

Diagnóstico molecular de los defectos del surfactante

MILAGROS GONZÁLEZ-RIVERA^a Y M. ÁNGELES MUÑOZ-FERNÁNDEZ^b

^aLínea Instrumental Secuenciación. Hospital General. Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

^bLaboratorio de Inmunobiología Molecular. Hospital General. Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España.

mgonzalezr.hgugm@salud.madrid.org; mmunoz.hgugm@salud.madrid.org

El surfactante pulmonar está compuesto por una mezcla lipoproteica que tapiza la superficie de los alvéolos pulmonares. Su función es disminuir la tensión superficial de la interfase líquido-aire para evitar el colapso del espacio alveolar en la inspiración, y facilitar la expansión pulmonar en la inspiración.

El surfactante pulmonar es secretado por las células epiteliales tipo II del alvéolo, en forma de cuerpos lamelares. En el espacio alveolar, éstos se despliegan para generar una estructura matricial denominada mielina tubular. El componente mayoritario de la monocapa tapizante son los fosfolípidos (80-90%). Sólo un 10% está compuesto por proteínas específicas (*surfactant-protein*) que se denominan SP-A, SP-B, SP-C y

SP-D. Aunque la SP-A es mayoritaria y esencial en la formación de la mielina tubular y en la regulación de la monocapa, su ausencia no parece afectar la función surfactante pulmonar. Sin embargo, las proteínas SP-B y SP-C parecen desempeñar un papel crítico en relación con su hidrofobicidad y su implicación estructural con los fosfolípidos, tanto en la ordenación de los cuerpos lamelares como de la mielina tubular y de la monocapa lipídica¹.

Déficit de surfactante pulmonar

Los defectos del surfactante pulmonar, excluidos los transitarios o la enfermedad hialina del recién nacido prematuro, son de base genética y representan un porcentaje bajo de las causas del síndrome de distrés respiratorio (SDR) del recién nacido. Las manifestaciones clínicas difieren según sea la proteína implicada en la composición y/o metabolismo del surfactante afectado y su grado de alteración. La sospecha diagnóstica se debe establecer ante un distrés respiratorio en el recién nacido que comienza en las primeras 72 h de vida, una vez excluidas las causas infecciosas, las malformaciones anatómicas pulmonares y/o cardíacas y los trastornos funcionales debidos a procesos extrapulmonares. Para fundamentar la sospecha clínica de déficit de surfactante pulmonar se debe profundizar en la historia clínica familiar, la genealogía y la consanguinidad, buscando otros casos familiares de trastornos de la función pulmonar. El diagnóstico definitivo requiere técnicas de biología molecular.

Puntos clave

- Los defectos genéticos del surfactante son una causa minoritaria del síndrome de distrés respiratorio de comienzo inmediato o en las primeras horas del nacimiento. La sospecha diagnóstica se debe establecer una vez excluido el resto de las causas etiológicas conocidas.
- La sospecha clínica de déficit de surfactante pulmonar debe documentarse realizando una historia clínica familiar que identifique otros casos previos de enfermedad pulmonar y establezca la genealogía de todos los casos.
- En neonatos con una enfermedad pulmonar grave de causa desconocida, refractaria a todo tipo de tratamiento y mal pronóstico, se debe realizar el análisis genético de SP-B y ABCA3.
- En niños con enfermedad pulmonar intersticial progresiva de causa no filiada se debe realizar el estudio del gen SP-C, especialmente cuando existen casos familiares.
- Para la confirmación diagnóstica de los defectos congénitos de surfactante (SP-B, SP-C, ABCA3) se requiere realizar un estudio genético del niño, de los padres y de los casos familiares previos.

