

COMUNICACIÓN CORTA

Efecto antibacteriano de Surfacen® y la proteína A del surfactante pulmonar frente a un aislado clínico de *Streptococcus pneumoniae*

Odalys Blanco Hidalgo^{I*}, Yuliannis Lugones Ladrón de Guevara^I, Yamilka Riverón Alemán^{II}, Amalia Núñez Drake^{II}, Gilda Toraño Peraza^{III}, Roberto Faure García^I

^IGrupo de Desarrollo Biofarmacéutico, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Mayabeque, Cuba.

^{II}Departamento de Calidad, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Mayabeque, Cuba.

^{III}Departamento de Microbiología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), La Habana, Cuba.

RESUMEN: Surfacen®, una preparación clínica de surfactante pulmonar exógeno, y la proteína A del surfactante pulmonar (SP-A), se evaluaron en relación a su efecto *in vitro* sobre el crecimiento de un aislado clínico de *Streptococcus pneumoniae*. La bacteria fue incubada en solución salina durante 5 h a 37°C junto a Surfacen® y la SP-A. Los resultados mostraron que Surfacen®, a las concentraciones de 10 y 25 mg/ml, logró una reducción de un logaritmo del crecimiento bacteriano; a su vez la SP-A porcina tuvo igual efecto a las concentraciones de 0,25; 0,5 y 1 mg/ml. La adición de SP-A porcina a la máxima concentración de Surfacen® (25 mg/ml) mostró una mayor actividad antibacteriana al reducir dos logaritmos del crecimiento bacteriano.

Palabra clave: surfactante pulmonar, Surfacen®, antibacteriano, proteína A del surfactante (SP-A), Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo.

Antibacterial effect of Surfacen and surfactant protein A (SP-A) against a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*

ABSTRACT: Surfacen®, a clinical preparation of exogenous pulmonary surfactant, and pulmonary surfactant protein A (SP-A) were evaluated in relation to their *in vitro* effect on the growth of a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. The bacterium was incubated in a normal saline solution for 5 h at 37°C, together with Surfacen® and SP-A. Surfacen® showed antibacterial activity against the clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* at 10 or 25 mg/ml with one logarithm of reduction of the bacterial growth; also SP-A had the same effect at concentrations of 0.25, 0.5 or 1 mg/ml. Porcine SP-A addition at the highest Surfacen® concentration (25 mg/ml) showed a higher antibacterial activity by reducing two logarithms of bacterial growth.

Key word: lung surfactant, Surfacen®, antibacterial, Surfactant Protein A (SP-A), Acute Respiratory Distress Syndrome.

El sistema surfactante pulmonar, contiene fosfolípidos y proteínas específicas que permiten la apertura estable de los espacios respiratorios pulmonares (1). Su falta o disfunción está asociada al desarrollo de patologías severas tales como el Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo (SDRA), neumonías,

etc (2). El sistema surfactante integra también componentes encargados de establecer una barrera de defensa innata que previene la entrada de patógenos a través de la superficie respiratoria, la mayor área de contacto del organismo con su entorno. Diversos estudios han revelado la capacidad antibiótica del

*Autor para la correspondencia: Dra. Odalys Blanco Hidalgo. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) Autopista Nacional y Carretera de Tapaste, San José de Las Lajas, Apartado 10, CP 32 700, Mayabeque, Cuba. Tel: 5347-863014. Fax: 5347-861104. E-mail: oblanco@censa.edu.cu y odalysbh@infomed.sld.cu.

surfactante y muy especialmente de algunas de sus proteínas (3). Esto abre la posibilidad de explotar la acción de surfactantes terapéuticos como fármacos antibióticos en el tratamiento de patologías respiratorias severas.

