

# SURFACEN® inhibe el crecimiento de bacterias causantes de infecciones respiratorias

✉ Odalys Blanco, Yamilka Riverón, Elizabeth de Armas, Janet Sánchez, Roberto Faure, Octavio Fernández

Grupo de Química-Farmacología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA  
San José de Las Lajas, CP 32 700, La Habana, Cuba  
Fax: 047 98104; E-mail: oblanco@censa.edu.cu

## RESUMEN

Una preparación farmacéutica de surfactante pulmonar exógena, SURFACEN®, se evaluó en relación con el crecimiento *in vitro* de agentes patógenos involucrados en enfermedades pulmonares. SURFACEN®, a las concentraciones de 1, 10 y 20 mg/mL, se incubó con *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en solución salina durante 5 h a 37 °C. En presencia del SURFACEN® se observó una disminución de las unidades formadoras de colonias en las concentraciones evaluadas. A partir de la concentración de 10 mg/mL se observó una reducción de un logaritmo del crecimiento bacteriano, en todos los tipos de bacterias ensayadas. SURFACEN® mostró un efecto antibacteriano en bacterias grampositivas y gramnegativas causantes de enfermedades respiratorias.

**Palabras claves:** surfactante pulmonar, SURFACEN®, antibacteriano, bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, neumonía, sepsis, Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo

*Biotecnología Aplicada 2005;22:279-281*

INVESTIGACIÓN

## ABSTRACT

**SURFACEN® is able to inhibit bacterial growth causing respiratory infections.** One pharmaceutical preparation of exogenous lung surfactant, SURFACEN®, was tested *in vitro* on growth of pathogens involved in lung disease. SURFACEN® at concentration of 1, 10 and 20 mg/mL was incubated with *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in saline solution by 5 h at 37 °C. In the presence of SURFACEN® it was observed a decrease of colony forming units in all evaluated concentrations and from 10 mg/mL a reduction of one logarithm of bacterial growth in all types of bacteria tested was observed. SURFACEN® showing antibacterial effect on grampositive and gramnegative bacteria causing lung disease.

**Key words:** pulmonary surfactant, SURFACEN®, antibacterial, grampositive bacteria, gramnegative bacteria, pneumonia, Acute Respiratory Distress Syndrome

## Introducción

El surfactante pulmonar endógeno es una mezcla de fosfolípidos y proteínas específicas (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D). La principal función del surfactante es disminuir la tensión superficial en la interfase aire-líquido en los alvéolos pulmonares, y así reducir el trabajo de la respiración y mantener la estabilidad del pulmón al evitar el colapso alveolar [1]. Además de su función tensoactiva, esta sustancia realiza una función de defensa en el pulmón [2].

En los años 80 del siglo XX, la aplicación terapéutica de un surfactante pulmonar natural de origen bovino, cuyo nombre comercial es SURFACTANT TA®, a neonatos con Síndrome de Distrés Respiratorio (SDRN) evidenció resultados satisfactorios [3]. Además del SURFACTANT TA®, existen cinco surfactantes naturales exógenos, obtenidos de fuente bovina o porcina, producidos comercialmente por compañías farmacéuticas, estos son: SURVANTA® (cuya variante japonesa es el SURFACTANT TA®) (Abbot Ltd., Laboratorios Ross, Estados Unidos), ALVEOFAC® (Boehringer Ingelheim, Alemania), CUSURF® (Chiesi Pharmaceuticals, Italia), INFASURE® (Laboratorios Forest, Estados Unidos) y BLES® (BLES Biochem, Canadá); a estos pocos se suma SURFACEN®, desarrollado en Cuba (CENSA) [4]. Generalmente, la composición bioquímica de estos surfactantes se caracteriza por la presencia de un

alto contenido en fosfolípidos, en particular de la fosfatidilcolina y su especie saturada con ácido palmítico, la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). También 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 [1].

La disfunción del surfactante se ha descrito para enfermedades pulmonares, tales como neumonías y Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA) causado por sepsis [5]. Existen pocos trabajos relacionados con la influencia directa del surfactante pulmonar, así como de sus preparaciones farmacéuticas comerciales, sobre el crecimiento bacteriano y estos han sido divergentes [6, 7]. En este sentido, no se ha estudiado si SURFACEN® posee esta propiedad. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto del producto SURFACEN® en el crecimiento *in vitro* de bacterias causantes de infecciones respiratorias.

