



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

---

CARRERA DE BIOLOGÍA

INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

ISIDRO ESPINOZA DE LOS REYES

**IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL SURFACTANTE PULMONAR  
(SPA, SPB, SPC Y SPD)  
EN LAVADOS BRONQUIOALVEOLARES  
DE NEONATOS CON SÍNDROME DE DIFICULTAD RESPIRATORIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

P R E S E N T A

**SÁNCHEZ CAMACHO ADRIANA**

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. JOEL ARIAS MARTÍNEZ

ASESOR INTERNO:

BIÓLOGA MA. CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ



México D.F., abril, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

### ***A DIOS***

Que me dio la vida, por regalarme una familia maravillosa y poner en mi camino a personas maravillosas; por las bendiciones y los regalos que recibo día tras día y haberme permitido llegar al final de mi carrera.

### ***A mi Mamá***

Que con sus cuidados y atenciones me ha apoyado en todas las ocasiones y aunque hemos pasado momentos difíciles siempre ha estado apoyándome, por todo esto le agradezco de todo corazón.

### ***A mi Papá***

Que aunque no está ya entre nosotros sigue vivo en mi pensamiento; y que su estímulo fue mi impulso para llegar al final.

### ***A la Universidad Nacional Autónoma de México***

Por haberme dado la oportunidad de ingresar al sistema de Educación Superior ya que me permitió llegar hasta aquí y en especial a la Fes Zaragoza porque me apoyo para cumplir este gran sueño y por todo lo que aprendí en ella.

### ***Al Instituto Nacional de Perinatología***

Por abrirme sus puertas y brindarme el apoyo para realizar esta tesis.

### ***Al M. en C. Joel Arias Martínez***

Quien me asesoró y apoyó incondicionalmente, por su paciencia y consejos.

### ***A la Dra. Claudine***

Por abrirme las puertas del laboratorio y haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis y por su apoyo.

### ***A Laura Correa***

Por todo su apoyo en los trámites y sus consejos.

### ***Al biólogo José Luis***

Por su apoyo en el laboratorio.

***A mis profesores: Ma. Cristina Alvarado, Elvia, Arcadio Monroy, Rocío Breceda, Carlos Montoya, Ana Laura.***

Por su tiempo, su apoyo, así como por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

***Al Presbitero Efrén Velázquez***

Por el apoyo que le brindo a mi madre en los momentos difíciles, pero sobre todo al amigo.

***A mis amigos (as) de la facultad: David García, Eva María Corona, Erika Roxana, Omar Coyote, Jorge Zetina, Salvador Coyote y Jesús Vega.***

Porque todos ustedes han sido tantas veces parte de mi vida y me han abierto los ojos al mundo. Gracias por todos los momentos que pasamos juntos en la Facultad y por haber estado conmigo en momentos muy difíciles ya que ustedes me ayudaron a seguir adelante y a no dejarme caer, sé que siempre contaré con ustedes.

***A mis amigas y compañero del INPer: Erika Yopez, Laura Estudillo, Lupita Martínez y Miguel Palacios.***

Por su amistad, consejos y apoyo incondicional.

***A mis amigas: Karina Verastegui, Eva María García, Cristi Barragán, Conchita Hernández.***

Por sus consejos, su amistad, sé que siempre contaré con ustedes y por formar parte de mi vida.

“Y por último: deseo dedicar este momento tan importante e inolvidable; a **MI MISMA**, por no dejarme vencer, ya que en ocasiones el principal obstáculo se encuentra dentro de uno....”

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>I. Antecedentes</b>	3
Anatomía y función pulmonar	3
Neumocitos de tipo II	5
Surfactante pulmonar y su función	6
Síntesis del surfactante pulmonar	8
Regulación del surfactante	9
Proteínas del surfactante (SPA, SPB, SPC y SPD)	10
Surfactantes sintéticos para uso terapéutico (tipos)	14
Síndrome de dificultad respiratoria (SDR)	17
Epidemiología neonatal y Síndrome de Deficiencia Respiratoria en México	19
<b>II. Planteamiento del problema</b>	20
<b>III. Justificación</b>	21
<b>IV. Hipótesis</b>	22
<b>V. Objetivos</b>	23
Objetivo general	23
Objetivos particulares	23
<b>VI. Metodología</b>	24
Muestras biológicas	24
Técnica de lavados bronquioalveolares	24
Cuantificación de proteínas	25
Preparación de las muestras para Electroforesis en gel de poliacrilamida con sulfatoduodecil de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras	25
Electroforesis	25
Preparación de las muestras para geles al 15%	25
Tinción de Plata	26
Western blot	26

<b>VII. Resultados</b>	28
Estandarización de las técnicas de electroforesis, tinción con plata y transferencia húmeda de proteínas con lavados bronquioalveolares de conejo y porcino	28
Identificación de la proteína SPB en muestra de porcino por inmunoblot	29
Cuantificación de la concentración de proteínas de Neonatos Humanos	31
Identificación de las SP's en muestras de neonatos con SDR	31
Identificación de las SP's por Inmunoblot	33
<b>VIII. Discusión de resultados</b>	39
<b>IX. Conclusiones</b>	42
<b>X. Bibliografía</b>	43
<b>XI. Apéndice</b>	47

## ABREVIATURAS

(Alec)	Componente artificial de pulmón expandido
(DPPC)	Dipalmitoilfosfatidilcolina
(INPer)	Instituto Nacional de Perinatología
(kDa)	kilo Dalton
(LB)	Cuerpos lamelares
(LBA)	Lavados bronquioalveolares
(MBL)	Mannose binding lectin
(Pa)	Ácido palmítico
(Pg)	Fosfatidilglicerol
(SDR)	Síndrome de dificultad respiratoria
(SDS-PAGE)	Electroforesis en gel de poliacrilamida con sulfato duodecil de sodio
(SPA)	Proteína del Surfactante Pulmonar A
(SPB)	Proteína del Surfactante Pulmonar B
(SPC)	Proteína del Surfactante Pulmonar C
(SPD)	Proteína del Surfactante Pulmonar D
(SP)	Surfactante Pulmonar
(TBST)	Tris buffer salino tween
(TGFb)	Factor de crecimiento tumoral beta

## RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido al nacimiento del infante pretérmino, como aquel que ocurre a partir de la semana 20 hasta la semana 36 de gestación. El parto pretérmino es la causa más frecuente de mortalidad y enfermedad perinatales y se calcula que es responsable del 75% de las muertes neonatales no relacionadas con malformaciones hereditarias. Una de las principales consecuencias de estos nacimientos es el desarrollo del Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR) en el neonato; y que clínicamente es causada por déficit de surfactante que es una sustancia tensoactiva producida por los neumocitos de tipo II que recubre los alvéolos. Este compuesto es una mezcla compleja de lípidos y proteínas que permite reducir de manera importante la tensión superficial, haciendo la ventilación alveolar y el intercambio de gases posible. Las proteínas del Surfactante Pulmonar (SP) forman parte de la conformación activa de los lípidos y además participan en funciones inmunológicas del pulmón. Las principales proteínas del (SP) son cinco: SPA, SPB, SPC, SPD y CC10. La SPB y SPC son extremadamente hidrofóbicas y con un peso aproximado de 8.8 y 3.7 kDa., respectivamente, éstas se fijan fuertemente a los lípidos y se disuelven en solventes orgánicos, mientras que SPA y SPD son grandes, hidrofílicas con un peso aproximado de 26 y 43 kDa., respectivamente y pertenecen a la familia de las colectinas (C-tipo lectina).

En este estudio se identificaron las proteínas del SP (SPA, SPB, SPC y SPD) en lavados bronquioalveolares (LBA) de neonatos humanos con SDR. Dado que no hay testigos de neonatos humanos sanos ya que no es éticamente posible obtener de ellos muestras de LBA, el estudio identificará a las proteínas SPA, SPB, SPC y SPD en neonatos humanos con SDR. Se utilizaron 9 muestras biológicas de neonatos prematuros que fueron diagnosticados con SDR y 10 controles (8 conejos y 2 porcinos). Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, tinción con plata, transferencia húmeda de las proteínas y detección de las proteínas SPA, SPB, SPC y SPD por Western Blot para su identificación.

El peso de las proteínas fue identificado de acuerdo al mencionado en la literatura en condiciones reductoras, aunque no se encontraron las 4 proteínas en todas las muestras analizadas, esto puede deberse a la historia clínica de cada paciente, así como edad gestacional o el nivel de desarrollo de SDR que presentó.

La SPC no fue identificada en ninguna de las muestras, posiblemente porque el anticuerpo utilizado (Goat Anti-Rabbit HRP) no reconoció a esta proteína, por el tamaño tan pequeño que es de aproximadamente 3.7 kDa en su forma madura y debido a esto se haya salido del gel o no se haya expresado o también por su concentración tan baja.



Sin embargo concluimos que las proteínas se expresan de diferente forma dependiendo de la presencia y severidad del desarrollo de SDR lo cual pueden contribuir al entendimiento de esta patología en este tipo de pacientes ya que se les ha atribuido un papel en la homeostasis lipídica y en el proceso de respuesta inmunológica.

## **I. ANTECEDENTES**

### *Anatomía y Función Pulmonar*

El sistema respiratorio se puede dividir en dos componentes que son: las vías respiratorias superiores e inferiores. El tracto respiratorio superior se compone de las partes fuera de la cavidad torácica: los pasajes de aire de la nariz, fosas nasales, faringe, laringe y tráquea superior, mientras que el tracto respiratorio inferior se compone de: la parte inferior de la tráquea y los pulmones, los cuales incluyen el árbol bronquial y los alveolos (Fig. 1). También forman parte del sistema respiratorio la membrana pleural y los músculos respiratorios que forman la cavidad torácica: el diafragma y los músculos intercostales (Scanlon y Sanders. 2007).

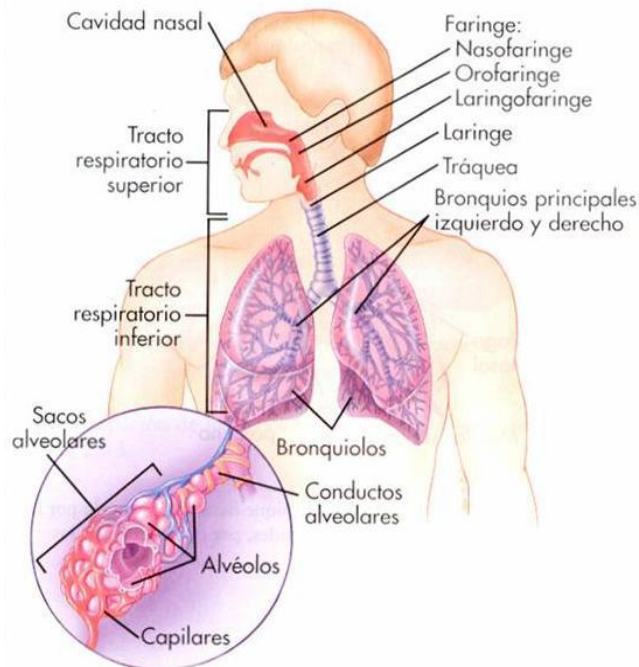
### *Los pulmones y membrana pleural*

Los pulmones son órganos pares que se encuentran en la cavidad torácica y están limitados por las membranas pleurales. La pleura parietal es la capa externa, la pleura visceral es la capa interna. Las membranas pleurales son las membranas serosas de la cavidad torácica. Entre estas membranas existe líquido seroso que evita la fricción y mantiene a las dos membranas juntas durante la respiración (Tortora y Anagnostakos. 2007).

### *Árbol traqueobronquial*

El árbol traqueobronquial está formado por tráquea, bronquios primarios, bronquios secundarios, bronquios terciarios, bronquiolos y bronquiolos terminales (Fig. 1).

En cada pulmón el bronquio principal se divide en varias ramas que se dividen a su vez y así sucesivamente. De este modo se forma un sistema arboriforme de ramificaciones bronquiales: el árbol bronquial, alrededor del cual se organizan las porciones respiratorias del pulmón (Tortora y Anagnostakos. 2007).



**Figura 1. Sistema respiratorio y alveolar**

(Tomado de <http://www.aparatoRespiratorio.jpg//losbronquios.alveolar>).

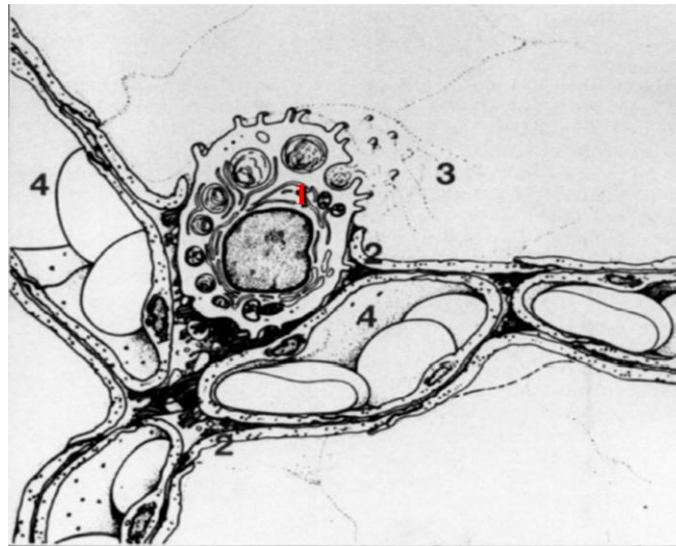
Durante la vida intrauterina los alveolos pulmonares distendidos se encuentran llenos de líquido que contiene surfactante producido por los neumocitos de tipo II. El pulmón del recién nacido presenta una serie de adaptaciones que modifican la circulación fetal. El reemplazo del líquido fetal por aire es un fenómeno mecánico que requiere de la aplicación de presiones transpulmonares elevadas para lograr insuflar el pulmón en las primeras respiraciones; estas fuerzas deben superar tres elementos: viscosidad del surfactante pulmonar, tensión superficial y resistencia de los tejidos. La expansión del tórax, así como el primer llanto, hacen que los bronquios aspiren aire que llena los alveolos pulmonares, se libera una sustancia tensoactiva denominada surfactante que evita el colapso alveolar con la expiración. Cualquier alteración en estos mecanismos de adaptación, provoca alteración pulmonar y la aparición de una enfermedad conocida como Síndrome de Dificultad Respiratoria (Castro y cols. 2007).

