



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA**  
**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA CC10 EN**  
**LAVADOS BRONQUIOALVEOLARES DE NEONATOS HUMANOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**MIGUEL ÁNGEL PALACIOS SÁNCHEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DRA. IRLES MACHUCA CLAUDINE LILIANE**

**MÉXICO D.F., 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*Dedicada a mi pequeño Atl*

No te salves

No te quedes inmóvil  
al borde del camino  
no congeles el júbilo  
no quieras con desgana  
no te salves ahora  
ni nunca

no te salves  
no te llenes de calma  
no reserves del mundo  
sólo un rincón tranquilo  
no dejes caer los párpados  
pesados como juicios  
no te quedes sin labios  
no te duermas sin sueño  
no te pienses sin sangre  
no te juzgues sin tiempo

pero si

pese a todo  
no puedes evitarlo  
y congelas el júbilo  
y quieres con desgana  
y te salvas ahora  
y te llenas de calma  
y reservas del mundo  
sólo un rincón tranquilo  
y dejas caer los párpados  
pesados como juicios  
y te secas sin labios  
y te duermes sin sueño  
y te piensas sin sangre  
y te juzgas sin tiempo  
y te quedas inmóvil  
al borde del camino  
y te salvas

entonces  
no te quedes conmigo.

Mario Benedetti

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todo lo que me ha dado para llegar hasta aquí, porque desde mi adolescencia me he formado en ella.

A mi Facultad porque me apoyó para cumplir este sueño y por todas las cosas que aprendí dentro de sus aulas.

Al Instituto Nacional de Perinatología por abrirme sus puertas y brindarme todo el apoyo para realizar esta tesis.

A la Dra. Claudine Irlles quien me asesoró y apoyó no solo en lo académico, en ella encontré además de una excelente tutora a una gran amiga.

Al Dr. Flavio Mendoza por las oportunidades y el respaldo que me brindó, por todo su apoyo y consejos.

Al M. en C. Joel Arias por compartirme su conocimiento y ayudarme en el aprendizaje de las técnicas de laboratorio.

Al Dr. Guzmán por proporcionar las muestras con las que he podido realizar ésta investigación.

A la M. V. Susana González por su ayuda y enseñanza en el bioterio.

A Laura Correa por todo su apoyo en los trámites, por sus consejos y regaños.

A mi colega y amiga Erika Yépez con quien compartí mi proceso de investigación en el Inper.

A Aura por su amistad y porque siempre llenaba de alegría el laboratorio.

Al biólogo José Luis por su amistad y con quien compartí la última etapa de investigación en el Inper.

Al M. en C. Higinio que me ayudó a perfeccionar algunas técnicas de laboratorio.

A mi compañero biólogo Luis Alberto quien me contactó con el Inper.

A mis profesores:

Las maestras Eloísa Guerra, Georgina Rosales, Rosalva Rangel, Ma. Elena Ayala, Elia Roldán, Beatriz Martínez y Elvia García.

Los profesores Carlos Castillejos, Carlos P. Malvárez, Manuel Rico B., Armando Cervantes y Rubén Zulbarán.

Por sus enseñanzas, consejos y regaños.

A mis amigos de la facultad:

Paola Hernández, Mine, Coni, Sandra Freire, Miriam Martínez, Leti, Misael, Miguel, Eli, Chio, Daniel, Zuleima, Luz, Javier, Laura y demás amigos con quienes compartí momentos muy felices.

A mis amigos:

Jorge Chagoya, Dioscelina Lagunas, Alejandro Aguilar, Kandy Gómez, Irvin Ávila, Katia Meave, Israel Rodríguez, Miguel Méndez, Gerardo Camacho, Papá porro, Érika García, Armando Rodríguez, Emmanuel Audelo, quienes han estado conmigo en los mejores momentos y también en los malos.

A mi familia:

A Atl, la persona más importante en mi vida, que me llena de orgullo y me hace tan feliz.

A Moni, mi compañera de vida, quien siempre me hace sentir una persona especial, sin su apoyo no hubiera podido llegar hasta aquí.

A mis suegros quienes me han apoyado desde el momento en que toqué sus vidas.

A mis cuñadas que me han soportado.

A mis hermanos: Reyna; por todo su cariño aunque a veces le haya costado trabajo entenderme.

A Carlos porque me hizo sacar el orgullo, seguir adelante y me ha apoyado en momentos difíciles.

A Germán por su sincera amistad, compañía y cariño.

A Jorge a quien no tengo palabras para agradecer todo lo que ha hecho por mí, porque siempre ha creído en lo que hago, sin su ayuda no habría llegado hasta aquí.

A Nancy a quien la vida me dio otra oportunidad de conocerla y convivir con ella.

A mis padres toda mi admiración, respeto y amor por todo su apoyo, cariño y consejos, quienes siempre están en mi corazón y me impregnaron su esencia. Gracias.

## Índice

Abreviaturas .....	8
Resumen .....	9
I. Introducción	
I.1. Anatomía y Función pulmonar .....	10
I.2. Síndrome de Deficiencia Respiratoria (SDR).....	14
I.3. Surfactante Pulmonar .....	17
I.4. Proteína de las Células Clara (CC10) .....	22
II. Planteamiento del problema .....	28
III. Justificación .....	28
IV. Hipótesis.....	28
V. Objetivos	
V.1. Objetivo general .....	29
V.2. Objetivos Particulares.....	29
VI. Metodología	
VI.1 Muestras biológicas .....	30
VI.2. Cuantificación de proteínas .....	30
VI.3. Preparación de las muestras para Electroforesis en gel de poliacrilamida con sulfatododecil de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras.....	31
VI.3.1 Preparación de la muestra para minigel al 15% .....	31
VI.3.2. Electroforesis .....	31
VI.4. Tinción de Plata .....	32
VI.5. Electroforesis en dos dimensiones .....	33
VI.5.1. Preparación de las muestras.....	33
VI.5.2. Preparación de las muestras por inmunoprecipitación.....	33
VI.5.3. Electroforesis (primera dimensión): Isoelectroenfoque (IEF) .....	34
VI.5.4. Electroforesis (segunda dimensión): SDS-PAGE .....	34
VI.6. Western Blot.....	35
VI.6.1. Transferencia de la proteína CC10.....	35
VI.6.2. Bloqueo de la membrana.....	35
VI.6.3. Inmunoblot .....	36
VI.6.4. Protocolo de revelado.....	36
VI.6.5 Tinción de gel de poliacrilamida con Deep Purple Total Protein Stain.....	37
VII. Resultados	
VII.1. Identificación de la proteína CC10 en lavados bronquioalveolares de conejo .	39
VII.2. Estandarización de la técnica de electroforesis de dos dimensiones (2D) con lavados bronquioalveolares de conejo .....	41

VII.3. Identificación de la proteína CC10 en lavados bronquioalveolares de neonatos prematuros con SDR.....	43
VII.4. Obtención del mapa 2D de lavados bronquioalveolares de neonatos prematuros con SDR.....	45
VII.5. Detección de las isoformas de la proteína CC10 presente en lavados bronquioalveolares de neonatos prematuros con SDR .....	47
VIII. Discusión de resultados.....	49
IX. Conclusiones.....	53
X. Perspectivas.....	53
XI. Bibliografía.....	54
Apéndice I.....	59
Apéndice II.....	62



## Abreviaturas

CCSP	Proteína secretada por las células Clara
CC10	Proteína de las células Clara de 10 kDa
CC16	Proteína de las células Clara de 16 kDa
DBP	Displasia broncopulmonar
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DTT	Ditiotreitol
IEF	Isoelectroenfoque
IFN $\gamma$	Interferón gama
IL-1	Interleucina 1
InPER	Instituto nacional de Perinatología
kDa	kilo Dalton
LBA	Lavado bronquioalveolar
PA2	Fosfolipasa A2
pI	punto Isoeléctrico
SDR	Síndrome de deficiencia respiratoria
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con sulfato dodecil de sodio
SP-A	Proteína A del surfactante
SP-B	Proteína B del surfactante
SP-C	Proteína C del surfactante
SP-D	Proteína D del surfactante
TBS-T	Buffer Tris salino con Tween
2D	Dos dimensiones

## Resumen

El parto pretérmino es la causa más frecuente de mortalidad y enfermedad perinatales. Una de las principales dificultades asociadas con estos nacimientos es el Síndrome de dificultad respiratoria (SDR), el cual es un estado clínico multifactorial; se caracteriza por una respiración anormal con alteración del intercambio gaseoso, de la oxigenación y de la eliminación del anhídrido carbónico. La superficie alveolar de los pulmones de todos los mamíferos está recubierta de una mezcla de lípidos y proteínas llamado surfactante pulmonar, que permite reducir de manera importante la tensión superficial en la interfase aire-agua, haciendo la ventilación alveolar y el intercambio de gases posible, previniendo el colapso del alveolo, particularmente durante la expiración, además está demostrada su participación en funciones inmunológicas del pulmón. La proteína CC10, también está presente en el surfactante pulmonar ésta se une a la fosfatidilcolina, al fosfatidilinositol, a la progesterona y es un potente inhibidor de la actividad enzimática de la fosfolipasa A2, previene la degradación del surfactante pulmonar y el desarrollo de lesiones pulmonares. La administración temprana de ésta proteína recombinante en el surfactante comercial, lleva al mejoramiento de los neonatos prematuros con SDR, por lo tanto, es importante caracterizarla bioquímicamente en estos, debido a que, cambios en su estructura, podrían estar involucrados en el mecanismo de acción de esta proteína. De tal forma que si se llega a caracterizar la estructura de la proteína CC10 esta información podrá utilizarse en la prevención y el combate al desarrollo del SDR en el neonato prematuro.

Por lo tanto los objetivos de este trabajo fueron: Identificar la proteína CC10 presente en lavados bronquioalveolares (LBA) de neonatos prematuros con SDR así como determinar su peso molecular y punto isoeléctrico con la finalidad de detectar la presencia de isoformas.

Se utilizaron 7 muestras biológicas de neonatos prematuros que fueron diagnosticados con SDR y mínimo un control negativo por cada experimento. Se realizaron electroforesis de una y dos dimensiones, inmunoprecipitaciones y detección de la proteína CC10 por Western Blot para su identificación y para detectar la existencia de isoformas. El peso de la proteína CC10 fue determinado en alrededor de 6 kDa en condiciones reductoras. Se detectaron 7 isoformas de esta proteína, 3 más que las reportadas en la literatura, aunque no se encontraron los siete en todas las muestras analizadas, esto puede deberse a la historia clínica de cada paciente, así como la edad gestacional o el nivel de desarrollo de SDR que presentó. Además observamos que varias isoformas tenían un punto isoeléctrico menor al reportado anteriormente y creemos que esto se debe a cambios post traslacionales de la misma como pueden ser oxidaciones causadas por la misma patología y que probablemente impide el funcionamiento adecuado de la proteína.

## I. Introducción

### I.1. Anatomía y función pulmonar

El sistema respiratorio se puede dividir en dos partes: las vías respiratorias superiores e inferiores. El tracto respiratorio superior se compone de las partes fuera de la cavidad torácica: los pasajes de aire de la nariz, fosas nasales, faringe, laringe y tráquea superior, mientras que el tracto respiratorio inferior se compone de: La parte inferior de la tráquea y los pulmones, los cuales incluyen el árbol bronquial y los alveolos. También forman parte del sistema respiratorio la membrana pleural y los músculos respiratorios que forman la cavidad torácica: el diafragma y los músculos intercostales (Scanlon y Sanders, 2007).

#### Los pulmones y la membrana pleural

Los pulmones se encuentran a ambos lados del corazón, en la cavidad torácica y son rodeados y protegidos por esta. La base de cada pulmón se apoya sobre el diafragma, el ápice (la punta superior) está a nivel de la clavícula. Sobre la superficie medial de cada pulmón se ubica una indentación llamada hilus, donde el bronquio primario, arteria pulmonar y venas entran en el pulmón (Fig. 1). Las membranas pleurales son las membranas serosas de la cavidad torácica. Entre estas membranas existe líquido seroso que evita la fricción y mantiene a las dos membranas juntas durante la respiración (*Ibíd.*).

#### Árbol bronquial

En cada pulmón el bronquio principal se divide en varias ramas que se dividen a su vez y así sucesivamente. De este modo se forma un sistema arboriforme de ramificaciones bronquiales: el árbol bronquial, alrededor del cual se organizan las porciones respiratorias del pulmón (Fig. 1).

Por lo general, las ramificaciones mayores del árbol bronquial se denominan bronquios, mientras que las menores se denominan bronquiolos (Fig. 1).

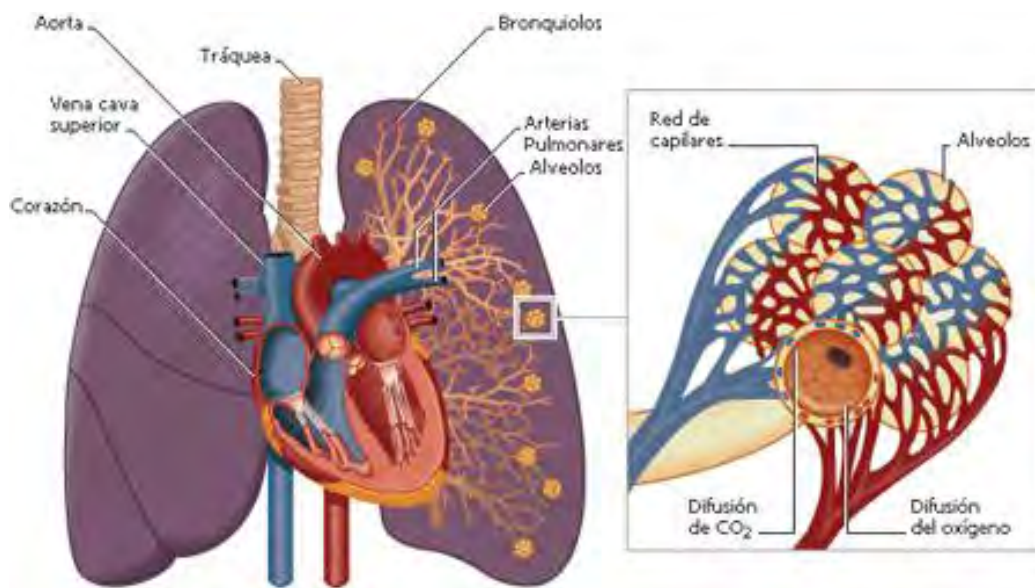


Figura 1. Anatomía del pulmón  
 (Tomado de <http://www.xenciclopedia.com/upload/09-07/pulmones211.gif>)

La histología de los bronquios se modifica de forma gradual. El epitelio pseudoestratificado ciliado se transforma en epitelio cilíndrico, desaparecen el cartílago y las glándulas y, por último, se engrosa la capa muscular.

