

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS LA SALUD**

**Identificación de la Proteína SP-A en Aspirados Bronquio
Alveolares de Neonatos Pretérminos con Síndrome de
Dificultad Respiratoria**



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Maria Magdalena Grajeda Mendoza

Ciudad Obregón, Sonora

Junio 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



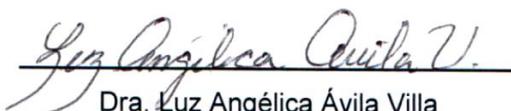
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado calificador designado para revisar el trabajo de tesis de **Maria Magdalena Grajeda Mendoza**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptado como registro parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.



Dr. Joel Arias Martínez
Director



Dra. Luz Angélica Ávila Villa
Secretario



Dr. Luis Daniel López Baldenebro
Vocal



QFB. Sandra Miranda Mauricio
Suplente

Dedicatoria

Por ser ese pilar fundamental de mi vida, por apoyarme en cada etapa de mi vida y ser mis primeros promotores por nunca dejarme vencer y seguir adelante, les agradezco cada uno de sus esfuerzos por apoyarnos a ser todas unas profesionistas a mis tres hermanas y a mí, hoy y siempre les dedico cada uno de mis logros, gracias infinitas Martin y Nachita son los mejores padres y nuestro mejor ejemplo a seguir

Agradecimientos

Agradezco a Dios por haberme permitido llegar a un regazo lleno de amor, y que son mi motor de cada día para ser una mejor persona

A mis tres hermanas Anai, Sarahi y Nahomi por siempre apoyarme e impulsarme a superarme en la vida, a nunca dejarme derrumbar para cumplir cada una de mis metas, son una gran motivación para mi cada una de ustedes por ser unas súper mujeres luchadoras

A mis hermanos Francisco y Luis Felipe por compartir cada una de mis éxitos, por siempre estar en los momentos más importantes

A el Dr. Joel Arias Martínez mi director de tesis por la realización de este proyecto durante estos meses, por siempre motivarme a seguir esforzándome y apoyarme a concluir este proyecto, gracias por su tiempo, accesibilidad y por ser el mejor maestro y un gran ser humano

A mis sinodales Dra. Luz Angélica Ávila Villa, Dr. Luis Daniel Baldenebro y Q. Sandra Miranda por su accesibilidad y su apoyo a la realización de este proyecto

A la Universidad de Sonora por brindarnos la oportunidad de estudiar una licenciatura y ofrecernos a los maestros más preparados

A todo el personal de la universidad por su buen trato y hacer de nuestros días más a menos, pero especialmente a Carlos, Adrián, Margarito, Teresita, Roció, Vero, Ing. Oscar, Rafa

A los maestros que dejaron marcada mi carrera universitaria y fueron un pilar y ejemplo a seguir siempre los llevare en mi corazón Q. Nora López, Q. Armando Lizárraga, Dr. Joel Arias, Dra. Luz Angélica Ávila, Q.Sandra Miranda

A mis amigos que siempre han estado en cada momento de mi vida bueno y malo, les comparto este logro y les agradezco el apoyo incondicional que siempre me han ofrecido a Denisse R, Denisse Panduro, Paola, Cinthya, Luisa, Tadeo, Maritza, Daniela

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS.....	12
General	12
Específicos	13
REVISIÓN DE LA LITERATURA	13
Anatomía y función pulmonar	13
Etapas del desarrollo pulmonar	14
Los pulmones y la membrana pleural	19
Árbol bronquial.....	20
El epitelio alveolar	21
Neumocitos de tipos II	23
Fisiología respiratoria y circulación fetal	24
Cambio de respiración.....	27
Ventilación pulmonar	27
Composición y función del surfactante pulmonar.....	29
Síntesis del surfactante pulmonar	33
Proteína surfactante SP-A.....	34
Síndrome de dificultad respiratoria (SDR)	35
Gastrosquisis	36
METODOLOGÍA	37
Cuantificación de proteínas por el método de BRADFORD	38
Electroforesis	39
Preparación de geles de poliacrilamida en diferentes concentraciones	39
Preparación de las muestras	40
Tinción de plata.....	40

Transferencia de proteínas (TRANS-BLOT).....	41
Revelado.....	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
CONCLUSIÓN.....	39
GLOSARIO.....	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Etapas del desarrollo pulmonar	14
2	Tabla de concentraciones para la determinación de proteínas	37
3	Concentración para la preparación de las muestras	37
4	Preparación de geles de poliacrilamida en diferentes concentraciones	38
5	Concentraciones obtenidas de aspirados bronquio-alveolares	43

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Formación de los pulmones	17
2	Estructura de los pulmones	18
3	Sistema respiratorio y alveolar.	19
	a) Órganos del sistema respiratorio	
	b) Ramificación alveolar	
4	Esquema de la terminación de los bronquiolos en el saco alveolar y la irrigación pulmonar	20
5	Esquema del epitelio alveolar	21
6	Tipo de célula presente en los alveolos	23
7	Esquema de circulación fetal	24
8	Esquema de la ventilación pulmonar	27
9	Intercambio gaseoso	28
10	Composición del contenido de diversos compuestos del surfactante Pulmonar	31
11	Esquema de las proteínas del surfactante pulmonar	32
12	Imagen de bebe con gastrosquisis	35
13	Trampa recolectora de secreciones bronquiales	36
14	Técnica de montaje de Western-blot	40
15	Curva de calibración de espectrofotómetro	42
16	Curva de concentraciones de proteínas	43
17	Gel de poliacrilamida al 12% en tinción de plata	44
18	Western-blot anti SP-A de aspirados bronquio-alveolares	45

ABREVIATURAS

(kDa)	Kilo Dalton
(SDR)	Síndrome de dificultad respiratoria
(SP-A)	Proteína del Surfactante Pulmonar A
(DPPC)	Dipalmitoifosfatidicolina
(PC)	Fosfatidilcolinas
(Hb)	Hemoglobina

RESUMEN

La proteína SP-A es de suma importancia para la inmunidad del pulmón, ya que esta ataca los agentes extraños que entran en las vías respiratorias y llegan hasta los alveolos queriendo causar algún daño, esta proteína se activa y ataca todos esos agentes extraños, además de que esta proteína juega un papel muy importante en la tensión superficial del pulmón ya que se encuentra estrechamente relacionada con los neumocitos de tipo dos, facilitando de esta manera el intercambio gaseoso.

Se demostrado en adultos y en modelos animales la presencia de esta proteína, sin embargo en neonatos con SDR no se ha descrito claramente la presencia de esta proteína, es por ello que es de vital importancia profundizar en estudios científicos para el análisis de esta proteína en aspirados bronquio-alveolares de neonatos que presentan SDR, esto con la finalidad de buscar alternativas de las posibles causas del papel que juega esta proteína en el desarrollo de dicha patología que es SDR.

En la presente investigación se analizaron varias muestras de aspirados bronquio-alveolares de neonatos prematuros de una edad gestacional aproximadamente 32-36 semanas, con las cuales se pudo obtener en los geles de poliacrilamida al 12% marcadores de varias muestras con el peso molecular que presenta dicha proteína, donde con la técnica de western-blot se pudo observar la presencia de la proteína SP-A al momento de obtener las bandas bien definidas.

Entonces podemos decir que los neonatos cuentan también con la presencia de la proteína SP-A con un aumento muy elevando posiblemente por la severidad de la patología que presenta, y como respuesta inmunitaria del pulmón.

INTRODUCCIÓN

El nacimiento prematuro es la causa principal de morbi-mortalidad de neonatos pretérminos. Una de las causas es la inmadurez del pulmón y la ausencia de surfactante pulmonar, como consecuencia se desarrolla el síndrome de dificultad respiratoria (SDR), el cual se caracteriza por una respiración deficiente o nula al momento de la espiración, cuando ocurre el intercambio gaseoso. El surfactante pulmonar se encuentra compuesto principalmente por lípidos y proteínas, y este líquido recubre la superficie alveolar en los pulmones, este reduce la tensión superficial entre el intercambio gaseoso y hace posible la ventilación alveolar, evitando el colapso de los alveolos durante el proceso de espiración.

El surfactante pulmonar se encuentra compuesto por cinco proteínas principales: CC10, SP-A, SP-B, SP-C y SP-D; La proteína SP-A es la más abundante, pertenece a la familia de las colectinas caracterizadas por tener un dominio de tipo colágeno. SP-A se sintetiza principalmente en los neumocitos de tipo II. Es una pieza fundamental de la inmunidad innata pulmonar, se ha señalado la actividad de opsonina, favoreciendo la fagocitosis de bacterias y virus.

El pulmón constituye el órgano respiratorio de los vertebrados terrestres y la mayor superficie en contacto entre éstos y el entorno. La respiración depende críticamente de la estabilización de la superficie de intercambio gaseoso frente a fuerzas físicas que tienden a su colapso. (Pérez Gil, 2011)

El surfactante pulmonar es muy importante para la supervivencia del recién nacido prematuro. Si el volumen de esta sustancia es insuficiente, se eleva la tensión superficial de la membrana aire-agua y existe un gran riesgo de que se produzca el colapso por parte de los alveolos durante la espiración. Como consecuencia sobreviene el SDR. (Salder, 2009)

La SP-A es una glicoproteína hidrofílica altamente conservada, con un peso molecular en condiciones reducidas de 29-38 kDa; en el caso de la SP-A humana está constituida por 248 aminoácidos. Dentro del alveolo existe en forma de un multímero constituido por seis unidades triméricas. (Hernández 2007)

La SP-A tiene la capacidad de enlazar lípidos y carbohidratos e interactuar con receptores específicos de la superficie celular. Su actividad depende del calcio y la cooperación con la SP-B y la SP-C (Sánchez, Torres 2004).

El síndrome de dificultad respiratoria (SDR) en neonatos pretérminos es la causa respiratoria más frecuente de mortalidad en niños menores de un año de edad, esto predice el riesgo de enfermedad pulmonar crónica en niños mayores.

El síndrome de dificultad respiratoria (SDR) es causado por la falta de desarrollo de los pulmones en neonatos pretérminos y por la ausencia de surfactante pulmonar. En la actualidad existen diversas investigaciones acerca de los mecanismos de acción y la función de los componentes del surfactante pulmonar y la relación que se presenta con las patologías respiratorias; la proteína SP-A juega un papel muy importante en la inmunidad innata. Por lo tanto es importante identificar la proteína SP-A en aspirados bronquio alveolares de neonatos pretérminos con síndrome de dificultad respiratoria (SDR), debido a que la ausencia o disminución se encuentra involucrada en problemas respiratorios como lo es el síndrome de dificultad respiratorio (SDR)

OBJETIVOS

General

Identificar a la proteína SP-A en aspirados bronquiales en neonatos pretérminos con síndrome de dificultad respiratoria (SDR).

Específicos

- ❖ Estandarizar la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% con lavados bronquioalveolares de pacientes con Gastrosquisis (control de pulmón sano) y con SDR para la identificación de proteínas.
- ❖ Estandarizar la técnica de Westen-Blot para identificar la proteína SP-A en muestras de neonatos prematuros con síndrome de dificultad respiratoria (SDR)

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Anatomía y función pulmonar

La respiración se define como el intercambio de gases entre el medio externo y el medio interno. Bajo esta definición se incluye no solamente el movimiento de inhalación y exhalación que se da a través de los pulmones, sino también el proceso que se da en el interior de los pulmones hasta llegar a los alveolos, donde se dará a cabo el proceso de homeostasis en la sangre; el transporte del oxígeno mediante el torrente sanguíneo hasta llegar a las células y su posterior difusión a través de las membranas celulares. Todo este proceso permite a las células el consumo de Oxígeno y la liberación del dióxido de carbono. (Noriega, 2011)

El sistema respiratorio se encuentra formado por las estructuras que realizan el intercambio de gases entre la atmosfera y la sangre. El sistema respiratorio se puede dividir en dos partes: vías respiratorias bajas y vías respiratorias altas. El tracto respiratorio superior está conformado por las partes que se encuentran fuera de la cavidad torácica: fosas nasales, nariz, laringe, faringe y tráquea superior, mientras que el tracto respiratorio inferior está conformado por: tráquea inferior y pulmones, los cuales incluyen el árbol bronquial hasta llegar a los alveolos (Figura 1). También forma 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).

