvieron imágenes digitales de las 32 laminillas anteriormente mencionadas tomadas mediante una cámara digital y el programa de imagen *Moticam 2300*. Se tomó una fotografía de cada campo observado en la laminilla, siendo en total 5 fotografías para cada laminilla. Estas fotografías se guardaron en formato TIFF y se analizaron con el software *Orbit Image Analysis* por 2 observadores distintos.

Tabla 1. Variables de medición

VARIABLE	MEDICION	ESCALA	VALOR
Número de bronquios presentes en el corte histológico	En el microscopio a un aumento de 10x se contó el número de bronquios presentes por cada campo del corte histológico. En el programa Orbit Image Analysis se contaron los bronquios presentes en cada fotografía de cada laminilla.	Numérica continua	Número de bronquiolos por campo
Número de vasos presentes en el corte histológico	En el microscopio a un aumento de 10x se contó el número de vasos presentes por cada campo del corte histológico. En el programa Orbit Image Analysis se contaron los vasos presentes en cada fotografía de cada laminilla	Numérica continúa	Número de vasos por campo
Inflamación peribronquial	En la muestra de tejido pulmonar teñida con hematoxilina-eosina, se observó la presencia o ausencia de infiltrado inflamatorio alrededor del bronquiolo, y de acuerdo con las características histológicas descritas en la escala estandarizada se asignó un valor. Con el programa Orbit Image Analysis se seleccionó la región de interés en cada fotografía de cada laminilla, donde se marcaron las clases a analizar. Se entrenó al modelo en base a las regiones de clase y se clasificó el tejido en proporciones por clase.	Numérica discreta	0= sin inflamación 1=leve 2= moderado 3= severo
Inflamación perivascular	En la muestra de tejido pulmonar teñida con hematoxilina-eosina se observó la presencia o ausencia de infiltrado inflamatorio alrededor del vaso, de acuerdo con las características histológicas descritas en la escala estandarizada se asignó un valor. Con el programa Orbit Image Analysis se seleccionó la región de interés en cada fotografía de cada laminilla, donde se marcaron las clases a analizar. Se entrenó al modelo en base a las regiones de clase y se clasificó el tejido en proporciones por clase.	Numérica discreta	0= sin inflamación 1=leve 2= moderado 3= severo
Inflamación del parénquima	En la muestra de tejido pulmonar teñida con hematoxilina-eosina se observará la presencia o ausencia de infiltrado inflamatorio alrededor del bronquiolo y en correlación a las características histológicas descritas en la escala estandarizada se asignó un valor. Con el programa Orbit Image Analysis se seleccionó la región de interés en cada fotografía de cada laminilla, donde se marcaron las clases a analizar. Se entrenó al modelo en base a las regiones de clase y se clasificó el tejido en proporciones por clase.	Numérica discreta	0= sin inflamación 1=leve 2= moderado 3= severo
		Numérica continua	Valores adimensionales

Metodología para el objetivo específico 1

Objetivo específico 1: Estandarizar una técnica de medición del grado de inflamación.

Elaboración de una escala cualitativa: Se realizaron revisiones de 5 fuentes bibliográficas recientes de artículos indexados que sugerían una escala de valoración del grado de inflamación perivascular y peribronquial, a partir de los cuales se estableció el siguiente método de medición, revisado por un experto patólogo quién dictaminó su aprobación.

Tabla 2. Escala cualitativa del grado de inflamación según las características histológicas.

Grado de Inflamación	Equivalente numérico	Características
Sin Inflamación	0	Tejido con características normales.
Leve	1	Presencia de infiltrado inflamatorio perivascular.
Moderado	2	Presencia de infiltrado inflamatorio perivascular, con aumento en el número de células, mayor tonalidad e escaso infiltrado inflamatorio peribronquial.
Severo	3	Presencia de infiltrado inflamatorio perivascular, con mayor aumento en el número de células, mayor tonalidad y mayor infiltrado inflamatorio peribronquial.

Análisis de imágenes con el programa *Orbit Image Analysis*: El programa de análisis de imágenes Orbit es un programa para analizar imágenes de diferentes tejidos; integra algoritmos que utilizan el aprendizaje automático, basándose en un modelo de entrenamiento. Procesa imágenes con tres módulos. El primer módulo (*Tissue Quantification*), realiza una clasificación de tejidos que se aplica para clasificar la discriminación de regiones en una imagen. El segundo módulo (*Objet Segmentation*), realiza una segmentación de objetos que generalmente se usa para la segmentación de células. Un tercer módulo (*Objet Classification*) que puede usarse para la clasificación celular, clasifica objetos segmentados. Este programa se utilizó con la finalidad de crear un algoritmo confiable para la cuantificación de tejido inflamatorio por 2 observadores distintos.

Se utilizó el módulo *Tissue Quantification* para clasificar las distintas clases de tejido en la imagen incluyendo el tejido inflamatorio. Para realizarlo, primero se cargó la fotografía al programa

seleccionando en la barra de tareas la opción *Open image from a file system*, para cargar la imagen al programa, posteriormente se seleccionó la opción *Configure classes* para definir por colores las clases a identificar (vaso, bronquio, alveolo e infiltrado inflamatorio). (Figura 4).

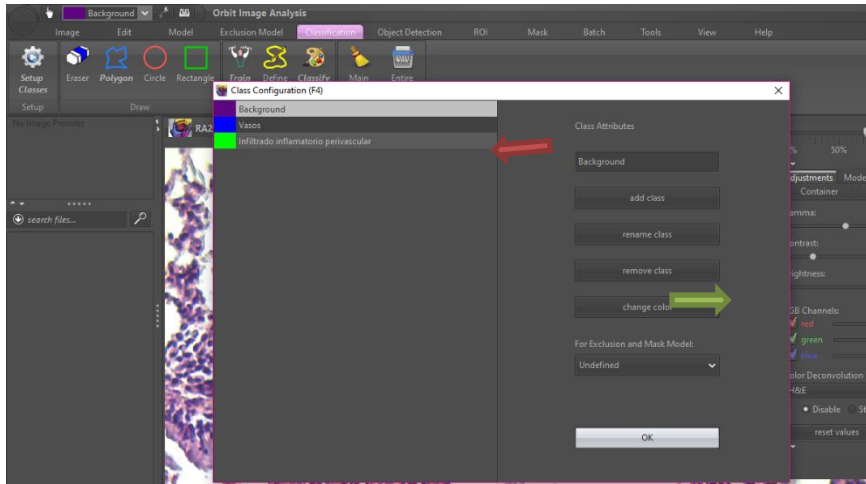


Figura 4. Configuración de las clases a evaluar. Se selecciona el color (flecha roja) y se nombra con la estructura correspondiente (flecha verde).

