

Elastasa de neutrófilos humana y surfactante pulmonar en el síndrome de distrés respiratorio agudo

✉ Odalys Blanco¹, Yuliannis Lugones¹, Dayrom F Gil²,
Roberto Faure¹, Yamilé González²

¹Grupo de Química-Farmacología-Toxicología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA San José de Las Lajas, CP 32700, La Habana, Cuba

²Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, UH Calle 25 No. 455, Vedado, CP 10400, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: oblanco@censa.edu.cu; odalysbh@infomed.sld.cu

RESUMEN

En el desarrollo de algunas enfermedades inflamatorias pulmonares, tales como la fibrosis cística, el daño agudo del pulmón (ALI, del inglés Acute Lung Injury) y el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), se liberan numerosas proteasas a partir de neutrófilos infiltrados en el espacio alveolar; entre ellas se distingue la elastasa de neutrófilos humana (ENH). Con el objetivo de inhibir la actividad elastolítica, se han desarrollado estrategias terapéuticas. Este artículo revisa algunas de las funciones fisiopatológicas de la ENH en el ALI/SDRA, y su relación con el sistema surfactante pulmonar, así como el potencial terapéutico de los inhibidores de proteasas. Los resultados postulan que, aunque la fisiopatología de estas enfermedades es compleja, muchos ensayos demuestran una relación directa entre la ENH y el ALI/SDRA: se ha observado un incremento de la concentración de esta proteasa en modelos animales con ALI, así como en pacientes. Al mismo tiempo, debido al desequilibrio proteasa/inhibidores endógenos, se ha efectuado la evaluación farmacológica y se investiga la aplicación clínica de inhibidores de la ENH, así como su posible asociación con las preparaciones de surfactante pulmonar exógeno, y se tienen resultados prometedores.

Palabras clave: elastasa de neutrófilos humana, daño agudo del pulmón, surfactante pulmonar, inhibidores, SDRA

Biotecnología Aplicada 2009;26:281-286

ABSTRACT

Human neutrophil elastase and lung surfactant in acute respiratory distress syndrome. In the context of several lung diseases such as cystic fibrosis, acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS), several proteases are released from infiltrate neutrophils on alveolar space, where the human neutrophil elastase (HNE) play a major role. Based on this concept, therapeutic approaches have been developed in order to inhibit the elastolytic activity. In this sense, this article summarizes, first, some pathophysiological functions of neutrophil elastase in ALI/ARDS and their relationship with the lung surfactant and the potential therapeutic use of elastase inhibitors as well. The results show that although the pathophysiology of ALI/ARDS is complex, several evidences shows a direct relationship between neutrophil elastase and ALI, where is observed a increasing of protease concentration in ALI animal model as well as in patients. On the other hand, due to unbalance protease/endogenous inhibitors, the pharmacological assays and the clinical application of neutrophil elastase inhibitors are being researched with promising results.

Keywords: human neutrophil elastase, acute lung injury, lung surfactant, inhibitors, ARDS

Introducción

El daño agudo del pulmón (ALI, *Acute Lung Injury*) y su forma más severa, el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), se caracterizan por una injuria en el parénquima pulmonar, que afecta la respiración normal de los pacientes. Es una afección compleja, en la que intervienen procesos de carácter inflamatorio, infeccioso y oxidativo, y representa un problema grave para la vida. Este es un problema sin solución aún, causante del 40% de las muertes en países altamente desarrollados [1].

En el curso de estos síndromes, el surfactante pulmonar se afecta desde el punto de vista bioquímico y biofísico [2, 3], lo cual perturba la propia respuesta defensiva en el pulmón. Esto se debe a que mediadores proinflamatorios, proteínas plasmáticas y proteasas que se liberan a los espacios alveolares, asociadas con el edema, así como productos oxidativos, desencadenan una inhibición severa del sistema surfactante.

Los neutrófilos infiltrados en el espacio alveolar son de gran importancia, porque secretan proteasas, como las serino proteasas: catepsina G, proteinasa 3 y la elastasa de neutrófilos humana (ENH). Esta última se distingue por ser muy destructiva.

Este artículo revisa algunas de las funciones fisiopatológicas de la ENH en el SDRA y su acción en el sistema surfactante pulmonar, así como el potencial terapéutico del uso de inhibidores de proteasas, y su posible asociación con las preparaciones de surfactante pulmonar exógeno.

Surfactante pulmonar y el síndrome de distrés respiratorio agudo

El surfactante pulmonar esta compuesto por 90% de lípidos y cerca de un 10% de proteínas aunque solamente del 6-8% por masa son específicamente asociadas al surfactante. Los fosfolípidos constituyen del

1. Mackay A, Al-Haddad M. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Cont Edu Anaesth Crit Care Pain* 2009;9:152-6.

2. Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 1999;13:1455-76.

3. Gunther A, Ruppert C, Schmidt R, Markart P, Grimminger F, Walrath D et al. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res* 2001;2:353-64.

