

## SURFACEN: DESDE LA BIOFÍSICA HASTA LA MEDICINA RESPIRATORIA

Blanco Hidalgo, Odalys<sup>1</sup>  
Lugones Ladrón de Guevara, Yuliannis<sup>1</sup>  
Monzote Fidalgo, Lianet<sup>2</sup>  
Morilla Guzmán, Andrés<sup>3</sup>  
Díaz Casaña, Elaine<sup>1</sup>  
Salomao Reinaldo<sup>4</sup>  
Pérez Gil, Jesús<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria/Grupo de desarrollo Bio-farmacéutico, Mayabeque Cuba, email: oblanco@censa.edu.cu

<sup>2</sup>Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), <sup>3</sup>Hospital Ángel Arturo Aballi, MINSAP, <sup>4</sup>Universidad Federal de San Pablo, Brasil, <sup>5</sup>Universidad Complutense de Madrid, España.

**Resumen:** La actividad surfactante adecuada sigue siendo crítica para la función pulmonar óptima durante toda la vida, y la disfunción o inactivación del surfactante secundario puede contribuir a la patogénesis de enfermedades pulmonares graves, incluido el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y el síndrome de aspiración de meconio (MAS). El objetivo del presente estudio fue caracterizar las propiedades biofísicas de Surfacen<sup>®</sup> y además estudiar el efecto de agentes inactivantes (suero, meconio) en estas propiedades así como las mismas pueden ser revertidas. Estas investigaciones se complementaron con nuevos estudios farmacológicos *in vitro* retando el producto contra *S. aureus*, microorganismo causante de enfermedades respiratorias, para conocer su efecto anti-inflamatorio y además contra *Leishmania amazonenses*. En paralelo se realizaron estudios de combinación de fármacos, usados en la medicina respiratoria, con Surfacen<sup>®</sup> en la evaluación de sus propiedades biofísicas. Los resultados mostraron que Surfacen<sup>®</sup> exhibió propiedades biofísica similares a las del surfactante endógeno, lo que avala su función óptima. El ácido hialurónico protege a Surfacen<sup>®</sup> de la inactivación por suero y meconio. Surfacen<sup>®</sup> demostró propiedades anti-inflamatorias y antipatogénicas. A su vez la combinación de Surfacen<sup>®</sup> con un anti-inflamatorio, un antioxidante y antibióticos no afecta sus propiedades interfaciales. En su conjunto estos estudios avalan las nuevas propiedades farmacológicas de Surfacen<sup>®</sup> para su uso más allá del distress en el neonato.

**Palabras clave:** surfactante pulmonar, biofísica, enfermedades respiratorias, inactivación

## I. INTRODUCCIÓN

El surfactante pulmonar es un complejo lipoprotéico esencial para permitir la apertura estable de los espacios respiratorios pulmonares, y su falta o disfunción está asociada al desarrollo de patologías severas (1, 2, 3). Las preparaciones clínicas de surfactante pulmonar se utilizan habitualmente para tratar los recién nacidos prematuros con síndrome de dificultad respiratoria, además estas preparaciones representan un componente crucial en el sistema inmune innato y adquirido regulando la defensa y los procesos inflamatorios en el pulmón. En este sentido el efecto terapéutico está relacionado no solamente con sus características biofísicas, sino además por sus efectos anti-inflamatorios (4).

La inhibición del surfactante incluye aquellos procesos que disminuyen la actividad de superficie del surfactante pulmonar. Las sustancias inhibitorias fundamentales incluyen proteínas del suero, lisofosfolípidos, y meconios entre otras. Varias investigaciones exploran el mecanismo molecular que subyace detrás de los procesos de inactivación así como diferentes estrategias para proteger o revertir la inactivación del surfactante pulmonar (5, 6, 7). Recientemente, se informó que la dermaserpina posee actividad frente a *Leishmania* (8, 9). Estos hallazgos sustentan la evaluación de las preparaciones de surfactantes, frente a protozoos parásitos.

Las particulares propiedades biofísicas del surfactante pulmonar, capaces de adsorberse con muy alta eficiencia a la interfase aire-líquido y, a través de ésta, viajar rápidamente a las vías aéreas distales, convierte al surfactante en un potencial vehículo para la administración de fármacos por la vía pulmonar (10).

