

# Organización de las nanoestructuras proteico-lipídicas del Surfacen® en correspondencia con la eficacia como agente de estabilización de la interfase aire-líquido respiratoria y primer reporte como agente antileishmanial

## Autor Yg principal Yg

Odalys Blanco Hidalgo<sup>1</sup>, Yuliannis Lugones Ladrón de Guevarra<sup>1</sup>, Lianet Monzote Fidalgo<sup>2</sup>, Roberto Faure García<sup>1</sup>, Reinaldo Salomao<sup>3</sup>, Jesús Pérez Gil<sup>4</sup>.

## Otros autores

Elaine Díaz Casaña<sup>1</sup>, Antonio Cruz<sup>4</sup>, Olga L. Ospina<sup>4</sup>, Elena López<sup>4</sup>, Dra. Milena Brunalti<sup>3</sup>, Sidnea Santos<sup>3</sup>.

## Entidad ejecutora principal

<sup>1</sup>Grupo de Desarrollo Biofarmacéutico, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

## Entidades participantes

<sup>2</sup>Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", La Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Laboratorio de Inmunología I, Universidad Federal de San Pablo, Escuela Paulista de Medicina, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid, España.

## Autor para 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 32700, Mayabeque, Cuba.

Tel: 5347-863014.

Fax: 5347-861409.

e-mail: oblanco@censa.edu.cu y odalysbh@infomed.sld.cu

## Resumen

Actualmente existen escasas investigaciones donde se comparan de forma integrada las propiedades biofísicas y bioquímicas de las preparaciones clínicas del surfactante pulmonar, constituyendo una pregunta abierta la posible correlación existente entre la actividad biofísica, las características estructurales y la eficacia clínica de estas preparaciones. Por otra parte, existen algunos reportes de la capacidad anti patogénica del surfactante pulmonar lo que abre nuevas perspectivas terapéuticas como fármacos antimicrobianos o para el diseño de nuevos medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades relevantes en la salud pública, no totalmente resueltas, tales como la leishmaniosis. El objetivo del presente estudio fue caracterizar las propiedades interfaciales y estructurales de las películas formadas por una preparación de surfactante clínico de origen porcino, Surfacen® para dilucidar la organización de las nanoestructuras de las películas proteino-lipídicas del producto en correspondencia con la eficacia farmacológica como agente de estabilización de la interfase aire-líquido respiratoria. Se comparó con el surfactante nativo de origen porcino y su extracto orgánico, además se evaluaron las propiedades interfaciales, reológicas y el tamaño de partícula de Surfacen® y se interpretaron estos resultados en base a su composición bioquímica y su forma farmacéutica. Estas investigaciones se complementaron con nuevos estudios farmacológicos *in vitro* retando el producto contra *S. aureus* donde se evaluó su efecto anti-inflamatorio y contra *Leishmania amazonenses*. Los resultados arrojaron que las películas de Surfacen®, utilizando microscopia de fluorescencia, mostraron una segregación de las fases lipídicas condensadas mucho mayor, con dominios ordenados significativamente más grandes y estables, cuando son comprimidas, en comparación con las películas formadas por el surfactante nativo endógeno o su extracto orgánico, lo cual resulta un aspecto novedoso y sienta las bases para su aplicación clínica. Así mismo, los resultados mostraron que Surfacen® exhibió propiedades similares a las del surfactante porcino nativo y su extracto

orgánico, al formar películas de superficies activas estables y eficientes en la interfase aire-líquido. El análisis por microscopía de fuerza atómica de películas formadas por Surfacen® o por su extracto orgánico mostraron una red similar interconectada de nanoestructuras condensadas, lo que sugiere que la organización de estas películas en el nivel submicroscópico constituye la característica esencial que sirve de base a las adecuadas propiedades mecánicas y de estabilidad en la interfase para facilitar el trabajo de la respiración. Los resultados brindan nuevos conocimientos sobre la actividad biofísica y las características estructurales de Surfacen®, y por tanto permite identificar y comprender las características esenciales del complejo sistema surfactante, así como proporcionar nuevos criterios para la optimización de nuevas estrategias en el desarrollo de nuevos productos surfactantes de uso terapéutico más efectivos. Por otra parte, Surfacen® mostró actividad contra la forma amastigote de *Leishmania amazonensis*. La proteína SP-A presentó una actividad similar contra ambas formas del parásito, promastigote y amastigote. Al combinar ambos se obtuvo una potenciación en el efecto observado. Este es el primer reporte de la actividad antileishmanial de Surfacen® y la SP-A, lo cual abre nuevas potencialidades terapéuticas contra la Leishmania. A su vez Surfacen® inhibió la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) en monocitos y neutrófilos estimulados con *S. aureus*, microorganismo causante de enfermedades respiratorias, *in vitro*.

