

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón".
ISCM-Habana. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria

EFFECTIVIDAD DE UN SURFACTANTE NATURAL EN LAS CURVAS PRESION-VOLUMEN DE FETOS INMADUROS DE CONEJO

Raúl Fernández-Regalado,* Dahis Manzanares,** María Cristina Muñoz*** y Héctor Colomé**

RESUMEN

La administración de surfactantes exógenos en el síndrome de dificultad respiratoria del recién nacido es una terapia de gran actualidad. La evaluación biológica de estos surfactantes es un requisito previo y a la vez indispensable antes de comenzar los ensayos clínicos. En este trabajo se demuestra, mediante las curvas presión-volumen *in vitro* en fetos de conejos inmaduros, la eficacia biológica de un surfactante natural (SURFACEN) obtenido en Cuba a partir de lavados pulmonares de cerdo. En comparación con los controles los animales experimentales mostraron valores inferiores de presión de apertura y mayores de volumen de expansión máxima y volumen de aire retenido durante la deflación a presión=5 cm de H₂O; los hallazgos anatomopatológicos se correspondieron con los resultados de las curvas presión-volumen.

INTRODUCCION

El surfactante pulmonar es una mezcla compleja de fosfolípidos y proteínas específicas en diferentes estados de agregación que recubre el interior de los alveolos pulmonares.

Al expandirse como una monocapa en la interfase aire-líquido, el surfactante pulmonar hace disminuir la tendencia de

los alveolos al colapso y la trasudación de fluido en los espacios aéreos. Su deficiencia en la superficie alveolar, como ocurre en el síndrome de dificultad respiratoria del niño recién nacido, provoca un grave trastorno en el intercambio gaseoso que es causa importante de morbilidad y mortalidad perinatales.¹⁻⁴

* Especialista de II Grado en Bioquímica Clínica. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón".

** Licenciada en Bioquímica. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.

*** Especialista en Medicina Veterinaria. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.

Una de las estrategias actuales para contrarrestar la deficiencia de esta sustancia, ocasionada por inmadurez pulmonar del niño pretérmino, consiste en la administración en estos casos de surfactantes exógenos obtenidos a partir de fuentes naturales o de origen sintético.^{5,6} Antes de administrar cualquier tipo de surfactante al niño recién nacido, es absolutamente imprescindible llevar a cabo una evaluación experimental del nuevo fármaco, la cual consta de 4 aspectos: 1) caracterización bioquímica, 2) evaluación de la actividad biológica del producto, 3) evaluación químico-física y 4) pruebas toxicológicas.^{3,4}

Para llevar a cabo la evaluación biológica, en particular, diversos modelos en animales de laboratorio han sido propuestos, teniendo cada uno de éstos ciertas ventajas, pero a la vez algunas desventajas.⁷ En el presente trabajo se describen los resultados obtenidos con un modelo de curvas presión-volumen (curvas P-V)⁸ realizadas con fetos inmaduros de conejo, a los cuales se les administró un surfactante natural obtenido en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) (SURFACEN) a partir de lavados de pulmón de cerdo.

MATERIAL Y METODO

En estos experimentos fueron utilizadas conejas de 27 días de gestación, las cuales fueron sacrificadas mediante una dosis letal de 100 mg de thiopental; transcurridos 15 min, cuando los fetos no se movían ya espontáneamente, se extrajeron por cesáreas.^{7,8}

Los conejitos o gazapos fueron pesados y asignados al azar al grupo control o al experimental. A continuación la tráquea de cada feto fue expuesta y una cánula metálica de 1,1 mm de diámetro fue insertada y fijada en ella. La cánulas metálicas

estaban acopladas a un tubo de nylon, en el cual mediante una micropipeta se aplicaba un volumen del SURFACEN o del NaCl 0,15 M para los controles. La dosis de surfactante y el volumen de la suspensión en solución salina variaron entre 30 y 80 mg/kg y 0,5-2,0 mL/kg, respectivamente; los datos relativos al modo de obtención y composición del SURFACEN son objeto de otro trabajo.

Para lograr que estos líquidos descendieran hasta vías aéreas de los gazapos fue necesario comprimirles suavemente el tórax antes de la aplicación. El gazapo por medio de este tubo de nylon fue conectado al extremo de una pipeta de 2 mL llena de aire, la cual por el otro extremo estaba conectada a un recipiente que contenía H₂O (figura 1).

Un número máximo de 6 gazapos de cada camada podían ser evaluados mediante este sistema en cada experimento. A medida que el recipiente que contenía H₂O se elevaba a partir del nivel 0, la presión se incrementaba, y cuando los pulmones de algún gazapo se comenzaban a expandir, el volumen de aire en la pipeta era reemplazado por H₂O. La presión se incrementa hasta 25 cm de H₂O y entonces se hacía descender hasta el nivel 0 de nuevo; se emplearon los siguientes valores de presión, tanto en el ascenso como en el descenso: 0,5, 10, 15, 20, 25 cm, manteniendo durante 1 min estable la presión en cada uno de estos niveles.

Este primer ciclo era seguido por un segundo ciclo de compresión-descompresión, después del cual fue realizado el examen anatomopatológico.