Surfacen ha mostrado un efecto antibacteriano en bacterias grampositivas y gramnegativas referenciadas (4); sin embargo, se desconoce su actividad frente a aislados clínicos de pacientes con enfermedades respiratorias. Por este motivo, es de vital importancia conocer el efecto de Surfacen® frente a bacterias que frecuentemente circulan en estas dolencias respiratorias, teniendo en cuenta que los microorganismos pudieran desarrollar adaptaciones moleculares capaces de incrementar los procesos que conllevan a la resistencia bacteriana. Ninguna de las preparaciones de surfactante clínicas (Curosurf® (Chiesi Farmaceuti, Pharma, Italy), Survanta® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), Alveofact® (Boehringer Ingelheim Co, Ingelheim, Germany), BLES® (BLES Biochemicals London, Ontario, Canada) y Infasurf® (Forest Pharmaceuticals, St. Louis, MO), contiene SP-A; esta proteína es eliminada durante el proceso de obtención de estos productos. Sin embargo, la SP-A al pertenecer a la familia de las colectinas está involucrada en importantes funciones de la defensa pulmonar, de manera tal que opsoniza, aumenta la fagocitosis y altera los mediadores de la respuesta inflamatoria en el pulmón (5). En este sentido, las propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas de la SP-A hacen de esta molécula un agente terapéutico potencialmente atractivo.

El objetivo del presente estudio fue conocer si Surfacen® posee actividad antibacteriana frente a un aislado clínico de *Streptococcus pneumoniae* y si dicho efecto es potenciado por la adición de la SP-A porcina. Además, se evaluó el efecto de los principales fosfolípidos, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y fosfatidilinositol (PI) frente a un aislado clínico de *Streptococcus pneumoniae*.

El Surfacen® es obtenido y producido por el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Mayabeque, Cuba. Los fosfolípidos, DPPC y PI fueron proporcionados por Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EEUU). La SP-A porcina fue aislada y purificada a partir de lavados pulmonares porcinos, según la metodología descrita por Suwabe *et al.* (6) y Blanco *et al.* (7).

El aislado de *Streptococcus pneumoniae* se obtuvo del pulmón de un paciente con neumonía, en el Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí», la Habana, Cuba. El aislado se cultivó en medio Agar sangre incubado a 37°C por 24 h, y conservado en forma de

lío-filizado a 4°C. Se identificó por pruebas bioquímicas mediante sistema API (Analytical Prolife Index, BioMérieux, Francia). El aislado se diluyó en solución de NaCl 0.9 % y se ajustó a una concentración equivalente a 3×10^8 UFC/ml, según la escala Mac Farland. La concentración del inóculo se confirmó realizando diluciones decimales seriadas 1:10 y se sembraron por diseminación, 0.1 ml de las diluciones -5, -6, -7, en dos placas de TSA. Las placas se invirtieron e incubaron a 37°C por 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.

Las suspensiones del microorganismo, la solución salina y los productos a evaluar: Surfacen® (1, 5, 10 y 25 mg/ml); SP-A porcina (0,25, 0,5 y 1 mg/ml); DPPC (1, 5 y 10 mg/ml); PI (0,5, 1 y 2 mg/ml) y SP-A porcina al 1 y 10 % con respecto a la máxima y mínima concentración de Surfacen® (1 y 25 mg/ml) se agitaron en zaranda horizontal a 90 rpm durante 5 h a 37°C (8). Se tomó una alícuota de 100 µl de cada diseño, se realizaron diluciones seriadas en solución salina 1/10 (hasta -6) y se sembró en placas de Agar sangre. Después de 24 h de incubación a 37°C se determinó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) que fueron calculadas a partir del conteo de colonias y la dilución respectiva. Se realizaron tres determinaciones independientes.

La actividad antibacteriana, se expresó como la reducción del crecimiento bacteriano (RCB) donde $RCB = \log_{10}C - \log_{10}X$, C: UFC del control y X: UFC en presencia de los productos evaluados. Se consideró efecto antibacteriano cuando exista una disminución de un logaritmo, al menos, del crecimiento microbiano con relación al control, lo cual significa que el RCB debe ser igual o mayor que 1 (9). 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 $p < 0.05$.

La incubación durante 5 h del aislado de *S. pneumoniae* con Surfacen® resultó en una disminución ($p < 0.05$) en las unidades formadoras de colonias. A las concentraciones de 10 y 20 mg/ml de Surfacen® se observó una disminución de un logaritmo del crecimiento microbiano, expresado en un RCB de 1,06 para ambas concentraciones, efecto que no fue obtenido a las concentraciones de 1 y 5 mg/ml (Figura 1A).