Existen dos premios anteriores ACC, uno otorgado al producto Surfacen® en 1995, cuya reivindicación versó sobre los conocimientos de la eficacia de Surfacen® en el tratamiento del Síndrome de Dificultad Respiratoria del Recién Nacido (SDRN), y otro otorgado en el 2005 donde se refrendaron aspectos vinculados con propiedades biofísicas, inmunomoduladoras y antibacterianas, así como las cualidades antioxidantes de la SP-A y su efecto sobre el Surfacen®. Esta nueva propuesta se sustenta en una caracterización detallada de las propiedades biofísicas y estructurales de Surfacen® comparándolas con su fuente de origen, a nivel estructural molecular y supramolecular que permitió revelar nuevos hallazgos al inferir que el proceso de liofilización en Surfacen® podría inducir una segregación particularmente eficaz de dominios condensados enriquecidos-DPPC en las membranas y películas de Surfacen®, que permitió que Surfacen® sea más eficiente en obtener presiones de superficies más altas durante la compresión o evitar la relajación de las películas durante la expansión, lo cual podría estar relacionado con una estabilidad relativamente mayor de las películas Surfacen®. Estos hallazgos son un importante aporte al conocimiento del surfactante pulmonar lo cual crea las bases para optimizar propiedades tales como la estabilidad de las películas de surfactantes en el diseño de nuevos surfactantes, además se demostró el efecto anti-inflamatorio de Surfacen® frente a *S. aureus*, microorganismo causante de enfermedades respiratorias. Por otra parte, se demostró una nueva propiedad farmacológica de Surfacen® y la SP-A como es el efecto antileishmanial.

## **Comunicación corta**

### **Introducción**

El surfactante pulmonar endógeno es una mezcla compleja de lípidos y proteínas específicas que recubren el epitelio alveolar y cuya función principal es reducir la

tensión superficial en la interfase aire-líquido, evitando el colapso alveolar y reduciendo el trabajo respiratorio. Los lípidos constituyen aproximadamente un 90-92 % de la masa de surfactante, y las proteínas el 8-10 % restante. Se han descubierto 4 proteínas, denominadas SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. La SP-B, SP-C son proteínas hidrofóbicas, las cuales son co-aisladas con los lípidos y forman parte de las preparaciones clínicas de surfactante. Ninguna de estas preparaciones posee SP-A o SP-D, proteínas oligoméricas pertenecientes a la familia de las colectinas. La presencia de surfactante, en las vías respiratorias es absolutamente necesaria, siendo su ausencia, deficiencia o inactivación asociada con enfermedades pulmonares graves. El Síndrome de Dificultad Respiratoria del neonato (SDRN) se origina por una inmadurez del epitelio para sintetizar y secretar una cantidad suficiente de surfactante pulmonar. En los años 80, del siglo pasado, el éxito de la aplicación terapéutica pionera de una preparación farmacéutica exógena de surfactante pulmonar para tratar neonatos con RDS abrió una nueva era en el manejo y en el cuidado de neonatos pre-términos y ha contribuido a salvar miles de vidas desde entonces.

Es de destacar que en la década del 80 se desarrollaron las seis preparaciones de surfactantes que hoy en día se emplean en la práctica clínica, dentro de estos se encuentra el surfactante cubano, Surfacen®. Todas estas preparaciones farmacéuticas están aprobadas para tratar a neonatos con SDRN. Las mismas difieren en método de producción, en la suplementación o no con componentes lipídicos adicionales y en la fuente animal de obtención. Profundizar en el estudio de estas preparaciones es una prioridad en esta temática, tanto para la obtención de nuevas preparaciones sintéticas lo cual, es una tarea no resuelta en la actualidad, debido a la complejidad del sistema surfactante, así como para poder comprender porque se han encontrado diferencias importantes en parámetros clínicamente relevantes en ensayos clínicos donde se han empleados diferentes preparaciones de surfactantes. En este sentido estudios comparativos sobre el comportamiento funcional de estas preparaciones, *in vitro e in vivo*, son escasos, y los existentes brindan una información limitada acerca de la asociación entre composición, estructura y propiedades biofísicas. Esto sugiere que un análisis detallado de la correlación estructura-función de las preparaciones de surfactantes clínicos con respecto al surfactante nativo endógeno funcional puede ser de interés tanto para identificar y comprender mejor las características esenciales del sistema surfactante, y para optimizar nuevas estrategias en la producción de surfactantes terapéuticos más eficaces.

