

El surfactante pulmonar, un sistema lipoproteico clave para la mecánica respiratoria

Antonio Cruz Rodríguez, Begoña García Álvarez y Bárbara Olmeda Lozano

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Instituto de Investigación "Hospital 12 de Octubre" (i+12), Universidad Complutense de Madrid.

A principios de los años 70 del siglo pasado, la mayor causa de muerte en niños nacidos prematuramente era una afección pulmonar conocida hoy como síndrome de distrés respiratorio del neonato, NRDS por sus siglas en inglés. Esta afección está asociada a la falta de madurez pulmonar, que solo se completa a partir de la semana 35 de gestación. Esta situación cambió drásticamente cuando gracias a las investigaciones de Mary Ellen Avery y John Clements, entre otros, se comenzó a utilizar la terapia con surfactante pulmonar exógeno.

La superficie de los alveolos está recubierta por una capa acuosa que hidrata el epitelio alveolar. Fue el médico suizo Kurt von Neergaard el primero que propuso que la tensión superficial presente en esta capa acuosa podría contribuir de forma importante a las fuerzas que hacen que los alveolos se expandan y contraigan durante el ciclo respiratorio. La tensión superficial en un líquido surge por la descompensación de fuerzas que se produce en las moléculas del líquido expuestas al aire, lo que da lugar a una tensión que se opone a la expansión de la superficie del líquido. En una superficie esférica, como puede ser la del alveolo, esta tensión genera una presión negativa que tiende a colapsar la esfera (*Figura 1*). Esta presión, definida por la ley de Laplace, es mayor en los alveolos de menor radio, lo que tiene como consecuencia que, si dos alveolos se encuentran conectados, la presión será mayor en el más pequeño, haciendo que colapse a favor del de mayor radio.

En los años 50, basándose en las ideas de von Neergaard, Clements predijo la presencia de un material tensioactivo en el pulmón que reduciría la tensión superficial conforme los alveolos se contraen durante la espiración, lo que explicaría además por qué los alveolos más pequeños no colapsan en cada ciclo respiratorio. El trabajo de Clements atrajo la atención de la pediatra Mary Ellen Avery que, analizando la tensión superficial de lavados de pulmones de neonatos fallecidos, demostró que la ausencia de actividad tensioactiva en este material podría ser la principal causa de muerte en estos niños. Todavía pasaría casi una década hasta que los primeros ensayos

de Tetsuro Fujiwara instilando surfactante procedente de pulmones de vaca en pulmones de niños con NRDS dieran resultados exitosos. A pesar de lo mucho que se conoce sobre el sistema surfactante pulmonar, no se ha conseguido fabricar aún un surfactante pulmonar sintético tan eficaz en clínica como los obtenidos a partir de fuentes animales.

PERO ¿QUÉ ES REALMENTE EL SURFACTANTE PULMONAR?

Los tensioactivos o surfactantes, del inglés surface active agent, son moléculas anfipáticas solubles que tienen tendencia a interaccionar con la interfase aire-líquido reduciendo su tensión superficial al generar una monocapa interfacial. Estas monocapas se forman al exponer las moléculas anfipáticas su parte hidrofóbica al aire, mientras que la parte hidrofílica queda en contacto con el agua. Los lípidos que forman las membranas biológicas son también sustancias anfipáticas, pero al ser insolubles en agua, cuando son dispersadas en ésta y forman estructuras lamelares, su capacidad tensioactiva se ve muy limitada. En otras palabras, es difícil que un fosfolípido abandone la estructura lamelar de una membrana para generar una monocapa interfacial.

El surfactante pulmonar contiene en su mayor parte lípidos (más de un 90 % en peso) similares a los que se encuentran en las membranas celulares (*Figura 1*). El fosfolípido más abundante (40%) es la dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), una especie lipídica que no abunda en las membranas celulares debido a su elevada temperatura de transición de fase. A temperaturas fisiológicas, la DPPC tendería a reducir la fluidez de la membrana debido a su capacidad de empaquetarse estrechamente, haciendo que la membrana se comporte como un gel. Sin embargo, esta capacidad de empaquetarse parece convertirla en la mejor candidata para reducir la tensión superficial en el pulmón. Si una monocapa de DPPC se comprime, como ocurre en los alveolos durante la espiración, se puede conseguir que se empaquete tanto como para reducir la tensión superficial del agua a valores extremadamente bajos.