80 al 85% del peso de los lípidos y consisten en un 75% de fosfatidilcolina, un 10% de fosfatidilglicerol, un 5% de fosfatidilserina más fosfatidilinositol y menos de un 5% de esfingomielina. Cerca de la mitad del contenido de la fosfatidilcolina es la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), constituyendo el componente mayoritario del surfactante. El colesterol es el lípido neutro mayoritario y constituye entre el 5 y 10% del total de los lípidos. Dentro de los componentes minoritarios se encuentran otros fosfolípidos, glicéridos, ácidos grasos libres, lisofosfolípidos, y glicolípidos [4]. La fracción proteica contiene cuatro proteínas específicas, denominadas según el orden de su descubrimiento: SP-A, SP-B, SP-C y SP-D [5]. La primera y la cuarta son solubles en agua, mientras que la SP-B y la SP-C son hidrofóbicas. La función principal del surfactante pulmonar es disminuir el trabajo respiratorio, mediante la reducción de la tensión superficial en la interfase aire-líquido en el alveolo, además de que estabiliza el tracto respiratorio, mejora el transporte mucociliar, previene la formación de edema, y contribuye a la defensa contra agentes patógenos [6, 7].

Las proteínas hidrofílicas del surfactante, SP-A y SP-D, pertenecen al subgrupo de las colectinas, que presentan un dominio de lectinas asociado a estructuras colagenosas. Estas colectinas involucran a las lectinas que unen manosa, y se consideran muy importantes para el sistema inmune, pues su función en la defensa pulmonar es fundamental. La SP-A y la SP-D interactúan con varios microorganismos y componentes derivados de los organismos patógenos. Ellas actúan como opsoninas, ya que aglutinan estos organismos patógenos. Las colectinas del pulmón, además, ejercen un efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias [8].

Ashbaugh (1967) fue el primero en describir el SDRA en doce pacientes adultos, que murieron por un fallo respiratorio [9]. A partir de este informe, numerosos estudios han seguido su epidemiología, su fisiopatología y los tratamientos terapéuticos. En la Conferencia Consenso Europea-Americana (1994) sobre la actualización de estudios de este síndrome, se definió que los pacientes con fallo respiratorio agudo, debido a una injuria del parénquima pulmonar, podían estar padeciendo un espectro de afecciones tales, como fallo respiratorio agudo (FRA), ALI y SDRA [10]. Aunque ha disminuido la mortalidad por esta última afección, continúa alta (40%), lo cual constituye un problema significativo [1].

Numerosas afecciones pueden conducir al ALI/SDRA; la causa más común es la infección por una injuria pulmonar primaria, como una neumonía, o por vía sistémica, como una sepsis. Otras afecciones posibles generadoras de ALI/SDRA son el trauma masivo, las transfusiones de sangre múltiples y la pancreatitis, así como las injurias directas del pulmón, tales como la aspiración gástrica o la inhalación de gases tóxicos [8]. Varios estudios han demostrado que se incrementan las concentraciones de mediadores pro y antiinflamatorios en el lavado broncoalveolar en estos pacientes. Aunque la liberación de estos mediadores puede ser como protección en estados tempranos de la enfermedad, cuando ocurre un desequilibrio hay una disfunción progresiva del pulmón, lo que podría llevar al fallo multiorgánico y a la muerte [11]. Los cambios

que ocurren como resultado de esta inflamación clínica se manifiestan como hipoxemia, infiltrado y reducción de la distensibilidad pulmonar.

El SDRA está asociado con alteraciones bioquímicas y biofísicas del sistema surfactante pulmonar [12]. Estas alteraciones incluyen un incremento en el contenido de proteínas en el lavado broncoalveolar, alteraciones en el perfil de fosfolípidos y de ácidos grasos [13, 14], reducida concentración de la SP-A y la SP-B [15], y bajos niveles de la forma biofísicamente activa del surfactante, los grandes agregados. Esto provoca una disminución marcada de la actividad de superficie del surfactante pulmonar en la interfase aire-líquido, en el alvéolo que presentan los pacientes con esta enfermedad. Y a su vez, ocurre una degradación de los componentes esenciales del surfactante por los mediadores inflamatorios (como las fosfolipasas y las proteasas, y entre estas últimas, la ENH) y la inhibición de la función surfactante por proteínas del plasma. Ello trae como consecuencia la pérdida de la estabilidad alveolar, la atelectasia y el deterioro severo del intercambio gaseoso. Estos son elementos suficientes para evaluar la administración de preparaciones de surfactantes en pacientes con ALI/SDRA.

El surfactante pulmonar es absolutamente necesario, y su ausencia, deficiencia o inactivación se asocia con enfermedades pulmonares severas, como el síndrome de distrés respiratorio del neonato (SDRN), ALI y SDRA [2]. En los inicios de los años 80, la terapéutica con un surfactante pulmonar natural de origen bovino, cuyo nombre comercial es SURVANTA® (laboratorios Abbot, EE.UU.), a neonatos pretérminos cuyos pulmones estaban inmaduros y no sintetizaban ni secretaban el surfactante pulmonar, afección conocida como membrana hialina o SDRN [16], revolucionó la práctica médica con este grupo de pacientes. Posteriormente, han sucedido cinco surfactantes naturales exógenos, dominados por las grandes compañías farmacéuticas: SURFACTEN® (Tokoyo Tanabe, Japón), ALVEOFACT® (Boehringer Ingelheim, Alemania), CUROSURF® (Chiesi Pharmaceuticals, Italia), INFASURF® (Laboratorios Forest, EE.UU.) y BLES® (BLES Biochem, Canadá). A estos pocos se le adiciona el SURFACEN®, desarrollado en Cuba (Centro Nacional de Salud Agropecuaria, CENSA) [17]. Estos surfactantes tienen una composición bioquímica que se caracteriza por la presencia de alto contenido en fosfolípidos, en particular de fosfatidilcolina y su especie saturada con palmítico, la DPPC, y a su vez se distinguen por un elevado porcentaje de fosfolípidos aniónicos (fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol), en comparación con otras especies de fosfolípidos y por la presencia de proteínas hidrofóbicas conocidas como SP-B y SP-C [4]. En el proceso de obtención de las preparaciones farmacéuticas a partir de origen animal, las proteínas hidrofóbicas forman parte de su composición química, pero no están presentes ni la SP-A ni la SP-D.

