

Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana
Facultad de Ciencias Médicas Julio Trigo

GENETICA MOLECULAR DEL SURFACTANTE PULMONAR

MSc.Gloria María Hernández Aguilera. Calle Cocos núm. 163 (primer piso)
entre Flores y San Benigno. Santos Suárez. Ciudad de La Habana.

gloriah@infomed.sld.cu

Especialista en Bioquímica

RESUMEN

Se revisan los estudios que han sido publicados recientemente acerca de las características estructurales de las proteínas constituyentes del surfactante pulmonar natural y los genes que las codifican, así como las variaciones polimórficas en ellos y su asociación con patologías pulmonares que se caracterizan por déficit del surfactante pulmonar.

Palabras clave: surfactante pulmonar, SP-A, SP-B, SP-C, SP-D, Síndrome del distress respiratorio

INTRODUCCIÓN

El síndrome del distress respiratorio (SDR), es una consecuencia del nacimiento prematuro, que se caracteriza por fallo respiratorio e intercambio gaseoso deficiente en las primeras horas después del nacimiento.¹ Es causado, principalmente, por una deficiencia del surfactante pulmonar, una mezcla de lipoproteínas necesarias para reducir la tensión superficial en la interfase aire-líquido del alveolo y para prevenir la atelectasia generalizada.

El factor predisponente para el SDR es la prematuridad, debido a inmadurez del pulmón. Sobre la base de un estudio en gemelos,² así como por datos epidemiológicos,³ hay evidencias de que existe una base genética, aunque el gen o genes involucrados no han sido identificados con certeza. Por tanto, se

considera que el SDR es una enfermedad compleja con etiología multifactorial y quizás multigénica.⁴

El sexo y la raza afectan la incidencia de la enfermedad. Se ha observado una mayor incidencia del SDR y la mortalidad, en varones que en hembras, relacionada con este síndrome, así como una menor incidencia de SDR en blancos, pero fatal en prematuros de la raza negra.⁴

Por la importancia del síndrome del distress respiratorio en el manejo del niño prematuro, es nuestro objetivo revisar los conocimientos actuales acerca de los aspectos moleculares del surfactante pulmonar.

CARACTERISTICAS GENERALES

El surfactante pulmonar es un complejo altamente tensoactivo que recubre la superficie alveolar del pulmón; constituye un material heterogéneo que existe en formas especializadas intra y extracelular. Está constituido por 90% de lípidos y 10% de proteínas, aproximadamente. Los lípidos son fundamentalmente fosfolípidos. La más abundante es la fosfatidilcolina. Más de 60% de la fosfatidilcolina está en la forma disaturada como dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), considerado el principal componente tensoactivo, al proporcionar estabilidad alveolar por disminución de la tensión superficial.⁵

El surfactante pulmonar contiene proteínas séricas y proteínas asociadas. Se han identificado cuatro proteínas asociadas al surfactante: SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. Se conoce que las tres primeras son determinantes importantes de la estructura, homeostasis y actividad superficial del surfactante, mientras que la SP-D en conjunto con la SP-A tiene funciones inmunomoduladoras.⁶ La SP-A es la más abundante de las proteínas asociadas al surfactante, constituyendo 50% de la proteína total y, al igual que la SP-D, es hidrofílica y pertenece a un subgrupo de lectinas de mamíferos conocidas como colectinas. La SP-B y SP-C son proteínas muy pequeñas e hidrófobas.

ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS ASOCIADAS AL SURFACTANTE PULMONAR.

La SP-A es una glicoproteína hidrofílica altamente conservada, con un peso molecular en condiciones reducidas de 29-36 kDa;⁷ 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.⁸ Su estructura primaria se caracteriza por cuatro dominios: un segmento amino terminal corto, un dominio colagenoso, una región de unión (bucle) y el dominio C-terminal de reconocimiento de carbohidratos (DRC). El segmento N-terminal de 27 aminoácidos contiene dos residuos de cisteína que forman dos puentes disulfuro intercatenarios necesarios para la multimerización. El dominio colagenoso de 73 aminoácidos forma una triple hélice y está compuesto de 23 tripletes repetitivos Gly-X-Y, con una interrupción entre el triplete 13 y 14. La Y es, frecuentemente, un residuo de hidroxiprolina.⁹ La región hidrófoba de unión es de unos 40 aminoácidos de longitud, muy importante en el plegamiento de la proteína. El dominio DRC es un dominio tipo lectina que une manosa por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} ; tiene 115 residuos de aminoácidos que incluyen los dos sitios de unión al Ca^{2+} y cuatro residuos conservados de cisteína que forman dos lazos intramoleculares por puentes disulfuro.⁴ Una vez sintetizada en el retículo endoplasmático de las células epiteliales alveolares tipo II, la SP-A sufre una serie de modificaciones post-transduccionales en el Golgi, fundamentalmente, N-glicosilación, sialilación y sulfatación.