Por su parte, la SP-A porcina fue capaz de reducir el crecimiento microbiano en el microorganismo en estudio ($p < 0.05$) a las concentraciones de 0,25, 0,5 y 1 mg/ml con una disminución del crecimiento microbiano por

encima de un logaritmo de reducción, mostrando un efecto dosis-efecto dependiente (Figura 1A).

La adición de la SP-A porcina incrementó la actividad antimicrobiana encontrada con el Surfacen®. La combinación de SP-A porcina al 10% con respecto a la mínima concentración de Surfacen® (1mg/ml) mostró resultados superiores a los obtenidos con el Surfacen® a las concentraciones de 10 y 25 mg/ml y similares a los obtenidos con la SP-A porcina. Surfacen® a la concentración de 1 mg/ml no es capaz de lograr un efecto antimicrobiano; sin embargo, la adición de SP-A porcina al 1 y al 10 % con respecto a esta concentración mínima de fosfolípidos permitió obtener un efecto antimicrobiano. Este efecto fue

incrementado al adicionar la SP-A porcina al 1 y 10 % con respecto a la máxima concentración de Surfacen® (25 mg/ml), lo que indica que la adición de la proteína potencia la reducción del crecimiento microbiano, provocada por el Surfacen® (Figura 1A).

La actividad antimicrobiana de la DPPC, componente mayoritario del surfactante pulmonar y el PI, el cual se encuentra en mayor proporción en Surfacen® en comparación con otras preparaciones de surfactantes pulmonares naturales exógenas, resultó en una disminución ($p < 0.05$) en las unidades formadoras de colonias expresado como un aumento en la reducción del logaritmo de crecimiento microbiano (Figura 1B).

