

3  
2EJ

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del C.C.H.**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas**

**Efectos del tratamiento hormonal con  
Dexametasona y TRH sobre la  
expresión de la proteína SP-A del  
surfactante pulmonar**

**Tesis que para obtener el título de  
Licenciada en Investigación Biomédica Básica  
presenta:**

**Nina S. Hinke Schultze**

**Ciudad Universitaria,**

**octubre de 1995.**

**CALLA DE ORIGEN**



## **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 está 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.

**Esta tesis fue dirigida por la Dra. Carmen Aceves Velasco del Centro de Neurobiología, UNAM.**

# Indice

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>2</b>
I. Fisiología del pulmón	2
II. El surfactante pulmonar	3
III. Composición del surfactante	4
IV. Ciclo del surfactante	5
V. Maduración bioquímica del pulmón y su control	6
VI. Más sobre las SP's, en particular sobre la SP-A	
a. Estructura y funciones	9
b. Ontogenia y regulación	12
<b>Planteamiento e hipótesis del trabajo</b>	<b>14</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>15</b>
I. Material biológico	15
II. Protocolo experimental	
a. Ontogenia	15
b. Tratamiento hormonal	15
III. Análisis de la proteína SP-A	
a. Preparación de la proteína	16
b. Western Blot	17
IV. Análisis de la expresión	
a. Preparación y purificación de los ARN totales	18
b. Cuantificación de los transcritos de SP-A por RT-PCR	18
<b>Resultados</b>	<b>21</b>
I. Análisis de la proteína por Western Blot	
a. Ontogenia	21
b. Regulación hormonal	22
II. Análisis de los transcritos por RT-PCR	24
<b>Discusión</b>	<b>26</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>32</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>33</b>
<b>Agradecimientos</b>	
<b>Apéndice- protocolos</b>	
(Extracción proteínas, Western Blot, soluciones)	
(Extracción ARN, RT-PCR, PCR semicuantitativa, marcaje de un oligo)	

# Resumen

El surfactante pulmonar es un complejo multimolecular de fosfolípidos y proteínas específicas, que contribuye por sus propiedades tensoactivas a la estabilidad alveolar y a la prevención del colapso durante la espiración. La importancia funcional del surfactante se hace patente en niños prematuros, que al no tener un surfactante adecuado y suficiente por falta de maduración de los pulmones, desarrollan un síndrome de estrés respiratorio o enfermedad de membranas hialinas. Se sabe que la administración de glucocorticoides (GC) en la hembra preñada, acelera la maduración pulmonar de los fetos, y que el tratamiento conjunto de GC con la hormona liberadora de tiotropina (TRH) tiene un efecto sinérgico sobre la maduración pulmonar (Liggins, 1969; Rooney *et al.*, 1978). Aunque se ha estudiado y reportado ampliamente el efecto de estas hormonas en la cantidad de fosfolípidos del surfactante, poco se sabe sobre su efecto sobre las proteínas específicas. La proteína A del surfactante (SP-A) es la más abundante de las proteínas específicas, y participa de manera importante en la expresión de las propiedades del surfactante y en la regulación de su metabolismo. El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de un tratamiento con GC y TRH sobre la expresión del gen de la SP-A del surfactante pulmonar en una edad temprana del desarrollo pulmonar. Con ese propósito se trató a ratas gestantes con GC (s.c. 0.2mg/kg en los días 14, 15 y 16 de la gestación), TRH (s.c. 0.05mg/kg 15, 16), T3 (i.v. 0.5mg/kg en los días 15, 16) GC+TRH (s.c. en los días 14, 15, 16 GC, y 15, 16 TRH) y GC+T3 (en los días 14, 15, 16 GC y 15, 16 T3), utilizando como control negativo la administración i.v. de solución salina. Al día 17 de la gestación se analizó la cantidad de la proteína y del ARNm de la SP-A en los pulmones fetales. Se encontró un efecto sinérgico sobre la cantidad de proteína del tratamiento hormonal de GC con TRH. El efecto de la TRH sobre la SP-A no está mediado vía la liberación de hormonas tiroideas, puesto que el tratamiento con T3, sola o con GC, no tuvo ningún efecto. No se observó ningún efecto sobre la cantidad de transcritos de SP-A para ninguno de los tratamientos. El efecto de las hormonas en la regulación de la síntesis de la SP-A en este período es postranscripcional. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte que analiza la regulación de la síntesis de la SP-A por TRH.

# Introducción

## I. Fisiología del pulmón

El sistema respiratorio es el responsable del intercambio de oxígeno y bióxido de carbono del cuerpo. Los órganos donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso son los pulmones. Además del intercambio gaseoso los pulmones desempeñan múltiples funciones, contribuyendo al equilibrio ácido-base, al metabolismo de compuestos vasoactivos y a la defensa contra infecciones. A continuación sólo se revisan algunos aspectos que se refieren a la respiración, y a aspectos estructurales que influyen en la mecánica de los pulmones (para revisiones sobre fisiología del pulmón véase Anderson, 1993 y Rodríguez, 1993).

El pulmón consiste en una serie de ramificaciones que tienen como objeto el transporte del aire y la generación de una gran superficie en la cual se realiza el intercambio gaseoso. La porción de intercambio está constituido por bronquiolos, conductos alveolares y alvéolos, que están rodeados por capilares, denominada barrera alvéolo-capilar.

La superficie interna de los alvéolos está revestida por una capa de líquido, expuesta al aire proveniente de la respiración. Las moléculas del agua en contacto con el aire ejercen una atracción fuerte entre sí, y en consecuencia, la superficie del agua tiende a contraerse (esto se hace evidente en el menisco en una pipeta, por ejemplo). Esta contracción en la superficie de los alvéolos tiende a expulsar el aire hacia los bronquios, lo cual hace que los alvéolos (y otros espacios aéreos de los pulmones) tiendan al colapso. Dado que estos mecanismos suceden en todos los espacios aéreos de los pulmones, el efecto neto de los mismos es producir una fuerza elástica contráctil en la totalidad del pulmón. La tensión superficial constituye aproximadamente 2/3 partes de las fuerzas contráctiles del pulmón (el otro tercio está constituido por la elasticidad del tejido pulmonar que al aumentar el volumen durante la inspiración desarrolla una fuerza de retracción). Para poder llevar a cabo el "trabajo respiratorio", es decir, inspirar/espigar, se deben de vencer estas fuerzas contráctiles.

Según la ley de Laplace, la presión en un espacio esférico de aire (que se puede aplicar a un alvéolo), se puede calcular de la siguiente forma:

$$\text{presión} = \frac{2 \times \text{tensión superficial}}{\text{radio}}$$

De la fórmula anterior se deduce que la presión del colapso generada en los alvéolos es inversamente proporcional al radio de los mismos, es decir, cuanto menor el alvéolo, mayor será la presión del colapso. Los alvéolos menores tenderían a colapsarse, expandiendo los alvéolos mayores, de esta forma teóricamente, colapsaría la totalidad de los alvéolos. Este fenómeno se conoce como inestabilidad de los alvéolos. Sin embargo, nada de esto sucede, ya que en la interfase aire/agua se intercala un material tensoactivo que reduce la tensión superficial, llamado surfactante pulmonar.

## **II. Surfactante pulmonar**

El surfactante pulmonar es un complejo lipo-protéico que recubre la pared de los bronquiolos respiratorios y los alvéolos desempeñando múltiples papeles fundamentales para la función respiratoria, como son el mantenimiento del equilibrio alveolar, la reducción del "trabajo respiratorio", el efecto anti-edema, la impermeabilización de la pared alveolar contra proteínas séricas, la acción antioxidante y la defensa contra agentes infecciosos (Van Golde *et al.*, 1988). El surfactante es producido y secretado a los alvéolos por el pneumocito de tipo II (PNII), una célula altamente diferenciada del epitelio pulmonar (Askin y Kuhn, 1971). El surfactante intracelular es almacenado en el PNII en unas estructuras llamadas inclusiones lamelares antes de ser secretado.

La importancia funcional del surfactante pulmonar se pone en evidencia en la patología de membranas hialinas (EMH), una de las principales causas de mortalidad de los niños prematuros. Este grave síndrome de estrés respiratorio, resulta de la inmadurez del sistema productor del surfactante que se traduce en un déficit cuantitativo y en una composición inadecuada del mismo (Zupan y Lacaze-Masmonteil, 1993).

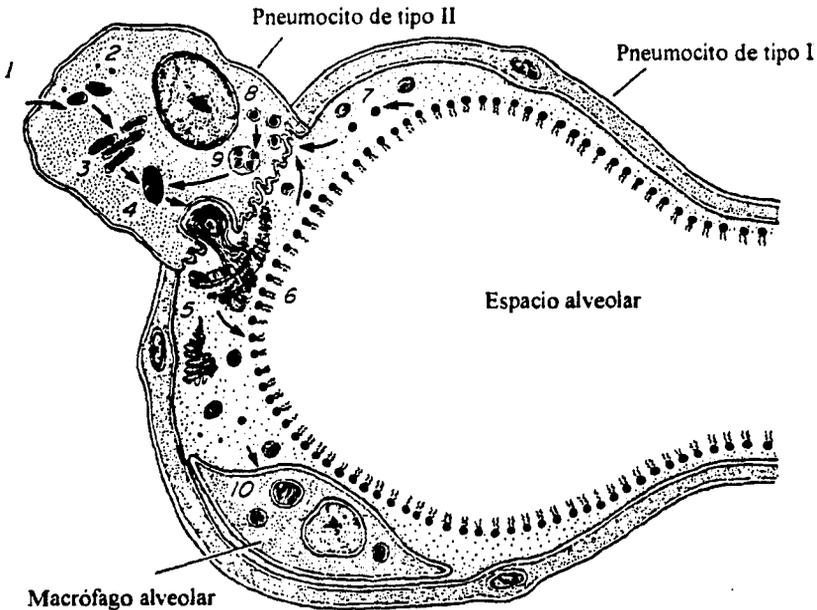
### III. Composición del surfactante

El surfactante de todos los vertebrados pulmonados estudiados hasta ahora comparte ciertas características generales, lo que resalta la importancia de los componentes principales (Bourbon, 1991a). El surfactante está constituido en un 90% por lípidos y el 10% restante son proteínas. La mayoría de los lípidos, -de 80 a 90%-, son fosfolípidos. Sin embargo, las proporciones de las especies moleculares difieren claramente de la composición lipídica de las membranas biológicas. La dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) representa más de un 60% y el fosfatidilinositol (PI), ausente en las membranas, hasta un 10%, el resto son lípidos en menor cantidad. El colesterol es el lípido neutro más abundante (Possmayer *et al.*, 1992). Desde un punto de vista funcional, el DPPC es el lípido más importante pues gracias a su naturaleza anfifílica se intercala en la interfase aire/agua disminuyendo la tensión superficial, logrando así la estabilidad alveolar. Sin embargo, los lípidos solos no poseen todas las características biofísicas del surfactante natural, sobre todo en lo que se refiere a la cinética de adsorción y la estabilidad después de varios ciclos de compresión/descompresión durante la inspiración/expiration. Esto sugiere un papel importante para las proteínas específicas del surfactante (Keough, 1992).

Las proteínas específicas sólo representan un 2% del material del surfactante. Hasta ahora se han caracterizado cuatro y se les denominó SP-A, SP-B, SP-C y SP-D (SP por Surfactant Protein). (Possmayer, 1988). La SP-B y la SP-C son dos proteínas hidrofóbicas de bajo peso molecular. La SP-A y la SP-D son glicoproteínas, hidrofílicas. Las proteínas forman junto con los lípidos una estructura molecular que permite la transición de la forma de almacenamiento intracelular poco hidratada y compacta (las inclusiones lamelares) a la película activa en la interfase aire/agua. Además, facilitan la distribución rápida de los fosfolípidos en la superficie de los alvéolos (Keough, 1992).

#### IV. Ciclo del surfactante

Además de la forma en monocapa que disminuye la tensión superficial en la interfase agua/aire del espacio alveolar, el surfactante se encuentra en una serie de configuraciones diferentes a lo largo del ciclo funcional (ver fig. 1). Las inclusiones lamelares al ser secretadas a la hipofase acuosa, se desenrollan y forman una estructura de transición altamente organizada en forma de malla, llamada mielina tubular (5 en la fig. 1). Esta parece ser fundamental para la adsorción eficaz de los fosfolípidos en el espacio aéreo y para su estructuración en monocapa funcional (6). El surfactante ya utilizado se encuentra en forma de vesículas uni o multilamelares (7) de diferentes tamaños, que se internalizan por endocitosis para ser recicladas (8, 9).



**Figura 1. Representación de un alvéolo y el ciclo del surfactante.**

1. Espacio intersticial 2. Pneumocito de tipo II 3. Vesículas provenientes del Golgi 4. Inclusiones lamelares 5. Formación de la mielina tubular en la hipofase 6. Monocapa de fosfolípidos en la interfase aire/agua 7. Internalización del surfactante "usado" 8 y 9. Vesículas de reciclaje (tomada de Hawgood y Clements, 1990)

La secreción del surfactante al espacio alveolar es llevada a cabo por exocitosis, mediante la activación del citoesqueleto, en particular de los filamentos de actina. La secreción está regida por la proteína cinasa dependiente de AMPc y de la proteína cinasa C. La primera, responde a los estímulos neuro-humorales (a través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos), y la segunda, al estímulo de factores locales (prostaglandinas, leucotrienos) generado por la distensión mecánica de las células. La cantidad de surfactante presente en el alvéolo es regulada por la proteína SP-A que ejerce un efecto negativo sobre la secreción y estimula su recaptura (Bourbon, 1991b). Existen evidencias de que la SP-A es secretada además por otra vía, probablemente por vesículas secretorias además de su secreción vía inclusiones lamelares junto con todos los componentes del surfactante (Froh *et al.*, 1991).

