

VARIACIÓN EN PROTEÍNAS DEL SURFACTANTE EN TEJIDO PULMONAR DE LACTANTES FALLECIDOS DURANTE UNA INFECCIÓN POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*

LICARALLÉN QUEVEDO C.¹, DR. SERGIO VARGAS M.², BQ. CAROLINA PONCE O.²

RESUMEN

Antecedentes: *Pneumocystis sp* induce daños en el surfactante pulmonar, consistentes en una alteración de su composición lipídica y en cambios selectivos en la expresión de sus proteínas (SP). Nosotros postulamos que en lactantes fallecidos durante una infección primaria por *Pneumocystis jiroveci*, presentan una disminución en la expresión de proteínas del surfactante del tipo hidrofóbicos (SP-B, SP-C) y un aumento en las de tipo hidrofílicos (SP-A, SP-D).

Método: Se utilizaron muestras de tejido pulmonar de lactantes fallecidos en la comunidad, las que fueron diagnosticadas para *P.jiroveci* mediante PCR anidada y las SPs analizadas por inmunohistoquímica. Se asignó un puntaje a cada muestra de acuerdo al grado de inmunotinción y el número de células positivas en 50 campos a 40X.

Resultados: Se observó un aumento significativo en la expresión de Sp-A ($p < 0.002$) en las muestras *P.jiroveci* positivas y una tendencia a la disminución en la expresión de SP-B que no alcanzó significancia estadística ($p = 0.12$).

Conclusión: Nuestros resultados sugieren que SP-A aumenta su expresión en presencia de *P.jiroveci* y justifican el análisis de un mayor número de muestras para el estudio de SP-B. Se continuaran nuestras investigaciones para cuantificar esta expresión y dilucidar si estas alteraciones ocurren a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional, relacionándolas con el síndrome de muerte súbita

Palabras claves: *pneumocystis jiroveci*, surfactante, síndrome de muerte súbita.

INTRODUCCIÓN

En el curso de la historia de la infección causada por el *Pneumocystis jiroveci*, se han realizado numerosos estudios sobre la neumonía que ocurre en pacientes inmunosuprimidos, como son aquellos que sufren del SIDA, que están sometidos a quimioterapia debido al cáncer, o que reciben drogas inmunosupresoras para el trasplante de órganos (1,2), todas estas enfermedades probablemente por reinfección por parte del patógeno (infección secundaria). Como principales modelos de estudio están los animales inmunosuprimidos e inmunodeficientes, principalmente los ratones SCID (colonias de diversa combinación de inmunodeficiencia, carecen de células T y B) y ratones nudes atímicos (carecen de células T) (3).

La infección primaria o primer contacto con *Pneumocystis*, que ocurre precozmente en la vida, normalmente permanece subclínica, pero algunos reportes han indicado que estos pueden presentarse clínicamente como neumonía en infantes inmunocompetentes, infección respiratoria autolimitada o sólo asintomática, que pueden llegar a ser transmitida a hospedadores susceptibles (4,5,6).

Más de un 50% de la etiología de la neumonía permanece sin ser conocida, es así como un número significativo de enfermedades respiratorias, podrían

corresponder a manifestaciones clínicas de un primer contacto con *Pneumocystis*. Estudios realizados en el laboratorio del Dr. Vargas, han sugerido la asociación entre la infección de *Pneumocystis* y el síndrome de muerte súbita (SMS)(4).

El mejor modelo de animal para el estudio de la infección primaria del *Pneumocystis* es el conejo, ya que estos usualmente desarrollan en forma espontánea, en el momento del destete, la neumonía causada por *Pneumocystis*, la cual resuelven a las pocas semanas, sin necesidad de un tratamiento, imitando la infección causada en humanos sanos (7,8). Sin embargo, es posible hacer un paralelismo entre la infección primaria y modelos de infección secundaria, ya que los cambios observados a nivel del surfactante pulmonar son los mismos en ambos modelos y dichos cambios son observados tempranamente en modelos de infección secundaria, sugiriendo que dichos cambios podrían ser requeridos para permitir la proliferación del *Pneumocystis* (9).

Pneumocystis, ha sido clasificado como un tipo exótico de hongo (10). La infección por *pneumocystis* es especie específico, siendo identificado *P. carinii* para los animales y el *P. jiroveci* en animales, y se sugiere que su transmisión es vía inhalación de quistes infectados(6).

¹ Estudiante 4° año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

² Laboratorio de Infecciones Respiratorias. Programa de Microbiología. ICBM. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Se ha postulado que luego de la inhalación de quistes de *Pneumocystis* estos llegan al interior del alvéolo donde proliferan en su forma trofozoítica (nomenclatura de protozoo) y se adhieren al neumocito tipo I, a través de interacciones entre las adhesinas polipeptídicas sobre la superficie del hongo y proteínas de la matriz extracelular, así como fibronectina, vintronectina y laminina, éste parece ser el paso fundamental en la colonización (3). Se cree que la injuria provocada en el tejido es producto de una respuesta inflamatoria, a través de mediadores como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Paralelo a esto ocurre una hiperplasia e hipertrofia del neumocito tipo II. Se observa un incremento de la permeabilidad de la membrana alveolo-capilar, lo que explicaría en parte, el edema intersticial. Este proceso conduce a un relleno de espacios con masas del parásito, macrófagos, células epiteliales alveolares escamadas y eventualmente, leucocitos polimorfonucleares. Los materiales encontrados en el pulmón contienen además glicoproteínas, componentes del surfactante, inmonoglobulinas y otras proteínas del hospedero. Las células plasmáticas que infiltran los pulmones de los infantes durante la neumonía por este microorganismo no siempre están presentes en la neumonía de los pacientes de SIDA u otros inmunocomprometidos (3,6)

Se ha visto que la respuesta inmune generada por el hospedador es del tipo humoral y celular, teniendo una importancia fundamental las células T CD4⁺ (linfocitos T helper), lo cual se ha estudiado principalmente en ratones nude y SCID (3), lo que explicaría también la enfermedad en pacientes inmunodeprimidos. Todos estos mecanismos conducen finalmente a una sintomatología que cursa con: tos seca no productiva, fiebre de intensidad variable, astenia, disnea y taquipnea con cianosis. La presión parcial de oxígeno es baja, mientras que la presión parcial de dióxido de carbono puede ser normal o baja. Si no son tratados los pacientes, esto lleva en un 100% de los casos a una muerte por asfixia (11).