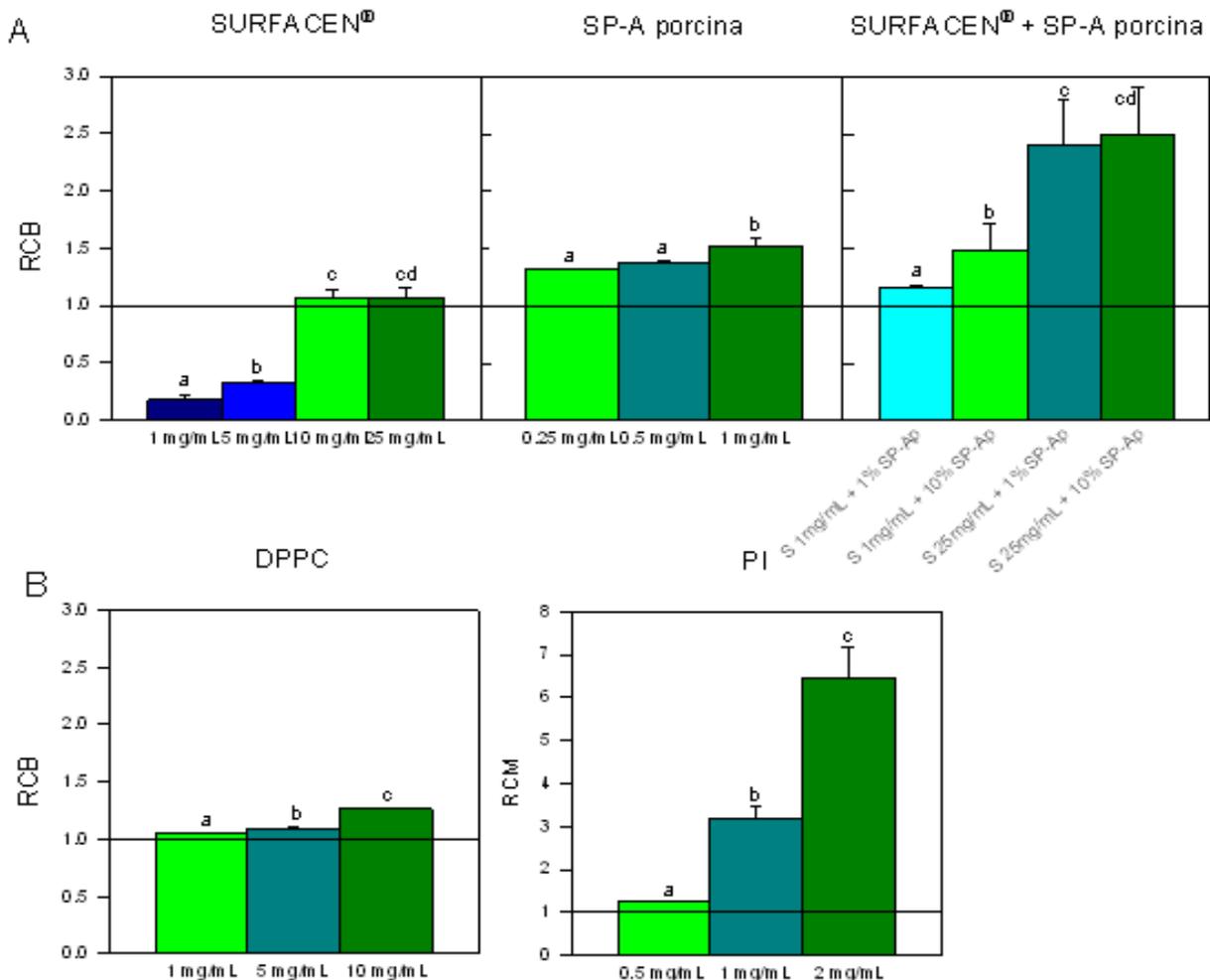


FIGURA 1. Reducción del crecimiento bacteriano (RCB) en el aislado clínico *Streptococcus pneumoniae* en función de la concentración de A: Surfacen®, SP-A porcina y su mezcla; B: DPPC y PI. Los datos son expresados como la media \pm DE de tres determinaciones independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)./ *Bacterial Growth Reduction (BGR) in the clinical isolation of Streptococcus pneumoniae in function of the concentration of A: Surfacen®, porcine SP-A and its mixture; B: DPPC and PI. Data are expressed as the mean \pm SD from three separate experiments. Different letters indicate significant statistical differences ($p < 0.05$).*

Con las diferentes concentraciones evaluadas para ambos fosfolípidos se observó una disminución del crecimiento por encima de un logaritmo de reducción. Sin embargo, el PI mostró una mayor actividad, logrando aproximadamente 3 logaritmos de reducción a una concentración de 1 mg/ml, resultado duplicado al incrementar la dosis a 2 mg/ml mostrando una relación entre dosis-efecto. Para el microorganismo evaluado en ausencia de productos se obtuvo el máximo crecimiento (datos no mostrados).

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó con el aislado *S. pneumoniae* obtenido de pulmones de pacientes con neumonía. Este microorganismo Gram-positivo está considerado como uno de los más frecuentes que se han aislado en pacientes con SDRA junto con otros como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. A su vez, se reporta un porcentaje de infección atribuible a microorganismos Gram negativos como *Escherichia coli*, seguido por otras bacterias tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter Serratia* y *Pseudomonas* (10).

Las investigaciones del componente fosfolípido del surfactante se han dirigido fundamentalmente a sus propiedades antiinflamatorias. La actividad antibacteriana necesita de más estudios. Se ha informado que la DPPC es capaz de reducir la toxicidad celular asociada a las citolisinas producidas por especies del grupo B del género *Streptococcus* (11). Nuestros resultados demuestran que la DPPC y el PI reducen el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, no todas las preparaciones clínicas de surfactante inhiben el crecimiento de microorganismos (8), de manera que puede inferirse, en lo que se refiere a esta actividad, que el comportamiento de la DPPC y el PI depende del contexto composicional de cada surfactante en particular.