Se procedió, en primer lugar, a la apertura del abdomen para descartar con el diafragma intacto la presencia de neumotórax; se extrajo después el bloque pulmonar, y se realizó una inspección macroscópica para determi-

Procedimiento

Coneja con
27 días de gestación



Los fetos inmaduros (gazapos) son sacrificados intraútero después de la inyección de 100 mg de thiopental a la madre



Los fetos se pesan y traqueostomizan y el surfactante se aplica en dosis de 30-80 mg/kg y 0,5 - 2 mL/kg. En los controles, NaCl 0,15 M



Los fetos son conectados a una pipeta de 2 mL llena con aire, la cual por el otro extremo está en comunicación con una columna de H₂O



El movimiento del agua en la pipeta fue registrado a diferentes presiones hasta 25 cm de H₂O



Curvas estáticas presión-volumen fueron dibujadas
Evaluación anatomopatológica

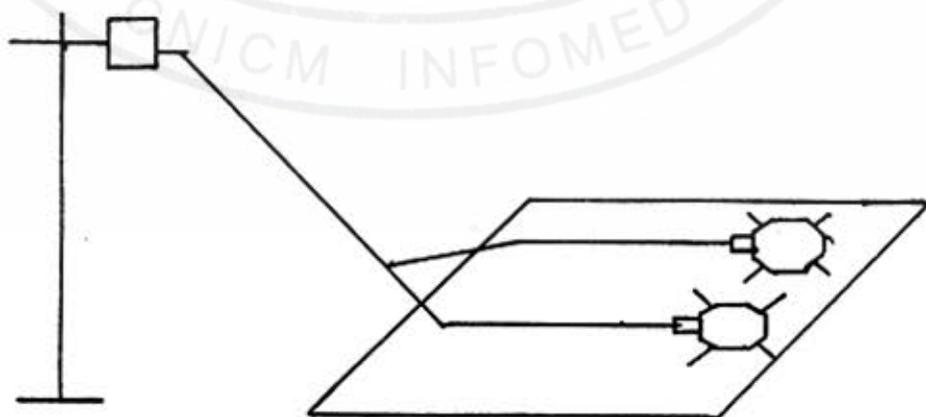


FIGURA 1. Resultados satisfactorios fueron obtenidos en fetos individuales en los distintos experimentos, uno de los cuales se muestra en esta gráfica. La dosis de SURFACEN fue de 45 mg/kg y el volumen de la suspensión, 2 mL/kg. En el control, al que se le aplicó un volumen idéntico de solución salina, no se produjo expansión pulmonar hasta la presión de 25 cm. La presión de apertura (PA) fue \leq de 15 cm, el VEM de 63 mL/kg y la variable V_g/VEM (ver texto) tuvo un valor de 0,58.

nar el carácter de la aereación por lóbulos y, además, una prueba de flotación en medio acuoso.

En caso de comprobarse neumotórax, se descartaron los resultados de las curvas P-V.

Posteriormente, 3 fragmentos correspondientes al pulmón derecho (lóbulos apical, cardíaco y diafragmático) y 2 al pulmón izquierdo (apical y diafragmático) fueron fijados en formalina neutra al 10 %, con posterior inclusión en parafina y coloración con hematoxilina-eosina para evaluación cualitativa histológica del parénquima pulmonar. En total se llevaron a cabo 23 experimentos en los que fueron evaluados 41 gazapos a los que se les aplicó SURFACEN y 34 controles a los que se les aplicó solución salina.

Las curvas P-V fueron dibujadas a partir de los datos de gazapos individuales y también agrupando algunos experimentos; se tuvo en cuenta el valor de compresión de la columna de aire a las distintas presiones, aunque estos valores al compararlos con los volúmenes de aire desplazados en los animales experimentales, eran prácticamente despreciables (a presión=25, 0,042 mL).

Debe fijarse la atención sobre las siguientes variables: 1) presión de apertura (PA), que es aquella a la cual comienzan a expandirse los pulmones, 2) volumen de expansión máxima (VEM), que es el volumen de aire en mL por kg de peso del gazapo, a los 25 cm de presión y 3) la relación entre el volumen de aire retenido durante la deflación a presión de 5 cm de H₂O y el volumen de expansión máxima (Vs/VEM).

Se consideró efecto positivo del SURFACEN cuando una adecuada curva P-V en el primer ciclo se correspondió con una buena aereación del tejido pulmonar.

En las comparaciones estadísticas realizadas se utilizaron el chi-cuadrado y la t de Student.

RESULTADOS

Aunque hubo algunas diferencias de peso entre los gazapos de distintos experimentos o incluso dentro de un mismo experimento, en conjunto, el peso de los animales asignados al grupo control ($\bar{X}=29,6$ DE=4,9) no fue significativamente diferente al de los experimentales ($\bar{X}=30,7$ DE=4,5).

De la figura 2 a la 6 se exponen los resultados más significativos obtenidos con las curvas P-V. De manera general resalta la notable diferencia hasta la presión de 25 cm entre los controles y los fetos experimentales; en algunas figuras no fue posible dibujar la curva P-V para los controles.

En los pies de cada figura se pueden leer las principales informaciones particulares relativas a cada experimento.

En total, el SURFACEN fue aplicado en 41 gazapos y mostró un notable efecto positivo en 37; sin embargo, en ninguno de los 34 controles se pudo demostrar un aceptable grado de aereación, ni en el análisis de las curvas presión-volumen ni en el examen anatomopatológico, tanto macroscópico como microscópico ($p<0,001$ al realizar prueba de chi-cuadrado).