La respiración incluye tres funciones principales separadas, pero relacionadas entre sí: ventilación, intercambio de gases y utilización del oxígeno; cada una de estas desempeña una función de vital importancia para el organismo, la ventilación se encarga de la respiración, el intercambio de gases se da entre el aire y la sangre en los pulmones, así como en la sangre y otros tejidos del cuerpo humano y la utilización del oxígeno por los tejidos en las reacciones liberadas de energía de la respiración celular (Ira Fox, 2011)

El sistema respiratorio presenta dos respiraciones interna y externa, de las cuales la respiración externa está dada por el conjunto la ventilación y el intercambio de gases entre el aire y la sangre, y la respiración interna es el intercambio de gases entre la sangre y los tejidos, y la utilización del oxígeno por los tejidos (Ira Fox, 2011)

Etapas del desarrollo pulmonar

Tabla 1.- Etapas del desarrollo pulmonar

Etapa	Edad posconcepcional	Eventos
Embrionaria	0 a 7 semanas	Botón pulmonar, interacción epitelial-mesenquimatosa
Seudoglandular	8 a 16 semanas	División completa de vías aéreas: cartílago, musculo liso; 25 000 bronquiolos terminales
Canalicular	17 a 27 semanas	Capilarización, formación de acinos, neumocitos de tipo I y II
Sacular	28 a 35 semanas	Aplanamiento de las células epiteliales, formación de sáculos terminales
Alveolización	Mayor a 36 semanas	Aparición de alveolos verdaderos
Posnatal	Mayo a 40 semanas	20 divisiones

Etapa embrionaria semana 4-7

La etapa embrionaria engloba desde la formación inicial del divertículo respiratorio hasta la constitución de todos los principales segmentos broncopulmonares. Durante este periodo, los pulmones en desarrollo crecen hacia las cavidades pleurales bilaterales y empiezan a llenarlas. Estos elementos son los principales de la cavidad torácica por encima del pericardio. (Carlson, 2009)

Etapaseudoglandular semana 8-16

Esta etapa pseudoglandular es el periodo principal de formación y crecimiento de los sistemas ductales dentro de los segmentos broncopulmonares, antes de que las porciones terminales formen los componentes respiratorios. La estructura histológica del pulmón se parece a la de una glándula, de ahí el nombre de esta etapa. En esta etapa se empieza a formar el sistema arterial pulmonar. Los vasos en desarrollo van paralelos a los conductos principales. (Carlson, 2009)

Etapa canalicular semana 17-26

Se caracteriza por la formación de los bronquiolos respiratorios como consecuencia de la gemación de los componentes terminales en el sistema bronquiolos que se constituyó en el estadio pseudoglandular. Un camino que siguen diferentes tipos celulares a lo largo del árbol respiratorio en formación. Un gradiente de señales de BMP-4 y Wnt, en mayor cantidad en las puntas distales forme fenotipos más característicos de ramas largas del árbol bronquial. El otro fenómeno esencial durante este periodo es la intensa invaginación de vasos sanguíneos hacia los pulmones en desarrollo y la estrecha asociación entre los capilares y las paredes de los bronquiolos respiratorios. (Carlson, 2009)

Etapa de sacos terminales semana 26-38

Durante el estadio de sacos terminales, los sacos aéreos terminales (alveolos) se originan a partir de los bronquiolos respiratorios formados en su mayoría en la fase canalicular. El epitelio que reviste a los alveolos se diferencia en dos tipos de células: Las células alveolares tipo I (Neumocitos), a través de las cuales tiene lugar el intercambio de gases tras el parto, y las células alveolares tipo II (Secretores epiteliales). Estas últimas forman el surfactante pulmonar, el material que se extiende por la superficie alveolar para reducir la tensión superficial y facilitar la expansión de los alveolos durante la respiración. Los estudios con marcadores específicos de células epiteliales han demostrado que las células de tipo II son las primeras en constituirse en el revestimiento alveolar. Tras proliferar, algunas de ellas se aplanan, pierden su función secretora característica y experimentan una diferenciación terminal en neumocitos de tipo I. otras células de tipo I parecen diferenciarse directamente a partir de una serie de células precursoras epiteliales del revestimiento alveolar primitivo. Al aumentar la formación de surfactante pulmonar, el feto tiene más probabilidad de sobrevivir si nace de forma prematura. En el feto, las vías respiratorias están llenas de líquido. Durante las cuatro últimas semanas de embarazo, la mayor formación de alveolos produce un incremento exponencial en la superficie respiratoria del pulmón. Estas semanas se llaman periodo alveolar del desarrollo pulmonar. (Carlson, 2009)

Etapa posnatal

En el momento del parto, los pulmones de los mamíferos distan mucho de ser maduros. Se calcula que el 90% o más de los cerca de 300 millones de alveolos presentes en un pulmón humano maduro se constituyen tras el nacimiento. El principal mecanismo de este incremento es la formación de tabiques de tejido conjuntivo secundarios, que dividen los sacos alveolares existentes. Cuando aparecen por primera vez, los tabiques secundarios son gruesos, pero con el tiempo van adelgazando y se convierten en tabiques maduros capaces de permitir un intercambio respiratorio completo. (Carlson, 2009)

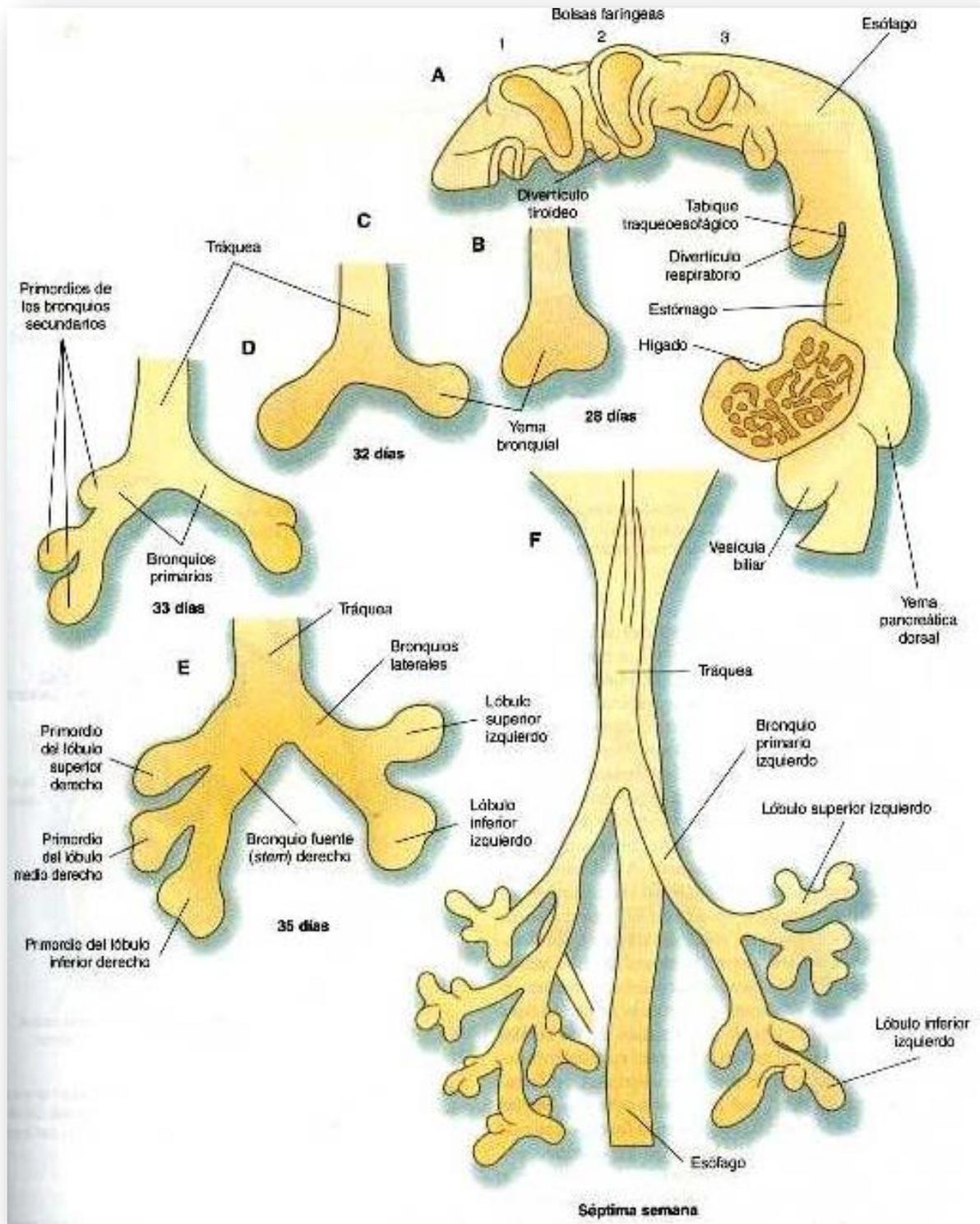


Figura 1. Desarrollo pulmonar, tomada de: <http://www.uaz.edu.mx/histo/MorfoEmbrio/Carlson/Cap14/cap14.htm#DUPLICACIONES>

Los pulmones y la membrana pleural

Los pulmones son órganos pares, que se encuentran separados por el corazón, situados en la cavidad torácica y limitados por las membranas pleurales, los cuales están formados por los bronquios, bronquiolos y alvéolos. El pulmón derecho es mayor que el izquierdo y presenta tres lóbulos, mientras el pulmón izquierdo es más pequeño debido al espacio ocupado por el corazón y sólo presenta dos lóbulos. (Noriega, 2011).

La membrana pleural encierra y protege a cada pulmón, esta se encuentra dividida en dos: pleura parietal y pleura visceral; la pleura parietal ocupa la capa superior, mientras que la pleura visceral ocupa la capa inferior. Entre las pleuras se encuentra un pequeño espacio, denominado cavidad pleural, que contiene líquido pleural que este reduce la fricción entre las membranas y permite que se deslicen suavemente una sobre la otra durante la respiración. El líquido pleural también hace que las dos membranas se adhieran entre sí, fenómeno llamado tensión superficial (Tortora y Derrickson, 2010).

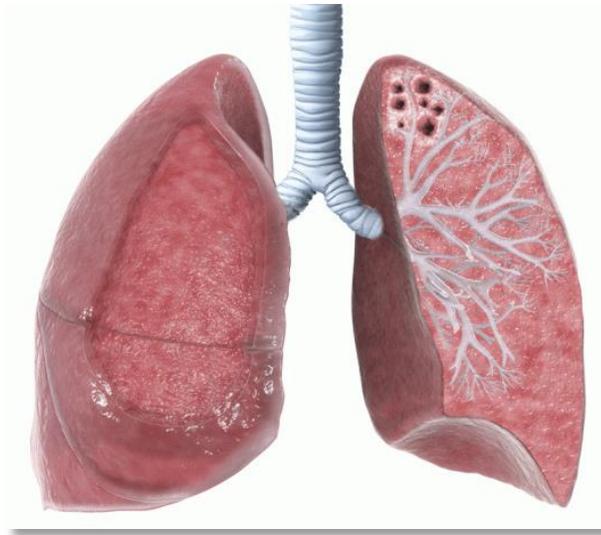


Figura 2. Estructura de los pulmones (Tomada de: <http://quemundo.info/index.php/l-anatomia-humana/90-los-pulmones>)

Árbol bronquial

El árbol bronquial se encuentra formado por tráquea, bronquios primarios, bronquios secundarios, bronquios terciarios y bronquiolos terminales. En los pulmones los bronquios primarios se dividen sucesivamente para formar los bronquiolos terminales. De este modo esta ramificación extensa forma el árbol bronquial, donde alrededor se organizan las porciones respiratorias del pulmón, llamados alveolos (Tortora y Derrickson, 2010).