## **V. Maduración bioquímica del pulmón y su control**

Durante la génesis del pulmón se distinguen diferentes etapas morfológicas conocidas como glandular, canalicular y sacular (ver tabla 1). Una vez que se establece la ramificación de los bronquios durante el desarrollo embrionario, la maduración pulmonar procede por dos vías: la maduración morfológica, que corresponde a la subdivisión de los acinos y al establecimiento de la barrera alvéolo-capilar (área de intercambio gaseoso), y la maduración bioquímica que corresponde a la adquisición de la capacidad de los PNII o sus precursores de sintetizar y secretar surfactante funcional. Ambas proceden simultáneamente, pero el factor limitante, o la causa inmediata del síndrome de estrés respiratorio en los niños prematuros, es la maduración bioquímica (Bourbon y Fraslon, 1991).

## ESTADIOS DEL PULMON FETAL EN RATA

	Días	Características morfológicas
Duración de gestación	22	
Periodo glandular	hasta 18	Desarrollo conductos aéreos. Aparición cel. epiteliales <sup>a</sup>
Periodo canalicular	19-20	Desarrollo acinos
Periodo sacular	21-neo	Des. porción respiratoria. Barrera alvéolo-capilar. Dif. PN II
Incl. lamelares	19	

**Tabla 1. Estadíos del pulmón fetal de rata de rata.** Utilizando un anticuerpo que reconoce células pulmonares epiteliales adultas, probablemente a través del reconocimiento de las proteínas del surfactante, detectó desde el día 16 de gestación PNII o sus precursores en rata. (Tabla modificada de Cockshut y Possmayer, 1992 con los datos de Ten Have Opbroek, 1981). (<sup>a</sup> Tomado de Otto-Verberne y Ten Have Opbroek, 1987).

Durante el período glandular del pulmón fetal (días 14-18 en rata), las células columnares indiferenciadas del epitelio empiezan su diferenciación en lo que será epitelio bronquial y epitelio alveolar (conformado de PNII y posteriormente PNI). Aunque los PNII están comprometidos en la vía de diferenciación desde un estadio precoz, sintetizan relativamente tarde el surfactante. Se ha demostrado que células epiteliales embrionarias de rata de 15 días de gestación, desarrollan en cultivo inclusiones lamelares, mientras que *in vivo* aparecen hasta el día 19 (Williams, 1977). Esta maduración acelerada se produce aún en medio de cultivo desprovisto de suero y de hormonas (Gross *et al.*, 1989). Trabajos recientes indican que un factor parecido al factor  $\beta$  de crecimiento de tumores (TGF- $\beta$ ) producido por el mesénquima pulmonar, inhibe la maduración en estadios precoces (Torday y Kourembanas, 1990). Parece también haber una coordinación recíproca entre crecimiento y diferenciación en el pulmón fetal, ya que los mecanismos que desencadenan la maduración bioquímica inhiben el crecimiento (Fraslon *et al.*, 1993).

La maduración bioquímica de los pneumocitos está regulada y mediada por varias hormonas y citocinas. Los glucocorticoides (cortisol) fetales juegan un papel central en el control de la maduración bioquímica. Su aparición durante el desarrollo coincide con la ontogenia de los componentes del surfactante (Smith, 1978). Por otro lado, se sabe que la administración de glucocorticoides o de ACTH tanto al feto como a la madre, aceleran la maduración y la producción del surfactante (Possmayer *et al.*, 1977). La importancia de los corticoides endógenos se ha demostrado además en experimentos donde la administración a la rata gestante del inhibidor de esteroides RU-486, retardó sensiblemente la maduración tanto estructural como bioquímica (Guettari *et al.*, 1989).

Se sabe que el efecto de los glucocorticoides sobre los pneumocitos II es a través del mesénquima pulmonar, al menos en lo que respecta a la síntesis de los fosfolípidos. Los fibroblastos estimulados por glucocorticoides producen un mediador peptídico llamado factor pneumocito de fibroblasto o FPF, que estimula los pneumocitos de forma parácrina. El intercambio de señales parece pasar vía uniones comunicantes en la membrana basal, pues se ha encontrado una correlación entre el número de éstas y el estado de multiplicación y diferenciación de las células epiteliales (Post y Smith, 1984). Se han encontrado receptores a GC tanto en fibroblastos como en los PNII. Estos aparecen normalmente en los fibroblastos desde el día 19, y en los PNII desde el día 20 de la gestación, y los GC pueden acelerar su aparición, lo que implica que los PNII pueden estar directamente influenciados por esta hormona (Swezey *et al.*, 1990).

El papel de los esteroides sexuales se pone en evidencia por el hecho de que los fetos de sexo femenino presentan una maduración precoz. Esta acción se debe al efecto inhibitorio de los andrógenos, más que a un efecto estimulante de los estrógenos (Ballard, 1989). Los andrógenos actúan sobre los fibroblastos e inhiben la producción del FPF. La hormona antimülleriana, que tiene una gran similitud con el TGF- $\beta$  y que es la responsable de la regresión de los canales de Müller en los machos, podría estar implicado en el retraso de la maduración epitelial (Bourbon y Fraslon, 1991).

Las hormonas tiroideas endógenas también están involucradas en la maduración pulmonar, como lo indican las siguientes observaciones. La administración de T4 a fetos de conejos, resulta en la maduración acelerada de los

pulmones con un incremento en el número de inclusiones lamelares (Wu *et al.*, 1973). El aumento en hormonas tiroideas coincide con el surgimiento del surfactante, y la tiroidectomía retrasa la maduración pulmonar (Hitchcock *et al.*, 1980). Además, se han encontrado niveles bajos de T3 Y T4 circulantes en recién nacidos con inmadurez pulmonar, y una correlación entre la frecuencia de EMH e hipotiroidismo (Cuestas *et al.*, 1976). Se han demostrado receptores a hormonas tiroideas en el pulmón fetal (Gonzalez y Ballard, 1982).

Otros mediadores e interacciones locales también están implicados en el control del crecimiento y la maduración del epitelio pulmonar. Péptidos como el factor de crecimiento epitelial (EGF) (King *et al.*, 1989), el péptido liberador de gastrina (GRP), y mediadores lipídicos como las prostaglandinas, ejercen efectos complejos aún poco entendidos (Post y Smith, 1992; Bourbon y Fraslon, 1991). En cuanto a la insulina, se sabe que es necesaria a concentraciones fisiológicas para el buen funcionamiento de los pneumocitos II. Sin embargo, un exceso como sucede en ciertos embarazos diabéticos, disminuye la producción del surfactante (Ballard, 1989).

En conclusión, la maduración del pulmón fetal está controlada por una interacción compleja entre un gran número de estímulos. Varios autores (Post y Smith, 1992; Bourbon y Fraslon, 1991; Cockshut y Possmayer, 1992) sugieren que las hormonas endógenas probablemente no tienen un papel inductor sobre la diferenciación del PNII que ya está comprometida desde etapas tempranas de la embriogénesis, sino que principalmente modulan la producción del surfactante por los pneumocitos de tipo II.

## **VI. Más sobre las SP's, en especial sobre la SP-A**

### **a. Estructura y funciones**

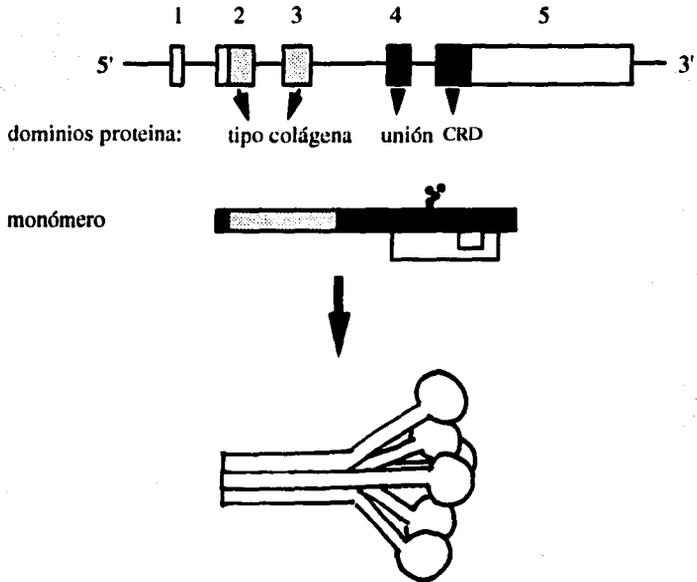
Las proteínas específicas del surfactante contribuyen de manera importante a la expresión de las propiedades de los fosfolípidos y por lo tanto al funcionamiento adecuado del surfactante.

La SP-B y la SP-C son proteínas hidrofóbicas que aceleran la adsorción de los fosfolípidos y protegen al surfactante del efecto inhibitor de ciertas proteínas

séricas (Whitsett y Baatz, 1992). Experimentos *in vitro* sugieren que SP-C es más efectivo en acelerar la adsorción de los fosfolípidos, mientras que SP-B facilita la reducción de la tensión superficial (Yu y Possmayer, 1990).

La SP-A, es la proteína más abundante y la mejor estudiada de las proteínas específicas del surfactante. Es una glicoproteína hidrofílica con un peso molecular de 26-38 kDa cuando se analiza en condiciones reductoras. El producto de la traducción del ARNm, que en el humano es de 248 aa., sufre una maduración postraduccional importante: establecimiento de puentes disulfuro intra y extracatenarios, glicosilación y sialización (Hawgood, 1992). El análisis de la secuencia revela la presencia de tres regiones estructurales definidas; este arreglo es el resultado de un largo proceso evolutivo que, por medio de duplicación génica, favoreció la recombinación exónica dando lugar a una secuencia polipeptídica de dominios funcionales de diferente origen (Zupan y Lacaze-Masmonteil, 1993) (ver figura 2). La parte NH<sub>2</sub> terminal del producto de traducción es un dominio que presenta homología con la familia de las colágenas. La parte COOH terminal es un dominio hidrofílico importante que contiene un sitio consenso de glicosilación y un sitio de unión a carbohidratos (CRD), lo que hace de la SP-A una lectina (Drickamer *et al.*, 1986). Estos dominios están separados por una hélice alfa anfífilica. La estructura cuaternaria funcional de la proteína es un octadecámero de 600 kDa, conformada por seis trímeros unidos de forma no covalente (Hawgood, 1992).

El ADNc de SP-A de varias especies ha sido aislado, incluyendo el del humano (White *et al.*, 1985; Floros *et al.*, 1986) de la rata (Sano *et al.*, 1987) y del conejo (Boggaram *et al.*, 1988). En el humano se clonaron dos ADN complementarios que difieren ligeramente en su secuencia. Estos dos transcritos son el producto de la transcripción de dos genes localizados en el cromosoma 10. En la rata, el análisis por Southern Blot, revela la presencia de un solo gen. El gen consiste de 5 exones, pero sólo los cuatro últimos exones codifican para la proteína (Hawgood, 1992).



**Figura 2. Representación de la estructura del gen y la proteína SP-A.**

Se muestra la correspondencia entre la organización de los exones y los diferentes dominios funcionales de la proteína. CRD=dominio de reconocimiento de carbohidratos. También se representan las modificaciones posttraduccionales, glicosilación (s), y puentes disulfuro (u). (Tomado de Hawgood, 1992)

La proteína SP-A desempeña varias funciones. Esta se une en presencia de calcio a los fosfolípidos a través del dominio anfipático y el sitio que presenta homología con la colágena agregando los lípidos (Keough, 1992). Esta interacción con los lípidos tiene consecuencias importantes: contribuye junto con la SP-B a la formación de la mielina tubular (Suzuki *et al.*, 1989). Junto con la SP-B y la SP-C acelera la velocidad de adsorción y distribución de los fosfolípidos en la pared del alvéolo (Whitsett y Baatz, 1992). La SP-A participa además en el reciclaje del surfactante; al unirse a un receptor específico localizado en la superficie del PNII, inhibe la secreción del material tensoactivo por el PNII, y estimula la recaptura e internalización del mismo (Wright *et al.*, 1989).

El pulmón es un importante receptáculo de partículas y microorganismos provenientes del aire. En este sentido, el surfactante contribuye de manera importante a los mecanismos de defensa no específicos del pulmón. Se ha demostrado que los macrófagos alveolares embebidos en él presentan una actividad mayor de fagocitosis y eliminación de bacterias. En específico, se ha visto que la SP-A estimula la actividad de los macrófagos alveolares gracias a su dominio de unión a carbohidratos, homólogo al factor del complemento C1q (Van Iwaarden *et al.*, 1990 y Van Iwaarden *et al.*, 1991). Esta capacidad de opsonización también la comparte la SP-D ya que puede fijar lipopolisacáridos (Kuan *et al.*, 1992).