La investigación en el área del surfactante pulmonar, en los últimos años se ha concentrado principalmente, en obtener una descripción de las interacciones moleculares y la organización de las estructuras surfactantes bajo condiciones funcionales relevantes. Un hallazgo importante fue que la composición lipídica particular del surfactante es evolutivamente optimizado para sostener la segregación en membranas de surfactante y películas de fases ordenadas y desordenadas, que se ha relacionado con las propiedades particulares del surfactante en términos de dinámica y estabilidad mecánica. Algunos pocos estudios han analizado hasta qué punto los surfactantes clínicos presentan este sello estructural del surfactante nativo y como la existencia de la segregación de fase de las membranas podría ser también, asociado

con adecuadas propiedades funcionales. En la misma línea de pensamiento, un estudio reciente comparó en detalle la estructura de películas formadas por diferentes surfactantes clínicos, por microscopía de fuerza atómica (AFM). Sin embargo, se carece de estudios que aborden la comparación directa de la estructura y las propiedades biofísicas de surfactantes clínicos con respecto a las de su fuente de origen, lo cual sería importante ya que ilustraría en qué medida los procedimientos industriales necesarios para convertir un material derivado de una fuente animal en un producto clínico, puede modificar su estructura y comportamiento funcional.

El surfactante, además representa 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. En base a estos mecanismos, una preparación de surfactante óptima debe ser aquella que se caracterice por presentar propiedades anti-inflamatorias. El SDRN, así como otras enfermedades pulmonares, tales como SDRA, neumonías, enfermedades obstructivas crónicas, entre otras, están caracterizadas por una inflamación intensa asociada con un flujo de neutrófilos, monocitos y macrófagos hacia el alveolo, como resultado se incrementa la liberación de citoquinas y especies reactivas del oxígeno. El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) permanece como la causa principal de infecciones humana, con un aumento de su virulencia, encontrándose nuevas cepas resistentes a diversos fármacos, lo que hace su tratamiento muy dificultoso, destacándose la infección por este microorganismo en el tracto respiratorio bajo.

*Leishmania* es un protozoo intracelular obligado del sistema retículo-endotelial, que causa diferentes enfermedades conocidas por leishmaniosis. Esta parasitosis constituye una de las seis enfermedades tropicales más importantes según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra la leishmaniosis es una necesidad urgente. Así mismo, constituye un modelo factible para explorar la actividad antiprotozoaria y sus mecanismos. Teniendo en cuenta que, estudios recientes demuestran que las colectinas pulmonares son expresadas en sitios extra-pulmonares, promueve el interés de estudiar si las mismas podrían ser beneficiosas para el tratamiento de enfermedades infecciosas en otros órganos. A su vez, la SP-B, la cual está presente en las preparaciones clínicas de surfactantes, posee homología estructural con el péptido antimicrobiano dermasepina, lo que sirvió de base para investigar las propiedades antibacterianas de la SP-B. Recientemente, se informó que la dermasepina posee actividad frente a *Leishmania*. Estos hallazgos sustentan la evaluación de las preparaciones de surfactantes, así como de las colectinas pulmonares frente a protozoos parásitos.

El objetivo del presente estudio fue caracterizar las propiedades interfaciales y estructurales de las películas formadas por una preparación de surfactante clínico de origen porcino, Surfacen® para dilucidar la organización de las nanoestructuras de las películas proteico-lipídicas del producto en correspondencia con la eficacia farmacológica como agente de estabilización de la interfase aire-líquido respiratoria. Se comparó con el surfactante nativo de origen porcino y su extracto orgánico, además se

evaluaron las propiedades interfaciales, reológicas y el tamaño de partícula de Surfacen® y se interpretaron estos resultados en base a su composición bioquímica y su forma farmacéutica. Estas investigaciones se complementaron con nuevos estudios farmacológicos (efecto anti-inflamatorio) *in vitro* retando el producto contra *S. aureus*, microorganismo causante de enfermedades respiratorias y contra *Leishmania amazonenses*.

## **Materiales y Métodos**

### **Fármaco:**

**Surfacen®:** se obtiene a partir de extracto orgánico de lavados broncoalveolares porcinos, que son sometidos a precipitación con acetona para reducir su contenido de lípidos neutros. Se presenta como un liofilizado blanco estéril, dosificado en 50 mg de fosfolípidos por vial. Producido por el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Surfactante clínico usado en el tratamiento del Síndrome de Dificultad Respiratoria del Neonato desde 1995 y recientemente se emplea en dos nuevas indicaciones terapéuticas, el Síndrome de Dificultad Respiratoria agudo en adulto (2010) y en pacientes pediátricos (2014).