Los alveolos son estructuras en forma esférica, llenas de aire en condiciones normales, cubiertos por una red de capilares sanguíneos, estos son la unidad funcional del sistema respiratorio, ya que gracias a ellos se lleva acabo el intercambio gaseoso dentro de los pulmones, el número total de alveolos en los pulmones oscila aproximadamente entre 300 a 600 millones. (Noriega, 2011)

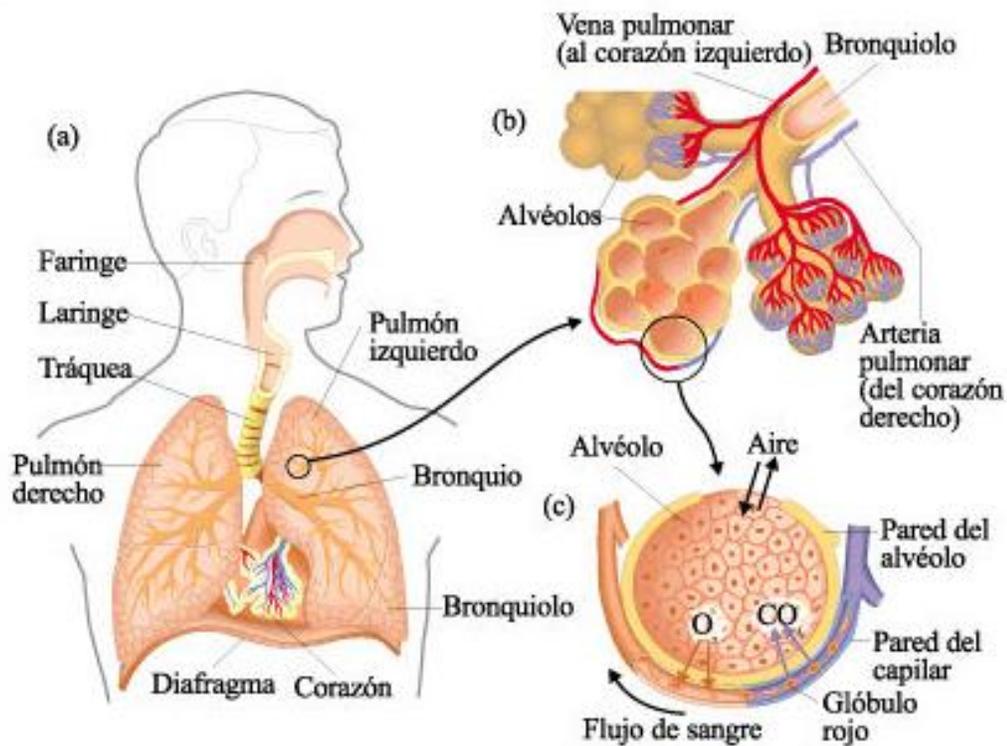


Figura 3. Sistema respiratorio y alveolar.

a) Órganos del sistema respiratorio

b) Ramificación alveolar

(Tomado de <http://www.bibliotecadeinvestigaciones.files.wordpress.com/2011/02/ubicacic3b3n-y-estructura-de-los-alvec3b3los.jpg>)

El epitelio alveolar

La respiración es la función mediante la cual los seres vivos toman oxígeno del medio que habitan y dejan en el dióxido de carbono, que resulta de la actividad celular. Los seres humanos poseen un sistema respiratorio más complejo que otros (debido al número considerable de células que forman su organismo), asociado, además, con el sistema que permite el transporte de oxígeno y gas carbónico hasta las células: el sistema circulatorio. El aire atmosférico, rico en oxígeno, penetra en los pulmones, en cuyos alvéolos se produce el pasaje de este gas a la sangre. Y el dióxido de carbono, producto de desecho de las células, que transporta la sangre pasa a los pulmones para ser expulsado.

El epitelio alveolar se encuentra recubierto por dos tipos de células alveolares: neumocitos de tipo I y de tipo II. Siendo los neumocitos de tipo II las más abundantes que las de tipo I. Las células alveolares tipo I cubren el 90% de la superficie alveolar debido a su estructura larga y aplanada, y son las encargadas de realizar el intercambio gaseoso. En el espacio alveolar también se encuentran los macrófagos alveolares, en forma de células libres, que se desplazan hasta los bronquiolos terminales a través de la luz de las vías respiratorias, aprovechando el movimiento ciliar de las células epiteliales ciliadas. (Sibille y Reynolds 1990)

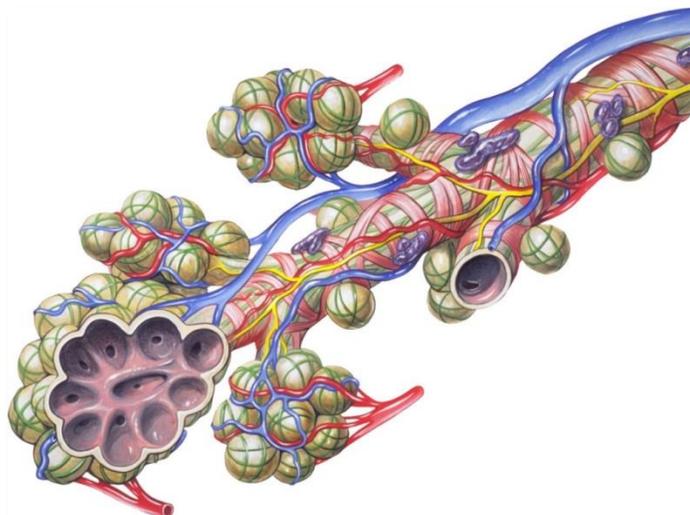


Figura 4. Esquema de la terminación de los bronquiolos en el saco alveolar y la irrigación pulmonar (Tomada de: <http://enfisema.net/alveolos/>)

Una vez el oxígeno dentro de los pulmones, es transportado por medio de los bronquiólos hasta llegar a los alveolos, donde el oxígeno para poder llegar a la sangre tiene que penetrar la barrera alveolo-capilar, de un grosor medio aproximado de $0.6 \mu\text{m}$, que está constituido por tres capas superpuestas: (Maina y West, 2005)

1. El epitelio alveolar constituye el 31% del volumen de dicha barrera. Este epitelio se encuentra formado por dos tipos de células: Neumocitos de tipo I y neumocitos de tipo II.
2. La capa intersticial constituye el 41% del volumen de la barrera alveolo-capilar. Se encuentra conformada por tejido conectivo, células inmunitarias tales como linfocitos T y células inflamatorias como los macrófagos. Sus fibroblastos secretan la matriz extracelular, la cual soporta la estructura del alveolo, aunque en situaciones patológicas su activación conlleva a la fibrosis pulmonar.
3. El endotelio alveolar este constituye el 28% del volumen de la barrera. Forma parte de la red de capilares que irrigan el pulmón, a la que el oxígeno difunde para poder entrar al sistema circulatorio.

Finalmente sobre el epitelio alveolar podemos encontrar una capa acuosa, en la cual se da la interfase aire-agua en la cual se deposita el surfactante pulmonar.

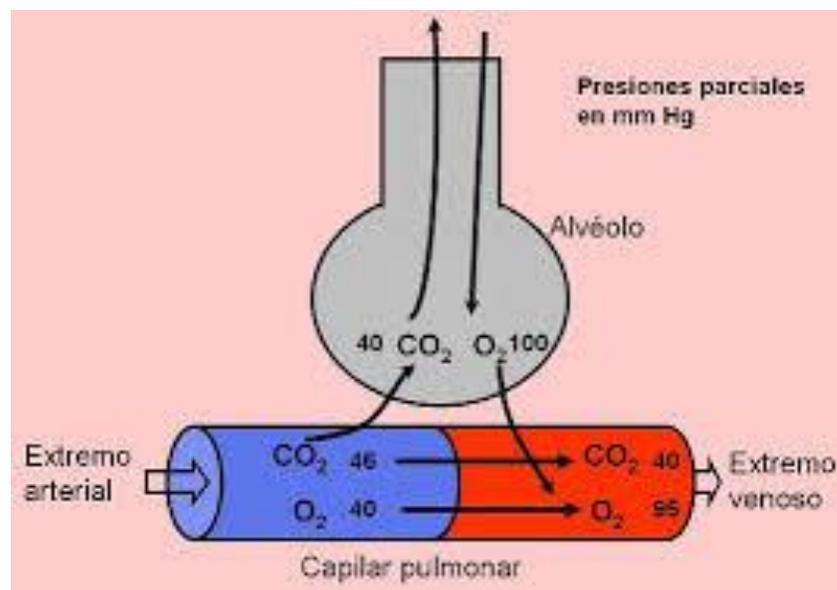


Figura 5. Esquema del epitelio alveolar (http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_14.htm)

Neumocitos de tipos II

Las paredes del alveolo tiene dos tipos de células epiteliales alveolares: neumocitos de tipo II y neumocitos de tipo I (Figura 5). Los neumocitos de tipo II, se encuentran rodeados por células epiteliales cubicas cuyas superficies libres contienen microvellosidades, secretan liquido alveolar, que mantiene húmeda la superficie entre las células y el aire (Tortora y Derrickson, 2010).

Los neumocitos de tipo II ocupan alrededor del 5% de la célula alveolar, se encuentran entremezcladas entre los neumocitos de tipo I y forman uniones de oclusión. La característica de estas células es la presencia de cuerpos laminares unidos a la membrana que contienen agente tensoactivo pulmonar, producto secretorio de estas células (Gartner y Hiatt, 2008).

Los neumocitos de tipo II se dividen por mitosis para regenerarse a sí mismos y producen y fagocitan el surfactante pulmonar (Gartner y Hiatt, 2008).

Las células alveolares tipo II se caracterizan por sintetizar y secretar surfactante pulmonar, formado por una gran proporción de fosfolípidos (85%) y por proteínas (15%), de la cuales se han descrito 4 tipos: A, B, C y D. (Pérez-Gil, 2008).

El surfactante activa la superficie alveolar y evita su colapso, además de tener otras funciones importantes como defensa inmunológica. Las células alveolares tipo II son progenitoras de las células alveolares tipo I y, por ello, son las responsables de la reparación alveolar después de daños celulares epiteliales. En condiciones normales, la reparación del epitelio alveolar se produce a través de la proliferación de las células alveolares tipo II y su diferenciación a células alveolares tipo I. (Chroneos, sever-Chroneos ySherphed, 2010)

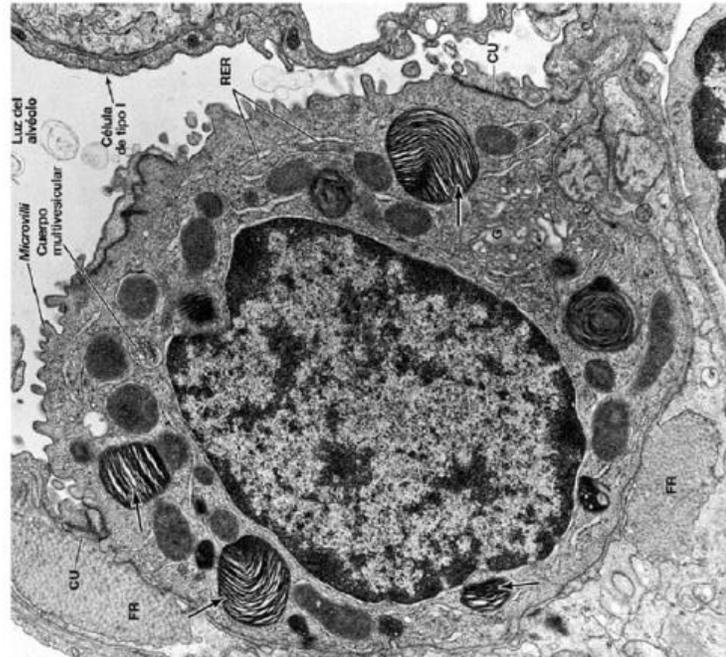


Figura 6. Tipo de célula presente en los alveolos. (Tomado de M.C Williams)

Fisiología respiratoria y circulación fetal

Durante la vida fetal los pulmones están llenos de líquido y no tienen funciones respiratorias; sin embargo, son fisiológica y metabólicamente activos: simulan movimientos respiratorios, sintetizan surfactante y secretan líquido a los potenciales espacios aéreos. El crecimiento normal pulmonar intrauterino depende en gran medida del balance entre una adecuada producción y un drenaje controlado del líquido pulmonar. Cuando el balance entre la producción y la absorción del líquido pulmonar se altera, el crecimiento de los pulmones se ve alterado. En el caso de obstrucción traqueal los pulmones crecen incontrolablemente distendiendo las unidades respiratorias terminales y disminuyendo el número de células alveolares tipo II productoras de surfactante. Otras condiciones que afectan la producción normal de líquido pulmonar produciendo hipoplasia pulmonar son la oclusión de la arteria pulmonar, la hernia diafragmática y la compresión del tórax fetal por pérdida crónica de líquido amniótico.