Los animales que recibieron el SURFACEN mostraron en la evaluación morfológica una clara tendencia a la presentación de estados de aereación pulmonar de tipo lobular, con clara demarcación de lobulillos y expansión alveolar uniforme, caracterizada esta última por la presentación de un epitelio simple plano en 31 gazapos sin daño en las células epiteliales de la pared septal (figura 7).

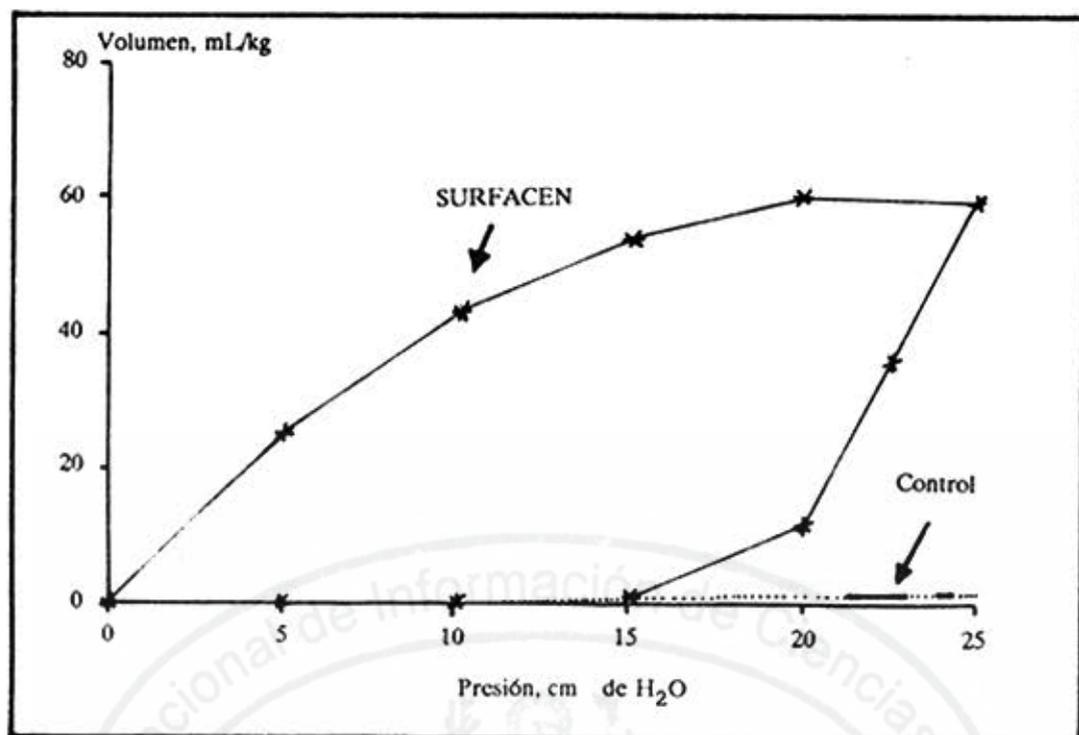


FIGURA 2. Resultados más significativos obtenidos con las curvas de P-V.

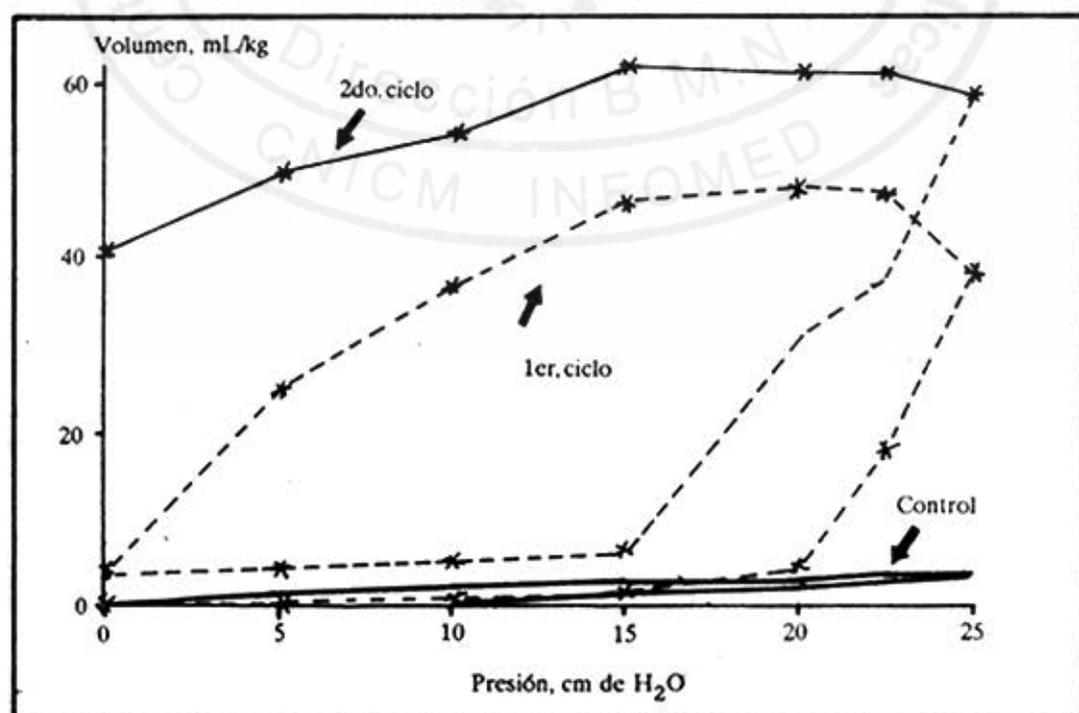


FIGURA 3. En este experimento (el número 11 de la serie) se muestran las curvas P-V en 2 ciclos de inflación-deflación. La dosis utilizada en este caso fue de 60 mg/kg y el volumen, 1,8 ml/kg. Obsérvese la amplia histeresis de ambas curvas.