El epitelio consiste principalmente de células ciliadas y no ciliadas, las células Clara. En la zona apical se encuentran gránulos de secreción cuyo contenido se vacía por exocitosis a la superficie del epitelio. Se cree que la secreción es surfactante o tiene funciones similares; por lo que se piensa que contribuye a mantener abiertas las pequeñas luces de los bronquiolos, sobre todo en la fase final de una espiración, de otro modo podrían quedar pegadas las paredes bronquiales opuestas (Geneser, 2000).

Durante la vida intrauterina los alveolos pulmonares distendidos se encuentran llenos de un trasudado producido por los capilares pulmonares. El pulmón del recién nacido sufre una serie de adaptaciones trascendentales que modifican la circulación fetal. El reemplazo del líquido pulmonar fetal por aire, es un fenómeno mecánico que requiere de la aplicación de presiones transpulmonares elevadas para lograr insuflar el pulmón en las primeras respiraciones; estas fuerzas deben superar tres elementos: viscosidad del líquido pulmonar, tensión superficial y resistencia de los tejidos. La expansión del tórax, así como el primer llanto, hacen que los bronquios aspiren aire que llena los alveolos pulmonares, se libera una sustancia tensoactiva denominada surfactante que evita el colapso alveolar con la expiración. Cualquier alteración en estos mecanismos de adaptación, provoca alteración pulmonar y la aparición de un Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR).

El cambio de la respiración intrauterina que se lleva a cabo mediante la placenta por la extrauterina a través del pulmón, le da una característica única a estos procesos, que en gran medida se producen por una alteración de la adaptación cardiopulmonar al medio externo (Castro *et al.*, 2007).

La superficie alveolar está formada por dos tipos de células epiteliales, neumocitos I y neumocitos II, o células alveolares tipo I y tipo II. La mayor parte de la superficie alveolar está cubierta por las células tipo I (cerca del 90%), estas son células aplanadas incapaces de dividirse, contienen pocos organelos y sirven como una fina barrera entre la sangre y el aire (Andreeva *et al.*, 2007).

Las células tipo II proliferan y migran para limpiar y reparar las áreas dañadas, son capaces de dividirse y diferenciarse en células tipo I. Ellas participan en la respuesta de defensa por la expresión de varios receptores, en particular los receptores Toll. Estas células están involucradas en la red de citocinas/quimiocinas del pulmón, secretándolas y respondiendo ante ellas, regulan la transmigración de los monocitos a través de la capa epitelial y posiblemente participan en la activación de las células T. Sin embargo la función principal es la secreción del surfactante del pulmón (*Ídem*).

A lo largo de casi todo el árbol traqueobronqueal se localizan las células Clara (Fig. 2) y sobre todo en los bronquiolos terminales, son no ciliadas, no serosas, no mucosas columnares o cúbicas las cuales secretan la proteína de las células Clara (CCSP o CC10), implicada en la regulación de la inflamación en el pulmón (Jorens *et al.*, 1995).

Aun no está claro el rol de estas células en la biología del pulmón pero las principales funciones de estas células son:

- 1.- Secreción de la capa de hipo-fase del líquido bronquioalveolar.
- 2.- Reparación del epitelio bronquial.
- 3.- Se encuentran involucradas en el metabolismo de Xenobióticos a través de citocromo 450 mezclado con oxigenasas.

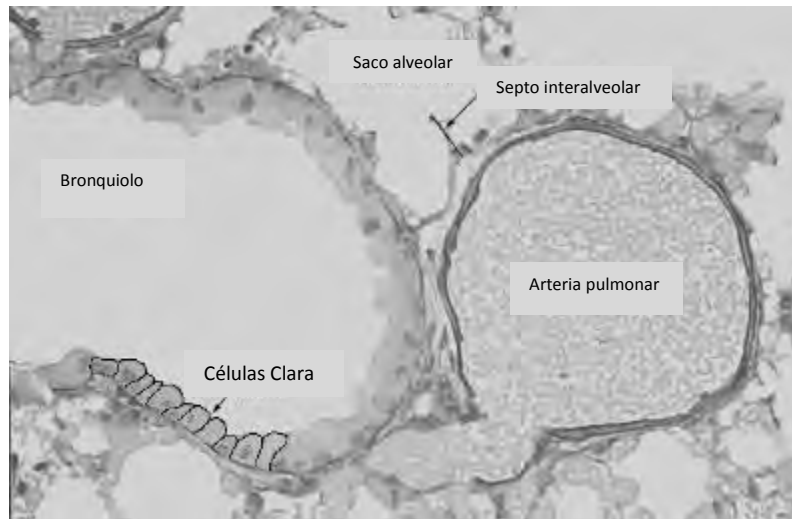


Figura 2. Ubicación de las Células Clara en el tracto respiratorio  
(Tomado de: <http://www.bu.edu/histology/p/13805loa.htm>)

## I.2. Síndrome de Deficiencia Respiratoria (SDR)

El parto pretérmino es la causa más frecuente de mortalidad y enfermedad perinatales y se calcula que es responsable del 75% de las muertes neonatales no relacionadas con malformaciones hereditarias. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido al nacimiento del infante pretérmino, como el que ocurre a partir de la semana 20 y hasta la semana 36 de gestación.

Las principales dificultades asociadas con los nacimientos pretérmino son: el SDR, hemorragia interventricular, enterocolitis necrotizante, displasia broncopulmonar, persistencia del conducto arterioso, retinopatía y sepsis (Rosas *et al.*, 2008).

Los problemas respiratorios pulmonares pueden estar condicionados por la reabsorción del líquido del pulmón y la prematurez (taquipnea transitoria del recién nacido y SDR), por la asfixia perinatal (síndrome de aspiración meconal), las infecciones respiratorias (neumonía neonatal), por trastornos de la circulación pulmonar (hipertensión pulmonar) o por problemas crónicos (displasia broncopulmonar) (Castro *et al.*, 2007).

El SDR es un estado clínico multifactorial; se caracteriza por una respiración anormal con alteración del intercambio gaseoso, de la oxigenación y de la eliminación del anhídrido carbónico; constituye una de las patologías más frecuentes en el recién nacido (Fig. 3). El mayor número de casos se produce por afecciones del propio sistema respiratorio, aunque otras veces es secundaria a afecciones cardiacas, nerviosas, metabólicas o musculares (Barranco *et al.*, 2000). La taquipnea, retracción y quejido se consideran pilares en el diagnóstico clínico del SDR, aunque algunos de ellos se encuentran transitoriamente en los recién nacidos normales. Existen factores pre disponentes que se relacionan con la aparición del SDR como son: prematurez, nacimiento por cesárea, hijo de madre diabética, hemorragia aguda anteparto y segundo gemelo, que en general tienen en común la posibilidad de producir asfixia (Jasso, 1996).

La evolución y el pronóstico de los recién nacidos con SDR, son muy variables y depende en gran medida del factor causante. Puede ser benigna, de pocas horas de evolución, como es la taquipnea transitoria del recién nacido, o de mayor duración como en los recién nacidos con displasia broncopulmonar e incluso puede presentarse de por vida, como es el caso de los niños que muestran algunas cardiopatías congénitas.

Cualquier deficiencia en la cantidad o en la composición del surfactante pulmonar secretado por las células neumocitos tipo II y células Clara, es causante de atelectasia y

daño alveolar, por lo general compromete la integridad espacial de la superficie de la mucosa, necesaria para hacer eficiente el intercambio gaseoso (Martínez y col., 2007; Fig. 5). La deficiencia del surfactante ha sido establecida como la principal causa de falla respiratoria y muerte en infantes con Síndrome de Deficiencia Respiratoria o SDR (Günther *et al.*, 2001).

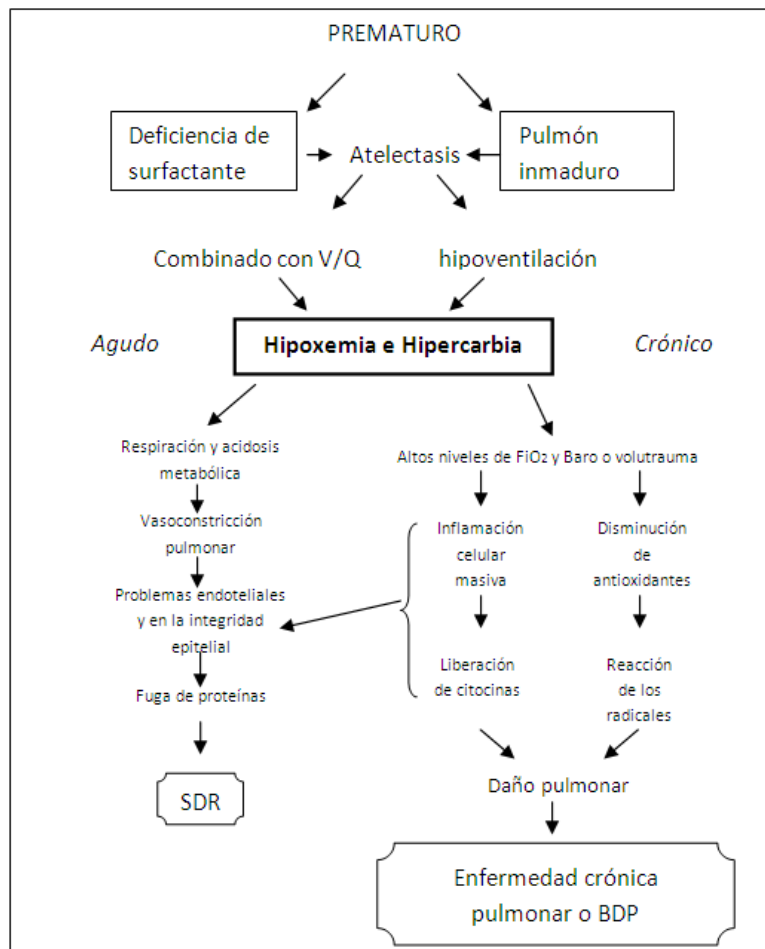


Figura 3. Desarrollo de la lesión pulmonar en el prematuro (Tomado de Respiratory Distress Syndrome in intensive care nursery house staff manual, 2004)

La atelectasia está caracterizada por la distensión de los bronquiolos y el colapso de los alveolos. Se considera que tres factores contribuyen al desarrollo de ésta en los infantes prematuros:

1. La disminución en la capacidad de los alveolos frente a los bronquios favorece la pérdida de aire del alveolo cuando sólo una parte del total del aire sale de los pulmones.
2. En condiciones de colapso tras respirar el aire, las superficies respiratorias tienen una mayor adhesividad, lo que hace perpetuar la atelectasia causada por el primer factor.



3. La tensión superficial favorece la formación de grandes burbujas de aire en los bronquiolos, aun más que en los alveolos (Clements y Avery, 1998).

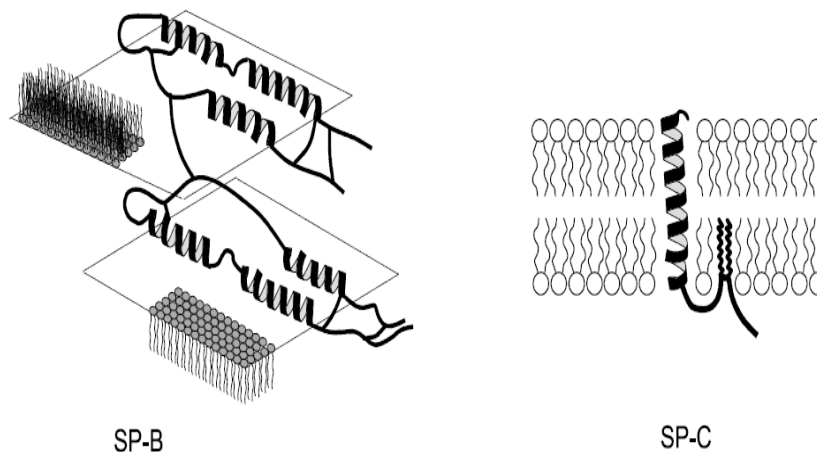
En las últimas décadas, los avances terapéuticos como la administración del surfactante exógeno (Ramanathan, 2006), las nuevas modalidades ventilatorias, el tratamiento durante la gestación entre otras, han producido un descenso importante en la mortalidad pero no en la morbilidad, ya que esta depende también del desarrollo pulmonar del recién nacido (Barranco *et al.*, 2000).

### I.3. Surfactante Pulmonar

La superficie alveolar de los pulmones de todos los mamíferos está recubierta de una mezcla de lípidos y proteínas llamado surfactante pulmonar, que permite reducir de manera importante la tensión superficial en la interfase aire-agua, haciendo la ventilación alveolar y el intercambio de gases, posible y previniendo el colapso del alveolo, particularmente durante la expiración, además está demostrada su participación en funciones inmunológicas del pulmón (Günther *et al.*, 2001).

Está compuesto por aproximadamente 90% de lípidos y 10% de proteínas, así como pequeñas cantidades de carbohidratos (Weaver y Whitsett, 1991). De los lípidos, alrededor del 10-20% son neutros, el otro 80 a 90% son fosfolípidos de los cuales cerca del 80% corresponde a la fosfatidilcolina, ésta molécula se encuentra como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) ya que contiene una inusual cantidad de residuos de ácido palmítico (entre un 50 y 60% de todas las moléculas de fosfatidilcolina se unen a este ácido y alrededor del 10% son fosfatidilglicerol). Otros fosfolípidos como fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y esfingomiolina están presentes en bajos porcentajes.

Existen cuatro apoproteínas específicas del surfactante llamadas proteínas del surfactante (SP): SP-A, SP-B, SP-C, SP-D (Fig. 4). SP-B y SP-C son extremadamente hidrofóbicas y con un peso molecular bajo de 8.7 y 4.2kDa respectivamente, éstas se fijan fuertemente a los lípidos y se disuelven en solventes orgánicos, mientras que SP-A y SP-D son grandes, hidrofílicas con un peso molecular alto de 36 y 42kDa respectivamente y pertenecen a la familia de las colectinas (C-tipo lectina), tienen regiones con colágeno de tipo N-terminal, así como iones de calcio e hidratos de carbono en sus regiones C-terminal (Diemel, 2002).