Los mecanismos por los cuales se produce la hipoxia en el desarrollo en esta enfermedad aún permanecen sin ser clarificados, estudios tanto en humanos como en modelos de infección en animales sugiere que la anormalidad en la expresión de los componentes y la actividad biofísica del surfactante juega un rol en la alteración fisiológica de la respiración asociada a esta infección (12), dichas alteraciones se presentan en etapas tempranas de la infección (9).

El surfactante pulmonar ubicado en la superficie alveolar, es una mezcla activa de fosfolípidos (80%), otros lípidos (10%) y proteínas (10%) secretadas por los neumocito tipo II, y cuyas funciones principales son: 1) Reducir la tensión superficial en la interfase líquido-aire, lo que permite mantener la estabilidad pulmonar a bajos volúmenes del pulmón (12), y 2) Participar en la defensa del huésped, evitando la vulnerabilidad del pulmón a la invasión de microorganismos (13).

Sobre la base de sus estructuras, función y solubilidad en solventes orgánicos, las proteínas del surfactante han sido divididas en dos grupos:

1. Las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C, mantienen la tensión superficial del alvéolo, participando en el empaquetamiento de los lípidos, organización y en el aumento de la absorción de la interfase líquido-aire. La contribución fisiológica en la función del pulmón ha sido designada a través de diversas observaciones, como por ejemplo: la deficiencia congénita de SP-B (y ausencia conmesurable de SP-C) resulta de manera uniforme en una falla respiratoria crónica en infantes humanos (14)

2. Las proteínas hidrofílicas SP-A y SP-D, son importantes componentes en la inmunidad innata. SP-A y SP-D son miembros de una familia de lectinas tipo C que incluyen un número de moléculas con conocida función de defensa del hospedador. Ambas proteínas pueden influir en la función de los macrófagos y la vía de señalización específica de receptores presentes sobre las células blancos. *In vitro* tanto SP-A como SP-D selectivamente se unen a *Pneumocystis* (12). Se ha demostrado que SP-A media el aumento del *clearance* de *Pneumocystis* por los macrófagos (12).

Se ha observado en el surfactante de humanos y animales modelos de NPC una elevación en la actividad fosfolipasa, disminución en la cantidad de fosfolípidos y alteración relativa e las proporciones de los componentes individuales de los lípidos (fosfatidilglicerol, dipalmitodilfosfatidilcolina) (12). Sin embargo, los cambios reportados en la composición lipídica son insuficientes para explicar las alteraciones fisiológicas observada en NPC. Se ha descrito una selectiva *down-regulation* de la expresión de las proteínas SP-B tanto en ratones scid/scid y modelos de ratones depletados para CD4, así como incrementos en los niveles de SP-A y SP-D inducido por NPC en tratamientos con corticoides en ratas (12), pero el rol de los cambio en estas proteínas en la patogénesis de la disfunción del surfactante permanecían desconocidos.

Recientemente se ha ido esclareciendo los cambios observados en las relaciones proteicas; es así como Atochina y cols. demostró en un modelo con tratamiento no esteroideal que NPC induce un incremento significativo en la tensión superficial mínima, paralelo a la selectiva inhibición de la expresión de SP-B y SP-C. Además reportó que los niveles alveolares de SP-D eran marcadamente elevados. Estudios con ratón *knockout* para SP-A y SP-D no muestran alteraciones en la tensión superficial (15).

Al analizar las investigaciones realizadas para aclarar la neumonía causada por *Pneumocystis jiroveci* durante una infección secundaria, es posible relacionarla con la infección primaria y predecir un posible mecanismo que explique su manifestación clínica o subclínica según corresponde, pero principalmente, nos ayudará a recolectar mayor información para relacionar los cambios producidos en el surfactante con el síndrome de muerte súbita estudiado en el laboratorio del Dr. Vargas.

De acuerdo a esto, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo y objetivos:

HIPÓTESIS:

Lactantes fallecidos durante una infección primaria por *Pneumocystis*, presentan una disminución en la expresión de proteínas del surfactante hidrofóbicas (SP-B, SP-C) y un aumento de la expresión de proteínas del surfactante hidrofílicas (SP-A, SP-D)

OBJETIVO GENERAL:

Determinar, mediante inmunohistoquímica, las proteínas del surfactante en muestras de tejido pulmonar de lactantes fallecidos que cursan una infección primaria de *Pneumocystis jiroveci*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

-Clasificación de las muestras de tejido pulmonar en: positivo para *Pneumocystis jiroveci* y negativos para *Pneumocystis jiroveci*, mediante PCR anidada.

-Estandarizar un método inmunohistoquímico, para el análisis semi-cuantitativo para SP-A.

-Utilizando el protocolo estandarizado de inmunohistoquímica, analizar SP-B.