Varios laboratorios han examinado la base molecular de la interacción entre la SP-A y los patrones moleculares asociados a los patógenos. En el 2003 se reportó por primera vez, que la SP-A inhibe el crecimiento tanto de cepas de referencia de *Escherichia coli*, como de aislados clínicos. Esta función directa antimicrobiana es distinta de sus propiedades de defensa inmune dependiente de macrófagos. Wu et al. (12) demuestran que la SP-A inhibe directamente el crecimiento de bacterias por incrementar la permeabilidad de la membrana a través de su dominio C-terminal. Posteriormente, se demuestra igual actividad en otras bacterias como *Bordetella pertussis* (13), *P. aeruginosa* (13,14,15) y *Mycoplasma pneumoniae* (16).

Nuestros resultados demuestran que Surfacen® y la SP-A porcina poseen actividad antimicrobiana *in vitro* frente al aislado clínico de *Streptococcus pneumoniae* y que la actividad de Surfacen® es potenciada por la adición de la SP-A porcina. Además se informa la actividad antimicrobiana del componente fosfolípido.

REFERENCIAS

1. Perez-Gil J, Weaver TE. Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions. *Physiology* (Bethesda). 2010;25(3):132-41. Epub 2010/06/17.
2. Whittsett JA, Wert SE, Weaver TE. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu Rev Med*. 2010;61:105-19. Epub 2009/10/15.
3. Ryan M, Akinbi H, Serrano A, Perez-Gil J, Wu H, McCormack F, et al. Antimicrobial Activity of Native and Synthetic Surfactant Protein B Peptides 1. *J Immunol*. 2006;176(1):416-25.
4. Blanco O, Riverón Y, de Armas E, Sánchez J, Faure R, Fernández O. SURFACEN® inhibe el crecimiento de bacterias causantes de infecciones respiratorias. *Biotechnología Aplicada*. 2005;22(4):279-81.
5. Sano H, Kuroki Y. The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity. *Mol Immunol*. 2005;42(3):279-87. Epub 2004/12/14.
6. Suwabe A, Itasaka M, Suzuki H, Ito M, Takahashi K. [Inhibitory effect of rat alveolar type II cells on production of superoxide by neutrophils]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*. 1996;34(11):1208-15. Epub 1996/11/01.
7. Blanco O, Sánchez J, Manzanarez D, Fernández O. Isolation of surfactant protein A, SP-A, from bronchoalveolar porcine lavage. *Rev Salud Anim*. 2000;22:180-2.
8. Rauprich P, Moller 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. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000;7(5):817-22. Epub 2000/09/06.

9. Rusell A, Hugo W, Ayliffe G. Desinfection, preservation and sterilization. Ed Blasckweel Scientific Publication. 1982; Part 1:3-262.
10. Fendrick AM, Saint S, Brook I, Jacobs MR, Pelton S, Sethi S. Diagnosis and treatment of upper respiratory tract infections in the primary care setting. *Clin Ther.* 2001;23(10):1683-706.
11. Nizet V. Streptococcal α -hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends Microbiol.* 2002;10(12):575-80.
12. Wu H, Kuzmenko A, Wan S, Schaffer L, Weiss A, Fisher JH, et al. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest.* 2003;111(10):1589-602. Epub 2003/05/17.
13. Schaeffer LM, McCormack FX, Wu H, Weiss AA. Interactions of pulmonary collectins with *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide elucidate the structural basis of their antimicrobial activities. *Infect Immun.* 2004;72(12):7124-30.
14. Zhang S, Chen Y, Potvin E, Sanschagrin F, Levesque RC, McCormack FX, et al. Comparative signature-tagged mutagenesis identifies *Pseudomonas* factors conferring resistance to the pulmonary collectin SP-A. *PLoS pathogens.* 2005;1(3):e31.
15. Zhang S, McCormack FX, Levesque RC, O'Toole GA, Lau GW. The flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* is required for resistance to clearance by surfactant protein A. *PLoS One.* 2007;2(6):e564. Epub 2007/06/28.
16. Ledford JG, Goto H, Potts EN, Degan S, Chu HW, Voelker DR, et al. SP-A preserves airway homeostasis during *Mycoplasma pneumoniae* infection in mice. *J Immunol.* 2009;182(12):7818-27. Epub 2009/06/06.

Recibido: 27-9-2013.
Aceptado: 8-11-2013.