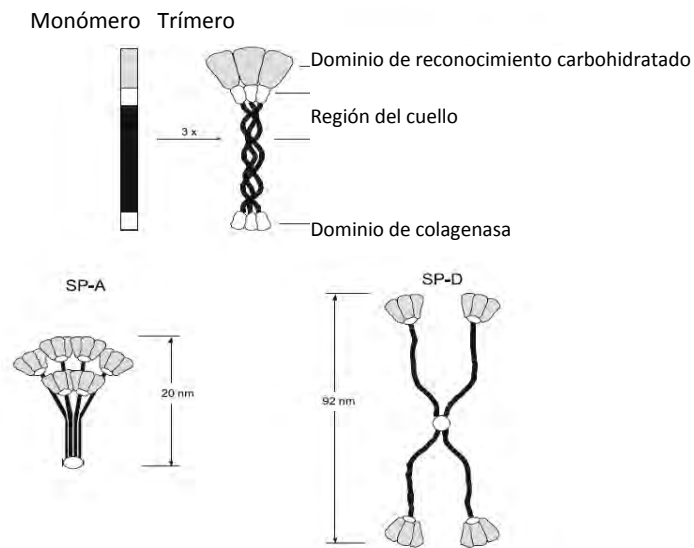


Figura 4. Estructura terciaria de las proteínas SP del surfactante pulmonar (Tomado de Diemel, 2002).

La absorción de los fosfolípidos por la interfase aire-agua, resulta en la formación de una película estable de fosfolípidos (Diemel, 2002; Fig. 5), en la cual están insertados dos de las proteínas del surfactante: la SP-B y SP-C mientras que la SP-A tiene la capacidad de enlazar lípidos y carbohidratos e interactuar con receptores específicos de la superficie celular. Su actividad depende del calcio y la cooperación con la SP-B y la SP-C. La SP-A promueve la formación de la mielina tubular, mejora la actividad superficial del surfactante mediante su unión a los fosfolípidos, bloquea la inactivación del surfactante inducida por las proteínas del suero y se ha sugerido que ejerce un control regulador negativo al inhibir la secreción de fosfolípidos por las células alveolares tipo II

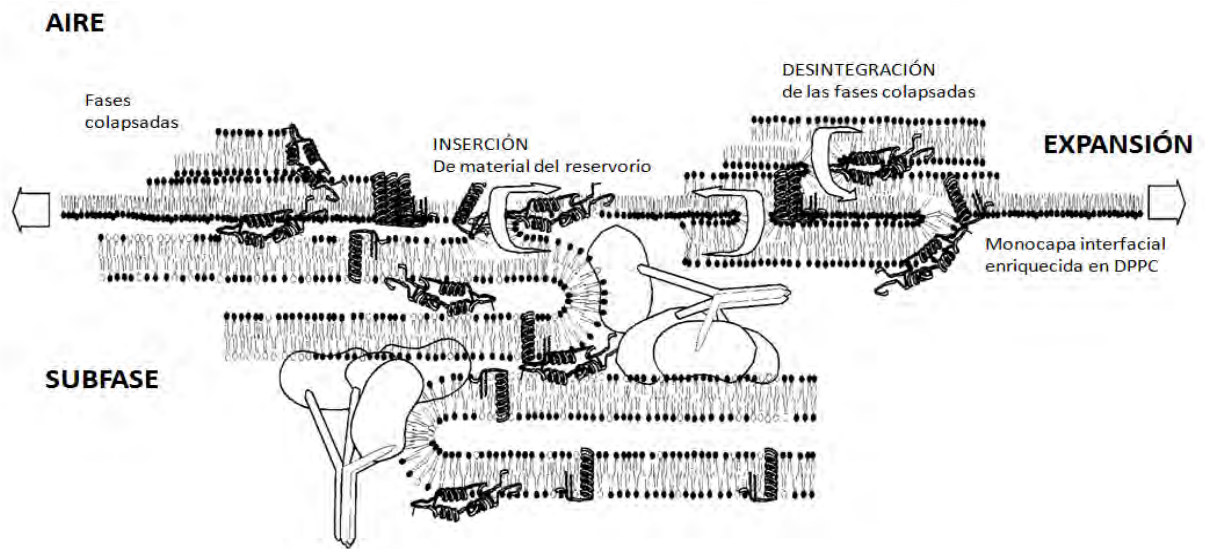


Figura 5. Modelo de la película estable de fosfolípidos que conforma el surfactante pulmonar (Tomado de Pérez-Gil y Keough K., 1998)

En estudios *in vitro* se ha observado que SP-A inhibe la secreción y aumenta la captación de lípidos del surfactante. SP-B también puede influir tanto intra como extracelularmente en el transporte de los lípidos. (Clements y Avery, 1998).

Existe otra proteína presente de manera abundante en el surfactante pulmonar llamada Uteroglobina, CC10 o CC16 debido a que es secretada por las células Clara presentes en el árbol traqueobronquial, su función en el surfactante pulmonar aún no es muy clara pero existe evidencia de que esta proteína se une a la fosfatidilcolina y al fosfatidilinositol presentes en el surfactante pulmonar (Stripp *et al.*, 2002).

Las funciones mecánicas más importantes del surfactante son pasar rápidamente de la fase acuosa dentro de la interfase aire-agua, para formar una película estable que pueda mantener baja la tensión superficial por largos intervalos.

Durante la respiración, cuando la película superficial es comprimida y re-expandida, los componentes de la película son expulsados, con lo cual se logra un empaquetamiento de lípidos tales como los fosfolípidos dipalmitoilados, de este modo disminuye la tensión superficial (Günther *et al.*, 2001).

Si la tensión superficial es elevada y no disminuye durante el cierre del alveolo, este colapsará inevitablemente ya que el gradiente de presión incrementará durante el cierre; lo que hace el surfactante es reducir la tensión superficial, sobre todo cuando el radio del alveolo es más pequeño y por lo tanto estabiliza al conjunto de alveolos.

La disminución de la tensión superficial que causa el surfactante no solo permite la adecuada circulación del aire sino la salida del líquido alveolar hacia el intersticio que de otra manera se acumula dentro del mismo. Además permite la remoción de partículas del pulmón al mejorar la función ciliar de su epitelio (Cullen, 2007).

La función inmunológica del surfactante es cada vez más relevante. La proteína SP-A incrementa la actividad de los macrófagos alveolares y fomenta la producción de citocinas por los linfocitos. Los lípidos del surfactante inhiben la proliferación linfocitaria y su producción de inmunoglobulinas, lo que regula la respuesta inflamatoria (Wright, 1997).

El proceso de inflamación que se llega a dar en los pulmones como respuesta inmune a una infección bacteriana u otros agentes infecciosos provoca la degradación del surfactante pulmonar. La proteína CC10 presente en el surfactante es una de las principales responsables de la regulación de la respuesta inflamatoria, se ha observado que la ausencia de esta proteína acelera el proceso de degradación del surfactante pulmonar, lo que puede derivar en el desarrollo del SDR (Wang *et al.*, 2003).

## Tipos de Surfactante Exógeno

El primer surfactante artificial fue de pulmón bovino, en la década de los 80, hoy en día se pueden clasificar en dos tipos de surfactante: los naturales y los sintéticos. Todos los surfactantes contienen fosfolípidos, particularmente el DPPC. Los naturales contienen SP-B y SP-C y de los sintéticos; dos no contienen proteínas y dos contienen proteínas recombinantes o emuladores.

La terapia con surfactante exógeno es ampliamente usada en el manejo del SDR, en recién nacidos prematuros que requieren asistencia ventilatoria o en aquellos trastornos que suelen tener disfunción e inactividad del surfactante endógeno.

*Curosurf* es el surfactante natural no modificado comercializado por *Chiesi Farmaceutici, Pharma Italy*, fue aprobado por la Food and Drug Administration<sup>1</sup> (FDA) en 1999 (Chiesi Farmaceutici, NDA 20-744: 1-7), es obtenido de pulmón de cerdo, compuesto fundamentalmente por fosfolípidos y las proteínas lipofílicas (SP-B y SP-C), no contiene SP-A ni conservadores. Se obtiene mediante extracción con cloroformo metanol a partir del pulmón triturado y purificado por cromatografía líquida para eliminar los lípidos neutros. Este método de purificación tiene el inconveniente de que a gran escala consume grandes cantidades de solventes orgánicos clorados, a pesar de lo cual no logra elevar el contenido de dipalmitoilfosfatidilcolina que equivale a cerca del 33% del contenido del surfactante (Taeusch *et al.*, 2002).

Este surfactante es utilizado en algunos hospitales de México como el Instituto Nacional de Perinatología (INPER) para tratar una deficiencia en la producción de surfactante en neonatos humanos prematuros diagnosticados con el SDR.

---

<sup>1</sup> Administración de Alimentos y Fármacos, por sus siglas en inglés. Es la agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos (tanto para seres humanos como para animales), suplementos alimenticios, medicamentos (humanos y veterinarios), cosméticos, aparatos médicos (humanos y animales), productos biológicos y productos hemáticos.

#### I.4. Proteína de las Células Clara (CC10)

Una proteína de bajo peso molecular que está presente en el surfactante pulmonar ha sido localizada en los gránulos de secreción de las células Clara. La estructura de esta proteína es similar a la proteína que es secretada en el endometrio del conejo llamada uteroglobina o lacriglobina (lágrimas de humano). Después, resultó que la misma proteína también se expresa en otros tejidos en cantidades significantes, por ejemplo, en pulmón de conejo y tracto genital de macho. Estos resultados iniciales se redescubrieron diez años después cuando se identificó que se encontraba esta proteína en células Clara secretoras en pulmón de conejo, ratón, ratas y en pulmón humano (Singh *et al.*, 1988), aunque también se expresa en la próstata (Carlomagno *et al.*, 1997).

También se le conoce con los siguientes nombres: Clara Cell Secretory Protein (CCSP), Clara cell 16-kDa protein, Clara cell 10-kDa protein, Secretoglobin family 1A member 1, Clara cell phospholipid-binding protein, urinary protein 1 y polychlorinated biphenyl-binding protein. Aquí nos referiremos a ella como proteína de las células Clara 10-kDa (CC10) por sus siglas en inglés.

La proteína es detectada en el pulmón humano en desarrollo alrededor de la semana 21 de gestación. También ha sido detectada en el fluido amniótico, parece ser que esta proteína es secretada de manera abundante y esto es estimulado por agonistas adrenérgicos (Singh y Katyal, 2007).

#### Estructura

La proteína CC10 consiste en dos polipéptidos idénticos arreglados de forma antiparalela. El peso molecular basado en la secuencia de aminoácidos aparece cercano a los 16000 Daltones (Da), en geles de poliacrilamida con SDS (sulfato dodecil de sodio) tiene mucha movilidad y tiene un aparente peso molecular de 10 a 12 kDa, motivo por el cual en descripciones iniciales fue nombrada como proteína CC10.

La cadena de polipéptidos de CC10 está formada por 70 a 77 aminoácidos. En primates incluyendo humanos y lagomorfos la cadena de péptidos es de 70 aminoácidos. En roedores tiene dos aminoácidos en el extremo N-terminal y cinco aminoácidos en el extremo C-terminal dando un total de 77 aminoácidos (ver Tabla 1, Singh y Katyal, 2007). La proteína tiene un péptido inicial de 19 a 21 aminoácidos que es común en las proteínas secretoras.

La proteína CC10 contiene 91 aminoácidos (Fig. 6), 21 de los cuales son los aminoácidos de señal; tiene un peso molecular de 10 kDa pero es en realidad un homodímero formado por dos monómeros de 5 kDa unidos mediante un enlace de puentes disulfuro entre las cisteínas Cys24 y Cys90 (Singh *et al.*, 1988; Umland *et al.*, 1994; Fig. 7). Cada uno de los monómeros tiene 4 hélices alfa separadas por curvas beta, las 8 hélices alfa del dímero se cierran en un botón hidrofóbico. Pertenece a la familia de las secretoglobinas.

Estudios realizados por cristalografía de difracción de rayos X de la proteína CC10 purificada en humanos mostró lípidos ocupando la cavidad hidrofóbica de esta, la extracción de la proteína y el análisis del extracto de lípidos por cromatografía de gases reveló que la proteína se une a la fosfatidilcolina y al fosfatidilinositol en cantidades casi idénticas (Singh y Katyal, 2007).

Esta proteína tiene 61.5% de homología con la Uteroglobina de conejo, 54.2% con la rata y 52.8% con el ratón (Singh *et al.*, 1990).

10	20	30	40	50
MKLAVTLTLV	TLALCCSSAS	AEICPSFQRV	IETLLMDTPS	SYEAAMELFS
	60	70	80	90
	PDQDMREAGA	QLKKLVDTLP	QKPRESIIKL	MEKIAQSSLC N

Figura 6. Secuencia de aminoácidos de CC10 (Swissprot Access number P11684).

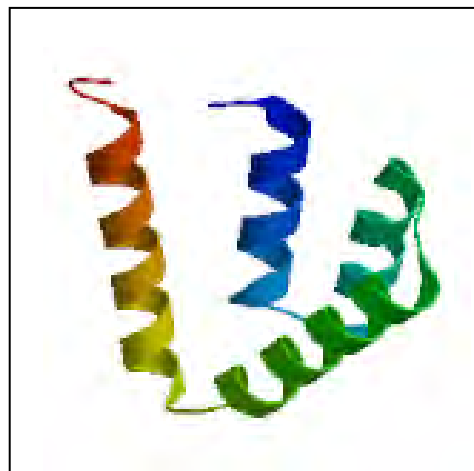


Figura 7. Modelo tridimensional de CC10 a partir de cristalografía de rayos X (Tomado de: Banco de datos de estructuras cristalográficas; Umland y col., 1994)



Tabla 1 Secuencia de aminoácidos de la proteína CC10 en distintas especies

	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Humano			Glu	Ile	Cys	Pro	Ser	Phe	Gln	Arg	Val	Ile	Glu	Thr	Leu	Leu	Met	Asp
			Glu	Ile	Cys	Pro	Thr	Phe	Leu	Arg	Val	Ile	Glu	Ser	Leu	Phe	Leu	Asp
Mono	Ser	Ser	Asp	Ile	Cys	Pro	Gly	Phe	Leu	Gln	Val	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Leu	Gly
	Ser	Ser	Asp	Ile	Cys	Pro	Gly	Phe	Leu	Gln	Val	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Met	Gly
Rata	Ser	Ser	Asp	Thr	Cys	Pro	Gly	Phe	Phe	Gln	Val	Leu	Glu	Phe	Leu	Phe	Met	Gly
			Gly	Ile	Cys	Pro	Arg	Phe	Ala	His	Val	Ile	Glu	Asn	Leu	Leu	Leu	Gly
Ratón			Gly	Ile	Cys	Pro	Gly	Phe	Ala	His	Val	Leu	Lys	Glu	Phe	Gln	Pro	Asp
			Glu	Val	Cys	Pro	Ser	Phe	Val	Glu	Val	Ile	Gln	Asn	Leu	Phe	Lys	Gly