-Realizar un análisis comparativo de las diferentes proteínas y su relación con la infección por *P. jiroveci*

MATERIALES Y MÉTODOS**1. Material biológico**

Muestras de tejido de pulmón derecho de lactantes fallecidos en la comunidad, obtenidos desde el Servicio Médico Legal.

2. Procesamiento de las muestras

Las muestras desde cada lóbulo del pulmón fueron almacenadas a -20°C. Se realizaron cortes en micrótopo de congelación de 4mm, se fijaron con acetona fría en portaobjetos silanizados y se almacenaron a -20°C en papel de aluminio, para su posterior estudio.

3. Diagnóstico de *Pneumocystis jiroveci*

a) Extracción y purificación de ADN mediante Kit Qiagen (cat# 51306)

b) La detección del *P. jiroveci* se realiza mediante la reacción de polimerasa en cadena (PCR) anidada en termociclador (MJ research, modelo PTC-150-16), de acuerdo al siguiente protocolo:

1° **Amplificación:** se utilizó partidores pAZ102-H y pAZ102-E (Bioschile), que amplifican el gen de la sub-unidad mayor del rRNA mitocondrial del *Pneumocystis* y se preparó el mix para cada muestra. El programa utilizado fue: 40 ciclos de: 94°C por 1:30min; 55°C por 1:30min; 72°C por 2:00min.

2° **Amplificación:** se utilizó partidores internos pAZ102X y pAZ102Y (bioschile) específicos para *Pneumocystis jiroveci*, y se preparó el mix para cada muestra. El programa utilizado fue: 10 ciclos de: 94°C por 1:30 min, 56°C por 1:30 min, 72°C por 2:00 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1:30 min, 65°C por 1:30min, 72°C por 2:00min. Las muestras se amplificaron se almacenaron a -20°C. Se observaron en gel de agarosa al 2% que contiene Bromuro de etidio en buffer TAE 0.5X. El gel se corrió a 50 volts por 30 minutos en buffer TAE 0.5X con un marcador de peso molecular de 100pb (Gibco cat#15628-019)

Soluciones utilizadas:

- Buffer TAE 50X: 40 mM Tris, 20mM Acido acético glacial, 1mM EDTA pH 8.0.

- Mix 1x para PCR (invitrogen: 2.5 ml DNA muestra, 2.5 ml buffer PCR10X, 3ml MgCl₂ 25mM, 0.5ml dNTPs 10mM, 0.75 ml de cada primers 10mM, 0.125 ml Taq polimerasa 500U (gibco cat#18038-042) y 14.8 ml de agua nanopure.

- Partidores universales para *Pneumocystis*:

pAZ102-H sens: 5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3'
pAZ102-E antisens: 5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3'

- Partidores internos de *P. jiroveci*:

PAZ102-X sens: 5'-GTG AAA TAC AAA TCG GAC TAG G-3'
PAZ102-Y antisens: 5'-TCA CTT AAT ATT AAT TGG GGA GC-3'

4. Inmunohistoquímica

Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente de acuerdo al siguiente protocolo:

a) Las muestras procesadas se ambientaron en PBS por 5min. y se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena mediante la adición de 40ml del reactivo bloqueo peroxidasa (Sta. Cruz cat# G1703) por 10 min. Se lavo con PBS por 2 min 3 veces, eliminando el exceso de líquido desde los portaobjetos

b) Para bloquear las uniones inespecíficas se adicionó 40 ml de BSA al 2% por 30 min.

c) La titulación de los anticuerpos primarios SP-A (cat#sc-7700) y SP-B (cat#sc-7701) se realizó a las diluciones: 1:20, 1:30 y 1:50 en BSA al 2%. Se incubó con 40 ml del anticuerpo primario previamente diluido por 30 min. Se lavo con PBS por 2 min 3 veces, eliminando el exceso de líquido desde los portaobjetos.

d) Para el bloqueo de biotina endógena se utilizó el kit Dako cat#01344. Primero se incubó con 40 ml de Avidina por 10 min. Se lavo con PBS como se indicó anteriormente. Segundo, se incubó con 40 ml de Biotina por 10 min. Se lavo nuevamente con PBS.

e) Se incubaron las muestras con 40 ml de anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra (cat# sc-2053) por 30 min. Se lavo con PBS por 2 min 3 veces, eliminando el exceso de líquido desde los portaobjetos.

f) Cómo método de detección se utilizó el kit estraptavidina-HRPO (Santa Cruz cat#SC-2053).

g) Se realizó tinción de contraste con hematoxilina #2 de Gill por 10 min, se realizó lavados con agua desionizada. Luego se pasó por un baño con alcohol-ácido, lavando posteriormente con agua desionizada, se dejó por 5min en solución de Borato de sodio al 1% y se lavó con agua desionizada.

h) Inmediatamente se adicionó a cada portaobjeto 1 a 2 gotas de medio de montaje acuoso (Dako cat#S3025), se cubrió con cubreobjeto, para su observación por microscopia de luz (olympus Bx60)

Soluciones utilizadas: Todos los reactivos son Merck

- Buffer PBS: 1.5mM KH₂PO₄, 0.15M NaCl, 3 mM de Na₂HPO₄

- Solución alcohol-ácido: alcohol70%, 12 mM HCl

5. Análisis Inmunohistoquímico

Para el análisis semicuantitativo de la tinción inmunohistoquímica se establecieron categorías de análisis a las que se le asignó un puntaje determinado (tabla 1). La cuantificación de la marca se realizó calculando el promedio de la multiplicación del número de células positivas en 50 campos 40x por el puntaje asignado (ver fórmula).