La superficie alveolar está formada por dos tipos de células epiteliales, neumocitos de tipo I y neumocitos de tipo II, ó células alveolares de tipo I y de tipo II (Fig. 2). El 90% de la superficie alveolar está cubierta por las células de tipo I; son células aplanadas incapaces de dividirse con pocos organelos y que forman una fina barrera entre la sangre y el aire (Andreeva y cols. 2007).

## NEUMOCITOS DE TIPO II

Los neumocitos de tipo II son células cúbicas que se localizan en las uniones de las paredes alveolares. Constituyen el 15% de las células de la pared alveolar, pero no cubren más del 10% de la superficie alveolar; poseen organelos especializados de 0.1-2.4  $\mu\text{m}$  en diámetro, denominados cuerpos lamelares (LB). Cada célula de tipo II contiene 120-180 cuerpos lamelares (LBs) que consisten de láminas apretadas de membrana concéntrica con pocos espacios intralamelares que están rodeados por el exterior de la membrana (Fig. 2) (Andreeva y cols. 2007).

Son células metabólicamente muy activas. Su función principal es la síntesis y secreción del surfactante pulmonar (Casado J. 1994). Las células de tipo II proliferan y migran para limpiar y reparar las áreas dañadas, son capaces de dividirse y diferenciarse en células de tipo I. Ellas participan en la respuesta de defensa por la expresión de varios receptores, (en particular los receptores Toll, que son una familia de proteínas transmembranas de tipo I que forman parte del sistema inmunitario innato). Estas células están involucradas en la red de citocinas/quimiocinas del pulmón, secretándolas y respondiendo ante ellas, regulan la trans migración de los monocitos a través de la capa epitelial y posiblemente participan en la activación de las células T (Andreeva y cols. 2007).



**Figura 2. Tipos de células presentes en los alveolos.** 1.-Neumocito tipo II cuerpos lamelares, 2.- Neumocito de tipo I, 3.- área de superficie de alveolos pulmonares con surfactante, 4.- Capilares alveolares.

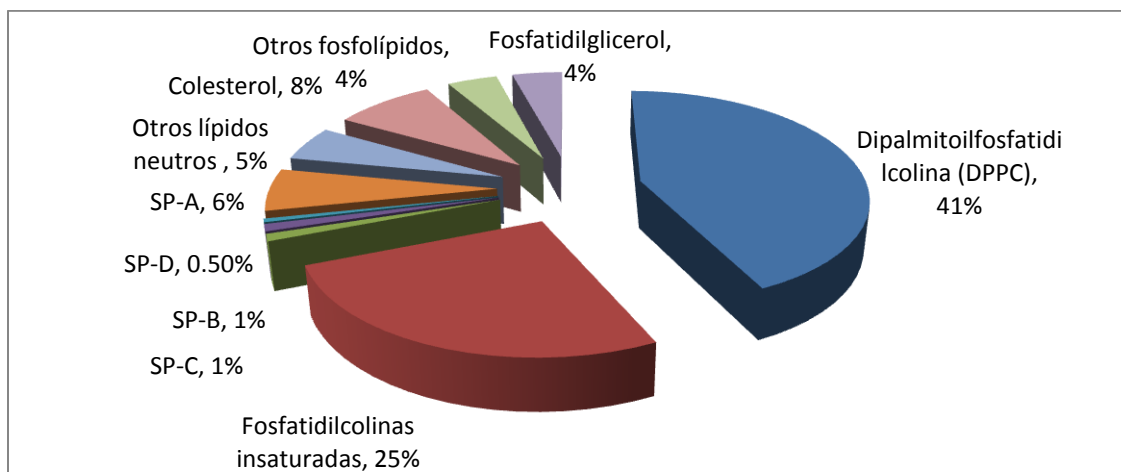
(Tomado de <http://escuela.med.puc.cl/publ/AparatoRespiratorio/01Morfologia.html>).

## SURFACTANTE PULMONAR Y SU FUNCIÓN

El surfactante pulmonar es una mezcla de naturaleza heterogénea, la cual se encuentra recubriendo el epitelio alveolar y su función principal es estabilizar los alveolos pulmonares, al formar una monocapa capaz de reducir la tensión superficial del área en la interfase aire-líquido de las estructuras que constituyen las vías aéreas terminales (Travieso y Blanco. 2009).

Consiste en un 92% de lípidos y de proteínas 8%. La fosfatidilcolina comprende 80% del total de los lípidos, del cual la mitad aproximadamente es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (Fig. 3). El fosfatidilinositol y el fosfatidilglicerol forman menos de 10% de los lípidos y otros, como la fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélna y glucolípidos están presentes en menor proporción (Cullen y cols. 2007).

Las proteínas que conforman el surfactante son cinco las más estudiadas y son denominadas: SPA, SPB, SPC, SPD y CC10 según su orden de descubrimiento, SPA y SPD son proteínas multiméricas, glicosiladas, hidrofílicas; mientras que SPB y SPC son proteínas hidrófobas, de menor peso molecular que requieren de detergentes, solventes orgánicos o lípidos para su solubilización y constituyen el 1% de la masa del surfactante y participan en la extensión y adsorción de la DPPC en la interfase aire-líquido (Blanco O. 2004) (Fig. 3); por otra parte también podemos mencionar que la proteína CC10, está involucrada en proteger a los lípidos del surfactante de su degradación y también de inhibir una respuesta inflamatoria en el pulmón y tiene un peso molecular de 10-16 kDa (Singh y S. 2000).

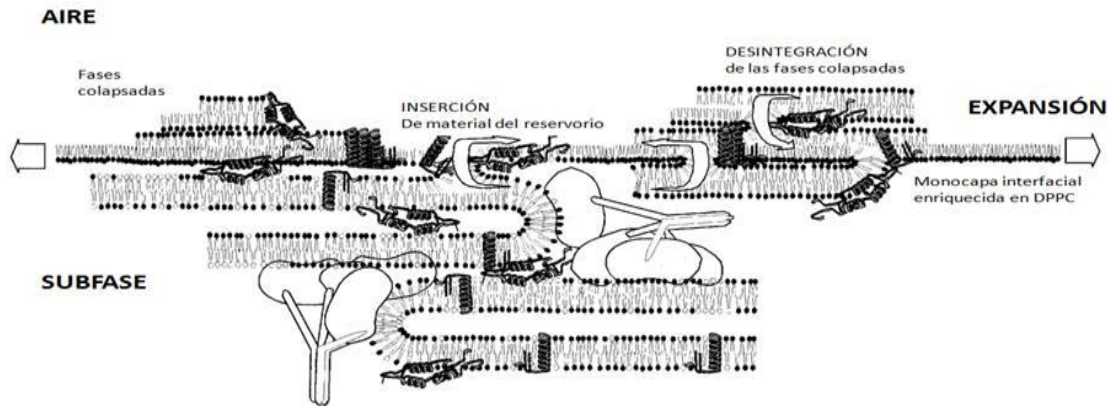


Lípidos: 92%

Proteínas específicas: 8%

**Figura 3. Composición del contenido de diversos compuestos del surfactante pulmonar** (Tomado de Pérez J. 2010).

La absorción de los fosfolípidos por la interfase aire-líquido, resulta en la formación de una película estable de fosfolípidos que van a permitir la disminución de la tensión superficial entre esta interfase en la cual están insertadas dos de las proteínas del surfactante: la SPB y la SPC mientras que la SPA tiene la capacidad de enlazar lípidos y carbohidratos e interactuar con receptores específicos de la superficie celular (Diemel. 2002; Fig. 4),



**Figura 4. Modelo de la película estable de fosfolípidos que conforma el surfactante pulmonar** (Tomado de Pérez y Keough. 1998).

En estudios *in vitro* se ha observado que SPA inhibe la secreción y aumenta la captación de lípidos del surfactante. SPB también influye tanto intra como extracelular en el transporte de los lípidos. (Clements y Avery. 1998).

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

Si la tensión superficial es elevada y no disminuye durante el cierre del alveolo, este se colapsará inevitablemente ya que el gradiente de presión se incrementará durante el cierre; lo que hace el surfactante es reducir la tensión superficial, sobre todo cuando el radio del alveolo es más pequeño y por lo tanto estabiliza al conjunto de alveolos. La disminución de la tensión superficial que causa el surfactante no solo permite la adecuada circulación del aire sino la salida del líquido alveolar hacia el intersticio que de otra manera se acumula dentro del mismo. Además permite la remoción de partículas del pulmón al mejorar la función ciliar de su epitelio (Cullen y cols. 2007).

## SÍNTESIS DEL SURFACTANTE PULMONAR

La síntesis del surfactante pulmonar se lleva a cabo en los neumocitos de tipo II a partir de las 17 semanas de gestación y se acumula a nivel intracelular como cuerpos lamelares (Campos y cols. 2006).

El ciclo biológico del surfactante se inicia con la síntesis de sus componentes como son los fosfolípidos y las proteínas SPB, SPC en el retículo endoplasmático rugoso, algunos de estos componentes se procesan posiblemente en el aparato de Golgi por medio de los cuerpos multivesiculares al interior de los cuerpos lamelares y son secretados por medio de exocitosis.

Después de la exocitosis de los cuerpos lamelares, los fosfolípidos del surfactante en presencia de SPA que es sintetizada por separado junto SPD y el  $Ca^{2+}$  son organizados en una estructura denominada mielina tubular (parecida a un entrecruzado) que forma una monocapa rica en lípidos que reduce la tensión superficial del alveolo y que permite a los grupos acil-grasos hidrofóbicos de los fosfolípidos dirigirse hacia el aire alveolar, mientras que en el otro extremo de la estructura química las cabezas polares (hidrofílicas) lo hacen hacia el agua (Fig. 5) (Pérez J. 2010).

Los fosfolípidos desde la monocapa, pueden reentrar, por endocitosis, a los neumocitos tipo II y formar cuerpos multivesiculares, que son reciclados por la incorporación rápida a los cuerpos lamelares o degradados en los lisosomas.

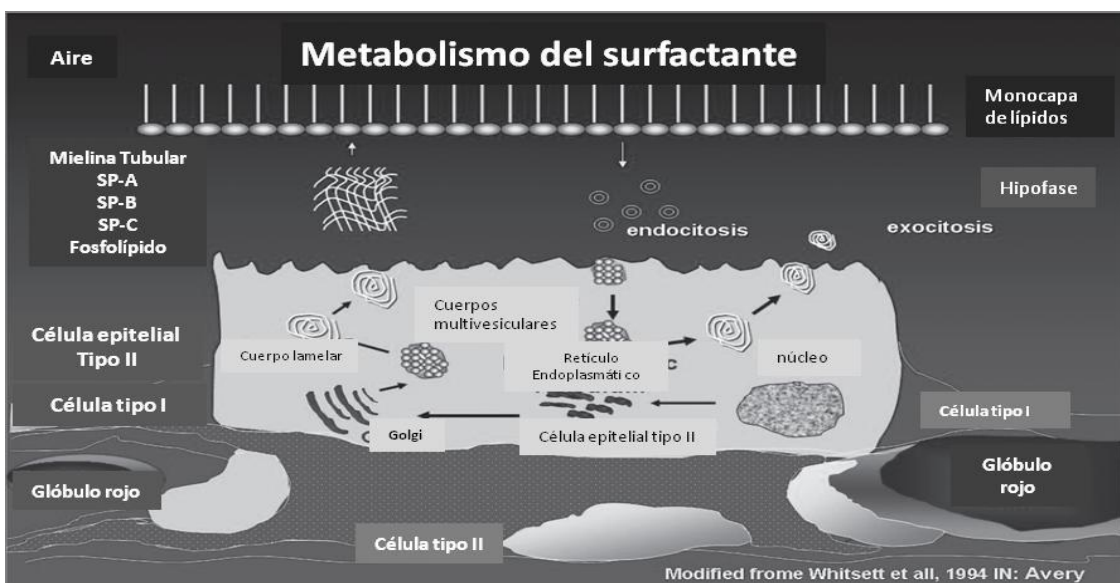


Figura 5. Síntesis del surfactante pulmonar (Tomado de Pinheiro y Albuquerque. 2007).