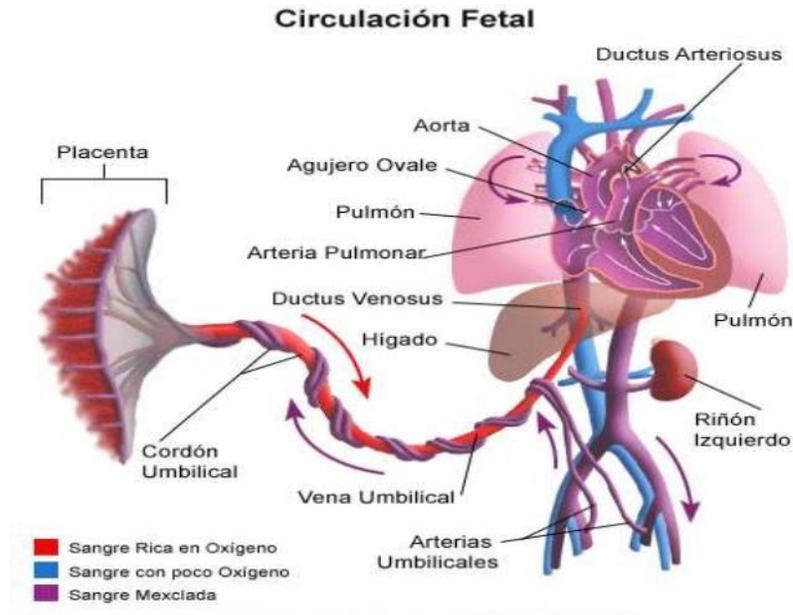


Figura 7. Esquema de la circulación fetal (Tomada de: <http://es.slideshare.net/Dulcesitxp/circulacion-fetal-41280533>)

El pasar de realizar el intercambio gaseoso en la placenta a los pulmones requiere la rápida remoción del líquido presente en el espacio aéreo potencial. Por muchos años los fisiólogos y los pediatras pensaron que la compresión mecánica del tórax durante el nacimiento era la principal fuerza responsable del reemplazo del líquido por aire, pero en años recientes varios reportes han mostrado que esta transición normal es considerablemente más compleja que la expulsión y deglución del líquido que sugiere la compresión.

El aparato cardiovascular inicia su formación al final de la tercera semana de edad post-concepcional y es posible percibir latidos cardíacos tan temprano como a la cuarta semana de vida embrionaria. La sangre venosa retorna al corazón por la vena cava superior (VCS), la vena cava inferior (VCI), el seno coronario y las venas pulmonares. De toda esta sangre, la menos oxigenada es la que proviene del cerebro y del cuerpo superior a través de la VCS y del corazón a través del seno coronario. La VCS se cruza hacia abajo y hacia delante en su entrada al corazón garantizando que casi toda la sangre pase a través de la válvula tricuspídea.

De igual manera, el ostium del seno coronario está justo en el borde superior del límite medial de la misma válvula, lo que también garantiza que toda esa sangre desoxigenada proveniente del

miocardio pase directamente al ventrículo derecho. Idealmente toda esta sangre que llega al ventrículo debe ser enviada cargada de oxígeno y nutrientes a la placenta.

La sangre de la VCI proviene de dos fuentes principales: la menos oxigenada que viene del cuerpo fetal a través de las venas ilíacas, mesentéricas, renales, hepática derecha y otras similares; y la más oxigenada proveniente de la circulación onfaloplacentaria a través del ductus venoso y de la vena hepática izquierda.

La mayoría de la sangre menos oxigenada pasa al ventrículo derecho a través de la válvula tricuspídea y una menor proporción pasa a la aurícula izquierda por el foramen oval (shunt 1 de derecha a izquierda). La sangre más oxigenada tiende a ir por el centro de la VCI y por la orientación de la válvula de Eustaquio y el foramen oval es principalmente dirigido a la aurícula izquierda.

La sangre de las venas pulmonares escasamente oxigenada llega directamente a la aurícula izquierda. Todas estas características anatómicas le permiten al sistema circulatorio fetal alcanzar un máximo grado de eficiencia, permitiendo estas diferentes direcciones de flujos que la sangre del ventrículo izquierdo esté 15-20% más saturada que la del ventrículo derecho.

El 65% de la sangre que en la vida fetal llega al corazón pasa al ventrículo derecho, y del total de esta solo 13% alcanza el lecho vascular pulmonar (8% de la sangre eyectada por ambos ventrículos). El resto pasa por el ductus arterioso (shunt 2 de derecha a izquierda) a la aorta descendente; de esta sangre solo la tercera parte llega al cuerpo fetal y las dos terceras partes restantes llegan a la placenta en busca de nutrientes. El ventrículo izquierdo recibe el restante 35% del retorno venoso, siendo 63% de esta sangre enviada al cerebro y al cuerpo superior, 8% a las coronarias y 29% (a través del istmo aórtico) hacia el cuerpo inferior y la placenta.

El volumen de eyección de ambos ventrículos es cercano a 400 mL/kg/minuto en la vida fetal, lo que más o menos equivale a la salida de cada ventrículo en un neonato. Es necesario anotar que el shunt 2 se produce por una diferencia de presiones entre la presión arterial pulmonar y la presión arterial sistémica. La presión pulmonar in útero se encuentra aumentada como consecuencia de aumento en la resistencia vascular pulmonar dada principalmente por un marcado engrosamiento de la capa arterial muscular. Lo anterior sumado al bajo flujo pulmonar y al aumento de la cantidad de líquido por peso en los pulmones durante la gestación genera un sistema de alta resistencia.

Cambio de respiración

Las primeras respiraciones efectivas, denotan el paso de una “respiración líquida” a una “respiración gaseosa”, cuyo objetivo final es la manifestación de nacer. Con este hecho se cumple el paso de la vida intrauterina confortable, en la gran mayoría de los casos, a la necesaria manifestación de vitalidad extrauterina, es decir, a la capacidad de tolerar este cambio traumático inevitablemente necesario. Los conceptos actuales muestran que el trabajo de parto y el parto mismo desencadenan una secuencia de eventos imprescindibles para una adecuada adaptabilidad al nacimiento que, entre otros, inducen asfixia fetal transitoria que estimula mecanismos bioquímicos mediados por quimiorreceptores periféricos, baro receptores y receptores adrenérgicos que preparan y adaptan al feto para el nacimiento.

Ventilación pulmonar

La ventilación pulmonar es el proceso funcional por el cual el oxígeno es transportado desde el exterior del sujeto hasta llegar a los alveolos y viceversa. Este proceso puede ser pasivo o activo, según sea el modo ventilatorio. El nivel se encuentra regulado desde el centro respiratorio en función de las necesidades metabólicas, del estado gaseoso, del equilibrio acido-base que se presenta en la sangre y de las condiciones mecánicas del conjunto pulmón- caja torácica de cada individuo. (Canet)

El principal objetivo de la respiración es suministrar oxígeno a todos los tejidos y eliminar el dióxido de carbono. Para que este proceso se lleva cabo, la respiración se divide en cuatro procesos de suma importancia:

1. Ventilación pulmonar
2. Difusión del oxígeno y del dióxido de carbono entre los alveolos y la sangre
3. Transporte del oxígeno y del dióxido de carbono en la sangre
4. Regulación de la ventilación

En la ventilación pulmonar se encuentran músculos que se encargan de expandir y contraer los pulmones y este proceso se da mediante dos maneras:

1. Por el movimiento hacia abajo y hacia arriba del diafragma para alargar y acortar la cavidad torácica.
2. Por la elevación y el descenso que se da en las costillas para aumentar y disminuir el diámetro antero posterior de la cavidad torácica

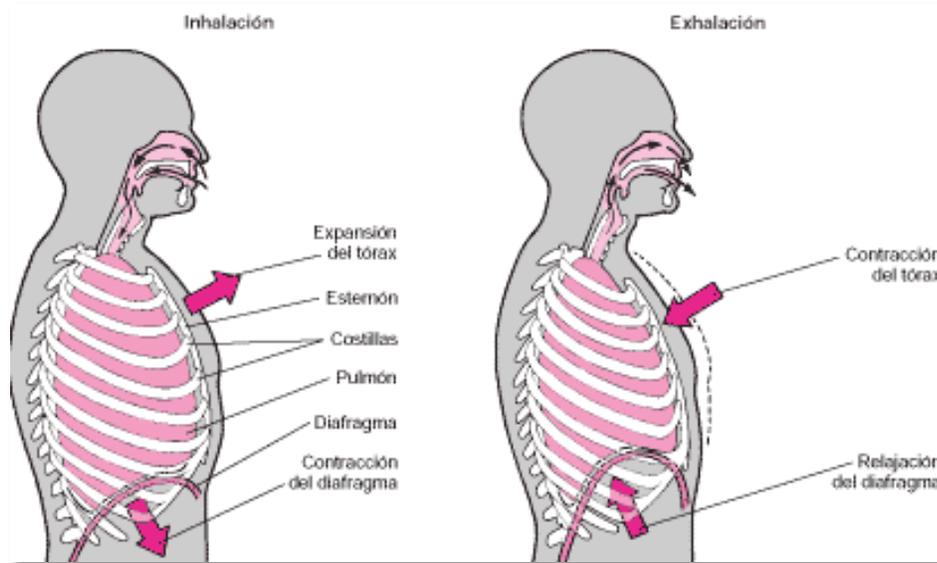


Figura 8. Esquema de la ventilación pulmonar (Tomada de: <https://www.msdsalud.es/manual-merck-hogar/seccion-4/biologia-pulmones-vias-respiratorias.html>)

Difusión del oxígeno y del dióxido de carbono entre los alveolos y la sangre, se lleva a cabo al gradiente de presiones del oxígeno y el dióxido de carbono, que existe entre el alveolo y los capilares pulmonares. De modo que el oxígeno se difunde a favor hacia la sangre, mientras que el dióxido de carbono lo hace de modo inverso. Esta difusión de gases no solo depende de las concentraciones, sino también del coeficiente de difusión de cada gas y del estado de la membrana respiratoria.

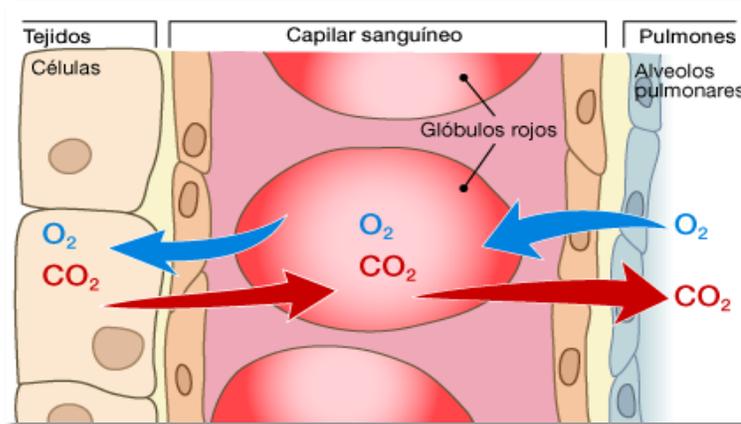


Figura 9. Intercambio gaseoso en los alveolos (Tomada de: http://mararteambiental.blogspot.mx/2012_12_01_archive.html)

El Transporte del oxígeno y del dióxido de carbono en la sangre el principal responsable del transportar es la hemoglobina que se encuentra en el interior de los eritrocitos. La hemoglobina se combina reversiblemente con el oxígeno, y de esta manera se transporta más del 98 % del oxígeno que existe en la sangre; el resto del O_2 se encuentra disuelto en la sangre.



La unión química entre la Hb y el O_2 tiene varias características:

- Es una combinación reversible; la forma unida al oxígeno se denomina oxihemoglobina (HbO_2).
- La reacción del O_2 con la Hb es muy rápida, lo que es importante para el transporte ya que la sangre permanece en los capilares pulmonares y sistémicos menos de un segundo.

El CO_2 difunde desde los tejidos a la sangre y, en ella existen varios mecanismos para su transporte:

- En solución: cerca del 10 % del CO_2 viaja en solución.
- Como carbaminohemoglobina: la Hb tiene radicales amino (NH_2). Parte del CO_2 que difunde al interior de los eritrocitos reacciona con las cadenas laterales NH_2 y forma carbaminohemoglobina

Composición y función del surfactante pulmonar

El surfactante está compuesto por fosfolípidos, proteínas y carbohidratos. Estos últimos están presentes en distintos agregados macromoleculares, cuyas formas estructurales están influidas por la relativa abundancia de lípidos y de proteínas, así como por la acción de las fuerzas mecánicas que se producen durante el ciclo respiratorio.