El uso de estas preparaciones de surfactante pulmonar exógeno, constituye una práctica rutinaria en pacientes con SDRN [7, 18]. Sin embargo, el SDRA se caracteriza por una deficiencia o inactivación del surfactante endógeno como consecuencia de una compleja afección. Es una enfermedad severa cuyo

4. Creuwels LA, Van Golde LM, Haagsman HP. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects. *Lung* 1997;175:1-39.
5. Possmayer F. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant associated proteins. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:990-8.
6. Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* 1997;77:931-62.
7. Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 2005;5:58-68.
8. Sano H, Kuroki Y. The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity. *Molecular Immunol* 2005;42:279-87.
9. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2:319-23.
10. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:818-24.
11. Dietch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 1992;216:117-34.
12. Hallman M, Spragg R, Harell JH, Moser KM, Gluck L. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. *J Clin Invest* 1982;70:673-83.
13. Schmidt R, Meier U, Yabut-Perez M, Walrath D, Grimminger F, Seeger W, et al. Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipids in acute respiratory distress syndrome and pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:95-100.
14. Schmidt R, Markart P, Ruppert C, Wygrecka M, Kuchenbuch T, Walrath D, et al. Time-dependent changes in pulmonary surfactant function and composition in acute respiratory distress syndrome due to pneumonia or aspiration. *Respir Res* 2007;8:55-60.
15. Gunther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, et al. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:176-84.
16. Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet* 1980;1:55-9.
17. Manzanares D, Díaz E, Alfonso W, Escobar A, Colomé H, Muñoz MC, et al. Surfactante pulmonar porcino. 1995. República de Cuba, A 61 K 35-42.
18. Zhang JP, Wang YL, Wang YH, Zhang R, Chen H, Su HB. Prophylaxis of neonatal respiratory distress syndrome by intra-amniotic administration of pulmonary surfactant. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:120-4.
19. Lewis JF, Veldhuizen R. The role of exogenous surfactant in the treatment of acute lung injury. *Annu Rev Physiol* 2003;65:613-42.

cuadro clínico puede ser el resultado de múltiples causas [19]. En este sentido, el uso de una terapia con surfactante pulmonar exógeno para el tratamiento de esta enfermedad en adultos está aún en debate, y dependerá del desarrollo de nuevos surfactantes clínicos, que resistan los retos intrínsecos del pulmón dañado e inflamado en el adulto. Por esto, las características de un surfactante exógeno para el tratamiento de una disfunción pulmonar secundaria a una infección y, por ende, a una inflamación pulmonar, será diferente de aquellas preparaciones requeridas para tratar una deficiencia primaria de surfactante en pulmones inmaduros, como en los neonatales. Una de las estrategias a considerar es la adición de principios activos diferentes, ya que las preparaciones naturales tienen potencial para su optimización, como la posibilidad de la adición de un inhibidor de la ENH a una formulación de surfactante pulmonar exógeno, lo que será discutido posteriormente.

Acción de preparaciones exógenas de surfactante pulmonar sobre la actividad de la ENH

Se ha estudiado el efecto de diferentes preparaciones de surfactante pulmonar exógeno en la modulación *in vitro* de neutrófilos activados. Los resultados han sido diferentes: el EXOSURF[®], surfactante pulmonar sintético compuesto por DPPC, alcohol cetílico y tiloxapol, indujo una liberación de elastasa en los polimorfonucleares retados con tres agentes inductores de esta enzima. Sin embargo, dos preparaciones naturales, CUROSURF[®] y SURVANTA[®], causaron el efecto opuesto: la inhibición dosis dependiente en la liberación de ENH. El surfactante clínico ALVEOFACT[®], dependió de dos factores: de la concentración y del estímulo: a bajas concentraciones se incrementó la liberación de esta proteasa; y a mayores concentraciones, la enzima se inhibió. No obstante, la reducción en la liberación de ENH fue considerablemente más débil que la observada con CUROSURF[®] y SURVANTA[®] [20]. Estos resultados sustentan que la diferencia en la composición bioquímica de estas preparaciones es importante en su efecto farmacológico [21].

Funciones biológicas de la ENH e inhibidores endógenos

La función fisiológica principal de la ENH es la defensa del organismo, determinada porque hidroliza los peptidoglicanos presentes en la membrana externa de las bacterias gramnegativas, así como la degradación de los complejos inmunes fagocitados por los leucocitos polimorfonucleares [22]. Además, es probable que esta enzima también tenga una función en la migración de los leucocitos de la sangre a los tejidos [23].