El locus de la SP-A humana en el cromosoma 10q22-q23 consiste de dos genes funcionales (SP-A1 y SP-A2) y un pseudogen. Se considera que en humanos, el trímero de la SP-A está compuesto por dos monómeros de la SP-A1 y un monómero de la SP-A2.⁸ Los genes de la SP-A1 y la SP-A2 se hallan en orientación transcripcional opuesta y separados por solo 40 Kb.¹⁰ Cada gen abarca, aproximadamente, 5 Kb en las que aparecen 5 exones. La secuencia codificadora está contenida desde el exón 2 hasta el 5. Los productos génicos de ambos genes difieren en cuatro de las posiciones de los aminoácidos en el dominio colagenoso. En la región codificante la diferencia más significativa se sitúa en el codón 85, con un cambio de cisteína por arginina que posiblemente afecta la formación de puentes disulfuro entre los dos péptidos de SP-A1 en el heterotrímero.¹¹ Ambos genes de la SP-A son altamente polimórficos.

La expresión de los genes de la SP-A1 y SP-A2 está regulada diferencialmente durante el desarrollo, el nivel de expresión del gen de la SP-A1 es alto en relación con el de la SP-A2 en la etapa fetal; ocurre un aumento relativo de la expresión de la SP-A2 en la medida en que avanza la madurez del pulmón.¹²

La SP-B y SP-C son pequeñas proteínas hidrófobas presentes en los extractos obtenidos con solventes orgánicos del surfactante pulmonar. La SP-B aislada a partir del surfactante extracelular es un homodímero de 18 kDa formado por 79 aminoácidos, con una masa molecular reducida de 8 kDa.¹³ El producto primario de la traducción es una preproteína monomérica de 381 aminoácidos con una masa molecular de 42 kDa. Después de numerosas modificaciones postransduccionales, el prepropéptido de 381 aminoácidos da lugar al péptido maduro que abarca desde la Fen²⁰¹ a la Met²⁷⁹. Cada monómero de SP-B contiene tres puentes disulfuro intracatenarios y el único puente disulfuro intercatenario en la Cis²⁴⁸ es responsable de la dimerización de la forma madura de la SP-B.¹⁴ La SP-B humana es codificada por un gen de copia única que se designa también como SFTP3 o SFTPB en el cromosoma 2p12-p11.2.¹⁵

La expresión de los genes de la SP-B y la SP-C comienza antes de la diferenciación de las células tipo II y antes del aumento en la síntesis de los lípidos del surfactante y de la SP-A.⁴

El gen que codifica la SP-C es de copia única, localizado en el cromosoma 8p en el hombre; cuenta con 5 exones y 4 intrones y abarca de 2.5 a 3 kb de DNA. Los distintos alelos del gen de la SP-C que han sido secuenciados difieren al nivel nucleotídico en menos de 1%. Los sitios de procesamiento alternativo del RNA en el exon 5 generan RNA mensajeros de diferentes tamaños que difieren en 18 pares de bases, los que originan proproteínas que difieren en 6 aminoácidos en posición carboxiterminal, respecto al dominio del péptido activo. La SP-C humana es una de las proteínas más hidrófobas conocidas; cuenta con unos 32-35 aminoácidos y un tamaño molecular de 3-6 kDa, migrando algo más lento en presencia de agentes reductores, pero no existen evidencias de que esto se deba a la existencia de puentes disulfuros intercatenarios. Los dos residuos de cisteína del péptido activo están enlazados a ácido palmítico.¹⁶

