

Comunicación corta

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DEL SURFACTANTE PULMONAR DE CERDOS JÓVENES

Danay González*, María del C. Travieso**, Wilma Alfonso* y Elaine Díaz*

*Dirección de Producciones Biofarmacéuticas, ** Dirección de Calidad, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: danayg@censa.edu.cu

RESUMEN: La búsqueda de surfactantes exógenos constituye actualmente una prioridad debido a la alta morbilidad y letalidad del Síndrome del Dificultad Respiratoria del Recién Nacido y a la alta eficacia demostrada por la terapia de reemplazo con estos productos, fundamentalmente, los de origen natural. Teniendo en cuenta que la composición y función del surfactante pulmonar difiere entre los vertebrados en dependencia de la anatomía pulmonar, fisiología respiratoria y que la calidad de este varía con la edad de los animales, en el presente trabajo abordamos una caracterización bioquímica y biofísica general del surfactante pulmonar de origen porcino obtenido de animales jóvenes, con vistas a evaluar su calidad. Los resultados permiten afirmar que el surfactante pulmonar procedente de animales jóvenes reúne las características bioquímicas generales similares al resto de los naturales heterólogos empleados en la clínica, como son un alto contenido de fosfatidilcolina, específicamente su fracción disaturada (DPPC), bajos niveles de lisofosfatidilcolina, niveles de proteínas adecuados, que permitieron demostrar su excelente actividad biofísica.

(Palabras clave: surfactante pulmonar; cerdos jóvenes; composición bioquímica; actividad surfactante)

PRELIMINARY STUDY OF THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF LUNG SURFACTANT FROM YOUNG PIGS

ABSTRACT: The search of exogenous surfactants constitutes currently a priority due to the high morbidity and lethality of the Neonatal Respiratory Distress Syndrome (NRDS) and the high effectiveness demonstrated by the replacement therapy with these products mainly those from natural origin. Taking in mind that composition and function of the natural lung surfactant differ among vertebrates depending on the pulmonary anatomy and respiratory physiology and that its quality varies with the age of the animals, in the present work a biochemical and biophysical characterization of a pig lung surfactant from young and adult animals was studied in order to evaluate the quality of these surfactants. The results showed that the lung surfactant from young animals has the general biochemical characteristics similar to the rest of the natural lung surfactant used in the clinic practice. Such characteristics are high levels of dipalmitoylphosphatidylcholine, low levels of lysophosphatidylcholine, and adapted protein levels to allow its excellent biophysical activity.

(Key words: lung surfactant; young pigs, biochemical composition, surfactant activity)

Los surfactantes pulmonares de origen natural son actualmente considerados como de primera elección para la terapia del síndrome de dificultad respiratoria del recién nacido (SDRN), debido a las ventajas que

ofrecen (8). Existen datos que corroboran que estos producen mejoría más rápida de la oxigenación en comparación con los sintéticos. También se ha observado menores tasas de complicaciones y de mor-

talidad con el empleo de surfactantes naturales, los que tienen un efecto inmediato, por contener proteínas específicas que favorecen su adsorción alveolar (13).

Sin embargo, el uso de surfactantes naturales se ve afectado por la limitada disponibilidad de las fuentes de materias primas (pulmones sanos) de diferentes especies. Generalmente se utilizan los pulmones provenientes de animales adultos por la factibilidad económica que representa. Aunque la composición de estos surfactantes naturales ha sido estudiada (2, 7) es necesario la búsqueda de otras fuentes alternativas de esta materia prima, de ahí que el objetivo de este trabajo sea evaluar la composición bioquímica del surfactante de una masa de cerdos jóvenes para conocer el comportamiento de los indicadores bioquímicos y biofísicos de forma comparativa con otros surfactantes de origen porcino (Curosurf) y bovino (Survanta), obtenidos ambos de animales adultos.

El estudio se realizó utilizando cerdos jóvenes sanos de 25 ± 5 Kg de peso (11) y cerdos adultos sanos de más de 80 Kg de peso de la misma raza (F1 Yorlan). El surfactante pulmonar (SP) fue obtenido mediante lavado broncoalveolar con solución salina (0,9 %), extracciones con cloroformo: metanol (2:1) y posterior etapa de purificación mediante precipitación con acetona para obtener extractos purificados de surfactante, que fueron liofilizados para garantizar su conservación (3). Se realizaron tres corridas experimentales para el caso de los cerdos jóvenes y seis para cerdos adultos.