La definición de los modelos *in vitro* del estudio de la actividad biofísica comprende la evaluación de las características interfaciales en el surfactómetro de burbuja cautiva, el cual reproduce las condiciones de humedad, temperatura y concentración fisiológica de surfactante que tiene lugar en el pulmón, constituyendo la metodología más completa para la evaluación de las propiedades biofísicas del sistema surfactante pulmonar, las medidas estructurales se realizaron a nivel submicrométrico y nanométrico mediante microscopía de fluorescencia y de fuerza atómica, las cuales fueron comparadas con las de su fuente de origen. La evaluación *in vitro* de la actividad anti-inflamatoria se realizó en células mononucleadas de la sangre humana periférica estimuladas con *S. aureus*. La evaluación *in vitro* de la actividad antileishmanial se realizó en un modelo de macrófagos peritoneales infectados con *Leishmania amazonensis*.

**Estudios bioquímicos:** El análisis del contenido de proteínas en Surfacen® y las otras muestras de surfactante se llevó a cabo por electroforesis en condiciones reductoras y posteriormente western blot con anticuerpos específicos a las proteínas del surfactante, SP-B y SP-C.

**Modelos biofísicos:** La presión superficial de los diferentes surfactantes se evaluó utilizando un surfactómetro de burbuja cautiva (CBS) completamente controlado por un ordenador. Las medidas estructurales se realizaron mediante microscopía de fluorescencia y de fuerza atómica (AFM).

**Modelos químico-físico:** Las medidas reológicas se realizaron en un reómetro (Haake, modelo RV20) empleando el sistema de medición M5 y el sensor NV std. Las medidas de tamaño de partícula se realizaron en un analizador de tamaño de partícula por difracción de luz tipo Coulter.

**Modelo farmacológico *in vitro* con células mononucleadas de sangre humana 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.

**Modelo farmacológico de macrófagos infectados con *Leishmania amazonensis*:** Se determinó la actividad antileishmanial del Surfacen® y la SP-A al tratar cultivos *in vitro* de promastigotes de *L. amazonensis* por un método colorimétrico utilizando una sal de tetrazolio (MTT) y frente a amastigotes intracelulares en macrófagos peritoneales de ratón BALB/c previamente infectados con *L. amazonensis*. En paralelo, se determinó la citotoxicidad de ambos productos frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c sin infectar, mediante un ensayo colorimétrico utilizando el MTT. Posteriormente, se analizó la actividad de ambos productos al adicionarlos de forma combinada frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.

## Resultados

**Resultados del Estudio Bioquímico:** El análisis por western blot que compara el contenido relativo de proteínas SP-B y SP-C en las diferentes muestras estudiadas demostró que Surfacen® contiene proporciones bien detectadas de ambas proteínas, estando en el orden de 0,7% de SP-C y 0,4% de SP-B con respecto a fosfolípido en masa, comparable en términos generales a las cantidades de SP-B y SP-C presente en un surfactante clínico bien conocido como Curosurf *Blanco O y col. 2012 Biochimica Biophysica Acta*.

## Impacto científico

Estos resultados avalan por primera vez la cuantificación de las proteínas SP-B y SP-C presentes en Surfacen®.

**Resultados de la evaluación de las propiedades biofísicas:** Surfacen® exhibió propiedades similares a las de surfactante porcino nativo o su extracto orgánico al formar películas de superficie eficientemente activas y estables, en la interfase aire-líquido, siendo capaz de alcanzar tensiones superficiales por debajo de 5 mN/m en repetitivos ciclos de compresión-expansión. Películas de Surfacen®, sin embargo, mostraron una segregación de fases lipídicas condensadas, significativamente más grandes y estable, cuando son comprimidas en comparación con las obtenidas por las películas formadas por el surfactante nativo endógeno o su extracto orgánico, evidenciado por microscopía de fluorescencia. Por otra parte, el análisis por microscopía de fuerza atómica de películas formadas por Surfacen® o por el extracto orgánico de surfactante porcino nativo revela una red similar interconectada de nanoestructuras condensadas, lo que sugiere que la organización de las películas en el nivel submicroscópico constituye la característica esencial que sirve de base a las propiedades mecánicas y la estabilidad adecuada permitiendo a las películas

surfactante en la interfase facilitar el trabajo de la respiración. *Blanco O y col. 2012 Biochemica Biofisica Acta.*