#### b. Ontogenia y regulación hormonal

En todas las especies estudiadas, la expresión de las proteínas asociadas al surfactante está regulada durante el desarrollo. Estas al igual que los fosfolípidos son sintetizadas en el PNII, no por los prePNII, pero además las SP-A y SP-B pero no la SP-C, son producidas por las células de Clara, células del epitelio bronquial (Wohlford-Lenane y Snyder, 1992 y Auten *et al.*, 1990). Las proteínas asociadas al surfactante aparecen en el último tercio del embarazo (en humanos, en ratas el último 20%) aumentando de forma significativa al final de la gestación (Weaver y Whitsett, 1991). El aumento en las proteínas durante el desarrollo se da de forma paralela al aumento en los fosfolípidos, y está asociado a la capacidad de reducir la tensión superficial del surfactante. Farrell *et al.* midieron las propiedades del surfactante aislado a los días 19, 20 y 21 de la gestación en la rata y encontraron una correlación entre la actividad biofísica y la aparición de las proteínas en las fracciones lamelares (Farrell *et al.*, 1990).

En la rata, los transcritos de SP-A se pueden detectar a partir del día 16 de gestación utilizando técnicas de hibridación con una sonda complementaria muy sensibles, como mapeo por S1. La acumulación en mensajeros se debe, al menos en parte, al aumento en la tasa de transcripción. La proteína sigue la cinética de los transcritos pero de forma desfasada. Se le detecta a partir del día 18 de gestación y se observa un aumento a medida que avanza el desarrollo (Gross *et al.*, 1989). En ratas recién nacidas (día 1) la cantidad de SP-A es dos veces mayor que en fetos de 21 días de gestación, mientras que la cantidad de SP-A en ratas adultas es tres veces mayor

que al primer día de nacimiento. Las apoproteínas se pueden detectar en el líquido amniótico de ratas desde el día 19 registrando un incremento del doble o triple durante los días 20 y 21 de la gestación. (Van Golde *et al.*, 1988). En este momento el pulmón está listo para la vida extrauterina.

Durante el desarrollo fetal tanto la expresión del gen de la SP-A como la síntesis de la proteína están moduladas por varias hormonas. Explantes de tejido pulmonar fetal de conejo expuestos a un análogo del AMPc, aumentan la tasa de transcripción, la cantidad de mensajeros y de la proteína SP-A por un factor de 5. Sobre los glucocorticoides los resultados son muy contradictorios. Se ha localizado en el promotor del gen de la SP-A un elemento de regulación por glucocorticoides (GRE) putativo (Lacaze-Masmonteil *et al.*, 1992). Su efecto sobre la expresión del gen de SP-A en tejido fetal puede ser estimulador o inhibitorio según la especie, las concentraciones utilizadas y la duración del tratamiento (Post y Smith, 1992).

# Planteamiento e hipótesis de trabajo

Se sabe que la administración de glucocorticoides (GC), como la dexametasona, en la hembra preñada acelera la maduración pulmonar de los fetos. El mismo tratamiento administrado a la mujer embarazada en riesgo de parto prematuro, permite reducir la frecuencia de la enfermedad de membranas hialinas (EMH) en alrededor un 50% (Ballard y Ballard, 1992). Recientemente se demostró que un tratamiento conjunto de GC con hormona liberadora de tirotropina (TRH), no sólo reduce la frecuencia de la EMH, sino que a su vez reduce la incidencia de una enfermedad secundaria y crónica llamada displasia broncopulmonar (Ballard *et al.*, 1992).

Se conoce, además, que la administración de glucocorticoides aumenta la maduración pulmonar y la síntesis de surfactante y que el tratamiento que asocia GC con TRH tiene un efecto sinérgico tanto en la maduración morfológica como funcional. Como ya se analizó en la introducción de esta tesis, la maduración funcional del pulmón requiere de la síntesis y secreción de un surfactante adecuado tanto en cantidad como en composición. Dado que la síntesis de la SP-A parece ser un factor determinante en esta maduración, la hipótesis propuesta es que los GC y el TRH participan en la regulación de la aparición y síntesis de la SP-A.

Por todo lo anterior y con el fin de corroborar la hipótesis los objetivos de la tesis fueron:

- 1) Analizar la aparición y curso temporal de la SP-A durante el desarrollo, para poder
- 2) Analizar si la administración de CG y TRH en una etapa precoz del desarrollo pulmonar puede inducir un aumento en la síntesis de la proteína SP-A
- 3) Evaluar si el efecto observado con TRH, podría estar mediado por su acción de liberación de hormonas tiroideas
- 4) Analizar de manera más específica, si la regulación es a nivel transcripcional o postranscripcional

# Material y Métodos

Como modelo experimental escogimos la rata pues disponíamos tanto de las sondas de ADNc y oligonucleótidos específicos para el análisis de la expresión del gen, como de anticuerpos contra la proteína para la cuantificación de la síntesis de SP-A.

## I. Material Biológico

Se utilizaron ratas Wistar gestantes, y se extrajeron los pulmones fetales de ambos sexos de 14 a 21 días de gestación. Asimismo, como controles se utilizaron pulmón, duodeno e hígado de ratas adultas. Para cada edad y tratamiento se extrajeron las proteínas totales y los ARN totales.

## II. Protocolo experimental

### a. Ontogenia

Para determinar la ontogenia de la SP-A normal durante el desarrollo fetal se sacrificaron ratas a los días 17, 18, 19, 20 Y 21 días de gestación. Se extrajeron los pulmones fetales de ambos sexos de dos camadas por día, y se analizó la cantidad de proteína por Western Blot. No consideramos hacer un análisis separado de la respuesta por machos o hembras. Además, se ha demostrado que la respuesta de la síntesis de las proteínas específicas del surfactante al tratamiento con dexametasona es igual en ambos sexos (Schellhase *et al.*, 1991).

### b. Tratamientos hormonales de los animales

Con el propósito de analizar el efecto de los glucocorticoides, TRH y T3 en la regulación precoz de la SP-A en fetos, se trataron ratas gestantes con las respectivas hormonas a partir del día 14 de gestación. Para analizar el efecto de los glucocorticoides se utilizó la dexametasona (Dex), un esteroide sintético que se sabe resiste la oxidación de la placenta, a diferencia del cortisol que es un glucocorticoide endógeno. Las ratas se sacrificaron el día 17, y se extrajeron los

pulmones de los fetos de dos camadas en conjunto para extraer los ARN totales y las proteínas. El análisis que se hizo fue cualitativo, en el sentido que nos interesó hacer una comparación, entre los diferentes tratamientos, de los niveles tanto de proteína SP-A como de su mensajero, más que una cuantificación exacta de las cantidades presentes.

Se trataron seis pares de ratas gestantes con las siguientes hormonas:

1. solución salina isotónica i.v. días 14, 15 y 16 (grupo control).
2. dexametasona (0,2 mg/kg s.c.) días 14, 15 y 16.
3. TRH (0.05 mg/kg s.c.) días 15 y 16, suero fisiológico i.v. día 14.
4. dexametasona (0.2 mg/kg s.c.) días 14, 15 y 16, TRH (0.05 mg/kg s.c.) días 15 y 16.
5. T3 (0.5 mg/kg i.v.) días 15 y 16, suero fisiológico i.v. día 14.
6. dexametasona (0.2 mg/kg s.c.) días 14, 15 y 16 , T3 (0.5 mg/kg i.v.) días 15 y 16

Las hormonas y la solución salina se administraron en un volumen de 250  $\mu$ l. La cantidad de proteína se analizó por Western Blot. La cantidad de ARNm de SP-A se analizó por medio de RT-PCR cuantitativa (transcripción inversa de los ARNm en ADNc seguida de una amplificación por PCR).

### **III. Análisis de la proteína SP-A (según método de Laemmli y Favre, 1973).**

#### **a. Preparación de la proteína**

El tejido pulmonar fetal se pesó y se homogeneizó en el Polytron en 20 volúmenes de solución de Tris-HCl 125mM pH 6.8, glicerol 15%, SDS 4% y  $\beta$ -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol. De esta manera las diferentes muestras de proteína quedan diluidas a la misma concentración y no es necesario hacer una determinación por Lowry o Bradford. Después se pasó por una jeringa para romper el ADN. Se incubó durante 5 min. en agua hirviendo. 10  $\mu$ l de muestra se depositaron en un gel de acrilamida de 15% para el análisis ontogenético, y de 12% para el análisis de los experimentos con las hormonas, para mejorar la resolución.

## b. Western Blot

Para separar las proteínas según su peso molecular se llevó a cabo una electroforesis en condiciones desnaturizantes, en un gel de acrilamida de 15% o 12% según el experimento (ver párrafo anterior), SDS 0.1%, Tris-HCl 0.4 M pH 8.8, persulfato de amonio 0.1% y Temed 0.04%. Sobre el gel de migración se preparó un segundo gel, para concentrar las proteínas en el límite de ambos geles, antes de comenzar su separación. Este gel de concentración es de acrilamida 4%, SDS 0.1%, Tris-HCl 0.04 M pH 6.8, persulfato de amonio 0.08% y Temed 0.08%. La migración se llevó a cabo a una intensidad constante de 15 mA, en una solución de glicina 1.1%, SDS 0.1% y Tris 0.6%. El frente de la migración se siguió con el azul de bromofenol. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell, 0.1 $\mu$ m) en una cámara de transferencia semi-seca (Pharmacia), en un artiguador de transferencia (glicina 14.4%, Tris 0.3% y SDS 0.05%) a una corriente de 90 mA durante aprox. una hora.

Una vez hecha la transferencia, se incubó la membrana durante una hora en TBS-A (5% albúmina bovina (BSA), Tris-HCl 100 mM a pH 8.0, NaCl 1.5 M, Tween 20 0.5% y leche descremada 5%) para saturar todos los sitios libres, y así evitar que los anticuerpos se fijaran de manera no específica. Después se incubó la membrana a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo específico. Para ésto se utilizó un anticuerpo policlonal específico contra SP-A (dil. 1:1000) hecho en cobayo y donado por el grupo de J.M. Whittsett (Childrens Hospital Research Foundation, Cincinnati, USA). Después se incubó la membrana con un segundo anticuerpo anti-cobayo acoplado a la peroxidasa (dil. 1:1000), durante 45 min. La unión se reveló mediante una reacción quimioluminiscente con un estuche ECL (Enhanced Luminescence, Amersham). La membrana se lavó entre cada incubación en TBS-T (Tris-HCl 100 mM a pH 8.0, NaCl 1.5 M, Tween 20 0.5%) para quitar el excedente de anticuerpo. La especificidad del marcaje se realizó utilizando como primer anticuerpo un suero de cobayo preinmune.

Como control de que los cambios observados en las cantidades de SP-A no se debían a un cambio en la cantidad de la proteína presente en las muestras, siempre se hicieron dos geles, y uno de ellos se tiñó con azul de coomasie para poder hacer una comparación de concentraciones.

#### **IV. Análisis de la expresión**

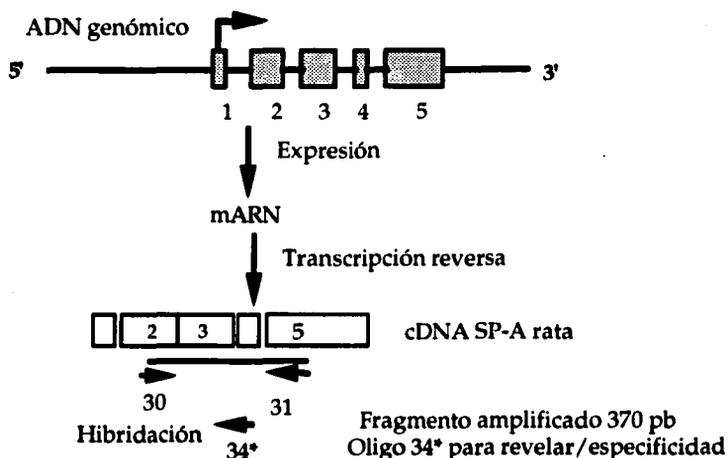
##### **a. Preparación y purificación de los ARN totales (según método de Chomczynski y Sacchi, 1987)**

Se homogeneiza el tejido pulmonar fetal en el Polytron en una solución de tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7, 0,5% sarcosil, 0.1 M 2-β mercaptoetanol. Se le agregó un volumen de fenol saturado en agua y 1/5 de volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1). Se centrifugó a 13 000 r.p.m. a 4°C durante una hora. Se recuperó el ARN que se encuentra en la fase acuosa, (el ADN se encuentra en la interfase). Se precipitó con isopropanol, se resuspendió en la solución de tiocianato y se volvió a precipitar. El paquete se lavó con etanol al 75%, se secó y se resuspendió en agua esterilizada. Los ARN purificados se guardaron a -80°C.

##### **b. Cuantificación de los transcritos de SP-A por RT-PCR**

*(Reverse transcription- polymerase chain reaction según Noonan, 1988)*

Se realizó la transcripción reversa de 2 µg ARN totales a ADNc utilizando como cebadores para la polimerasa reversa aislada del virus murino de Moloney (Gibco, BRL), 200 pmoles de hexanucleótidos aleatorios (Amersham). Posteriormente se amplificó el ADNc de SP-A específicamente por PCR. Para esto se utilizaron un par de oligonucleótidos de SP-A localizados en exones diferentes (ver figura 3) lo que permitió distinguir la amplificación del ADNc del posible ADN genómico contaminante. Para poder hacer una comparación cuantitativa entre los tratamientos, se utilizó como control interno la amplificación simultánea de los transcritos de la β-actina, que se sabe, no cambian con los tratamientos hormonales. Los oligonucleótidos específicos para la amplificación de la β-actina (β5' y β3') de rata se fabricaron según la secuencia publicada por Nudel *et al.* en 1983. La secuencia de β5' localizado en el primer exón es 5' CGTGGGCCCGCCCTAGGCACCA 3' y la secuencia de β3' localizada en el segundo exón es 5' CCCCCCTGAACCCTAAGGCCAA 3'.