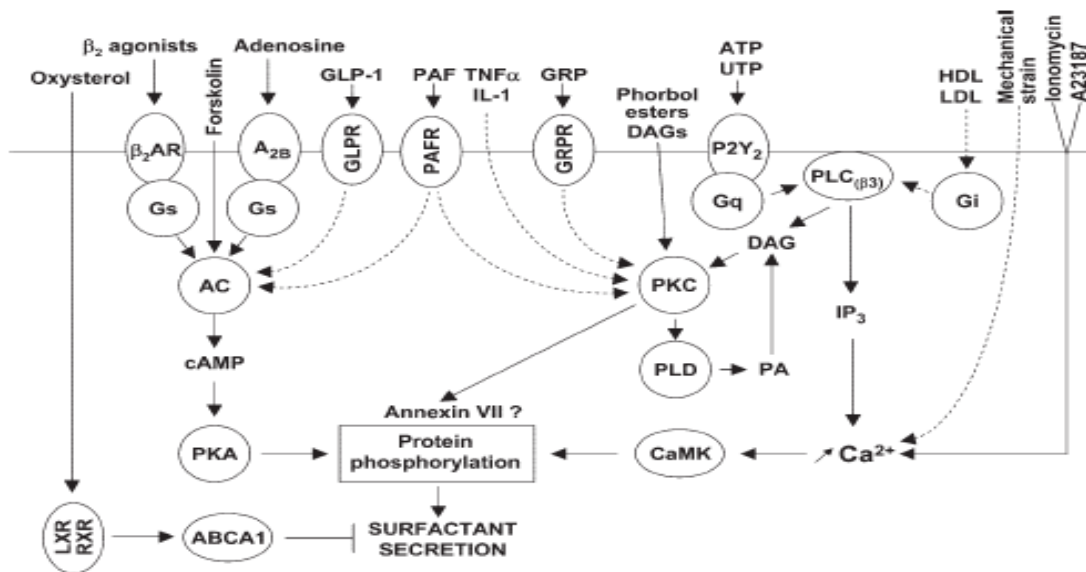
En varios estudios se ha mostrado que las características de la composición bioquímica del surfactante pulmonar natural están conservadas, en gran medida, en diferentes especies como: hombre, rata, oveja, pollo, conejo, y otros, y difiere de la composición fosfolipídica de otros órganos (Travieso. 2006).

## REGULACIÓN DEL SURFACTANTE

La regulación de la secreción del surfactante es mediado por al menos tres mecanismos distintos:

- activación de la adenilato ciclasa con la formación del cAMP y la activación de cAMP-dependiente de proteína cinasa.
- activación de la proteína-cinasa C.
- un mecanismo regulador de  $Ca^{2+}$ , probablemente por la activación de una proteína cinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina.

El ATP es el agente que activa los tres mecanismos de señalización (Fig. 6) (Andreeva y cols, 2007).



**Figura 6. Vías de señalización implicadas en la regulación de la secreción del surfactante.** Se muestran las principales vías dependientes de las 3 quinasas las cuales son: la PKA, PKC y CaMK, así como la acción de varios simuladores farmacológicos. Las líneas discontinuas indican las vías con intermediarios desconocidos y / o confirman las funciones fisiológicas de GLP-1, péptido similar al glucagón 1; PAF, factor activador de plaquetas; GRP, péptido liberador de gastrina; DAG, diacilglicerol; LXR, receptor X del hígado; RXR, receptor de ácido retinoico (Tomado de Andreeva y cols. 2007).



## PROTEÍNAS DEL SURFACTANTE

### PROTEÍNA DEL SURFACTANTE A (SPA)

La SPA es la más abundante, pertenece a la familia de las colectinas caracterizadas por tener un dominio de tipo colágeno. Es una molécula muy compleja con 18 cadenas peptídicas enlazadas entre sí en forma helicoidal. Su peso molecular es de 26 kDa. y consta de 248 aminoácidos (hidrofílica) (Fig. 7), por lo tanto la SPA se sintetiza principalmente en los neumocitos tipo II, pero en el pulmón fetal también se expresa en tráquea y otras localizaciones respiratorias (Participa con las restantes SP's en la adhesión de lípidos a la pared alveolar), también se considera un agente protector del factor surfactante frente a proteasas e inhibidores, por lo que su principal función ocurre en alteraciones y situaciones de agresión. Es una pieza fundamental de la inmunidad innata local pulmonar. Se ha señalado su actividad de opsonina, favoreciendo la fagocitosis de bacterias y virus, al menos en herpes e influenza, y produciendo radicales de oxígeno con capacidad bactericida (Blanco Q. 2007).



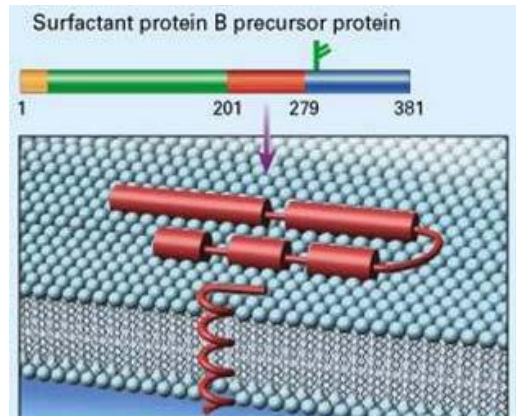
**Figura 7. Estructura cuaternaria de SPA.** La SPA se localiza en el cromosoma 10 y en las células de tipo I y II, su peso molecular es de 26 kDa., consta de 248 aminoácidos, tiene 18 cadenas peptídicas enlazadas entre sí en forma helicoidal, hexamérica y se sintetiza en las células de tipo II (Tomado de Pérez Gil, 2002).

### PROTEÍNA DEL SURFACTANTE B (SPB)

Esta proteína tiene 11 exones y el RNAm definitivo codifica un péptido de 381 aminoácidos que actúa como molécula pre-activa (proPS-B), luego pierde gran parte de su composición y adquiere la estructura de la SPB madura que tiene 79 aminoácidos, su peso molecular es de 8.7 kDa (hidrofóbica) (Hawgood S. 2004; Fig. 8), la SPB aunque también aparece en epitelio bronquial no ciliado, sólo alcanza funcionalidad plena en los neumocitos de tipo II. Los corticoides son el estímulo más potente conocido, la insulina y el TGF $\beta$  (factor de crecimiento tumoral beta) inhiben la síntesis de esta proteína. Algunas mutaciones ocasionan la ausencia de SPB, otras codifican una pro-SPB anómala, incapaz de convertirse en SPB madura. En ciertas deficiencias de SPB hay cantidades anormales de

SPC indicando una relación funcional entre la síntesis de ambas proteínas (Hawgood S. 2004).

En estudios se ha mostrado que la deficiencia de SPB causa muerte. El primer caso de SDR neonatal letal de causa genética precisamente se debió a una deficiencia de SPB, para que haya repercusión clínica se precisa la afectación de ambos alelos, por consiguiente el patrón de herencia es autosómico recesivo. En ratones heterocigotos se vieron minusvalías, como peor defensa al trauma oxidativo, lo que no fue comprobado en humanos, aunque los estudios son todavía insuficientes, de momento se continúa aceptando sólo el patrón recesivo (Blanco Q. 2007).

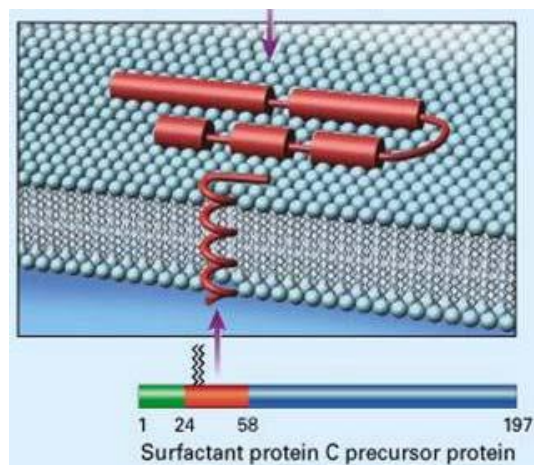


**Figura 8. Estructura cuaternaria de la SPB.** La SPB se localiza en el cromosoma 2 y en las células de tipo I y II, su peso molecular es de 8.8 kDa., consta de 79 aminoácidos, se presenta en forma de dímeros unidos por cadenas de disulfuro y se sintetiza en las células de tipo II (Tomado de Glasser y cols. 1990).

## PROTEÍNA DEL SURFACTANTE C (SPC)

La proteína SPC tiene 191 aminoácidos y corresponde a la pro-SPC que posteriormente se modifica y se convierte en la forma activa (SPC) de 34 aminoácidos en los cuerpos lamelares de los neumocitos de tipo II y su peso molecular es de 3.7 kDa (hidrofóbica) (Glasser y cols. 1990; Fig. 9).

Estudios realizados en ratones transgénicos sin gen SPC no desarrollan enfermedad pulmonar neonatal y en la mayoría la alteración aparece en la edad adulta (Weaver y Whitsett. 1991). Se supone que la ausencia de SPC madura causa inestabilidad alveolar y con ello atelectasias recurrentes, inflamación y eventual fibrosis, pero hasta ahora solo se comprobó la alteración de la pro-SPC, sin datos concluyentes sobre los niveles de SPC, aunque se habla de una influencia genética “*negativa-dominante*” que acelera la degradación de la pro-SPC sin ocasión de madurar a SPC. Otro posible mecanismo de enfermedad, que gana adeptos, es que cualquiera de las dos moléculas (pro-SPC y SPC) en su anómala expresión estructural se comporten como tóxicos, quizás por su elevada hidrofobia (Weaver y Whitsett. 1991).



**Figura 9. Estructura cuaternaria de la SPC.** La SPC se localiza en el cromosoma 8 y en las células de tipo I y II, su peso molecular es de 3.7 kDa., consta de 34 aminoácidos y se sintetiza en las células de tipo II (Tomado de Glasser W. 1990).

## PROTEÍNA SURFACTANTE D (SPD)

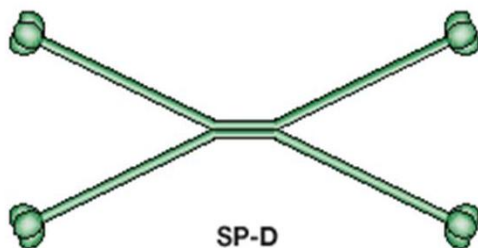
La SPD es similar a la SPA, también es una colectina, consiste en monómeros de 43 kDa que se unen en tetrámeros y luego en polímeros en forma de cruz y consta de 375 aminoácidos (hidrofílica) (Blanco Q. 2007; Fig. 10).

Al contrario de la SPA, la SPD está ampliamente distribuida por los epitelios corporales, pero no solo en el pulmón también en glándulas lacrimales, ovario, útero, estómago, tiroides, corazón o riñón.

La SPD interviene en la mecánica respiratoria y es relevante en la reacción antiinfecciosa. La SPD se adhiere a bacterias y virus, promoviendo su opsonización y fagocitosis por macrófagos; particularmente se adhiere a *Haemophilus influenzae*, *S. pneumoniae*. Interviene en las fases precoces de la infección por neumococo. Es posible que la SPD, y quizás la SPA, además de colaborar con los macrófagos, tengan actividad microbicida, aumentando la permeabilidad de la membrana de algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli K12* y *Enterobacter aerogenes*.

Por otro lado, la SPD protege al pulmón de la inflamación causada por ciertos contaminantes como el ozono (O<sub>3</sub>) y por estrés oxidativo y de la inflamación alérgica; sin embargo no se han descrito deficiencias de SPD en humanos.

En ratones transgénicos sin SPD no se muestran problemas neonatales, pero desarrollan enfisema y tienen tendencia a procesos inflamatorios crónicos con aumento de macrófagos alveolares. La posible participación, primaria o secundaria, de la SPD en patología pulmonar humana todavía no está suficientemente evaluada (Blanco Q. 2007).



**Figura 10. Estructura cuaternaria de la SPD.** La SPD se localiza en el cromosoma 10 y en las células de tipo I y II, su peso molecular es de 43 kDa., consta de 375 aminoácidos, consiste de monómeros que se unen en tetrámeros y luego en polímeros en forma de cruz y se sintetiza en las células de tipo II y células clara (Tomado de Pérez Gil, 2002).

En el **cuadro 1** se muestran las características generales de las proteínas mas estudiadas contenidas en el surfactante pulmonar.

**Cuadro 1. Características de las proteínas contenidas en el surfactante pulmonar**  
(Tomado de Cullen y cols. 2007).

Proteína	Origen	Tamaño	Función
SPA	Cromosoma 10 Células tipo I y II	26 kDa.	Ayuda a formar la mielina tubular. Promueve la fagocitosis Opsoniza y regula la producción de citocinas
SPB	Cromosoma 2 Células tipo I y II	8.8 kDa.	Tiene un rol en la unión de la membrana, en su lisis, fusión y en la adsorción de lípidos de la interfase aire-liquido
SPC	Cromosoma 8 Células tipo I y II	3.7 kDa.	Da estabilidad a la monocapa y parte funciones con SP-B Aumenta la resistencia a la inhibición del surfactante pulmonar frente a proteínas plasmáticas.  Facilita la adsorción de los fosfolípidos a la interfase.
SPD	Cromosoma 10 Células tipo I y II	43 kDa.	Contribuye a la estabilidad del fosfatidilinositol. Se une a patógenos y actúa como opsonizador

## *SURFACTANTES SINTÉTICOS PARA USO TERAPÉUTICO (TIPOS)*

Los surfactantes se dividen de acuerdo a su origen: naturales y sintéticos.

**Surfactantes naturales.** Son obtenidos de tejidos pulmonares de bovinos o cerdos. Los comercialmente conocidos como Beractant (survanta) y surfactant TA (Surfacten) tiene lípidos extraídos de pulmón de bovino junto con DPPC, tripalmitoilglicerol y ácido palmítico; en tanto que los que se comercializan como Calfactant (Infasurf), SF-RII (Alveofact) y BLES, provienen del “lavado” de pulmones de bovino que luego son extraídos con cloroformo-metanol (Jiménez y Castellanos. 2009).

El que se conoce como Poractant (curosurf) proviene del pulmón de cerdos y es extraído con cloroformo-metanol y purificado mediante cromatografía de gel líquido para eliminar los lípidos neutros. Este método de purificación tiene el inconveniente de que a gran escala consume grandes cantidades de solventes orgánicos clorados, a pesar de lo cual no logra elevar el contenido de dipalmitoilfosfatidilcolina que equivale a cerca del 33% del contenido del surfactante. Este producto contiene 99% de lípidos polares (fosfolípidos) y 1% de proteínas hidrofóbicas de bajo peso molecular (SPB y SPC) no contiene SPA ni conservadores (Taeusch y Ramírez. 2002).