Se utilizó la herramienta *Region Of Interest (ROI)* para definir un área de interés, seleccionando la opción *Define ROI* y se dibujó la región de ejemplo alrededor de la estructura para analizar individualmente a los vasos, bronquios y alveolos de una misma fotografía. (Figura 5)

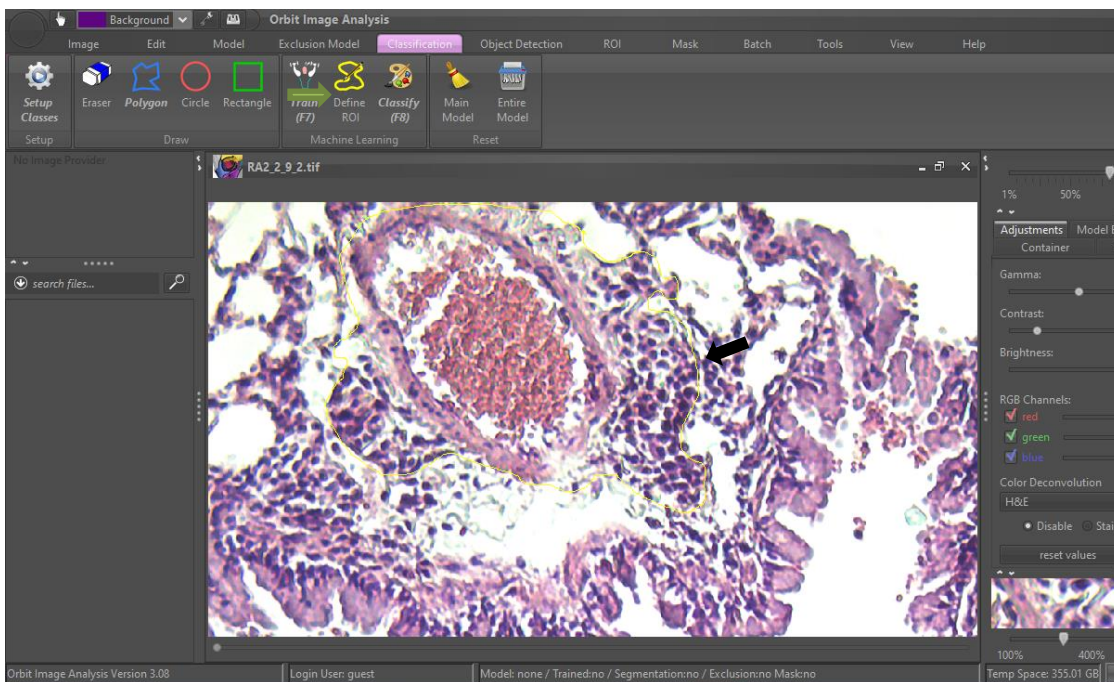


Figura 5. Definición del área de interés a analizar. Se selecciona la herramienta ROI (flecha verde) y se realiza el marcaje alrededor de la estructura a analizar (flecha negra).

Dentro de la región de interés (ROI), se marcaron áreas representativas para cada clase de tejido, para realizarlo se seleccionó la clase desde el menú desplegable de clases, posteriormente se eligió una herramienta de dibujo (por ejemplo, polígono) y se dibujaron algunas regiones de ejemplo a fin de mostrarle al programa las regiones representativas para cada clase de tejido (Figura 6).

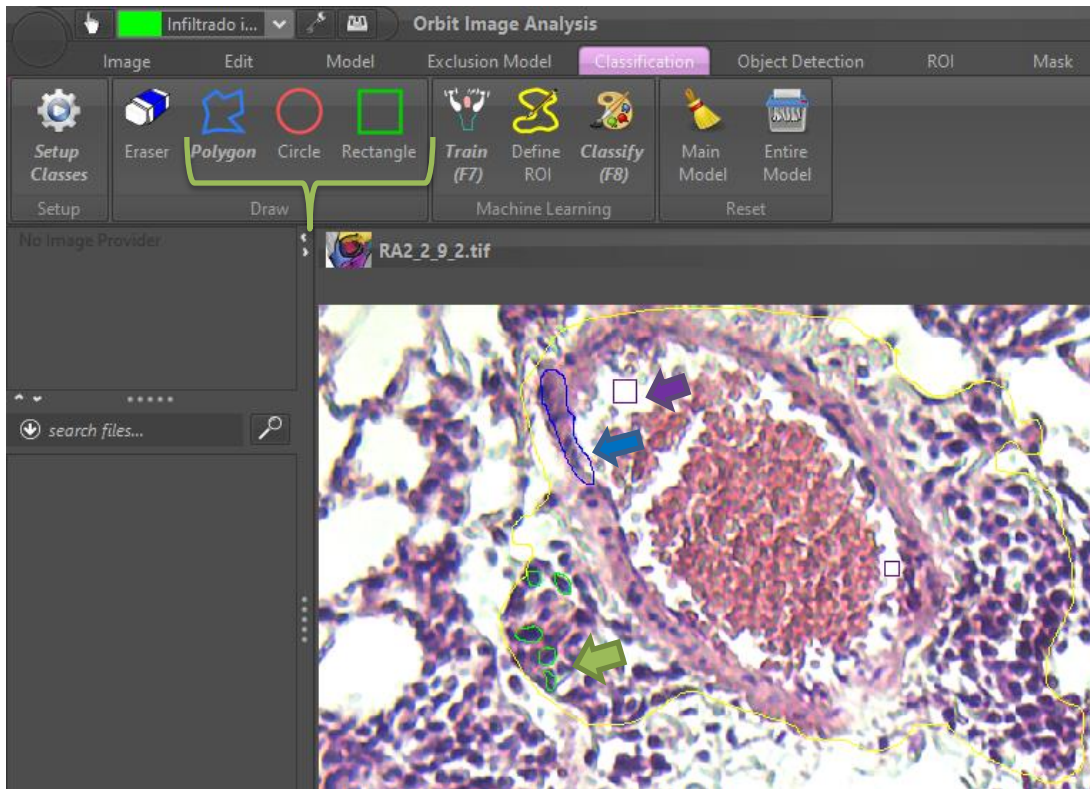


Figura 6. Marcaje de las áreas representativas para cada clase de tejido. Se selecciona la forma para marcar el área de tejido (corchete verde), posteriormente se dibuja sobre el tejido el área representativa. (Flecha morada: área representativa del fondo; Flecha azul: área representativa del tejido vascular; Flecha verde: área representativa del infiltrado inflamatorio.)

Seguidamente se seleccionó la opción *Train* para entrenar al modelo basado en las regiones de clase anteriormente marcadas y después se seleccionó la opción *Classify* para clasificar el modelo completo marcado en la fotografía. (Figura 7).

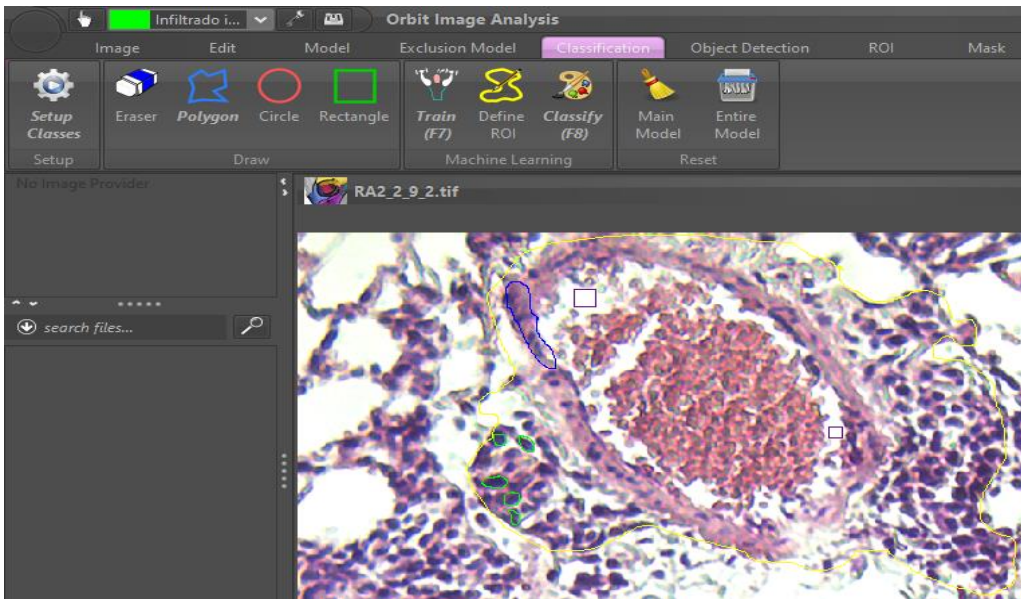


Figura 7. Entrenamiento y clasificación de la imagen. Se selecciona la opción Train para entrenar al modelo (flecha verde), posteriormente se selecciona la opción Class

Metodología para el objetivo específico 2

Objetivo específico 2: Medir el grado de inflamación de la muestra de pulmón en el modelo murino asmático con remodelación de la vía aérea y con tinción hematoxilina-eosina mediante microscopio óptico y el programa Orbit Image Analysis.