## Materiales y métodos

La preparación farmacéutica SURFACEN®, es un surfactante natural, obtenido a partir de lavado pulmonar porcino. Se presenta en forma de un liofilizado estéril de color blanco, cada bulbo contiene 50 mg de fosfolípidos, 0.3 a 0.7 mg de proteínas hidrofóbicas

1. Creuwels LAJM, Van Golde LMG, Haagsman HP. The pulmonary surfactant system: biochemical and clinical aspects (Review). *Lung* 1997;175:1-39.

2. Wright JR. Immunomodulatory Functions of Surfactant. *Physiol Rev* 1997;77: 931-62.

3. Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet* 1980;1:55-9.

4. Blanco O. Propiedades antiinflamatorias del surfactante pulmonar y su aplicación en la clínica. *Biotecnología Aplicada* 2004;21:70-6.

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

6. Neumeister B, Woerndle S, Bartmann P. Effects of different surfactant preparations on bacterial growth *in vitro*. *Biol Neonate* 1996;70:128-34.

7. Rauprich P, Möller O, Walter G, Herting E, Robertson B. Influence of modified natural or synthetic surfactant preparations on growth of bacteria causing infections in the neonatal period. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2000;7:817-22.

y 2.03 a 3.03 mg de otros lípidos [8]. Se obtiene y suministra en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Los microorganismos empleados fueron *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Las cepas se cultivaron en un medio agar sangre, incubadas a 37 °C durante 24 h y liofilizadas a 4 °C. A las cepas se les realizaron las pruebas bioquímicas mediante el sistema API (*analytical prolife index*, bioMérieux, Francia) para su identificación. Las cepas se diluyeron en solución de NaCl al 0.9% y se llevaron a  $3 \times 10^8$  UFC/mL según la escala Mac Farland. La concentración del inóculo se controló al realizar diluciones decimales seriadas 1:10 y sembrar 0.1 mL de las diluciones  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  en dos placas de agar que contenían triptonsoya (TSA), que se diseminaron con la ayuda de varillas L. Las placas se invirtieron e incubaron a 37 °C durante 24 h. Todos los inóculos se utilizaron dentro de la primera hora de preparados y se consideraron válidos los conteos entre 20 y 200 UFC/mL [9]. Para la determinación del crecimiento bacteriano por el método de suspensión cuantitativa por dilución y conteo, se utilizaron los tubos que contenían solución de NaCl al 0.9%, suspensión de bacteria en solución salina y SURFACEN® disuelto en agua (1, 10 y 20 mg/mL), se agitaron en zaranda horizontal a 90 r.min<sup>-1</sup> durante 5 h a 37 °C [7]. Se tomó una alícuota de 100 µL de cada tubo, se realizaron diluciones seriadas en solución salina 1/10 (hasta  $10^6$ ), y se sembró en placas de agar sangre. Después de 24 h de incubación a 37 °C, se contaron las colonias y las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), a partir del conteo de colonias y la dilución respectiva. Se realizaron tres determinaciones independientes. Como el crecimiento bacteriano es logarítmico, se calculó el logaritmo de las unidades formadoras de colonias ( $\log_{10}$ UFC/mL). Los valores se expresaron como la reducción del crecimiento bacteriano (RCB), es decir,  $RCB = \log_{10}C - \log_{10}S$ , donde C: UFC del control y S: UFC en presencia de SURFACEN®. Se consideró efecto antibacteriano a partir de la reducción en un logaritmo del crecimiento microbiano indicado por valores mayores o iguales que 1 [10]. En el análisis estadístico, los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) de tres determinaciones independientes. Los datos se evaluaron estadísticamente por análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Duncan, mediante el programa SAS, versión 8.02 TS nivel 02MO (1999-2001). Las diferencias estadísticas se consideraron cuando  $p < 0.05$ .