**Figura 3. Localización de los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR.** La figura muestra un esquema del gen SP-A de rata, y la posición de los oligonucleótidos 30 (5' GGAAGCCCTGGGATCCCTGG 3') y 31 (5' CAGTCAACTTTGATACAATA 3') que se utilizaron como cebadores para los ciclos de amplificación. Para confirmar la especificidad de la amplificación se utilizó el oligo 34 (5' CCTGGTGCACCTGGAGAA 3') radiomarcado. La secuencia de la SP-A de rata se tomó de Sano *et al.*, 1987).

Después de desnaturalizar el ADNc durante 5 minutos a 94°C, se inició la amplificación. Cada ciclo constó de una fase de desnaturalización (94°C, 30 segundos), una fase de hibridación tomando en cuenta la T<sub>m</sub> de los oligonucleótidos utilizados (56°C, 30 segundos) y una fase de elongación (72°C, 1 minuto). Partiendo de un volumen total de 100 µl, se inició la amplificación y se tomaron alícuotas de 10 µl a 17, 20, 23 y 25 ciclos, para asegurar estar en la fase exponencial de la curva de amplificación.

Los productos de la amplificación se depositaron en un gel de agarosa NuSieve al 3% y se sometieron a una electroforesis en un amortiguador de TBE 1x. Después se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon en condiciones desnaturalizantes (NaOH 0.4 M). Para revelar el resultado y estar seguros de la especificidad de la amplificación, se realizó una hibridación con

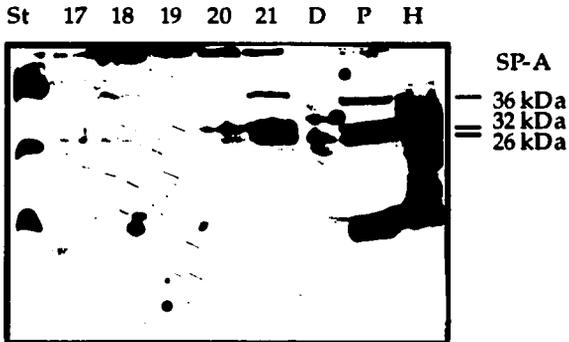
un oligonucleótido interno (ver fig. 3 para SP-A) radiomarcado con  $\gamma^{32}\text{P}$  ATP (3000 Ci/mmol (Amersham)) en el extremo 5' con la polinucleótido cinasa T4, durante 8 horas a 42°C, en una solución 5x SSC- 5x Denhart- 0.5% SDS, utilizando como competidor no específico ARN de E. Coli. A falta de un oligo interno para la  $\beta$ -actina se utilizó el oligo  $\beta 3$  radiomarcado para revelar la especificidad. La membrana se lavó posteriormente en condiciones astringentes crecientes (SDS 0.1% SSC 2x hasta SDS 0.1% SSC 0.5x) a 42°C, durante 15 min. Después de cada lavado, se monitoreó la limpieza de la membrana por medio del contador Geiger.

# Resultados

## I. Análisis de la proteína SP-A por Western Blot

### a. Ontogenia

El Western Blot de la figura 4 muestra la presencia de la SP-A en pulmones fetales de rata en un estudio ontogenético que incluyó los días 17, 18, 19, 20 y 21 de la gestación. La proteína se detecta claramente a partir del día 20, y al último día de la gestación (día 21), hay un incremento considerable. Se registran las tres bandas características de las diferentes formas de glicosilación de los monómeros de la SP-A, es decir, de 26, 32 y 36 kDa respectivamente. Es interesante notar que en el día 20 de la gestación, se ve principalmente la banda de 32 kDa, y que para el día 21 de gestación se detecta el mismo perfil de glicosilación que en el adulto.

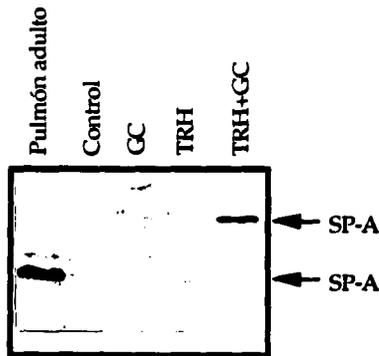


**Figura 4. Ontogenia de la proteína SP-A en rata.**

La figura muestra un Western Blot (gel de 15%) revelado con un anticuerpo específico contra la SP-A. Los carriles sucesivos contienen 10  $\mu$ l de homogeneizado de los pulmones fetales de rata a los 17, 18, 19, 20 y 21 días de gestación. Los controles negativos son duodeno (D) e hígado (H) adultos. El control positivo es pulmón adulto (P). (St) es el estándar de corrimiento. Las bandas de 26, 32 y 36 kDa. concuerdan con otros reportes (Whitsett *et al.*, 1985a, Floros *et al.*, 1986)

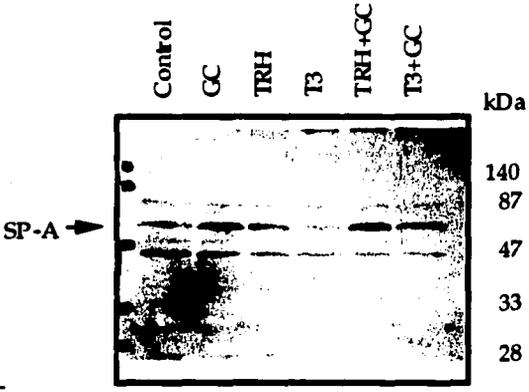
## b. Regulación hormonal

En la figura 5 se muestran los resultados del análisis cualitativo de los tratamientos con glucocorticoides (GC) y la hormona liberadora de tirotropina (TRH) sobre la cantidad de la SP-A en los pulmones fetales. Observamos un efecto sinérgico de la TRH con glucocorticoides en la acumulación de SP-A, mientras que el efecto de cada hormona por separado resulta en un pequeño aumento respecto al control. La forma de SP-A revelada por el anticuerpo corresponde a una forma dimérica de alrededor de 66 kDa. y no se ven las tres bandas características monoméricas detectadas durante el estudio ontogénico. El control de que se trata de una forma de SP-A se hizo por medio de un Western Blot de dos dimensiones (resultados no publicados obtenidos por Sandrine Rubio en París 7).



**Figura 5. Efecto de GC y TRH sobre la cantidad de SP-A.** Este Western Blot (gel de 12%) muestra la comparación de cantidad de SP-A en pulmones fetales de rata de 17 días de gestación (10  $\mu$ l de homogeneizado por carril), en respuesta al tratamiento de las madres con GC y/o TRH durante los días 14, 15 y 16 de gestación. El grupo control corresponde al tratamiento de las ratas gestantes durante el mismo periodo con solución salina. Como control positivo se utilizó pulmón de rata adulta en el que se distinguen las tres formas monoméricas. La forma dimérica ha sido reportada en rata (Weaver *et al.*, 1985).

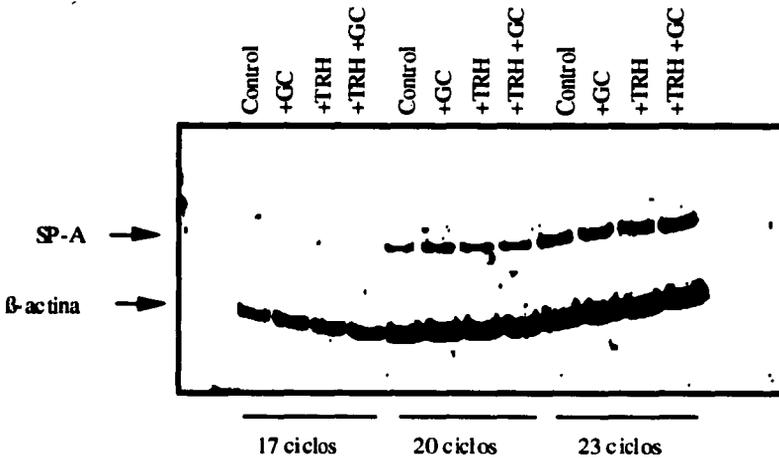
Otro grupo de experimentos fue realizado para analizar si el efecto de la TRH en la cantidad de SP-A era a través de un aumento en la triiodotironina (T3). Los resultados de la comparación de la cantidad de SP-A presente en los pulmones fatales después de los distintos tratamientos hormonales, se muestran en la figura 6. Se observa apenas un sinergismo cuando se asocian los glucocorticoides con la TRH comparado al efecto de cada uno por separado. El efecto fue mucho menor que en el experimento anterior. Los pulmones fatales provenientes de madres tratadas con la TRH o con los GC por separado, muestran un incremento en la proteína SP-A con respecto al control. El tratamiento con T3, en cambio, parece no tener ningún efecto. Cuando se asocian los glucocorticoides y la T3 hay un incremento en la cantidad de SP-A parecido al efecto de los glucocorticoides solos. Una vez más, observamos la banda dimérica de 66 kDa, y no las formas monoméricas con diferentes grados de glicosilación.



**Figura 6. Efecto de GC, TRH y T3 sobre la cantidad de SP-A.** Este Western Blot (gel 12%) muestra la cantidad de SP-A en pulmones fatales de rata de 17 días de gestación (10 µl de homogeneizado por carril), en respuesta al tratamiento de las madres con GC, TRH, T3, GC+TRH y GC+T3 durante los días 14, 15 y 16 de gestación. El grupo control corresponde al tratamiento de las ratas gestantes con solución salina.

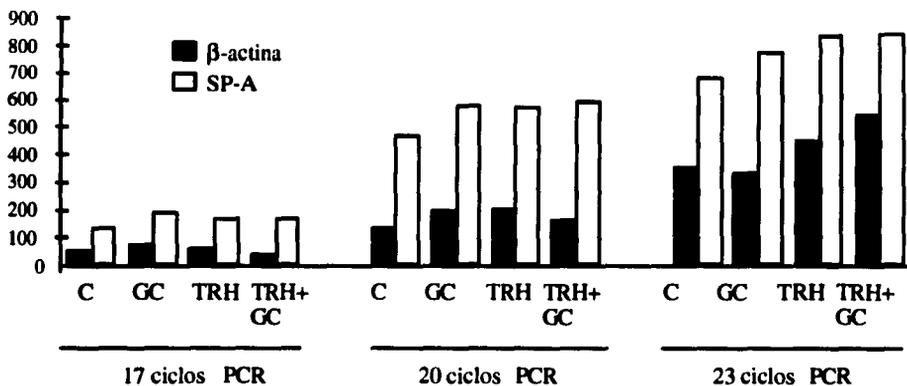
## II. Análisis de los transcritos de SP-A por RT-PCR

Con el fin de analizar el efecto de los tratamientos hormonales en la expresión del gen SP-A y evaluar si el aumento en la proteína SP-A se debía a un aumento en la cantidad de los mensajeros, se cuantificaron los transcritos de SP-A por RT-PCR (transcripción inversa de los ARNm en ADNc seguida de una amplificación por PCR). En experimentos preliminares observamos que los mensajeros de SP-A en esta edad son indetectables por métodos directos como el Northern Blot de ARNm totales. Por esta razón se utilizó para este estudio la RT-PCR. Como control interno y para poder hacer una comparación entre un tratamiento y otro, se utilizó la coamplificación de la  $\beta$ -actina, que se sabe, no cambia con los tratamientos hormonales. Los resultados del análisis de las distintas combinaciones hormonales se muestran en las figuras 7 y 8 en las que se ve que la cantidad de transcritos de SP-A en los pulmones fetales de 17 días no varía después de haber recibido los diferentes tratamientos hormonales.



**Figura 7. Análisis de la cantidad de transcritos de SP-A en pulmones fetales de 17 días por RT-PCR.** Cuantificación de los transcritos de SP-A después del tratamiento hormonal de las madres a los días 14, 15 y 16 de gestación. Como control interno se coamplificó la  $\beta$ -actina. En el grupo control se reemplazaron las hormonas por solución salina. Este Southern muestra la comparación de los productos de amplificación de los diferentes tratamientos a 17, 20 y 23 ciclos de PCR.

La comparación de la intensidad de las bandas de los mensajeros de SP-A respecto a los de la  $\beta$ -actina indica que la cantidad de ARNm de SP-A al día 17 no varía ni de un tratamiento a otro, ni con respecto al control. El incremento proporcional de producto al incremento en número de ciclos nos indica que la PCR a 17 ciclos no estaba saturada y por lo tanto los datos son confiables (fig. 7). El resultado de las autoradiografías se corroboró a través de la cuantificación de una de las imágenes por medio del Phosphoimager (fig. 8).



**Figura 8.** Cuantificación y correlación entre los transcritos de SP-A y  $\beta$ -actina en pulmones fetales de 17 días por Phosphoimager. El phosphoimager cuantifica la radiación del  $^{32}\text{P}$  del  $\gamma\text{ATP}$  de los oligonucleótidos marcados que se utilizaron para revelar el Southern de los productos de amplificación. La radiación es proporcional a la cantidad de mensajeros. Las unidades son arbitrarias.

## Discusión

El análisis por Western Blot de la proteína SP-A en pulmones fetales de rata durante el desarrollo, revela claramente la presencia de ésta a partir del día 20 de la gestación, con un marcado incremento al día 21. Sin embargo, la proteína SP-A ha sido detectada por ELISA desde el día 18 de la gestación (Schellhase *et al.*, 1989). El aumento marcado que observamos en la concentración de la proteína durante los días 20 y 21 de la gestación, coinciden con el patrón normal de ontogenia de la SP-A. Este incremento marcado al final de la gestación es común a todas las especies estudiadas (conejo (Boggaram *et al.*, 1988); humano (Ballard *et al.*, 1986)), y coincide con un aumento en los glucocorticoides endógenos (Cockshut y Possmayer, 1992).