El surfactante obtenido se caracterizó bioquímica y biofísicamente evaluándose la concentración de pro-

teínas (9), de fosfolípidos totales (17) y de fosfolípidos específicos como la fosfatidilcolina (PC) y su fracción disaturada, la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (10), que constituye el principio activo responsable de la actividad tensoactiva y la lisofosfatidilcolina (LPC) como producto de la degradación fundamental que debe encontrarse en pequeñas cantidades por demostrar efectos tóxicos a nivel pulmonar e inhibir la actividad del surfactante (6). Los fosfolípidos fueron separados por TLC (15) e identificados contra patrones de la SIGMA y cuantificados según Bartlett (1). La actividad tensoactiva se evaluó mediante el método biofísico empleando el surfactómetro de burbuja pulsátil (PBS Electronics Corporation) (5). Las corridas experimentales de una misma variante fueron comparadas mediante la prueba de Wilcoxon (test no paramétrico para muestras dependientes) y los indicadores bioquímicos de cada variante (cerdos jóvenes y cerdos adultos) fueron comparados utilizando el método Kruskal – Wallis (test no paramétrico para muestras independientes).

Los resultados muestran (Tabla 1) la composición bioquímica de los surfactantes obtenidos por las dos variantes (cerdos jóvenes y adultos), evidenciando que ambas preparaciones cumplen con la concentración de DPPC (> 40 %), PC (> 50 %), LPC (< 2%) y proteínas (< 2%) que están demostrados, en estudios anteriores, y son necesarios para presentar una buena actividad surfactante (4) Igualmente ambas preparaciones presentaron una excelente actividad biofísica, dada por la disminución de la tensión superficial mínima a valores muy por debajo a lo descrito por Halliday (8) como requisito para considerar a una preparación como un buen surfactante pulmonar (< 10 mN/m).

TABLA 1. Caracterización bioquímica y actividad biofísica de los surfactantes pulmonares./ *Biochemical characterization and biophysical activity of lung surfactants*

INDICADORES	SP CERDOS JÓVENES (N=3)	SP CERDOS ADULTOS (N=6)	CUROSURF (14)	SURVANTA (14)
PC/ PL totales (%)	71,67 - 76,35	65,00- 76,91	67- 74	79-87
LPC/ PL totales (%)	0,91-1,19	0,45- 1,25	6,9	2,2
DPPC/PL totales (%)	48,84 - 56,98	45,78- 54,02	50 - 56*	45-74*
Proteínas/ PL totales (%)	1,05 - 1,91	0,9- 1,3	1	0,5- 2,5
Actividad biofísica (tensión superficial mínima, mN/m)	0,1- 2,3	< 3	1,3	0,4

PL totales: Concentración de fosfolípidos totales

LPC/ PL totales: Concentración relativa de lisofosfatidilcolina con respecto a fosfolípidos totales

PC/PL totales: Concentración relativa de fosfatidilcolina con respecto a fosfolípidos totales

DPPC/ PL totales: Concentración relativa de dipalmitoilfosfatidilcolina con respecto a fosfolípidos totales

*: Valores calculados a partir de los datos de DPPC con respecto a PC

Datos de Curosurf y Survanta tomados de Taeusch *et al.* (14)

El análisis estadístico de los resultados mostró que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las corridas experimentales de una misma variante, lo que demuestra la poca variabilidad entre estas. Igualmente quedó demostrada la similitud en los diferentes indicadores bioquímicos evaluados entre los surfactantes pulmonares obtenidos de animales jóvenes y adultos. No obstante, se requiere profundizar en la composición de otros fosfolípidos aniónicos como el fosfatidilinositol (PI) y el fosfatidilglicerol (PG) que contribuyen a las propiedades tensoactivas, a través de su interacción con las proteínas hidrófobas, porque en estudios recientes que compararon la calidad y composición del surfactante pulmonar obtenido de cerdos recién nacidos (23 ± 15 horas, 1.4 ± 0.3 kg) con cerdos adolescentes (11 ± 1 semana de edad, 34-36 kg) informaron una disminución significativa en la concentración de PI (de 7.2 a 2.8 Mol %) y un aumento considerable en la concentración de PG (de 2.7 a 9.2 Mol %) asociados a la edad (7), así como en otros componentes fosfolipídicos del sistema surfactante, en la composición de los ácidos grasos, colesterol, etc.

Como puede observarse (Tabla 1) los surfactantes obtenidos presentan cantidades de DPPC dentro del intervalo (35- 60%) reconocido por Van Golde *et al.* (16) que demuestran la concentración adecuada de este principio activo fundamental. Por otra parte, la concentración de lisofosfatidilcolina (LPC), producto de la degradación hidrolítica de la fosfatidilcolina, es tóxica a dosis superiores a los 10 mg/ Kg de peso, por lo que es un elemento poco deseado en las preparaciones de surfactantes pulmonares (6), se mantuvo por debajo de los límites permisibles en ambas preparaciones.

Estos resultados son comparables con los reportados para otros surfactantes naturales como Survanta y Curosurf que son productos exitosos en el mercado internacional, con resultados de ensayos clínicos controlados muy positivos en el tratamiento del SDRN y con más de 10 años en la práctica clínica (12, 14).