## Resultados y discusión

La incubación de SURFACEN® durante 5 h con las bacterias grampositivas: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* resultó en una disminución de las unidades formadoras de colonias, expresada como un aumento en la reducción del crecimiento microbiano (Figura 1). Existe una tendencia dosis-efecto con el *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pneumoniae*, y dosis-dependiente con el *Staphylococcus aureus*. A las

concentraciones de 10 y 20 mg/mL se observó una disminución del crecimiento por encima de la reducción de un logaritmo, indicado por valores mayores o iguales que 1. Asimismo, la incubación de SURFACEN® con bacterias gramnegativas: *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* resultó en una disminución en las unidades formadoras de colonias dosis-dependientes expresado como un aumento en la reducción del crecimiento microbiano (Figura 1B). De esta forma se logra una reducción en un logaritmo del crecimiento microbiano a partir de la concentración de 10 mg/mL. Para los microorganismos evaluados en ausencia de SURFACEN®, se obtuvo el máximo del crecimiento (datos no mostrados).

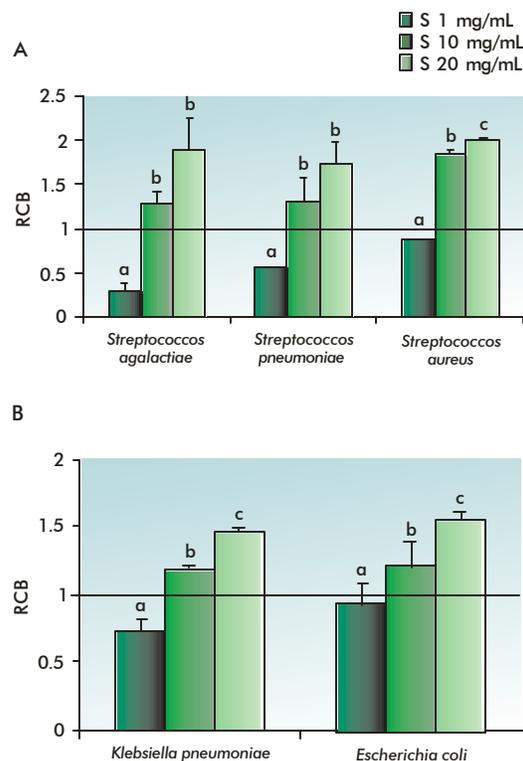


Figura 1. Efecto del producto SURFACEN® en el crecimiento de bacterias grampositivas (A) y gramnegativas (B). Los datos están expresados como la media  $\pm$  el EEM de la reducción del crecimiento bacteriano (RCB). Se consideró el efecto antibacteriano a partir de la reducción en un logaritmo del crecimiento microbiano indicado por valores mayores o iguales que 1. Letras diferentes indican diferencias significativas  $p < 0.05$ .

La primera evidencia de actividad antibacteriana del surfactante pulmonar procede de los resultados obtenidos con una fracción de surfactante de lavado de rata, la cual causó lisis del *Streptococcus pneumoniae* y de otras bacterias grampositivas, tales como *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus bovis*, efecto que se le atribuyó a los ácidos grasos libres presentes en ella [11]. Conejos infectados con *Streptococcus grupo B*, tratados con CUROSURF®, manifestaron una disminución de la proliferación bacteriana en homogenado de pulmón [12]. También se informó que el tratamiento con este mismo surfactante a ratas con neumonía causada por *Escherichia coli* provocó una mejora en la función

8. Manzanares D, Díaz E, Alfonso W, Escobar A, Colomé H, Muñoz MC, Noa M, Rabell S, Hidalgo A. Surfactante pulmonar porcino. 1995. República de Cuba, A 61 K 35-42.

9. Daguet, GL, Chabbert, VA. Técnicas en Bacteriología. Editorial JIMS 1977;3: 135-53.

10. Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ (editor). Desinfection, preservation and sterilization. Ed. Blackwell Scientific Publication: Oxford England 1982; Part 1.p. -262.