Formula de asignación del puntaje:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de células (50 campos 40x) x puntaje (1,2 o3)}}{3}$$

Tabla 1: Categorización celular semicuantitativa inmunohistoquímica.

Categoría	Puntaje	Características
+++	3	Tinción Intensa (naranja-oscuro), cubre todo el citoplasma celular.
++	2	Tinción Media (anaranjado), cubre zonas del citoplasma, más pericelular
+	1	Tinción Tenue (anaranjado-plomizo), cubre zonas del citoplasma, o todo el citoplasma.

6. Análisis estadístico

Para verificar si existían diferencias significativas en la expresión de las proteínas del surfactante en los grupos *P.jiroveci* positivo y los *P.jiroveci* negativo, se utilizó el software de estadística Systat, aplicando el test de Mann-Whitney que se emplea para el análisis de variables no pareadas con n < 9. Valores de p < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1. Clasificación de las muestras mediante diagnóstico de *Pneumocystis jiroveci*

La PCR anidada genera dos fragmentos identificables en el gel de agarosa al 2%: en la 1ª amplificación es de 362 pb y en la 2ª amplificación es de 267 pb. En la figura 1, se ilustran algunas muestras observadas. Mediante la PCR se obtuvo el diagnóstico de *P.jiroveci* en cada muestra estudiada, lo que permitió clasificar las muestras en: *P.jiroveci* positivo y *P.jiroveci* negativo (tabla 2).

Muestra	PCR 1	PCR 2	<i>Pneumocystis jiroveci</i>
1138-03 LDI	+	+	Positivo
1138-03 LDM	+	+	Positivo
1138-03 LDS	+	+	Positivo
1642-03 LDI	-	+	Positivo
1642-03 LDM	-	+	Positivo
1642-03 LDS	-	-	Negativo
1225-03 LDI	-	-	Negativo
1225-03 LDM	-	-	Negativo
1225-03 LDS	-	-	Negativo
1231-03 LDI	-	-	Negativa
1231-03 LDM	-	-	Negativa
1231-03 LDS	-	-	Negativa
1222-03 LDS	-	+	Positiva
658-03 LDI	-	+	Positiva
738-03 LDI	-	+	Positiva
865-03 LDI	-	-	Negativa

Tabla 2: Clasificación de las muestras según diagnóstico de *P.jiroveci*

2. Inmunohistoquímica

Se estandarizó el protocolo de inmunohistoquímica para ambas proteínas del surfactante y la titulación del primer anticuerpo dio como mejor dilución 1:30 para SP-A y para SP-B. Se identificó una muestra como positiva para *P.jiroveci*, la cual fue utilizada como control positivo para SP-A y control negativo para SP-B, dada su gran intensidad en la inmunohistoquímica y su PCR anidada positiva en ambas amplificaciones. Como control negativo se utilizó cada muestra sin la incubación con el primer anticuerpo (figura 2)

3. Análisis Inmunohistoquímico

Las muestras procesadas para inmunohistoquímica, presentaron diferentes tipos de inmunotinción por célula marcada con el anticuerpo anti proteína del surfactante (figura 3). Estas diferencias fueron claves para su clasificación (ver tabla 1) y fueron observadas tanto para SP-A como para SP-B (datos no mostrados).

Los resultados del análisis semicuantitativo para SP-B y SP-A se muestran en las tablas 3 y 4, los cuales se obtuvieron mediante la fórmula de asignación de puntaje (ver antes).

El análisis estadístico indicó que la expresión de la proteína SP-A en las muestras *P.jiroveci* (+) fue significativamente mayor a las muestras *P.jiroveci* (-) ($p < 0.0024$). La proteína SP-B no presenta una diferencia significativa entre los dos grupos de muestras ($p = 0.12966$).

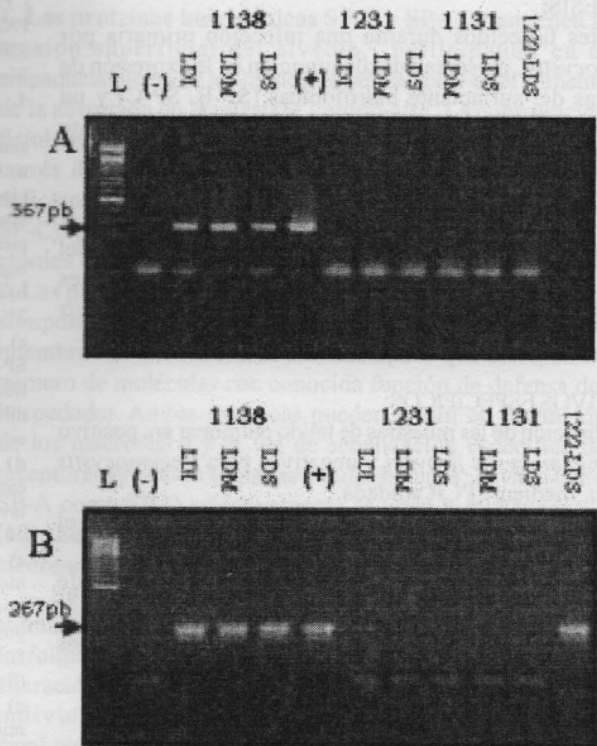


Figura 1: Primera y Segunda PCR para *P. jiroveci*. A: Primera PCR con partidores pAZ102-H y pAZ102-E. B: Segunda PCR con partidores internos pAZ102X y pAZ102Y. L: marcador de peso molecular de 100pb, (-): control negativo, (+): control positivo, LDS: lóbulo derecho superior, LDM: lóbulo derecho medio, LDI: lóbulo derecho inferior. Números: codificación de muestras del año 2003

DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que la infección por *Pneumocystis* provoca una alteración selectiva en la composición del surfactante, y disminuye la razón fosfolípido/proteína (12,16).