En el análisis por Western Blot se detectaron las tres diferentes formas de monómeros de SP-A consideradas típicas en rata (26, 32 y 36 kDa) reportadas anteriormente (Whitsett *et al.*, 1985b y Floros *et al.*, 1986). Se ha demostrado que las bandas de 32 y 36 kDa reconocidas por el anticuerpo contra SP-A, corresponden a diferentes formas de glicosilación del producto primario de la traducción que es de 26 kDa (Whitsett *et al.*, 1985b). Las diferentes formas de glicosilación del monómero de SP-A han sido también reportadas en otras especies (conejo (NG *et al.*, 1983) humano (Floros *et al.*, 1985)). En acuerdo con nuestras observaciones, se ha descrito que el patrón de glicosilación cambia durante el desarrollo, favoreciendo las especies moleculares más grandes hacia finales de la gestación (Whitsett *et al.*, 1985a). Este aumento en las formas glicosiladas de la SP-A al final de la gestación sugiere que no sólo la síntesis de la proteína está regulada durante el desarrollo, sino que también su maduración lo está, a través de las modificaciones postraduccionales (Snyder y Mendelson, 1987). En este sentido es importante notar que estos autores siempre encontraron el patrón maduro de la proteína cuando analizaron la SP-A en las inclusiones lamelares, mientras que el análisis de homogeneizados de pulmón fetal a diferentes edades reveló cambios en las proporciones moleculares, como ya se describió.

En el análisis de la respuesta a los tratamientos hormonales en el día 17 de la gestación, encontramos una forma dimérica de la SP-A y no las tres bandas características reportadas generalmente y que observamos durante el análisis ontogenético. Esta forma molecular de la SP-A ha sido reportada con anterioridad en los artículos de caracterización de SP-A durante el desarrollo fetal (Snyder y Mendelson, 1987; Weaver *et al.*, 1985), pero no se le ha tomado en cuenta puesto que las formas con el patrón adulto de glicosilación, que son mucho más abundantes hacia finales de la gestación, son las que se han considerado como relevantes. Cabe la posibilidad que en esta etapa del desarrollo aún no esté maduro el aparato de glicosilación de los PNII, y por lo tanto se trate de SP-A no glicosilada. Esto podría explicar que se agregue en dímeros, como se ha observado para otras proteínas (Gesundheit y Weintraub, 1993). Una manera de probar si la proteína está glicosilada sería mediante el uso de lectinas, proteínas que se unen de manera específica a los carbohidratos. Curiosamente, la forma dimérica de la SP-A también ha sido detectada abundantemente en una patología llamada proteinosis alveolar (Ross *et al.*, 1987), una enfermedad caracterizada por la acumulación de un material parecido al surfactante, cuya etiología se desconoce. Se ha visto que los dímeros están estabilizados por uniones covalentes tanto sulfidriilo-dependientes como independientes (Weaver, 1988). El hecho de que esa forma dimérica no haya aparecido durante el análisis ontogenético se puede deber a que el tiempo de exposición del revelado fue mucho menor en el análisis ontogenético que el que se utilizó en los experimentos posteriores. Además, se buscaba revelar la presencia de los monómeros, y no se repitió el estudio después de que encontramos la forma dimérica.

Los resultados del efecto de los tratamiento hormonales en ratas a los días 14, 15 y 16 de gestación, indican un aumento en la cantidad de SP-A presente en el pulmón fetal a los 17 días de la gestación con glucocorticoides (0.2 mg/kg), y que la administración conjunta de GC + TRH (0.05 mg/kg) tiene un efecto sinérgico sobre la cantidad de proteína. En contraste, el tratamiento con T3 (0.5 mg/kg), sola o en conjunción con GC, no tiene ningún efecto sobre la cantidad de SP-A. La diferencia en la magnitud de la respuesta al tratamiento conjunto de GC y TRH, se puede deber a varios factores. Aunque en ambos casos se inyectaron los animales a la misma hora y estaban sometidos a la misma alimentación y ciclos de luz, puede haber otros factores ambientales que hayan causado un estado diferente en los animales. Se sabe

que en respuesta al stress se liberan glucocorticoides y esto podría reflejarse en la respuesta. En ambos casos los sacrificios de los animales se empezaban 24 h después del último tratamiento, entre los primeros animales hasta los últimos habían transcurrido varias horas y no se cuidó el orden del sacrificio.

Observaciones hechas en animales adrenalectomizados e hipofisectomizados y experimentos de restitución muestran que la maduración pulmonar requiere de la acción en conjunto de varias hormonas y no sólo del cortisol (Liggins *et al.*, 1981; 1985). El hecho de que el tratamiento de TRH con GC tenga un efecto sinérgico sobre la cantidad de la SP-A, confirma esta idea. El TRH es un tripéptido que cruza la placenta y estimula la producción de TSH por la pituitaria fetal, quien a su vez estimula la producción de T3 fetal endógena. El TRH a su vez estimula la producción de prolactina (PRL) tanto en fetos como en recién nacidos (Ballard y Ballard, 1992). Nuestros resultados muestran que el efecto del TRH sobre la SP-A no está mediado por T3 puesto que al administrar a las ratas gestantes T3 solo, no vemos ningún efecto sobre la cantidad de SP-A. Nuestros resultados concuerdan con otros reportes que indican que T3 no tiene ningún efecto en la maduración bioquímica del pulmón (síntesis de proteínas asociadas al surfactante), más sí sobre la maduración morfológica (Post y Smith, 1992; Nichols *et al.*, 1990). Se ha observado un efecto permisivo y sinérgico de GC en este respecto, por lo que nuestros resultados no excluyen que las hormonas tiroideas liberadas por el tratamiento con TRH contribuyan al mejoramiento de la enfermedad de membranas hialinas (EMH), pero su efecto no es a través de la estimulación de las proteínas del surfactante.

El efecto de la TRH que nosotros observamos podría estar mediado por la TRH directamente, o por el efecto que esta hormona tiene sobre la PRL. Sin embargo, hasta ahora no se ha estudiado el efecto de la TRH sobre la expresión de las proteínas asociadas al surfactante ni *in vivo* ni *in vitro*. En lo que concierne la PRL, tampoco se ha estudiado su efecto sobre las proteínas del surfactante, pero se sabe que la PRL tiene un efecto permisivo para la acción de los GC, en etapas donde el pulmón no responde a un tratamiento con éstos (p. ej. ovejas (Schellenberg *et al.*, 1988)). El hecho de que haya un efecto sinérgico o un efecto permisivo, apoya la hipótesis que el estado fisiológico específico determina la respuesta a un tratamiento hormonal (Schellenberg *et al.*, 1988).

En cuanto al nivel de regulación de la expresión de la SP-A, nuestros resultados no mostraron cambios en los niveles de los ARNm de SP-A bajo ninguno de los tratamientos hormonales, por lo que no se puede establecer una correspondencia entre los niveles de la proteína SP-A y el nivel de transcripción de sus mensajeros. Puesto que el método utilizado es muy sensible, estas observaciones no obedecen a razones técnicas. Esto sugiere que el efecto del tratamiento hormonal observado, es a nivel postranscripcional. Estos resultados muestran ciertas incongruencias respecto a otros autores, pues Schellhase y Shannon han observado que el tratamiento de ratas gestantes con dexametasona (Dex) (1 mg/kg) durante el mismo período (días 14,15 y 16 de la gestación) resulta en aumento precoz tanto de proteína como la aparición del ARNm en los pulmones fetales, sugiriendo un efecto a nivel transcripcional (Schellhase y Shannon, 1991), mientras que Phelps *et al.* no reportaron ningún efecto ni en la cantidad de proteína ni en la cantidad de ARNm, al administrar a ratas antes de 19 días de gestación una dosis de Dex (0.2 mg/kg) 24h antes del sacrificio (Phelps *et al.*, 1987), mientras que el mismo tratamiento al día 19 resulta en un aumento tanto de la proteína, como del ARNm. Por lo tanto, estos resultados en conjunto hacen pensar que la sensibilidad a un tratamiento con GC, y el tipo de regulación ejercido por éstos sobre la expresión de la SP-A, está sujeto a la dosis, duración del tratamiento, y a la edad. Es importante recalcar que el período fetal no es un estado estable, sino una sucesión de períodos, durante los cuales las respuestas a los estímulos varían notablemente. Se han reportado varios efectos de los GC sobre la regulación de la SP-A *in vivo*. Se sabe que los GC estimulan la transcripción del gen de SP-A (conejo (Boggaram *et al.*, 1988), rata (Phelps *et al.*, 1987)), a un nivel postranscripcional, se ha visto que a altas dosis los GC causan un decremento en la estabilidad de los ARNm y también pueden influenciar su traducibilidad (conejo (Boggaram *et al.*, 1989)) y a nivel postraduccional, se ha reportado un decremento en la proteína sin cambios en los mensajeros en animales adultos adrenalectomizados (rata (Fisher *et al.*, 1991)). Pudiera ser que cada una de estas formas de regulación contribuya a la regulación global de la SP-A en diferentes condiciones fisiológicas, y así se logre una plasticidad de respuesta a diferentes estímulos a los que puede estar sujeto el pulmón.

El aumento de la proteína sin un cambio en la cantidad de ARNm que observamos se puede deber a un aumento en la eficiencia de traducción de los mensajeros, o a cambios postraduccionales en el procesamiento o degradación de la SP-A (Shellhase y Shannon, 1991). Mendelson *et al.*, encontraron que los GC aumentan la traducción de los ARNm de SP-A en conejo. Este efecto de los GC en la regulación de la traducción de mensajeros específicos, ha sido descrito para varias proteínas ((glutamina sintetasa (Sarantos *et al.*, 1994) , apopolipoproteína (Strobl *et al.*, 1992) ).

Otra posibilidad para explicar la acumulación de la proteína SP-A es que haya un cambio en la tasa de degradación de la proteína. Esto se puede deber a un cambio en la localización de la SP-A, mediado por las hormonas. Como ya se dijo antes, la SP-A se encuentra en diferentes pozas (vesículas, inclusiones lamelares, mielina tubular y espacio alveolar). Se ha descrito que el TRH y el cortisol aumentan la cantidad de fosfolípidos en las formas intracelulares (Oulton *et al.*, 1989), y se puede pensar un efecto similar para la SP-A. Hasta ahora no se ha estudiado la posibilidad de que el tratamiento hormonal favorezca modificaciones postraduccionales en la SP-A que la hagan más estable y que aumente su vida media. Este tipo de regulación también ha sido descrito en otros sistemas (Malbon *et al.*, 1990; Receptor a GC (McIntyre y Samuels, 1984) ).

Se ha propuesto que el efecto de los glucocorticoides sobre la producción del surfactante es a través del Fibroblast Pneumocyte Factor (FPF) liberado por los fibroblastos estimulados (Post y Smith, 1984 y Post y Smith, 1992). Sin embargo, existen varias evidencias en apoyo a un efecto directo de los GC sobre la síntesis de las proteínas asociadas al surfactante (O'Reilly *et al.*, 1988, O'Reilly *et al.*, 1989 y Fisher *et al.*, 1991). Estos trabajos establecen que la síntesis de proteínas del surfactante y su regulación no necesitan de otro tipo celular. Además el promotor de SP-A contiene un elemento de respuesta a GC (GRE), aunque no se ha demostrado su funcionalidad. Asimismo, SP-B y SP-C contienen un GRE en sus promotores. El efecto de la TRH podría estar mediado por un incremento o la estimulación de los receptores a GC.

No podemos excluir la posibilidad de que la SP-A que observamos sea producida por las células bronquiales de Clara (Auten *et al.*, 1990), puesto que nuestras mediciones se hicieron en homogeneizados de pulmón y no podemos distinguir la procedencia de la SP-A. En este tipo celular se ha detectado la presencia de SP-B y SP-A y sus precursores desde etapas muy tempranas del desarrollo fetal (Khooret *et al.*, 1991 y Otto-Verbene y Ten Have Opbroek, 1990). No se sabe si la SP-A es procesada de manera igual que en los pneumocitos, pero se han encontrado vesículas secretorias con SP-A y SP-B (Walker *et al.*, 1986). Se ha visto que la secreción de estas vesículas está regulada de manera específica (Massaro *et al.*, 1981) y que los GC pueden modular la producción de las proteínas en este tipo celular (Phelps y Floros, 1991 y O'Reilly *et al.*, 1988).

Es importante mencionar que un tratamiento hormonal en esta etapa del desarrollo no permite estimular de manera significativa la cantidad de SP-A, ya que las cantidades que encontramos aún después del tratamiento hormonal, es muy inferior a la cantidad detectada por Western Blot al final de la gestación. Como ya se discutió antes, la etapa del desarrollo determina la respuesta a un tratamiento hormonal. Por este motivo sería conveniente repetir los experimentos a una edad posterior para poder analizar de manera óptima la acción de la regulación hormonal en la expresión de la proteína SP-A.

En conjunto nuestros datos indican que la estimulación hormonal en la etapa glandular, no induce la síntesis de la proteína SPA, pero permiten sugerir que independientemente del tipo celular que produzca la SP-A (PNII o Células de Clara), los glucocorticoides y el TRH participan en la regulación de la síntesis de la SP-A. El nivel de la regulación de la proteína está determinado por la edad a la que se administra el tratamiento, y existen varios niveles de regulación de las hormonas sobre la síntesis de la SP-A.