El objetivo del presente estudio fue caracterizar las propiedades biofísicas de Surfacen® y además estudiar el efecto de agentes inactivantes (suero, meconio) en estas propiedades así como las mismas pueden ser revertidas. Estas investigaciones se complementaron con nuevos estudios farmacológicos *in vitro* retando el producto contra *S. aureus*, microorganismo causante de enfermedades respiratorias, para conocer su efecto anti-inflamatorio y además contra *Leishmania amazonenses*. En paralelo se realizaron estudios de combinación de fármacos, usados en la medicina respiratoria, con Surfacen®.

## II. MÉTODO

### I-Materiales

Surfacen®, un surfactante clínico usado en la terapia de SDRN en Cuba producido por el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA, Mayabeque). N-acetilcisteína: 100 mg/mL, 1 mL, Hidrocortisona: 100 mg polvo liofilizado y Amikacina: 500mg, 2mL. Ácido Hialurónico (HA, 120k) fue suministrado por Sigma (St. Louis, MO). Meconio y suero donado por el Dr. Jesús Pérez Gil

**II-MODELO BIOFÍSICO:** La tensión superficial se evaluó utilizando un surfactometro de burbuja cautiva (CBS) controlado por un ordenador según lo descrito por Shoel y col. (11). Los ensayos de inhibición fueron realizados siguiendo la metodología de López-Rodríguez y col. 2012 (6).

**III-MODELO FARMACOLÓGICO *IN VITRO* CON CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGRE HUMANA (PMBC) RETADAS CON *S. AUREUS*:** Se realizó el aislamiento de las células mononucleadas a partir de sangre humana por el método del gradiente con Ficoll, las cuales fueron estimuladas con *S. aureus* y pre incubadas con Surfacen®. La determinación de citoquinas (TNF $\alpha$  e IL-6) se realizó por el método de ELISA según instrucciones del fabricante.

**IV-MODELO FARMACOLÓGICO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS CON *LEISHMANIA AMAZONENSIS*:** Se determinó la actividad antileishmanial del Surfacen<sup>®</sup> al tratar cultivos *in vitro* de amastigotes intracelulares en macrófagos peritoneales de ratón BALB/c previamente infectados con *L. amazonensis*, por un método colorimétrico utilizando una sal de tetrazolio (MTT) (12). En paralelo, se determinó la citotoxicidad de ambos productos frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c sin infectar, mediante el mismo método.

#### **V-ESTUDIO VEHICULIZADOR DE FARMACOS**

Los ensayos de la evaluación del efecto de los medicamentos (NAC, HCORT y AMIK) en la propiedad interfásica de Surfacen<sup>®</sup> (cinéticas de *spreading*), se realizaron en la balanza de Langmuir. Surfacen<sup>®</sup> y las diferentes mezclas aplicaron en la interfase y fueron registrados los cambios en la presión superficial ( $\pi$ ) del material de superficie activa en función del tiempo

**VI-ESTADÍSTICA:** **II**-Los datos representan la media  $\pm$  DE después de promediar los datos de tres experimentos independientes, experimentos de compresión-expansión en CBS se ilustran como isothermas representativas de cada material surfactante. **III**-El análisis estadístico fue realizado usando en software SPSS 21.0. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  EEM y analizado con un ANOVA simple y el ensayo post hoc LSD. Un valor de probabilidad de  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. **IV**- Los datos fueron procesados por el paquete estadístico STATGRAPHICS Versión 3.1 para WINDOWS por una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) y expresados como la media  $\pm$  DE. Diferencias significativas fueron consideradas para  $p < 0.05$ . **V**- El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS 21.0. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  DE y analizados por un ANOVA simple (one way) con un análisis LSD post doc. Un valor de probabilidad de  $p \leq 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

### **III. RESULTADOS**

#### **Inhibición de Surfacen por suero y por meconio y su reversión con ácido hialurónico**

La figura 1 ilustra como Surfacen en ausencia de suero reduce rápidamente la tensión superficial ( $t_s$ ) a  $24,4 \pm 1,4$  mN/m a los 5 min en la adsorción inicial y después de expandir la burbuja. Cuando Surfacen fue aplicado alrededor de la capa de suero que cubre la interfase, no ocurrió adsorción ya que la tensión superficial fue de  $43,2 \pm 2,3$  mN/m, igual a la del suero. Después de la expansión, la  $t_s$  no cambia, indicando que Surfacen no fue capaz de competir eficientemente con los componentes del suero para lograr la interfase. En contraste la aplicación de Surfacen pre-mezclado con HA restablece la habilidad del surfactante de lograr la interfase y disminuir la ( $t_s$ ) a valores de  $25,6 \pm 0,6$  mN/m aun en presencia de suero.