Todos los surfactantes de origen natural contienen SPB y SPC, pero los extractos de pulmón molidos (survanta y curosurf) tiene menos de 10% de la SPB que se encuentra en los extractos de lavado de pulmón (Jiménez y Castellanos. 2009).

**Surfactantes Sintéticos.** Estos surfactantes contienen una mezcla de fosfolípidos tenso-activos. El colfosceril palmitato (exosurf) tiene 85% de DPPC, 9% de hexadecanol y 6% de tiloxapol. Por otro lado, ALEC (pneumactant) contiene una mezcla de 7:3 de DPPC y fosfatidilglicerol. Es conveniente señalar que el principal agente tenso-activo de los surfactantes artificiales es el DPPC; los otros componentes intervienen facilitando la adsorción de superficie. Los nuevos productos sintéticos se han enfocado en cubrir la desventaja que implicaba para los surfactantes el hecho de no tener proteínas; es así como surge en el comercio el conocido como surfaxin.; es pertinente hacer notar que aunque en los últimos 20 años el exosurf fue el producto tensoactivo más usado y el componente artificial de pulmón expandido (ALEC) se retira del mercado hace poco más de 5 años (**cuadro 2**) (Jiménez y Castellanos. 2009).

**Cuadro 2. Tipos y componentes de los productos comerciales del surfactante pulmonar**  
(Tomado de Jiménez y Castellanos, 2009).

Tipo	Nombre genérico	Componentes
No proteicos (sintéticos)		
Adsurf	Pumactant (Alec)	DPPC PG
Exosurf	Colfosceril palmitato	DPPC
No proteicos (sintéticos)		
Adsurf	Pumactant (Alec)	DPPC PG
Exosurf	Colfosceril palmitato	DPPC
Proteicos (Naturales) H110		Tejido pulmonar porcino
Curosurf	Poractan alfa	Tejido pulmonar porcino
Alveofact	Sr-fi-I	Lavado pulmonar bovino
Bles	Surfactante de extracto lípido bovino	Lavado pulmonar bovino
	Calfactant clse	Lavado pulmonar bovino
Infasurf	Surfactant ta	Pulmón bovino
Newfacten	Beractant	Pulmón bovino homogéneo
Surfacten		Tejido pulmonar bovino
Survanta		Tejido pulmonar bovino
Sintéticos que contienen péptidos recombinantes		
Venticute	Surfactante spcr	DPPC, POPG, PA, SPCr
Surfaxin	Lucinactant	DPPC, POPG, Péptido KL4

Los productos preparados por extracción o lavado de tejidos de animales, todos contiene alrededor de 80% de dipalmitoilfosfatidilcolina y proteínas, como SPB y SPC, sin embargo no tienen SPD, como se puede ver en el **cuadro 3**.

Los productos que contiene proteína C recombinante se extraen de sistemas procarióticos; poseen además péptidos sintéticos como el sinapeltide o péptido KL4, cuyos dominios anfipáticos son similares a la apoproteína B, lo que mejora la función de este producto por su semejanza con el surfactante humano.

### Cuadro 3. Componentes de algunos tipos de surfactante

(Tomado de Jiménez y Castellanos, 2009).

Componentes	Curosurf	Survanta	Alveofact	Exosurf
Fosfolípidos	99%	84%	88%	84%
Triglicéridos	Ausente	6%	8%	Ausente
Apoproteína B	0.2 a 0.3%	<0.1%	1%	Ausente
Apoproteína C	Presente	Presente	1%	Ausente
Aditivos	Ninguno	Dppc		
		Ácido palmítico		
		Tripalmitina		

## *SÍNDROME DE DIFICULTAD RESPIRATORIA (SDR)*

El Síndrome de Dificultad Respiratoria es un estado clínico de origen multifactorial; se caracteriza por una respiración anormal con alteración del intercambio gaseoso, de la oxigenación y de la eliminación del anhídrido carbónico (Castro y cols. 2007); también presenta atelectasia pulmonar masiva con congestión y edema pulmonar (Obladen. 2005); se presenta en recién nacidos prematuros tras el comienzo de la respiración (Behrman y Nelson. 2001).

Su incidencia aumenta inversamente respecto a la edad de gestación de manera que afecta al 60% de los menores de 28 semanas de edad gestacional y a menos del 5% de los mayores de 34 semanas de edad gestacional (González y Omaña. 2006).

El mayor número de casos se produce por afecciones del propio sistema respiratorio, aunque otras veces es secundaria a afecciones cardíacas, nerviosas, metabólicas o musculares (Barranco y cols. 2000).

El SDR es más frecuente en varones; así como en niños de raza blanca, fenómeno que podría ser explicado por otros factores que pudieran influir en la maduración pulmonar (Behrman y Nelson. 2001).

En México, el 20 % de los niños nacidos vivos son prematuros menores de 37 semanas de edad gestacional y de ese porcentaje el 4.4% cursa con dificultad respiratoria (17.7% de muy bajo peso y el 4.34% de extremadamente bajo peso; Datos publicados en el anuario estadísticos del INPer).

Existen factores que se relacionan con la aparición del SDR como son: prematuridad, nacimiento por cesárea, hijo de madre diabética, hemorragia aguda anteparto y segundo gemelo, que en general tienen en común la posibilidad de producir asfixia (Jasso L. 1996).

El parto pretérmino es la causa más frecuente de mortalidad y enfermedad perinatales. Se calcula que es responsable del 75% de las muertes neonatales no relacionadas con malformaciones hereditarias. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al nacimiento del infante pretérmino, como el que ocurre a partir de la semana 20 y hasta la semana 36 de gestación (Rosas y cols. 2008).

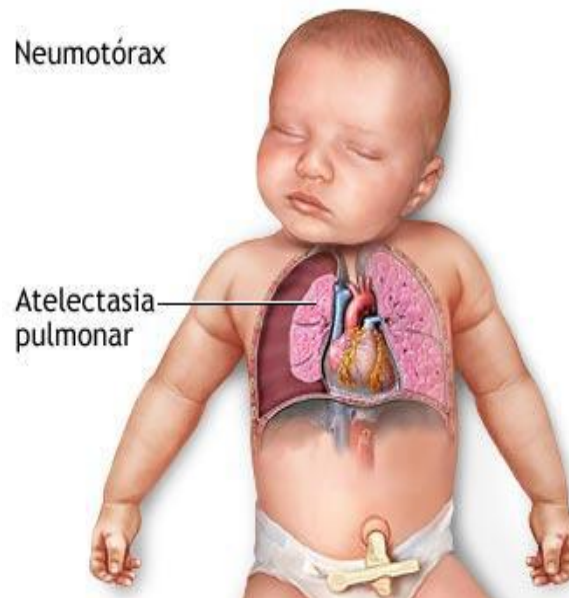
Cualquier deficiencia en la cantidad o en la composición del surfactante pulmonar secretado por las células neumocitos tipo II es causante de atelectasia y daño alveolar, por lo general compromete la integridad espacial de la superficie de la mucosa, necesaria para hacer eficiente el intercambio gaseoso (Martínez y cols. 2007). La deficiencia del surfactante pulmonar ha sido establecida como la



principal causa de falla respiratoria y muerte en infantes con Síndrome de Dificultad Respiratoria (Günther y cols. 2001).

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

El SDR se caracteriza por microatelectasias generalizadas (colapso de los alveolos) causadas por deficiencia de surfactante, que lleva a la insuficiencia respiratoria de evolución progresiva (Fig. 11). (Avery y Mead. 1959)



**Figura 11. Microatelectasias.** El pulmón queda desprovisto de aire y se colapsa formando microatelectasias que llevan a la insuficiencia respiratoria y desarrollo de SDR. (Ilustración tomada de la enciclopedia ADAMS).

## *Epidemiología y Síndrome de Deficiencia Respiratoria en México*

A nivel mundial el 38% de las muertes en menores de 5 años ocurren en el primer mes de vida y en México este porcentaje alcanza el 51% (Cruz Gallardo y cols. 2006). Debido a este hecho, la recomendación internacional de focalizar las acciones en salud en este grupo de edad es muy pertinente para alcanzar las metas planteadas dentro de los Objetivos de Desarrollo del Milenio.

En México, la mortalidad neonatal ha descendido de 17.2 individuos en el año 2000 a 14.2 individuos por cada 1000 nacidos vivos en el año 2004, lo que representa un decremento de 17.4% (Cruz Gallardo y cols. 2006). Sin embargo, el descenso es más acelerado en Nuevo León que en otros estados como Chiapas y Oaxaca, en donde el riesgo de muerte neonatal es 2.3 veces más alto.

Las causas de muerte en el primer mes de vida han cambiado en los últimos años. Mientras en 1980 una de cada cuatro muertes neonatales se asociaba a diarrea o a infección respiratoria, en 2004 menos de 1% de las defunciones se relacionan con esas causas.

En contraste, las afecciones propias del periodo perinatal y las anomalías congénitas han incrementado su contribución. Los problemas respiratorios del recién nacido (síndrome de dificultad respiratoria, hipoxia intrauterina, aspiración neonatal) concentran más de 40% de las defunciones neonatales.

Por otro lado, las infecciones propias del periodo perinatal, fundamentalmente la sepsis bacteriana del recién nacido, representan 15%, las anencefalias y las anomalías congénitas del corazón y de las grandes arterias suman 20%, mientras que la prematuridad contribuye con 7% (Cruz Gallardo y cols. 2006).

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El Síndrome de Dificultad Respiratoria neonatal (SDR) es la causa respiratoria más frecuente de morbi-mortalidad en niños menores de un año de edad, esto predice el riesgo de enfermedad pulmonar crónica en niños mayores.

A pesar de haberse logrado adelantos técnicos, clínicos y de infraestructura en neonatología, la morbi-mortalidad neonatal sigue representando un gran problema de salud, especialmente en el grupo de los que padecen dificultad respiratoria neonatal causado por diversos factores madre-feto que marcan alteraciones en el curso normal del embarazo y parto, repercutiendo en el recién nacido.

Una de las causas principales del Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR) es la inmadurez del pulmón en neonatos pretérmino y deficiencias en el surfactante. En la actualidad diversos investigadores han hecho estudios acerca de las funciones y los mecanismos de acción de los componentes del surfactante y como este se relaciona con las distintas enfermedades respiratorias; las proteínas SPA, SPB, SPC y SPD se sabe que juegan un papel primordial en el buen funcionamiento del surfactante ya que SPA y SPD tiene que ver con la respuesta de defensa innata y SPB y SPC tienen que ver con la formación de la membrana de lípidos.

### III. JUSTIFICACIÓN

El factor surfactante juega un papel muy importante en la homeostasis del pulmón, está involucrado en la actividad tensoactiva en el saco alveolar y en el mantenimiento de la inmunidad innata en el pulmón. La falta de madurez pulmonar en el neonato prematuro lleva implícita la deficiencia en la producción del factor surfactante resultando en Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR), el curso natural del proceso resulta en serias complicaciones inflamatorias e infecciosas posteriores o la muerte, sin embargo, la presencia del SDR en prematuros con un buen desarrollo pulmonar representan un porcentaje de la población cuyo tratamiento cursará con complicaciones respiratorias a posteriori.

En países como México es importante determinar las tasas de morbi-mortalidad perinatal, neonatal e infantil al igual que la materna, aún elevadas en relación a otros países, con la finalidad de establecer estrategias y recomendar alternativas metodológicas que les permitan reducir su prevalencia de SDR, es por eso que se pretende identificar la presencia o ausencia de las proteínas SPA, SPB, SPC y SPD en este estudio, en lavados bronquioalveolares de neonatos pretérminos con síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y entender si existe una relación entre estos resultados y el desarrollo del mismo.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Las proteínas SPA, SPB, SPC y SPD presentes en el factor surfactante de lavados bronquioalveolares de neonatos prematuros se les ha atribuido un papel en la homeostasis lipídica y en el proceso de respuesta inmunológica.

Una modificación en la ausencia de alguna de estas proteínas del surfactante (SP's), presente en el lavado bronquioalveolar de neonatos prematuros podrían contribuir al desarrollo de SDR neonatal.

## **V. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Identificar la presencia de las proteínas SPA, SPB, SPC, y SPD en lavados bronquioalveolares (LBA) de neonatos prematuros con Síndrome de Deficiencia Respiratoria.

### **Objetivos Particulares**

- Estandarizar la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% con lavados bronquioalveolares de conejos sanos para la identificación de proteínas.
- Estandarizar la técnica de Western-Blot para identificar las proteínas específicas (SPA, SPB, SPC y SPD) en muestras de neonato humano con síndrome de dificultad respiratoria.
- Identificar la presencia de las proteínas por la técnica de Western-Blot en lavados bronquioalveolares de neonatos prematuros humanos con Síndrome de Dificultad Respiratoria.

## VI. METODOLOGÍA

### Muestras biológicas

Se recibieron lavados bronquioalveolares (LBA) de neonatos de 28 y 34 semanas de gestación diagnosticados con SDR del (Hospital de la mujer), los LBA de conejo y cerdo fueron obtenidos en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular del Instituto Nacional de Perinatología (INPer). Los conejos (*Oryctolagus cuniculus*) tuvieron un peso 4 kg en promedio y fueron de 3 a 5 meses de edad, hembras prepúberes y adultos.