Con estos resultados se puede afirmar que el surfactante pulmonar obtenido de animales jóvenes reúne las características bioquímicas generales de los surfactantes naturales heterólogos empleados en la clínica, como son un alto contenido de fosfatidilcolina, específicamente su fracción disaturada (DPPC), bajas concentraciones de lisofosfatidilcolina y de proteínas. Este surfactante además demostró una excelente actividad biofísica.

REFERENCIAS

1. Bartlett, G.R. (1959): Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234: 466-468.
2. Bernhard, W.; Mottaghian, J.; Gebert, A.; Gunnar, A.R.; Horst, V.H.; Poets, C.F. (2000): Commercial versus native surfactants. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 162(4): 1524-1533.
3. Díaz, E.; Alfonso, W.; Barrios, M.; Correa, H. y Villanueva, G. (2001): Desarrollo del proceso de obtención del principio activo de un surfactante pulmonar natural. *Revista Cubana de Química.* Vol. XIII, núm. 2.
4. Díaz, E.; Alfonso, W.; Manzanares, D. y Villanueva, G. (2004): *Procedimiento para la obtención de surfactante pulmonar.* República de Cuba. A 61K 35/12, 35/42.
5. Fernández-Regalado, R.; Manzanares, D. y Veldhuizen, R. (1993). Aspectos biofísicos en la evaluación del surfactante natural Surfacen. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 12: 93-99.
6. Grossmann, G.; Tashiro K.; Kobayashi, T.; Suzuki, Y.; Matsumoto, Y.; Waseda, Y.; Akino, T.; Cursted, T. y Robertson, B. (1999): Experimental neonatal respiratory failure induced by lysophosphatidylcholine: effect of surfactant treatment. *J. Appl. Physiol.* 86(6): 633-40.
7. Gunnar, A.R.; Vieten, G.; Haitzma, J.J.; Freihorst, J.; Poets, C.F.; Benno, M.; Bernhard, W. (2004): Surfactant in Newborn compared with adolescent pigs. *American J. Resp. Cell. Molec. Biol.* 30: 694-701.
8. Halliday, H.L. (1996): Controversies: Synthetic or natural surfactant. The case for natural surfactant. *J. Perinat. Med.* 24: 417-426.
9. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265.
10. Mason, R.J.; Nellenbogen, J. y Clements, J.A. (1976): Isolation of disaturated phosphatidylcholine with osmium tetroxide. *J. Lipid Research.* 17: 281.

11. Perdigón, R.; Cabrera Y.; Mederos, C.M.; Muñiz, M.; Arias, T.; Vázquez, R.; Leal, M.; Acosta, M. y López, M. (2005): Tecnología para la producción de pulmones sanos y útiles de cerdo hasta la etapa de preceba. *Libro de Resúmenes Biotecnología Habana 2005*, pág. 92. ISBN 959-235-023-X.
12. Yapicio, lu H.; Yildizda, D.; Bayram, I.; Sertdemir, Y. and Yilmaz, H.L. (2003): The use of surfactant in children with acute respiratory distress syndrome: efficacy in terms of oxygenation, ventilation and mortality. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 16(6): 327-333.
13. Soll, R.F. (2002): Natural surfactant extract vs. synthetic surfactant in the treatment of established respiratory distress syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Issue 2.
14. Tausch, H.W.; Karen, L.U. y Daniela, R.S. (2002): Improving pulmonary surfactants. *Acta Pharmacol. Sin.* ISSN 1671-4083: 11-15.
15. Touchstone, J.C.; Chen, J.C.; y Beaver, K.M. (1980): Improved separation of phospholipids in thin layer chromatography. *Lipids*. 15: 61-62.
16. Van Golde, L.M.G.; Battenburg, J.J. y Robertson, B. (1988): The pulmonary surfactant system. Bioquimical aspect and functional significance. *Am. Physiol. Soc.* 68: 374-455.
17. Zilversmith, D.B. y Davis, B.S. (1950): Microdetermination of plasma phospholipids by trichloroacetic acid precipitation. *J. Lab. Clin. Med.* 35: 155.

(Recibido 30-1-2006; Aceptado 17-3-2006)



Su solicitud...

Dr.C. Jesús Rodríguez Diego
E.mail: jesus@censa.edu.cu

Maestrias en:

Reproducción Animal ■

Microbiología Veterinaria ■

Doctorados en:

Farmacología Veterinaria ■

Toxicología Veterinaria ■

Epizootiología ■

Reproducción Bovina ■

Patología Veterinaria ■

Virología Veterinaria ■

Inmunología Veterinaria ■

Bacteriología Veterinaria ■

Parasitología Veterinaria ■

Producción y Calidad de la leche ■