FUNCIONES DE LAS PROTEINAS DEL SURFACTANTE PULMONAR

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.⁷ La SP-A promueve la

formación de la mielina tubular, mejora la actividad superficial del surfactante mediante su unión a los fosfolípidos,¹³ 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.¹⁷

Las colectinas SP-A y SP-D son consideradas componentes importantes de la inmunidad natural del pulmón. Mediante estudios de mutagénesis específica de sitio en modelos de animales se han definido algunos de los aminoácidos y dominios específicos necesarios para las funciones de la SP-A. Se han encontrado que las regiones ligadas a carbohidratos de la SP-A no son esenciales para la unión a los lípidos y la interacción con las células tipo II,¹⁸ pero que son importantes para la unión a virus y micobacterias.¹⁹

Existen evidencias de que la SP-A modula la respuesta celular inducida por polisacáridos, mediante interacción directa con CD14.²⁰ Se ha encontrado que las colectinas pulmonares se unen a CD14 y alteran su interacción con los lipopolisacáridos y que en esta unión participan directamente el dominio de "unión" de la SP-A y el dominio tipo lectina de la SP-D; es reconocido el componente peptídico de CD14 por la SP-A y el componente carbohidrato de CD14 por la SP-D.²¹

La SP-B en conjunto con la SP-C tiene funciones relacionadas, fundamentalmente, con la reducción de la tensión superficial y el metabolismo del surfactante pulmonar, siendo esencial para el funcionamiento normal del pulmón.²²

La deficiencia de SP-B es una causa común de proteinosis alveolar pulmonar congénita (PAC), que es una enfermedad respiratoria familiar que se presenta en niños nacidos a término, de etiología heterogénea,^{23, 24} que se caracteriza por fallo respiratorio en el período neonatal.

La deficiencia hereditaria de SP-B es una alteración autosómica poco frecuente, la cual produce en los niños afectados una enfermedad respiratoria severa que se asemeja clínica y radiográficamente al SDR, pero provoca la muerte a una edad promedio de 3 meses.²⁴ Estos niños no responden a la terapia de reemplazamiento con surfactante, ventilación mecánica y oxigenación extracorpórea.^{23, 25}

La primera causa reconocida de deficiencia total de SP-B y PAC fatal fue una mutación en el marco de lectura, consistente en una sustitución de la secuencia nucleotídica GAA por C en el codón 121 del cDNA de la SP-B (121ins2) y la introducción de un codón prematuro de parada en la posición correspondiente al aminoácido 214.²⁵ La mayoría de los niños homocigóticos para esta mutación presentaban niveles muy bajos del RNAm para la SP-B, el que aparecía degradado.²⁶ Los heterocigotos portadores de esta mutación parece que presentan un funcionamiento pulmonar normal.²⁷

Han sido identificadas varias mutaciones a través del gen de la SP-B en pacientes deficientes de esta proteína.^{25, 26, 28, 29} Por otra parte, en algunos casos en que no se han detectado mutaciones, el PAC ha estado asociado a un procesamiento postranscripcional anómalo del RNAm de la SP-B.^{25, 29, 30}

GENES RELACIONADOS CON EL SDR

Los genes que codifican para las proteínas del surfactante pulmonar, especialmente, para la SP-A y SP-B, han sido considerados como posibles candidatos relacionados con el desarrollo del SDR.

Las variantes de la SP-A presentan diferencias funcionales debido a cambios en algunos aminoácidos y/o diferencias estructurales, así como diferencias en las regiones regulatorias del gen.³¹ Se ha sugerido que la variación alélica en el gen de la SP-A se asocia al desarrollo del SDR, con una asociación sinérgica positiva de un alelo específico de la SP-A2 con una variante de longitud del intrón 4 de la SP-B.³² Se sugirió que la longitud variable del intrón 4 de la SP-B estaba asociada al desarrollo de SDR, ya que el alelo variante $\Delta i4$ se encontró con mayor frecuencia en pacientes afectados de SDR que en la población normal.³³ No obstante, en un trabajo posterior no se encontró una asociación directa de dos polimorfismos del gen de la SP-B (el Ile131Thr o el $\Delta i4$) con el desarrollo de SDR, sino que la asociación entre los genes de la SP-A y el SDR dependía de dos factores: el grado de prematuridad y el genotipo Ile131Thr para la SP-B, quedaba así restringida la asociación a una subpoblación homocigótica para el genotipo Thr/ Thr.⁴