### Técnica de lavados bronquioalveolares.

Se inmovilizó al conejo, se limpió con alcohol en la zona donde fue inyectado (vena marginal de la oreja) y se le administraron 2 mL de Hidrocloruro de xilacina y ketemina para anestesiarlo. Para la intubación traqueal se introdujo el laringoscopio para exponer la laringe y así identificar las estructuras de la laringe, se introdujo la cánula endotraqueal, enseguida se introdujo la sonda de aspiración y se conectó un aspirador a fin de iniciar la aspiración para la obtención de la muestra correspondiente. Se verificó que la intubación fuera hecha correctamente para que la sonda estuviera en los pulmones y no en el esófago, se le administraron 5 mL de solución salina estéril, después se le introdujo una sonda de menor calibre (3.5 mm) dentro de la anterior para aspirar el pulmón. Este paso se repitió varias veces hasta obtener una cantidad suficiente de lavado bronquioalveolar (aproximadamente 10 mL). Inmediatamente después se centrifugó la muestra a 1500 rpm/min durante 10 min para eliminar las células y recuperar el sobrenadante, el cual se guardó a -70°C hasta su análisis (Fig. 12).



**Figura 12. Intubación endotraqueal,** técnica de intubación endotraqueal de un conejo para realizar un lavado bronquioalveolar con 5 ml. de solución salina.

### ***Cuantificación de proteínas (micrométodo de Bradford-Biorad)***

Se elaboró un blanco con 800  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y 200  $\mu\text{L}$  del reactivo Bradford, y se construyó la curva estándar con 5, 10 15 y 20  $\mu\text{g}$  de albumina estándar (1mg/mL), se ajustó el volumen de los tubos a 800  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo Bradford (Sigma, Australia) (ver apéndice), se agitó y leyó a 595 nm. en un espectrofotómetro (Beckman Coulter Fullerton DU 800, California), después de 5 minutos se determinó la proteína total en cada una las muestras de LBA extrapolarlo en la curva estándar y en función de la dilución de cada muestra.

### ***Preparación de las muestras para Electroforesis en gel de poliacrilamida con sulfatoduodecil de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras.***

#### **Preparación de las muestras para geles al 15%**

Para su preparación se mezcló 20-25  $\mu\text{g}$  de proteína total de LBA con el mismo volumen de Laemli 2x (apéndice) con DTT (Ditiotreitol), y se calentó a 100°C por 5 minutos.

### **Electroforesis**

Se preparó la cámara para los geles de poliacrilamida al 15% con un grosor de 0.75 mm para separar proteínas de entre 10 kDa y 150 kDa. Se pesó una proporción de persulfato de amonio al 10% (ver apéndice) en g y otra de agua desionizada en  $\mu\text{g}$ , se homogeneiza bien.

Se preparó el gel separador (ver apéndice) al 15% de acrilamida/bisacrilamida (30/0.8%) y se vertió en la placa de electroforesis, dejando polimerizar por 15 min. El gel concentrador (ver apéndice) al 4% de acrilamida/bisacrilamida (30/0.8%) y se vertió en la placa de electroforesis, se colocó el peine formador de pozos y se dejó polimerizar 15 min. Se desmontaron los geles y se colocaron en la cámara de electroforesis (marca Biorad) la cual debe contener el buffer de corrida (ver apéndice). Posteriormente se colocaron las muestras en los carriles del gel, así como un marcador preteñido de pesos moleculares 3  $\mu\text{g}$  (marca Biorad). El gel se corrió a un voltaje de 28 mA y 200 Volts y se detuvo justo antes de que se saliera el frente de migración (aprox. 1 hora).



## **Tinción de Plata**

Se colocó el gel en una solución de 40% metanol + 5% formaldehído (10-60 min a temperatura ambiente a 4°C), se realizaron dos lavados de 5 min con H<sub>2</sub>O desionizada (). Se pretrató con una solución de 0.02% de NA<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> con 5 mL de agua desionizada y se dejó el gel durante 1 min. De nuevo se hicieron dos lavados con H<sub>2</sub>O desionizada rápidamente. Se tiñó con una solución de plata preparada en el instante (0.025 g de nitrato de plata al 0.1% en 25 mL de H<sub>2</sub>O desionizada) durante 15 min. Se realizó un lavado rápidamente con H<sub>2</sub>O desionizada, se agregó una solución reveladora (ver apéndice) hasta que se observaron las bandas con la intensidad necesaria, se detuvo la acción del revelador con una solución de 3.5 mL de ácido cítrico 2.3 M.

## ***Western blot***

### **Transferencia húmeda de las proteínas SPA, SPB, SPC Y SPD**

Para la transferencia de las proteínas se cortó la membrana de nitrocelulosa de acuerdo al tamaño del gel y se sumergió junto con el papel filtro, y los cojines de soporte en el buffer de transferencia (ver apéndice) asegurando que han sido completamente empapados, se ensambló el “sándwich” de transferencia con el gel cuidando que no hubiera burbujas entre la membrana y el gel o con el papel filtro, se colocó el “sándwich” de transferencia en la cámara de transferencia con la membrana cerca del electrodo positivo, de tal forma que las proteínas pudieran ser transferidas correctamente, se dejó transferir 1 hora a 100 V/4°C y 250 mA, al siguiente día se tiñó la membrana para observar las proteínas con Rojo Ponceau, se enjuagó la membrana con TBS-T (ver apéndice) por 5 minutos.

### **Bloqueo de la membrana**

La membrana fue sumergida en un volumen suficiente de TBS-T + 5% de leche descremada y se puso a incubar 1 hora a temperatura ambiente, en agitación.

## **Inmunotransferencia**

### **Anticuerpo primario**

Una vez terminado el bloqueo de la membrana, esta se retiró y se enjuagó rápidamente con TBS-T y se le adicionó el anticuerpo primario (ver apéndice) (SPA (N-19) Santa Cruz Biotechnology., SPB (M-20) Santa Cruz Biotechnology., SPC (FL-197) Santa Cruz Biotechnology y SPD (N-14) Santa Cruz Biotechnology a una dilución 1:1000 (BSA Fracción V 0.1 g + azida de sodio al 10% 10 µL + anticuerpo primario 10 µL y se lleva a 10 mL de TBS-T). Se incubó 1 hora a temperatura ambiente, en agitación, se realizaron 6 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T

### **Anticuerpo secundario**

Se sumergió en TBS + Tween 20 + 3% de leche ó albúmina humana + anticuerpo secundario (ver apéndice) goat ó rabbit a una dilución 1:40,000 (BSA fracción V 0.02 g + anticuerpo secundario 0.5 µL y se lleva a 20 mL de TBS-T). Se incubó 1 hora a temperatura ambiente, en agitación. Se realizaron 6 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T, quedando listo para el revelado.

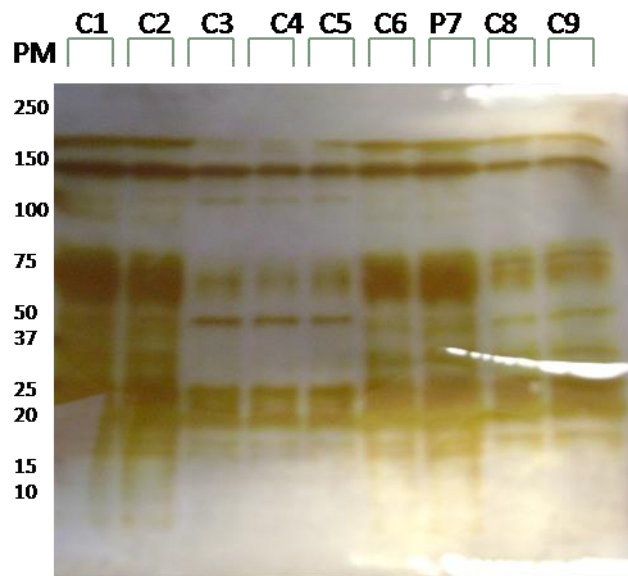
## **Revelado de la membrana**

La membrana de nitrocelulosa fue colocada previamente seca en un vidrio. Se añadieron volúmenes iguales de las soluciones del Enhanced quimioluminescence 400 µL (ECL, Amersham), verificando que cubrieran bien la membrana y se incubó con la mezcla por 1 min - 30 seg, se sacó la membrana, se escurrió y se colocó entre dos acetatos, se colocó en los cartuchos de exposición, en un cuarto oscuro se colocó la película (Hyperfilm, Amersham) se cerró y expuso por 5 minutos, se reveló la película poniéndola primero en solución reveladora (kodak, GBX) y antes de que la película se oscureciera se sacó y enjuagó en agua rápidamente para enseguida ponerla en la solución fijadora (Kodak, GBX) por mínimo 3 minutos.

## VII. RESULTADOS

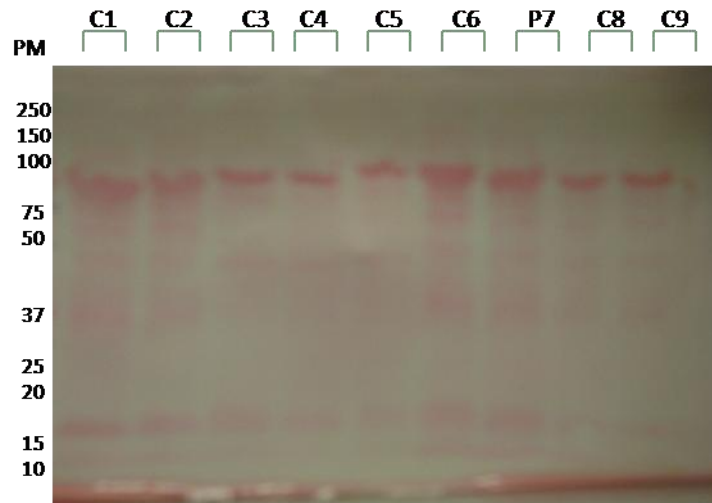
### Estandarización de las técnicas de electroforesis, tinción con plata y transferencia húmeda de proteínas con lavados bronquioalveolares de conejo y porcino.

Para estandarizar la metodología que se utilizó en el análisis de las proteínas de las muestras de LBA de neonatos humanos, el primer paso fue realizar electroforesis con muestras de LBA de animales (conejo y porcino), para comparar y saber si existía un perfil similar de las proteínas de neonato humano. Hay que recordar que los surfactantes naturales exógenos que se utilizan actualmente en la clínica son de origen bovino o porcino. Para esto se realizó la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford. 1976) previo a la separación mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida, y pudimos observar que las muestras de conejo presentaban un patrón proteínico diferente con respecto al de porcino (Fig. 13).



**Figura 13. Patrón de proteínas en LBA de dos diferentes especies.** Gel de poliacrilamida con SDS al 15%. Cada carril representa dos animales diferentes, cada uno con 30  $\mu$ g de proteína total determinada por Bradford de muestras de LBA de conejo (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 y C9) y porcino (P7), y se tiñó con la técnica de plata.

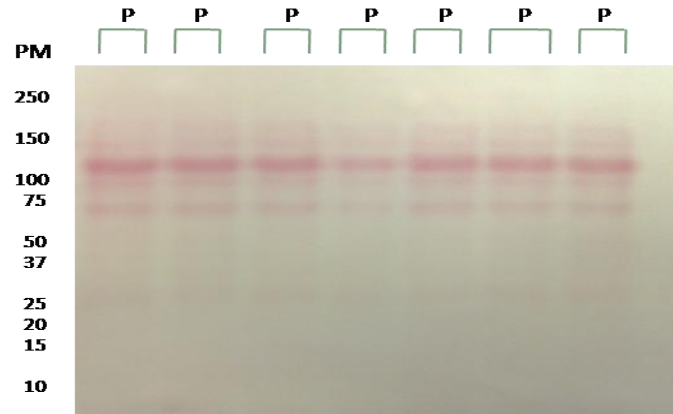
Después de la electroforesis se realizó la estandarización de la transferencia húmeda de las proteínas de las muestras de conejo y porcino para corroborar que la transferencia de proteínas se haya llevado a cabo satisfactoriamente. Posteriormente se tiñeron con rojo ponceau y se observaron las bandas correspondientes a cada una de las proteínas de las muestras que previamente se habían observado. El gel se tiñó con la técnica de plata, y se muestra en la membrana de nitrocelulosa (Fig. 14), es importante mencionar que es necesario este paso ya que de él depende el éxito de la técnica del inmunoblot.



**Figura 14. Membrana de nitrocelulosa muestras de conejo y porcino teñida con rojo ponceau.** Se hizo un gel de poliacrilamida con SDS al 15%. Se procedió hacer la transferencia húmeda de las proteínas de muestras de conejo (C1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 9) y porcino (P7) para corroborar que si se hayan transferido las proteínas y se tiñeron con rojo ponceau.

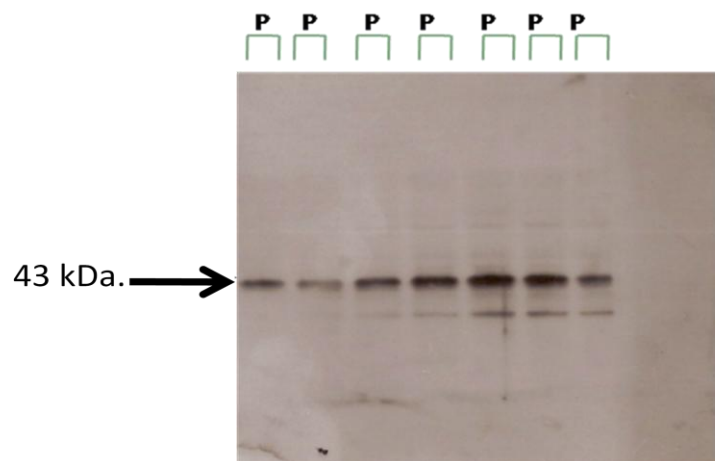
### **Identificación de la proteína SPB en muestra de porcino por inmunoblot.**

Para la identificación de la proteína SPB, primero se realizó la electroforesis de un gel de poliacrilamida con SDS al 15% con muestras de porcino (dato no mostrado) y se procedió hacer la transferencia húmeda de las proteínas y se tiñeron con rojo ponceau, nuestro primer resultado mostró la transferencia de proteínas de las muestras de porcino (Fig. 15). Observándose unas bandas muy ligeras de aproximadamente el peso de la proteína SPB, y posteriormente se realizó el inmunoblot con el anti-SPB para tener la certeza de que realmente se encuentra la proteína que se está buscando en estas muestras.