Medición mediante microscopio óptico: Con la metodología general de la cuantificación de inflamación anteriormente descrita, se evaluó el grado de inflamación y se asignó un valor a partir de la escala estandarizada antes mencionada.

Cuantificación de tejido celular inflamatorio con el programa Orbit Image Analysis: Al clasificar el modelo completo con la metodología del objetivo específico 1 anteriormente descrita, se obtuvieron los resultados del análisis desplegándose una ventana donde se mostraron las proporciones por cada clase, que, sumadas, dan como resultado 1. (imagen).

Finalmente, se realizó la validez visual de los resultados con el control deslizante inferior a la imagen. Llevándolo hacia la derecha, se observó el mapa de clasificación. Para cada grupo experimental se obtuvo el área de inflamación perivascular, peribronquial y alveolar en cada microfotografía. Los resultados se normalizaron tomando en cuenta el área que ocupa cada estructura y su número, con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{área de inflamación en la microfotografía}}{\text{área de la estructura} \times \text{cantidad de estructuras en la microfotografía}}$$

Entendemos por estructura ya sea al vaso, al bronquio o al tejido alveolar. Para el análisis estadístico, se empleó el promedio y desviación estándar de las mediciones obtenidas de todas las microfotografías de cada laminilla.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La concordancia entre los observadores se midió con el coeficiente de correlación intraclase. En los datos obtenidos se presentaron medias y desviaciones estándar de cada grupo experimental y de los grupos control. El análisis estadístico se realizó en el software SPSS versión 23. Se hizo ANOVA con prueba post-hoc de Tuckey para comparar la diferencia entre los grupos. Se empleó el programa R ((versión 3.6) y RStudio (versión 1.2.1335). Se consideró como significativa una p menor de 0.05.

Tamaño de la muestra: Se realizó un estudio para una variable de respuesta continua de un sujeto control y uno experimental, con un control por cada sujeto experimental. La variable diana fue la presencia de inflamación en la matriz extracelular. En un estudio previo (44), la respuesta dentro de cada grupo de sujetos se distribuyó normalmente con una desviación estándar de 780. Si la verdadera diferencia en la media experimental y de control es de 1150 (nos interesa una magnitud del efecto 50% o mayor), nosotros tendríamos que estudiar 8 sujetos experimentales y 8 sujetos control para ser capaces de rechazar la hipótesis nula de que las medias poblacionales de los grupos experimental y control son iguales, con una potencia de 0.8 y probabilidad de cometer el error de tipo 1 de 0.05. El cálculo se hizo con el programa *Power and Sample Size PS*.

ASPECTOS ÉTICOS

El presente protocolo de investigación siguió los lineamientos éticos establecidos por la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y los principios básicos de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. También se siguieron los lineamientos establecidos por el Bioterio Central de la BUAP.

RESULTADOS

ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA LA MEDICIÓN DEL GRADO DE INFLAMACIÓN EN EL TEJIDO PULMONAR

La medición del grado de inflamación se realizó por 2 observadores diferentes a partir de 2 métodos distintos siguiendo la metodología descrita en el objetivo específico 2. Estos fueron a través de la observación de las imágenes en el microscopio óptico y con la aplicación del programa *Orbit Image Analysis*. Con el primer método cada observador analizó las 32 laminillas al microscopio óptico. En cada laminilla se cuantificaron el número de vasos y bronquios encontrados observando la presencia o ausencia de inflamación alrededor de ellos, y se asignó un valor del 0-3 al grado de inflamación presente. Se obtuvo el promedio y la mediana de inflamación de cada estructura reportada por cada observador. Así mismo, para determinar cuál método resultaba más confiable y objetivo, ambos se evaluaron a través del coeficiente de correlación intraclase (CCI) para determinar la concordancia entre los datos obtenidos de los 2 observadores, observándose que al utilizar el método al microscopio óptico el CCI fue muy variable. Dependiendo de la variable analizada, osciló entre 0.001 hasta 0.79 (Tabla 3).

Tabla 3. Consistencia de las mediciones entre 2 observadores con el método de análisis al microscopio óptico.

Medición	Observador 1	Observador 2	CCI (IC _{95%})*	<i>p</i>
Numero de vasos	4109	3009	0.001 (-0.34 - 0.34)	<i>p</i> = 0.49
Mediana de inflamación de vasos	2	1	0.79 (0.62 - 0.89)	<i>p</i> = < 0.001
Promedio de inflamación de vasos	1	2	0.79 (0.62 - 0.89)	<i>p</i> = < 0.001
Numero de bronquios	3069	4042	0.06 (-0.27 - 0.40)	<i>p</i> = 0.35
Mediana de inflamación de bronquios	1	0	0.75 (0.55 - 0.86)	<i>p</i> = < 0.001
Promedio de inflamación de bronquios	1.5	1	0.75 (0.55 - 0.86)	<i>p</i> = < 0.001
Mediana de inflamación general	1	2	0.64 (0.39 - 0.80)	<i>p</i> = < 0.001

*CCI: coeficiente de correlación intraclase. (IC_{95%}): intervalo de confianza al 95%.

Con el segundo método cada observador analizó las fotografías obtenidas de cada laminilla con el programa *Orbit*. De la misma manera se cuantificaron el número de vasos y bronquios encontrados y mediante el algoritmo anteriormente desarrollado se midió el infiltrado inflamatorio. Por cada observador se reportaron el promedio y la mediana de inflamación. El CCI de las mediciones hechas por los 2 observadores osciló entre 0.98 y 0.99 (Tabla 4), por lo que se decidió implementar el análisis con *Orbit* como el método estandarizado más confiable para la medición del grado de inflamación y la obtención de los resultados.

Tabla 4. Consistencia de las mediciones entre 2 observadores con el método de análisis con el programa Orbit.

Medición	Observador 1	Observador 2	CCI (IC _{95%})*	p
Numero de vasos	692	692	1**	<0.001
Promedio del área de vasos	0.42	0.43	0.99 (0.99 - 1)	<0.001
Promedio del área de inflamación de vasos	.30	0.30	1**	<0.001
Numero de bronquios	643	641	0.99 (0.99 – 0.99)	<0.001
Promedio del área de bronquios	0.39	.40	0.99 (0.99 – 0.99)	<0.001
Promedio del área de inflamación de bronquios	0.18	0.19	0.99 (0.99 - 1)	<0.001
Promedio del área alveolar	0.39	0.41	0.98 (0.97 – 0.99)	<0.001
Promedio del área de inflamación alveolar	0.17	0.18	0.99 (0.99 – 0.99)	<0.001

*CCI: coeficiente de correlación intraclase. (IC_{95%}): intervalo de confianza al 95%.

**Los observadores contaron el mismo número de vasos.

EFFECTO DEL SURFACTANTE PULMONAR ENRIQUECIDO CON PE SOBRE EL GRADO DE INFLAMACIÓN PULMONAR EN EL MODELO MURINO DE REMODELACIÓN DE LA VÍA AÉREA.