Los fosfolípidos representan de 80 a 90% del surfactante. En porción menor 8% se encuentran los glucolípidos y los lípidos neutros, en tanto que las proteínas dan cuenta 6 y 7% restante. La dipalmitoilfosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante y representa 70% del surfactante, del cual 50% es saturada y el restante 20% insaturado. El fosfatidilglicerol constituye 8% .En propiedades de los fosfolípidos del surfactante influye el grado de saturación de las cadenas de sus ácidos grasos, de tal forma que ha mayor saturación, presentara mayor efecto hidrofóbico. (Jasso, 2008)

El líquido alveolar contiene una sustancia que reduce la tensión superficial. Esta sustancia se llama surfactante. Las células alveolares tipo II secretan surfactante hacia los alveolos; el surfactante consta de fosfolípidos junto con proteínas surfactantes hidrofóbicas. El surfactante queda entremezclado entre moléculas de agua en la interfaz entre agua y aire; esto reduce los enlaces de hidrogeno entre moléculas de agua en la superficie y, por eso, reducen la tensión superficial. Como resultado de este efecto el surfactante pulmonar, la tensión superficial de los alveolos es insignificante. El surfactante secretado hacia los alveolos por las células alveolares tipo II es eliminado por macrófagos alveolares. (Fox, 2011)

Las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C constituyen, cada una de ellas, aproximadamente de 1 a 2 % del peso total del surfactante. En los neumocitos tipo II maduros, el RNA mensajero de la primera, y el de la SP-C y su pro-proteína, están presentes en la morfogénesis inicial de las puntas distales de la ramificación de las vías aéreas. La SP-B es esencial para la formación de la mielina tubular y para la absorción de la DPFC. El surfactante que contiene SP-B mejora las curvas de presión-volumen de los pulmones en los hay deficiencia de surfactante pulmonar.

La SP-A y la SP-D se denominan proteínas colectinas. La SP-A se sintetiza de novo en los neumocitos tipo II, en las células claras y en algunas glándulas tranqueales. Esta proteína aparece en el líquido pulmonar fetal, junto con los fosfolípidos, durante la etapa tardía de la gestación, y es fundamentalmente importante mecanismo de defensa al nivel de los alveolos y de las vías aéreas, debido a su capacidad para unirse a carbohidratos y para interactuar con las células inmunitarias (Jasso, 2008)

Es un complejo lipoproteico sintetizado y secretado por el epitelio alveolar que se encuentra en los pulmones, este resulta esencial para mantener abierta la superficie respiratoria y proporcionarle inmunidad a los pulmones, no permitiendo la entrada a organismos patógenos.

La función principal de este es facilitar la mecánica respiratoria minimizando la energía que el tejido pulmonar debe aportar para mantener abierta y expuesta la superficie de intercambio gaseoso durante los sucesivos ciclos de inspiración-espriación. (Pérez-Gil 2010)

El surfactante pulmonar se compone principalmente de dos fosfolípidos dipalmitoilfosfatidilcolina y fosfatidilglicerol (Figura 3), y cinco proteínas únicas, proteínas del surfactante pulmonar CC10, A, B, C y D (Gartner y Hiatt, 2008).

El surfactante pulmonar se libera por exocitosis hacia la luz de los alveolos en donde forma una red amplia llamada mielina tubular. El surfactante pulmonar reduce la tensión superficial e impide así el colapso de los alveolos (Gartner y Hiatt, 2008).

La composición del surfactante pulmonar se ha estudiado sobre todo a partir del análisis del material obtenido de lavados bronquio alveolares de pulmones animales. En esos lavados se obtiene una muestra de los componentes presentes en los espacios respiratorios, secretados por los tipos celulares que tapizan las vías aéreas. El surfactante puede considerarse un complejo lipoproteico. En los pulmones de mamíferos, el 90% en peso del surfactante corresponde a material lipídico; entre el 8% y el 10%, a proteínas. Dentro de los componente lipídicos, los fosfolípidos suponen un 90%; el resto son lípidos neutros, entre los que destaca una proporción notable de colesterol. Cabe resaltar la presencia, entre los fosfolípidos, de una especie molecular inusual en cualquier otro tejido, la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), que constituye más del 40% del surfactante. (Pérez-Gil 2010)

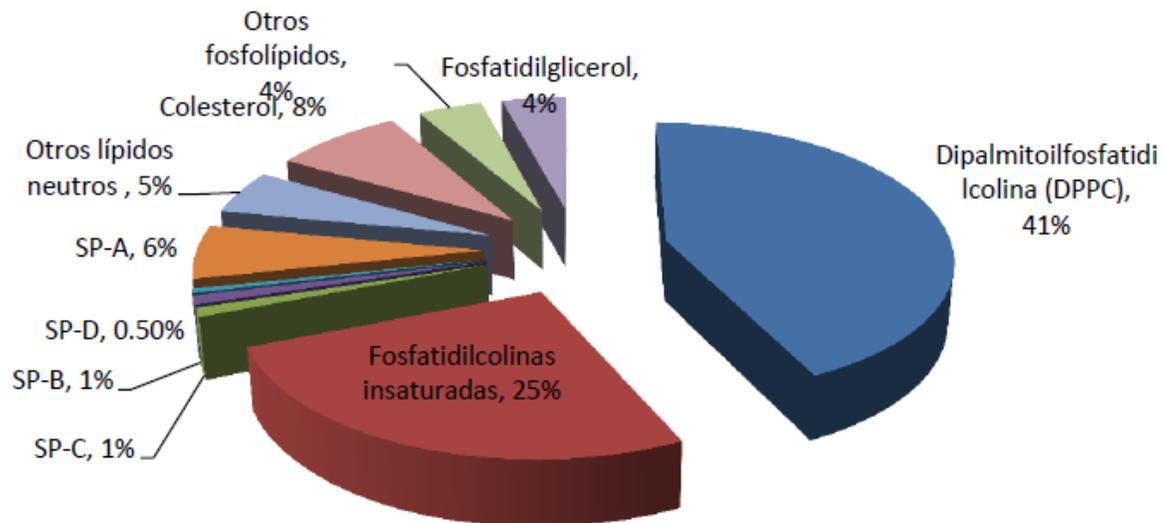


Figura 10. Composición del contenido de diversos compuestos del surfactante pulmonar (Tomado de Pérez J, 2010).

Las fosfatidilcolinas (PC) son los componentes lipídicos principales en la mayoría de las membranas de las células animales. La mayoría de las PC de membrana poseen un ácido graso saturado y otro insaturado. Esta combinación de ácidos grasos ofrece propiedades óptimas de fluidez a la temperatura fisiológica, que aseguran que en el seno de la membrana los lípidos y las proteínas puedan moverse y organizarse. (Pérez-Gil 2010)

La dipalmitoifosfatidicolina (DPPC) reduce la tensión superficial alveolar pero requiere la presencia de las proteínas hidrofóbicas como son las SP-C y SP-B que son cruciales para su estabilidad.

Las proteínas de gran relevancia que presenta este surfactante son cuatro: SP-A, SP-B, SP-C Y SP-D. Estas proteínas se agrupan en dos familias: hidrofóbicas e hidrofílicas, esto en función de las propiedades y su estructura, así como la función que lleguen a desarrollar en el epitelio alveolar. La SP-A Y SP-D son proteínas hidrofílicas, estas pertenecen al grupo de las colectinas, estas proteínas son de gran importancia para la inmunidad del pulmón. Mientras que las proteínas SP-B y SP-C forman de la fase hidrofóbica y es por ello que son solubles en disolventes orgánicos, por lo que se co-purifican junto con los lípidos cuando se realiza una extracción orgánica del material surfactante. (Pérez-Gil 2011)

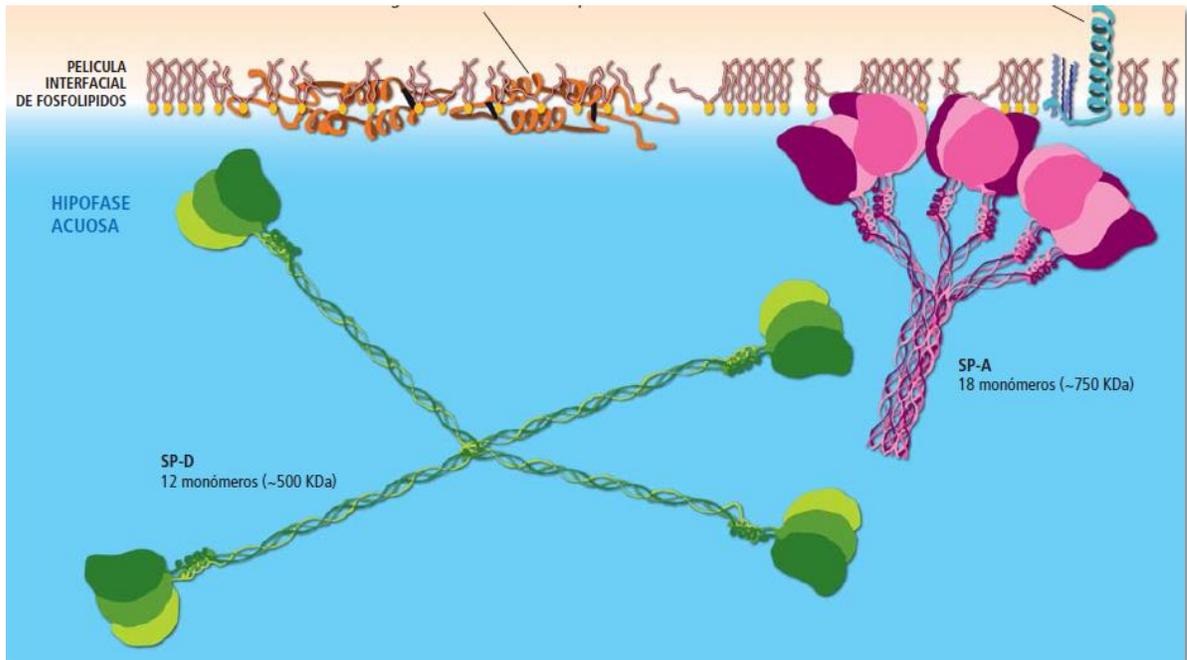


Figura 11. Esquema de las proteínas del surfactante pulmonar. (Tomada de Pérez-Gil 2011)

El surfactante pulmonar se sintetiza por los neumocitos de tipo II y con la primera respiración del recién nacido sano, este rápidamente recubre la superficie del alveolo, reduciendo la tensión superficial, y la presión necesaria para mantener los alveolos abiertos. Un pulmón sin surfactante, los alveolos tienden a colapsarse y requieren mayor esfuerzo para respirar. (Kumar, Abbas, Fauso y Mitchel 2008)

El surfactante pulmonar es muy importante para la supervivencia del recién nacido prematuro. Si el volumen de esta sustancia es insuficiente, se eleva la tensión superficial de la membrana aire-agua y existe un gran riesgo de que se produzca el colapso por parte de los alveolos durante la espiración. Como consecuencia sobreviene el SDR (Salder, 2009).

Síntesis del surfactante pulmonar

La síntesis del surfactante pulmonar está regulada por hormonas. Los corticoides estimulan la formación de surfactantes lipídicos y proteínas asociadas. Por lo tanto, las enfermedades

asociadas con estrés intrauterino y restricción del crecimiento fetal que aumentan la liberación de corticoides y disminuye el riesgo de desarrollar síndrome de dificultad respiratoria (SDR) (Kumar, Abbas, Fauso y Mitchel 2008).

La síntesis del surfactante alveolar en el pulmón se incrementa dramáticamente durante el último mes de gestación. Durante la vida fetal el pulmón cumple con una serie de funciones metabólicas que le son indispensables para la adaptación a la vida extrauterina. Por ejemplo la síntesis del surfactante alveolar en el pulmón se incrementa dramáticamente durante el último mes de la gestación. Los ácidos grasos derivados del metabolismo se incorporan en parte en los fosfolípidos (Jasso, 2008)

La síntesis del surfactante pulmonar puede suprimirse por concentraciones sanguíneas compensadoras muy elevadas de insulina en niños de madres diabéticas, que contrarrestan los efectos de los corticoides. Por lo tanto, los bebés de madres diabéticas son más propensos a desarrollar síndrome de dificultad respiratoria (SDR). (Kumar, Abbas, Fauso y Mitchel 2008).

Proteína surfactante SP-A

La SP-A es una glicoproteína hidrofílica altamente conservada, con un peso molecular en condiciones reducidas de 29-38 kDa; en el caso de la SP-A humana está constituida por 248 aminoácidos. Dentro del alveolo existe en forma de un multímero constituido por seis unidades triméricas. (Hernández 2007).

La SP-A tiene la capacidad de enlazar lípidos y carbohidratos e interactuar con receptores específicos de la superficie celular. Su actividad depende del calcio y la cooperación con la SP-B y la SP-C. (Sánchez, Torres 2004).

La SP-A promueve la formación de la mielina tubular, mejora la actividad superficial del surfactante mediante su unión a los fosfolípidos, bloquea la inactivación del surfactante inducida por las proteínas del suero y se ha sugerido que ejerce un control regulador negativo al inhibir la secreción de fosfolípidos por las células alveolares tipo II. (Sánchez, Torres 2004).