### **Impacto científico**

Estos resultados avalan por primera vez que Surfacen® presenta un comportamiento biofísico óptimo evidenciado por la metodología-equipamiento gold estándar para este tipo de preparaciones. Por otro lado los estudios estructurales permitieron inferir que el proceso de liofilización puede justificar el comportamiento observado en los estudios estructurales y por ende estar relacionado con las excelentes propiedades mecánicas y la eficacia clínica de Surfacen®. Estos hallazgos son un importante aporte al conocimiento del surfactante pulmonar lo cual crea las bases para optimizar propiedades tales como la estabilidad de las películas de surfactantes, condición que impone la dinámica respiratoria, en el diseño de nuevos surfactantes. A nuestro conocimiento este es uno de los pocos estudios, en el cual las propiedades estructurales y funcionales de un surfactante clínico son comparadas en detalle con las del material de origen del cual procede, ofreciendo una buena oportunidad para analizar en qué medida los procedimientos involucrados en la extracción, manipulación, producción y almacenamiento de un surfactante clínico preserva las propiedades funcionales del nativo.

**Resultados del análisis químico-físico:** Se describió el perfil reológico y el tamaño de partícula de Surfacen® y se estudió el efecto de la liofilización en dicho comportamiento. Surfacen® mostró una viscosidad de 2,54 y 1,98 mPa.s a 23 y 37 °C, respectivamente. El análisis del diámetro de la partícula evidenció tres poblaciones de partículas en los intervalos de 0,04-0,4 µm, 2-15 µm, y de 40-200 µm. Surfacen® mostró una dependencia mínima de la viscosidad en función del gradiente de velocidad de cizalla, con una tendencia a un comportamiento newtoniano. El proceso de liofilización disminuyó la viscosidad de la formulación. *Blanco O y col. 2008 Lat. Am. J. Pharm.*

### **Impacto científico**

Estos resultados avalan por primera vez el comportamiento reológico de Surfacen®, resultando en una formulación de baja viscosidad, siendo un candidato atractivo para el suministro por vía intratraqueal.

En su conjunto, el impacto científico de estos resultados develan un valor agregado que tiene Surfacen®, expresado integralmente en sus propiedades biofísicas, reológicas, bioquímicas y farmacéuticas, evidenciándose la relevancia de la formulación farmacéutica y el proceso de liofilización (*único surfactante clínico natural en forma de liofilizado*), lo que contribuyo por una parte, en disponer de una formulación con baja viscosidad lo que la torna adecuada para su suministro como medicamento y atractivo para futuras formulaciones farmacéuticas con la adición de nuevos principios activos y por otra parte, los estudios funcionales biofísicos arrojaron una segregación de fases lipídicas sostenida en función de la presión de superficie, lo que explica la gran estabilidad mecánica observada, pudiendo estar relacionada con el proceso de liofilización y su composición bioquímica.

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

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 induce una inhibición de alrededor de un 40 % de la IL-6 inducida por *S. aureus*. *Lugones Y. y col. 2014 International Immunopharmacology.*

#### **Impacto científico**

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

### **Resultados del efecto de Surfacen® y la SP-A en macrófagos infectados con *Leishmania amazonensis***

Surfacen® mostró 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 (CI50) fue de  $17.9 \pm 3.0$   $\mu\text{g/mL}$ , sin encontrarse efecto tóxico. Surfacen® mostró una actividad similar a medicamentos de primera línea empleados para esta enfermedad. *Blanco y col. 2011 Revista do Instituto de medicina tropical de Sao Pablo.*

La SP-A presentó una actividad similar contra ambas formas del parásito, con una CI50 de  $34.0 \pm 3.1$  y  $33.6 \pm 1.1$   $\mu\text{g/mL}$  contra promastigote y amastigote, respectivamente. La SP-A fue moderadamente citotóxica en macrófagos peritoneales con una CI50 de  $172.0 \pm 6.1$   $\mu\text{g/mL}$ . *Lugones Y. y col. 2012 Biotecnología Aplicada.*

La combinación de ambos productos resultó en un efecto farmacológico sinérgico dado por un índice de concentración inhibitoria fraccional menor de 0.5. La combinación más eficaz fue con la relación 4:1 de Surfacen y la SP-A respectivamente. El efecto farmacológico de Surfacen y la SP-A como compuestos antileishmanial fue demostrado, con una potenciación de la actividad cuando fueron incubados en conjunto. *Lugones Y. y col. 2013 Chemotherapy.*

#### **Impacto científico**

Estos resultados avalan por primera vez la actividad antileishmanial de Surfacen y la SP-A, siendo a nuestro juicio el primer reporte internacional de dicho efecto. Nuestros resultados sugieren la exploración de estos productos en el diseño de nuevas formulaciones contra *Leishmania*. Estos resultados brindan sustentación práctica a los recientes reportes que demuestran que las colectinas pulmonares son expresadas en



sitios extra-pulmonares, lo que promueve el interés de estudiar si las mismas podrían ser beneficiosas para el tratamiento de enfermedades infecciosas en otros órganos, así como que la proteína hidrofóbica, SP-B, presente en las preparaciones clínicas de surfactante posee homología estructural con la dermaserpina, y recientemente a esta última se le demostró actividad frente a *Leishmania*.