Múltiples inhibidores endógenos proteicos regulan la actividad proteolítica no controlada e indeseada de la ENH (Tabla 1). Estos inhibidores están en la circulación o localizados en diferentes células y tejidos a altas concentraciones, y tienen una función importante en la protección contra la proteólisis no deseada de las enzimas. Por su abundancia y características, son importantes: el α_1 -antitripsina (α_1 -AT) o inhibidor de proteasa α_1 ; la α_2 -macroglobulina; el inhibidor de peptidasa secretado de leucocito (SLPI, *secretory leukocyte peptidase inhibitor*), la pre-elafina y la elafina;

Tabla 1. Inhibidores endógenos de la ENH

Nombre inhibidor	Localización	Familia de inhibidores a que pertenece	Función fisiológica e importancia terapéutica	Referencia
α_1 -AT (α_1 -antitripsina)	Plasma y numerosos tejidos	Serpinas	Principal inhibidor fisiológico de ENH Deficiencia hereditaria del inhibidor: provoca enfermedades letales como el enfisema paracinar y la fibrosis cística	24
SLPI (<i>secretory leukocyte protease inhibitor</i>)	Células epiteliales, macrófagos y neutrófilos	Quelonianinas	Inhibe la ENH y la cathepsina G Demostrada actividad antiviral, bactericida y antifúngica Modula numerosas actividades antiinflamatorias	25
Pre-elafina y elafina (<i>skin-derived antileuko-protease inhibitor</i>)	Secreción bronquial y piel	Quelonianinas	Inhibe ENH y proteasa-3 Reduce la respuesta inflamatoria mediada por leucocitos y citoquinas	26-27
M/NEI (Monocyte/neutrophil elastase inhibitor)	Macrófagos y neutrófilos	Serpinas	Inhibe la ENH, la elastasa pancreática y la proteasa-3 Inhibidor recombinante potencial en el tratamiento de la fibrosis cística	28
P19 (human proteinase inhibitor 9)	Placenta, pulmón y linfocitos citotóxicos	Serpinas	Inhibe la ENH y la cathepsina G	29

fina; el inhibidor de elastasa de monocitos/neutrófilos (M/NEI, *monocyte/neutrophil elastase inhibitor*); así como el P19 (*protease inhibitor 9*) [30, 31].

El inhibidor α_1 -AT tiene una masa molecular de 55 kDa, y es el más importante inhibidor irreversible de ENH en cuanto a su concentración (54 $\mu\text{mol/L}$ en plasma) y acción rápida ($k_{\text{on}} 6 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}\text{Ls}^{-1}$). Es un inhibidor perteneciente a la familia de las serpinas, como el M/NEI y P19 [28, 31, 32]. La α_1 -AT es responsable del 92% de la inhibición de ENH en el plasma y la inhibición remanente se le atribuye a la α_2 -macroglobulina. Ambos inhibidores presentan un mecanismo de inhibición diferente. El α_1 -AT inhibe irreversiblemente a ENH, mediante la formación de un complejo estable acil-enzima a través de su sitio catalítico, mientras que la α_2 -macroglobulina ejerce un mecanismo de atrapamiento, es decir, la enzima atrapada pierde casi completamente su actividad proteolítica, pero es capaz de hidrolizar algunas proteínas nativas, particularmente pequeños sustratos que pueden ocupar el sitio activo [24]. El significado fisiológico de la actividad proteolítica remanente del complejo α_2 -macroglobulina y de la ENH no está claro todavía; sin embargo, algunas evidencias sugieren que parte de la degradación del tejido en el enfisema pulmonar puede ser atribuida a esta actividad [32].

El SLPI es un inhibidor más pequeño (11.7 kDa) y el más importante localizado en el epitelio del tracto respiratorio superior. El SLPI se sintetiza y secreta por una amplia variedad de células como las epiteliales y las de las glándulas bronquiales [33, 34]; la ENH es la proteasa diana del SLPI, la que es inhibida reversiblemente con un valor de K_i de $4 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$ [35]. El SLPI y la elafina pertenecen a la familia de quelonianinas, que son inhibidores canónicos de serino proteasas [36]. SLPI contiene dos dominios, el

20. Tremblay GM, Sallenave JM, Israel-Assayag E, Cormier Y, Gaudie J. Elafin/elastase-specific inhibitor in bronchoalveolar lavage of normal subjects and farmer's lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1092-8.

21. Blanco O, Pérez-Gil J. Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat Respiratory Distress Syndrome: Role of the different components in an efficient pulmonary surfactant. *Eur J Pharmacol* 2007;568:1-15.

22. Lee WL, Downey GP. Leukocyte elastase. Physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:896-904.

23. Murphy G, Reynolds JJ. Extracellular matrix degradation. En: *Connective Tissue and its Heritable Disorders*. (Royce PM, Steinmann B, eds.). New York Wiley-Liss, 1993, p. 287-316.

24. Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Ann Rev Biochem* 1983;52:655-709.

25. Renesto P, Balloy V, Kamimura T, Masuda K, Imaizumi A, Chignard M. Inhibition by recombinant SLPI and half-SLPI (Asn55-Ala107) of elastase and cathepsin G activities: consequence for neutrophil-platelet cooperation. *Br J Pharmacol* 1993;108:1100-6.