17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
Thr	Pro	Ser	Ser	Tyr	Glu	Ala	Ala	Met	Glu	Leu	Phe	Ser	Pro	Asp	Gln	Asp	Met	Arg
Thr	Pro	Ser	Ser	Phe	Glu	Ala	Ala	Met	Gly	Phe	Phe	Ser	Pro	Asp	Gln	Asp	Met	Ser
Ser	Glu	Ser	Asn	Tyr	Glu	Ala	Ala	Leu	Lys	Pro	Phe	Asn	Pro	Ala	Ser	Asp	Leu	Gln
Ser	Glu	Ser	Gly	Tyr	Val	Ala	Ser	Leu	Lys	Pro	Phe	Asn	Pro	Gly	Ser	Asp	Leu	Gln
Ser	Glu	Ser	Ser	Tyr	Glu	Ala	Ala	Leu	Lys	Pro	Tyr	Asn	Pro	Gly	Ser	Asp	Leu	Gln
Thr	Pro	Ser	Ser	Tyr	Gly	Thr	Ser	Leu	Lys	Glu	Phe	Glu	Pro	Asp	Asp	Thr	Met	Lys
Thr	Pro	Ser	Ser	Tyr	Gly	Thr	Ser	Leu	Lys	Glu	Phe	Gln	Pro	Asp	Asp	Ala	Met	Lys
Thr	Leu	Ala	Ser	Try	Glu	Ala	Ser	Val	Glu	Pro	Phe	Ser	Pro	Asn	Glu	Asp	Met	Lys

36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	50	51	52	53	54	55	56
Glu	Ala	Gly	Ala	Gln	Leu	Lys	Lys	Leu	Val	Asp	Thr	Leu	Gln	Lys	Pro	Arg	Glu	Ser	Ile
Glu	Ala	Gly	Ala	Gln	Leu	Lys	Lys	Leu	Val	Asp	Thr	Leu	Ala	Lys	Ala	Arg	Asp	Ser	Ile
Asn	Ala	Gly	Thr	Gln	Leu	Lys	Arg	Leu	Val	Asp	Thr	Leu	Gln	Glu	Thr	Arg	Ile	Asn	Ile
Asn	Ala	Gly	Thr	Gln	Leu	Lys	Arg	Leu	Val	Asp	Thr	Leu	Gln	Glu	Thr	Arg	Ile	Asn	Ile
Asp	Ser	Gly	Thr	Gln	Leu	Lys	Lys	Leu	Val	Asp	Thr	Leu	Gln	Lys	Thr	Arg	Met	Asn	Ile
Asp	Ala	Gly	Met	Gln	Met	Lys	Lys	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Gln	Thr	Thr	Arg	Glu	Asn	Ile
Asp	Ala	Gly	Met	Gln	Met	Lys	Lys	Val	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Thr	Thr	Arg	Glu	Asn	Ile
Lys	Ala	Gly	Ala	Gln	Leu	Lys	Thr	Leu	Val	Asp	Thr	Leu	Pro	Glu	Ala	Lys	Asp	Ser	Val

57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
Ile	Lys	Leu	Met	Glu	Lys	Ile	Ala	Gln	Ser	Ser	Leu	Cys	Asn					
Ile	Lys	Leu	Met	Glu	Lys	Ile	Asp	Lys	Ser	Leu	Leu	Cys						
Val	Lys	Leu	Thr	Glu	Lys	Ile	Leu	Thr	Ser	Pro	Leu	Cys	Glu	Gln	Asp	Leu	Arg	Val
Met	Lys	Leu	Thr	Glu	Lys	Ile	Leu	Thr	Ser	Pro	Leu	Cys	Lys	Gln	Asp	Leu	Arg	Phe
Met	Lys	Leu	Ser	Glu	Ile	Ile	Leu	Thr	Ser	Pro	Leu	Cys	Asn	Gln	Asp	Leu	Ser	Val
Met	Lys	Leu	Thr	Glu	Lys	Ile	Val	Lys	Ser	Pro	Leu	Cys	Met					
Ile	Lys	Leu	Thr	Glu	Lys	Ile	Val	Lys	Ser	Pro	Leu	Cys	Met					
Leu	Lys	Leu	Gln	Glu	Lys	Ile	Ile	Lys	Ser	Pro	Leu	Cys	Ala					

(Tomado de Singh y Katyal, 2007)

El cDNA y la región 5' del gene que codifica para la CC10 (SCGB1A1) a partir de las células alveolares (Clara) de origen pulmonar, fue clonado y caracterizado, el cual se localiza en el cromosoma 11q12.3-13 humano (Singh, 1988). Esta región se ha encontrado en varios genes involucrados con patologías tales como la enfermedad atópica de asma y distrofia muscular. Este hecho aumenta la posibilidad de que la CC10 pudiera estar altamente relacionada con este tipo de patologías. Algunos estudios de la expresión del gen de la CC10 en el pulmón fetal en conejas demostraron que su expresión ocurre a lo largo de toda la gestación con una disminución antes del parto. Dicha expresión aumenta dramáticamente en pulmón del feto con edad gestacional creciente, demostrándose además que mantiene una relación inversa entre los niveles de CC10, Prostaglandina E2 y Prostaglandinas F2 y una correlación positiva en los leucotrienos C4 (Vasanthakumar *et al.*, 1988).

En estudios realizados en 1988 con Isoelectroenfoque de la proteína CC10 (Singh *et al.*, 1988) no encontraron isoformas, pero estudios posteriores con esta misma técnica encontraron que si existen cuatro isoformas de esta proteína en humanos adultos, con un punto isoeléctrico de 4.6, 4.8, 4.9 y 5.2 (Lindahl *et al.*, 1999); estos estudios se realizaron con muestras de lavados bronquioalveolares (LBA) de adultos fumadores y no fumadores y hasta el momento son los únicos estudios que reportan sobre la caracterización de mas de una isoforma de la proteína CC10 en humanos.

En estudios realizados con ratones se identificaron solamente dos isoformas de la proteína CC10 con puntos isoeléctricos de 4.9 y 5.2 respectivamente (Wattiez *et al.*, 2003).

Función de la proteína CC10.

A pesar de conocer el gen que codifica a la proteína CC10, la secuencia completa de aminoácidos y la estructura de la proteína por difracción de rayos X, aún no se conoce completamente la función fisiológica primaria de la proteína CC10.

La unión de la progesterona por la uteroglobina de conejo fue la primera función atribuida a la proteína, esta ayuda a facilitar el desarrollo del endometrio en el embarazo temprano pero no hay evidencia de que la progesterona se una con la proteína nativa ya que los animales transgénicos deficientes en CC10/uteroglobina siguen reproduciéndose normalmente (Singh y Katyal, 2007). También se piensa que sirve como sustrato para la transglutamasa y que ayuda como inmunomodulador en la histo-incompatibilidad del feto, pero como se mencionó anteriormente, ratones deficientes de CC10 siguen reproduciéndose normalmente.

La CC10 en conejos es un inhibidor de la papaína, a pesar de que la inhibición no es muy fuerte, esta función varía entre especies, ya que en humanos su actividad inhibitoria es mayor (Singh *et al.*, 1990).

Se ha demostrado que CC10 se une y retiene el calcio, es posible que algunas de las funciones de esta proteína pueden estar mediadas por su actividad quelante de calcio, ya que la disposición espacial de los átomos que podrían formar ligandos con calcio, podría ser similar al sitio de unión con enzimas de secreción de la fosfolipasa A2 (Winkelmann *et al.*, 1998).

Se ha observado que CC10 tiene actividad anti-citocina inhibiendo la producción de Interferón gama (IFN- $\gamma$ ), Interleucina 1 (IL-1) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Se ha demostrado que también exhibe supresión de la actividad antiviral y aumenta la fagocitosis inducida por IFN- $\gamma$ . Además se ha visto que inhibe la quimiotaxis de los leucocitos (Wright, 1997).

Cuando existen variaciones genéticas en la región no codificante del gen de CC10 humano, esto afecta los niveles de CC10 en plasma. Niños asmáticos tienen bajos niveles de CC10 en plasma, esto abre la posibilidad de que CC10 proteja contra el asma por medio de su actividad anti inflamatoria (Laing *et al.*, 2000).

Se ha observado una relación directa entre bajos niveles de CC10 con el desarrollo de displasia broncopulmonar (DBP), sugiriendo que la CC10 puede jugar un papel importante en la limitación de la respuesta inflamatoria que lleve al desarrollo de DBP (Loughran *et al.*, 2006). Por otro lado, se encontró que la concentración de CC10 esta disminuida en sujetos con daño pulmonar causado por fumar, como consecuencia de la destrucción de las células Clara. En contraste, la concentración de CC10 se incrementa en pacientes adultos con desórdenes o daño pulmonar agudo o crónico (Broeckert *et al.*, 2000). Esta proteína juega un papel crucial en la prevención y disminución de lesiones en el pulmón de ratones y humanos. Estos efectos en los recién nacidos aún son inciertos, pero se han hecho estudios donde se ha ido demostrando la importancia anti-inflamatoria que tiene esta proteína. De hecho, la concentración de la proteína CC10 se encuentra disminuida en infantes pretérmino (Loughran *et al.*, 2006).

En cuanto al SDR, existen pocos estudios donde se implique a la CC10 con esta patología, sin embargo, existen evidencias claras de su papel en el desarrollo de la enfermedad. Se han hecho estudios en neonatos prematuros con SDR a los cuales se les suministró surfactante de corderos (Wolfson *et al.*, 2008) y cerdos (Angert *et al.*, 2007) mezclado con distintas dosis de la proteína CC10 recombinante humana y la respuesta ha sido inmediata, estos neonatos con SDR han mejorado

considerablemente y sus niveles de inflamación en el pulmón se han visto reducidos. Así mismo, en estudios realizados con ratones en los cuales se les ha inhibido el gen que codifica para la proteína CC10, se ha observado una mayor susceptibilidad a desarrollar el SDR (Wang *et al.*, 2003).

Se sabe que en neonatos prematuros existen altos niveles de oxidación de proteínas y lípidos lo que conlleva a una disminución en la función de las proteínas como es el caso de la CC10 y un subsecuente daño pulmonar, disminuye su capacidad de respuesta ante un proceso inflamatorio y eleva la posibilidad de desarrollar el SDR y el subsecuente desarrollo de Displasia Broncopulmonar (BDP) (Ramsay *et al.*, 2001).

Se realizaron estudios con ratones, unos sensibles al ozono (O<sub>3</sub>) y otros resistentes a este, lo que provoca un proceso de oxidación de proteínas y lípidos. Fueron expuestos a ozono por varios periodos de tiempo para después analizar el aspirado bronquioalveolar de estos. Se detectaron solamente dos isoformas de la proteína CC10, una de 4.9 kDa y otra de 5.2 kDa en los dos tipos de ratones pero detectaron un decremento en los niveles de la isoforma con el punto isoeléctrico más ácido (4.9) de los ratones que son sensibles al ozono comparándolo con la misma isoforma en ratones resistentes al ozono, concluyendo que CC10 participa en la protección del pulmón disminuyendo la cantidad de isoformas oxidadas (Wattiez *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, el mecanismo molecular por el cual esta proteína está implicada en el desarrollo del SDR del pulmón no se conoce a fondo. Sin embargo, se sabe que la CC10 se une a la fosfatidilcolina, al fosfatidilinositol, a la progesterona y que es un potente inhibidor de la actividad enzimática de la fosfolipasa A2 (Yoshikawa *et al.*, 2005). La fosfolipasa A2 o PA2 (EC 3.1.1.4) es una enzima que libera los ácidos grasos del segundo carbono del glicerol, es decir que hidroliza la unión sn-2 acil de los fosfolípidos liberando ácido araquidónico. Esta molécula se transforma en ecosanoides que incluyen a las prostaglandinas y leucotrienos, que son constrictores muy potentes de la musculatura lisa y por lo tanto afecta sitios sensibles como las vías periféricas del pulmón provocando inflamación crónica, aumentando la permeabilidad vascular y favoreciendo, por tanto, el edema de la zona afectada, así como degradación del surfactante pulmonar, lo que puede derivar en el desarrollo del SDR o Displasia Broncopulmonar. Por lo tanto se ha propuesto que la proteína CC10 previene la degradación del surfactante pulmonar y el desarrollo de lesiones pulmonares (Stripp *et al.*, 2002).

## II. Planteamiento del problema

Las causas principales del SDR son la inmadurez del pulmón en infantes pretérmino y deficiencias en el surfactante. En la actualidad se continúa investigando sobre las funciones y los mecanismos de acción de los componentes del surfactante y como se relaciona con las distintas enfermedades respiratorias; la proteína CC10 presente en el surfactante actúa como regulador de la respuesta inflamatoria y evita la degradación del surfactante y la administración temprana de esta, lleva al mejoramiento de los pacientes. Por lo tanto, es importante caracterizar bioquímicamente a la CC10 de neonatos prematuros con SDR debido a que, cambios en su estructura, podrían estar involucrados en el mecanismo de acción de esta proteína.

### III. Justificación

La importancia de estudiar la estructura de la proteína CC10 del surfactante pulmonar de neonatos humanos con SDR radica en que aún no se conoce si existen isoformas de esta proteína que pudieran estar involucradas en el desarrollo del SDR. En los surfactantes artificiales que se utilizan en la actualidad esta proteína no está presente debido a que aún no se conocen todas sus funciones. De tal forma que si se llega a caracterizar la estructura de la proteína CC10 esta información podría utilizarse en la prevención y el combate al desarrollo del SDR en el neonato prematuro.

#### IV. Hipótesis

La proteína CC10 de neonatos prematuros con SDR presenta isoformas.

## V. Objetivos

### V.1. Objetivo general

Caracterizar la proteína CC10 presente en lavados bronquioalveolares (LBA) de neonatos prematuros con Síndrome de Deficiencia Respiratoria.

### V.2. Objetivos Particulares

- Identificar la proteína CC10, presente en LBA de neonatos prematuros con SDR.
- Estandarizar la técnica de electroforesis de segunda dimensión con LBA de conejos sanos.
- Obtener el mapa de segunda dimensión (2-D) de LBA de neonatos prematuros con SDR.
- Determinar el peso molecular y el punto isoeléctrico de la proteína CC10 presente en LBA de neonatos prematuros con SDR, con la finalidad de detectar la presencia de isoformas.



## VI. Metodología

### VI.1 Muestras biológicas

Se recibieron LBA de neonatos de menos de 34 semanas de gestación diagnosticados con SDR (Dr. Guzmán-Bárceñas, Hospital Ángeles de Interlomas y Hospital de la Mujer), los LBA de conejo fueron obtenidos en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular por el M.C. Joel Arias M. y Laura Correa en colaboración con la M.V. Susana González Gallardo (Bioterio) todos adscritos al InPER.

Los conejos (Oryctolagus cuniculus) de 4kg en promedio y de 3 a 5 meses de edad.