Las investigaciones en los últimos años se han volcado al análisis de los cambios en la expresión de las proteínas del surfactante. Atochina y cols. en el año 2000, demostraron una disminución en la expresión de las proteínas hidrofóbicas Sp-B y SP-C, en infección por *Pneumocystis* en ratones scid/scid sin tratamiento esteroideal; este cambio se vio acompañado de un cambio fisiológico importante en las propiedades biofísicas del surfactante (aumento de la tensión superficial). Estudios previos realizados para encontrar la función de las proteínas hidrofóbicas, apoyan la relación entre estas proteínas y cambios en la tensión superficial. (3,12,17).

El aumento en la expresión de las proteínas hidrofílicas también se ha demostrado (18). Así en pacientes con neumonía relacionadas a SIDA se observó un incremento de la proteína SP-A, incluso mayor que en pacientes que presentan neumonías no producidas por éste microorganismo. (16,19).

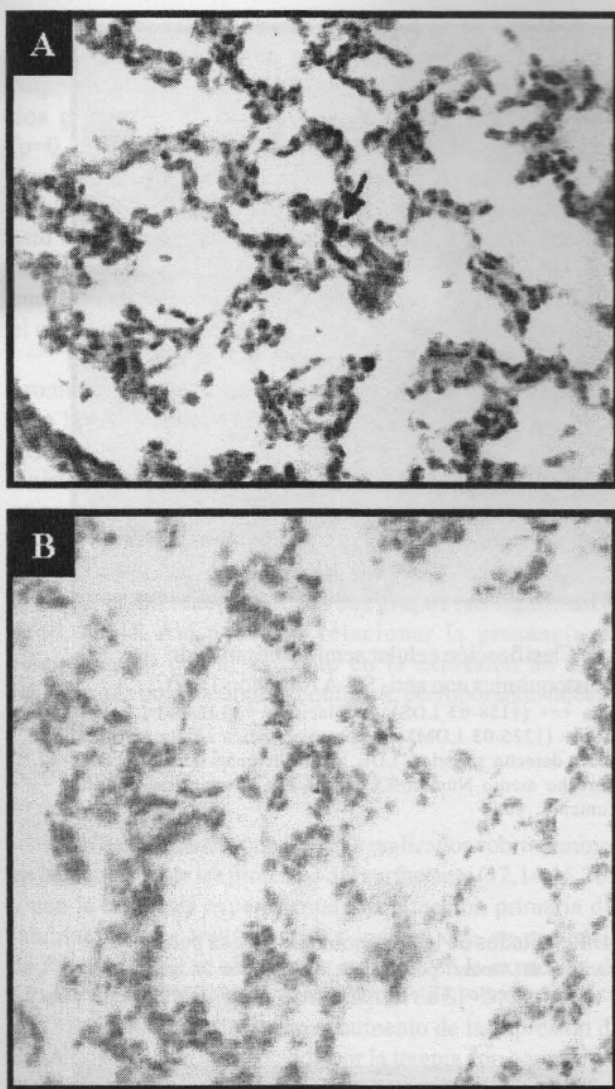


Figura 2: Muestras controles de Inmunohistoquímica
A: Control positivo (1138-03 LDI). **B:** Control negativo (1138-03 LDI). Aumento 20X

La proteína SP-D también responde con una elevación en su concentración frente a infecciones por *Pneumocystis jiroveci* (12,), y recientemente se ha comprobado su función en la agregación de microorganismos, participando de esta manera en la eliminación por parte del hospedero, al poseer la proteína SP-D un dominio que reconoce la glicoproteína A de *Pneumocystis sp.*, que potencia la interacción con macrófagos alveolares (16,18,19).

Si bien todos estos estudios fueron realizados en modelos que cursaban con una infección secundaria, es posible relacionarlos a una infección primaria, ya que los cambios observados en el surfactante se desarrollan tempranamente en la infección (20).

Basados en las observaciones descritas, nosotros planteamos que lactantes fallecidos durante una infección primaria por *Pneumocystis jiroveci*, presentan una disminución en la expresión de proteínas del surfactante de

A

Muestra	Categoría +	Categoría ++	Categoría +++	Puntaje
1138-03 LDI	4	5	0	4,667
1138-03 LDM	0	3	5	7,000
1138-03 LDS	0	5	1	4,333
1642-03 LDI	6	6	0	6,000
1642-03 LDM	0	0	0	0,000
1222-03 LDS	0	0	0	0,000
$\bar{X} \pm SE$				3,667 \pm 1,223

B

Muestra	Categoría +	Categoría ++	Categoría +++	P. jiroveci (-)
1642-03 LDS	2	2	0	2,000
1225-03 LDI	1	8	3	8,667
1225-03 LDM	1	9	4	10,333
1225-03 LDS	0	26	8	25,333
1231-03 LDI	0	4	6	8,667
1231-03 LDM	9	0	0	3,000
$\bar{X} \pm SE$				9,667 \pm 3,421

Tabla 3: Resultados de la inmunohistoquímica para SP-B

A: en muestras *P. Jiroveci* positiva. **B:** en muestras *P. Jiroveci* negativa.
 X = Promedio SE = Error estándar. P=0.12966

tipo hidrofóbicas (SP-B y SP-C) y un aumento de las de tipo hidrofílicas (SP-A y SP-B).