## PUBLICACIONES

1. ***Biochemica Biophysica Acta (2012) 1818, 2756–2766*** Blanco O., Cruz A., Ospina O. L. and Perez-Gil J. Interfacial behavior and structural properties of Surfacen, a clinical lung surfactant from porcine source.
2. ***European Journal of Pharmacology (2007) 568, 1-15*** Blanco O. and Perez-Gil J. Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat the Respiratory Distress Syndrome: Role of the different components in an efficient pulmonary surfactant.
3. ***Biophys. J. (2008) 94: 1225*** Blanco O., Cruz A., Schurch D. and Perez-Gil J. Differences in structure and surface behavior of clinical preparations from porcine pulmonary surfactant.
4. ***International Immunopharmacology 2014, 21 369–374***. Yuliannis Lugones Ladrón de Guevara, Odalys Blanco Hidalgo, Sidnéia Sousa Santos, Milena Karina Colo Brunialti, Roberto Faure, Reinaldo Salomao. Effect of natural porcine surfactant in *Staphylococcus aureus* induced pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species generation in monocytes and neutrophils from human blood.
5. ***Chemotherapy 2013, 59: 247-250*** Lugones Y, Blanco O, Faure R, Monzote L. In vitro Interaction between SURFACEN® and Surfactant Protein A against *Leishmania amazonensis*.
6. ***Lat. Am. J. Pharm. (2008) 27, 5, 826-30*** Blanco O., Morales I., Toledo A. Alfonso W., Díaz E. and Faure R. Viscosidad y tamaño de partícula de una preparación clínica de surfactante pulmonar
7. ***Revista do Instituto de medicina tropical de Sao Pablo (2011) 53 no 4, 235-238*** Blanco O., Lugones Y., Díaz E. and Monzote L. *In vitro* activity of Surfacen® against *Leishmania amazonensis*
8. ***Biotecnología Aplicada (2012) 29:35-37*** Lugones Y., Blanco O., Faure R. and Monzote L. In vitro activity of surfactant protein A against *Leishmania amazonensis*.
9. ***Biotecnología Aplicada (2012) 29:53-59*** Blanco O., Lugones Y., Fernández O. y Faure R. Update about clinical surfactant preparations and respiratory disease.

## Bibliografía

- C.B. Daniels, S. Orgeig, Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing, *News Physiol. Sci.* 18 (2003) 151–157.
- J. Perez-Gil, Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 1676–1695.
- J. Perez-Gil, T.E. Weaver, Pulmonary surfactant pathophysiology: current models and open questions, *Physiology (Bethesda)* 25 (2010) 132–141.
- J.A. Whitsett, S.E. Wert, T.E. Weaver, Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease, *Annu. Rev. Med.* 61 (2010) 105–119.

- T. Fujiwara, H. Maeta, S. Chida, T. Morita, Y. Watabe, T. Abe, Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease, *Lancet* 1 (1980) 55–59.
- M. Obladen, History of surfactant up to 1980, *Biol. Neonate* 87 (2005) 308–316.
- O. Blanco, J. Perez-Gil, 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.* 568 (2007) 1–15.
- B.C. Lam, Y.K. Ng, K.Y. Wong, Randomized trial comparing two natural surfactants (Survanta vs. bLES) for treatment of neonatal respiratory distress syndrome, *Pediatr. Pulmonol.* 39 (2005) 64–69.
- R. Ramanathan, M.R. Rasmussen, D.R. Gerstmann, N. Finer, K. Sekar, A randomized, multicenter masked comparison trial of poractant alfa (Curosurf) versus beractant (Survanta) in the treatment of respiratory distress syndrome in preterm infants, *Am. J. Perinatol.* 21 (2004) 109–119.
- Y.Y. Zuo, R.A. Veldhuizen, A.W. Neumann, N.O. Petersen, F. Possmayer, Current perspectives in pulmonary surfactant—inhibition, enhancement and evaluation, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 1947–1977.
- J. Bernardino de la Serna, G. Oradd, L.A. Bagatolli, A.C. Simonsen, D. Marsh, G. Lindblom, J. Perez-Gil, Segregated phases in pulmonary surfactant membranes do not show coexistence of lipid populations with differentiated dynamic properties, *Biophys. J.* 97 (2009) 1381–1389
- J. Bernardino de la Serna, J. Perez-Gil, A.C. Simonsen, L.A. Bagatolli, Cholesterol rules: direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 40715–40722.
- B.M. Discher, K.M. Maloney, W.R. Schief Jr., D.W. Grainger, V. Vogel, S.B. Hall, Lateral phase separation in interfacial films of pulmonary surfactant, *Biophys. J.* 71(1996) 2583–2590.
- K. Nag, J. Perez-Gil, M.L. Ruano, L.A. Worthman, J. Stewart, C. Casals, K.M. Keough, Phase transitions in films of lung surfactant at the air–water interface, *Biophys. J.* 74 (1998) 2983–2995.
- B. Piknova, W.R. Schief, V. Vogel, B.M. Discher, S.B. Hall, Discrepancy between phase behavior of lung surfactant phospholipids and the classical model of surfactant function, *Biophys. J.* 81 (2001) 2172–2180. C. Alonso, T. Alig, J. Yoon, F. Bringezu, H. Warriner, J.A. Zasadzinski, More than a monolayer: relating lung surfactant structure and mechanics to composition, *Biophys. J.* 87 (2004) 4188–4202.
- T. Ivanova, I. Minkov, I. Panaiotov, P. Saulnier, J.E. Proust, Dilatational properties and morphology of surface films spread from clinically used lung surfactants, *Colloid Polym. Sci.* 282 (2004) 1258–1267.