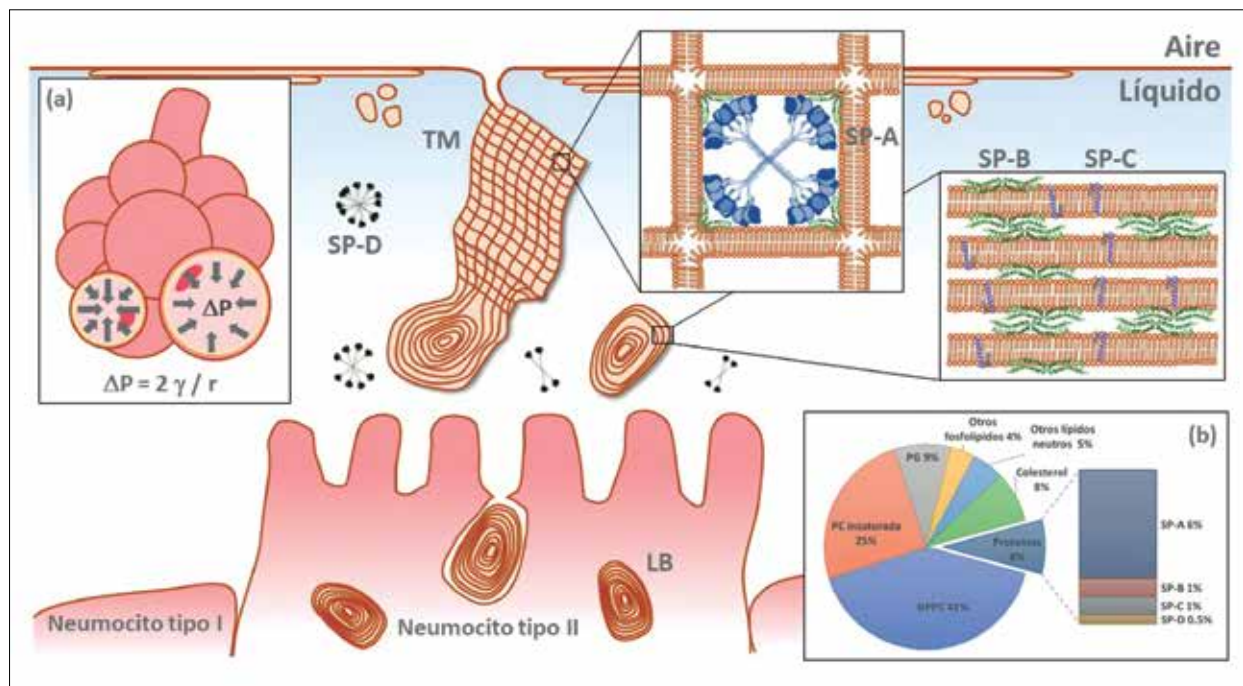


Figura 1

La ley de Laplace (a) relaciona la presión (P) en el interior de una esfera con su tensión superficial interna (γ) y el radio de la esfera (r). El surfactante pulmonar reduce la tensión superficial evitando que los alveolos de menor radio colapsen. Los lípidos y las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C son sintetizados y ensamblados por los neumocitos tipo II del epitelio alveolar en los cuerpos lamelares (LB). Una vez secretados, los LB se despliegan generando la estructura conocida como mielina tubular (TM). La presencia de SP-A es esencial para la formación de TM que podría favorecer la adsorción de los lípidos del surfactante a la interfase aire-líquido. La proteína SP-D se suele encontrar no asociada a las membranas de surfactante. En (b) se muestra la composición en peso del surfactante pulmonar.