26. Wiedow O, Luademann J, Utecht B. Elafin is a potent inhibitor of proteinase 3. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:6-10.

27. Zani ML, Nobar SM, Lacour SA, Lemoine S, Boudier C, Bieth JG, et al. Kinetics of the inhibition of neutrophil proteinases by recombinant elafin and pre-elafin (trappin-2) expressed in *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem* 2004;271:2370-8.

dominio del extremo carboxilo, donde se localiza la actividad inhibidora, y el dominio del extremo amino, que presenta actividad antibacteriana frente a bacterias grampositivas y gramnegativas [34]. SLPI puede acceder con mayor facilidad a los espacios pequeños en el sistema respiratorio, comparado con la α_1 -AT y la α_2 -macroglobulina, por lo que tiene una función importante en la protección contra el tejido dañado por ENH [37].

La elafina, una proteína de 6.0 kDa, aislada de secreciones pulmonares [20, 38] o de epitelios humanos [39], se libera proteolíticamente de su precursor trappin-2 o pre-elafina. La región del extremo amino se caracteriza por la presencia de una secuencia de aminoácidos repetitivos, que al parecer es la responsable de inmovilizar este inhibidor a los componentes proteicos del pulmón y, por tanto, restringir la difusión de estas al sitio de acción deseado. Es un inhibidor reversible de ENH (K_i 2×10^{-10} mol/L) [40], así como de proteasa 3: otra serino proteasa secretada también por los neutrófilos [26]. En un modelo de ALI en hánteres, la administración intratraqueal de pre-elafina recombinante humana inhibe la hemorragia pulmonar; sin embargo, la elafina sintética no fue efectiva [41].

El M/NEI, también conocido como SERPINB1, es una proteína de la familia de las serpinas y uno de los inhibidores más eficientes de ENH, catepsina G y proteasa-3 [36]. SERPINB1 se expresa de manera extensa y en concentraciones muy altas en el citoplasma de neutrófilos. Recientemente se demostró que el SERPINB1 preserva los componentes celulares y moleculares responsables de la defensa contra *Pseudomonas aeruginosa*, cuando se evidenció que ratones que no tenían esta molécula eran incapaces de eliminar la infección en el pulmón por *P. aeruginosa*, lo cual les provocaba una infección bacteriana sistémica. El defecto en la función inmune de los ratones que no tenían el gen *serpinb1* conlleva a un incremento en la velocidad de necrosis de los neutrófilos, se reduce el número de fagocitos e incrementa la actividad de las serino proteasas de los neutrófilos en el pulmón con proteólisis de la SP-D [42]. Los últimos estudios sugieren que el M/NEI puede brindar una protección a las vías aéreas, por regular el exceso de la actividad proteasa asociada a desórdenes inflamatorios pulmonares, en general, los inhibidores que pertenecen a la familia de las serpinas tienen aplicaciones terapéuticas promisorias [43].

La función fisiológica de los inhibidores endógenos de ENH es proveer una gran actividad anti-elastasa para que la enzima no dañe los tejidos. Sin embargo, a pesar de que la concentración de α_1 -AT es alta en los tejidos, se conoce que ENH presente en los fluidos purulentos es capaz de degradar una amplia variedad de proteínas nativas [32]. La enzima escapa de la regulación de sus inhibidores endógenos mediante numerosas vías. Una de ellas es el tamaño molecular de la α_1 -AT y la α_2 -macroglobulina, que impide la penetración de estos inhibidores a microambientes entre los neutrófilos y los tejidos, debido a las limitaciones estereoquímicas. En estos sitios, los inhibidores pequeños como el SLPI y la elafina bloquean la proteólisis [32]. Un segundo mecanismo es la inactivación de α_1 -AT mediante la mieloperoxidación, en la que la Met358 (sitio reactivo del inhibidor) se oxida a sul-

fóxico, por especies reactivas del oxígeno producidas por los neutrófilos activados, proceso que también inactiva a la α_2 -macroglobulina y el SLPI [32]. Un tercer mecanismo, es el empobrecimiento de la actividad inhibidora frente a ENH, unida a la superficie de los neutrófilos y tejidos, ya que los inhibidores de proteasas endógenos no son completamente efectivos para inhibir ENH unida; sin embargo, pueden inhibir la enzima libre [37, 44]. Al mismo tiempo, se plantea que la elevada acumulación de los gránulos de neutrófilos humanos provee de altas concentraciones de ENH, se rompe el equilibrio de elastasa-inhibidores, y conduce al daño agudo del tejido, lo que se ha comprobado en pacientes con deficiencia de la α_1 -AT [46].

Efecto de la ENH en el ALI/SDRA: potencial terapéutico de sus inhibidores

En el contexto de las enfermedades respiratorias, la ENH escapa de su regulación, altera la función de permeabilidad de la barrera del pulmón e induce la liberación de citoquinas proinflamatorias. Estas acciones causan síntomas típicos del ALI, como el incremento de los niveles de ENH en modelos animales de ALI y en la clínica. A su vez, la administración tópica o sistémica de ENH provoca síntomas típicos de ALI, tanto *in vitro* como *in vivo*, y la inhibición de la actividad incrementada de ENH reduce los síntomas de ALI en modelos animales [32, 46].