# Conclusiones

1) Ontogenia. Detectamos los tres monómeros característicos de SP-A, correspondientes a diferentes grados de glicosilación, a partir del día 20 de la gestación y un aumento al día 21 de la gestación. Las proporciones de los diferentes monómeros glicosilados cambian durante el desarrollo.

2) La proteína detectada durante el día 17 de la gestación después de los tratamientos hormonales, corresponde a un dímero de la SP-A. El tratamiento hormonal no favoreció la producción del patrón de SP-A maduro.

3) El tratamiento hormonal de ratas gestantes con GC (0.2 mg/kg) y TRH (0.05mg/kg) durante los días 14,15 y 16 de la gestación, revelaron un efecto sinérgico sobre la cantidad de SP-A presente en los pulmones fetales. Este es el primer reporte sobre el efecto de la TRH sobre la proteína SP-A. El tratamiento de T3 (0.5mg/kg) no tuvo ningún efecto cuando se administró sólo o en conjunción con CG.

4) Los cambios observados en la cantidad de SP-A no corresponden a un cambio en la cantidad de ARNm de SP-A, lo que sugiere que las hormonas ejercen su efecto a nivel postranscripcional de la SP-A en esta edad.

5) Finalmente, la cantidad de SP-A que observamos en esta etapa es mucho menor que la que se necesita para un efecto fisiológico, puesto que los niveles observados son muy inferiores a los detectados en el Western Blot de ontogenia al día 21 de la gestación. La edad del tratamiento es un factor determinante para obtener una respuesta óptima al tratamiento hormonal.

# Bibliografia

Anderson D.K. (1993) Mechanisms of respiration en: *Physiology*. Sperekelakis N. and R.D. Banks Eds. Boston: Little, Brown and Co., 415-433.

Askin F.B. and C. Kuhn (1971) The cellular origin of pulmonary surfactant. *Lab. Invest.* **25**: 260-267.

Auten R.L., Watkins D.L., Shapiro D.L. and S. Horowitz (1990) Surfactant protein A (SP-A) is synthesized in airway cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**: 491-496.

Ballard P. (1989) Hormonal regulation of pulmonary surfactant. *Endocrine Reviews* **10**: 165-180.

Ballard R.A. and P.L. Ballard (1992) Prevention of neonatal respiratory distress syndrome by pharmacological methods en: *Pulmonary Surfactant: from molecular biology to clinical aspects*. Amsterdam: Robertson B., Van Golde L.M.G. and J.J. Batenburg Eds. Elsevier Science Publisher, 539-560.

Ballard R.A., Ballard P.L., Creasy R.K., Padbury J., Polk D.H., Bracken M., Moya F.R., Gross I. and the TRH study group (1992) Respiratory disease in very-low birthweight infants after prenatal thyrotropin-releasing hormone and glucocorticoid. *Lancet* **339**: 510-515.

Boggaram V., Qing K. and C.R. Mendelson (1988) The major apoprotein of rabbit pulmonary surfactant: elucidation of primary sequence and cAMP and developmental regulation. *J. Biol. Chem.* **263**: 2939-2947.

Boggaram V., Smith M.E. and C.R. Mendelson (1989) Regulation of expression of the gene encoding the major surfactant protein (SP-A) in human fetal lung in vitro. Disparate effects of glucocorticoids on transcription and on mRNA stability. *J. Biol. Chem.* **264**: 11421-11427.

Boggaram V., Smith M.E. and C.R. Mendelson (1991) Posttranscriptional regulation of surfactant protein A messenger RNA in human fetal lung in vitro by glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* **5**: 414-423.

Bourbon J.R. and C. Fraslon (1991) Developmental aspects of the alveolar epithelium and the pulmonary surfactant system, en: *Pulmonary surfactant: biochemical, functional, regulatory and clinical aspects*. Boca Raton, FL: CRC Press, 257-324.

Bourbon J.R. (1991a) Comparative aspects of pulmonary surfactant, en: *Pulmonary surfactant: Biochemical, Functional, Regulatory and Clinical Concepts*. Boca Raton, FL: CRC Press, 127-144.

Bourbon J.R. (1991b) Secretion, alveolar processing, and turnover of pulmonary surfactant en: *Pulmonary surfactant: Biochemical, Functional, Regulatory and Clinical Concepts*. Boca Raton, FL: CRC Press, 146-182.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987) Single step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

Cockshut A.M. and F. Possmayer (1992) Metabolism of surfactant lipids and proteins in the developing lung, en: *Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice*. Robertson B., Van Golde L.M.G. and J.J. Batenburg Eds. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 339-378.

Cuestas R.A., Lindall A. and R.R. Engel (1976) Low thyroid hormones and respiratory distress syndrome of the newborn. *New Engl. J. Med.* **295**: 297-302.

Drickamer K., Dordal M.S. and L. Reynolds (1986) Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate recognition domains linked to collagenous tails. Complete primary structures and homology with pulmonary surfactant apoprotein. *J. Biol. Chem.* **261**: 6878-6887.

Farrell P.M., Bourbon J.R., Notter R.H., Marin L., Noguee L.M. and J.A. Whitsett (1990) Relationships among surfactant fraction lipids, proteins and biophysical properties in the developing rat lung. *Biochim. Biophys. Acta* **104**: 84-90.

Fisher J.H., Mc Cormack F., Park S.S., Shannon J.M. and T. Hofman (1991) In vivo regulation of pulmonary surfactant proteins by glucocorticoids. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **5**: 304-312.

Floros J., Phelps D.S. and H.W. Taeusch (1985) Biosynthesis and in vitro translation of the major surfactant-associated protein from human lung. *J. Biol. Chem.* **260**: 495-500.

Floros J., Phelps D.S., Kourembanas S. and H.W. Taeusch (1986) Primary translation products, biosynthesis, and tissue specificity of the major surfactant protein in rat. *J. Biol. Chem.* **15**: 828-830.

Fraslon C., Lacaze-Masmonteil T., Zupan V., Chailley-Heu B. and J.R. Bourbon (1993) Fetal rat lung type II cell differentiation in serum-free isolated cell culture: modulation and inhibition. *Am. J. Physiol.* **264**: L504-L516.

Froh D.K., Gonzales L.W. and P.L. Ballard (1991) Secretion of phosphatidylcholine (PC) and surfactant protein A (SP-A) in cultured cells of human fetal lung. *Pediatr. Res.* **29**: 331A.

Gonzalez L. and P.L. Ballard (1982) Nuclear 3,5,3' triiodothyronine receptors in the rabbit lung: characterization and developmental changes. *Endocrinology* **111**: 542-552.

Gross I. and C.M. Wilson (1982) Fetal lung in organ culture. IV. Supra-additive hormone interactions. *J. Appl. Physiol.* **52**: 1420-1425.

Gross I., Wilson C.M., Floros J. and D.W. Dynia (1989) Initiation of fetal rat lung phospholipid and surfactant-associated protein A mRNA synthesis. *Pediatr. Res.* **25**: 239-244.

Guetteri M., Marin L., Bourbon J., Dufour M.E., Rieutort M. and M. Tordet (1989) Effects of the antiglucocorticoid RU486 on the maturation of fetal rat surfactant. *Exp. Lung Res.* **5**: 151-166.

Hawgood S. and J.M. Clements (1990) Pulmonary surfactant and its apoproteins. *J. Clin. Inv.* **68**: 1-6.

Hawgood S. (1992) The hydrophilic surfactant protein SP-A: molecular biology, structure and function en: *Pulmonary Surfactant: from molecular biology to clinical aspects*. Amsterdam: Robertson B., Van Golde L.M.G. and J.J. Batenburg Eds. Elsevier Science Publisher, 33-54.

Hitchcock K.R., Harney J. and S. Riechlin (1980) Hormones and the lung. III. Thyroid hormone uptake kinetics in the perinatal lung. *Endocrinol.* **107**: 294-299.

Keough K.M. (1992) Physical chemistry of pulmonary surfactant in the terminal airspaces en: *Pulmonary Surfactant: from molecular biology to clinical aspects*. Robertson B., Van Golde L.M.G. and J.J. Batenburg Eds. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 109-164.

Khoor A., Gray M.E. and M.T. Stahlman (1991) Expression of surfactant protein A (SP-A) gene in the developing human respiratory system as detected by in situ hybridization. *Pediatr. Res.* **29**: 322A.

King R.J., Jones M.R. and P. Minoo (1989) Regulation of lung cell proliferation by polipeptide factors. *Am. J. Physiol.* **257**: L23-L38.

Kuan S.H., Rust K. and E. Crouch (1992) Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolisacharides. *J. Clin. Invest.* **90**: 97-106.

Kukasabe M., Smith B.T. and M. Post (1988) Mesenchymal induction of surfactant protein expression in rat lung epithelium. *Pedr. Res.* **23**: 246A.

Lacaze-Masmonteil T., Fraslon C., Bourbon J., Raymondjean M. and A Kahn (1992) Characterization of the rat pulmonary surfactant protein A promoter. *Eur. J. Biochem.* **206**: 613-623.

Laemmli U.K. and M. Favre(1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging effects. *J. Mol. Biol.* **80**: 575-590.

Lawson K.A. (1983) Stage specificity in the mesenchyme requirement of rodent lung epithelium in vitro: a matter of growth control? *J. Embriol. Exp. Morphol.* **74**: 183-206.

Lee S.W., Tsou A-P., Chan H., Thomas J., Petrie K., Eugui E.M. and A.C. Allison (1985) Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 $\beta$  gene and decrease stability of interleukin 1 $\beta$  mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1204-1208.

Liggins G.C. (1969) Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J. Endocrinol.* 45: 515-517.

Liggins G.C. and M.B. Howie (1972) A controlled trial of antenatal glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 59: 519-523.

Liggins G.C., Kitterman J.A., Campos G.A., Clements J.A., C.S. Forster, Lee C.H. and R.K. Creasy (1981) Pulmonary maturation in the hypophysectomised ovine fetus. *J. Dev. Physiol.* 3: 1-14.

Liggins G.C., Shellenberg J.C., Finberg K., Kitterman J.A. and C.H. Lee (1985) The effects of ACTH or cortisol on pulmonary maturation in the adrenalectomised ovine fetus. *J. Dev. Physiol.* 7: 105-111.

Malbon C.C., Haddock J.R., Rapiejko P.J., Ros M., Wang H.Y. and D.C. Watkins (1990) Regulation of transmembrane signalling elements: transcriptional, post-transcriptional and post-translational controls. *Biochem. Soc. Symp.* 56: 155-64.

Massaro G.D., Fischman C.M., Chiang M., Amado C. and D. Massaro (1981) Regulation of secretion in Clara cells. Studies using the isolation perfused lung. *J. Clin. Invest.* 67: 345-351.

McIntyre W.R. and H.H. Samuels (1985) Triamcinolone acetate regulates glucocorticoid-receptor levels by decreasing half life of the activated nuclear receptor. *J. Biol. Chem.* 260: 418-427.

McKnight G.S. and R.D. Palmiter (1979) Transcriptional regulation of the ovalbumin and conalbumin genes by steroid hormones in chick oviduct. *J. Biol. Chem.* 254: 9050-9058.

Mendelson C.R., Johnston J.M., McDonald P.C. and J.M. Snyder (1981) Multihormonal regulation of surfactant synthesis by human fetal lung in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **53**: 307-317.

NG V.L., Herndon V.L., Mendelson C.R. and J.M. Snyder (1983) Characterization of rabbit surfactant-associated proteins. *Bioch. Biophys. Acta* **754**: 218-226.

Nudel U., Zakut R., Shani M., Neuman S., Levy Z. and D. Yaffe (1983) The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic  $\beta$ -actin gene. *Nucleic Acid Res.* **11**: 1759-1771.

Nichols K.V., Floros J., Dynia D.W., Velezza S.V., Wilson C.M. and I. Gross (1990) Regulation of surfactant protein A mRNA by hormones and butyrate in cultures fetal lung. *Am. J. Physiol.* **259**: L488-L495.

O'Reilly M.A., Gazdar A.F., Morris R.E. and J.A. Whitsett (1988) Differential effects of glucocorticoid on expression of surfactant proteins in a human lung adenocarcinoma cell line. *Biochim. Biophys. Acta* **970**: 194-204.

O'Reilly M.A., Gazdar A.F., Clark J.C., Pilot M.T.J., Wert S.E., Hull W.M. and J.A. Whitsett (1989) Glucocorticoids regulate surfactant protein synthesis in a pulmonary adenocarcinoma cell line. *Am. J. Physiol.* **257**: L385-L392.

Otto-Verberne C.J.M. and A.A.W. Ten Have-Opbroek (1987) Development of the pulmonary acinus in fetal rat lung: a study based on antiserum recognizing surfactant-associated proteins. *Anat. Embryology* **175**: 356-373.

Oulton M., Rasmusson M.G., Yoon R.Y. and M. Fraser (1989) Gestation dependent effects of combined treatment of glucocorticoids and thyrotropin releasing hormone on surfactant production by fetal rabbit lung. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **160**: 961-967.

Phelps D.S., Church S., Kourembanas H.W., Taeusch H.W. and J. Floros (1987) Increases in the 35 kDa surfactant-associated protein and its mRNA following in vivo dexamethasone treatment of fetal and neonatal rats. *Electrophoresis* **8**: 235-238.

Phelps D.S. y J. Floros (1991) Dexamethasone in vivo raises surfactant protein B mRNA in alveolar and bronchiolar epithelium. *Am. J. Physiol.* **260**: L416-L452.