El gen de la SP-C es polimórfico en algunos puntos, pero ninguna de las variaciones más frecuentes ha estado asociada con el SDR o alguna otra enfermedad.^{34, 35} No obstante, recientemente, fue detectada una mutación en

este gen en una familia afectada de una severa enfermedad intersticial del pulmón.³⁶ Se demostró que la sustitución de A por G en la primera base del intrón 4 del gen de la SP-C alteró el procesamiento del RNAm, produjo pérdida del exón 4 y la supresión de 37 residuos de aminoácidos en la proteína precursora de la SP-C. Se considera que el desarrollo de enfermedades intersticiales del pulmón ocurre en individuos genéticamente susceptibles expuestos a diversos factores ambientales desencadenantes.³⁷

CONCLUSIONES

El estudio de las proteínas del surfactante pulmonar y de los genes que las codifican resulta de gran importancia para conocer el riesgo de distress respiratorio en niños prematuros, así como para el diseño de surfactantes artificiales que puedan utilizarse en el tratamiento de niños prematuros, afectados por este síndrome y de adultos afectados por distress respiratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am J Dis Child.* 1959; 97: 517-523.
- 2 Myriantopoulos NC, Churchill JA, Baszynski AJ. Respiratory distress syndrome in twins. *Acta Genet Med Gemellol.* 1971; 20:199-204.
- 3 Graven SN, Misenheimer HR. Respiratory distress syndrome and the high risk mother. *Am J Dis Child.* 1965; 109: 489-494.
- 4 Haataja R. The role of surfactant protein A and B genes in heritable susceptibility to neonatal respiratory distress syndrome. *Acta Universitatis Ouluensis D Medica.* 2001; 651.
- 5 Batenburg JJ, Haagsman HP. The lipids of pulmonary surfactant: dynamics and interactions with proteins. *Prog Lipid Res.* 1998; 37:235-276.
- 6 Mason RJ, Greene K, Voelker DR. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am J Physiol.* 1998; 275:L1-13.
- 7 McCormack FX. Structure, processing and properties of surfactant protein A. *Biochim Biophys. Acta.* 1998; 1408:109-131.
- 8 Voss T, Melchers K, Scheirle G, Schafer KP. Structural comparison of recombinant pulmonary surfactant protein SP-A derived from two human coding

sequences: implications for the chain composition of natural human SP-A. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991; 4: 88-94.

9 Creuwels LA, van Golde LM, Haagsman HP. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung.* 1997; 175:1-39.

10 Hoover RR, Floros J. SP-A 3'-UTR is involved in the glucocorticoid inhibition of human SP-A gene expression. *Am J Physiol.* 1998; 276: L917-24.

11 Katyal SL, Singh G, Locker J. Characterization of a second human pulmonary surfactant-associated protein SP-A gene. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992; 6: 446-452.

12 McCormick SM, Mendelson CR. Human SP-A1 and SP-A2 genes are differentially regulated during development and by cAMP and glucocorticoids. *Am J Physiol.* 1994; 266:L367-L374.

13 Hawgood S, Benson BJ, Scilling J, Damm D, Clements JA, White RT. Nucleotide and amino acid sequences of pulmonary surfactant protein SP 18 and evidence for cooperation between SP 18 and SP 28-36 in surfactant lipid absorption. *Proc Natl Acad Sci. USA:* 1987; 84: 66-70.

14 Johansson J, Curstedt T, Jornvall H. Surfactant protein B: disulfide bridges, structural properties and kringle similarities. *Biochemistry.* 1991; 30: 6917-6921.

15 Vamvakopoulos NC, Modi WS, Floros J. Mapping the human pulmonary surfactant-associated protein gene (SFTP3) to chromosome 2p12-- >p11.2. *Cytogenet Cell Genet.* 1995; 68: 8-10.

16 Whitsett JA, Baatz JE. Hydrophobic surfactant proteins SP-B and AP-C: molecular biology, structure and function. En: *Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice.* Robertson B, Van Golde LMG, Batenburg JJ, Elsevier Science Publishers BV. 1992; 55-75.