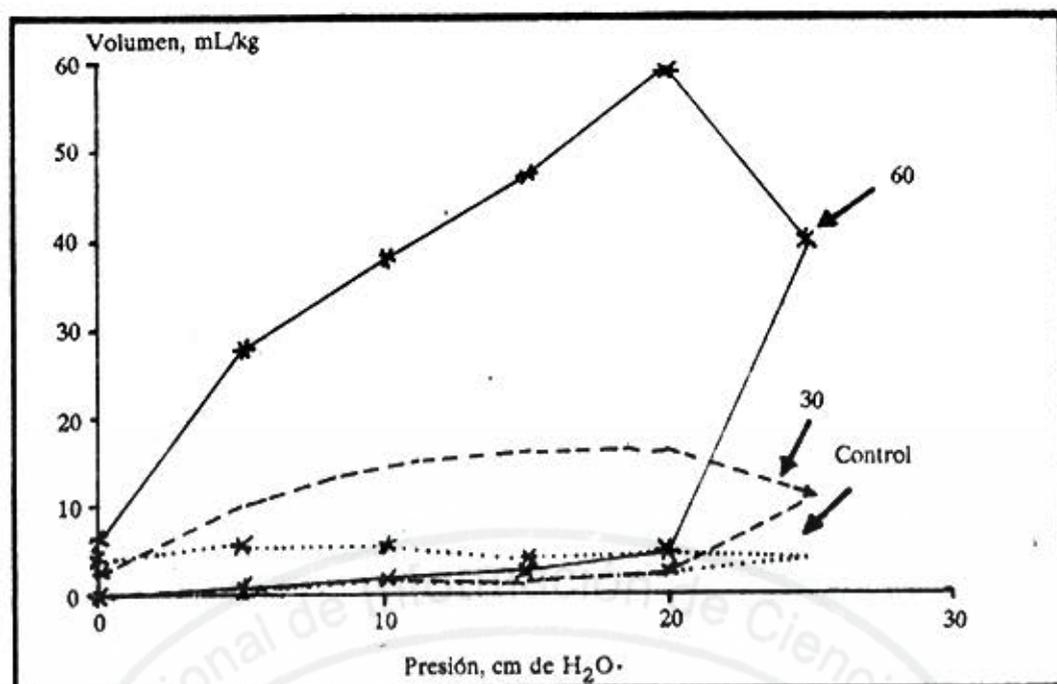


FIGURA 4. Cuando se utilizaron 2 dosis de SURFACEN, de 30 y 60 mg/kg, y un volumen de 2 mL/kg, las curvas que se obtuvieron en el primer ciclo son las mostradas en esta figura. Se repite la gran diferencia con respecto a los controles de los parámetros principales de estas curvas P-V.

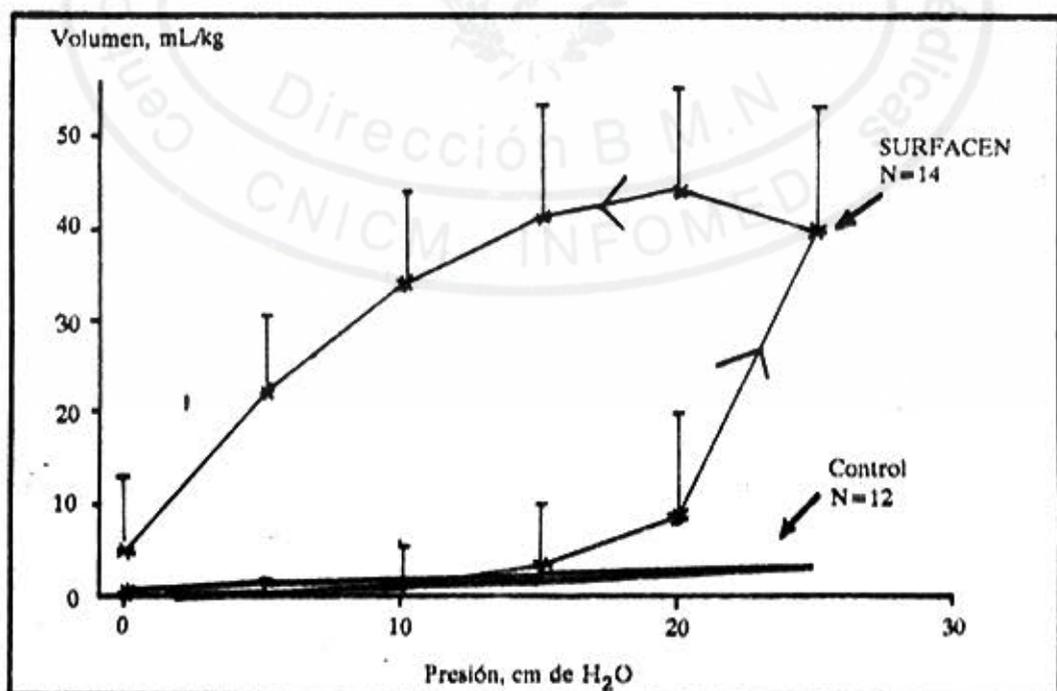


FIGURA 5. Esta gráfica se obtuvo agrupando los resultados de varios experimentos llevados a cabo en condiciones similares; las curvas se obtuvieron al unir los valores medios del volumen de aire pulmonar para cada presión y además se muestran las desviaciones estándar mediante líneas verticales. La dosis de SURFACEN osciló en el rango de 45-60 mg/kg y el volumen de la suspensión entre 0,5 y 2,0 mL/kg. Diferencias muy significativas se obtuvieron (prueba t de Student) en particular para VEM y V_{90}/VEM entre animales controles y experimentales. Este último parámetro alcanzó un valor de 0,69 en los experimentales.