**Figura. 15. Membrana de nitrocelulosa muestras de porcino teñida con rojo ponceau.** Se hizo un gel de poliacrilamida con SDS al 15%. Se procedió hacer la transferencia húmeda de las proteínas de muestras de porcino (P) para corroborar que si se hayan transferido las proteínas y se tiñeron con rojo ponceau.

En el inmunoblot con el anticuerpo anti-SPB en las diferentes muestras de porcino y revelado mediante quimioluminiscencia (ECL) se observó la presencia de una banda de un peso de aproximadamente de 43 kDa. Siendo esta banda específica para la proteína SPB pero en su forma inmadura ya que corresponde al peso molecular que es de 43 kDa. (dato no reportado en la literatura) (Fig. 16), y partiendo de ese resultado nos indica que la metodología funciona adecuadamente y al probar los siguientes anticuerpos anti-SPA, SPC y SPD, no se observó ninguna banda específica contra esas proteínas.



**Fig. 16. Western blot SPB muestra de porcino (P).** Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida y SDS al 15% y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana con TBST-albúmina, se incubó con el anticuerpo anti-SPB. Después de varios lavados se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-rabbit y revelado mediante quimioluminiscencia en placas hyperfilm Amersham.

### **Cuantificación de la concentración de proteínas de Neonatos Humanos.**

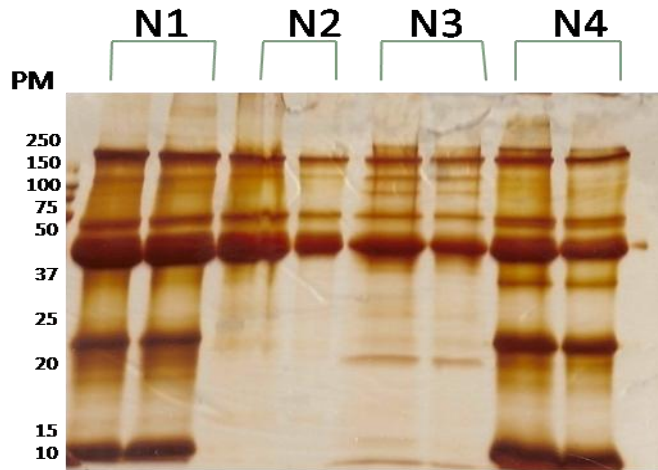
Antes de probar las muestras de LBA de neonato humano con SDR, para la identificación de proteínas SP's, fue necesario cuantificar la concentración de proteína total de las muestras de neonatos por el método de Bradford (Bradford, 1976), obteniendo las siguientes concentraciones (tabla 1). Podemos observar que la diferencia de concentraciones es importante entre los distintos neonatos, pero todas estas concentraciones se ajustan a 15 µg de concentración por pozo.

No. muestra	Proteína total (mg/ml)
N1	5478
N2	2000
N3	606
N4	3996
N5	687
N6	973
N7	703
N8	528
N9	827

**Tabla 1. Determinación de proteínas totales de LBA de neonatos prematuros con SDR**

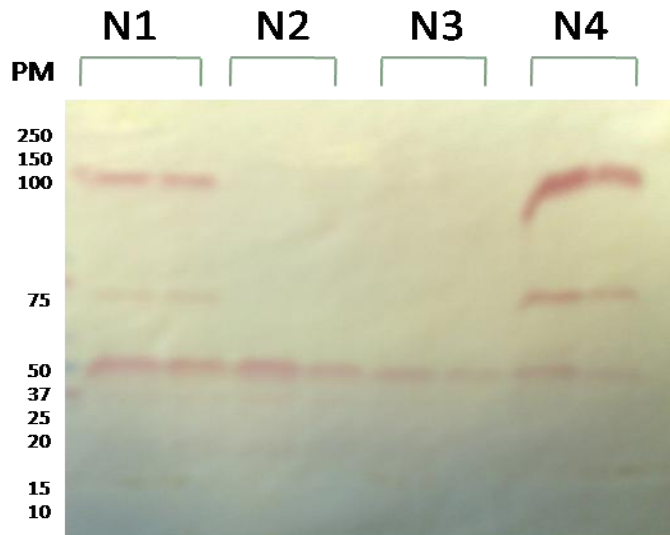
### **Identificación de las SP's en muestras de neonatos con SDR**

Para poder identificar las diferentes proteínas del surfactante pulmonar (SPA, B, C, y D), Se corrió un gel de poliacrilamida con SDS a partir de LBA de cuatro muestras de neonatos con SDR, y se tiño con plata, y se observó el perfil de proteínas totales de las diferentes bandas y dentro de las cuales algunas bandas coinciden con los pesos moleculares a las cuales pertenecen las SP's, por lo tanto la presencia de estas bandas nos dio la pauta para realizar el inmunoblot (Fig. 17). En el gel se observó que la muestra del Neonato 1 y Neonato 4 presenta una cantidad homogénea de proteínas a diferencia del Neonato 2 y Neonato 3 donde se observó que las bandas de menor peso molecular tienen menor cantidad de proteína.



**Figura 17. Perfil de proteínas en LBA de 4 Neonatos diferentes.** Gel de poliacrilamida con SDS al 15%. Cada dos carriles representan un Neonato diferente, cada uno con 15  $\mu\text{g}$  de proteína total determinada por Bradford. Se realizó una tinción de plata para proteínas totales.

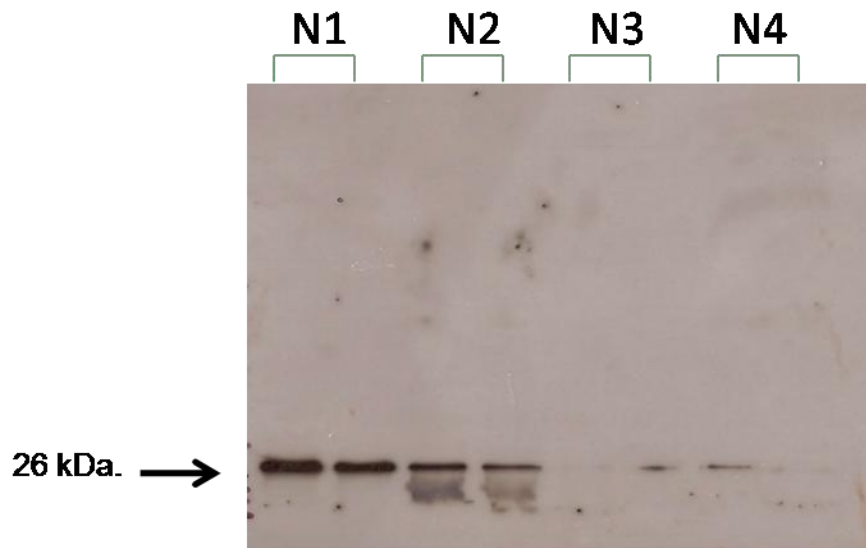
En la transferencia húmeda de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa de de las cuatro muestras de Neonatos con SDR la cual fue teñida con rojo ponceau se demuestra que efectivamente si hay proteínas y que fueron transferidas correctamente ya que corresponden al peso molecular de las proteínas (Fig. 18).



**Figura 18. Membrana de nitrocelulosa de muestras de 4 Neonatos, teñida con rojo ponceau.** Se hizo un gel de poliacrilamida con SDS al 15%. Se procedió hacer la transferencia húmeda de las proteínas de muestras de Neonatos con SDR para corroborar que si se hayan transferido las proteínas y se tiñeron con rojo ponceau y efectivamente si hay proteínas.

## Identificación de las SP's por Inmunoblot

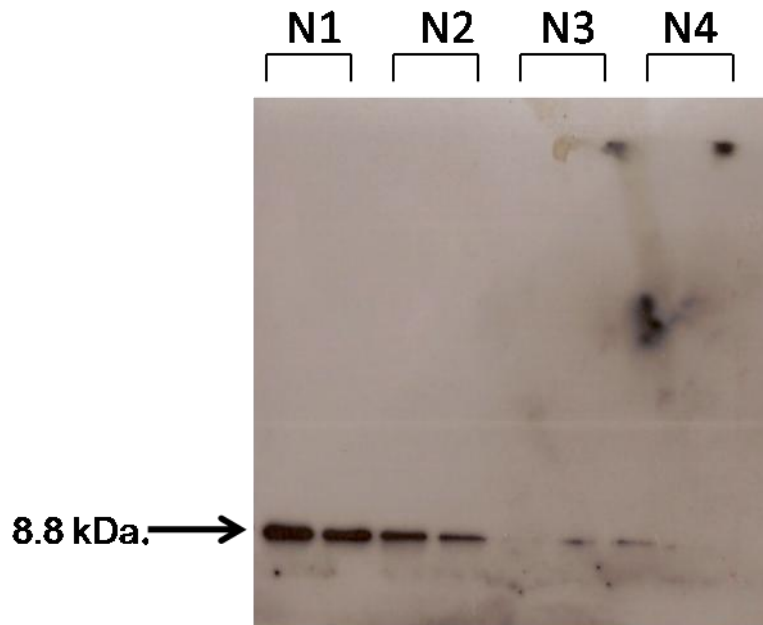
Se realizaron inmunoblot's para la identificación de las cuatro SP's, utilizando anticuerpos específicos, (Anticuerpo primario SPA goat polyclonal Santa Cruz (sc7700); Anticuerpo primario SPB goat polyclonal Santa Cruz (sc7703); Anticuerpo primario SPC rabbit polyclonal Santa Cruz (FL19713979); Anticuerpo primario SPD goat polyclonal Santa Cruz (N14-7709) dirigidos contra las proteínas (SPA, SPB, SPC, y SPD) de muestras de LBA de neonatos humanos con SDR y se detectaron las bandas para la identidad de estas proteínas. Primero se realizó un inmunoblot utilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína SPA y revelada mediante quimioluminiscencia (ECL) con una exposición de 5 minutos en placas hyperfilm, mostrando el resultado que en el neonato 1 y neonato 2 contenían banda que corresponde al peso molecular de SPA que es de aproximadamente 26 kDa, como se reporta en la literatura (Blanco Q., 2007); sin embargo en los Neonatos 3 y 4 la banda que corresponde a la proteína SPA se ve muy ligeramente (Fig. 19).



**Figura 19. Inmunoblot anti-SPA de LBA de Neonatos Humanos con SDR.** Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida y SDS al 15% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana con TBST-albúmina, se incubó con el anticuerpo anti-SPA. Después de varios lavados se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-donkey y revelado mediante quimioluminiscencia en placas hyperfilm Amersham. La flecha indica el peso molecular de 26 kDa.



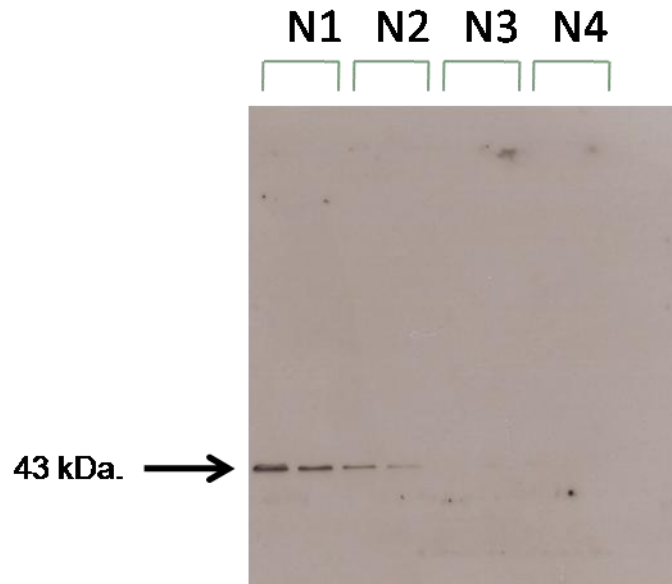
Se realizó otro inmunoblot de estas mismas muestras utilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína SPB y se observó en el Neonato 1 y 2 tienen una sola banda que corresponde al peso molecular que es de 8.8 kDa, como se reporta en la literatura (Cullen y cols. 2007) la cual fue revelada mediante quimioluminiscencia (ECL) con una exposición de 5 minutos en placas hyperfilm Amersham; sin embargo en los Neonatos 3 y 4 la proteína SPB se ve muy ligeramente como se observó para el caso de la proteína SPA en el experimento anterior (Fig. 20).



**Figura 20. Inmunoblot anti-SPB de LBA de Neonatos Humanos con SDR.** Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida y SDS al 15% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana con TBST-albúmina, se incubó con el anticuerpo anti-SPB. Después de varios lavados se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-donkey y revelado mediante quimioluminiscencia en placas hyperfilm Amersham. La flecha indica el peso molecular de 8.8 kDa.

Es importante mencionar que al realizar el experimento con estas mismas muestras, utilizando el anticuerpo anti-SPC, no se observó ninguna banda de reconocimiento.