Desde que se demostró que la administración de surfactante pulmonar enriquecido con PE provoca disminución de la deposición de fibras de colágena en la fibrosis subepitelial en un modelo murino de asma con remodelación de la vía aérea, se examinó si este fosfolípido podía tener un efecto similar sobre el grado de inflamación. Para este propósito, se midió la presencia o ausencia de inflamación con tinción HE en los 3 grupos experimentales. La figura 1 muestra microfotografías representativas de cada grupo en donde se pueden observar los diferentes grados de inflamación.

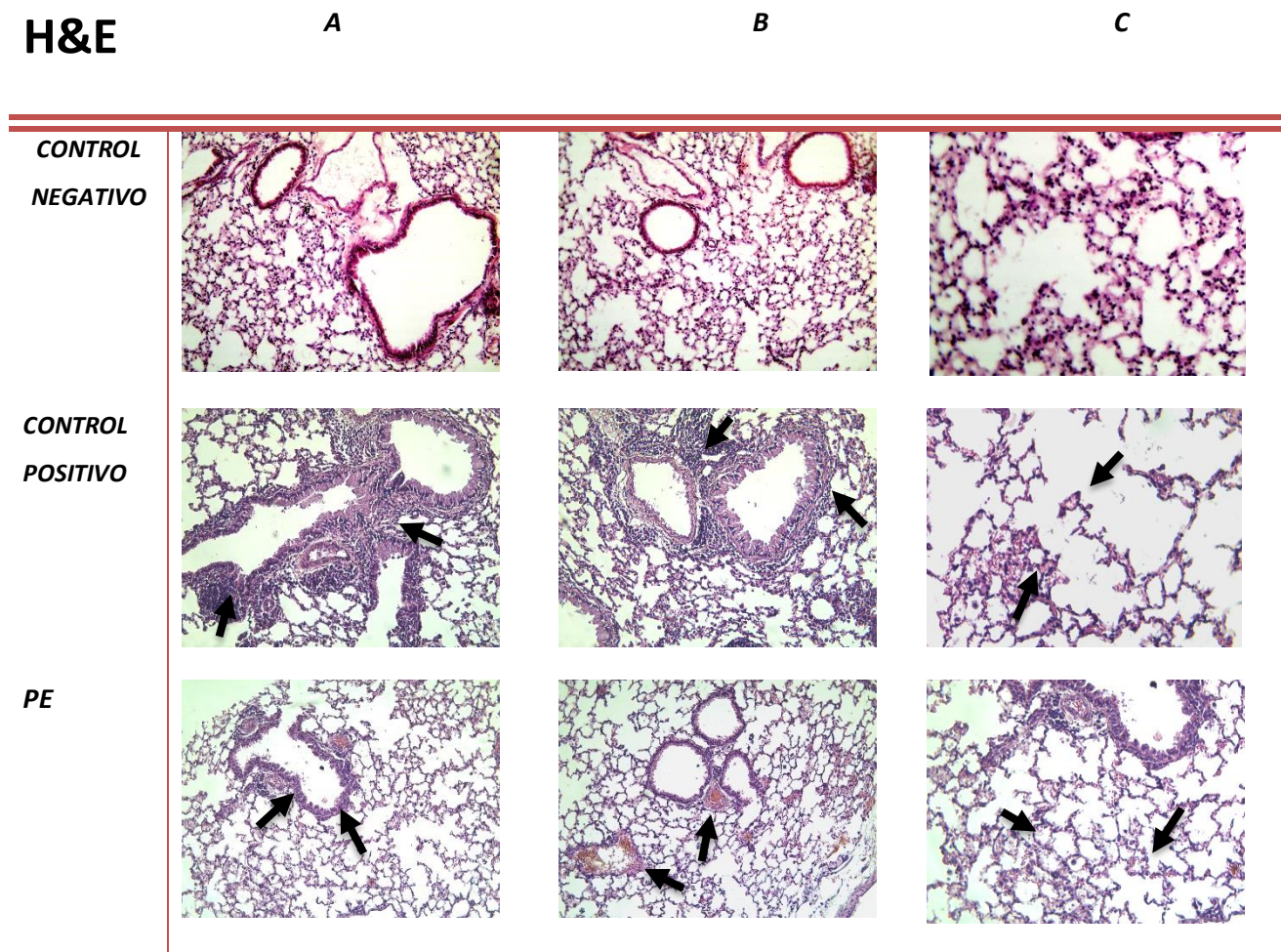


Figura 1. Microfotografías representativas del tejido pulmonar de los grupos experimentales. Control negativo: sensibilización y retos con solución salina, tratamientos con sol. salina. **Control positivo:** sensibilización y retos con ECH, tratamientos con sol. salina. **PE:** sensibilización y retos con ECH, tratamiento con fosfatidiletanolamina. **(A)** Infiltrado inflamatorio peribronquial (flechas negras). **(B)** Infiltrado inflamatorio perivascular (flechas negras). **(C)** Infiltrado inflamatorio alveolar (flechas negras).

Efecto de la fosfatidiletanolamina sobre el grado de inflamación alveolar.

El grupo de ratones controles mostró cierto grado de inflamación, observándose dispersión en el área normalizada de inflamación ya que el promedio del grupo control negativo fue de 34.22 ± 17.67 . Sin embargo, en el grupo control positivo aumentó el área de inflamación a 56.71 ± 21.84 , y en el grupo tratado con fosfatidilentanoalmina, la inflamación disminuyó pues el promedio fue de 29.19 ± 11.38 . La diferencia fue estadísticamente significativa al compararlo con el grupo control positivo (ANOVA con post-hoc Tuckey, $p < 0.001$). (Figura 2).

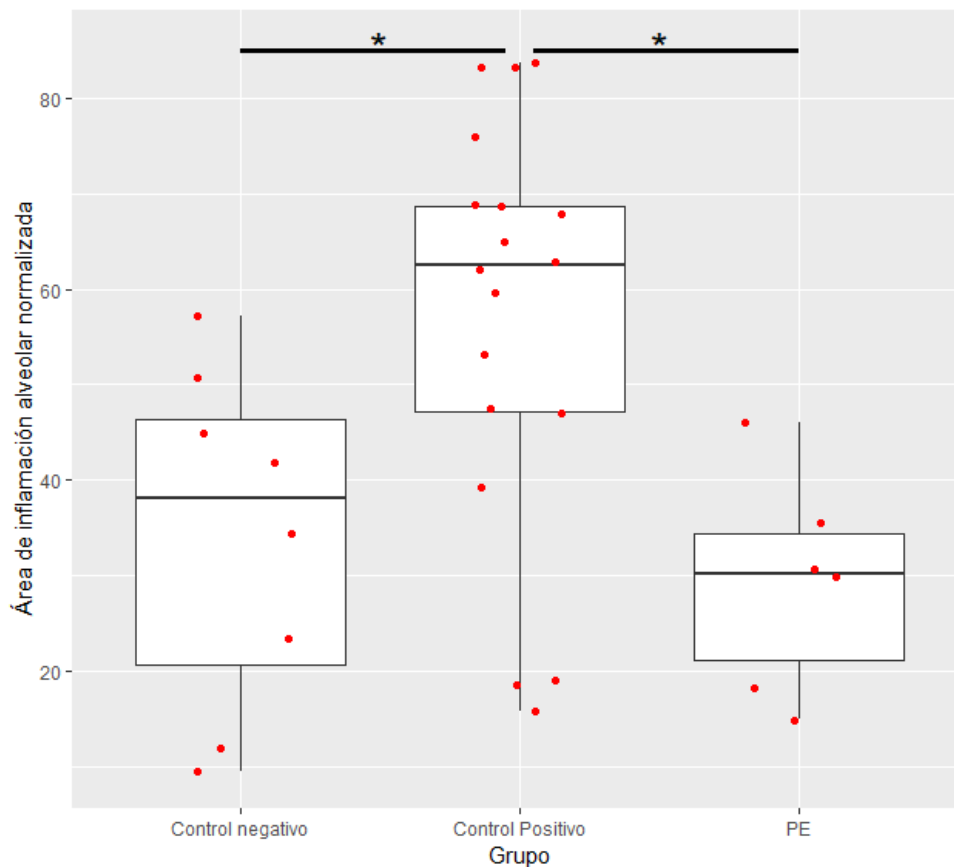


Figura 8. Efecto de la fosfatidiletanolamina (PE) sobre el grado del área de inflamación alveolar normalizada en el modelo murino de remodelación de la vía aérea. Se muestra el área de inflamación alveolar normalizada de cada ratón (puntos rojos) agrupados en sus respectivos grupos experimentales (Control negativo, Control positivo, PE) a fin de mostrar el efecto de la PE sobre la misma. Los datos se obtuvieron a partir de mediciones hechas con el programa Orbit. Las comparaciones fueron hechas con ANOVA y la prueba *post-hoc* de Tukey. El asterisco indica una $p < 0.01$. Dosis de PE empleada: 400 mg/Kg de peso a una concentración de 25 mg/ml.