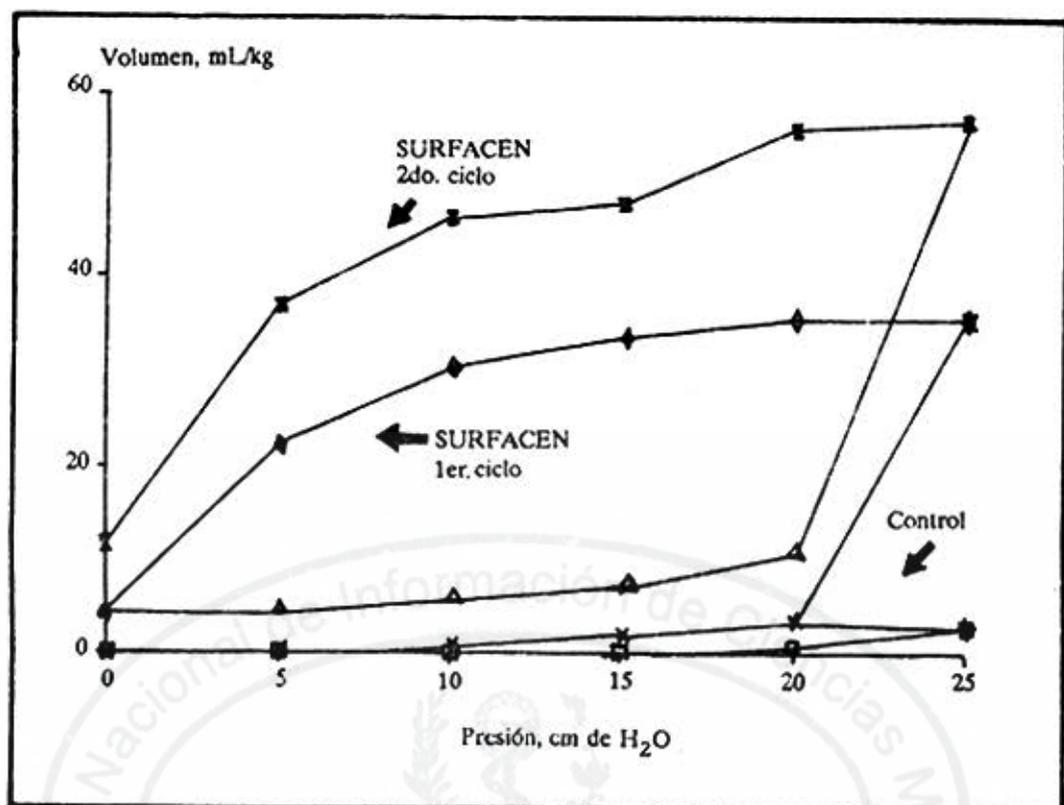
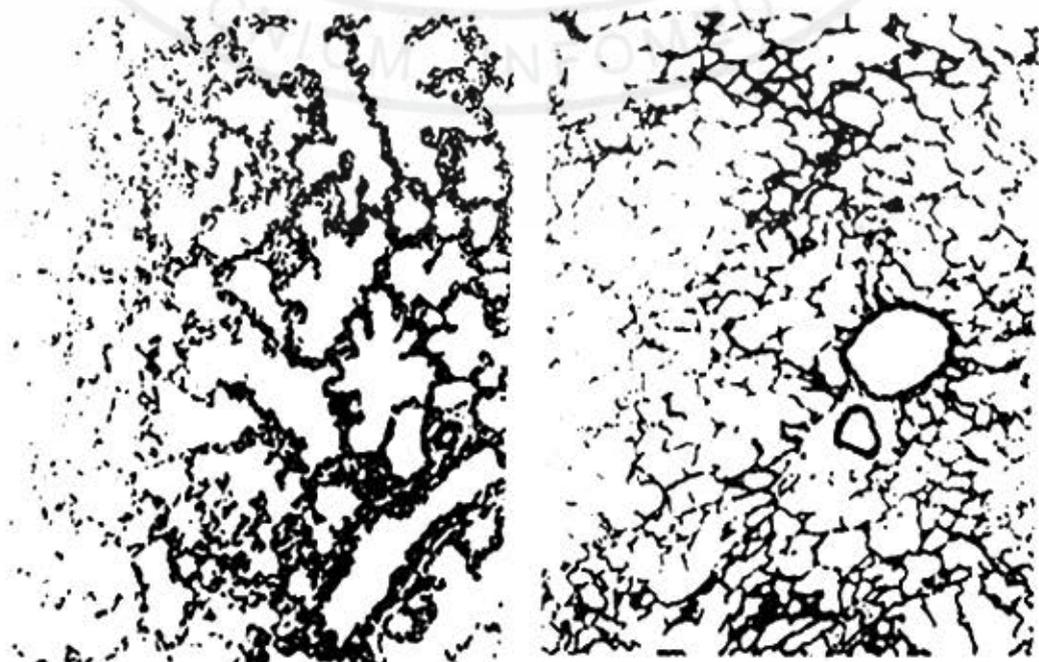
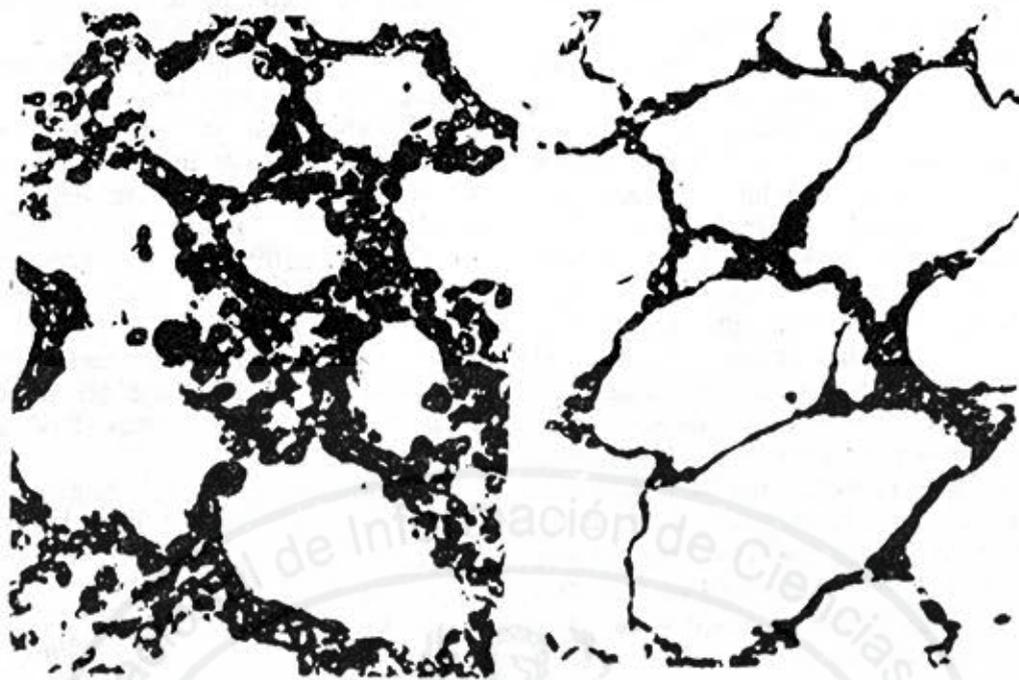