- K. Nag, J.S. Pao, R.R. Harbottle, F. Possmayer, N.O. Petersen, L.A. Bagatolli, Segregation of saturated chain lipids in pulmonary surfactant films and bilayers, *Biophys. J.* 82 (2002) 2041–2051.
- H. Zhang, Q. Fan, Y.E. Wang, C.R. Neal, Y.Y. Zuo, Comparative study of clinical pulmonary surfactants using atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1808 (2011) 1832–1842.
- Vannier-Santos, M., A. Martiny, et al. (2002). "Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading." *Current pharmaceutical design* 8(4): 297-318
- Murray, H. W., J. D. Berman, et al. (2005). "Advances in leishmaniasis." *The Lancet* 366(9496): 1561-1577.
- Croft, S. L., S. Sundar, et al. (2006). "Drug resistance in leishmaniasis." *Clinical microbiology reviews* 19(1): 111-126.
- Bourbon, J. R. and B. Chailley-Heu (2001). "Surfactant proteins in the digestive tract, mesentery, and other organs: evolutionary significance." *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* 129(1): 151-161
- MacNeill, C., T. M. Umstead, et al. (2004). "Surfactant protein A, an innate immune factor, is expressed in the vaginal mucosa and is present in vaginal lavage fluid." *Immunology* 111(1): 91-99.
- Bräuer, L., C. Kindler, et al. (2007). "Detection of surfactant proteins A and D in human tear fluid and the human lacrimal system." *Investigative ophthalmology & visual science* 48(9): 3945-3953.
- 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.
- Ryan, M., H. Akinbi, et al. (2006). "Antimicrobial activity of native and synthetic surfactant protein B peptides." *The Journal of Immunology* 176(1): 416.
- 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*.
- O. Moreno V, M. Lee L, F. Domínguez D, et al., Estudio de la eficacia del SURFACEN en el distress respiratorio del recién nacido, *Rev. Cuba. Pediatr.* 71 (1999) 60–71.
- D. Manzanares, E. Díaz, W. Alfonso, A. Escobar, H. Colomé, M.C. Muñoz, M. Noa, S. Rabell, A. Hidalgo, *Surfactante pulmonar porcino*, *Repúb. Cuba A* 61 (1995) 35–42 K.
- H.W. Taeusch, J. Bernardino de la Serna, J. Perez-Gil, C. Alonso, J.A. Zasadzinski. Inactivation of pulmonary surfactant due to serum-inhibited adsorption and reversal by hydrophilic polymers: experimental, *Biophys. J.* 89 (2005) 1769–1779.