Después de inmovilizar al animal, se limpió con alcohol en la zona donde fue inyectado y se le administraron 2 ml de Hidrocloruro de xilacina y ketemina para anestesarlo. Para la intubación traqueal se introdujo el laringoscopio para exponer la laringe y se introdujo la sonda endotraqueal. Se verificó que la intubación fuera hecha correctamente para que la sonda estuviera en los pulmones y no en el esófago, se le administraron 5 ml de solución salina estéril, después se le introdujo una sonda de menor calibre dentro de la anterior para aspirar el pulmón. Este paso se repite varias veces hasta obtener una cantidad suficiente de lavado bronquioalveolar (aproximadamente 10 ml). Inmediatamente después se centrifugó la muestra a 1500rpm/min para eliminar las células y recuperar el sobrenadante, el cual se guarda a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### VI.2. Cuantificación de proteínas (método de Bradford-Biorad)

Se elaboró un blanco con 800 $\mu\text{l}$  de agua desionizada y 200 $\mu\text{l}$  del reactivo Bradford.

Se construyó la curva estándar con 5, 10 y 20  $\mu\text{g}$  de albumina estandar (1mg/ml), se ajustó el volumen de los tubos a 800  $\mu\text{l}$  de agua desionizada y se agregaron 200  $\mu\text{l}$  del reactivo Bradford, se agitó y leyó a 595 nm después de 5 minutos.

Se determinó la proteína total en las muestras de LBA extrapolando en la curva estándar y en función de la dilución de cada muestra.

VI.3. Preparación de las muestras para Electroforesis en gel de poliacrilamida con sulfatododecil de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras.

#### VI.3.1 Preparación de la muestra para minigel al 15%

Se mezcló 5µg de proteína total de LBA con el mismo volumen de Laemli 2x (ver Apéndice I) con DTT (Ditiotreitol), y se puso a calentar a 95°C por 5 minutos.

#### VI.3.2. Electroforesis

Se preparó el gel separador (ver Apéndice I) al 15% de acrilamida/bisacrilamida (30/0.8%) y se vertió en la placa de electroforesis, dejando polimerizar por 1 h.

Se preparó el gel concentrador (ver Apéndice I) al 4% de acrilamida/bisacrilamida (30/0.8%) y se vertió en la placa de electroforesis, se colocó el peine formador de pozos y se dejó polimerizar 30 minutos.

Se colocó el gel en la cámara de electroforesis (Biorad) la cual debe contener el buffer de corrida 1x (ver Apéndice I).

Se colocaron las muestras en los carriles del gel, así como un marcador preteñido de pesos moleculares (Biorad) o el marcador de pesos moleculares Mark 12 (Invitrogen, LC5677)

El gel se expuso a un voltaje de 2mA y se detuvo justo antes de que se saliera el frente de migración.

#### VI.4. Tinción de Plata

Después de la electroforesis, se colocó el gel en una solución de 40% metanol, 5% formaldehído (10-60min a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C) para hacer que las proteínas queden fijadas al gel.

Se hicieron dos lavados de 5min con H<sub>2</sub>O desionizada.

Se pretrató con una solución de 0.02% de NA<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> durante 1 min.

De nuevo se hicieron dos lavados con H<sub>2</sub>O desionizada.

Se tiñó con una solución de plata preparada en el momento (0.025g de nitrato de plata en 25ml de H<sub>2</sub>O desionizada durante 19 min.).

Se realizó un lavado rápidamente con H<sub>2</sub>O desionizada.

Se colocó una solución reveladora (ver Apéndice I) hasta ver las bandas con la intensidad necesaria.

Se detuvo la acción del revelador con una solución de 1.25 ml. de ácido cítrico 2.3M.

Se colocó una solución de etanol al 10% y glicerol al 4% para secar el gel.

## VI.5. Electroforesis en dos dimensiones

### VI.5.1. Preparación de las muestras de lavados bronquioalveolares totales

Se adicionaron 300µl de precipitante del (2-D Clean-Up Kit) para una muestra de 1-100 µl (conteniendo de 1-100 µg de proteína total de LBA). Se agitó e incubó en hielo por 15 minutos.

Se complementó con 300µl de co-precipitante y mezcló, luego se centrifugó a 12000g. 5 minutos, se tiró el sobrenadante y se recuperó el pellet.

Se colocaron 40µl de co-precipitante y se puso a incubar el tubo en hielo por 5 minutos.

Se centrifugó a 12000g. y se tiró el sobrenadante.

Enseguida se adicionaron 25 µl de agua desionizada al pellet, se agitó y dispersó.

Se agregó 1ml de Buffer de lavado frío y 5 µl de aditivo de lavado, se incubó en hielo por 30 min, se agitó por 20-30 seg cada 10 minutos.

Se centrifugó a 12000g. por 5 min. Luego se removió y descartó el sobrenadante permitiendo que se seque un poco el pellet.

Se resuspendió el pellet en buffer de rehidratación con DTT (ver apéndice II).

### VI.5.2. preparación de las muestras por inmunoprecipitación

Se pesaron 40 mg de proteína A Sefarosa (GE Healthcare) en perlitas y se colocaron en 1 ml de Buffer de Tris-NaCl (ver apéndice II).

Se puso a incubar por 30 min a 4<sup>0</sup>C o en hielo para que se rehidrataran.

Se lavaron las perlitas 3 veces con el mismo Buffer (se centrifugó a 14000 rpm un pulso).

Se dejó en un volumen de 1 ml.

Se colocaron 20µl del anticuerpo primario (ver apéndice II) en 150 µl de Buffer de Tris-NaCl-NP40 (ver apéndice II).

Se adicionaron 50 µl de perlas de la proteína A Sefarosa al anticuerpo primario que se encuentra en el Buffer de Tris-NaCl-NP40, se puso en agitación 1 hora a 4<sup>0</sup>C.

Se lavó 2 veces con Tris-NaCl-NP40 para desechar el anticuerpo que no se pegó a las perlitas.

Se centrifugó a 14000 rpm un pulso, se desechó el sobrenadante y se secó con una aguja Hamilton para evitar que se perdieran las perlitas.

Se agregaron 50 µg de la muestra de LBA de neonatos con SDR y se dejó agitando toda la noche a 4°C.

Al siguiente día se centrifugó a 14000 rpm un pulso, se separó el sobrenadante de las perlitas y estas junto con el anticuerpo y la proteína CC10 pegada se les agregó el Buffer de Rehidratación (250 µl, ver apéndice II).

Se dejó incubar 15 min y luego se guardó a -30°C hasta colocarlo en la tira de pH 3-10 (Immobiline DryStrip gels, Amersham).

#### VI.5.3. Electroforesis (primera dimensión): Isoelectroenfoque (IEF)

Se incubó la muestra resuspendida en solución de rehidratación en la tira de pH 3-10 (Immobiline DryStrip gels, Amersham) toda la noche.

Se colocaron las tiras en el equipo de isoelectroenfoque (IPGPhor, Amersham) y se realizó la corrida para que migraran las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico.

Después de la corrida se pueden guardar a -70°C en una bolsa de plástico.

#### VI.5.4. Electroforesis (segunda dimensión): SDS-PAGE

Se hizo un gel preparativo a 15% de acrilamida/bisacrilamida (37.5/1%) grado proteómica.

Se incubaron las tiras en una solución de equilibrio (ver apéndice II) con DTT a temperatura ambiente por 15 minutos y enseguida otros 15 min. a temperatura ambiente en una solución de equilibrio con Iodoacetamina.

Se colocó la tira en el vidrio de electroforesis con el gel y se cubrió con una solución de agarosa (ver apéndice II).

Se puso en una cámara de electroforesis conectada a la fuente de poder a 28 mA.

Una vez terminada la migración de las proteínas en el gel, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa para hacer el Western Blot.

## VI.6. *Western Blot*

### VI.6.1. Transferencia de la proteína CC10

Se cortó la membrana de nitrocelulosa de acuerdo al tamaño del gel y se sumergió junto con el papel filtro, y los cojines de soporte en el buffer de transferencia (Ver apéndice I) asegurando que han sido completamente empapados.

Se ensambló el “sándwich” de transferencia con el gel cuidando que no hubiera burbujas entre la membrana y el gel o con el papel filtro.

Se colocó el “sándwich” de transferencia en la cámara de transferencia con la membrana cerca del electrodo positivo, de tal forma que las proteínas pudieran ser transferidas correctamente.

Se dejó transferir a 20V. toda la noche a 4°C.

Al siguiente día se tiñó la membrana para ver las proteínas con Rojo Ponceau, se enjuagó la membrana con TBS-T (Ver apéndice I) por 5 minutos.

### VI.6.2. Bloqueo de la membrana

Se sumergió la membrana en un volumen suficiente de TBS-T + 5% de leche descremada.

Se puso a incubar 1 hora a temperatura ambiente, en agitación.

### VI.6.3. Inmunoblot

#### Anticuerpo primario

Se sacó la membrana del bloqueo y se le adicionó el anticuerpo primario (Ver apéndice I), se incubó de 1-2 horas a temperatura ambiente, en agitación.

Se realizaron 6 lavados de 5 minutos con TBS-T

#### Anticuerpo secundario

Se sumergió en TBS + Tween 20 + 3% de leche + anticuerpo secundario (Ver apéndice I).

Se incubó 1 hora a temperatura ambiente, en agitación.

Se realizaron 6 lavados de 5 minutos con TBS-T.

### VI.6.4. Protocolo de revelado

Se añadieron volúmenes iguales de las soluciones del Enhanced quimioluminescence (ECL, Amersham). Verificando que cubrieran bien la membrana.

Se incubó con la mezcla por 1 min. y 30 seg.

Se sacó la membrana, escurrió y se colocó entre dos acetatos.

Se colocó en los cartuchos de exposición.

En un cuarto oscuro se colocó la película (Hyperfilm, Amersham) se cerró y expuso por 5, 10 ó 30 minutos.

Se reveló la película poniéndola primero en solución reveladora (Kodak, GBX) y antes de que la película se oscureciera se sacó y enjuagó en agua rápidamente para enseguida ponerla en la solución fijadora (Kodak, GBX) por mínimo 3 minutos.

## VI.6.5 Tinción de gel de poliacrilamida con Deep Purple Total Protein Stain

Preparación de las soluciones a utilizar:

Solución de fijación: 7.5% (v / v) de ácido acético y 10% (v / v) de metanol

Ácido acético	75 ml
Metanol	100 ml
Agua desionizada	825 ml

Solución de Lavado:  $\text{NaHCO}_3$  35 mM y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  300 mM en agua desionizada

$\text{NaHCO}_3$	2,94 g	
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	31,8 g	pH: 10.6 -10.7
Agua desionizada	750 ml	

Solución de tinción de proteínas totales:

Se diluyó el concentrado de Deep Purple Total Protein Stain 1:200 en agua desionizada. Esta solución fue preparada justo antes de ser utilizada y se protegió de la luz.

Solución de Estabilización 7.5% (v / v) de ácido acético.

Ácido acético	75 ml
Agua desionizada	925 ml

Pasos que se siguieron para la tinción con Deep Purple total Protein Stain:



### 1. Fijación

Para la fijación de las proteínas en el gel se adicionó un volumen adecuado de solución de fijación en un contenedor (aproximadamente 20 veces más que el volumen del gel)

Se incubó el gel en la solución de fijación, toda la noche a temperatura ambiente con agitación suave.

### 2. Tinción

El Deep Purple se encontraba a una temperatura de  $-30^{\circ}\text{C}$  y se puso a temperatura ambiente unos 5 minutos antes de ser utilizado.

Se retiró la solución de fijación y se sustituyó con la solución de lavado en un volumen 20 veces mayor al volumen del gel. Se puso en agitación suave por 30 minutos.

Nota: La solución es sensible a la luz y debe mantenerse alejada de la luz brillante.

Se retiró la solución de lavado y se reemplazó con agua desionizada (10 veces superior al volumen del gel). En este punto se le agregó el Deep Purple Total Protein Stain al agua, tomando en cuenta que la disolución debía ser 1:200. Se puso a incubar a temperatura ambiente por una hora en agitación suave. El recipiente debía ser tapado de la luz.

### 3. Estabilización

Se cambió la solución de tinción por la solución de estabilización, procurando que esta cubriera totalmente el gel. Se colocó en agitación suave por 15 minutos a temperatura ambiente. Este paso se repitió una vez más.

Después de este paso, se procedió a la visualización del gel en el equipo Typhoon 9410 (Amersham, GE) para detectar las proteínas por fluorescencia y estas fueron analizadas con el programa Image Master 2D Platinum (Amersham, GE).

## VII. Resultados

### VII.1. Identificación de la proteína CC10 en lavados bronquioalveolares de conejo

Con la finalidad de estandarizar la metodología que será utilizada para el análisis de las proteínas de las muestras humanas, primero se realizaron experimentos con muestras de modelos animales.

Se cuantificó entonces la proteína total presente en muestras de LBA de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Las muestras de LBA fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con sulfato dodecil de sodio (SDS) para investigar la presencia de la proteína CC10, cuyo peso molecular se comparó con un marcador de pesos moleculares (fig. 8).

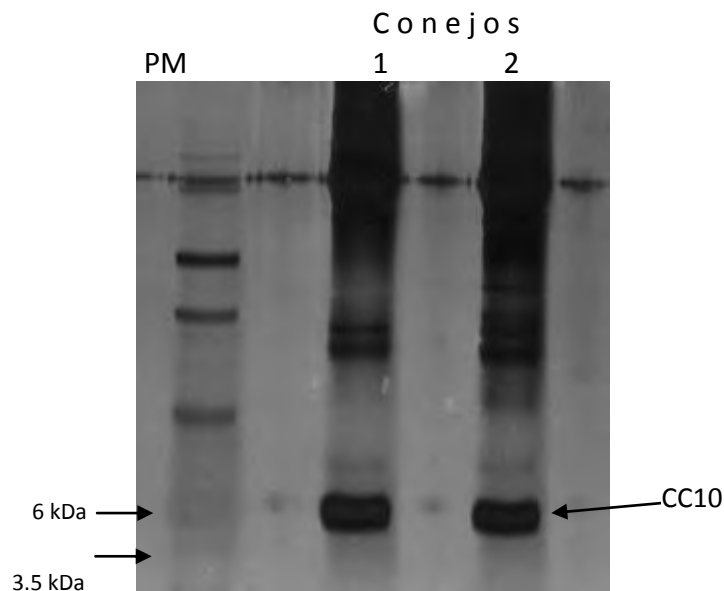


Fig. 8 Gel de poliacrilamida con SDS al 15% con 10  $\mu$ g de proteína de muestras de LBA de conejo y 5  $\mu$ l de marcador de pesos moleculares: PM (Mark 12, Invitrogen). Tinción: Plata.

El gel se tiñó mediante plata para visualizar las proteínas y, como podemos observar en la figura 8 se identificó una banda con abundante proteína que probablemente corresponde a la proteína CC10, debido a que tiene un peso de  $\sim$  6 kDa como el reportado en la literatura (Mantile et al., 1993).