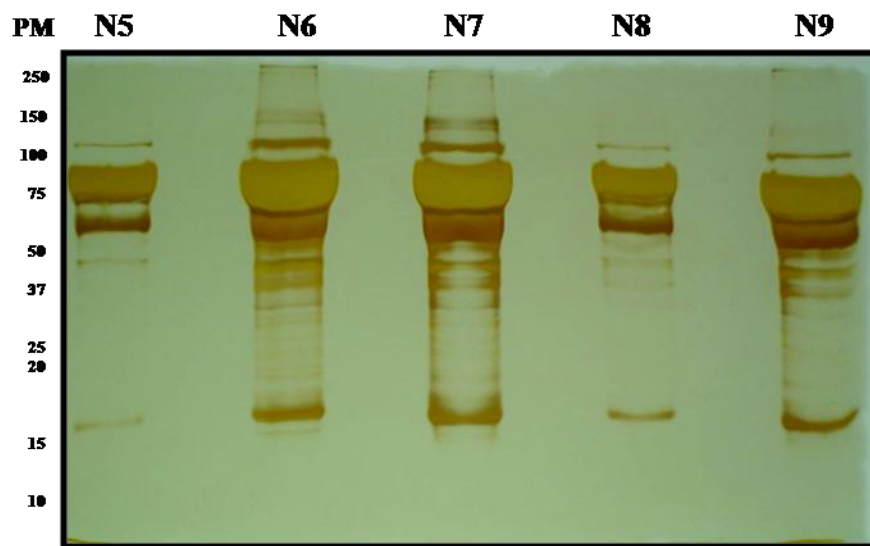
Se realizó otro inmunoblot de estas mismas muestras utilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína SPD y se observó en el Neonato 1 y 2 que presentan una sola banda que corresponde al peso molecular que es de 43 kDa, como se reporta en la literatura (Blanco Q. 2007) la cual fue revelada mediante quimioluminiscencia (ECL) con una exposición de 5 minutos en placas hyperfilm Amersham; sin embargo en los Neonatos 3 y 4 no se observó la banda que corresponde a la proteína SPD (Fig. 21).



**Figura 21. Inmunoblot anti-SPD de LBA de Neonatos Humanos con SDR.** Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida y SDS al 15% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana con TBST-albúmina, se incubó con el anticuerpo anti-SPD. Después de varios lavados se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-donkey y revelado mediante quimioluminiscencia en placas hyperfilm Amersham. La flecha indica el peso molecular de 43 kDa.

Se procedió a analizar diferentes muestras a las anteriores (N5 a N9) de LBA de neonatos con SDR en un gel de poliacrilamida con SDS, teñido con plata, y se observó la presencia de bandas, lo cual nos indica que contienen el perfil de proteínas totales a las observadas en las primeras muestras y que se encuentran las diferentes SP's (Fig. 22). En este gel se observó que los Neonatos 6, 7 y 9 presentan bastante cantidad de proteínas y los Neonatos 5 y 8 se observó que las bandas de menor peso molecular tienen menor cantidad de proteína.

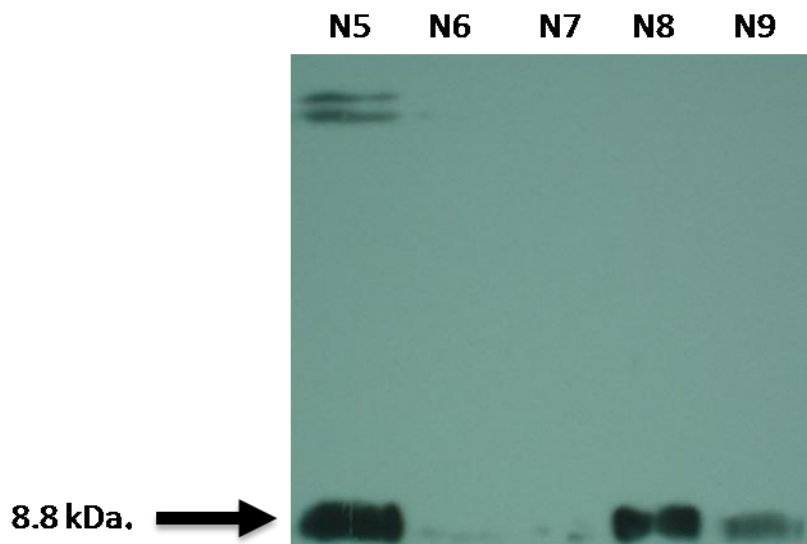
Es importante mencionar que se procedió de esta manera ya que las primeras muestras se utilizaron como parte de la estandarización de la metodología, por lo tanto era necesario probar diferentes muestras de la misma especie, que en este caso se trataba de neonatos humanos.



**Figura 22. Perfil de proteínas en LBA de 5 Neonatos diferentes.** Gel de poliacrilamida con SDS al 15%. Cada carril representa un Neonato diferente, cada uno con 15  $\mu$ g de proteína total determinada por Bradford. Se realizó una tinción de plata para proteínas totales.

Se realizaron experimentos de inmunoblot probando el anti-SPA con estas muestras y no hubo ningún reconocimiento de la banda correspondiente a 26 kDa.

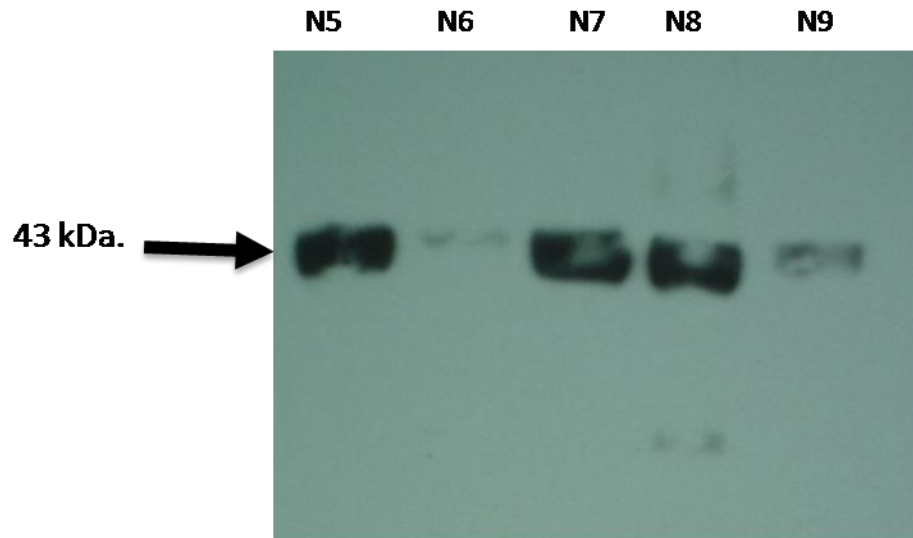
Enseguida se realizó un inmublot con 5 muestras de diferentes Neonatos utilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína SPB y se observó que la muestra de Neonato 5 presenta una banda bien definida correspondiente a la proteína de SPB, el Neonato 6 y 7 presentaron una banda ligeramente definida, y el Neonato 8 de igual forma presenta una banda bien definida y la 9 menos definida, la presencia de estas bandas corresponden al peso molecular de aproximadamente 8.8 kDa. de SPB como se reporta en la literatura (Cullen y cols. 2007), esta membrana fue revelada mediante quimioluminiscencia (ECL) con una exposición de 5 minutos en placas hyperfilm (Fig. 23).



**Figura 23. Inmublot anti-SPB de LBA de Neonatos Humanos con SDR y Conejo.** Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida y SDS al 15% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana con TBST-albúmina, se incubó con el anticuerpo anti-SPB. Después de varios lavados se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-donkey y revelado mediante quimioluminiscencia en placas hyperfilm. La flecha indica el peso molecular de 9 kDa.

En la identificación de la proteína SPC, utilizando el anticuerpo anti-SPC, con las muestras de neonato no se observó ninguna banda de reconocimiento.

Para identificar a la proteína SPD se utilizó el anticuerpo anti-SPD lo cual se procedió a realizar un inmublot con las 5 muestras los diferentes neonatos y se observó que en el Neonato 5 se ve muy bien la banda; el Neonato 6 muy ligeramente se ve la banda; el Neonato 7 y 8 tienen muy marcada la banda y el Neonato 9 se ve la banda ligeramente, y estas bandas corresponden al peso molecular que es de 43 kDa, como se reporta en la literatura (Blanco Q. 2007) la cual fue revelada mediante quimioluminiscencia (ECL) con una exposición de 5 minutos en placas hyperfilm (Fig. 24).



**Figura 24. Inmublot anti-SPD de LBA de Neonatos Humanos con SDR y Conejo.** Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida y SDS al 15% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana con TBST-albúmina, se incubó con el anticuerpo anti-SPD. Después de varios lavados se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-donkey y revelado mediante quimioluminiscencia en placas hyperfilm. La flecha indica el peso molecular de 43 kDa.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los datos mostrados en la estandarización de los geles de poliacrilamida con las especies animales (porcino y conejo) mostraron que aunque existe una ligera diferencia en los patrones de proteínas, se observaron bandas correspondientes al peso molecular de las proteínas SP's y a las que correspondieron a las muestras de neonatos humanos mostraron una diferencia marcada en algunas bandas correspondientes al mismo peso de estas proteínas. Uno de los objetivos principales de este estudio, fue tratar de identificar la presencia o ausencia de las cuatro proteínas más estudiadas en este tipo de pacientes con SDR, sin embargo el resultado mostrado en la figura 16 sólo se pudo identificar la SPB en muestras de porcino; por otro lado los resultados que fueron mostrados por inmunoblot en la figuras 19, 20 y 21 se logró identificar a las proteínas SPA, SPB y SPD en LBA de las primeras cuatro muestras de neonatos prematuros con SDR, utilizando anticuerpos dirigidos contra las proteínas SPA, SPB, SPD, cuyo peso molecular corresponde al reportado en la literatura (Blanco Q., 2007 y (Cullen y cols. 2007).

La SPC no se identificó en estas muestras, posiblemente a que el anticuerpo utilizado (Goat Anti-Rabbit HRP) no reconoció a esta proteína o por el tamaño tan pequeño que es de aproximadamente 3.7 kDa en su forma madura y se haya salido del gel de electroforesis como se reporta en la literatura (Glasser y cols. 1990), en la figura 17 se mostraron las muestras de neonatos y la presencia de bandas más pequeñas donde se observan ligeramente, esto pudiera ser que la concentración es más baja y por lo tanto tienen una menor cantidad de proteína. Otra de las posibilidades es que los datos clínicos del paciente dependen del desarrollo de la patología de SDR, edad gestacional o al nivel del desarrollo del SDR.

Diferentes autores proponen que la ausencia de SPC madura causa inestabilidad alveolar y con ello atelectasias ocurrentes, inflamación y fibrosis pero hasta ahora sólo se ha comprobado la alteración de la pro-SPC en modelos animales, sin datos concluyentes sobre los niveles de SPC, aunque se habla de una influencia genética "negativa dominante" que acelera la degradación de la pro SPC sin ocasión de madurar a SPC (Weaver y Whitsett, 1991).

La presencia de la proteína SPB está mostrando una baja concentración en el inmunoblot y es por esa razón que las bandas se observen más ligeras en cuanto a su concentración, es importante mencionar que en la literatura los estudios más recientes han sugerido que estas proteínas SPB y SPC en conjunto juegan un papel en la conformación y estabilización de la formación de la membrana de lípidos para que estas tengan un funcionamiento adecuado en la disminución de la tensión superficial entre la interfase aire-agua, para el caso de estas muestras se

podría suponer que no se pudiera estar formando adecuadamente la membrana hialina en pacientes con SDR severo; sin embargo la proteína SPB se considera la más importante del sistema surfactante ya que remueve de forma selectiva especies de lípidos aniónicos e insaturados de la película formada por fosfolípidos en la superficie alveolar y se ha demostrado en estudios que la deficiencia de esta proteína causa dificultad respiratoria letal y es causada por ausencia del gen involucrado en su síntesis y por lo tanto no hay posibilidades de vida (Nogee, 1994).

La identificación de las proteínas SPA y SPD como se muestra en la figura 19 y 21, presentan las bandas más intensas lo cual podría indicar que dichas proteínas se expresan más, posiblemente a que forman parte de la respuesta inflamatoria, se ha mostrado que la proteína SPA ayuda a la formación de la mielina tubular con un rápido envío de fosfolípidos a la interfase y produce una disminución de la tensión superficial (Blanco Q. 2007), y la proteína SPD participa en el mecanismo de defensa pulmonar contra patógenos potenciales (virus, bacterias y hongos) sin embargo en el caso de esta proteína pudiera sugerirse que el paciente una vez ya intubado echa andar diferentes mecanismos de defensa como el caso de respuesta inflamatoria por el trauma de que se introduce la sonda endotraqueal y posteriormente y dependiendo de los días en que el paciente este en terapia intensiva pudiera cursar por un cuadro infeccioso.

En los datos obtenidos en los inmunoblots para las proteínas SP's, en especial en las muestras de los neonatos 1 y 2 las bandas correspondientes a las proteínas SPA, SPB y SPD se observan más intensas y esto podría deberse a que posiblemente podrían estar más involucradas dichas proteínas en estos neonatos o también que el desarrollo de SDR en esos neonatos es diferente a los pacientes 3 y 4 en donde se observa que las bandas de las proteínas SPA y SPB son muy ligeras, ya que probablemente el SDR pudiera estar cursando por una etapa más complicada y están menos involucradas esas proteínas; sin embargo la SPD en los neonatos 3 y 4 hay ausencia de esa proteína lo cual pudiera sugerir que el cuadro infeccioso no está desarrollándose.