Para probar nuestra hipótesis lo primero que se realizó fue la clasificación de las muestras de tejido pulmonar mediante PCR anidada. Se estudiaron los pulmones derechos de 8 pacientes, obteniendo muestras de cada uno de los lóbulos. En la tabla 2 se pueden observar los resultados de las dos amplificaciones sucesivas de ADN: se obtuvieron 8 muestras *P. jiroveci*-negativas y 8 muestras *P.jiroveci*-positivas. Sólo la muestra 1138-03 presentó un PCR positivo en las dos amplificaciones, sugiriendo una mayor carga de *P. jiroveci*. La muestra 1642-03 es negativa para *P.jiroveci* sólo en el lóbulo Derecho Superior (LDS), indicando una infección localizada del patógeno en los otros dos lóbulos, ésta focalización de la infección ha sido observada anteriormente en nuestro laboratorio (datos no mostrados). En la fig. 1A se observa una banda de 367 pb que corresponde a la primera amplificación de las muestras 1138-03 y en la fig.1B se observa una banda de 267 pb que corresponde a la segunda amplificación de la misma muestra. Las otras 2 muestras cargadas en el gel no amplifican para *Pneumocystis*. La muestra 1642-03 LDS positiva para *P. jiroveci*, no presentó banda en la primera amplificación, ya que la cantidad de ADN obtenida es menor a la detectada por un gel de agarosa, pero al amplificar nuevamente esta muestra si observamos una banda a 267pb (2° amplificación).

El análisis de las variaciones de expresión de las proteínas del surfactante se realizó a través de inmunohistoquímica. Por lo tanto nuestra segunda etapa en

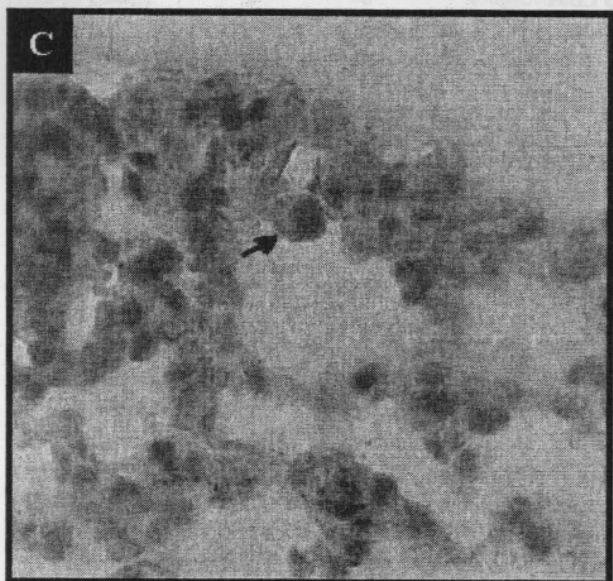
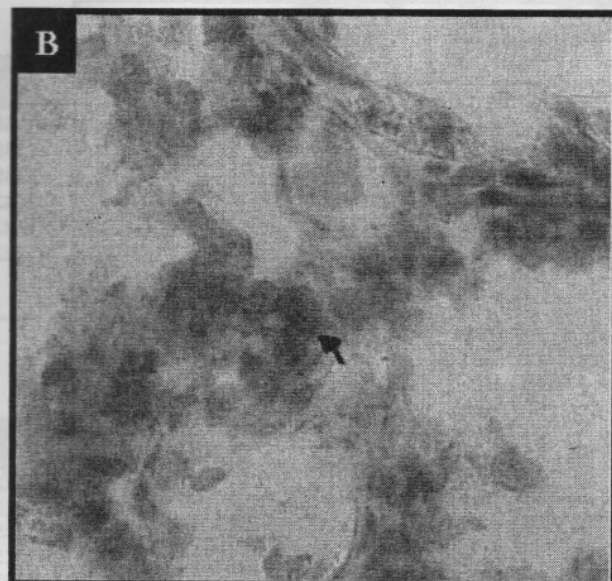
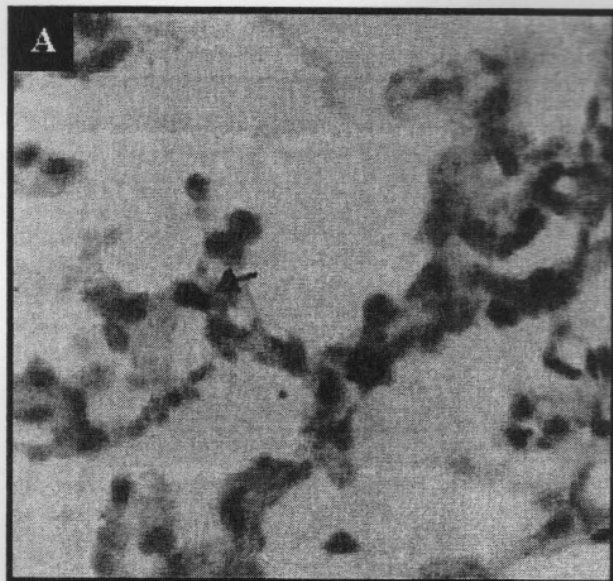


Figura 3: Clasificación celular semicuantitativa de Inmunohistoquímica con anti- SP-A (dilución 1:30).