Possmayer F., Duwe G., Metcalfe R., Stewart De-Haan P.J., Wong C., Las Heras J. and P.G.R. Harding (1977) Cortisol induction of pulmonary maturation in the rabbit fetus. Its effects on enzymes related to phospholipid biosynthesis and on marker enzymes for subcellular organelles. *Biochem. J.* **63**: 484-494.

Possmayer F. (1988) A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**: 990-998.

Post M. and B.T. Smith (1984) Effect of fibroblast pneumocyte factor on the synthesis of surfactant phospholipids in type II cells from fetal rat lung. *Biochim. Biophys. Acta* **793**: 297-299.

Post M. and B.T. Smith (1992) Hormonal control of surfactant metabolism en: *Pulmonary Surfactant: from molecular biology to clinical aspects*. Robertson B., Van Golde L.M.G. and J.J. Batenburg Eds. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 379-459.

Rodríguez, R. (1993) Fisiología del sistema respiratorio en: *Fisiología Humana*. Ed. Tresguerres J.A.F. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana, 645-690.

Rooney S.A., Gross I. and J.B. Warshaw (1978) Thyrotropin releasing hormone stimulates surfactant secretion in the fetal rabbit. *Am. Rev. Respir. Dis.* **117**: 386-390.

Ross G.F., Ohning B.L., Tannenbaum D. and J.A. Whitsett (1987) Structural relationships of the major glycoproteins from human alveolar proteinosis surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* **911**: 294-305.

Sano K., Fisher J., Mason R.J., Kuroki Y., Schilling J., Benson B. and D. Voelker (1987) Isolation and sequence of a cDNA clone for the rat pulmonary surfactant associated protein SP-A. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **144**: 367-374.

Sarantos P., Chakrabarti R., Copeland E.M. and W.W. Souba (1994) Dexamethasone increases jejunal glutamine synthetase expression via translational regulation. *Am. J. Surg.* **167**: 8-13.

Schellenberg J.C., Liggins G.C., Manzai M., Kitterman J.A. and C.C.H. Lee (1988) Synergistic hormonal effects on lung maturation in fetal sheep. *J. Appl. Physiol.* **65**: 94-100.

Schellhase D.E., Emrie P.A., Fisher J.H. and J.M. Shannon (1989) Ontogeny of surfactant apoproteins in the rat. *Pediatr. Res.* **26**: 167- 174.

Schellhase D.E. and J.M. Shannon (1991) Effects of maternal dexamethasone on expression of SP-A, SP-B, and SP-C in fetal rat. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **4**: 304-312.

Smith B.T. (1978) The role of corticosteroid 11-reductase activity in lung maturation. *Pediatr. Res.* **12**: 12-14.

Snyder J.M. and C.R. Mendelson (1987) Induction and characterization of the major surfactant apoprotein during rabbit fetal lung development. *Biochim. Biophys. Acta* **920**: 226-236.

Strobl W., Chan L. and W. Patsch (1992) Differential regulation of hepatic apolipoprotein A-I and A-II gene expression by thyroid hormone in rat liver. *Atherosclerosis* **97**: 161-70

Suzuki Y., Fujita Y. and K. Kogishi (1989) Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**: 75-81.

Sweezey N.B., Buch S.J., Rae S., Mawdsley C. and M. Post (1990) Feed forward regulation of lung maturation: glucocorticoid receptor is stimulated by its ligand in maturing rat lung. *Pediatr. Res.* **27**: 306 A.

Ten Have Opbroek A.A.W. (1981) The development of the lungs in mammals: an analysis of concepts and findings. *Am. J. Anat.* **162**: 201-209.

Torday J.S. and S. Kourembanas (1990) Fetal rat lung fibroblasts produce TGF- $\beta$  homolog that blocks alveolar type II cell maturation. *Dev. Biol.* **139**: 35-41.

Van Golde L.M.G., Batenburg J.J. and B. Robertson (1988) The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. *Physiol. Rev.* **68**: 374-455.

Van Iwaarden J.F., Welmers B., Verhoef J., Haagsman H.P. and L.M.G. Van Golde (1990) Pulmonary surfactant protein A enhances the host defense mechanism of rat alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2**: 91-98.

Van Iwaarden J.F., Van Strijp J.A., Ebskamp M.H., Welmers A.C., Verhoef J. and L.M.G. Van Golde (1991) Surfactant protein A is opsonin in phagocytosis of herpes simplex virus type I by rat alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* **261**: L204-L209.

Walker S.R., Williams M.C. and B. Benson (1986) Immunocytochemical localization of the major surfactant apoproteins in type II cells, Clara Cells and alveolar macrophages of rat lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* **137**: 399-405.

Weaver T.E., Hull W.M., Ross G.F. and J.A. Whitsett (1985) Intracellular and oligomeric forms of surfactant associated apolipoproteins A in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **827**: 260-267.

Weaver T.E. (1988) Pulmonary surfactant associated proteins. *Gen. Pharmacol.* **12**: 361-368.

Weaver T.E. and J.A. Whitsett (1991) Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochem. J.* **273**: 249-264.

White R.T., Damm D., Miller J., Spratt K., Schilling J., Hawgood S., Benson B. and B. Cordell (1985) Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene. *Nature* **317**: 361-363.

Whitsett J.A., Weaver T., Hull W., Gross G. and C. Dion (1985a) Synthesis of surfactant-associated glycoprotein A by rat type II epithelial cells. Primary translation products and post-translational modification. *Biochim. Biophys. Acta* **828**: 162-171.

Whitsett J.A., Ross G., Weaver T., Rice W., Dion C. and W. Hull (1985b) Glycosilation and secretion of surfactant associated glycoprotein A. *J. Biol. Chem.* **260**: 15273-15279.

Whitsett J.A. and J.E. Baatz (1992) Hydrophobic surfactant proteins SP-B and SP-C: molecular biology, structure and function en: *Pulmonary Surfactant: from molecular biology to clinical aspects*. Robertson B., Van Golde L.M.G. and J.J. Batenburg Eds. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 55-76.

Williams, M.C. (1977) Development of the alveolar structure of the fetal rat in late gestation. *Fed. Proc.* **36**: 2653-2659.

Wilson J.D. and D.W. Foster (1992) Introducción en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8a Ed. Philadelphia: Ed. W.B. Saunders Company, 1-8.

Wohlford-Lenane C.L. and J.M. Snyder (1992) Localization of the surfactant-associated proteins SP-A and SP-B mRNA in fetal rabbit lung tissue by in situ hybridization. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **7** 335-343.

Wright J.R., Borchelt J.D. and S. Hawgood (1989) Lung surfactant apoprotein SP-A (26-36 kDa) binds with high affinity to isolated alveolar type II cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5410-5414.

Wu B., Kikkawa Y., Orzalesi M.M., Motoyama E.K., Kaibara M., Zigas G.C. and C.D. Cook (1973) The effect of thyroxine on the maturation of fetal rabbit lung. *Biol. Neonate* **22**: 161-166.

Yu S.H. and F. Possmayer (1990) Role of bovine pulmonary surfactant associated proteins in the surface-active property of phospholipid mixture. *Biochim. Biophys. Acta* **1046**: 233-241.

Zupan V. and T. Lacaze-Masmonteil (1993) Le surfactant pulmonaire: de la physiopatologie à la thérapeutique. *Médecine/Sciences* **9**: 277-287.

Quiero agradecer especialmente a los Dres. Carmen Aceves y Carlos Valverde por haberme apoyado en todos mis caprichos y además haberme sacado de todos los aprietos. Este trabajo no hubiera podido realizarse sin la generosidad del Dr. Thierry Lacaze-Masmonteil, la ayuda de Sandrine Rubio y de Phillip Chaffey. A Alejandra Núñez de la Mora quien leyó varias veces el manuscrito y me salvó de la desesperación ante los datos. A la Dra. Verónica Guarner por su amabilidad y calidez y al Dr. Arámburo por sus comentarios atinados sobre el manuscrito. A mis maestros durante la carrera, el Dr. Larralde, Toño Lazcano, Dr. Exequiel Ezcurra, Vali y Jesús Aguirre que me contagiaron de entusiasmo por la biología en sus diversos aspectos. A los integrantes del laboratorio de las tiroideas y de los otros con los que compartí todas las peripecias de "la investigación". A los microchips por ser tan compañeros. A los integrantes del Instituto de Investigaciones Biomédicas que facilitaron mi transitar, pienso en Lucy, Violeta, Blanca, Dr. Lino Díaz de León, el Sr. de la Mora y al personal de la UACPyP. A la UNAM por haberme brindado la oportunidad de formarme. A la DGAPA por haberme otorgado una beca para realizar la tesis.

Muchos más son aquellos a los que quisiera agradecer, pues este trabajo no es sólo el resultado de un esfuerzo y una colaboración académica. A mis amigos y a mi familia. A ellos en especial.

# Apéndice- protocolos

## **Western Blot**

Antes de empezar la preparación de las muestras es recomendable preparar los geles de acrilamida (ver soluciones).

## **Preparación del gel**

Empezar con el gel de separación. La solución de acrilamida se vierte en los cristales evitando las burbujas. El uso de una jeringa grande puede facilitar el depósito de la acrilamida. No comenzar la preparación del gel de concentración hasta que haya polimerizado el gel de separación. Es recomendable preparar dos geles a la vez, uno para la inmunodetección y otro para la tinción con azul de coomasie.

## **Preparación de las proteínas**

- Al momento de la extracción del tejido animal congelar el tejido en nitrógeno líquido para evitar degradación.
- Pesar el tejido y agregar 10 o 20 vol. del peso de amortiguador para la homogeneización. De esta forma todas las muestras de n tejido quedan a la misma dilución. Primero intentar con 10 vol. y si durante la homogeneización con el politron la muestra está demasiado viscosa (cantidad de ADN según el órgano que se esté tratando), agregar a 20 vol. También se puede homogeneizar y posteriormente cuantificar por Lowry o Bradford para hacer las diluciones de las muestras.
- Politronar 3 x 15 segundos a temperatura ambiente
- Dejar reposar a temperatura ambiente hasta que desaparezca la espuma
- Aspirar y sacar la muestra varias veces con una jeringa con el propósito de romper el ADN (para ésto se requiere que la muestra no sea demasiado viscosa), al mismo tiempo que se pasa la muestra a un Eppendorf de 1 ml
- Incubar la muestra de 3-5 min. en agua hirviendo
- Centrifugar 5 min. a 10 000 rpm
- Recuperar el sobrenadante y cargar el gel con 10-20  $\mu$ l (el resto de la muestra se conserva a - 20°C.)

-Migración a 15 mA/gel (migrar hasta que el frente de migración llegue al final del gel. Desmontar los geles.) Durante este tiempo preparar las membranas para la transferencia de los geles para la inmunodetección.

### **Electotransferencia**

- Cortar la nitrocelulosa al tamaño del gel (5.5 x 8.5 cm)
- Recortar el papel filtro (4 Whatman 3M y 1 Whatman 1M) 10 cm x 8cm.
- Remojar la membrana de nitrocelulosa, los papeles filtro y las esponjas en el amortiguador de transferencia)
- Incubar el gel durante 30 min en el amortiguador de transferencia
- Colocar una esponja y 3 papeles Whatman 3M en el lado oscuro del cassette de transferencia, y con una jeringa o pipeta ponerle un poco de amortiguador (evita las burbujas)
- Colocar el gel cuidando no dejar burbujas
- Poner un poco de amortiguador sobre el gel y colocar la membrana de nitrocelulosa
- Quitar las burbujas y poner dos filtros Whatman 3M
- Volver a quitar las burbujas y cerrar el cassette y colocar en la cámara de transferencia y llenarlo con el amortiguador de transferencia
- Aplicar una corriente constante a 90 mA al menos durante una hora
- Después de la transferencia, lavar la membrana con agua destilada durante 3 min y se deja secar a temperatura ambiente

### **Inmunodetección**

- Incubar el filtro en TBSA durante una hora
- Lavar una vez en TBST
- Incubar con el primer anticuerpo diluido en TBSA durante 1-2 horas
- Lavar en TBST
- Lavar tres veces durante 15 min en TBST
- Incubar en el segundo anticuerpo acoplado a la peroxidasa (diluido en TBSA) durante 45 min en la oscuridad
- Lavar en TBST
- Lavar al menos tres veces durante 15 min en TBST (entre más se lave, mejor)
- Se revela por medio del estuche ECL

## Soluciones

### 1. Acrilamida/Bis (30% T, 2.6% C)

Acrilamida	29.2 g
Bis	0.8 g
H <sub>2</sub> O	Aforar a 100 ml
Filtrar y conservar a 4°C	

### 2. Tris-HCl 0.5M pH 6.8

Tris Base	6.0 g
H <sub>2</sub> O	50 ml
ajustar el pH con HCl y luego aforar con agua a 100 ml	

### 3. Persulfato de amonio 10% (preparar al momento) y Temed (ya viene listo)

### 4. Amortiguador de transferencia 5x (Tris 3%, Glicina 14.4%, SDS 0.05%)

Tris Base	30 g
Glicina	144 g
SDS	15 g
H <sub>2</sub> O	Aforar a 1000 ml

### 5. Amortiguador de muestra (Tris-HCl 75 mM pH 6.8 , Glicerol 15%, SDS 15%, β-mercaptoetanol 5%, Azul de Bromofenol)

0.5 M Tris-HCl pH 6.8	7.5 ml
Glicerol	10 ml
SDS 25%	30 ml
β-mercaptoetanol	2.5 ml
Azul de Bromofenol	un poco

### 6. TBST 10x "Amortiguador Tris salina Tween" (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, NaCl 1.5 M, Tween 20 0.5%)

Tris	12 g
NaCl	90 g
Tween	5 ml
HCL	ajustar a pH 8
H <sub>2</sub> O	aforar a 1000 ml

**7. TBSA (BSA 5% (bovine serum albumin)/ TBST) preparar en el momento**

Leche descremada 5 g (reemplaza la BSA)

TBST aforar a 100 ml

**8. Solución de revelado estuche ECL (Amersham)**

**Preparación de los geles a partir de la solución Stock de acrilamida a 30%;**

**Gel de separación (Tris 0.375 M, pH 8.8)**

	<b>18 %</b>	<b>12 %</b>	<b>10%</b>	<b>8%</b>
<b>Acrilamida/Bis (30%)</b>	24.00 ml	16.00 ml	13.33 ml	10.66 ml
<b>Agua destilada</b>		5.80 ml	8.50 ml	11.20 ml
<b>Glicerol</b>	5.80 ml	8.00 ml	8.00 ml	8.00 ml
<b>1.5 M Tris-HCl pH 8.8</b>	10.00 ml	10.00 ml	10.00 ml	10.00 ml

**Gel de concentración (Tris 0.125 M, pH 6.8) 4%**

<b>Acrilamida/Bis (30%)</b>	4.00 ml
<b>Agua destilada</b>	18.20 ml
<b>0.5 M Tris-HCl pH 6.8</b>	7.50 ml

## **Extracción del ARN total por RNAzol**

- Los tejidos animales se extraen y se ponen en un Eppendorf y se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido. Así congelados se guardan a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. CUIDAR QUE NUNCA SE DESCONGELE EL TEJIDO. Agregar el RNAzol cuando aún congelado.