En relación a las isothermas de compresión-expansión, en ausencia de suero, las isothermas cíclicas de Surfacen exhiben un comportamiento óptimo, al final del 4<sup>to</sup> ciclo la  $t_s$  fue de  $3,0 \pm 0,8$  mN/m con una reducción del área de 20 %. En los ciclos dinámicos Surfacen mostró una función normal en ausencia de suero, con una  $t_s$  de  $3,1 \pm 0,7$  mN/m. Cuando Surfacen fue aplicado alrededor de la capa de suero que cubre la interfase, no fue capaz de disminuir la  $t_s$  por debajo de  $20,6 \pm 1,6$  mN/m (Q-estático) y  $13,9 \pm 5,8$  mN/m (dinámicos ciclos) aun después de una reducción del área de más de un 50%. Sin embargo la aplicación de Surfacen pre-mezclado con HA es capaz de restablecer la habilidad de Surfacen de obtener una  $t_s$  mínima en los ciclos cuasi-estático y dinámicos.

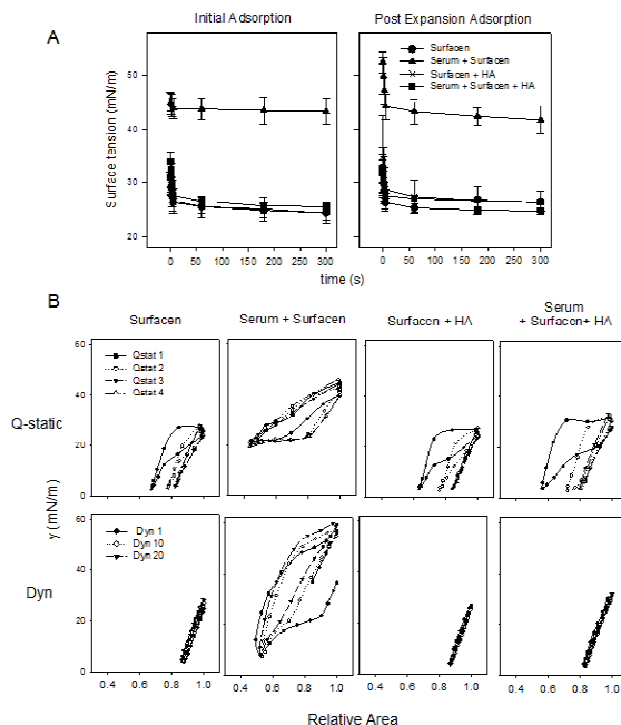


Fig. 1 Inhibición de Surfacten por suero y su reversión con ácido hialurónico (HA): (A) Adsorción interfacial (B) Isotermas cíclicas de compresión-expansión en ausencia y presencia de suero

La figura 2 muestra como Surfacten expuesto a meconio se adsorbe tan rápido como Surfacten solo, sin embargo se obtiene una  $t_s$  mayor  $33,5 \pm 9,4$  mN/m. Re-adsorción del exceso de material en la expansión de la burbuja muestra resultados similares, aunque la variabilidad entre las muestras es mayor, debido probablemente a la naturaleza heterogénea del meconio. Las isotermas cíclicas de Surfacten expuestas a meconio exhiben alta variabilidad y no son reproducibles. Tres experimentos representativos de tal comportamiento son representados en los ciclos cuasi-estático y dinámicos. En los ciclos cuasi-estático la histéresis fue pequeña pero se necesita mucha mayor compresión del área en algunos experimentos para obtener una  $t_s$  mínima de 19,6 mN/m. Sin embargo no efectos del meconio fue observado en otros experimentos donde la pre-exposición a meconio aun mantiene la habilidad para obtener una baja  $t_s$ , sin embargo se requiere una compresión del área mayor y exhibe mayor histéresis en ambos ciclos. En el caso de las isotermas obtenidas con Surfacten/HA expuesto a meconio restablece el comportamiento de Surfacten.