Efecto de la fosfatidiletanolamina sobre el grado de inflamación peribronquial.

De la misma manera, el grupo de ratones controles mostró cierto grado de inflamación peribronquial, ya que el promedio de área de inflamación normalizada del grupo control negativo

fue de 0.89 ± 0.65 . En contraste, en el grupo control positivo la inflamación fue mayor pues el promedio aumentó a 9.6 ± 4.9 , mientras que en el grupo tratado con fosfatidiletanolamina disminuyó a 3.69 ± 1.99 . La diferencia fue estadísticamente significativa en comparación con el grupo control positivo. (ANOVA con *post-hoc* Tukey, $p < 0.001$). (Figura 3).

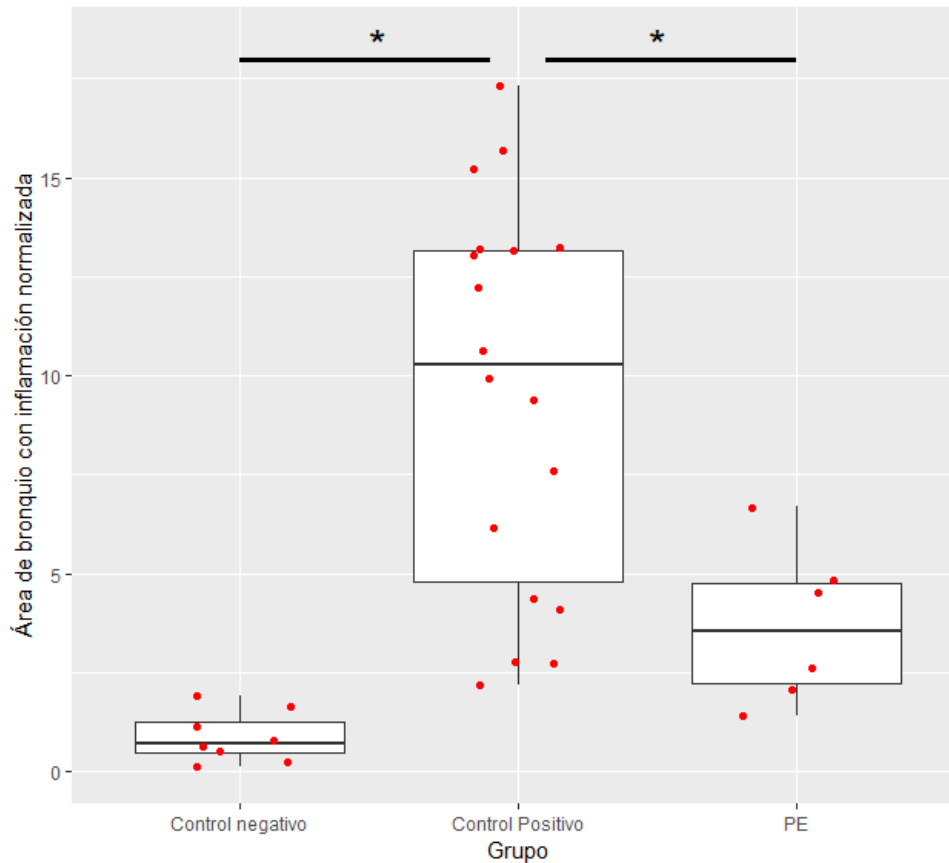


Figura 9. Efecto de la fosfatidiletanolamina sobre el grado del área de inflamación bronquial normalizada en el modelo murino de remodelación de la vía aérea. Se muestra el área de inflamación bronquial normalizada de cada ratón (puntos rojos) agrupados en sus respectivos grupos experimentales (Control negativo, Control positivo, PE) a fin de mostrar el efecto de la PE sobre la misma. Los datos se obtuvieron a partir de mediciones hechas con el programa Orbit. Las comparaciones fueron hechas con ANOVA y la prueba *post-hoc* de Tukey. El asterisco indica una $p < 0.01$. Dosis de PE empleada: 400 mg/Kg de peso a una concentración de 25 mg/ml

Efecto de la fosfatidiletanolamina sobre el grado de inflamación perivascular.

En el grupo de ratones controles se mostró cierto grado de inflamación, pues el promedio de área de inflamación perivascular normalizada del grupo control negativo fue de 1.14 ± 0.79 . Sin embargo, en el grupo control positivo aumentó el área de inflamación a 21.66 ± 12.85 , mientras que en el grupo tratado con fosfatidiletanolamina la inflamación disminuyó, pues el promedio fue de 5 ± 2.9 . La estadística hecha con ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey demostró que hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos control negativo y control positivo, lo que

comprueba que en el grupo asmático tratado con surfactante pulmonar enriquecido con PE disminuyó significativamente el grado de inflamación perivascular ($p < 0.01$). (Figura 4).