Se realizó un Western Blot a las mismas muestras de conejo (inmunoblot anti-CC10) y fue reconocido por el anticuerpo dirigido contra la proteína CC10 (fig. 9), por lo que podemos concluir que la banda de ~ 6 kDa detectada en el gel de poliacrilamida corresponde a la proteína CC10.



Fig. 9 Western Blot con anticuerpo anti-CC10 con muestras de LBA de conejo revelado mediante quimioluminiscencia (ECL), electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% con SDS.

## VII.2. Estandarización de la técnica de electroforesis de dos dimensiones (2D) con lavados bronquioalveolares de conejo

Se realizó la electroforesis (2D) de proteínas de lavado bronquioalveolar de conejo, con el fin de estandarizar la técnica y posteriormente llevarla a cabo con las muestras de neonatos prematuros (fig. 10).

Se necesitaba lograr que las proteínas migraran y se distinguieran correctamente unas de otras, ya que un manejo inadecuado de la técnica hace que se puedan perder las proteínas o no se distinguen bien los "spots" correspondientes a proteínas con distintos puntos isoeléctricos, además de que la manipulación de la tira de pH fijo debe hacerse con mucho cuidado al colocarle la muestra, al equilibrarla y sobre todo cuando se coloca por encima del gel, ya que si no se hace de forma adecuada se pierden las proteínas o no se logra una buena migración en el gel.

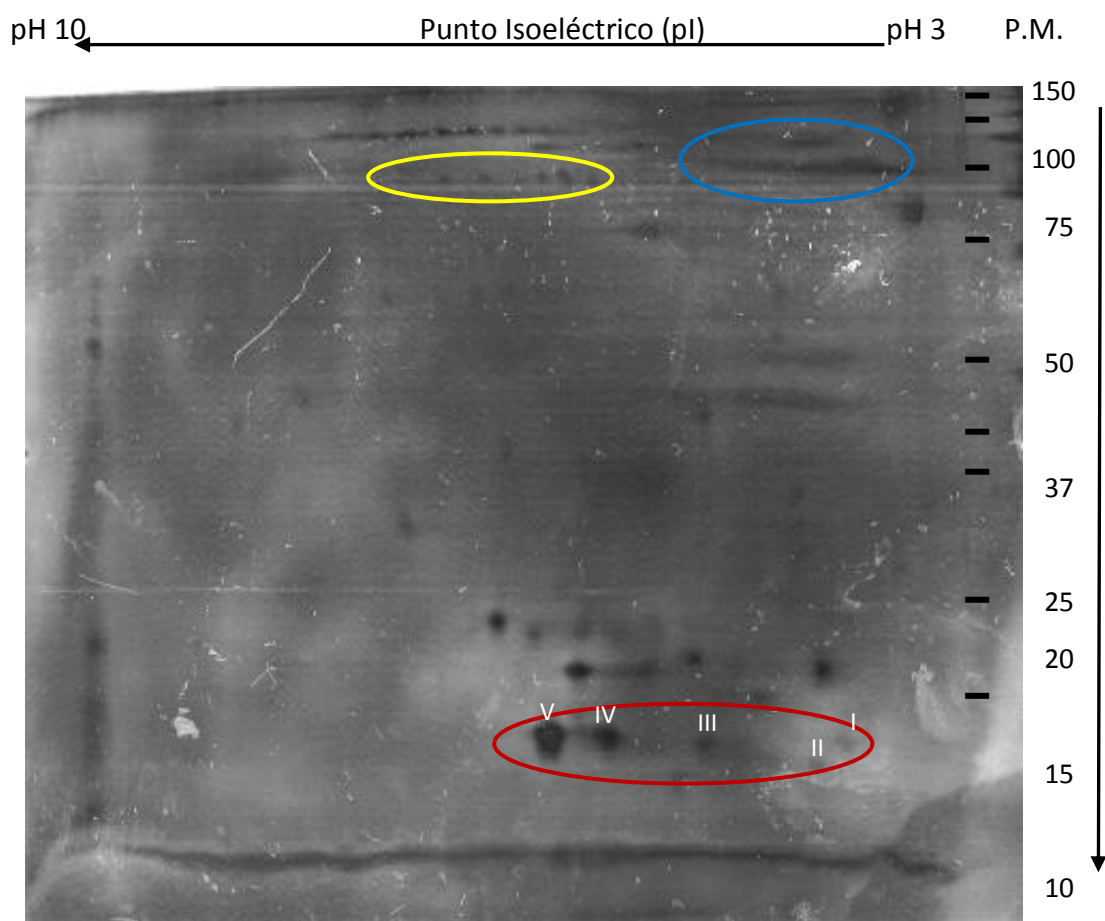


Fig. 10. Gel de SDS-Poliacrilamida al 15% con tira de Isoelectroenfoque de pH fijo de 3-10, de 13 cm de longitud con 50 µg de proteínas de lavado bronquioalveolar de conejo, teñido con plata.

En la figura 10 podemos observar puntos de color oscuro que denominamos “spots”, los cuales corresponden a proteínas, que se separaron en distintos puntos isoeléctricos mediante Isoelectroenfoque en un rango de pH de 3 a 10 (primera dimensión) los cuales migran y se separan de manera horizontal. Posteriormente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (segunda dimensión) se separaron por su peso molecular y migran de forma vertical en el gel. Al final el gel se tiñó con plata.

Los spots encerrados en la elipse de color amarilla se distinguen bien uno de otro, lo cual nos indica que esa proteína en particular tiene isoformas con distintos puntos isoeléctricos, (fig. 10), en contraste, la elipse de color azul muestra una mancha que es un corrimiento irregular de otra proteína y no se logra distinguir ningún spot, por lo que no podemos saber cuantas isoformas tiene esa proteína y cuál es su punto isoeléctrico.

La elipse de color rojo nos muestra spots que corresponden al peso de la proteína CC10 y podemos apreciar que tiene cinco isoformas; las isoformas I, III, IV, y V tienen diferentes puntos isoeléctricos pero el mismo peso molecular, mientras que la numero II es una isoforma con un punto isoeléctrico y peso molecular distinto a las otras cuatro.

### VII.3. Identificación de la proteína CC10 en lavados bronquioalveolares de neonatos prematuros con SDR

Se realizó la cuantificación de proteínas totales de las muestras de LBA de neonatos prematuros con SDR por el método de Bradford, obteniendo las siguientes concentraciones:

No. de muestra	Proteína total (mg/ml)
1	0.1
2	0.170
3	0.466
4	0.291
5	4.98
6	0.75
7	0.727

Tabla 2. Cuantificación de proteína total de LBA de neonatos prematuros con SDR

Se realizó un gel de poliacrilamida con SDS a partir de LBA de neonatos en dónde podemos observar la presencia de una banda de ~6 kDa, que posiblemente corresponde a la proteína CC10 (fig. 11).

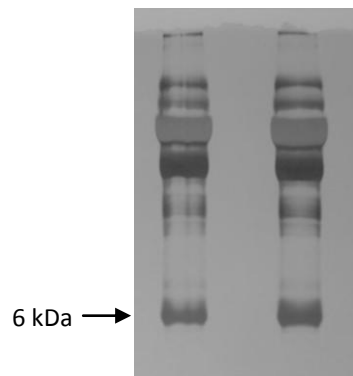


Fig.11 Muestras de LBA de neonato prematuro con SDR  
Gel de poliacrilamida al 15 %, Tinción: Plata

Se realizó un inmunoblot anti-CC10 de las muestras de LBA de neonatos detectándose una banda del mismo peso molecular que en el gel de plata, por lo que se demostró la presencia de esta proteína (fig. 12).



Fig. 12 Western Blot de muestras de LBA de neonato con anticuerpo anti-CC10  
Gel de poliacrilamida al 15% con SDS

Una vez detectada la proteína CC10 en las muestras de LBA de neonato se procedió a hacer inmunoprecipitaciones con anticuerpo anti-CC10 (IP: CC10) para no ocupar toda la muestra en la identificación y caracterización de una sola proteína, en este caso de la CC10.

En el primer carril se colocó un control negativo (C) el cual contenía la proteína A Sefarosa con un anticuerpo anti-CC10 sin muestra biológica, en los otros cuatro carriles se colocaron las inmunoprecipitaciones de la proteína CC10 de las muestras de LBA de neonatos (fig. 13).

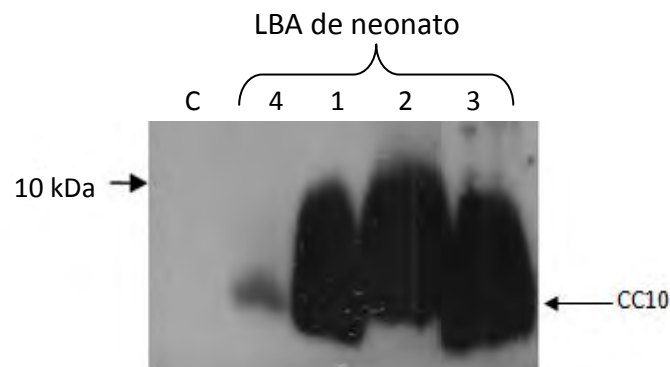


Fig. 13 Inmunoprecipitación de la proteína CC10  
a partir de 25  $\mu$ g de proteína total de LBA de neonatos con antiCC10 policlonal  
(Anti-CC10 rabbit polyclonal, Santa Cruz), gel de SDS-poliacrilamida al 15%,

Se llevó a cabo la detección por Western Blot con anticuerpo policlonal anti-CC10. No se observó ninguna banda de proteína en el peso de 6 kDa en el control negativo, el cual no tenía muestra (Fig. 13, carril "C"), mientras que, en los otros carriles se detectó la proteína CC10 inmunoprecipitada y reconocida específicamente por el anticuerpo. Se precipitó una mayor cantidad de CC10 de las muestras 1, 2 y 3 que en la muestra 4, esto pudo deberse a una falla en la cuantificación.

#### VII.4. Obtención del mapa 2D de lavados bronquioalveolares de neonatos prematuros con SDR

Se realizó el mapa de segunda dimensión de proteínas de LBA de un neonato prematuro con SDR (fig. 14).

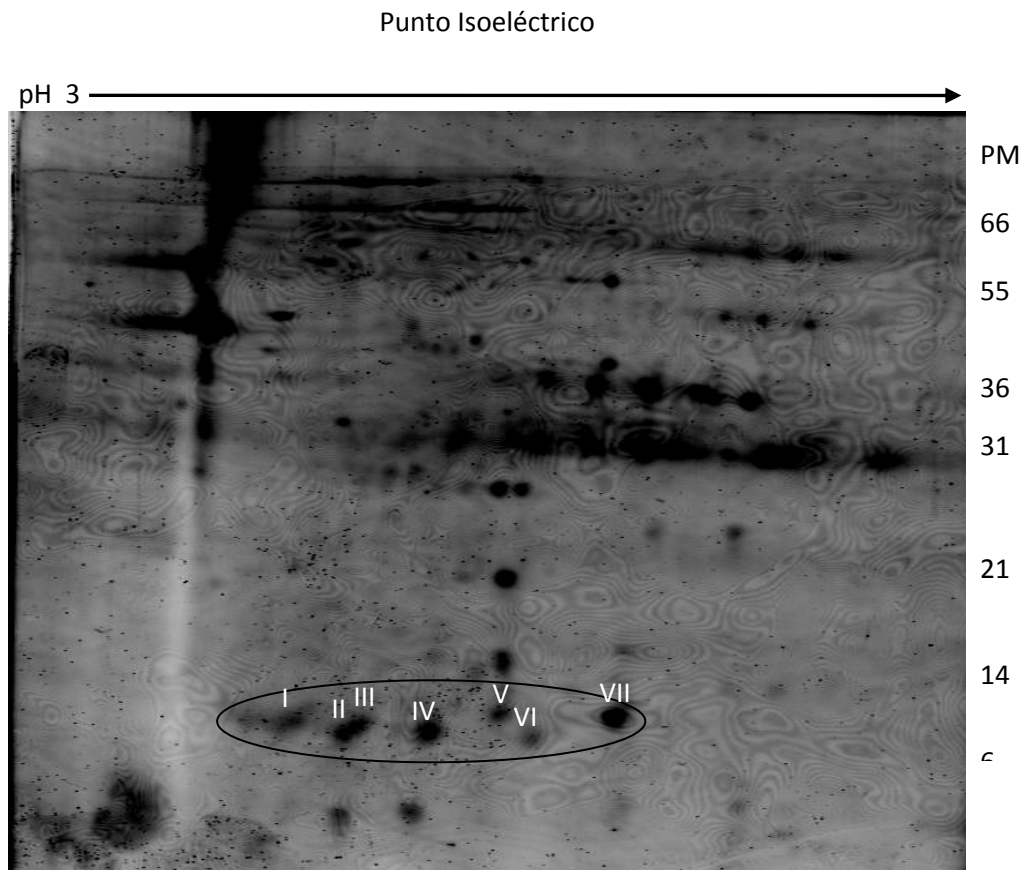


Fig. 14. Mapa de 2D de LBA de neonatos prematuros con SDR utilizando 50  $\mu$ g de proteína. La figura es escaneada de un gel con el programa Image Master 2D platinum, presentada sin manipular, excepto porque no se muestra completa y por la luz y contraste para resaltar los spots.



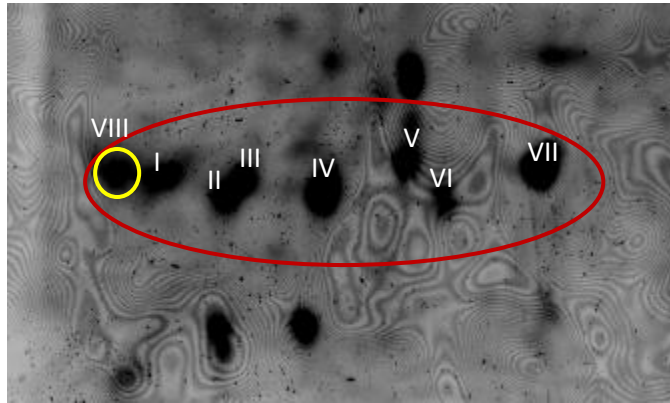


Fig. 15 LBA de neonato prematuro con SDR, imagen tomada de la Fig. 11, recortada y con mayor resolución

Con ayuda del equipo Typhoon 9410 (Amersham) se seleccionó y aumento la resolución de la parte del gel donde se localiza el peso molecular correspondiente a la proteína CC10 (fig. 12). En esta imagen se aprecian mejor siete isoformas que podrían corresponder a la proteína CC10 por su peso molecular, y detectamos una más que en la imagen anterior (fig. 14, isoforma VIII). Con la finalidad de comprobar si estas isoformas corresponden a la CC10, realizamos posteriormente el análisis 2D de inmunoprecipitaciones de CC10 a partir de LBA de neonatos.