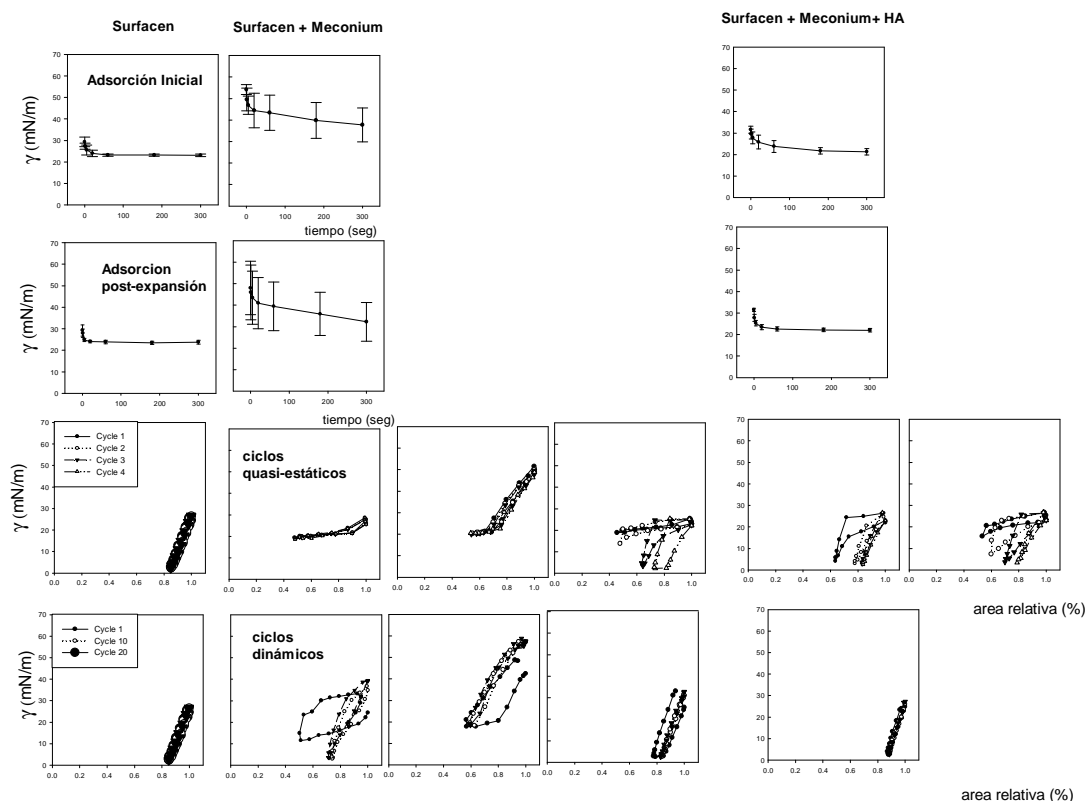


Fig. 2 Inhibición de Surfacen por meconio y su reversión con ácido hialuronico (HA): (A) Adsorción interfacial (B) Iso-  
termas cíclicas de compresión-expansión en ausencia y presencia de meconio

### Efecto de Surfacen® sobre TNF- $\alpha$ e IL-6 en PMBC estimulado con *S. aureus*:

La figura 3 muestra una supresión dosis-dependiente de la liberación de TNF- $\alpha$  se observó cuando las PBMCs fueron pre-incubadas con diferentes concentraciones de Surfacen® y retadas con *S. aureus* por 4h. Los niveles de TNF- $\alpha$  disminuyeron hasta un 60 % en células inducidas con *S. aureus* cuando fueron incubadas con Surfacen® por 4 h. Cuando las células fueron incubadas por 24 h, la reducción de los niveles de TNF- $\alpha$  fue menos marcada, con una disminución significativa solamente a las mayores concentraciones de Surfacen®. Se observó una disminución de IL-6 dosis-dependiente después de las 4h de estimulación con *S. aureus* cuando las PBMCs fueron preincubadas con Surfacen®. Cuando las células fueron estimuladas por 4h, Surfacen® a la concentración de 0,5 mg/mL es capaz de lograr una inhibición de alrededor de un 40 % de la IL-6 inducida por *S. aureus*.