Déficit de SP-B

La proteína B del surfactante pulmonar la producen las células epiteliales de tipo II, y es imprescindible para la síntesis funcional de los cuerpos lamelares y para el procesamiento proteolítico de la proteína SP-C. En la mayoría de los déficit de proteína B, con ausencia total o disfuncionalidad de la proteína, la clínica es similar al SDR del prematuro. Se manifiesta en las primeras horas de vida, experimenta mejoría transitoria tras la administración de surfactante exógeno, pero es refractario a los tratamientos habituales de ventilación u oxí-

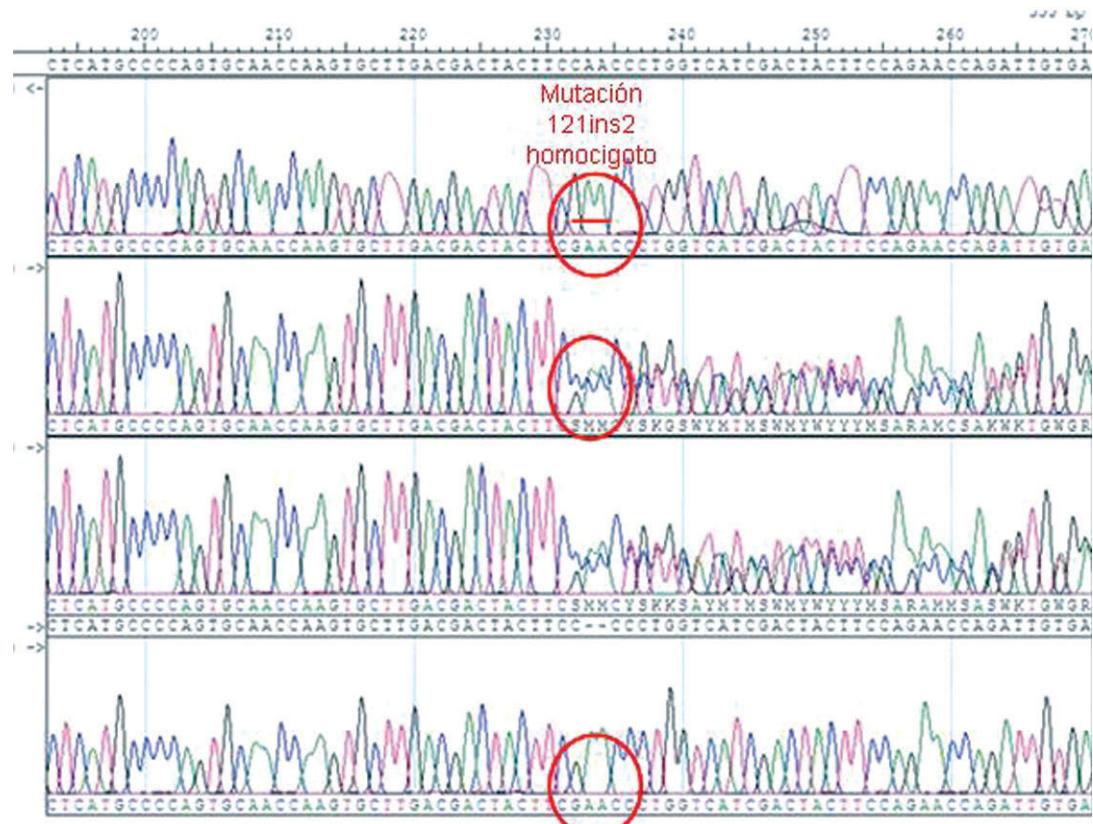


Figura 1. Secuenciación del gen SP-B (exón 4).
Fila 1 y 4: caso con mutación 121ins2 en homocigosis.
Fila 2 y 3: padre y madre con mutación 121ins2 en heterocigosis.