FIGURA 6. En la fase final el producto fue esterilizado mediante un filtro biológico, posteriormente liofilizado y envasado en viales que contienen 100 mg. Con uno de estos viales se realizó el experimento, cuya curva P-V en un primer y también segundo ciclo se muestra en esta figura. La dosis utilizada fue de mg/kg y el volumen, 1,6 mL/kg.





B

FIGURA 7. En la figura 7A se aprecia la imagen histológica del tejido pulmonar de los animales tratados con SURFACEN, a 2 aumentos distintos, 125 y 310. En la figura 7B y a los mismos aumentos, la imagen histológica pulmonar de los gazapos controles. Tinción con hematoxilina-eosina.

Se observaron 6 fetos con aereación irregular, caracterizada por áreas de expansión pulmonar, muchas veces enfisematosas, alternando con zonas de atelectasia y sólo en 4 casos fueron observados pulmones típicamente fetales con predominio de atelectasia.

Los pulmones de los controles tratados con solución salina presentaron un aspecto típicamente fetal, con predominio de atelectasia y marcado engrosamiento de los septos interalveolares.

DISCUSION

Los niños pretérmino, en particular, aquéllos con edad gestacional inferior a 32 semanas, frecuentemente se ven afectados por el síndrome de dificultad respiratoria (SDR). Este trastorno,

según se conoce actualmente, es causado principalmente por la deficiencia del surfactante pulmonar.¹

Desde el año 1980 en que Fujiwara⁵ publicó los primeros resultados alentadores para el tratamiento del SDR con la aplicación de un surfactante exógeno, creciente interés ha despertado en el mundo científico esta nueva terapéutica.

Desde esa fecha algunos ensayos clínicos con surfactantes naturales o artificiales se han completado o ejecutan actualmente en diversos países; también un conocimiento bastante completo se ha ido adquiriendo acerca de la composición, metabolismo, métodos de obtención y evaluación experimental del surfactante pulmonar.³

Este último aspecto es de extraordinario interés, ya que antes de llevar a cabo un ensayo clínico con

cualquier tipo de surfactante exógeno resulta imprescindible, entre otras evaluaciones experimentales, realizar ensayos biológicos en animales de laboratorio que permitan demostrar su eficacia farmacológica.

Varios han sido los modelos propuestos para tal fin, entre los cuales se encuentra el de las curvas P-V estáticas. En este modelo es posible utilizar pulmones aislados de algún animal adulto, por ejemplo, rata o perro^{9,10} usualmente, en los cuales el surfactante pulmonar es eliminado mediante lavados repetidos con solución salina; posteriormente, los pulmones son comprimidos manualmente para eliminar todo el aire de su interior y se conectan con un sistema que permita medir el volumen de aire que penetra a diferentes presiones y dibujar con esos datos curvas P-V.