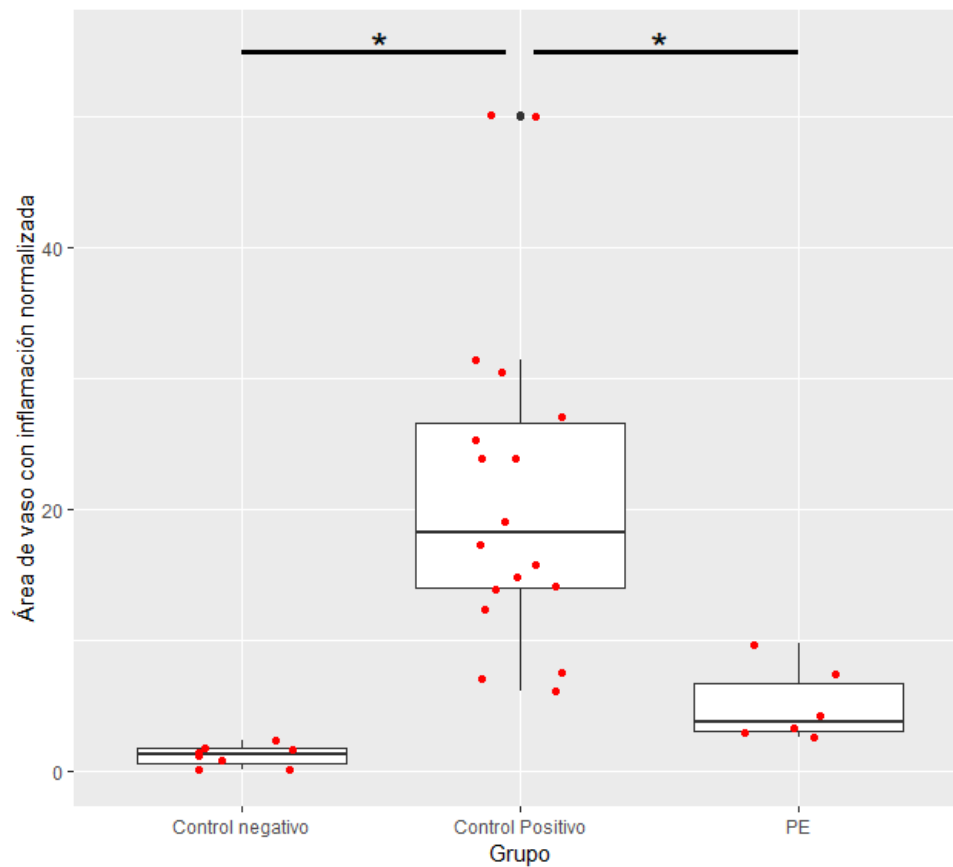


Figura 10. Efecto de la fosfatidiletanolamina sobre el grado del área de inflamación vascular normalizada en el modelo murino de remodelación de la vía aérea. Se muestra el área de inflamación vascular normalizada de cada ratón (puntos rojos) agrupados en sus respectivos grupos experimentales (Control negativo, Control positivo, PE) a fin de mostrar el efecto de la PE sobre la misma. Los datos se obtuvieron a partir de mediciones hechas con el programa Orbit. Las comparaciones fueron hechas con ANOVA y la prueba *post-hoc* de Tukey. El asterisco indica una $p < 0.01$. Dosis de PE empleada: 400 mg/Kg de peso a una concentración de 25 mg/ml

DISCUSIÓN

El surfactante pulmonar es una mezcla compleja de fosfolípidos y proteínas específicas que tienen muchas funciones esenciales. Su papel en el asma no se ha establecido claramente, pero existe evidencia en modelos murinos del rol que desempeñan las proteínas SP-A y SP-D en la respuesta alérgica inflamatoria de la vía aérea. Por ejemplo, en el contexto clínico, la SP-D se ha postulado como un marcador de actividad de la enfermedad, ya que se ha observado que niveles altos en el esputo y lavado bronquioalveolar de pacientes asmáticos, se relacionan con la severidad de la enfermedad, con los cambios en el espesor de la membrana basal y en el área de músculo liso, también se sabe que está involucrada en la eliminación de patógenos, células apoptóticas/necróticas y en la modulación de la inflamación alérgica (45;46). Además, se ha demostrado que un fragmento recombinante de SP-D humana suprime la inflamación alérgica proinflamatoria impulsada por los linfocitos Th2, inhibe la producción de IgE y muestra efectos terapéuticos al disminuir la eosinofilia pulmonar en la inflamación alérgica causada por polen en modelos murinos experimentales (47). Otro componente del surfactante que se ha relacionado con el asma es la proteína SP-A. Existe evidencia de que en ratones *knock-out* para SP-A aumenta la gravedad de la inflamación en afecciones como el asma (48). Además esta descrito que regula y controla las señales proinflamatorias que desencadena la inmunidad del huésped en respuesta a la exposición a alérgenos y participa en la modulación de eosinófilos relacionados con la gravedad de la enfermedad.(49).

Otro componente importante del surfactante pulmonar es la fosfatidiletanolamina (PE), un fosfolípido que resulta de interés especial al existir evidencia de que posee propiedades antifibrosantes en modelos *in vivo* de fibrosis pulmonar (5) así como de inducir decremento en la expresión de fibras de colágena en un modelo murino de asma crónico (7); sin embargo, la función que los fosfolípidos del surfactante pulmonar pudieran tener sobre la inflamación de la vía aérea en el asma en comparación con la función que tienen las proteínas, no está dilucidada.

En el presente estudio, utilizamos un preparado de surfactante pulmonar exógeno enriquecido con el fosfolípido fosfatidiletanolamina, pero carente de las proteínas SP-A y SP-D. Cabe mencionar que para probar el efecto de la PE, se sensibilizó al modelo murino con ECH y no con OVA por cuestiones de falta de presupuesto; sin embargo, el grado de fibrosis observado en el grupo control positivo, nos permite afirmar que se alcanzaron los objetivos del modelo en el cual nos basamos (44).

Encontramos que nebulizando el surfactante enriquecido con PE a una dosis de 400 mg/Kg de peso, a una concentración de 25 mg/ml como tratamiento en ratones con asma crónico con

remodelación de la vía aérea se atenuó visiblemente la inflamación perivascular, peribronquial y del parénquima pulmonar; también se observó que el área de inflamación en los vasos y bronquios disminuyó en comparación con los ratones asmáticos que no recibieron el tratamiento. Es importante mencionar que el grado de inflamación detectada por *Orbit* en vasos, bronquios y alveolos de ratones sanos, se corrobora con la inflamación histopatológica detectada al microscopio por los observadores, en estos mismos ratones, ya que el promedio y la mediana de inflamación general obtenidos de ambos observadores fue de 2.14 y 2 respectivamente, en la escala estandarizada que va del 0 al 3, antes mencionada. Suponemos que la inflamación observada en los ratones del grupo control negativo, pudo deberse a las condiciones de bioterio a las que estuvieron expuestos, a la estancia prolongada o a las micronebulizaciones continuas con solución salina. A pesar de ello, la inflamación peribronquial en los animales tratados con fosfatidiletanolamina disminuyó un 62% respecto a la inflamación en los animales retados con ECH, y la inflamación perivascular disminuyó un 77%. Al ser un programa de entrenamiento para el reconocimiento de patrones, el algoritmo confiable de cuantificación de inflamación que se estableció con *Orbit*, pudo comprobar el efecto del SP con PE sobre la inflamación.

El efecto antiinflamatorio de algunos fosfolípidos se ha descrito en la literatura. Jelske N. y cols. (50), demostraron que en ratones *knock-out* para fosfatidiletanolamina *N-metiltransferasa* (una enzima de gran importancia para la biosíntesis de fosfatidilcolina en el hígado), se elevaron los niveles de TNF α (una citocina inflamatoria) provocando inflamación hepática en estos animales, en comparación con los grupos controles. En otro estudio, Colombo S. y cols. (51) demostraron que la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina oxidadas (OxPAPE y OxPAPS, respectivamente), disminuyeron significativamente los niveles de TNF α expresado por monocitos clásicos en sangre periférica humana incubada con LPS (lipopolisacáridos producidos por bacterias que inducen un estado inflamatorio), además, se observó que la incubación con OxPAPS y LPS indujo un decremento en la expresión de IL-1 β por monocitos no clásicos, así como también en la expresión de TNF α por células dendríticas (51).

Rongsong Li. y cols. demostraron que la sn-glicero-3-fosfocolina (PEIPC), una subespecie de fosfatidilcolina oxidada (OxPAPC), induce un efecto antiinflamatorio al reducir la expresión de TNF α e incrementar la expresión de IL-10 a través de la activación del receptor de prostaglandina E2 en células endoteliales (52). Hammond VJ y cols. identificaron recientemente al ácido 15-cetoeicosatetraenoico (KETE)-PE el cual es producto de la acción enzimática de la 15-lipooxigenasa sobre la fosfatidilcolina, como un fosfolípido antiinflamatorio que activan al receptor

PPAR γ que es capaz de reducir la producción de proteína C reactiva, factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 6 y moléculas de adhesión vascular en células monocíticas (53).

En otro estudio, Rockenfeller y cols. demostraron que la administración de etanolamina aumenta los niveles de fosfatidiletanolamina, lo que condiciona un aumento del marcador autofágico GFP-LC3, estimulando la autofagia en células de mamíferos, así como disminuyendo las especies reactivas de oxígeno (ROS) (54). Yu Yao y cols. demostraron que la fosfatidiletanolamina induce apoptosis en células hepáticas al aumentar la expresión de Bax, una proteína con actividad proapoptótica y disminuir la expresión de Bcl-2, una proteína con actividad de supervivencia celular (55).