Hay varias dianas potenciales para la acción de la ENH en el pulmón: se demostró, por ejemplo, que factores antimicrobianos en la superficie líquida de las vías aéreas se inactivan o degradan por la ENH. Otra diana son las proteínas del surfactante pulmonar: los primeros estudios *in vitro* demostraron que las propiedades de adsorción del surfactante a la interfase aire-líquido disminuye en presencia de la ENH, y se corroboró que se asocia a una ruptura proteolítica de la SP-A, así como de las proteínas hidrófobas SP-B y SP-C, por lo que estos efectos pudieran dañar la función surfactante *in vivo* [47]. Recientemente se confirmaron estos resultados en pacientes con fibrosis cística, y se demostró la presencia de la catepsina G y la ENH en el lavado broncoalveolar. La incubación del lavado broncoalveolar de estos pacientes con SP-A causó una degradación de esta proteína, y la adición de catepsina G o ENH al lavado broncoalveolar de pacientes normales, causó una degradación dosis-dependiente de la SP-A endógena. También se demostró que esta degradación fue abolida por la adición de dos inhibidores, el M/NEI y el diisopropil-fluorofosfato [48].

Luego, algunos ensayos *in vitro* demostraron que ocurre una degradación de la proteína SP-D cuando se incuba con las proteasas: ENH, proteasa 3 y catepsina G, procedentes de los neutrófilos. La degradación fue a través de una hidrólisis específica en la región conservada del dominio de reconocimiento de carbohidrato de la SP-D. Estos resultados se confirmaron en un modelo experimental de neumonía bacteriana en ratones [49]. A partir de estas evidencias, se puede decir que las serino proteasas de neutrófilos, especialmente la ENH y la catepsina G, contribuyen a la degradación de las proteínas del surfactante y, por tanto, disminuyen la defensa pulmonar innata antimicrobiana.

28. Remold-O'Donnell E, Chin J, Alberts M. Sequence and molecular characterization of human monocyte/neutrophil elastase inhibitor. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:5635-9.

29. Dahlen JR, Foster DC, Kisiel W. Human proteinase inhibitor 9 (PI9) is a potent inhibitor of subtilisin A. Biochem Biophys Res Commun 1997;238:329-33.

30. Bieth JG. *In vivo* significance of kinetic constants of macromolecular proteinase inhibitors. Adv Exp Med Biol 1984;167: 97-109.

31. Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: Physicochemical properties, activity and physiopathological functions. Biochimie 2008;90:227-42.

32. Kawabata K, Hagio T, Matsuoka S. The role of neutrophil elastase in acute lung injury. Eur J Pharm 2002;451:1-10.

33. Vogelmeier C, Gillissen A, Buhl R. Use of secretory leukoprotease inhibitor to augment lung antineutrophil elastase activity. Chest 1998;110:261-66.

34. Hiemstra PS. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. Biochem Soc Trans 2002;30:116-20.

35. Faller B, Mely Y, Gerard D, Bieth JG. Heparin-induced conformational change and activation of mucus proteinase inhibitor. Biochemistry 1992;31:8285-90.

36. Rawlings ND, Tolle DF, Barret AJ. Evolutionary families of peptidase inhibitors. Biochem J 2004;378:705-16.

37. Owen CA, Campbell MA, Sannes PL, Boukedes SS, Campbell EJ. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. J Cell Biol 1995;131:775-89.

38. Sallenave JM, Silva A. Characterization and gene sequence of the precursor of elafin, an elastase-specific inhibitor in bronchial secretions. Am J Respir Cell Mol Biol 1993;8:439-45.

39. Pfundt R, Van Ruissen F, Van Vlijmen-Willems IM, Alkemade HA, Zeeuwen PL, Jap PH, et al. Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia. J Clin Invest 1996;98:1389-99.

40. Ying QL, Simon SR. Kinetics of the inhibition of human leukocyte elastase by elafin, a 6-kilodalton elastase-specific inhibitor from human skin. Biochemistry 1993;32:1866-74.

41. Tremblay GM, Vachon E, Larouche Ch, Bourbonnais Y. Inhibition of human neutrophil elastase-induced acute lung injury in hamsters by recombinant human pre-elafin (trappin-2). CHEST 2002;121: 582-8.

42. Benarafa C, Priebe GP, Remold-O'Donnell E. The neutrophil serine protease inhibitor serpinb1 preserves lung defense functions in *Pseudomonas aeruginosa* infection. The J Exp Med 2007;204: 1901-9.

43. Askew DJ, Silverman GA. Intracellular and extracellular serpins modulate lung disease. J Perinatol 2008;28:S127-S35.

A su vez, en el ciclo de vida complejo, el surfactante pulmonar se convierte de grandes agregados de superficie activa, a pequeños agregados inactivos: los primeros, responsables de las excelentes propiedades biofísicas que presenta el surfactante [50]. Se plantea que este proceso del metabolismo extracelular del surfactante, es regulado probablemente por una serino proteasa, conocida como convertasa del surfactante, producida por los macrófagos alveolares y las células pulmonares de tipo II [51], el cual es dependiente del proceso de expansión-compresión en la interfase aire-líquido [52]. Aunque esta enzima no es la única involucrada en este proceso, hay evidencias de que esta convertasa es altamente específica en la conversión de los subtipos de surfactante. La determinación de la secuencia aminoácida de la convertasa del surfactante demostró que es una serino carboxiesterasa [53]. Estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la convertasa del surfactante es sensible a la inhibición por la α_1 -AT.