## VII.5. Detección de las isoformas de la proteína CC10 presente en lavados bronquioalveolares de neonatos prematuros con SDR

Se realizaron inmunoprecipitaciones de la proteína CC10 de los LBA las cuales se analizaron en 2D e inmunoblot anti cc-10.

Para estar seguros que las proteínas inmunoprecipitadas corresponden a la CC10, se llevó a cabo el análisis 2D e inmunoblot anti-CC10 con un control negativo (proteína A Sefarosa con el anticuerpo pero sin adicionarle la muestra), en el cual no se detectó ningún spot de proteína de peso molecular de 6 kDa.

Después de que se inmunoprecipitó la CC10 de seis muestras de LBA de neonatos, estas inmunoprecipitaciones fueron sometidas a electroforesis (2D) y detectadas por Western Blot.

Observamos dos isoformas de la proteína CC10 a un minuto de exposición, una de ellas (isoforma II), es una isoforma con un peso molecular más bajo de 6 kDa y un pI menor de 4.3 en comparación de la isoforma III (fig. 16).

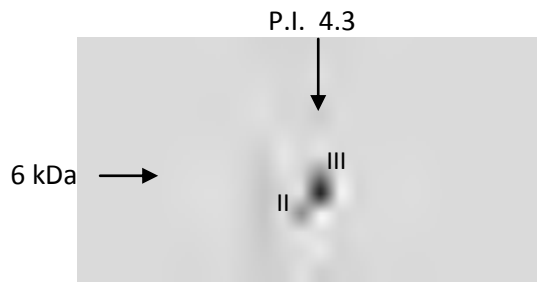


Fig. 16. Inmunoprecipitación y electroforesis de 2-D de la proteína CC10 de LBA  
Detección por Western Blot con anti-CC10, 1 min. de exposición

La misma membrana se dejó expuesta 48 horas para obtener una mayor señal y se observaron un total de 7 isoformas de la CC10 (fig. 17). La isoforma VIII (Fig. 14) solo apareció en el gel 2D de proteínas totales de LBA de neonatos, por lo cual se requieren otros experimentos para comprobar su identidad.

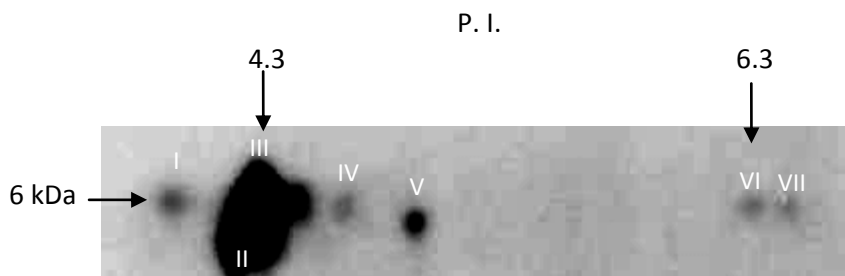


Fig. 17. Inmunoprecipitación y electroforesis de 2-D  
CC10 de LBA  
Detección por Western Blot con anti-CC10, 48 horas de exposición

En cada uno de los experimentos de inmunoprecipitación (n=6), se midió el punto isoeléctrico y el peso molecular para cada una de las isoformas de la proteína CC10 (ver Tabla 2).

# de isoforma	Punto Isoeléctrico					P.M. kDa	No. de muestras <sup>1</sup>
I	3.9	3.9				6.5	2/6
II	4.2	4.5	4.4	4.5		6.1	4/6
III	4,5	4.3	4.5	4.4	4.5	6.5	5/6
IV	4.6	4.6				6.5	2/6
V	5.1	5.0	5.0			6.3	3/6
VI	6,5	6,4	6,4			6.5	3/6
VII	6,7	6,5	6,7			6.5	3/6

Tabla 3. Isoformas observadas en cada una de las muestras, con su punto Isoeléctrico y peso molecular

<sup>1</sup> Numero de muestras que presentaron esa isoforma entre el total de las muestras (n=6)

## VIII. Discusión de resultados

Se identificó la proteína CC10 en muestras de LBA de neonatos prematuros con SDR por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (fig. 12), inmunoprecipitación e inmunoblot con un anticuerpo dirigido contra la proteína CC10, cuyo peso molecular corresponde al reportado en la literatura (Singh *et al.*, 1988). La identificación de la proteína CC10 de LBA de conejo también se llevó a cabo por electroforesis y western blot detectándose una sola banda. De acuerdo a estos resultados podemos decir que esta proteína tiene el mismo peso molecular en humanos adultos, neonatos prematuros con SDR y conejos sanos sin que se noten cambios en la proteína por la diferencia en la edad, la patología o la especie.

Por medio de la electroforesis 2D si pudimos observar diferencias entre la proteína CC10 de los LBA de conejo (5 isoformas, ver fig. 10) y de neonato prematuro con SDR (fig. 14) ya que observamos hasta 7 isoformas en estos últimos. Esto puede deberse a la diferencia entre especies y que los conejos eran sanos, mientras que los neonatos son prematuros y eso ya implica una diferencia en la cantidad de surfactante presente en los pulmones y por lo tanto una menor cantidad de proteínas que se obtienen en los LBA de estos neonatos. Es probable que el SDR y la prematuridad, que también disminuyen la cantidad de proteína en los pulmones, sean la causa de que en el mapa 2D de LBA de neonatos con SDR se observe una menor cantidad de spots de proteínas totales si lo comparamos con experimentos como el que realizó Lindahl y colaboradores en donde analizaron LBA de adultos fumadores y no fumadores (Lindahl *et al.*, 1999). Por otro lado, estos autores realizaron sus experimentos en geles mucho más grandes, lo que permite una mejor separación de las proteínas. Hasta el momento no existe un mapa de segunda dimensión de proteínas obtenidas de un lavado bronquioalveolar de neonatos prematuros con SDR, pero si se ve una diferencia muy clara en la cantidad de spots entre el adulto y el neonato. La comparación ideal sería con un neonato sano para analizar las diferencias que presenta un neonato prematuro con este síndrome pero por razones éticas esto no es posible.

Pudimos detectar siete spots, los cuales fueron numerados (I-VII), que, de acuerdo al peso corresponden a la proteína CC10 (fig. 14), cuando aplicamos mayor resolución en el equipo typhoon (9410, Amersham) pudimos apreciar otro spot (fig. 15) que no fue detectado por inmunoprecipitación por lo que no podemos afirmar que corresponda a la proteína CC10, con otro tipo de estudios (como el espectrómetro de masas) podríamos analizarlo para descartarlo o no. Las isoformas detectadas en los experimentos realizados son más que las reportadas en la literatura (Lindahl *et al.*, 1999), los puntos isoelectricos también varían ligeramente (ver tabla 3). No existe un estándar en la cantidad de isoformas y sus puntos isoelectricos para esta proteína. Sin

embargo, el punto isoeléctrico teórico obtenido de la secuencia de aminoácidos de CC10, es de 4.99 ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)) y el primero reportado en la literatura es de 4.8 (Singh y cols., 1988). Los resultados de neonatos mostraron que los primeros cinco spots van del punto isoeléctrico de 3.9 a 5.0, la razón por la cual Lindahl y colaboradores no detectaron tantas isoformas puede deberse a diferencias en las muestras, ya que sus muestras son de adultos.

Se sabe que las proteínas pueden ser alteradas en su estructura y que esto ocasione cambios en su punto isoeléctrico, algunas de estas alteraciones “post-translacionales” pueden ser: oxidaciones, causadas por agentes oxidantes como el oxígeno que atrae los hidrógenos de una molécula y hace que la proteína cambie su punto isoeléctrico; glicosilaciones, causadas por moléculas de carbohidratos que se unen a algún aminoácido de las proteínas; fosforilaciones, cuando un fosfato es añadido y luego removido de la estructura siendo esta la más común en células animales.

Se podría proponer que los spots de CC10 con puntos isoeléctricos menores a los reportados por Lindahl de LBA de neonatos, se encuentran oxidados y eso ocasiona que su punto isoeléctrico disminuya y la isoforma se vuelva más ácida. No existen reportes de cambios en el pI por oxidación de la CC10 en neonatos pero si en otras proteínas (Cumming *et al.*, 2007). Está demostrado que los bebés prematuros con SDR tienen una mayor oxidación de las proteínas que están presentes en el pulmón debido a la patología así como al tratamiento para contrarrestarlo como es la ventilación mecánica, que incluye la aplicación de oxígeno con respiradores artificiales (Ramsay *et al.*, 2001). Sin embargo, se tienen que realizar más estudios para determinar si la diferencia en el punto isoeléctrico de la proteína de neonato prematuro con SDR del presente trabajo con la reportada en el adulto es por oxidación o se debe a otras causas.

Dos isoformas de la proteína CC10 (VI y VII) están más separadas a puntos isoeléctricos de 6.5 y 6.7 respectivamente, esto puede deberse a fosforilaciones o glicosilaciones que ocasionan que la isoforma tenga un punto isoeléctrico mayor, estos no han sido reportados antes por lo que también pueden solo presentarse en bebés con SDR e incluso podría tener implicaciones clínicas, pero faltan mas estudios para determinar estos cambios en la estructura.

Existe un programa llamado NetPhos 2.0 Server (Blom *et al.*, 1999) el cual está diseñado para predecir los sitios de fosforilación en la mayoría de las proteínas.

MKLAVTLTLV TLALCCSSAS AEICPSFQRV IETLLMDTPS SYEAAMELFS  
 PDQDMREAGA QLKKLVDTLP QKPRE<sup>S</sup>IIKL MEKIAQSSLC N

Fig. 18 Secuencia de aminoácidos de la proteína CC10 de humano.  
 Las letras de mayor tamaño corresponden a los aminoácidos en los que es probable haya fosforilaciones. Las Serinas que se encuentran en color rojo son aquellas en donde el programa predice posibles fosforilaciones.

El programa hace las predicciones para tres aminoácidos: Serina, Treonina y Tirosina; en los últimos dos el puntaje de probabilidad es muy bajo por lo que no predice fosforilaciones en éstos últimos residuos. Existen cuatro Serinas con un puntaje alto de probabilidad de que existan fosforilaciones (Ver tabla 4).

	POSICIÓN	PUNTAJE
SERINA	40	0.835
SERINA	41	0.991
SERINA	50	0.543
SERINA	76	0.945

Tabla 4. Predicción de fosforilaciones en Serina, mediante el programa NetPhos 2.0 Server

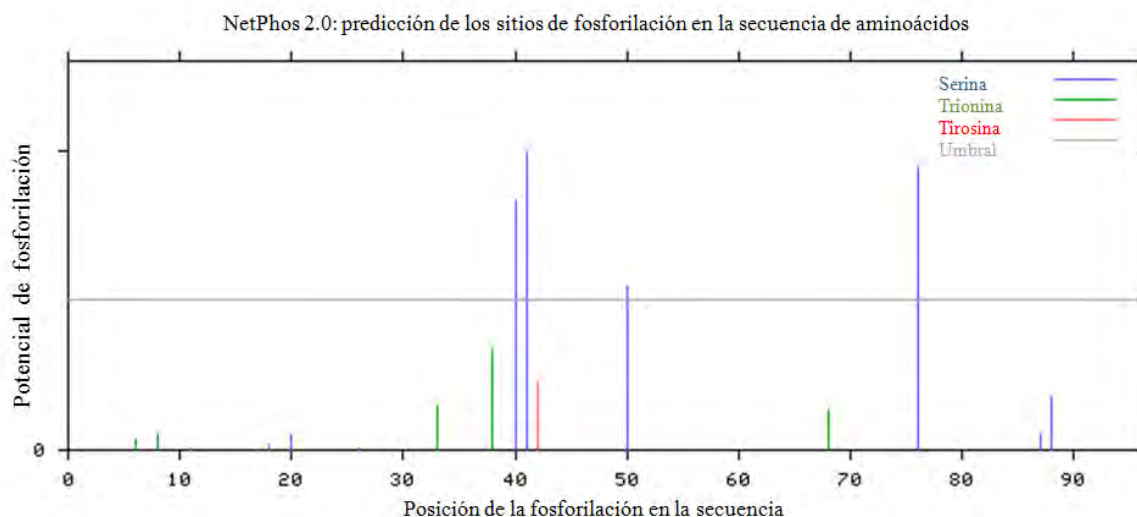


Gráfico 1. Predicción de los sitios de fosforilación en la secuencia de aminoácidos con el programa NetPhos 2.0 Server

Las predicciones de fosforilación realizadas para la proteína CC10 solo aparecen en cuatro Serinas (ver gráfico 1), que se aprecian por arriba del umbral de predicción.

Es entonces posible sugerir que dos de las isoformas (VI y VII) de la proteína CC10 se encuentren fosforiladas y por esa razón tengan un punto isoeléctrico mayor que las otras cinco (ver tabla 3). Para estar seguros de eso se tendrá que analizar con espectrómetro de masas que detecte fosforilaciones.

Por otro lado, se utilizó otro programa para predecir posibles glicosilaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína CC10 llamado NetNGlyc 1.0 Server (Gupta *et al.*, 2004) para investigar si existen probabilidades de que las isoformas VI y VII estén glicosiladas y los resultados que se obtuvieron fue que no existen sitios de predicción de glicosilaciones para la secuencia de aminoácidos de la proteína CC10. Por lo que se refuerza la idea de que son fosforilaciones presentes en estas dos isoformas que ocasionan un punto isoeléctrico mayor en ellas.

A pesar de que ya se han realizado varios estudios de las isoformas de la proteína CC10 aún existen variaciones en la cantidad de isoformas presentes en los LBA, así como en los puntos isoeléctricos de esta (Lindahl *et al.*, 1999, Ghafouri *et al.*, 2002, Wattiez *et al.*, 2003), por lo que es difícil comparar los resultados obtenidos en la presente investigación con los reportados en la literatura, ya que las muestras con las que se trabajó en dichas investigaciones eran de humanos adultos con patologías distintas a las de mi investigación, o se hicieron en otras especies. Por lo que se puede decir que existen varios factores que influyen en el cambio de la proteína CC10 o en sus isoformas.

## IX. Conclusiones

La caracterización de la proteína CC10 en neonatos prematuros con SDR muestra siete isoformas, algunos de estos spots no han sido reportados anteriormente, se necesita hacer estudios más detallados para identificar que está ocasionando estas modificaciones en la proteína, y si el cambio en el punto isoeléctrico esta directamente relacionado con la función que desempeña la proteína en el pulmón de neonatos prematuros, así como, la relación que puede existir entre los cambios observados de CC10 con el SDR presente en los neonatos.