Una alternativa a este proceder, que ha sido la empleada en este trabajo, elimina la manipulación mecánica y, por lo tanto, el posible daño hístico, es el modelo de curvas P-V en fetos de conejo extraídos de la cavidad uterina a los 27 días de edad gestacional.⁷ En esta variante al ser los fetos sacrificados intraútero, los pulmones permanecen llenos de líquidos sin ningún grado de aereación y la aplicación intratraqueal de un producto surfactante permite la expansión pulmonar. Resulta posible comparar el efecto resultante en los animales experimentales con el obtenido en los controles seleccionados de la misma camada.

Utilizando este procedimiento, Enhorning y Robertson⁸ fueron los primeros en demostrar incremento de la expansión pulmonar en animales prematuros después de la instilación traqueal de un surfactante natural obtenido de lavados pulmonares de conejo adulto; mas recientemente Revak et al.¹¹ demostraron la eficacia biológica de surfactantes artificiales

obtenidos a partir de mezclas de lípidos sintéticos con proteínas hidrofóbicas de 6 KDa y de 28-36 KDa.

En nuestros experimentos llevados a cabo con fetos de conejo y como se aprecia en varias de las figuras de resultados, la PA es mayor de 10 cm de H₂O, entre 15 y 20 cm de H₂O, en los animales tratados con surfactante. En los controles ni con presiones de 25 cm de H₂O se produjo expansión alveolar importante, y ésta es la razón por la cual es perfectamente explicable la no aparición del patrón característico de las curvas P-V en estos gazapos.

Nohara et al.¹² si demuestran alguna expansión en los fetos controles, pero sólo a presiones mayores de 25 cm de H₂O.

Al estar llenos de líquido los pulmones al inicio del experimento, el gradiente de presión (P) requerido para mover la interfase aire-líquido hasta el nivel alveolar es directamente proporcional a la tensión superficial (S) del líquido e inversamente relacionado con el radio capilar (r) de los bronquiolos terminales, de acuerdo con la ley de Laplace ($P=2S/r$).

Ha sido calculado incluso este gradiente de presión en el pulmón neonatal humano,³ asumiendo un radio de 50 micras para el bronquiolo terminal y una tensión superficial de equilibrio de 25 mN/m para el líquido que contiene surfactante, entonces el gradiente de presión para vencer la resistencia a la aereación es sólo de 1 000 N/m², lo cual es equivalente a 10,2 cm de H₂O, valor algo menor al encontrado en los experimentos de nuestro trabajo con gazapos.

Esta variable, la presión de apertura (PA), es una de las más importantes a tener en cuenta en este tipo de diagramas: los productos con buena actividad tensoactiva hacen disminuir notablemente su valor en relación con el control, tal como ocurrió con el SURFACEN.

También se ha propuesto⁷ tener en cuenta el VEM, el cual estuvo como promedio entre 35 y 40 mL/kg y el índice V_5/VEM que es la relación entre el volumen a presión = 5 cm durante la deflación y el VEM. Según ha señalado Gorree,² sólo los surfactantes de buena calidad, capaces de producir una adecuada estabilidad alveolar, muestran valores de este índice superiores a 0,5. Como se evidencia, sobre todo en la figura 5 que resume varios ensayos experimentales, el SURFACEN cumple con este requisito.

La histéresis que muestran las curvas P-V es debida a que en la primera fase de reducción de presión en la deflación, el volumen de expansión máxima se mantiene constante e incluso puede incrementarse indicando un reclutamiento de nuevos alveolos.³

En todos los experimentos realizados en este trabajo se emplearon dosis de surfactante entre 30 y 80 mg/kg, aplicadas en un volumen de suspensión salina de 0,5-2,0 mL/kg; las dosis utilizadas en diversos ensayos clínicos son algo más elevadas y fluctúan entre 60 y 200 mg/kg^{1,2,5,13} en un volumen de 1,4-4 mL/kg.

Al comparar los cortes hísticos de pulmón de fetos tratados con surfactante con los de fetos tratados con salina se apreciaron notables diferencias (figura 7): escasa expansión alveolar y el engrosamiento septal predominó en los animales controles, mientras que exactamente el patrón contrario predominó en los tratados con surfactante. En este último grupo no fue detectado daño del epitelio alveolar, lo que podría apuntar a un efecto tóxico local del producto. Los efectos adversos que más se destacan al revisar la literatura concerniente al surfactante pulmonar, son la persistencia del *ductus arteriosus* y el riesgo potencial de inmunización contra proteínas heteró-

logas al administrar surfactantes naturales a niños recién nacidos; sin embargo, en relación con este último riesgo no se han reportado complicaciones alérgicas, quizás debido a la limitada capacidad de respuesta inmunológica en este período de la vida.³

De cualquier manera es necesario llevar a cabo pruebas de toxicidad aguda, subaguda y crónica con el producto SURFACEN, lo cual no fue realizado en este trabajo.