11. Coonrod JD, Yoned K. Detection and partial characterization of antibacterial factors in alveolar lining material of rats. J Clin Investig 1983;71:129-41.

respiratoria [13]. La presencia de péptidos bactericidas en el pulmón, tales como  $\beta$ -defensinas y catelicidinas (ejemplo LL 37) contribuye a las funciones de defensa en el pulmón [14]. En este sentido, se ha informado la presencia de péptidos antibacterianos en el surfactante pulmonar endógeno bovino [15]. Asimismo, en tejido pulmonar porcino y en la preparación comercial CUROSURF® se demostró la presencia del péptido catelicidina, nombrado profenina, por su alto contenido en los aminoácidos prolina y fenilalanina, y un fragmento de 18 aminoácidos a partir del C-terminal de este, denominado PF-18 [16, 17].

La contribución de algunos de los componentes del surfactante a esta actividad se ha estudiado. La proteína hidrofóbica SP-B presentó 68% de homología secuencial con el péptido antibiótico dermaseptina bI e inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* [18]. A su vez, recientemente se ha informado que los fosfolípidos, en particular la DPPC, actúan como inhibidor de la exotoxina producida por el *Streptococcus* del grupo A y del B, pertenecientes a la familia de los  $\beta$  hemolíticos [19].

Se han informado diferencias en la composición bioquímica de las preparaciones comerciales de surfactantes [20, 21] lo que influye decisivamente en

sus propiedades. Resultados en el comportamiento de tres preparaciones de surfactante (ALVEOFACT®, SURVANTA® y EXOSURF®) sobre el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae*, demuestran que SURVANTA® induce el crecimiento de *Escherichia coli* [6]. En estudios recientes se evaluó el efecto de diferentes preparaciones de surfactantes naturales exógenos (SURVANTA®, CUROSURF®, ALVEOFACT®) y dos sintéticas (EXOSURF® y PUMACTANT®) en el crecimiento de *Streptococcus* grupo B, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados mostraron que solo CUROSURF® inhibió el crecimiento de *Streptococcus* grupo B. Este efecto no se observa para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Ninguno de los surfactantes inhibió el crecimiento de *Escherichia coli*, y en el caso de SURVANTA®, lo aumentó [7]. Por otra parte, se ha informado que CUROSURF® posee un efecto antibacteriano frente a *Streptococcus* grupo B y *Escherichia coli* y, a su vez, dan lugar a la peroxidación del surfactante, debido a las especies reactivas liberadas por estas bacterias [22].

Los resultados muestran el primer informe del efecto antibacteriano de la preparación farmacéutica comercial SURFACEN® sobre microorganismos gramnegativos y grampositivos.

12. Herting EC, Jarstrand O, Rasool T, Curstedt B, Robertson B. Experimental neonatal group B streptococcal pneumonia: effect of a modified porcine surfactant on bacterial proliferation in ventilated near-term rabbits. *Pediatr Res* 1994;36:784-91.

13. Song GW, Robertson B, Curstedt T, Gan XZ, Huang WX. Surfactant treatment in experimental *Escherichia coli* pneumonia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1996; 40:1152-9.

14. Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev* 2000; 173:39-51.

15. Brogden KA, De Lucca AJ, Bland J, Elliot S. Isolation of a bovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for

*Pasteurella haemolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:412-6.

16. Harwig SSL, Kokryakov VN, Swiderek KM, Aleshina GM, Zhao C, Lehrer RI. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Lett* 1995;362:65-9.

17. Wang Y, Griffiths WJ, Curstedt T, Johanson J. Porcine pulmonary surfactant preparations contain the antibacterial peptide prophenin and a C-terminal 18-residue fragment thereof. *FEBS Lett* 1999;460:257-62.

18. Kaser MR, Skouters GG. Inhibition of bacterial growth by synthetic SP-B1-78 peptides. *Peptides* 1997;18:1441-4.

19. Nizet V. Streptococcal  $\beta$ -hemolysis: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends in Microbiology* 2002;10:575-80.

20. Bernhard W, Mottaghian J, Gebert A, Rau G, Von der Hardt H, Poets Ch. Commercial versus native surfactants surface activity, molecular components, and the effect of calcium. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1524-33.

21. Rüdiger M, Tolle A, Meir W, Rüstow B. Naturally derived commercial surfactants differ in composition of surfactant lipids and in surface viscosity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L379-L83.

22. Bouhafs RK, Jarstrand C. Lipid peroxidation of lung surfactant by bacteria. *Lung* 1999;177:101-10.

Recibido en agosto de 2005. Aprobado en octubre de 2005.