A: Tinción +++ (1138-03 LDS). B: Tinción ++ (1225-03 LDI). C: Tinción + (1225-03 LDM). Flecha roja: indica célula marcada. LDS: lóbulo derecho superior, LDI: lóbulo derecho inferior, LDM: lóbulo derecho medio. Números: codificación de muestras del año 2003. Aumento: 40x

Tabla 4: Resultados de la inmunohistoquímica para SP-A

A: en muestras *P. Jiroveci* positiva. B: en muestras *P. Jiroveci* negativa. X = Promedio SE = Error estándar. P < 0.00244

A

Muestra	Categoría +	Categoría ++	Categoría +++	P. jiroveci (+)
1138-03 LDI	2	12	30	38,667
1138-03 LDM	0	8	10	15,333
1138-03 LDS	0	11	20	27,333
1642-03 LDI	0	3	0	2,000
1642-03 LDM	0	2	0	1,333
1222-03 LDS	0	0	9	9,000
658-03 LDI	40	20	1	27,667
738-03 LDI	50	0	10	26,667
			X ± SE	18,500 ± 4,823

B

Muestra	Categoría +	Categoría ++	Categoría +++	P. jiroveci (-)
1642-03 LDS	0	0	0	0,000
1225-03 LDI	0	6	0	4,000
1225-03 LDM	1	0	0	0,333
1225-03 LDS	0	0	0	0,000
1231-03 LDI	2	0	0	0,667
1231-03 LDM	0	0	0	0,000
1231-03 LDS	0	0	0	0,000
865-03 LDI	0	0	0	0,000
			X ± SE	0,625 ± 0,490

el presente estudio fue estandarizar la técnica para las SPs del tipo hidrofóbicas e hidrofílicas. Se probaron dos medios de bloqueo: el entregado en el kit straptavidina-HRPO y BSA al 2%, siendo este último el más eficiente en la disminución del *background* de la inmunotinción. Se realizó la titulación del anticuerpo primario (1:20, 1:30 y 1:50), obteniéndose la mejor marca con la dilución 1:30 en BSA al 2% tanto para SP-A como para SP-B (ver materiales y métodos). El análisis de la inmunohistoquímica se llevó a cabo por una categorización de las inmunotinciones (tabla 1 y fig.3) y asignación de puntaje como fue descrito antes.

Como se puede apreciar en la tabla 3 A y B, el promedio de células positivas y su puntaje asignado para SP-B en muestras *P.jiroveci*-positivas es menor que para las muestras *P.jiroveci*-negativas (3.6667 y 9.667 respectivamente), encontrando incluso muestras sin marcas para SP-B en el grupo infectado con *Pneumocystis* y muy pocas células

categorizadas como 3 cruces en comparación con el grupo control no infectado (en promedio 1 célula y 4 células respectivamente). Al realizar el análisis estadístico de estos dos grupos no se observó una diferencia significativa ($p=0.1296$), sin embargo esto se puede adjudicar a la gran desviación estándar entre las muestras de cada grupo en estudio y al número limitado de casos estudiados, es por esto que al observar los resultados se puede ver que hay una "tendencia" a la disminución de la expresión de SP-B, la cual sólo podremos confirmar fehacientemente al aumentar el número de muestras.

En la tabla 4 A y B, se puede observar el puntaje promedio asignado por las células marcadas (categorías) para Sp-A. Se puede apreciar claramente un aumento en la inmunotinción de SP-A en el grupo infectado con *Pneumocystis* (puntaje promedio: 18,500 contra 0,625). No se encontraron células marcadas con categoría tres cruces en el grupo *Pneumocystis*-negativas (no infectada). Si bien las desviaciones entre las muestras de los grupos son grandes, la diferencia entre los dos grupos fue significativa ($p<0.0024$). Así podemos relacionar la presencia de *Pneumocystis* con el aumento en la expresión de SP-A evidenciada por inmunohistoquímica, corroborando nuestra hipótesis.

CONCLUSIÓN

En concordancia con trabajos realizados sobre cambios en la expresión de las proteínas del surfactante (12,14,15,20), y con la hipótesis experimental por infección primaria del laboratorio, nuestros resultados indican que en presencia de *Pneumocystis* se observa un aumento en la expresión de SP-A y una tendencia a la disminución de SP-B.

Evidencias indican que el aumento de la expresión de SP-A puede verse influenciada por la terapia con corticoides (16, 12, 21) que fue utilizada para modelos de animales inmunosuprimidos (20). Se ha observado recientemente que neumonía por *P. jiroveci* altera la expresión y distribución de las proteínas SP-A y SP-D, especialmente de la proteína SP-A, la cual no cambia en la fracción LA (agregados grandes de surfactante) (12), pero aumenta enormemente en la fracción SA (agregados pequeños de surfactante) en el líquido broncoalveolar (18). Debido a esto es importante conocer la metodología en cada estudio para saber si los cambios o no en la expresión de SP-A son atribuibles a *Pneumocystis*. Nuestro estudio no estuvo influenciado por corticoides y se observó SP-A total (en toda la muestra de tejido pulmonar).

Estudios realizados sobre la respuesta inmune generada por el pulmón, indican que cambios en los componentes del surfactante, pueden jugar un rol en la patogénesis de algunas enfermedades respiratorias, planteando que existe un balance entre las acciones estimuladoras e inhibitorias generadas por el surfactante sobre las células del sistema inmune. Es posible evidenciar que las proteínas SP-A y SP-D están involucradas en el reconocimiento de los microorganismos, actuando como opsoninas y estimulando la quimiotaxis y

fagocitosis, si bien cada una con propiedades particulares (13). Sin embargo la neumonía por este patógeno es caracterizada por una severa hipoxemia que a menudo es desproporcionada con respecto a la intensidad de la inflamación pulmonar (22).

Todos los estudios realizados ya sea en modelos experimentales en inmunosuprimidos, pacientes inmunosuprimidos o conejos que cursan con una infección primaria espontánea por *Pneumocystis* (12, 20,22) indican que existe una disminución de las proteínas hidrofóbicas (SP-B y SP-C), si bien nuestro estudio no dio una diferencia significativa estadísticamente, pudimos observar una disminución en la cantidad de células de categoría 3 cruces disminuida e inclusive casos donde por medio de ésta técnica de inmunotinción no pudimos observar células marcadas para SP-B.