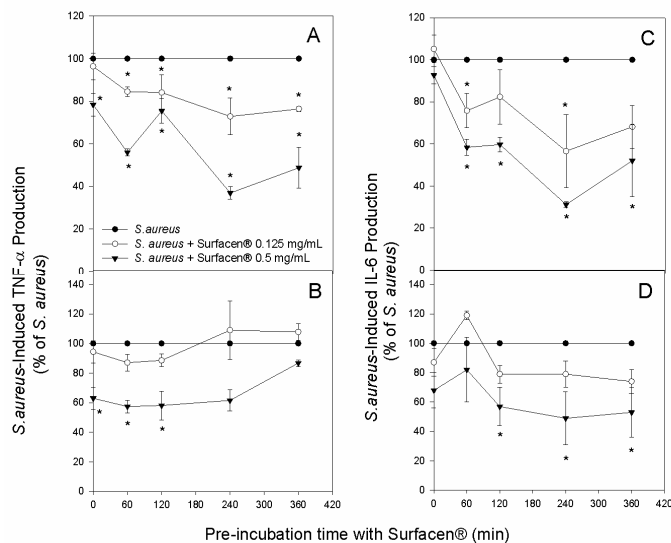


Fig. 3 Modulación de la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 por Surfacen<sup>®</sup> en células mononucleadas de la sangre (PBMC) inducido por *S. aureus*

### Efecto anti-patogénico

La figura 4 mostró que Surfacen<sup>®</sup> presentó actividad contra la forma amastigote de *Leishmania amazonensis*, inhibiendo el porcentaje de macrófagos infectados y el número promedio de amastigote por macrófagos. La concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) fue de  $17,9 \pm 3,0$   $\mu$ g/mL, sin encontrarse efecto tóxico. Surfacen<sup>®</sup> mostró una actividad similar a medicamentos de primera línea empleados para esta enfermedad, tal como el Glucantime.

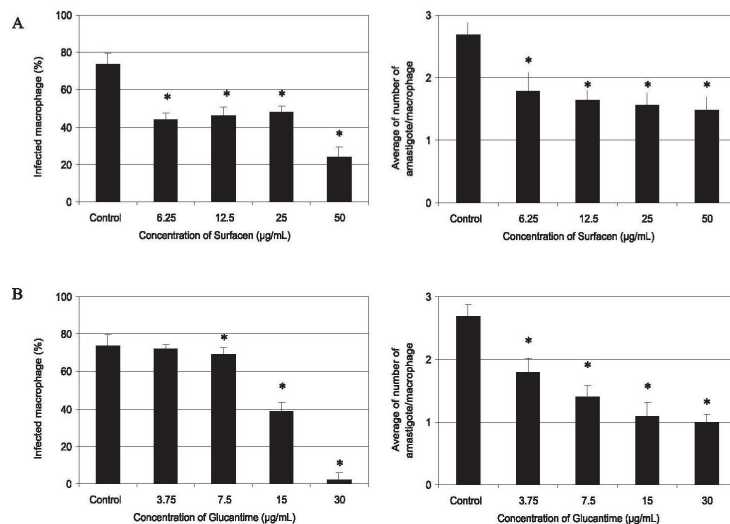


Fig. 4 Porcentaje de macrófagos infectados y número promedio de amastigotes en macrófagos peritoneales infectados con *L. amazonensis*

### Surfacen como vehiculizador de fármacos

La figura 5 muestra la cinética de *spreading*, medida a través los cambios en la presión de superficie ( $\pi$ ) en el tiempo, en la interfase de una balanza de Wilhelmy a 37°C, para Surfacen® y la combinación de Surfacen® con tres medicamentos, un antioxidante como la N-acetilcisteína, un anti-inflamatorio como la hidrocortisona y un antibiótico como la amikacina. La adición de los diferentes fármacos a Surfacen® no afecta su cinética de *spreading*. Los fármacos, por si solos no presentan ningún comportamiento interfasial.