Pero para que un buen surfactante sea efectivo necesita cumplir tres funciones: (i) adsorberse rápidamente a la interfase aire-líquido, (ii) reducir la tensión superficial hasta valores mínimos durante la espiración, y (iii) reextenderse eficientemente durante la inspiración para garantizar la estabilidad de los alveolos a lo largo de los ciclos respiratorios. La DPPC es eficaz reduciendo la tensión superficial hasta valores mínimos (ii), pero esto mismo hace que sea un material que no se adsorbe fácilmente a la interfase (i) ni se reextiende eficazmente durante la espiración (iii). Por eso, los primeros ensayos para tratar el NRDS realizados utilizando suspensiones de membranas de DPPC no tuvieron ningún éxito. Para que el surfactante pulmonar sea eficaz necesita la presencia de sus otros constituyentes esenciales.

El surfactante pulmonar es sintetizado y secretado en el pulmón por los neumocitos tipos II del epitelio alveolar (Figura 1). Estas células almacenan el surfactante en unos orgánulos de reserva de entre 0.2 y 2 μm de diámetro, conocidos como cuerpos lamelares (LB). Bajo el microscopio electrónico estos LB aparecen como gránulos formados por capas concéntricas de

membranas altamente empaquetadas y deshidratadas. La síntesis de los LB depende de la actividad de la proteína ABCA3 perteneciente a la familia de las ATP-binding cassette, que importaría fosfolípidos tensioactivos al interior de los LB a expensas de la energía liberada por la hidrólisis de ATP. Estos orgánulos son secretados al espacio alveolar, donde parecen desplegarse para formar una estructura aún más compleja llamada mielina tubular (TM) (Figura 1). La TM está formada por una red de tubos de sección cuadrada que se cree que podría facilitar el tránsito de lípidos hasta la interfase, o al menos servir de reservorio de especies tensioactivas, conectando las membranas de surfactante con la monocapa interfacial.

El resto de los componentes del surfactante contribuyen por tanto a la plasticidad de las membranas de surfactante, lo que permite la formación de estas estructuras y facilita la adsorción de fosfolípidos a la interfase aire-líquido. Además de la DPPC, el surfactante contiene otras fosfatidilcolinas insaturadas (25% en peso), 9% del fosfolípido aniónico fosfatidilglicerol (PG) y colesterol (8%) (Figura 1). Finalmente se conocen cuatro proteínas

específicas asociadas al surfactante pulmonar y que constituyen aproximadamente el 8-10% en peso del surfactante, las denominadas SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. Tanto SP-A como SP-D son proteínas hidrofílicas oligoméricas pertenecientes a la familia de las colectinas. Ambas forman parte de la inmunidad innata en el pulmón, aunque se sabe que la SP-A es capaz de unirse a los lípidos del surfactante, resultando esencial junto a la SP-B para la formación de la TM. Por otro lado, las proteínas SP-B y SP-C son extremadamente hidrofóbicas. Su función está relacionada con las propiedades que hacen del surfactante pulmonar un buen material tensioactivo.

SP-B: PIEZA FUNDAMENTAL EN LAS MEMBRANAS DE SURFACTANTE

La presencia de SP-B en el pulmón es un requisito indispensable para la respiración. Ello se debe a que las

actividades de esta proteína, íntegramente determinadas por su interacción con las membranas lipídicas, están implicadas en el funcionamiento del surfactante a todos los niveles. A pesar de que su estructura tridimensional no ha sido todavía resuelta a alta resolución, sabemos que la SP-B es una proteína hidrofóbica de 79 aminoácidos, con carga neta positiva, y que está formada por 4 ó 5 α -hélices anfipáticas (*Figura 2*). Estas son importantes para su interacción con las membranas, que se establece principalmente de manera superficial a través de interacciones electrostáticas de los residuos catiónicos de la SP-B con las cabezas polares de los fosfolípidos, por lo que la presencia de lípidos aniónicos como PG es importante para la óptima función de la proteína. Además, la SP-B contiene un segmento amino-terminal no helicoidal (1-7) que parece ser especialmente necesario para anclar la proteína a la membrana.