Fessler MB y cols. observaron que el fosfatidilinositol y la fosfatidilglicerina, inhiben respuestas inflamatorias de macrófagos frente a liposacáridos bacterianos al interferir con la vía LBCD14-TLR4/MD2, una vía que cataliza la transferencia de lipopolisacáridos al complejo TLR4/MD2 que tiene como función el reconocimiento de patrones de patógenos (56).

En nuestro estudio, se pudo comprobar que el grado de inflamación histopatológica se atenúa con la administración de surfactante pulmonar exógeno enriquecido con fosfatidiletanolamina en un modelo murino asmático sensibilizado con extracto crudo de huevo. Con la evidencia mostrada en diferentes estudios, pensamos que los mecanismos moleculares responsables de este efecto, no solo se debe al enriquecimiento del surfactante con PE, sino también a los demás fosfolípidos que lo componen, y que estos mecanismos se relacionan fuertemente con la inhibición de la expresión del TNF α por monocitos (50-52). Otro mecanismo que se puede asociar es la apoptosis causada por PE, pues se ha demostrado que dentro de este mecanismo se inhibe al receptor Raf-1, el cual forma parte de la vía MAPK/ERK para la proliferación regulación y diferenciación celular, lo que podría estar inhibiendo la supervivencia de células inflamatorias (51). También se ha comprobado que disminuyen las especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro del mecanismo de apoptosis; al ser estas moléculas reclutadoras de glóbulos blancos, de esa manera podría verse disminuido el infiltrado inflamatorio (54). Los mecanismos exactos sobre la inflamación aún no están del todo dilucidados por lo que este trabajo requiere futuras investigaciones, y establecer si el surfactante pulmonar enriquecido con PE puede ser un posible tratamiento para el asma.

Las limitaciones de nuestro trabajo están relacionadas con el modelo experimental, al ser este sensibilizado con extracto crudo de huevo (ECH) y no con ovoalbúmina (OVA). Por otro lado, se observó cierto grado de inflamación en los ratones de los grupos controles. Esto puede ser

debido a las condiciones ambientales en el bioterio, así como a las condiciones durante las nebulizaciones con solución salina. Por costos, reusamos los micronebulizadores.

Las perspectivas a futuro del presente trabajo apuntan a que con futuras investigaciones se pueda establecer al surfactante pulmonar enriquecido con fosfatidiletanolamina como posible tratamiento del asma crónico. Sin embargo, primero debemos llevar a cabo experimentos que nos permitan dilucidar los mecanismos moleculares. También se deben efectuar estudios de dosis-respuesta para averiguar la cantidad óptima de PE en la preparación. Es importante mencionar que empleamos un preparado de surfactante exógeno de empleo comercial, y la PE es para uso exclusivo en el laboratorio. Actualmente estamos trabajando en la extracción de surfactante de pulmones de cerdo, así como en la síntesis orgánica de 1,2-dipalmitoil-glicero-3-fosfoetanolamina racémica.

CONCLUSIONES

- El análisis de imágenes con el programa Orbit vs la lectura en el microscopio óptico es un método más consistente para la identificación y cuantificación de células inflamatorias.
- El surfactante pulmonar enriquecido con PE disminuye el grado de inflamación perivascular en un modelo murino de asma crónico con remodelación de la vía aérea.
- El surfactante pulmonar enriquecido con PE disminuye el grado de inflamación peribronquial en un modelo murino de asma crónico con remodelación de la vía aérea.
- El surfactante pulmonar enriquecido con PE disminuye el grado de inflamación perialveolar en un modelo murino de asma crónico con remodelación de la vía aérea.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Global Initiative for Asthma [Internet]. Wisconsin: Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2018; c2018 [cited 20-10-2018]. Available from: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2018/04/wms-GINA-2018-report-V1.3-002.pdf>
- (2) The Global Asthma Report 2018 [Internet]. New Zealand: c2018 [cited 25-10-2018]. Available from: <http://www.globalasthmareport.org/Global%20Asthma%20Report%202018.pdf>
- (3) Loftus PA, Wise SK. Epidemiology of asthma. *Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery* 2016;24(3):246-9.
- (4) Larenas-Linnemann D, Salas-Hernandez J, Vazquez-Garcia JC, Ortiz-Aldana I, Fernandez-Vega M, Del Rio-Navarro BE, et al. Mexican Asthma Guidelines: GUIMA 2017. *Rev Alerg Mex* 2017;64 Suppl 1:s11-s128.
- (5) Vazquez-De-Lara LG, Tlatelpa-Romero B, Romero Y, Fernández-Tamayo N, Vazquez-De-Lara F, Justo-Janeiro JM, et al. Phosphatidylethanolamine induces an antifibrotic phenotype in normal human lung fibroblasts and ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19(9).
- (6) Becerril C, Meléndez J, De Lara LV, Maldonado V, Montaña M, Selman M, et al. Surfactant components modulate fibroblast apoptosis and type I collagen and collagenase-1 expression. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2000;279(5):L950-L957.
- (7) García Alcudia I, Vázquez De Lara L, García Mendoza I, Díaz Gómez Y, Tlatelpa Romero B, Fernández Tamayo N, et al. Effect of inhaled surfactant enriched with phosphatidylethanolamine on matrix deposition in a murine model of airway inflammation and remodeling. *European Respiratory Journal* 2018 Sep;52(suppl 62):A1049.
- (8) Hartl D, Lee CG, Da Silva CA, Chupp GL, Elias JA. Novel biomarkers in asthma: Chemokines and chitinase-like proteins. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2009;9(1).
- (9) Agache I, Akdis C, Jutel M, Virchow JC. Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2012;67(7):835-46.
- (10) Lotvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjerner L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011;127(2):355-60.
- (11) Wenzel S. Severe asthma: From characteristics to phenotypes to endotypes. *Clinical and Experimental Allergy* 2012;42(5):650-8.
- (12) Akella A, Deshpande SB. Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders. *Indian Journal of Experimental Biology* 2013;51(1):5-22.
- (13) Baumgart F, Ospina OL, Mingarro I, Rodríguez-Crespo I, Pérez-Gil J. Palmitoylation of pulmonary surfactant protein SP-C is critical for its functional cooperation with SP-B to sustain compression/expansion dynamics in cholesterol-containing surfactant films. *Biophysical Journal* 2010;99(10):3234-43.