generación extracorpórea, produciéndose la muerte en los primeros meses de vida. El diagnóstico se confirma mediante la secuenciación del gen de SP-B en el recién nacido y en los padres. Se han descrito más de 25 tipos de mutaciones en el gen *SP-B*^{2,3}. De todas ellas, la mutación más frecuente es la denominada 121ins2⁴, que afecta al codón proteico 121 de la proteína SP-B. El cambio nucleotídico de una citosina a guanina y la inserción de dos adeninas genera un triplete o codón de parada (fig. 1). Esta señal de parada da lugar, en el proceso de transcripción del gen, a un ácido ribonucleico mensajero (ARNm) inestable, ocasionando una ausencia total de precursor proteico y de proteína SP-B madura⁴. La mutación se presenta en el 65% de los alelos de los pacientes que han sido diagnosticados de déficit de SP-B³. Cuando el gen es heterocigoto para el alelo mutado y el alelo sano, la función surfactante no está alterada, y el individuo es un portador sano⁵. Por tanto, es una enfermedad con patrón hereditario autosómico recesivo, subsidiaria de consejo genético a los padres. El déficit congénito de SP-B explica sólo una quinta parte de los SDR no filiados y un tercio de los que cursan con fallecimiento. Se han realizado estudios poblacionales americanos para determinar la frecuencia alélica de la mutación 121ins2, siendo de 0,3-1 por 1.000 habitantes^{6,7}. En España ha sido diagnosticado un caso de déficit SP-B en una familia portadora⁸.

Déficit de SP-C

La proteína C del surfactante pulmonar difiere estructuralmente de la proteína B, y ambas son muy hidrófugas. Su función está relacionada con el mantenimiento de la flexibilidad lípida de las membranas y las vesículas del neumocito tipo

II; es fundamental para la estabilidad del surfactante en el alvéolo, y también está implicada en la recaptación de los fosfolípidos y, probablemente, en su catabolismo.

El déficit o la disfunción de la proteína SP-C da lugar a diferentes cuadros clínicos con gran variabilidad en la gravedad de la patología, lo que indica que la afección del gen *SP-C* requiere de otros factores (genes modificadores, factores ambientales) para dar lugar a un fenotipo patológico en el recién nacido. De los casos publicados con mutaciones en el gen *SP-C*, podemos deducir que la sospecha diagnóstica se presentará en cuadros de enfermedad respiratoria del recién nacido de causa no explicada, agudos o crónicos que evolucionan a enfermedad intersticial en su sentido amplio, que puede incluir una neumonitis intersticial típica, no específica o descamativa⁹⁻¹³. También se han descrito casos de enfermedad pulmonar crónica con mutaciones en *SP-C* que se manifiestan a distintas edades desde la pediátrica a la edad adulta¹⁴.

Ante una sospecha diagnóstica, es importante documentar la historia clínica del paciente y la familiar para sustentar la base genética de la enfermedad; el patrón hereditario es autosómico dominante. El estudio del gen de SP-C se realiza mediante la secuenciación de ADN en el recién nacido, en los padres y otros casos familiares.

Proteína ABCA3

ABCA3 (*ATP-binding cassette transport A3*) es una proteína de membrana con función de transportador ATP-dependiente, perteneciente a la familia ABC, de la que se han descrito 14 genes. Estos genes están implicados en enfermedades de

almacenamiento, como la enfermedad de Tangier (ABCA 1). La proteína ABCA 3 se ha localizado en las células alveolares tipo II, en la membrana limitante de los cuerpos lamelares¹⁵, específicas del tejido pulmonar¹⁶. Los primeros estudios en este gen en relación con el SDR del recién nacido se llevaron a cabo en el año 2004¹⁷, encontrándose una afección del gen en el 76% de los niños estudiados, con descripción de 10 mutaciones distintas, 8 de ellas en homocigosis. Un niño heterocigoto presentó un cuadro de enfermedad crónica pulmonar. El cuadro clínico de los pacientes con mutaciones homocigotas fue el de un déficit de surfactante, con afección grave desde el nacimiento y evolución fatal, similar al descrito para el déficit de SP-B. El diagnóstico anatomo-patológico fue consistente con la proteinosis alveolar pulmonar y neumonitis descamativa intersticial. Los estudios de microscopia electrónica demostraron una alteración en la estructura de los cuerpos lamelares, sin mielina tubular en los espacios aéreos, que estaban llenos de un material proteináceo y lipídico.