La SP-A se une ávidamente con las endotoxinas y con un gran número de bacterias gramnegativas y grampositivas; promueve la fagocitosis y la destrucción de los mismos microorganismos por medio de los macrófagos alveolares; actúa como opsonina para la fagocitosis de virus tales como herpes, influenza A y sincitial respiratorio, e incrementa el macrófago la producción de óxido nítrico para destruir a los microorganismo patógenos. Por lo que se refiere a su acción como surfactante, se ha descubierto que el niño pretérmino que nace con una relación muy baja de SP-A/ DPFC corre mayor riesgo de fallecer o desarrollar displasia broncopulmonar (Jasso, 2008)

Síndrome de dificultad respiratoria (SDR)

El síndrome de dificultad respiratoria (SDR) es una enfermedad que afecta principalmente niños prematuros, ocurre alrededor del 60% de los niños nacidos con menos de 28 semanas de gestación, del 15 al 20% de nacidos entre las 32 y 36 semanas de gestación, y menos del 5% en aquellos nacidos después de la semana 37 de gestación. Otras posibles causas son diabetes materna, cesárea antes del comienzo del parto y el embarazo gemelar (Prematuro). (Kumar, Abbas, Fauso y Mitchel 2008)

El defecto fundamental del síndrome de dificultad respiratoria (SDR), es la incapacidad del pulmón para sintetizar surfactante pulmonar. Este es un complejo de fosfolípidos activos, principalmente dipalmitoilfosfotidilcolina (DPPC) y al menos dos grupos de proteínas asociadas al surfactante pulmonar. (Kumar, Abbas, Fauso y Mitchel 2008)

El síndrome de dificultad respiratoria (SDR), es un cuadro respiratorio agudo que afecta casi exclusivamente a los recién nacidos prematuros. La inmadurez del pulmón del pre-término no es solamente bioquímica, si no también morfológica y estructural, ya que el desarrollo del pulmón en estos bebe prematuros. El pulmón con déficit de surfactante pulmonar es incapaz de mantener una aireación y un intercambio gaseoso adecuado. La incidencia y la gravedad aumentan al disminuir la edad gestacional. (López y Soler, 2008)

Gastrosquisis

La gastrosquisis es un defecto de la pared abdominal, usualmente ubicado a la derecha de la inserción del cordón umbilical, a través del cual estructuras intra abdominales protruyen al exterior y toman contacto con el líquido amniótico; no presenta membrana peritoneal que lo recubra.

Diversos factores de riesgo como la baja edad materna, el consumo de alcohol, tabaco, y drogas (cocaína y marihuana) y el bajo nivel socio-económico. La ecografía prenatal nos ofrece la posibilidad de diagnosticar la mayoría de los defectos estructurales del feto y ello permite intervenir a su debido tiempo ante estas malformaciones, a fin de mejorar la sobrevivencia de estos bebés (Villacencio, 2008)



Figura 12.- Imagen de bebe que presenta gastrosquisis
(<http://www.cdc.gov/ncbddd/spanish/birthdefects/gastroschisis.html>)

METODOLOGÍA

Se recolectaron muestras de aspirados bronquioalveolares de neonatos pretérminos que desarrollaron SDR y que fueron identificados para este proyecto, las muestras de aspirados bronquioalveolares fueron proporcionadas por el Dr. Joel Arias Martínez obtenidas del Instituto Nacional de Perinatología y Hospital Infantil Federico Gómez. Los aspirados los realizó única y exclusivamente los neonatologos asignados para este proyecto.

Una vez obtenida la muestra en las trampas para secreciones bronquiales, el aspirado obtenido se pasa a un tubo cónico o ependorf, dependiendo del volumen, en promedio 500 μ L a 1000 μ L se centrifuga a 4500 RPM durante 5 a 10 minutos a una temperatura de 4°C con el objeto de separar las células, una vez realizado el proceso se recupera el sobrenadante y se desecha el paquete celular.



Figura 13. Trampa recolectora de secreciones bronquiales (Tomada de:<http://www.sivta.com.mx/images/bronquiales.jpg>)

Ya que se obtuvieron los sobrenadantes se les determino la concentración total de proteínas por el método de BRADFORD (micro-método) para la realización de geles de poliacrilamida y de esta manera determinar el patrón proteico utilizando marcadores de peso molecular de la marca BIORAD (precision plus proteinstandars dual color)

Cuantificación de proteínas por el método de BRADFORD

Se Constituyó una curva estándar de 0- 50 μg de albumina (del estándar de albumina previamente preparada) y se ajustó el volumen de los tubos 2500 μL se agregó 0.5 ml del reactivo de color concentrado, se agito, y se leyó a 595 nm en el espectrofotómetro después de haber transcurrido 5 minutos.

Tabla 2.- Tabla de concentraciones para determinación de proteínas

Curva de proteínas	Blanco	12.5	25	37.5	50	62.5	μg
Estándar de albumina	0	12.5	25	37.5	50	62.5	μL
Agua desionizada	2000	1987.5	1975	1963.5	1950	1947.5	μL
Reactivo de color	500	500	500	500	500	500	μL

Volumen total 2500 μL

Se agito y se dejó reposar para que se llevara a cabo la reacción transcurridos 5 minutos y se leyó a 595 nm en el espectrofotómetro, para las muestras se realizaron para cada una de ellas lo siguiente:

Tabla 3.- Preparación de las muestras de proteínas

Muestra	12.5 μL
Agua desionizada	1987.5 μL
Reactivo de color	500 μL

Se Incubo 5 minutos y se leyó en el espectro a 595 nm

Electroforesis

Se prepararon los reactivos (ver anexo) para realizar los geles poliacrilamida para llevar a cabo el proceso de electroforesis, dichas muestras se prepararon en condiciones reductoras

Tabla 4.- Preparación de geles de poliacrilamida en diferentes concentraciones

Separador	6 %	12 %	15 %
Agua desionizada	5.3 mL	3.3 mL	3.0 mL
Acrilamida/Bisacrilamida	2.0 mL	4.0 mL	5.9 mL
Tris pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	3.0 mL
Persulfato de amonio	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	8 µL	10 µL	10 µL

*Estos cálculos son para dos minigeles de un grosor de 0.75 mm

Concentrador	4 %
Agua desionizada	2.7 ml
Acrilamida/Bisacrilamida	670 µL
Tris pH 6.8	500 µL
Persulfato de amonio	40 µL
TEMED	10 µl

*Se dejaron polimerizar por lo menos 15 minutos, tiempo en el cual se prepararon las muestras

Se preparó el gel separador al 12% de acrilamida/ bisacrilamida y se vertió en la placa de electroforesis ya montada, dejando polimerizar por 15 minutos, posteriormente se preparó el gel concentrador al 4% de acrilamida/ bisacrilamida y se vertió en la placa de electroforesis, se colocó el peine formador de pozos cuidadosamente evitando dejar burbujas y se dejó polimerizar 15 minutos.

Estos geles de poliacrilamida se colocaron en la cámara de electroforesis de la marca BIORAD, en la cual se añadió el buffer de corrida 1X (ver Anexo) con la finalidad de facilitar la corrida de las muestras por medio del gel.

Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras, se leyeron las concentraciones de las proteínas totales de cada muestra previamente por el método de BRADFORD y en base a los resultados obtenidos de las muestras se descongelaron en hielo para mantener la estabilidad de las proteínas en el proceso de descongelamiento por el cambio de temperaturas, las diferentes muestras se prepararon con el buffer de la muestra (leamli) 2X (ver anexo) con una concentración 80 μ L de muestra y 20 μ L de buffer 2X, la cantidad de la muestra preparada utilizada por cada pozo es de 10 μ g-20 μ g y una vez preparada la muestra se incubo en el termobloque por un tiempo de cinco minutos a una temperatura de 100° C y se puso a enfriar antes de cargar la muestra en cada uno de los pozos del gel.

Se colocaron las muestras en cada uno de los pozos en orden de la muestra uno a la muestra nueve respectivamente, y en otro gel se cargaron de la muestra cuatro a la muestra nueve, así como en el pozo uno de ambos geles se añadió un marcador preteñido de la marca BIORAD.

Las condiciones de corrida fueron en refrigeración a 4°C a un voltaje de 220 V y 50 mA, dicha corrida se detuvo antes de que el frente de corrida de las muestras salieran de la cámara de electroforesis, una vez corrido y separado el patrón electroforético se desmonto el gel y se fijaron las proteínas en el gel para teñir con la técnica de plata.

Tinción de plata

Técnica

- 1.- se fijaron en el gel las proteínas con la solución de 40% metanol / 5% formaldehído durante una hora aproximadamente.
- 2.- se lavaron los geles dos veces con agua desionizada por cinco minutos agitando suavemente

- 3.-se pretrataron con la solución de tiosulfato de sodio al 0.02% durante un minuto, agitando suavemente
- 4.- se lavaron los geles dos veces con agua desionizada rápidamente
- 5.- se incubaron con la solución de plata al 0.1% durante 15 minutos
 NOTA: La solución de plata se preparó en el momento en que se utilizó
- 6.- se lavaron los geles con agua desionizada brevemente
- 7.- se incubaron con la solución de revelado hasta que comenzaron aparecer las bandas de proteínas bien definidas
- 8.- después de que aparecieron las bandas se paró la reacción de revelado adicionando 1.25 ml de ácido cítrico 2.3 M y se incubó por 10 minutos
- 9.- se enjuagaron y lavaron los geles con agua desionizada
- 10.- se secaron los geles con etanol 10% / 4% glicerol

Transferencia de proteínas (TRANS-BLOT)

Terminada la electroforesis, previamente se cortó la membrana de nitrocelulosa (HybondECL, GE Healthcare) al tamaño del gel y este se equilibró con buffer de transferencia

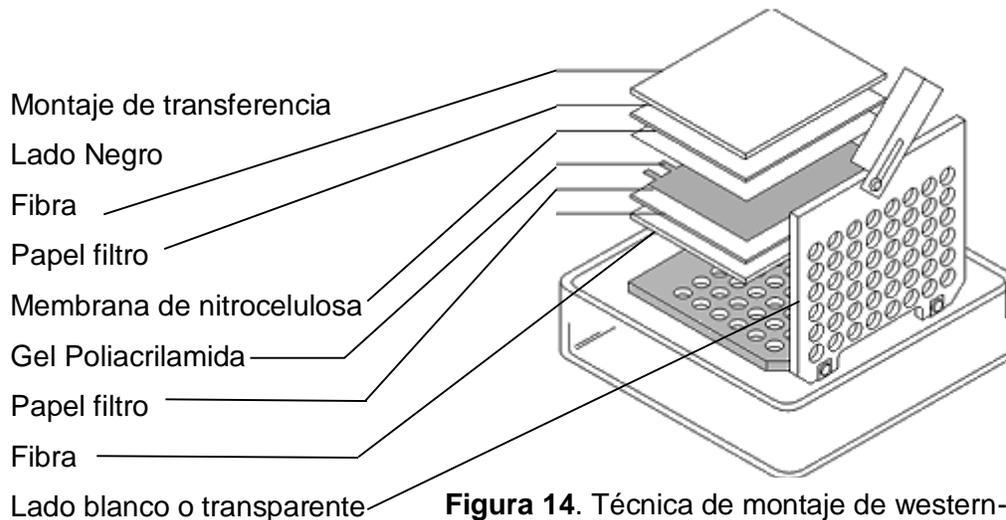


Figura 14. Técnica de montaje de western-Blot (Tomada de <http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Forschung/GelSandwich.gif>)

1. Es importante humedecer cada parte con el parte con el buffer de transferencia y tratar con una pipeta serológica de quitar cualquier burbuja de aire que se encuentre entre el gel de poliacrilamida y la membrana de nitrocelulosa
2. Cuando el sándwich es montado se coloca en la cámara de transferencia el lado negro queda hacia el lado negro y el lado transparente o blanco queda hacia el lado rojo las condiciones de corrimiento fueron de 30 V durante toda la noche a una temperatura de 4°C en refrigeración
3. Una vez terminada la transferencia se saca la membrana con mucho cuidado con unas pinzas
4. La membrana se enjuaga con agua desionizada para eliminar todos los residuos que desprendió el gel
5. La membrana se lavó con PBS-TWEN por 5 minutos en agitación
6. Se bloqueó la membrana con PBS-TWEN y 5% de leche descremada de la marca svelty durante una hora en agitación constante a temperatura ambiente
7. Se enjuago la membrana con PBS-TWEN
8. Se incubo con el anticuerpo primario una hora en agitación a temperatura ambiente
9. Se lavó la membrana 6 veces por 5 minutos cada vez con PBS-TWEN
10. Se incubo con el anticuerpo secundario una hora en agitación a temperatura ambiente
11. Se lavó la membrana 6 veces por 5 minutos cada vez con PBS-TWEN
12. La membrana quedo lista para revelarse