La principales ventajas de este modelo, según nuestra experiencia y los reportes de otros autores, han consistido fundamentalmente en su simplicidad, el requerimiento de un pequeño volumen de surfactante, en el rango de 0,6 a 6,0 mL/kg de peso del feto, y además una buena correlación ha sido hallada con los resultados obtenidos en otros modelos con el animal *in vivo*.^{1,3,7}

Las curvas P-V en fetos de conejo inmaduros podrían servir como una primera prueba de actividad biológica de cualquier producto surfactante y en dependencia de los resultados probar o no el producto en otros modelos más caros y complejos con el animal *in vivo*, tales como el del lavado pulmonar en curieles, fetos de conejo ventilados o carneros inmaduros.⁷

Debe tenerse en cuenta que el aspecto más controvertido en la evaluación experimental de cualquier surfactante es precisamente el de su evaluación biológica y, por lo tanto, es preferible obtener el máximo posible de evaluaciones en diferentes modelos de animales de laboratorio.

Aunque se ha recomendado principalmente la utilización del surfactante pulmonar en el SDR del niño recién nacido, nuevas perspectivas terapéuticas se abren en el futuro para esta sustancia, como son: el síndrome de dificultad respiratoria del adulto y las infecciones pulmonares.² El modelo biológico presentado en este trabajo

y otros que se aproximen lo más posible a cada una de estas condiciones patológicas, seguramente continuarán siendo imprescindibles en ese futuro para evaluar productos naturales

tales como el SURFACEN, quizás surfactantes artificiales e incluso surfactante obtenidos por técnicas de ingeniería genética y biotecnología.

SUMMARY

Administration of exogenous surfactants in respiratory distress syndrome of the newborn is a current therapy. Biological evaluation of these surfactants is a preliminary and essential requirement before starting clinical trials. In this work biological efficiency of a naturally occurring surfactant (SURFACEN) obtained in Cuba from pulmonary washings of swine is documented by means of in vitro pressure-volume curves of immature rabbit fetuses. Controls compared to experimental animal models showed lower values of opening pressure and higher values of maximal volume expansion and retained air volume during deflation at 5 cm H₂O pressure. Anatomopathological findings are consistent with pressure-volume curves results.

RESUME

L'administration de surfactant exogène pour le syndrome de difficulté respiratoire du nouveau-né est une thérapie de grande utilité. L'évaluation biologique de ces surfactants est une condition préalable et, au même temps, indispensable avant de commencer les essais cliniques. Dans ce travail on démontre, moyennant les courbes pression-volume *in vitro* chez les foetus immatures de lapin, l'efficacité biologique d'un surfactant naturel (SURFACEN), obtenu à Cuba à partir de lavages pulmonaires de porc. En comparant le contrôles, les animaux expérimentaux ont montré des valeurs inférieures de pression de rentrée et plus grandes de volume d'expansion maximale et de volume d'air retenu pendant la déflation à pression = 5 cm de H₂O; les trouvailles anatomiques pathologiques ont été en rapport avec les résultats des courbes pression-volume.

AGRADECIMIENTOS

Los autores principales de este trabajo agradecen la colaboración importante brindada por el Doctor Hilario Arturo Alfonso, la doctora Ileana Martín-Carrera y la imprescindible asistencia técnica de Calixto Gómez.

Al doctor C. J. Morley (Department of Paediatrics, University of Cambridge, UK) por su gentileza al facilitarnos valiosa información preliminar con respecto al modelo biológico desarrollado en este trabajo, y, en general, sobre el tema del surfactante pulmonar.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Jobe, J.; M. Ikegami: Surfactant for the treatment of respiratory distress syndrome. *An Rev Respir Dis* 130: 1256, 1987.
2. Lachmann, B.; L. M. G. van Golde: Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands. 60 Years of Surfactant Research. Final programme and abstracts. Floating Congress on the river Rhine 11-17 Nov., 1989.
3. Van Golde, L. M. G. et al.: The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. *Physiol* 68: 374, 1988.
4. Notter, R. H.: Physical chemistry and physiological activity of pulmonary surfactant. In: Shapiro D. L. and Notter R. H.; Eds. *Surfactant replacement therapy*. New York, A. R., Liss, Inc., 1989.
5. Fujiwara, T. et al.: Artificial surfactant therapy in hyaline membrane disease. *Lancet* 55, 1980.
6. Morley, C. J.: Surfactant therapy for very premature babies. *Br Med Bull* 44: 919, 1988.
7. Robertson, B.; B. Lachmann: Experimental evaluation of surfactants for replacement therapy. *Exp Lung* 14: 279, 1988.

8. *Enhoming G.; B. Robertson:* Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. *Pediatrics* 50: 58, 1972.
9. *Shannon, D. C. et al.:* Restoration of volume-pressure curves lecithin fog. *J Appl Physiol* 28: 470, 1970.
10. *Bernerl, M. S. et al.:* Lavaged excised rat lungs as a model of surfactant deficiency. *Lung* 162: 99, 1984.
11. *Revak, S. B.:* Reconstitution of surfactant activity using purified human apoprotein and phospholipids measured *in vitro* and *in vivo*. *Am Rev Respir Dis* 134: 1258, 1986.
12. *Nohara, K. et al.:* Correlations between physical and physiological properties of various preparations of lung surfactant. *Respir Dis* 69: 321, 1986.
13. *Smith, J. A. et al.:* Hyaline membrane disease treated with bovine surfactant. *Pediatrics* 71: 913, 1983.

Recibido: 2 de abril de 1990. Aprobado: 23 de abril de 1990.

Dr. *Raúl Fernández Regalado.* Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón".
Departamento de Perinatología Básica. Calle 146 No. 3102, Cubanacán, La Habana, 11600, Cuba.