- E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917. G. Rouser, A.N. Siakotos, S. Fleischer, Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots, *Lipids* 1 (1966) 85–86.
- S. Schurch, F.H. Green, H. Bachofen, Formation and structure of surface films: captive bubble surfactometry, *Biochim. Biophys. Acta* 1408 (1998) 180–202. D. Schurch, O.L. Ospina, A. Cruz, J. Perez-Gil, Combined and independent action of proteins SP-B and SP-C in the surface behavior and mechanical stability of pulmonary surfactant films, *Biophys. J.* 99 (2010) 3290–3299.
- 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.
- L. Wang, A. Cruz, C.R. Flach, J. Perez-Gil, R. Mendelsohn, Langmuir–Blodgett films formed by continuously varying surface pressure. Characterization by IR spectroscopy and epifluorescence microscopy, *Langmuir* 23 (2007) 4950–4958.
- Cruz, L. Vazquez, M. Velez, J. Perez-Gil, Effect of pulmonary surfactant protein SP-B on the micro- and nanostructure of phospholipid films, *Biophys. J.* 86 (2004) 308–320.
- B.M. Discher, K.M. Maloney, W.R. Schief Jr., D.W. Grainger, V. Vogel, S.B. Hall, Lateral phase separation in interfacial films of pulmonary surfactant, *Biophys. J.* 71 (1996) 2583–2590.
- K. Nag, J. Perez-Gil, M.L. Ruano, L.A. Worthman, J. Stewart, C. Casals, K.M. Keough, Phase transitions in films of lung surfactant at the air–water interface, *Biophys. J.* 74 (1998) 2983–2995
- Monzote, L. (2000). "Evaluación de la actividad de dos nuevos compuestos frente a la leishmaniosis cutánea experimental." Tesis presentada para optar por el grado de licenciada en Ciencias Farmacéuticas. Ciudad de la Habana, Universidad de la Habana.
- Sladowski, D., S. J. Steer, et al. (1993). "An improved MIT assay." *Journal of immunological methods* 157(1-2): 203-207.
- Torres-Santos, E. C., D. L. Moreira, et al. (1999). "Selective effect of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43(5): 1234-1241.
- Delorenzi, J. C., M. Attias, et al. (2001). "Antileishmanial Activity of an Indole Alkaloid from *Peschiera australis*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45(5): 1349-1354.
- Tiuman, T. S., T. Ueda-Nakamura, et al. (2005). "Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(1): 176-182

- Johnson, M. D., C. MacDougall, et al. (2004). "Combination antifungal therapy." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48(3): 693-715.
- Seifert, K. and S. L. Croft (2006). "In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50(1): 73-79.
- Zhao, L., M. G. Wientjes, et al. (2004). "Evaluation of combination chemotherapy." *Clinical cancer research* 10(23): 7994-8004. L. Gunasekara, S. Schurch, W.M. Schoel, K. Nag, Z. Leonenko, M. Haufs, M. Amrein, Pulmonary surfactant function is abolished by an elevated proportion of cholesterol, *Biochim. Biophys. Acta* 1737 (2005) 27–35.
- E. Keating, L. Rahman, J. Francis, A. Petersen, F. Possmayer, R. Veldhuizen, N.O. Petersen, Effect of cholesterol on the biophysical and physiological properties of a clinical pulmonary surfactant, *Biophys. J.* 93 (2007) 1391–1401.
- Y.Y. Zuo, S.M. Tadayyon, E. Keating, L. Zhao, R.A. Veldhuizen, N.O. Petersen, M.W. Amrein, F. Possmayer, Atomic force microscopy studies of functional and dysfunctional pulmonary surfactant films, II: albumin-inhibited pulmonary surfactant films and the effect of SP-A, *Biophys. J.* 95 (2008) 2779–2791
- B.M. Discher, K.M. Maloney, D.W. Grainger, S.B. Hall, Effect of neutral lipids on coexisting phases in monolayers of pulmonary surfactant, *Biophys. Chem.* 101–102 (2002) 333–345
- Y.Y. Zuo, E. Keating, L. Zhao, S.M. Tadayyon, R.A. Veldhuizen, N.O. Petersen, F. Possmayer, Atomic force microscopy studies of functional and dysfunctional pulmonary surfactant films. I. Micro- and nanostructures of functional pulmonary surfactant films and the effect of SP-A, *Biophys. J.* 94 (2008) 3549–3564.
- Braun A., P.C. Stenger, H.E. Warriner, J.A. Zasadzinski, K.W. Lu & H.W. Tausch *Biophys. J.* (2007) 93: 123-39
- Speer CP, Gotze B, Curstedt T, Robertson B. Phagocytic functions and tumor necrosis factor secretion of human monocytes exposed to natural porcine surfactant (Curosurf). *Pediatr Res* Jul 1991;30 (1):69–74
- Allen JN, Moore SA, Pope-Harman AL, Marsh CB, Wewers MD. Immunosuppressive properties of surfactant and plasma on alveolar macrophages. *J Lab Clin Med* Mar 1995;125(3):356–69
- Cauchetier, E., P. Loiseau, et al. "Characterisation of atovaquone resistance in *Leishmania infantum* promastigotes." *International journal for parasitology* (2002) 32(8): 1043-1051.
- Bodley, A. L., M. W. McGarry, et al. "Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and *Leishmania* species." *Journal of Infectious Diseases* (1995) 172(4): 1157.
- Pink, R., A. Hudson, et al. "Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* (2005) 4(9): 727-740.