Revelado

1. Se escurrió bien la membrana en un papel absorbente y se colocó en un vidrio limpio y seco con la cara donde se transfirieron las proteínas hacia arriba.
2. En un tubo cónico de 15 ml se preparó la mezcla A y B del kit (ECL PRIME WESTERN BLOTTING DET de la marca GE HEALTHCAREBIOSCIENCESCORP) 500 µL de A y 500 µL de B, utilizando una puntilla diferente para cada uno, para evitar la contaminación de estos.
3. La mezcla obtenida se depositó en la superficie de la membrana cubriéndola totalmente
4. Se dejó incubar por 3 minutos, y se escurrió la membrana para quitar los excesos de la mezcla
5. Se montó la membrana cubriéndola por ambos lados con acetato

6. Se expuso la placa fotográfica por 5 minutos con la membrana y se procedió a revelar la hasta la aparición de las bandas
7. Se enjuago la placa con agua desionizada y se fijó la placa por 5 minutos con el fijador
8. Se enjuago con agua desionizada la placa y se secó la placa para el análisis de las bandas obtenidas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se estaba buscando identificar a la proteína SP-A de lavados bronquio-alveolares de neonatos pretérminos que presentaban SDR, y de acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que se pudo identificar dicha proteína por medio de diferentes técnicas

Se identificaron las muestras a estudiar las cuales se le asignó un número a cada una para su fácil manejo, cada proceso realizado utilizando estas muestras se llevaron a cabo con mucho cuidado para no alterar los resultados al momento de estudiarlas

Se obtuvo la curva de calibración por medio del espectrofotómetro (AGILENT TECHNOLOGIES CARY 60 UV-VIS) con la lectura de cuatro muestras utilizando un estándar de proteína de albumina sérica bovina a 595 nm por el método de BRADFORD, donde nos arrojó un coeficiente de variación de aproximadamente 99% de confiabilidad, con estos resultados se pudo obtener la curva y la concentración de cada una de las muestras (Figura 13) de aspirados bronquio-alveolares de neonatos que presentaban SDR y gastrosquisis, obtenidas de Instituto Nacional de Perinatología

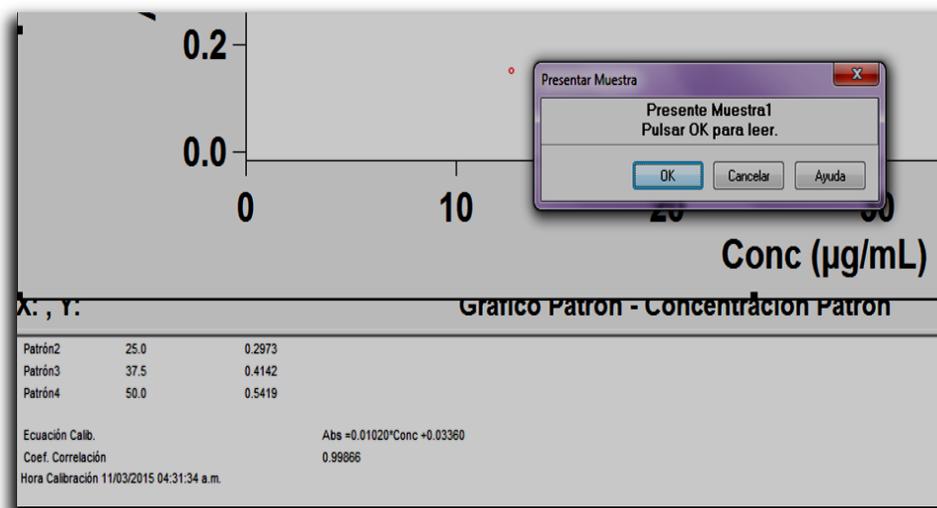


Figura 15. Curva de calibración con un coeficiente de variación de 99.8% para poder realizar las lecturas de las muestras en el espectrofotómetro

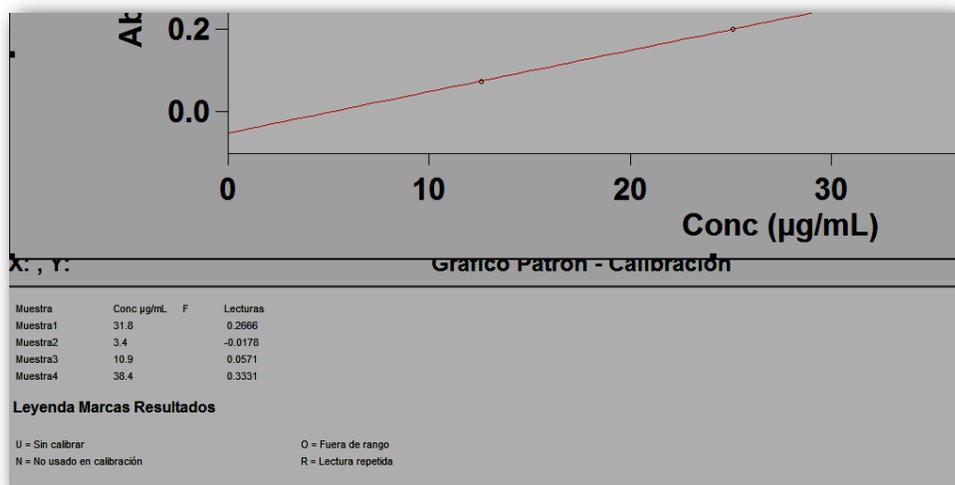


Figura 16. Curva de concentraciones de cada una de las muestras de aspirados bronquio-alveolares medidas por medio de espectrofotometría.

Se obtuvieron las concentraciones de las diferentes muestras de aspirados bronquio-alveolares de neonatos que presentaban SDR por medio de la lectura de espectrofotometría a 595 nm, obteniendo un coeficiente de variación de 98.78% factible para la lectura de las muestras, los resultados que obtuvimos fueron los siguientes por cada muestra:

Tabla 5. Concentraciones obtenidas de las muestras de aspirados bronquio-alveolares

Muestra	Concentración
1	10 µg/mL
2	10.2 µg/mL
3	12.5 µg/mL
4	8.0 µg/mL
5	63.0 µg/mL
6	18.7 µg/mL
7	195 µg/mL
8	37.4 µg/mL
9	18.2 µg/mL
10	12.5 µg/mL
11	32.8 µg/mL
12	10.5 µg/mL

Obtenidas las concentraciones de cada una de las muestras se procedió a desnaturalizarlas por medio de un termobloque a 100°C para correrlas en la cámara de electroforesis, las condiciones fueron de 220 V, en refrigeración a 4°C durante 1:26 hrs, se enjugaron los geles con agua desionizada y se fijaron por aproximadamente una hora, fijadas las proteínas al gel después de ese intervalo de tiempo se realizó la tinción de plata en la cual se obtuvieron bandas de proteínas de diferentes pesos moleculares en el gel, donde se pudo observar que las muestras cinco, seis, siete y ocho de aspirados bronquio-alveolares, se encontraron en cada una de las membranas de nitrocelulosa en dicha membrana muestra una proteína que corresponde aproximadamente al peso molecular de 25 KDa que se aproxima al peso de la proteína que se busca la proteína SP-A.

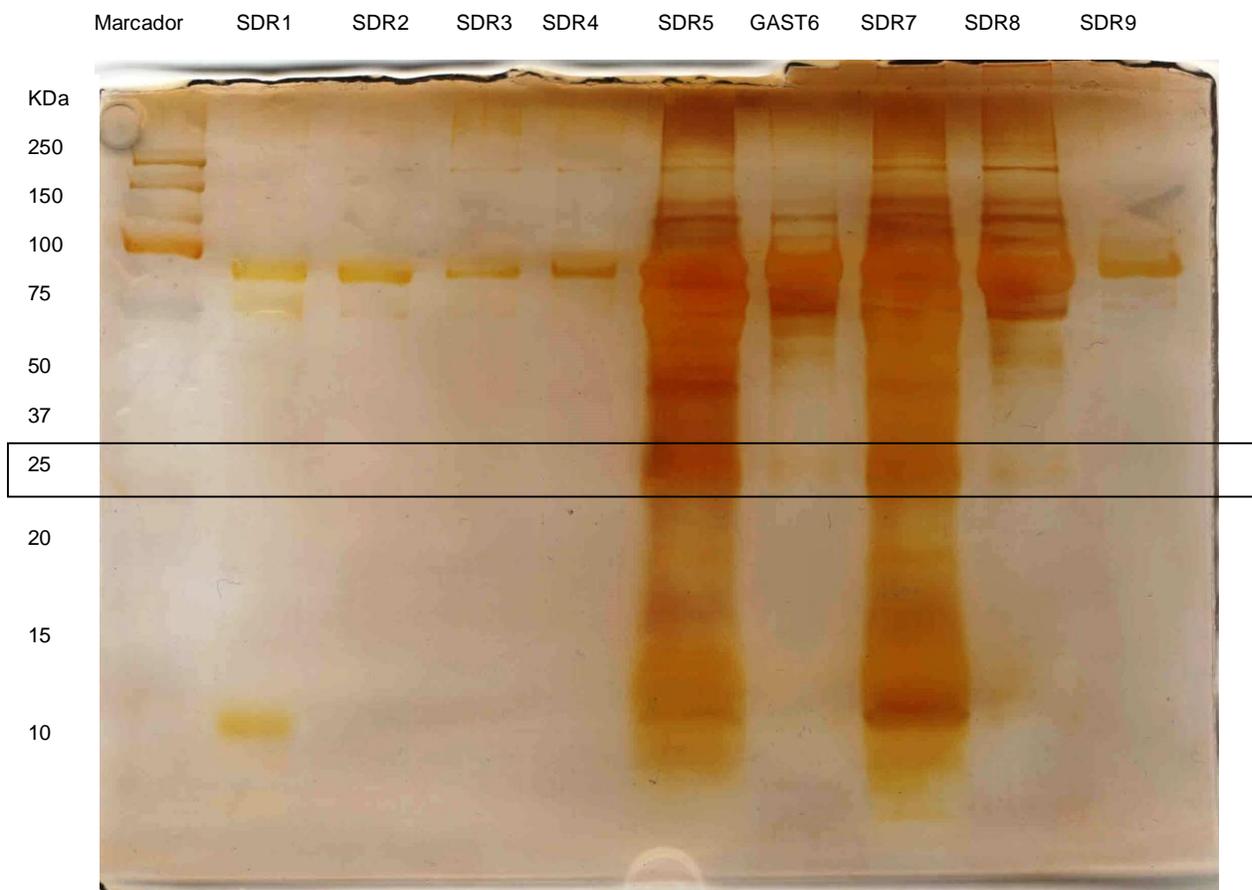


Figura 17. Gel de poliacrilamida al 12% en tinción de plata con las muestras de aspirados bronquio-alveolares de neonatos que presentan SDR y gastrosquisis

En el gel teñido en plata se puede observar las diferentes bandas de proteínas con diferentes pesos moleculares, donde las que se encuentran al inicio del gel son las proteínas más pesadas, mientras las que se encuentran al final del gel son las proteínas de menor peso molecular.

Para la realización del western-blot se corrió un nuevo gel en el cual se cargaron por duplicado las muestras cinco, seis, siete y ocho con la finalidad de poder observar una diferencia al momento del revelado, las muestras seis y ocho se tomaron como comparativo de la disminución de la proteína que se aproxima al peso molecular de la Proteína SP-A en los aspirados bronquiales y las muestras cinco y siete como la presencia de esta proteína.

Tomando en cuenta que la muestra seis es la muestra control ya que pertenece a un neonato que presenta gastrosquisis, mientras las muestras cinco, siete y ocho corresponden a neonatos prematuros que presentan SDR.