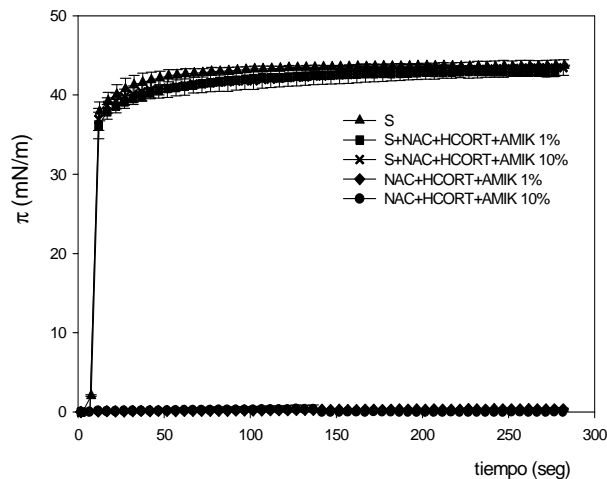


Fig. 5 Cinéticas de *spreading* de Surfacen® (S) antes y después de la adición de los tres medicamentos (NAC: N-acetilcisteína, HCORT: hidrocortisona y AMIK: amikacina) al 1 y 10% con relación a la concentración de fosfolípidos.

#### IV. CONCLUSIONES

Surfacen es fuertemente inhibido por meconio y por el suero cuando se evaluó en el surfactómetro de burbuja cautiva bajo condiciones que simulan la dinámica respiratoria. Sin embargo Surfacen es marcadamente protegido de esta inhibición cuando se pre-expone al polímero ácido hialurónico. Esto confirma que los surfactantes clínicos pueden ser optimizados para tratar patologías asociadas a un contexto de desactivación.

Los resultados sustentan por primera vez el efecto anti-inflamatorio de Surfacen frente a un patógeno que permanece como la causa principal de infecciones humanas, con especial relevancia en el tracto respiratorio bajo.

Se logra el primer reporte internacional de la actividad antileishmanial de Surfacen; esto sugiere la exploración de estos productos en el diseño de nuevas formulaciones contra *leishmania*.

Se brindan evidencias de la combinación de Surfacen con medicamentos frecuentes utilizados en la clínica en enfermedades respiratorias; no afecta sus propiedades biofísicas.

## REFERENCIAS

- 1-**J. Perez-Gil, T.E. Weaver, Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions, *Physiology (Bethesda)* 25 (2010) 132–141
- 2-**Dushianthan A, Grocott MP, Postle AD, Cusack R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgraduate medical journal*. 2011;87(1031):612-22.
- 3-**Lopez-Rodriguez E, Perez-Gil J. Structure-function relationships in pulmonary surfactant membranes: from biophysics to therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(6):1568-85
- 4-**Bersani
- 5-**Lopez-Rodriguez E, Ospina OL, Echaide M, Taeusch HW, Perez-Gil J. Exposure to polymers reverses inhibition of pulmonary surfactant by serum, meconium, or cholesterol in the captive bubble surfactometer. *Biophys J*. 2012;103(7):1451-9.
- 6-**Zuo YY, Veldhuizen RA, Neumann AW, Petersen NO, Possmayer F. Current perspectives in pulmonary surfactant--inhibition, enhancement and evaluation. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(10):1947-77
- 7-**Wiedemann JR, Saugstad AM, Barnes-Powell L, Duran K. Meconium aspiration syndrome. *Neonatal Netw*. 2008;27(2):81-7.
- 8-**Kaser, M. R. and G. G. Skouteris (1997). "Inhibition of Bacterial Growth by Synthetic SP-B< sub>1-78</sub> Peptides." *Peptides* **18**(9): 1441-1444
- 9-**Perez-Cordero, J. J., J. M. Lozano, et al. (2011). "Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells." *Peptides*
- 10-**Yeh TF, Lin HC, Chang CH, Wu TS, Su BH, Li TC, et al. Early intratracheal instillation of budesonide using surfactant as a vehicle to prevent chronic lung disease in preterm infants: a pilot study. *Pediatrics*. 2008;121(5):e1310-8
- 11-**W.M. Schoel, S. Schurch, J. Goerke, The captive bubble method for the evaluation of pulmonary surfactant: surface tension, area, and volume calculations, *Biochim. Biophys. Acta* 1200 (1994) 281–290.
- 12-**Sladowski, D., S. J. Steer, et al. (1993). "An improved MIT assay." *Journal of immunological methods* **157**(1-2): 203-207