- (14) Chroneos Z, Sever-Chroneos Z, Shepherd V. Pulmonary surfactant: An immunological perspective. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2010;25(1):13-26.
- (15) Grupo BIOMIL [Internet]. Biofísica de Membranas e Interfases Lipo-proteicas; c2019 Available from: bbm1.ucm.es/biomil/index.html
- (16) Zuo YY, Veldhuizen RAW, Neumann AW, Petersen NO, Possmayer F. Current perspectives in pulmonary surfactant - Inhibition, enhancement and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 2008;8(10):1947-77.
- (17) Chavarha M, Khojlnlan H, Schulwitz LE, Biswas SC, Rananavare SB, Hall SB. Hydrophobic surfactant proteins induce a phosphatidylethanolamine to form cubic phases. *Biophysical Journal* 2010;98(8):1549-57.
- (18) Godrath M. Lung surfactants. *American Journal of Health-System Pharmacy* 2006;63(16):1514-21.
- (19) Kisure U, Bernal AL, Kamran MF, Saxena S, Singh M, Sarma PU, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D in human health and disease. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2005;53(5):399-417.
- (20) Ding J, Takamoto DY, Von Nahmen A, Lipp MM, Lee KY, Waring AJ, et al. Effects of lung surfactant proteins, SP-B and SP-C, and palmitic acid on monolayer stability. *Biophysical Journal* 2001;80(5):2262-72.
- (21) Enhorning G. Surfactant in airway disease. *Chest* 2008 Apr;133(4):975-80.
- (22) Jordanova A, Georgiev GA, Alexandrov S, Todorov R, Lalchev Z. Influence of surfactant protein C on the interfacial behavior of phosphatidylethanolamine monolayers. *European Biophysics Journal* 2009;38:369-79.
- (23) universidad autonoma de barcelona [Internet]. Fisiología Respiratoria: Introducción y ventilación; c2019 Available from: <https://www.studocu.com/es/u/2463872>
- (24) Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma-present in most, absent in many. *Nature Reviews Immunology* 2015;15(1):57-65.
- (25) Kariyawasam HH, Robinson DS. The eosinophil: The cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 2006;27(2):117-27.
- (26) Fehrenbach H, Wagner C, Wegmann M. Airway remodeling in asthma: what really matters. *Cell and Tissue Research* 2017;367(3):551-69.
- (27) López JH, Gutiérrez CJ, Téllez HdO, López MM. Remodelación de la vía aérea en asma. *Medigraphic* 2009;18(2):60-78.
- (28) Bergeron C, Boulet LP. Structural changes in airway diseases: Characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest* 2006;129(4):1068-87.
- (29) Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;164(10):28-38.

- (30) Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Current Opinion in Pharmacology* 2010;10(3):236-45.
- (31) Holgate ST. Epithelium dysfunction in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007;120(6):1233-44.
- (32) Warner SM, Knight DA. Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2008;8(1):44-8.
- (33) Wang JY, Kishore U, Lim BL, Strong P, Reid KBM. Interaction of human lung surfactant proteins A and D with mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *Clinical and Experimental Immunology* 1996;106(2):367-73.
- (34) Liu CF, Chen YL, Chang WT, Shieh CC, Yu CK, Reid KBM, et al. Mite allergen induces nitric oxide production in alveolar macrophage cell lines via CD14/toll-like receptor 4, and is inhibited by surfactant protein D. *Clinical and Experimental Allergy* 2005;35(12):1615-24.
- (35) Winkler C, Hohlfeld JM. Surfactant and allergic airway inflammation. *Swiss medical weekly* 2013;143:1-10.
- (36) Scanlon ST, Milovanova T, Kierstein S, Cao Y, Atochina EN, Tomer Y, et al. Surfactant protein-A inhibits *Aspergillus fumigatus*-induced allergic T-cell responses. *Respiratory Research* 2005;6(97).
- (37) Mahajan L, Gautam P, Dodagatta-Marri E, Madan T, Kishore U. Surfactant protein SP-D modulates activity of immune cells: Proteomic profiling of its interaction with eosinophilic cells. *Expert Review of Proteomics* 2014;11(3):355-69.
- (38) Erpenbeck VJ., Ziegert M., Cavalet-Blanco D., Martin C., Baelder R., Glaab T., et al. Surfactant protein D inhibits early airway response in *Aspergillus fumigatus*-sensitized mice. *Clinical and Experimental Allergy* 2006;36(7):930-40.
- (39) Von Bredow C, Hartl D, Schmid K, Schabaz F, Brack E, Reinhardt D, et al. Surfactant protein D regulates chemotaxis and degranulation of human eosinophils. *Clinical and Experimental Allergy* 2006;36(12):1566-74.
- (40) Takeda K, Miyahara N, Rha YH, Taube C, Yang ES, Joetham A, et al. Surfactant protein D regulates airway function and allergic inflammation through modulation of macrophage function. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003;168(7):783-9.
- (41) Cheng G, Ueda T, Numao T, Kuroki Y, Nakajima H, Fukushima Y, et al. Increased levels of surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with bronchial asthma. *European Respiratory Journal* 2000;16(5):831-5.
- (42) Wang JY, Shieh CC, Yu CK, Lei HY. Allergen-induced bronchial inflammation is associated with decreased levels of surfactant proteins A and D in a murine model of asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2001;31(4):652-62.
- (43) Constantino Gde T, Mello JF Jr. Remodeling of the lower and upper airways. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* 2009;75(1):151-6.

- (44) Frigasa Iriso Rebeca, Nuñez Naviera Laura, Brienza Nadia, Cen, no Cortés Albert, López Peláez Eduardo, et al. Development of a Murine Model of Airway Inflammation and Remodeling in Experimental Asthma. *Archivos de Bronconeumología* 2009;45(9):422-8.
- (45) Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Molecular Immunology* 2006;43(9):1293-315.
- (46) Emmanouil P, Loukides S, Kostikas K, Papatheodorou G, Papaporfyriou A, Hillas G, et al. Sputum and BAL Clara cell secretory protein and surfactant protein D levels in asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2015;70(6):771-14.
- (47) Asif S.Qaseem, Isha Singh, Ansar A.Pathan, Janice A.Layhadi, StephenR.Durham, Uday Kishore, et al. A Recombinant fragment of Human Surfactant Protein D suppresses Basophil Activation, Th2 and B cell responses in Grass Pollen-induced Allergic Inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2017;196(12):1526-34.
- (48) Pastva AM, Mukherjee S, Giamberardino C, Hsia B, Lo B, Sempowski GD, et al. Lung effector memory and activated CD4+ T cells display enhanced proliferation in surfactant protein A-deficient mice during allergen-mediated inflammation. *Journal of Immunology* 2011;186(5):2842-9.
- (49) Alane Blythe C Dy, Sasipa Tanyaratsrisakul, Dennis R Voelker, Julie G Ledford. The Emerging Roles of Surfactant Protein-A in Asthma. *Journal of Clinical and Cellular immunology* 2018;9(4):553.
- (50) van der Veen JN, Lingrell S, Gao X, Quiroga AD, Takawale A, Armstrong EA, et al. Pioglitazone attenuates hepatic inflammation and fibrosis in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016 Apr 1;310(7):G526-G538.
- (51) Colombo S, Martin-Sierra C, Melo T, Laranjeira P, Paiva A, Domingues P, et al. Modulation of the inflammatory response of immune cells in human peripheral blood by oxidized arachidonoyl aminophospholipids. *Arch Biochem Biophys* 2018 Dec 15;660:64-71.
- (52) Li R, Mouillesseaux KP, Montoya D, Cruz D, Gharavi N, Dun M, et al. Identification of prostaglandin E2 receptor subtype 2 as a receptor activated by OxPAPC. *Circ Res* 2006 Mar 17;98(5):642-50.
- (53) Hammond VJ, Morgan AH, Lauder S, Thomas CP, Brown S, Freeman BA, et al. Novel keto-phospholipids are generated by monocytes and macrophages, detected in cystic fibrosis, and activate peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem* 2012 Dec 7;287(50):41651-66.
- (54) Rockenfeller P, Koska M, Pietrocola F, Minois N, Knittelfelder O, Sica V, et al. Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity. *Cell Death Differ* 2015 Mar;22(3):499-508.
- (55) Yao Y, Huang C, Li ZF, Wang AY, Liu LY, Zhao XG, et al. Exogenous phosphatidylethanolamine induces apoptosis of human hepatoma HepG2 cells via the bcl-2/Bax pathway. *World J Gastroenterol* 2009 Apr 14;15(14):1751-8.

- (56) Fessler MB, Summer RS. Surfactant Lipids at the Host-Environment Interface. Metabolic Sensors, Suppressors, and Effectors of Inflammatory Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016 May;54(5):624-35.