17 Rice WR, Ross GF, Singleton FM, Dingle S, Whitsett, JA. Surfactant-associated protein inhibits phospholipid secretion from type II cells. *J Appl Physiol.* 1987; 63: 692-698.

18 Kuroki Y, Mason RJ, Voelker DR. Chemical modification of surfactant protein A alters high affinity binding to rat alveolar type II cells and regulation of phospholipid secretion. *J Biol Chem.* 1988; 263:17596-17602.

19 van Iwaarden JF, Van Strijp JA, Visser H, Haagsman HP, Verhoef J, van Golde LM. Binding of surfactant protein A (SP-A) to herpes simplex virus type 1-

- infected cells is mediated by the carbohydrate moiety of SP-A. *J Biol Chem.* 1992; 267: 2039-2043.
- 20 Sano H, Sohma H, Muta T, Nomura S, Voelker DR, Kuroki Y. *J Immunol.* 1999; 163: 387-395.
- 21 Sano H, Chiba H, Iwaki D, Sohma H, Voelker DR, Kuroki Y. Surfactant Proteins A and D bind CD14 by different mechanisms. *J Biol Chem.* 2000; 275(29): 22442-22451.
- 22 Pryhuber GS. Regulation and function of pulmonary surfactant protein B. *Mol Genet Metab.* 1998; 64: 217-228.
- 23 de Mello DE, Noguee LM, Heyman S, Krous HF, Hussain M, Merritt TA. *et al.* Molecular and phenotypic variability in the congenital alveolar proteinosis syndrome associated with inherited surfactant protein B deficiency. *J Pediatr.* 1994; 125: 43-50.
- 24 Noguee LM. Surfactant protein-B deficiency. *Chest.* 1997; 111:129S-135S.
- 25 Noguee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, de Mello DE, Colten HR. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest.* 1994; 93:1860-1863.
- 26 Beers MF, Hamvas A, Moxley MA, Gonzales LW, Guttentag SH, Solarin KO *et al.* Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 22: 380-391.
- 27 Yusef RD, Cohen AH, Hamvas A. Normal lung function in subjects heterozygous for surfactant protein-B deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159: 411-414.
- 28 Ballard PL, Noguee LM, Beers MF, Ballard RA, Planer BC, Polk L *et al.* Partial deficiency of surfactant protein B in an infant with chronic lung disease. *Pediatrics.* 1995; 96:1046-1052.
- 29 Noguee LM, Wert SE, Proffitt SA, Hull WM, Whitsett JA. Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:973-981.
- 30 Lin Z, de Mello DE, Batanian JR, Khammash HM, DiAngelo S, Luo, J, *et al.* Aberrant SP-B mRNA in lung tissue of patients with congenital alveolar proteinosis (PAC). *Clin Genet.* 2000; 57:359-369.

- 31 Floros J, Wang G. A point of view: quantitative and qualitative imbalance in disease pathogenesis; pulmonary surfactant protein A genetic variants as a model. *Comp Biochem and Physiol*. 2001; Part A 129: 295-303.
- 32 Kala P, Koptides M, DiAngelo S, Hoover RR, Lin Z, Veletza V, *et al*. Characterization of markers flanking the human SP-B locus. *Dis Markers*. 1997; 13:153-167.
- 33 Floros J, Veletza SV, Kotikalapudi P, Krizkova L, Karinch AM, Friedman C, *et al*. Dinucleotide repeats in the human surfactant protein-B gene and respiratory- distress syndrome. *Biochem J*. 1995; 305: 583-590.
- 34 Hatzis D, Deiter G, deMello DE, Floros J. Human surfactant protein-C: genetic homogeneity and expression in SDR: comparison with other species. *Exp Lung Res*. 1994; 20: 57-72.
- 35 Nogee LM. Genetics of the hydrophobic surfactant proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1408: 323-333.
- 36 Nogee LM, Dunbar AE, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med*. 2001; 344: 573-579.
- 37 Pantelidis P, Veeraraghavan S, du Bois RM. Surfactant gene polymorphisms and interstitial lung diseases. *Respir Res*. 2002; 3:14-20.