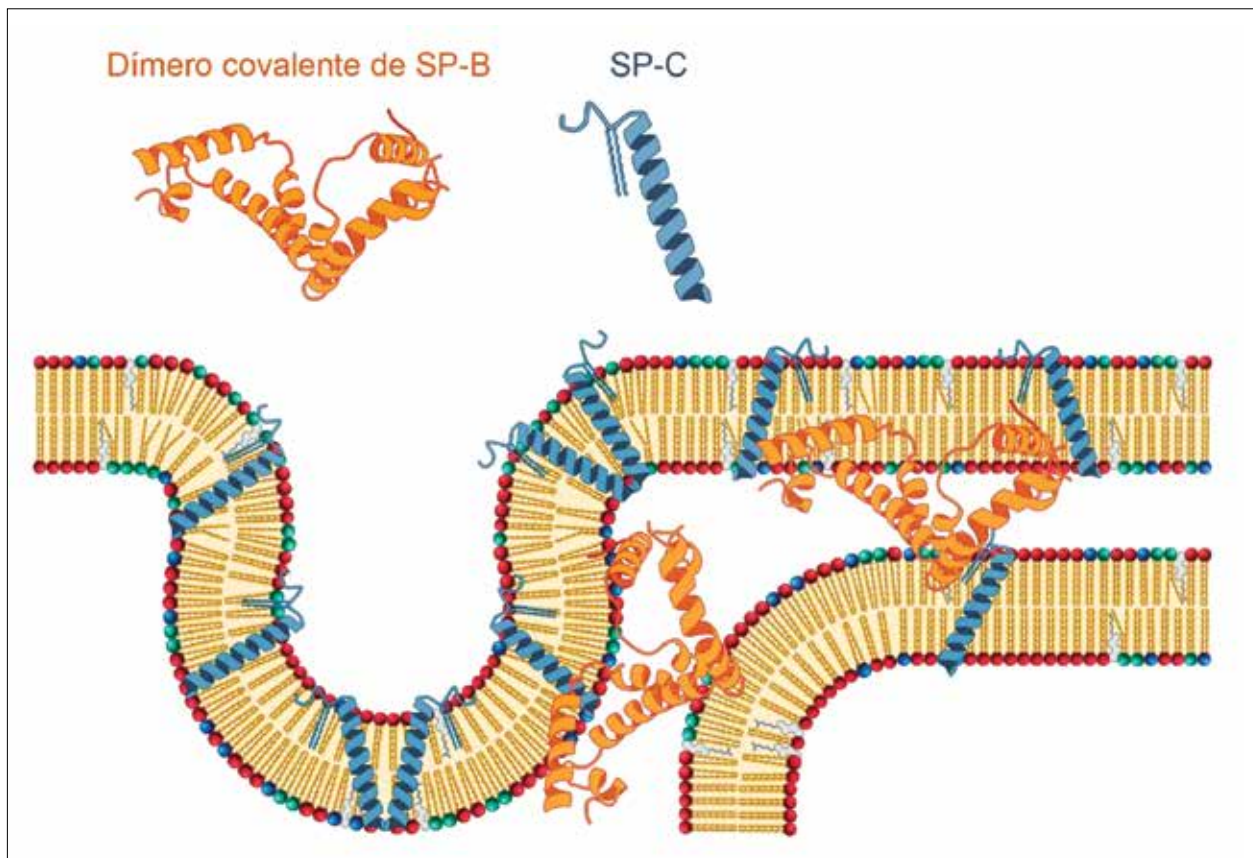


Figura 2

Estructuras propuestas para las proteínas hidrofóbicas del surfactante, SP-B y SP-C. La SP-B es un homodímero estabilizado por un puente disulfuro. Su estructura está constituida por varias α -hélices anfipáticas. La SP-C es una α -hélice hidrofóbica que se inserta en las membranas de surfactante, y se encuentra palmitoilada en dos cisteínas cercanas a su extremo N-terminal. Ambas proteínas se asocian a los lípidos del surfactante modulando sus propiedades. La SP-C es capaz de generar curvatura y fragmentación de las membranas. Por otro lado, la SP-B podría interactuar más superficialmente generando contactos entre membranas, contribuyendo a la estabilidad de la película interfacial y favoreciendo el tránsito de lípidos desde las membranas de surfactante a la interfase aire-líquido. (Figura realizada por Alejandro Alonso Eugenio).