Este hallazgo indica que en los cuadros de SDR del recién nacido hay que incluir el estudio del gen *ABCA3*; algunos autores¹⁸ señalan una mayor frecuencia en la afección de este gen que la del gen de SP-B y SP-C. La secuenciación del gen *ABCA3* presenta mayor complejidad técnica, debido a que está constituido por 30 exones codificantes, que dan lugar a una proteína madura de 1.704 aminoácidos.

Recientemente, se han detectado mutaciones de este gen en pacientes pediátricos con enfermedad intersticial pulmonar¹⁹.

Estrategia diagnóstica de la afección del surfactante

Ante la sospecha clínica fundamentada, se debe iniciar un estudio molecular. Sobre muestras de lavado broncoalveolar o de aspirado traqueal, se estudiará la presencia de la proteína madura SP-B, SP-C y de los precursores proteicos proSP-B y proSP-C, mediante técnicas de Western blot o ELISA. En caso de realizar biopsia del tejido pulmonar, es importante disponer de una muestra fresca que inmediatamente sea conservada a -196 °C. De esta forma se puede realizar el análisis de la expresión génica de SP-B, SP-C y ABCA3, mediante el estudio de los ARNm por técnicas de Northern blot o por reacción en cadena de la polimerasa (PCR); además, el tejido pulmonar es óptimo para la realización de técnicas de inmunohistoquímica que identificarán el contenido proteico del surfactante pulmonar.

Los resultados de las técnicas anteriormente descritas orientan hacia qué gen debe ser estudiado, para así confirmar el diagnóstico genético. La confirmación se realiza mediante el estudio del ADN del paciente, de los padres y de casos previos familiares. Cualquier muestra biológica sirve para tal efecto, aunque habitualmente se emplean muestras de sangre periférica. En primer lugar, se purifica el ADN genómico, sobre el cual se realizan amplificaciones de distintos fragmentos del gen mediante técnicas de PCR. Para ello, previamente, se han diseñado parejas de cebadores que anillen en los extremos de los fragmentos de ADN del gen estudiado. Los fragmentos de interés que se seleccionan suelen ser los exones co-

dificantes y las uniones exón-intrón donde residen los sitios de *splicing*. El estudio del gen *SP-B* se realiza habitualmente sobre 11 regiones, el del gen *SP-C* sobre 6 regiones, y el del gen *ABCA3* requeriría el estudio de 30 regiones para cada individuo. La aplicación de técnicas de secuenciación sobre las regiones de interés nos permite identificar la secuencia de nucleótidos del paciente que debe ser comparada con la secuencia consenso o de referencia para cada gen. Cualquier diferencia encontrada debe ser comprobada con las secuencias obtenidas de los padres y los casos familiares previos, así como con secuencias de individuos no afectados. De esta forma, se identifican las posibles mutaciones en cada uno de los genes que confirmarán el diagnóstico de la afección del surfactante.

Conclusiones

La alteración genética del surfactante es una causa minoritaria de SDR del neonato. En niños a término, con enfermedad respiratoria grave de causa desconocida, refractaria a los tratamientos habituales y especiales, deben solicitarse los análisis genéticos de *SP-B* y *ABCA3*. En niños con enfermedad intersticial pulmonar, sin hallazgo diagnóstico que filie la causa, se debe estudiar el gen *SP-C*. Es imprescindible realizar una historia familiar que identifique los casos previos similares y establezca el grado de relación parental.

Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

1. ●● Whitsett JA, Weaver TE. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med*. 2002;347:2141-8.
2. Tredano M, Gries M, De Blie J, Lorant T, Houdayer C, Schumacher S, et al. Analysis of 40 sporadic or familial neonatal and pediatric cases with severe unexplained respiratory distress: relationship to SFTPB. *Am J Med Genet*. 2003;119 Suppl A:324-39.
3. ●● Nogee LM, Wert SE, Proffit SA, Hull WM, Whitsett JA. Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:973-81.
4. Nogee LM, Garnier G, Dietz HC, Singer L, Murphy AM, De Mello DE, et al. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest*. 1994;93:1860-3.
5. Yusen RD, Cohen AH, Hamvas A. Normal lung function in subjects heterozygous for surfactant protein-B deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:411-4.
6. Cole FS, Hamvas A, Rubinstein P, King E, Trusgnich M, Nogee LM, et al. Population-based estimates of surfactant protein B deficiency. *Pediatrics*. 2000;105:538-41.
7. Hamvas A, Trusgnich M, Brice H, Baumgartner J, Hong Y, Nogee LM, et al. Population-based screening for rare mutations: high-throughput DNA extraction and molecular amplification from Guthrie cards. *Pediatr Res*. 2001;50:666-8.
8. Congenital surfactant protein B (SP-B) deficiency: molecular diagnosis in Spain. XIX European Congress of Perinatal Medicine. Atenas; 2004.
9. ● Nogee LM, Dunbar AE 3rd, 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;344:573-9.
10. Amin RS, Wert SE, Baughman RP, Tomashefski JF Jr, Nogee LM, Brody AS, et al. Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease. *J Pediatr*. 2001;139:85-92.

11. Hamvas A, Nogee LM, White FV, Schuler P, Hackett BP, Huddleston CB, et al. Progressive lung disease and surfactant dysfunction with a deletion in surfactant protein C gene. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;30:771-6.
12. Thomas AQ, Lane K, Phillips J 3rd, Prince M, Markin C, Speer M, et al. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1322-8.
13. Tredano M, Griese M, Brasch F, Schumacher S, Blieck J Jr, Marque S, et al. Mutation of SFTPC in infantile pulmonary alveolar proteinosis with or without fibro-sing lung disease. *Am J Med Genet.* 2004;126 Suppl A:18-26.
14. Horowitz AD, Moussavian B, Whitsett JA. Roles of SP-A, SP-B, and SP-C in modulation of lipid uptake by pulmonary epithelial cells in vitro. *Am J Physiol.* 1996;270:69L-79L.
15. Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, et al. AB-CA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett.* 2001;508:221-5.
16. Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Mochle C, Probst M, Stremmel W, et al. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem.* 2003;49:230-8.
17. ● Shulenin S, Nogee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med.* 2004;350:1296-303.
18. Whitsett JA, Wert SE, Xu Y. Genetic disorders of surfactant homeostasis. *Biol Neonate.* 2005;87:283-7.
19. Bullard JE, Wert SE, Whitsett JA, Dean M, Nogee LM. ABCA3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:1026-31.

Bibliografía recomendada

Nogee LM, Wert SE, Proffit SA, Hull WM, Whitsett JA. Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:973-81.

La importancia de este trabajo radica en que es una de las primeras revisiones de Nogee, autor de la identificación diagnóstica del primer caso de déficit de SP-B. En él se hace una revisión de los casos diagnosticados hasta el año 2000.

Shulenin S, Nogee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med.* 2004;350:1296-303.

Es el primer trabajo publicado sobre el gen ABCA3 y su estudio en niños con patología pulmonar no filiada. El autor expone la implicación de la proteína ABCA3 en la fisiología del surfactante pulmonar haciendo de ella diana para el estudio de un gen candidato que pudiera explicar los casos de SDR no filiados. Es el primer estudio donde se identifican 10 mutaciones de ABCA3.

Whitsett JA, Wert SE, Xu Y. Genetic disorders of surfactant homeostasis. *Biol Neonate.* 2005;87:283-7.

Hartl D, Griese M. Interstitial lung disease in children: genetic background and associated phenotypes. *Respir Res.* 2005;6:32.

Son las revisiones más actualizadas sobre los defectos genéticos del surfactante. Incluyen casos esporádicos diagnosticados que no se ajustan estrictamente a los patrones típicos descritos.