Fue posible probar muestras diferentes a las utilizadas anteriormente, y se observó en las figuras 23 y 24 que en los neonatos 5, 7 y 8 las proteínas SPB y SPD se ve muy intensas las bandas, lo cual sugiere que posiblemente el desarrollo de SDR en estos neonatos podría estar cursando por una severidad más marcada y por lo tanto las proteínas están más involucradas y en los neonatos 6 y 9 la banda se ve ligeramente y esto posiblemente el SDR es menos severo y están menos involucradas estas proteínas, es importante mencionar que la mayoría de los estudios muestran datos de mezclas o pools y concluyen en general el comportamiento de estas proteínas, para el caso de este trabajo se

trato de identificar individualmente a cada una y la falta de datos clínicos específicos de cada uno de los pacientes solo hacen suponer el papel que están jugando cada una de ellas, lo cual no deja de ser importante los datos obtenidos hasta este momento, ya que en la actualidad no existen datos de estudios con este tipo de pacientes y en específico con esta patología, es importante mencionar que en la clínica se están avocando a darle más importancia a la displasia broncopulmonar neonatal ya que esta tiene una presencia del 80% en neonatos prematuros de bajo peso y que tienen más de 7 días intubados en terapia intensiva, también es importante mencionar que para las muestras probadas de conejo la presencia de esas proteínas se observan ligeramente y esto podría deberse al bajo contenido de la concentración de proteínas, y por otra parte a que los anticuerpos probados de Santa Cruz no son tan específicos para la especie de conejo.

La prematurez neonatal y el desarrollo de SDR son los factores que mayor peso han tenido para el estudio de estas proteínas, el manejo clínico de cada paciente juega un papel importante y esto podría ser la causa de que en los otros neonatos con SDR se observe una menor cantidad de proteínas totales si lo comparamos con experimentos como el que realizó Lindahl (Lindahl y cols. 1999) en donde analizaron LBA de adultos fumadores y no fumadores y encontraron que las proteínas SPA y SPD se encontraban alteradas (menos expresadas) ya que tiene que ver con la respuesta inmunológica. Por otro lado, estos autores realizaron sus experimentos en geles mucho más grandes, lo que permite una mejor separación de las proteínas.



## IX. CONCLUSIONES

- ❖ Se estandarizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% con lavados bronquioalveolares de conejos sanos para la identificación de proteínas.
- ❖ Se estandarizó la técnica de Western Blot para identificar las proteínas específicas (SPA, SPB, SPC y SPD) en muestras de neonato humano con SDR.
- ❖ Se logró la identificación de las proteínas del surfactante pulmonar SPA, SPB y SPD en los lavados bronquioalveolares de neonatos prematuros humanos con SDR y esto nos permitió concluir que las proteínas se expresan de diferente forma dependiendo de la presencia y severidad del desarrollo del Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR), lo cual pueden contribuir al entendimiento de esta patología en este tipo de pacientes ya que se les ha atribuido un papel en la homeostasis lipídica y en el proceso de respuesta inmunológica.
- ❖ La SPC no fue identificada en ninguna de las muestras, posiblemente porque el anticuerpo utilizado (Goat Anti-Rabbit HRP) no reconoció a esta proteína, por el tamaño tan pequeño de esta proteína que es de aproximadamente 3.7 kDa en su forma madura y debido a esto se haya salido del gel o no se haya expresado esa proteína o también por la concentración haya sido muy baja.
- ❖ El peso de las proteínas fue identificado de acuerdo al mencionado en la literatura en condiciones reductoras, aunque no se encontraron las cuatro proteínas en todas las muestras analizadas, esto puede deberse a la historia clínica de cada paciente, así como edad gestacional o el nivel de desarrollo de SDR que presentó.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Andreeva AV, Kutuzov MA, Voyno-Yasenetskaya TA, 2007 Aug. Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 293(2):L259-71.
- ❖ Avery, M. E., y J. Mead. 1959. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *AMA J Dis Child* 97(5, Part 1):517-23.
- ❖ Barranco F, Blasco J, Mérida A, Muñoz MA, Jareño A, Cozar J, 2000. Principios de urgencias, emergencias y cuidados críticos. Andalucía: Editorial Alhulia.
- ❖ Blanco A. Quirós, 2007. Deficiencia genética de proteínas surfactantes y patología pulmonar, *Boletín pediátrico*, 47 (SUPL.2): 38-47.
- ❖ Blanco H. O., 2004. Propiedades Antiinflamatorias del surfactante pulmonar y su aplicación en la clínica, *Biotecnología Aplicada*; 21:70-76.
- ❖ Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- ❖ Behrman, Nelson R., 2001. Tratado de Pediatría. Edición 14, 463-469.
- ❖ Campos A. E., Ogas M. y Rammacciotti S., 2006. Surfactante exógeno y Síndrome de Dificultad Respiratoria en recién nacidos prematuros. Servicio de Neonatología. Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología. Facultad de Ciencias Médicas. UNC, Septiembre.
- ❖ Casado E. J. M., 1994. Interacciones lípido-proteína en el complejo lipoproteico del surfactante pulmonar. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Depto. de Bioquímica y Biología Molecular. Dr. en Ciencias biológicas, Vº B.-. Mayo.
- ❖ Castro L. F. W., Labarrere C. Y., González H. G., Barrios R. Y., 2007. Factores de riesgo del Síndrome de Dificultad Respiratoria de origen pulmonar en el recién nacido. *Revista Cubana Enfermer*; 23(3). Hospital Ginecoobstétrico "Ramón González Coro". La Habana Cuba.

- ❖ Clements J. A. and Avery M., 1998, Lung surfactant and neonatal respiratory distress syndrome, *Am J. Respir Crit Care Med*, Vol., 157, pp S59-S66.
- ❖ Cruz G. C. M., Robles Calvillo V. H., Osorio Amezcua C., 2006. Perfil Epidemiológico de la mortalidad neonatal en Tabasco, México. Vol. 5 No.3 septiembre-diciembre. *Horizonte sanitario*.
- ❖ Cullen B. P. J., Guzmán Cisneros B., Matías Martínez D. R., Martínez Alcazar M. A., 2007. Surfactante pulmonar. Septiembre- octubre. Vol.15 No.85.
- ❖ Diemel R. V., 2002, Surface activity of pulmonary surfactant protein B From biophysical properties to clinical application, Ph.D. thesis, with summary in Dutch Utrecht University, the Netherlands, January 2002.
- ❖ Glasser S. W. R. Korfhagen., D. Bruno M., Dey C. and Jeffrey A. Whitsett, 1990. Structure and Expression of the Pulmonary Surfactant Protein SPC Gene in the mouse. *The Journal of Biological Chemistry.*, Vol. 265, No. 35, Decembre 15, pp 21986-21991.
- ❖ González A. C., Omaña M. F. A., 2006. Síndrome de Distrés Respiratorio neonatal o enfermedad de membrana hialina. *Bol. Pediatr*; 46(SUPL 1); 160-165. Servicio de Pediatría. Unidad de Neonatología. Hospital Universitario Río Hortega Valladolid.
- ❖ Günther A, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walmrath D and Seeger W, 2001. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome, *Respir Res.*, (2) 353-364.
- ❖ Hawgood S., 2004. Surfactant Protein B: Structure and Function. *Biology of the Neonate*; 85(285-289) June 8. Department of Pediatrics and Cardiovascular Research Institute, University of California San Francisco, Calif., USA.
- ❖ Jasso G. L., 1996. Síndrome de dificultad respiratoria en el recién nacido. México DF: Intersistemas S.A.
- ❖ Jiménez J. J. R., Castellanos Reyes K., 2009. Desarrollo científico del surfactante pulmonar. *Revista Mexicana de Pediatría*. Vol. 76, Núm, 6. Noviembre-Diciembre.

- ❖ Lindahl, M., J. Svartz, and C. Tagesson. 1999. Demonstration of different forms of the anti-inflammatory proteins lipocortin-1 and Clara cell protein-16 in human nasal and bronchoalveolar lavage fluids. *Electrophoresis* 20(4-5):881-90.
- ❖ Martínez M, Muñoz S, Baeza R, 2007, Asociación molecular y función del agente tensioactivo pulmonar de ternera, *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(2):237-45.
- ❖ Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, de Mello DE, 1994. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin. Invest.* 93:1860-3.
- ❖ Obladen M., 2005. History of surfactant up to 1980. *Biol. Neonate*; 87(4);308-316.
- ❖ Pérez-Gil J, Keough M. W, 1998, Interfacial properties of surfactant proteins, *Biochimica et Biophysica, Acta* 1408:203-217.
- ❖ Perez-Gil, J. 2002. Molecular interactions in pulmonary surfactant films. *Biol Neonate* 81 Suppl 1:6-15.
- ❖ Pérez Gil J., 2010. El Sistema Surfactante Pulmonar. *Investigación y Ciencia*, febrero. 38-45.
- ❖ Pinheiro R. L. P., Albuquerque Diniz E. Ma., 2007. The importance of surfactant on the development of neonatal pulmonary diseases. *Clinics*; 62(2):181-90.
- ❖ Ramanathan R, 2006. Surfactant therapy in preterm infants with respiratory distress síndrome and in near-term or term newborns with acute RDS, *Journal of Perinatology*, 26, S51-S56.
- ❖ Rosas C, Mendoza M, Escobedo A, 2008. Efecto de inductores de madurez pulmonar fetal, *Revista de especialidades médico-quirúrgicas*, 13(4):181-5.
- ❖ Scanlon V.C., Sanders T., 2007. *Essentials of Anatomy and Phisiology*, 5ta. Ed., F.A. Davis Company, USA, 603:344.
- ❖ Singh, G., y S. L. Katyal. 2000. Clara cell proteins. *Ann N Y Acad Sci* 923:43-58.

- ❖ Taeusch, LU, Ramirez S, 2002, Improving pulmonary surfactants, Acta Pharmacologica Sinica, USA, suplement 23:11-15.
- ❖ Travieso N. Ma. del C, 2006. Después de medio siglo de estudio del Sistema Surfactante.
- ❖ Travieso N. Ma. del C, Blanco H. O, 2009. Relación entre mecanismos involucrados y dianas terapéuticas en el síndrome de dificultad respiratoria agudo. Rev Cubana Invest Bioméd v. 28 n. 2 Ciudad de la Habana abr.-jun.
- ❖ Tortora G. P. Anagnostakos N., 2007. Principios de Anatomía y Fisiología. Sexta Edición. Editorial Harla México. 862-866.
- ❖ Weaver T .y Whitsett J., 1991, Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins, Biochem. J.273, 249-264.

#### OTRAS REFERENCIAS

- ❖ <http://www.aparatoRespiratorio.jpg//losbronquios.alveolar.>
- ❖ <http://escuela.med.puc.cl/publ/AparatoRespiratorio/01Morfologia.html>

## **XI. APÉNDICE**

### **Soluciones para curva patrón de proteínas**

Solución de Bradford (100 mL)

Azul comassie G250 50 mg

Etanol 95% 25 mL

Ácido fosfórico 50 mL

Ajustar a 100 mL con agua desionizada.

### **Solución estándar de albúmina bovina (5.0 mL)**

0.005 g albúmina en 5.0 mL de agua

### **Soluciones para la electroforesis SDS-PAGE**

Solución reguladora 2X Leamly (5 mL)

Solución reguladora de Tris-HCl pH 6.8 1.25 mL

Solución de SDS al 10% 2.0 mL

2-mercapto etanol 0.5 mL

Glicerol 1.0 mL

Solución de azul de bromofenol 0.2% 0.25 mL

### **Solución de azul de bromofenol al 0.2%**

Azul de bromofenol 0.02 g

Agua desionizada 10 mL

**Persulfato de amonio al 10%**

Persulfato de amonio al 10%	0.1 g
Agua desionizada	1.0 mL

**Preparación del buffer superior (0.5 M):**

Para 100 mL

Tris Base-HCl	6.057 g
SDS al 10%	4.0 mL

Ajustar a pH de 6.8

**Preparación del buffer inferior (1.5M):**

Para 100 mL.

Tris Base-HCl	18.71 g
SDS	4.0 mL

Ajustar a pH de 8.8

**Solución monómeros:**

Para 100 mL

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g

### **Preparación del gel separador al 12% (10 mL)**

H <sub>2</sub> O desionizada	3.3 mL
Acrilamida/Bisacrilamida	4.0 mL
Tris pH 8.8	2.5 mL
Persulfato de amonio	100 µL
TEMED	10 µL

### **Preparación del gel concentrador (4.0 mL)**

H <sub>2</sub> O desionizada	2.7 mL
Acrilamida/Bisacrilamida	670 µL
Tris pH 6.8	500 µL
Persulfato de amonio	40 µL
TEMED	5.0 µL

### **Buffer de corrida**

Tris-hidroximetil amino-metano	6.0 g
Glicina	28.8 g
SDS	2 g

### **Soluciones para la tinción con plata**

#### **REVELADOR**

3% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.75 g
0.05% formaldehido	12.5 µL
0.004% NA <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.5 mL, <b>de Tiosulfato de sodio al 0.02%</b>



## **FIJADOR**

Metanol	40 mL
Formaldehido	5.0 mL
H <sub>2</sub> O desionizada	55 mL

## **Soluciones para Western Blot**

### ***Buffer de transferencia***

Tris 25 mM	3.03 g
Glicina	14.4 g
Etanol 20%	200 mL

### **TBS-10X**

NaCl	80 g
KCl	2 g
Tris Base	30 g

Se ajusta el pH a 7.4

### **TBS-TWEEN 0.1%**

TBS 10X	100 mL
Agua desionizada	895 mL
Tween 20	5.0 mL

## **ANTICUERPOS PRIMARIOS**

Anticuerpo primario SPA goat polyclonal Santa Cruz (sc7700)  
Anticuerpo primario SPB goat polyclonal Santa Cruz (sc7703)  
Anticuerpo primario SPC rabbit polyclonal Santa Cruz (FL19713979)  
Anticuerpo primario SPD goat polyclonal Santa Cruz (N14-7709)

### **TBS-T (10 mL)**

BSA Fracción V	0.1 g
Azida de sodio al 10%	10 $\mu$ L
Anticuerpo (1:1000)	10 $\mu$ L

## **ANTICUERPO SECUNDARIO**

### **Anticuerpo secundario goat anti-donkey y anti-rabbit**

TBS-T	20 mL
BSA Fracción V	0.02 g
Anticuerpo (1:40,000)	0.5 $\mu$ L