Entendiendo la función de cada tipo de proteína del surfactante (ver introducción) se podría postular que los daños producidos en el surfactante, evidenciados como un aumento de las proteínas hidrofílicas y disminución de las de tipo hidrofóbicas, acompañadas de la disminución de los fosfolípidos, podrían producir una desestabilización de la fisiología pulmonar que produzca la muerte si un lactante pequeño no es capaz de compensar con un mayor esfuerzo respiratorio.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo recibí el apoyo de todas las personas que conforman el Laboratorio de Enfermedades Respiratorias, quienes me acogieron con gran calidez e hicieron de mi estadía una vivencia gratificante. Debo agradecer en particular al Dr. Sergio Vargas quien me recibió en su laboratorio confiando desde el comienzo en mi trabajo, agradezco también a la Bq. Carolina Ponce quien fue mi principal pilar dentro del laboratorio, guiándome en las técnicas y decisiones experimentales desarrolladas. Al Dr. Patricio Madrid, quien como patólogo me enseñó a categorizar mis muestras y observar los cortes histológicos. Agradezco finalmente a la Bq. candidata a Doctorado Paola Pérez quien me ayudo a realizar el análisis estadístico de mis muestras.

BIBLIOGRAFIA

1. **Martin, W.J.II.** Pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:356-357, 1993.
2. **Su.T.H. and W.J.Martin II.** Pathogenesis and host response in *Pneumocystis carinii* pneumonia. Ann. Rev. Med. 45:261-272, 1994.
3. **Hanano R., Kaufmann S.H.E.** *Pneumocystis carinii* and the immune response in disease. Trends in Microbiol. 6 (2):71-75, 1998.

4. **Vargas S., Ponce C., Hughes W., et al.** Association of primary *Pneumocystis carinii* infection and sudden infant death syndrome. Clin. Infect. Dis. 29:1489-1493, 1999
5. **Stagno S., Pifer L., Hugues W., Brasfield D., Tiller R.** *Pneumocystis carinii* pneumonitis in young immunocompetent infants. Pediatr. 66:56-62, 1980.
6. **Dei-Cas E.** *Pneumocystis* infections: The iceberg?. Med. Microbiol. 38: 23-32, 2000.
7. **Ortona E., Visconti E., Barca S., et al.** Cellular and humoral response in *Pneumocystis carinii* spontaneously infected rabbits. J. Euk. Microbiol. 44(6):495, 1997.
8. **Ceré N., Polack B., Coudert P.** Improved rabbit model of *Pneumocystis carinii* pneumonia: induced infection in pneumocystis-free animals. APMIS. Suppl. 77(105):5-6, 1997.
9. **Aliouat E.M., Escamilla R., Cariven C., Vieu C., Mullet C.** Surfactant changes during experimental pneumocystosis are related to pneumocystis development. Eur. Respir. J. 11: 542-547, 1998.
10. **Stringer J.R.** The identity of *pneumocystis carinii*: not a single protozoan, but a diverse group of exotic fungi. Infect. Agents. Dis. 2:109-117, 1993.
11. **Murray P., Kobayashi G., Pfaller M., Rosenthal M.,** Microbiología Médica 2ª edición. Editorial Harcour Brace, 1990.
12. **Atochina E., Beers M., Scanlon S., Preston A., Beck J.** *P. carinii* induces selective alterations in component expression and biophysical activity of lung surfactant. Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 278:L599-L609, 2000.
13. **Phelps D.** Pulmonary surfactant modulation of host-defense function. Appl. Cardiopulm. Pathol. 5: 221-229, 1995.
14. **Ballard P., Noguee L., Beers M., Ballard R., Planer B., Polk L., demello D., Moxley M., Longmore W.J.** Partial deficiency of surfact protein B in a compound heterozygote with a new mutations. Pediatrics. 96: 1046-1052, 1995.
15. **Korfhagen T., et al.** Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:9594-9599, 1996.
16. **Dichter J., Lundgren J., Nielsen T., Jensen B., Schattenkert J., Benfield T., Lawrence M., Shelhamer J.** *Pneumocystis carinii* in HIV-infected patients: effect of steroid therapy on surfactant level. Respir. Med. 93: 373-378, 1999.
17. **Ballard P., Noguee L., Beers M., Ballard R., Planer B., Polk L., demello D., Moxley M., Longmore W.J.** Partial deficiency of surfact protein B in a compound heterozygote with a new mutations. Pediatrics. 96: 1046-1052, 1995.
18. **Atochina E., Beck J., Scanlon S., Preston A., Beers M.** *Pneumocystis carinii* pneumonia alters expression and distribution of lung collectins SP-A and SP-D. J. Lab. Clin. Med. 137(6): 429-439, 2001.
19. **Phelps D., Rose R.** Increased recovery of surfactant protein A in AIDS-related Pneumonia. Am. Rev. Respir. Dis. 143: 1072-1075, 1991.
20. **Aliouat E., Escamilla R., Cariven C., Vieu C., Mullet C., Dei-Cas E., Prévost M.** Surfactant changes during experimental pneumocystosis are related to *pneumocystis* development. Eur. Respir. J. 11:542-547, 1998.
21. **Limper A.H., Hoyte J.S., Standing J.E.** The role of alveolar macrophages in *Pneumocystis carinii* degradation and clearance from the lung. J. Clin. Invest. 99:2110-2117, 1997.
22. **Beers M.F., Atochina E.N., Preston A.M., Beck J.M.** Inhibition of lung surfactant protein B expression during *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. J. Lab. Clin. Med. 133: 423-433, 1999.