La SP-B presenta actividades relacionadas tanto con la fusión como con la lisis de membranas, permitiendo así una remodelación de éstas que resulta esencial para la función del surfactante. Ya durante la formación de los complejos de surfactante, la SP-B es esencial para el correcto empaquetamiento de las membranas en los LB. La capacidad de la SP-B de generar contactos entre membranas es fundamental para esta función (*Figuras 1 y 2*). Esta propiedad depende en parte de la dimerización y formación de complejos oligoméricos, de manera que las interacciones proteína-proteína mediarían el acercamiento de las membranas de surfactante. La generación de estos contactos permitiría el establecimiento de redes multilamelares que favorecerían la transferencia rápida de los lípidos entre ellas y hacia la película interfacial tensioactiva. En cuanto a cómo se produciría ese flujo de lípidos, se ha propuesto un modelo según el cual los complejos en forma de anillo que forma la SP-B se dispondrían formando túneles hidrofóbicos en su interior, permitiendo el paso de lípidos entre las distintas organizaciones estructurales del surfactante. La actividad de estos “poros” estaría además regulada por los propios lípidos (PG) y por la proteína SP-C. Por otro lado, además de facilitar la dinámica del surfactante, la generación de contactos entre membranas también proporcionaría estabilidad a la película interfacial.

Profundizando más en las interacciones concretas de la SP-B con los lípidos, el mapeo de los fragmentos responsables de las distintas actividades de la SP-B se ha abordado mediante la generación de diversos péptidos sintéticos basados en su secuencia. Más allá del interés

científico de esta información, cabe destacar que, debido al papel esencial de la SP-B en el correcto funcionamiento pulmonar, la obtención de péptidos que permitan emular sus actividades es hoy en día un objetivo clínico interesante para la formulación de surfactantes exógenos. Actualmente se están desarrollando estudios clínicos sobre surfactantes que contienen péptidos basados en SP-B y SP-C. En general, los estudios con péptidos parciales de la SP-B sugieren que prácticamente la totalidad de la proteína es necesaria para una correcta función del surfactante. Por ejemplo, los péptidos que prescinden de las hélices C-terminales (SP-B1-25 o SP-B1-37) son capaces de promover fusión y favorecer la adsorción, aunque fallan en el mantenimiento de la estabilidad durante la compresión. Por otro lado, la ausencia del segmento N-terminal (como en el péptido llamado “Mini-B”, que contiene las hélices amino y C-terminales unidas por un linker o segmento conector) conlleva una peor función interfacial asociada a una menor interacción con las membranas. En definitiva, la interacción de la SP-B con las membranas lipídicas de surfactante está perfectamente optimizada y regulada, constituyendo estas interacciones la base para el desarrollo de su esencial función en el surfactante.

INTERACCIONES LÍPIDO-PROTEÍNA DE SP-C

La proteína SP-C es una proteína transmembrana de 35 residuos de longitud (*Figura 2*). Esta proteína es sintetizada inicialmente como un precursor de 21 kDa (proSP-C) que, tras la escisión de los propéptidos N- y C-terminal, se convierte en la forma madura de 4.2 kDa. En este proceso, la presencia del dominio BRICHOS

integrado en el módulo C-terminal de la pre-proteína es crucial porque actúa como chaperona, asegurando el correcto plegamiento de la SP-C en las membranas, así como la correcta palmitoilación de dos cisteínas presentes en la región N-terminal de la proteína madura. Al contrario de lo que ocurre con la SP-B, alteraciones de la síntesis y procesamiento de la SP-C son compatibles con la vida, pero su mal plegamiento o su deficiencia conllevan a la larga el desarrollo de enfermedad pulmonar intersticial.

Entre las funciones atribuidas a la SP-C, una de las más importantes parece ser la contribución a la estabilización de las películas de surfactante durante la dinámica de compresión-expansión respiratoria, estableciendo contactos entre las diferentes membranas asociadas a la interfase. Estas uniones facilitarían la reinserción de los lípidos tensioactivos a la interfase durante la expansión pulmonar. La acción combinada de ambas proteínas hidrofóbicas en determinadas situaciones sugiere la posible existencia de interacciones entre SP-B y SP-C, que modularían mutuamente su estado oligomérico y sus actividades complementarias de remodelación de membranas.