El mapa 2D de LBA de neonatos prematuros con SDR no ha sido reportado anteriormente, tampoco se ha elaborado un mapa 2D de LBA de neonatos sanos o con otra patología, por lo que se desconoce si existe una diferencia en la cantidad de proteína presente o de sus isoformas, aun así, se necesita hacer estudios más detallados de estas y analizar las modificaciones que pudieran existir. De esta forma se podría lograr un mayor conocimiento del papel de las proteínas y el efecto que tiene el SDR en ellas para combatirlo de una manera más efectiva.



## X. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo son un pequeño aporte al desarrollo de la ciencia y específicamente en el conocimiento del SDR, por lo que es importante continuar con un trabajo más a fondo sobre las isoformas de la proteína CC10 y su relación con la enfermedad, ya que se podrían hacer cultivos de las células Clara obtenidas de LBA de neonatos prematuros con SDR y ver si existen cambios en las proteínas secretadas, así como comparar la CC10 de LBA de neonatos con SDR con LBA de neonatos con otras patologías y ver qué diferencias existen en las isoformas de la proteína. Lo ideal sería obtener muestras de LBA de neonatos sanos para hacer una comparación de la proteína CC10 pero éticamente no es posible, y con lo único que se podría comparar es con proteína CC10 presente en la sangre de cordón de neonatos sanos. Al investigar más a fondo el papel que desempeña la proteína CC10 en el surfactante pulmonar y como inmunoreguladora de la respuesta inflamatoria podría utilizarse en nuevos medicamentos que ayuden a contrarrestar al SDR y disminuya las muertes de neonatos prematuros.

## XI. Bibliografía

Andreeva AV, Kutuzov MA, Voyno-Yasenetskaya TA, 2007 Aug Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 293(2):L259-71.

Angert RM, Pilon AL, Chester D., Davis JM., 2007 Dec., CC10 reduces inflammation in meconium aspiration syndrome in newborn piglets, *Pediatric Research*; 62(6):684-8.

Barranco F, Blasco J, Mérida A, Muñoz MA, Jareño A, Cozar J, et al. 2000, Principios de urgencias, emergencias y cuidados críticos. Andalucía: Editorial Alhulia.

Blom, N., Gammeltoft, S., Brunak, S., 1999, Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites, *Journal of Molecular Biology*: 294(5): 1351-1362.

Bradford M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

Broeckaert F, Clippe A, Knoop B, Hermans C, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): features as a peripheral lung biomarker. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 923:68-77.

Carlomagno T, Mantile G, Bazzo R, Miele L, Paolillo L, Mukherjee AB, Barbato G, Resonance assignment and secondary structure determination and stability of the recombinant human uteroglobin with heteronuclear multidimensional NMR. *J Biomol NMR* 1997; 1:35-46.

Castro L., Labarrere Cruz, González H. y Dra. Yamilé Barrios Rentería, Factores de riesgo del Síndrome Dificultad Respiratoria de origen pulmonar en el recién nacido, *Rev. Cubana Enfermería* 2007; 23(3)

Clements Jhon A. and Avery M., 1998, Lung surfactant and neonatal respiratory distress syndrome, *Am J. Respir Crit Care Med*, Vol., 157, pp S59-S66.

Cullen B. P., Guzmán C., Matias M. D., Martínez A. M., 2007, Surfactante pulmonar, *Vacunación Hoy*, Vol. 18 Núm. 185.

Cumming C, Dargusch R., Fischer W., Schubert D., 2007, Increase in Expression Levels and Resistance to Sulfhydryl Oxidation of Peroxiredoxin Isoforms in Amyloid  $\beta$  Resistant Nerve Cells, *The journal of biological chemistry* vol. 282, no. 42, pp. 30523–30534.

Diemel Robert V., 2002, Surface activity of pulmonary surfactant protein B From biophysical properties to clinical application, Ph.D. thesis, with summary in Dutch Utrecht University, the Netherlands, January 2002

Geneser Finn, *Histología: sobre bases moleculares*, Buenos Aires-México, Médica Panamericana, 2000, 813 p.

Ghafouri B., Stahlbom B., Tagesson C., Lindahl M., 2002, Newly identified proteins in human nasal lavage fluid from non-smokers and smokers using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting, *Proteomics* 2002, 2, 112–120.

Günther A, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walmrath D., Seeger W, 2001 Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome, *Respir Res.*, 2;353-364.

Gupta R., Jung E., Brunak S., 2004, Prediction of N-glycosylation sites in human proteins, en preparación.

Jasso Gutiérrez L. Síndrome de dificultad respiratoria en el recién nacido. México DF: Intersistemas S.A; 1996.

Jorens PG, Sibille Y, Goulding NJ, van Overveld FJ, Herman AG, Bossaert L, De Backer WA, Lauwerys R, Flower RJ, Bernard A, 1995 Oct., Potential role of Clara cell protein, an endogenous phospholipase A2 inhibitor, in acute lung injury, *Eur Respir J.*;8(10):1647-53.

Laing, I., Hermans C., Bernard A., Burton P., Goldblatt J., Le Souëf P., 2000, Association between plasma CC16 levels, the A38G polymorphism, and asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:124–127.

Lindahl M, Svartz J, Tagesson C., 1999 Apr-May Demonstration of different forms of the anti-inflammatory proteins lipocortin-1 and Clara cell protein-16 in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids, *Electrophoresis.*;20(4-5):881-90.

Loughran F., Oei, Wang, Gxiu Xu, Neil, 2006, The Influence of Gestation and Mechanical Ventilation on Serum Clara Cell Secretory Protein (CC10) Concentrations in

Ventilated and Nonventilated Newborn Infants, *Pediatric Research* Vol. 60, No. 1, 103-108.

Mantile G., Miele L., Cordella M., Singh G., Katyal L., Mukherjee B., 1993, Human Clara Cell 10-kDa Protein Is the Counterpart of Rabbit Uteroglobin, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 268, No 27, 20343-20351.

Martínez M, Muñoz S, Baeza R, 2007, Asociación molecular y función del agente tensioactivo pulmonar de ternera, *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(2):237-45.

Pérez-Gil J, Keough M. W, 1998, Interfacial properties of surfactant proteins, *Biochimica et Biophysica, Acta* 1408:203-217

Ramanathan R, 2006, Surfactant therapy in preterm infants with respiratory distress syndrome and in near-term or term newborns with acute RDS, *Journal of Perinatology*, 26, S51-S56

Ramsay L., Demayo J., Hegemier E., Wearden E., Smith V., Welty E., Clara Cell Secretory Protein Oxidation and Expression in Premature Infants Who Develop Bronchopulmonary Dysplasia, *Am J Respir Crit Care Med* Vol 164. pp 155–161, 2001

Rosas C, Mendoza M, Escobedo A, Mendoza M, 2008, efecto de inductores de madurez pulmonar fetal, *Revista de especialidades medico-quirúrgicas*, 13(4):181-5

Scanlon V.C., Sanders T., 2007, *Essentials of Anatomy and Physiology*, 5ta. Ed., F.A. Davis Company, USA, 603:344

Singh G, Katyal SL, Brown WE, Phillips S, Kennedy AL, Anthony J, Squeglia N., 1988 Sep., Amino-acid and cDNA nucleotide sequences of human Clara cell 10 kDa protein, *Biochim Biophys Acta.*; 950(3):329-37

Singh G, Katyal SL, Brown WE, 1990. Clara cell 10 kDa protein (CC10): comparison of structure and function to uteroglobin. *Biochim. Biophys. Acta* 1039: 348–355.

Singh G, Katyal SL, 2007, Clara Cell Proteins, *Annals New York Academy of Sciences*, 43-58.

Stripp BR, Reynolds SD, Boe IM, Lund J, Power JH, Coppens JT, Wong V, Reynolds PR, Plopper CG, 2002 Aug; Clara cell secretory protein deficiency alters clara cell secretory

apparatus and the protein composition of airway lining fluid, *Am J Respir Cell Mol Biol.* 27(2):170-8

Taesch, LU, Ramirez S, 2002, Improving pulmonary surfactants, *Acta Pharmacologica Sinica*, USA, supplement 23:11-15.

[Umland T.C.](#), [Swaminathan S.](#), [Singh G.](#), [Warty V.](#), [Furey W.](#), [Pletcher J.](#), [Sax M.](#) [Nat. Struct. Biol.](#) 1:538-545(1994) "Structure of a human Clara cell phospholipid-binding protein-ligand complex at 1.9-A resolution."

Vasanthakumar G, Manjunath R, Mukherjee AB, Warabi H, and Schiffmann E., Inhibition of phagocyte chemotaxis by potent phospholipase A2 inhibitory protein, uteroglobin. *Biochem Pharmacol* 37: 389–394, 1988.

Wang SZ, Rosenberger CL, Bao YX, Stark JM, Harrod KS, 2003 Jul., Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection, *J Immunol.* 15; 171(2):1051-60.

Wattiez R., Noël-Georis, Cruyt C., Broeckeaert f., Bernard A., Falmagne P., 2003, Susceptibility to oxidative stress: proteomic analysis of bronchoalveolar lavage from ozone-sensitive and ozone-resistant strains of mice, *Proteomics* 2003, 3, 658–665.

Weaver T. and Whitsett J., 1991, Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins, *Biochem. J.* 273, 249-264.

Winkelmann R., Geschwindner S., Haun M., Rüterjans H., 1998, Solution structure of the recombinant oxidized rabbit uteroglobin using homonuclear and heteronuclear multidimensional NMR, *Eur. J. Biochem.* 258: 521-532.

Wolfson MR, Funanage VL, Kirwin SM, Pilon AL, Shashikant BN, Miller TL, Shaffer TH., 2008 Nov, Recombinant human Clara cell secretory protein treatment increases lung mRNA expression of surfactant proteins and vascular endothelial growth factor in a premature lamb model of respiratory distress syndrome, *Am J Perinatol.*;25(10):637-45.

Wright J.R., 1997, Immunomodulatory functions of surfactant, *Physiological Reviews*, Vol 77, 931-962.

Yoshikawa S, Miyahara T, Reynolds SD, Stripp BR, Angheliescu M, Eyal FG, Parker JC. 2005 Apr; Clara cell secretory protein and phospholipase A2 activity modulate acute ventilator-induced lung injury in mice. *J Appl Physiol.* 98(4):1264-71.

## Otras referencias

Chiesi Farmaceutici. Curosurf Package Insert. Package Insert; NDA 20-744: 1-7.

Respiratory Distress Syndrome en intensive care nursery house staff manual, 2004, The Reagents of the University of California

Sitio web de la Boston University, EU:  
<http://www.bu.edu/histology/p/13805loa.htm>

Expasy Proteomic Server, Swiss:  
[http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)

Enciclopedia educativa:  
<http://www.xenciclopedia.com/upload/09-07/pulmones211.gif>

## Apéndice I

### Soluciones para la electroforesis SDS-PAGE

Buffer de Laemmli 2X contiene:

- 4% SDS
- 20% glicerol
- 10% 2-mercaptoetanol o DTT (Dititreitol)
- 0,004% azul de bromofenol
- 0,125 M Tris HCl

Preparación del buffer superior (0.5 M):

- Para 500ml.
- Tris Base-HCl 30.3g
- SDS 20 ml.                      Ajustar a pH de 6.8

Preparación del buffer inferior (1.5M):

- Para 500ml.
- Tris Base-HCl 90.8g
- SDS 20 ml.                      Ajustar a pH de 8.8

Preparación del gel concentrador: 10 ml.

- Agua desionizada 3 ml.
- Acrilamida/Bis 30% 1.3 ml.
- Buffer Superior 2.5 ml.
- Persulfato de Amonio (APS) 30 µl.
- Temed 5 µl.

Preparación del gel separador: 10 ml. Porcentaje 15%

- Agua desionizada 2.4 ml.
- Acrilamida/Bis 30% 5.0 ml.
- Buffer Inferior 2.6 ml.
- Persulfato de Amonio (APS) 30 µl.

Temed 5  $\mu$ l.

#### Buffer de corrida

Tris Base	3.0g.	
Glicina	14.4g.	
SDS al 10%	10ml.	Aforar a 1lt.

#### Tinción de Plata

##### Revelador (para 25ml.)

3% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.75g.	
0.05% formaldehido	12.5 $\mu$ l	
0.004% NA <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0.5ml. de Tiosulfato de sodio al 0.02%	

#### Fijador

Metanol	40ml.
Formaldehido	5ml.
H <sub>2</sub> O desionizada	55ml.

#### Inmunoprecipitación

##### Tris-NaCl

Tris 25mM	
NaCl 150mM	pH: 7.4

##### NP40-Tris-NaCl

Tris-NaCl	
NP40 1%	



## Western Blot

### Buffer de transferencia

Buffer de corrida 10x	100ml.	
Etanol puro	200ml.	Aforar a 1lt.

### Buffer TBS 10X

NaCl	80g.	
KCl	2g.	
Tris Base	30g.	Se ajusta el pH a 7.4

### Buffer TBS-Tween 0.1%

TBS 10X	100ml.
Agua desionizada	895ml.
Tween 20	5ml.

### Anticuerpo primario CC10 rabbit polyclonal, Santa Cruz (#B0304)

TBS-T	10ml.
BSA Fracción V	100µl.
Azida de sodio al 10%	50µl.
Anticuerpo (1:1000)	10µl.

### Anticuerpo secundario para CC10 (anti-rabbit-HRP)

TBS-T	40ml.
Leche semidescremada	1.2g.
Anticuerpo (1:40,000)	1µl.

## Apéndice II

### Soluciones para la electroforesis de dos dimensiones

#### Solución Azul de Bromofenol

Azul de bromofenol	100mg.
Tris-base	60mg.
Agua bidestilada	aforar a 10ml.

#### Solución de Rehidratación

Urea 8M	12g.
CHAPS	0.5g.
Anfolitos (moléculas orgánicas con pequeñas cargas )	125µl
Azul de Bromofenol	50µl
Agua bidestilada	Aforar a 25ml.

Se adicionarán 7mg de DTT por cada alícuota de 2.5ml de solución de rehidratación.

#### Buffer de Equilibrio con SDS

(6 M Urea, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 29.3% Glicerol, 2% SDS, 0.002% Azul de Bromofenol, 200 ml)

Urea 6 M	72.1 g
Buffer superior (Tris-HCl, pH 8.8)	10.0 ml
Glicerol	69 ml (84.2 g)
SDS	4.0 g
Solución Azul de Bromofenol (1%)	400 µl
Agua bidestilada	Aforar a 200 ml

*Esta es una solución stock. Justo antes de usarse se añadirá DTT o Iodoacetamida (para el primero o segundo equilibrio, respectivamente)*

#### Solución selladora de Agarosa

Buffer de corrida con SDS	100ml.
Agarosa	0.5g.
Azul de Bromofenol	200µl.

*Adicionar todos los ingredientes en un matraz y calentar hasta que se disuelva completamente.*