El efecto de una preparación de surfactante pulmonar exógena, SURVANTA[®], así como mezclas de fosfolípidos y/o proteínas sintéticas que representan los principales componentes del surfactante pulmonar, se evaluaron en unión al α_1 -AT en un modelo de ratas deficientes en surfactante. Los experimentos demostraron un mejoramiento sustancial en la oxigenación, lo cual se asoció con un incremento en los grandes agregados del surfactante, probablemente debido a la inhibición de la actividad convertasa del surfactante [54]. Estos resultados sugieren el papel positivo de la α_1 -AT en prevenir la degradación del surfactante en el pulmón. Además, se han descrito otros inhibidores que actúan en el proceso de conversión de los agregados del surfactante [55]. Por la posible acción farmacológica de los inhibidores de ENH unidos a preparaciones clínicas de surfactante, consideramos que podría ser una estrategia terapéutica que se debería valorar en el tratamiento del ALI/SDRA.

Por la importancia de los procesos inflamatorios principalmente en enfermedades pulmonares, en los cuales se involucra la ENH, las investigaciones se dirigen a la búsqueda de inhibidores específicos, como drogas potenciales contra estas enfermedades [56]. En la tabla 2 se ilustran los principales inhibidores sintéticos y recombinantes de la ENH en diferentes estados de evaluación clínica. Entre ellos se destaca, el Sivelestat, inhibidor sintético de la ENH con alta especificidad. La infusión intravenosa de este inhibidor, en estudios en un modelo severo de ALI inducido por instilación de ácido clorhídrico y por *Streptococcus pneumoniae* en hámsteres, mejora significativamente los indicadores de daño en el lavado broncoalveolar y la presión parcial de oxígeno, junto con una inhibición de la actividad ENH y con una disminución de la mortalidad [57, 58]. Los autores de la presente investigación utilizaron un modelo de ALI, pero inducido por acetato de forbol miristato en conejos concisus, para demostrar que la aplicación de Sivelestat inhibía la actividad de la ENH entre 60 a 90% y, a su vez, atenuó la hemorragia y los niveles incrementados de proteínas en el pulmón [59]. También se demostró que ese inhibidor reduce de manera efectiva las medidas de inflamación, mejora los cambios edematosos y el daño agudo en múltiples modelos de animales [60].

Tabla 2. Inhibidores sintéticos y recombinantes de la ENH. Actualización del estado clínico en enfermedades respiratorias en general

Nombre de la droga	Indicación	Estado clínico	Nombre de la Compañía
Sivelestat, Elaspol, ONO 5046 o LY544349	Tratamiento de el daño agudo del pulmón, asociado al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica	Lanzado al mercado en Japón (2002) y en Korea (2006)	Ono Pharmaceutical Co., Ltd. y Dong-A Pharmaceutical Co.
Midesteine	Enfermedad crónica obstructiva del pulmón (COPD)	Pre-registro (Italia)	Medea Research
AE-3763	Enfermedad crónica obstructiva del pulmón (COPD)	Pre-clínica	Dainippon
R-448	Enfermedad crónica obstructiva del pulmón (COPD)	Fase I	Roche
Elafina Proteo	Hipertensión arterial pulmonar e hipertensión pulmonar tromboembólica crónica	Fase II	Proteo Inc. y Proteo Biotech AG
ADC 7878	Fibrosis cística	Pre-clínica	Argenta Discovery Ltd. (Private)
AZD9668	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	Fase II	AstraZeneca Plc. (AZN)
AGTC-0106	Enfisema (deficiencia de la α_1 -AT)	Fase I	Applied Genetic Technologies Corporation (AGTC)
Respriva	Enfisema (deficiencia de la α_1 -AT)	Fase II	Arriva Pharmaceuticals Inc. (Private)

Los estudios clínicos demostraron que Sivelestat mejora significativamente la oxigenación, reduce el tiempo en que los pacientes permanecen conectados al ventilador y en las unidades de cuidados intensivos; aunque no hubo diferencias significativas en la mortalidad de pacientes con síndrome de distrés respiratorio asociado a la respuesta del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica [61, 62]. Cuando se compara con inhibidores de proteasas endógenos, el Sivelestat, de pequeño tamaño molecular, puede suministrarse al sitio de inflamación de un modo más fácil y efectivo, lo cual mejora los síntomas clínicos del ALI [57, 63].

Aún es preciso investigar para resolver las incógnitas en ambos campos: tanto del surfactante pulmonar, como de la optimización de los inhibidores de ENH sintéticos o recombinantes y su ubicación en el complejo escenario de las enfermedades respiratorias. La combinación de ambas preparaciones podría ser un camino interesante a estudiar por sus potencialidades terapéuticas en el tratamiento del ALI y SDRA.