Existen pruebas que sugieren que la SP-C es clave en la modulación del efecto del colesterol sobre las propiedades del surfactante. Se ha observado que las alteraciones inducidas por un exceso de colesterol en el surfactante pueden restaurarse en presencia de una cantidad adecuada de SP-C, siempre que esté presente la SP-B. Además, se ha planteado que la SP-C podría interactuar específicamente con colesterol o con regiones de membrana enriquecidas en colesterol, favoreciendo su miscibilidad. Se ha propuesto que la presencia de colesterol induce cambios en la orientación/inclinación de la proteína y en su estructura en bicapas lipídicas. La palmitoilación de la SP-C podría, de hecho, desempeñar un papel importante en el mantenimiento de una inclinación adecuada de la proteína en las membranas del surfactante y estar relacionada con el efecto del colesterol sobre la dinámica de las membranas. Además, la palmitoilación de SP-C parece ser importante para mantener la conformación α -helicoidal de la proteína. La pérdida de las cadenas de palmítico conlleva la formación de dímeros con un mayor contenido en lámina β y tendencia a la formación de fibras amiloides, afectando a su función. Por otra parte, la SP-C es capaz de generar curvatura y fragmentación de membranas, lo que puede estar mediado por su dimerización (Figura 2).

La estructura de la SP-C parece entonces haber evolucionado para promover esta fragmentación en determinadas condiciones, probablemente durante la exclusión del surfactante de las especies menos

tensioactivas durante la espiración y el posible enriquecimiento de la monocapa interfacial en DPPC. Como ocurre con la SP-B, la importancia de la SP-C y sus peculiares características estructurales y funcionales la convierten en un elemento clave en el desarrollo de surfactantes clínicos con potencial aplicabilidad terapéutica. La producción de versiones recombinantes de SP-C humana ha supuesto un reto tecnológico, y se está explorando su inclusión como parte de una nueva generación de surfactantes clínicos.

EL SURFACTANTE: EL PERFECTO ENGRANAJE ENTRE PROTEÍNAS Y LÍPIDOS

Aunque la terapia con surfactantes exógenos naturales procedentes de animales se ha mostrado muy eficaz en el tratamiento del NRDS, existen otras patologías como el síndrome de aspiración de meconio (MAS) o el síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS) donde este tratamiento no ha dado buenos resultados. Ninguno de los surfactantes sintéticos que se han propuesto como alternativa han conseguido aún ser tan eficaces como estos surfactantes de origen natural. Las características de las proteínas hidrofóbicas y la dificultad que supone el obtenerlas de forma recombinante se añaden al problema de encontrar alternativas. Resulta crucial seguir investigando sobre las funciones de las proteínas SP-B y SP-C, lo que incrementará las oportunidades de desarrollar una formulación que sea capaz de sustituir a estos surfactantes de origen animal y abordar el tratamiento de otras patologías en las que la función surfactante se encuentra comprometida. En los últimos años, se ha propuesto también que el surfactante, debido a su capacidad de adsorberse y viajar rápidamente por la superficie pulmonar, podría servir de vehículo para la administración de fármacos a través del pulmón, lo que alienta la necesidad de conocer cuáles son los mecanismos moleculares que hacen del surfactante un material tensioactivo tan eficaz. ■

PARA LEER MÁS

- Cañadas O, Olmeda B, Alonso A, Pérez-Gil J. "Lipid-protein and protein-protein interactions in the pulmonary surfactant system and their role in lung homeostasis". *Int J Mol Sci* 21 (2020) 3708.
- Castillo-Sánchez JC, Cruz A, Pérez-Gil J. "Structural hallmarks of lung surfactant: lipid-protein interactions, membrane structure and future challenges". *Arch Biochem Biophys* 703 (2021) 108850.
- Clements JA. "Lung surfactant: a personal perspective". *Annu Rev Physiol* 59 (1997) 1-21.
- Echaide M, Autilio C, Arroyo R, Pérez-Gil J. "Restoring pulmonary surfactant membranes and films at the respiratory surface". *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859 (2017) 1725-39.
- García-Álvarez B, Alonso A, Pérez-Gil J. "Structure and function of pulmonary surfactant proteins". En eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.): Chichester (2019).
- Pérez-Gil J. "A recipe for a good clinical pulmonary surfactant". *Biomed J* 45 (2022) 615-28.