- También se pueden extraer y poner en la solución de RNAzol si se van a procesar inmediatamente después. SIEMPRE UTILIZAR GUANTES, EVITAR EL CONTACTO DE LAS PUNTAS CON LA MESA, UTILIZAR SOLUCIONES ESTERILIZADAS. DE PREFERENCIA TENER MATERIAL DIFERENTE PARA ARN QUE PARA ADN. MANIPULAR SIEMPRE EN HIELO.

- Homogeneizar el tejido en 2 ml de RNAzol en un tubo de 10 ml

- Verter en un Eppendorf de 2 ml y agregar 1/10 vol (200  $\mu\text{l}$ ) Cloroformo: alcohol isoamílico (14:1)

- Vortex

- Dejar en hielo o  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

- Centrifugar a 13 000 g durante 20 min a  $+4^{\circ}\text{C}$

- Recuperar y transferir a otro Eppendorf la fase acuosa

El ARN se queda en la fase acuosa. ADN y proteínas se quedan en la fase fenólica e interfase. NO TOCARLAS CON LA PUNTA, mejor dejar un poco de la fase acuosa. ,

- Agregar un vol. de cloroformo-alcohol isoamílico (14:1)

- Centrifugar a 13 000 g durante 20 - 30 min a  $+4^{\circ}\text{C}$ .

- Recuperar la fase acuosa, transferir a otro Eppendorf y añadir un vol de isopropanol

- Precipitar 1 h a  $-80^{\circ}\text{C}$  o 2 h a  $-20^{\circ}\text{C}$

- Centrifugar 13 000 durante 35 min a  $4^{\circ}\text{C}$

- Tirar el sobrenadante o retirarlo con un pipeta. (Utilizar para cada tubo una punta nueva)

- Resuspender el paquete en 200  $\mu\text{l}$  de agua destilada, esterilizada

- Precipitar con 1/12 vol Acetato de Sodio 3M pH 5 (1.7  $\mu\text{l}$ ) + 0.5 -1 ml Etanol frío (conservado en el congelador) durante 1 h a  $-80^{\circ}\text{C}$  o 2 h a  $-20^{\circ}\text{C}$  (así se pueden guardar los ARN indefinidamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ )

- Centrifugar 13 000 g 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , retirar sobrenadante

- Agregar alcohol 70% frío y centrifugar 13 000 g 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , retirar sobrenadante

- Repetir la operación alcohol 75 % para estar seguro que se removieron todas las sales

- Resuspender el paquete en 20  $\mu$ l agua destilada y esterilizada. (Así se pueden almacenar o utilizar para RT-PCR. Si se van a utilizar los ARN para Northern resuspender en sol A (EDTA 25mM, SDS 0.1%)

Para cuantificar la concentración de los ARN, se toman 4  $\mu$ l y se diluyen en 1 ml de agua (sol A si se van a utilizar para Northern Blot). La lectura a 260 nm x 10 indica la cantidad en  $\mu$ g/ $\mu$ l. Como blanco de lectura se utiliza agua o sol A, según como se hayan resuspendido. Se hacen además lecturas a 280 nm y 230 nm. La tasa de 280/260 debe de ser mayor a 1.75 hasta max. 2 valor de mayor pureza.

**Soluciones:**

<b>Sol. A</b>	Tris HCl 1M pH 7.5	1 ml
	EDTA 0.25 pH 7.5	0.4 ml
	SDS 10%	5 ml
	Agua destilada	93.5 ml

Autoclave y almacenamiento a temperatura ambiente

<b>Acetato de Sodio 3M pH 5</b>	Acetato de Sodio 123 g
	Agua destilada 300 ml
	Ajustar pH con ácido acético a pH 5 y aforar con agua a 500 ml. Autoclave y almacenamiento a temperatura ambiente.

### **Transcripción inversa de ARNm a ADNc**

Para facilitar la transcripción inversa, se recomienda guardar una parte de los ARN a una concentración de 1 µg/µl. Si la lectura en el espectrofotómetro a 260 nm indica 0.245, se toman 10 µl de ARN y se le agregan 14.5 µl de agua; es decir, se toman 10 µl de ARN y se agrega agua de tal forma que 10 + el agua den el total de la lectura x 100.

Se toman 2 µl de ARN (2 µg) para la retrotranscripción por medio de la transcriptasa reversa aislada del virus murino de Moloney. (Volumen final de la reacción 40 µl)

ARN	2 µl
Hexanucléotidos aleatorios 1x	2 µl
Amortiguador 5x	8 µl
dNTP (25mM)	2 µl
H <sub>2</sub> O	23 µl

- Incubación durante 10 min a 75 °C.

- Inmediatamente después colocar en hielo y dejar enfriar durante 5 min.

- Agregar 1 µl de RNAsin (evitar la degradación de los ARN), y 2 µl de la Reverso Transcriptasa (RT).

- Incubación durante 45 min a 1 hr a 42 °C.

El ADNc está listo. Guardar a - 20 °C.

### **PCR (Volumen final de la reacción 50 µl)**

En un Eppendorf de 1 ml preparar el amortiguador de la reacción con las siguientes cantidades por cada muestra:

MgCl <sub>2</sub>	4 µl
Amortiguador 10 x	5 µl
dNTP (25mM)	1 µl
oligos específicos (250 ng/µl)	1 µl c/u
(los oligos deben de ser de un mínimo de 18 pb.)	
H <sub>2</sub> O (q.s.p. 40)	28 µl

- Vortex

- Repartir 35 µl en cada tubo de PCR (guardar el sobrante y agregar ahí 0.5 µl de Taq polimerasa por tubo)

- Agregar a cada tubo 10  $\mu$ l ADNc CON PUNTAS DIFERENTES
- Agregar una o dos gotas de aceite PCR
- Empezar 5 min de denaturación en la máquina de PCR a 94 °C
- Abrir los tubos de PCR y agregar 5  $\mu$ l de la mezcla que contiene la Taq sin volver a aspirar con la pipeta, pero removiendo un poco con la punta) CAMBIAR DE PUNTA A CADA MUESTRA.
- Empezar los ciclos. (94 °C 30' Denaturación; 59° C 1' (paso intermedio para que la máquina no baje a menos de la temperatura de hibridación de los cebadores, lo que ayuda a la especificidad); 55°C 30' hibridación (la temperatura de hibridación puede variar según los cebadores utilizados, su tamaño y su contenido de GC), 72°C 1" elongación (hasta aprox. 1000 pb, para fragmentos más largos aumentar el tiempo de elongación).
- Hasta 32 ciclos se trata de una amplificación legítima. Se pueden realizar menos ciclos si aparecen varias bandas que no corresponden al fragmento esperado. También tratar de elevar uno o dos grados la temperatura de la hibridación. No olvidar siempre poner un control positivo como ADNc clonado, o amplificar una muestra independiente con cebadores para  $\beta$ -actina que se expresa en todos los tejidos. Para poder distinguir la amplificación del ADNc proveniente del ARN de posible ADN contaminante, se recomienda escoger un par de cebadores (oligos) que se encuentren separados por un intrón.
- Cuando se trata de un ARN que se expresa en pequeñas cantidades, se puede realizar una segunda amplificación de otros 15 a 20 ciclos utilizando un par de oligos que se encuentren localizados en el interior del fragmento de amplificación. De esta manera se asegura la especificidad.

### **PCR semicuantitativa**

Para realizar una PCR semicuantitativa cuando se utiliza el mismo tejido, pero que se tengan diferentes muestras que hayan recibido un tratamiento hormonal p.ej., se agrega al momento de la amplificación oligos de  $\beta$ -actina (secuencia en material y métodos). Tomar alícuotas a diferentes ciclos para estar en la fase exponencial y no en saturación. CUIDADO: cuando se realiza una coamplificación a veces unos cebadores tienen preferencia de amplificación y pueden intervenir en la amplificación de la otra secuencia. Probar diferentes concentraciones de cebadores.

## **Electroforésis y transferencia a una membrana de nitrocelulosa**

- Para analizar la amplificación se migra en un gel de agarosa teñido con BET para ver los fragmentos a luz ultravioleta. La concentración depende del tamaño del fragmento amplificado. No olvidar el peso molecular para verificar que las bandas correspondan al tamaño de amplificación deseado.

- Se corta una membrana Hybond "N" Amersham del tamaño del gel. Evitar tocar con los dedos, usar guantes, y dos papeles filtro uno del mismo tamaño y otro del mismo ancho pero más largo para que se bañe en la solución

-La transferencia se realiza por capilaridad en una solución de 0.4 N NaOH. Orden: Filtro largo sobre el soporte que toque por ambos lados la solución NaOH. Importante: evitar burbujas. Siempre humedecer los filtros y membranas en la solución y agregar sobre cada capa más solución. Colocar el gel, membrana, filtro. Colocar varias capas de papel que hagan la capilaridad. Cuidado: Asegurarse que el papel no toque el papel filtro largo porque entonces ya no funciona. Para mayor seguridad poner parafilm en los bordes del gel. Cambiar los papeles si ya están húmedos. Tiempo de transferencia durante 4h. El ADN se fija a la membrana por irradiación UV durante 5-10 min. Se puede utilizar membrana Hybond Plus que no requiere de este último paso.

## **Marcaje radioactivo de un oligonucleótido**

Para revelar la especificidad de los fragmentos de amplificación se hibrida la membrana con un oligo específico interno al producto de amplificación. Se recomienda utilizar un oligo interno y no alguno de los que se utilizaron para la amplificación. Esto se realiza por medio de la fosforilación del oligo en su extremo 5' con  $^{32}\text{P}$  con la polinucleótido cinasa (PNK). (Vol. final de la reacción 15  $\mu\text{l}$ .)

$^{32}\text{P}$ ATP (3000 Ci/mmole)	2.5 $\mu\text{l}$
Amortiguador ( Tris-HCl 300 mM pH 7.8, MgCl <sub>2</sub> 50 mM, ATP 1.65 mM, $\beta$ -merc. 75 mM)	3 $\mu\text{l}$
Oligos 250 ng	2 $\mu\text{l}$
PNK 10 unidades	1 $\mu\text{l}$
Agua	acompletar a 15 $\mu\text{l}$

Incubación durante una hora a 37°C. El producto se pasa por una columna de G50. El primer pico de radioactividad que se eluye es el del oligo marcado (seguir con el Geiger). Se toma 1  $\mu\text{l}$  y se pone en un ml de líquido de centelleo, y se cuenta. Se necesita por ml de amortiguador de hibridación 1000 000 de cuentas.

### **Prehibridación e hibridación**

La membrana se prehibrida en un vol. que cubra la membrana durante 2 hrs. a 42 °C en un amortiguador de hibridación.

La sol. stock del amortiguador contiene:

- |                             |                |
|-----------------------------|----------------|
| - SSC 20x                   | 25 ml          |
| - Denhardt 50x              | 2 ml           |
| - Buffer Fosfatos 1M pH 6.5 | 2 ml           |
| - Dextran                   | 10 g           |
| - Agua filtrada             | aforar a 30 ml |
- Agregar 150 µl/ml de DNA de esperma de salmón a la hora de realizar la prehibridación y el un vol de formamida.

Se hibrida durante un noche a 42°C. Para la hibridación se utilizan por cada 10 ml

Sol. Stock	3ml
Formamida	5 ml
Esperma de salmón (50mg/ml)	100 µl
Sonda (2ml)	10 000 000 cpm

Lavados:

2 lavados con SSC 2x, SDS 0.1% durante 15 min a 42°C

1 lavado con SSC 1x, SDS 0.1% durante 15 min 42°C

1 lavado con SSC 0.5x, SDS 0.1% durante 15 min 42°C

Checar con el Geiger, continuar los lavados hasta que la membrana quede limpia (radioactividad localizada) con SSC 0.1x, SDS 0.1% durante 15 min 42°C

Exposición para revelar.