Conclusión

Las proteasas son dianas potenciales para la terapia basada en inhibidores. Están presentes en la fisiopatología de varias enfermedades inflamatorias infecciosas, entre las que se destacan las enfermedades pulmonares como ALI y SDRA. Hay numerosas interrogantes por resolver para un mejor entendimiento de su función fisiopatológica. El reto está en lograr inhibidores que eliminen o neutralicen el efecto destructivo y dañino de la ENH, sin atentar contra su función fisiológica ni crear otros efectos adversos. Si bien escasos estudios evalúan la combinación de preparaciones exógenas de surfactante pulmonar e inhibidores de proteasas, es un camino aún por estudiar, lo cual abre perspectivas en el tratamiento de estas severas enfermedades pulmonares.

44. Kawabata K, Moore AR, Willoughby DA. Impaired activity of protease inhibitors towards neutrophil elastase bound to human articular cartilage Ann Rheum Dis 1996;55:248-52.

45. Campbell EJ, Campbell MA, Boukides SS, Owen CA. Quantum proteolysis by neutrophils implications for pulmonary emphysema in alpha 1-antitrypsin deficiency. J Clin Invest 1999;104:337-44.

46. Kawabata K, Hagio T, Matsumoto S, Nakao S, Orita S, Aze Y, et al. Delayed neutrophil elastase inhibition prevents subsequent progression of acute lung injury induced by endotoxin inhalation in hamsters Am J Respir Crit Care Med 2000;161:2013-18.

47. Pison U, Tam EK, Caughey GH, Hawgood S. Proteolytic inactivation of dog lung surfactant-associated proteins by neutrophil elastase. Biochim Biophys Acta 1989;992:251-7.

48. Rubio F, Cooley J, Accurso FJ, Remold-O'Donnell E. Linkage of neutrophil serine proteases and decreased surfactant protein-A (SP-A) levels in inflammatory lung disease. Thorax 2004;59:318-23.

49. Hirche TO, Crouch EC, Espinola M, Brokelman TJ, Mecham RP, DeSilva N, et al. Neutrophil serine proteinases inactivate surfactant protein D by cleaving within a conserved subregion of the carbohydrate recognition domain. J Biol Chem 2004; 279:27688-98.

50. Jobe AH, Ikegami M. Surfactant metabolism. Clin Perinatol 1993;20:683-96.

51. Barr F, Clark H, Hawgood S. Identification of a putative surfactant convertase in rat lung as a secreted serine carboxylase. Am J Physiol 1998;274:L404-10.

52. Gross NJ, Schultz RM. Requirements for extracellular metabolism of pulmonary surfactant: tentative identification of serine protease Am J Physiol 1992;262:L446-53.
53. Krishnasamy S, Gross NJ, Teng AL, Schultz RM, Dhand R. Lung "surfactant convertase" is a member of the carboxylesterase family. Biochem Biophys Res Commun 1997; 235:180-4.
54. Belai Y, Hernández-Juviel JM, Bruni R, Waring AJ, Walther FJ. Addition of α 1-Antitrypsin to Surfactant Improves Oxygenation in Surfactant-deficient Rats Am. J Respir Crit Care Med 1999;159:917-23.
55. Ruppert C, Pucker C, Markart P, Schmidt R, Grimminger F, Seeger W, *et al.* Selective inhibition of large-to-small surfactant aggregate conversion by serine protease inhibitors of the bis-benzamidine type. Am J Respir Cell Mol Biol 2003;28:95-102.
56. Tremblay GM, Janelle MF, Bourbonnais Y. Anti-inflammatory activity of neutrophil elastase inhibitors. Drugs 2003;4:556-65.
57. Hagio T, Matsumoto S; Nakao S, Abiru T, Ohno H, Kawabata K Elastase inhibition reduced death associated with acid aspiration-induced lung injury in hamsters. Eur J Pharmacol 2004;488:173-80.
58. Hagio T, Kishikawa K, Kawata K, Tasaka S, Hashimoto S, Hasegawa N, *et al.* Inhibition of neutrophil elastase reduces lung injury and bacterial count in hamsters. Pulm Pharmacol Ther 2008;21 (6):884-9.
59. Hagio T, Matsumoto S, Nakao S, Matsuoka S, Kawabata K. Sivelestat, a specific neutrophil elastase inhibitor, prevented phorbol myristate acetate-induced acute lung injury in conscious rabbits. Pulm Pharmacol Ther 2005;18:285-90.
60. Hagiwara S, Iwasaka H, Togo K, Noguchi T. A Neutrophil Elastase Inhibitor, Sivelestat Reduces Lung Injury Following Endotoxin-Induced Shock in Rats by Inhibiting HMGB1. Inflammation 2008 4:227-34.
61. Zeiher B G, Matsuoka S, Kawabata K, Repine JE. Neutrophil elastase and acute lung injury: prospects for sivelestat and other neutrophil elastase inhibitors as therapeutics Crit Care Med 2002;30:S281-7.
62. Okayama N, Kakihana Y, Setoguchi D, Imabayashi T, Omae T, Matsunaga A, *et al.* Clinical effects of a neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, in patients with acute respiratory distress syndrome. J Anesthesia 2006;20: 6-10.
63. Kawabata K, Hagio T, Matsuoka S. Pharmacological profile of a specific neutrophil elastase inhibitor, Sivelestat sodium hydrate. Folia Pharmacologica Japonica 2003;122:151-60.

Recibido en julio de 2009. Aprobado en diciembre de 2009.