46

Se realizó la transferencia de las proteínas por medio del wester-blot en el cual se realizó la corrida en la cámara en refrigeración a 4°C a 100V por 60 minutos, se procedió al revelado de la membrana de nitrocelulosa, en la cual pudimos observar lo siguiente:

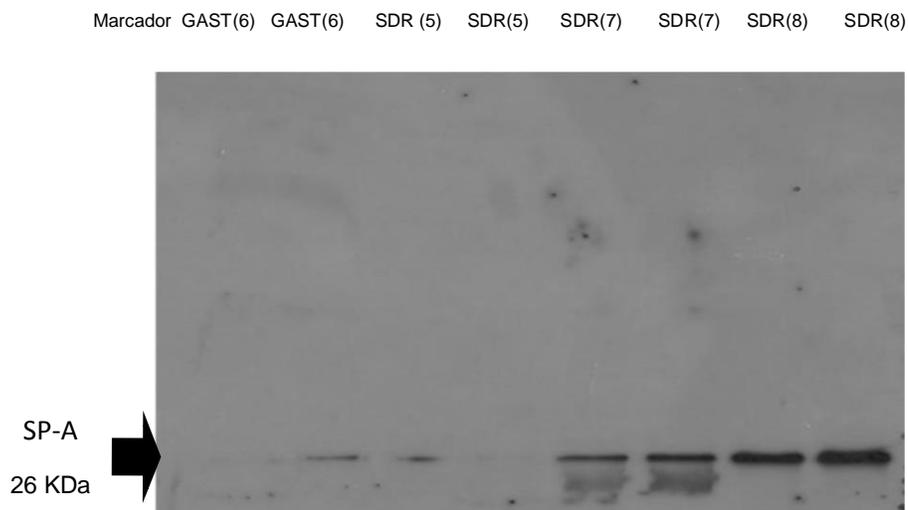


Figura 18. Western-Blot anti-SPA de aspirados bronquio-alveolares de neonatos que presentan SDR. Las proteínas fueron separadas en gel de poliacrilamida al 12% y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana con TBST-albúmina, se incubó con el anticuerpo anti-SPA. Después de varios lavados se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-donkey y revelado mediante quimioluminiscencia en placas hyperfilmAmersham.

Se obtuvieron las bandas donde se identificó la proteína SP-A de las respectivas muestras, se pudo observar que la muestra seis fue nuestra muestra control ya que pertenece a un neonato que nació con gastrosquisis, se observó una banda normal, ya que su pulmón está completamente desarrollado y es normal encontrar este tipo de proteínas, ya que dichas proteínas juegan un papel muy importante en las funciones respiratorias y se encuentran en los pulmones desarrollados en su totalidad y pueden llegar a manifestarse al momento de tener contacto con agentes extraños como virus, bacterias.

Mientras que la muestra ocho que pertenece a un neonato prematuro que presenta SDR se observa una ligera banda probablemente por la función de la proteína que es la de brindarle inmunidad al pulmón, sin embargo podemos observar que las muestras cinco y siete de aspirados bronquio-alveolares de neonatos prematuros con SDR son más marcadas, esto puede ser debido a la severidad de la patología que presentan, al tiempo en que se encuentran en cuidados intensivo o las funciones que presenta la proteína SP-A.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio nos permiten concluir que:

1. En el estudio se encontraron diferentes concentraciones en cada una de las muestras por el método de Bradford, a pesar de que 11 de las muestras presentaban la misma patología Síndrome de Dificultad Respiratoria, no en todas se pudo obtener una alta concentración de proteínas, sin embargo se pudo obtener 3 muestras que presentaban alta concentración de proteínas probablemente por la severidad de la enfermedad
2. La técnica de western blot ayudó a identificar la proteína SP-A la cual se pudo encontrar en 4 muestras (3 con SDR y 1 gastrosquisis), dichas muestras se identificaron en el gel en tinción de plata, sin embargo se observó que las muestras de SDR de lavados bronquio-alveolares 8 y 7 obtuvieron una banda de la proteína SP-A muy marcada, mientras que la muestra control (gastrosquisis) 6 y la muestra 5 de SDR se identificó la proteína SP-A normal en una banda ligeramente marcada.
3. La electroforesis SDS-PAGE es de gran eficacia como técnica para transferir proteínas mediante los geles, ya que se observa al momento de la tinción de plata la ubicación de las proteínas, donde se obtuvo un gel en tinción de plata el cual brindó información acerca de cuatro muestras que presentaban un peso molecular que coincidiera aproximadamente con el peso de la proteína SP-A estas muestras fueron las cuatro muestras que obtuvieron altas concentraciones, así como la muestra control que fue la de paciente con gastrosquisis.
4. Existen diferentes patologías las cuales pueden llegar a desarrollar la deficiencia del surfactante, el síndrome de dificultad respiratorio es una de ellas, con los resultados obtenidos se puede pensar que la proteína SP-A se encuentra en mayor concentración en las muestras 7 y 8 de LBA con SDR probablemente por la severidad de el SDR o por la función de la proteína que es la de enlazar lípidos y brindarle inmunidad a los pulmones.

GLOSARIO

- **Proteína:** molécula formada por cadenas líneas de aminoácidos, poseen función plástica, biorreguladora y de defensa.
- **Surfactante pulmonar:** Es un complejo de lípidos y proteínas capaz de reducir significativamente la tensión superficial dentro de los alveolos pulmonares.
- **Síndrome de dificultad respiratoria:** Es un cuadro respiratorio agudo, donde hay inmadurez en el pulmón.
- **Corticoides:** Hormonas que controlan el estrés, intervienen en la inflamación y regulan las secreciones de otras hormonas.
- **Membrana pleural:** Es una membrana serosa que recubre a los pulmones y otras estructuras, está compuesta por una lámina de células mesoteliales, tejido elástico y conectivo en interacción con capilares arteriales, venosos, linfáticos y nervios.
- **Lectina:** son proteínas que se unen a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo distinto. No se deben confundir con las glicoproteínas: las lectinas reconocen carbohidratos, mientras que las glicoproteínas están formadas en parte por ello

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Canet, J. (). Fisiología respiratoria. Sitio Web: <http://www.scartd.org/arxius/fisioresp06.pdf>

Carlson, B.M. 2009. Embriología humana y biología del desarrollo. 4ta.Ed. ELSEVIER 382-390

Clements, J., Avery, M. (1998).Lung surfactant and neonatal respiratory distress syndrome, Am J. RespirCrit Care Med, Vol. 157.

ChronosZC, Sever-Chroneos Z, Shepherd VL. Pulmonary surfactant: an immunological perspective. Cell PhysiolBiochem. 2010;25:13-26.

Gartner L., Hiatt J., 2008, texto atlas de histología, 3era. Ed., Mc. Graw Hill-Interamericana, México.

Hernández Aguilera, M.G. (2007) Genética molecular del surfactante pulmonar. Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. Santos Suarez, cd. La Habana. En línea (Disponible): <http://bvs.sld.cu/revistas/rhab/articulorev10/genmolecular.htm>

Jasso, L. 2008. Neonatología práctica, Síndrome de insuficiencia respiratoria. 7ma Ed. Manual Moderno 150-152

Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., MitchellR.N., 2008, Patología humana, 8va. Ed.,Elsevier, España, 264

López H., Soler v., 2008, Síndrome de dificultad respiratoria, julio del 2014., de asociación española de pediatría. Sitio web: <http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/31.pdf>

Lütjen-Drecoll, E., Rohen, W.J. (2008).Embriología funcional una perspectiva desde la biología del desarrollo. España: Editorial panamericana S.A

Maina, J. N. y J. B. West (2005)."Thin and strong!The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood- gas barrier."PhysiolRev85(3): 811- 44.

MartinezDucker, D.(). Fisiología respiratoria.....⁵¹ Cátedra de fisiología I, Facultad de medicina U.A.E.M. Sitio Web: kardia.cjb.net

Moore, K.L., Persaud, T.V.N. (2008). Embriología clínica. Barcelona, España: Editorial Elsevier

Noriega Borge, M.J. 2011. Fisiología humana. Departamento de fisiología y farmacología, Universidad de Cantabria. Sitio Web: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-humana-2011-g367>

Pérez-Gil, J. (2010). El sistema surfactante pulmonar. *Investigation y ciencia*: 38-45

Pérez-Gil J. Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *BiochimBiophysActa*. 2008;1778:1676-95.

Pérez Gil, J. (2011). El sistema surfactante pulmonar. *Salud siglo XXI*. En línea (Disponible): <http://elmercaderdelasalud.blogspot.mx/2011/01/el-sistema-surfactante-pulmonar.html>

Salder, T.W. (2009). Embriología medica con orientación clínica. Buenos Aires, Argentina: Editorial panamericana S.A

Sánchez Ramírez., Torres Torreti, J. (2004). Surfactante pulmonar. *Revista pediátrica electrónica*. En línea (Disponible): <http://www.revistapediatria.cl/vol1num1/pdf/surfactante.pdf>

Scanlon V.C., Sander T., 2007, elementos esenciales de la anatomía y la fisiología, 5ta. Ed., F.A. Davis Company, USA, 603:344

Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141:471-501

Ira Fox, S. 2011. Fisiología humana, fisiología respiratoria. 12va. Ed. Editorial McGraw Hill.

Tortora G.J., Derrickson B., 2010, ⁵²Principios de Anatomía y Fisiología, 11a. Ed., PANAMERICANA S.A de C.V, 862-867.

Wang, T., Roscenberg, C.L., Bao, Y.X., Strak, J.M., Harrod, K.S. (2003). Clara cell secretory protein modulates lung inflammatory and immune responses to respiratory syncytial virus infection. J Immunol.

Wright, J.R. (1997). Immunomodulatory functions of surfactant. Physiological review.Vol 77.

ANEXOS

Pr 53 ión de reactivos

Reactivo de color

Azul de coomasi 6.250 100 mg

Etanol al 95% 50 ml

Ácido fosfórico al 85% 100 ml

*Llevar a 200 ml con agua desionizada (agua libre en iones)

Estándar de proteína

Albumina sérica bovina 1mg

Agua desionizada 1000 µg/ml

Revelador

Na₂CO₃ al 3% 0.75 gr

Formaldehido al 0.05% 12.5 µl

Na₂SO₃ (STOCK) al 0.004% 500 µl

*Aforar a 25 ml con agua desionizada

Fijador

Metanol 40 ml

Formaldehido 5 ml

Agua desionizada 55 ml

*volumen total 100 ml

Tiosulfato de Sodio en 100 ml de agua desionizada

Na₂S₂O₃ 0.02 gr

Agua desionizada 100 ml

Solución de plata $Ag NO_3$ al 0.1%

$Ag NO_3$ 0.025 gr

Agua desionizada 25 ml

Ácido cítrico 2.3 M

Ácido cítrico 33.82 gr

Agua desionizada 50 ml

Solución de monómeros al 30/ 0.8% de concentración total ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA

Acrilamida 30 gr

Bisacrilamida 0.8 gr

*Aforar en 100 ml de agua desionizada y filtrar en papel WHATMAN No. 1 y conservar en frasco ámbar.

Solución reguladora Tris- HCl 1.5 M Ph 8.8 (Gel separador)

Tris hidroximetil amino metano 18. 171 gr

SDS 10 % 4 ml

*Ajustar pH a 8.8 con HCl 1 N y después aforar a 100 ml con agua desionizada

Solución reguladora Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (Gel concentrador)

55

Tris hidroximetil amino metano 6.057 gr

SDS 10% 4 ml

*Ajustar pH a 6.8 con HCl 1 N y después aforar a 100 ml con agua desionizada

Solución de DUODENIL SULFATO DE SODIO (SDS) al 10%

Duodenil sulfato de sodio 10 gr

*Aforar con agua desionizada a 100 ml

Solución de persulfato de amonio al 10%

Persulfato de amonio 10 gr

Agua desionizada 1 ml

*Preparar inmediatamente antes de usar.

Solución de azul de Bromofeni al 0.2%

Azul de bromofenol 0.02 gr

Agua desionizada 10 ml

Solución reguladora para la muestra 2X

Solución de azul de bromofenol al 0.2% 0.25 ml

Solución reguladora Tris-HCl pH 6.8 1.25 ml

Solución de SDS al 10% 2.00 ml

Mercapto etanol 0.50 ml

Glicerol 1.00 ml

*La solución es estable cuando se mantiene por un mes a -20°C

Solución reguladora de corrida 10X (solución Stock)

Tris hidroximetil amino metano 30 gr

Glicina 144 gr

*Aforar a 1000 ml con agua desionizada

Solución reguladora de corrida 1X

Solución reguladora de corrida 10X 100 ml

SDS al 10% 10 ml

*Aforar a 1000 ml con agua desionizada

Reactivos para TRANS-BLOT

Buffer de transferencia

Buffer de corrida 10 x 100 ml

Etanol 200 ml

*Aforar a 1000 ml y poner enfriar

PBS-TWEN

Twen 3ml

PBS 1x 1000 ml

REVELADOR 1

Antirabbit IgG HRP 2 μ l

PBS-TWEN 10ml

REVELADOR 2

DnKPAbHRP 5 μ l

PBS-TWEN 10 ml

