

COMPOSICIÓN DEL SURFACTANTE, DESARROLLO PULMONAR Y PRUEBAS DE MADURACIÓN EN EL FETO

SURFACTANT COMPOSITION, LUNG DEVELOPMENT AND FETAL LUNG MATURATION TESTS

Ariel Iván Ruiz-Parra, MD*, MSc,
Liliana Muñoz, MSc**,
Ligia Ome, Bact.**

RESUMEN

El surfactante pulmonar es una sustancia tensoactiva producida por los neumocitos tipo II, cuya concentración en el recién nacido prematuro/inmaduro está disminuída, llevando a la producción del síndrome de dificultad respiratoria. El surfactante está constituido en un 85% por lípidos, del tipo fosfolípidos en su mayoría. El resto son proteínas surfactantes.

Los fosfogliceridos (lecitinas) y la esfingomielina forman el grupo de fosfolípidos involucrados. La fosfatidil colina y la dipalmitoil fosfatidil colina son las lecitinas más abundantes en el líquido extracelular que recubre los alvéolos pulmonares normales y en el surfactante pulmonar que disminuye su tensión superficial. Así se evita la atelectasia al final de la fase espiratoria de la respiración. En el neumocito II, enzimas remodelan las diferentes lecitinas para convertirlas en dipalmitoil fosfatidil colina. Una vez que el surfactante es producido en

el neumocito, esta sustancia migra como “cuerpos lamelares” desde el núcleo hasta la superficie apical de la célula desde donde es liberado por exocitosis dentro del alveolo.

Menos de un 0.1% de los recién nacidos presentan Síndrome de Dificultad Respiratoria (llamado antiguamente Enfermedad de Membrana Hialina) cada año, y alrededor de un 10 % de estos mueren. La administración de corticoesteroides incrementa la madurez pulmonar en casos de riesgo de parto prematuro, o cuando es necesario realizar una cesarea lo más temprano posible. El tratamiento de los bebés prematuros que presentan SDR incluye la administración de surfactantes dentro del árbol traqueobronquial. El patrón oro de la determinación de madurez pulmonar fetal es la relación lecitina/esfingomielina (L/E), aunque hay algunas otras pruebas como la medición de cuerpos lamelares, que resultan confiables, económicas y más fácilmente disponibles en hospitales de menor categoría.

* Profesor Titular, Departamento de Obstetricia y Ginecología e Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Correspondencia: airuizparra@gmail.com

** Bacterióloga, Instituto Materno-Infantil de Bogotá.

Palabras clave: Maduración pulmonar fetal, relación lecitina/esfingomiélin, cuerpos lamelares, pruebas diagnósticas, fosfolípidos.

ABSTRACT

Pulmonary surfactant is a tensoactive substance produced by type II pneumocytes. Its concentration in premature/inmature babies is decreased, and this causes respiratory distress syndrome. 85% of surfactant are lipids, most of them phospholipids. The remainder are surfactant proteins.

Phosphoglycerides (lecithins) and sphingomyelin are involved phospholipids. Most abundant lecithins in extracellular fluid covering normal pulmonary alveoli are phosphatidyl-choline and dipalmitoil phosphatidyl choline, and in pulmonary surfactant (that decreases surface tension) as well. Thus, atelectasis at the end of expiratory phase is avoided. Type II pneumocytes contain a number of enzymes that remodel different lecithins to transform them in dipalmitoil phosphatidyl choline. Once surfactant is manufactured by the pneumocyte, it migrates as "lamellar bodies", from nucleus to apical surface of the cell, where it is released within the alveolus by an exocytosis process.

Less than one percent of newborns develop yearly the respiratory distress syndrome (formerly called "hyaline membrane disease"); about ten percent of them die. Corticoid administration enhances lung maturity in at risk cases of pre-term delivery, or when a cesarean sections is indicated as soon as possible, before term. Premature babies having the idiopathic respiratory distress syndrome are treated with surfactant administration into the tracheo-bronchial tree. Gold standard test to determine fetal lung maturity is lecithin/esfingomyélin (L/S) rate. There are other tests designed to meet this task, like measurement of lamellar bodies. This test can

be trusted, is cheaper is readily available in less sophisticated hospitals and medical centers.

Key words: Fetal lung maturation, lecithin/sphingomyélin rate, lamellar bodies, diagnostic tests, phospholipids.

A. DESARROLLO PULMONAR FETAL

El proceso de desarrollo y maduración pulmonar comienza en el embrión de cuatro semanas, cuando aparece el primordio del aparato respiratorio como una evaginación de la pared ventral del intestino anterior (1). Dependiendo de las especies, el proceso termina en la gestación avanzada o poco después del nacimiento, con la formación de alvéolos y de una red capilar con capacidad de intercambio gaseoso. El desarrollo embriológico del pulmón humano se ha dividido en cuatro etapas: pseudo-glandular, canalicular, sacular y alveolar (2).

Poco después de la evaginación de la pared ventral del intestino anterior, comienza la ramificación que genera el árbol bronquial. En éste proceso están involucradas numerosas hormonas, factores de crecimiento e interacciones con la matriz extracelular, que llevan a la activación de proteínas-kinasas activadas por mitógenos (MAP kinasas), así como el óxido nítrico (3,4).

Después de la ramificación comienza la etapa sacular caracterizada por adelgazamiento del mesénquima, diferenciación del epitelio y expresión de las proteínas surfactantes. En esta etapa existe un asa paracrina en la cual la leptina, derivada de lipofibroblastos, y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), actúan cooperativamente para estimular la expresión de la proteína B del surfactante y la maduración de los neumocitos tipo II (5). También se ha encontrado que la

interleukina 1 (IL-1) aumenta la expresión de los mRNA para proteínas del surfactante alveolar (6). Otra característica de la maduración pulmonar es la ciliogénesis en el epitelio de la vía aérea.

La etapa final es la formación de alvéolos de paredes delgadas con una red capilar integrada. Una disminución de los fibroblastos intersticiales contribuye al adelgazamiento alveolar que facilita el intercambio gaseoso. Ocurren entonces fenómenos de apoptosis que se correlacionan con una disminución de la expresión del receptor del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I) (7).

Hay evidencia de que el uso de corticoides prenatales aumenta el desarrollo pulmonar y mejora la supervivencia de los niños con hipoplasia pulmonar. Los corticoides pueden aumentar la distensibilidad pulmonar y mejorar el desarrollo estructural del pulmón (8). Aunque se ha señalado que la maduración pulmonar inducida por glucocorticoides podría ocurrir a expensas del crecimiento pulmonar, del desarrollo alveolar y del crecimiento fetal, que se afectarían en forma negativa (9,10), evidencia reciente obtenida en animales con hipoplasia pulmonar, sugiere que dosis pequeñas de cortisol aumentan el porcentaje del espacio aéreo, disminuyen el grosor de la pared interalveolar e incrementan el número de alvéolos, sin afectar negativamente el crecimiento pulmonar fetal (11).

B. SURFACTANTE Y ENFERMEDAD DE MEMBRANA HIALINA

El descubrimiento de la deficiencia de surfactante (que viene del inglés **Surface active agent** en los pulmones “hepatizados” de los niños que morían por EMH se debió a interacciones con muchos investigadores de diferentes disciplinas (12). En Inglaterra, Richard Pattle había investigado la espuma del edema pulmonar, porque algunos gases usados en la guerra

inducían edema pulmonar y se investigaban agentes “anti-espuma” para contrarrestar dicho efecto. La gran estabilidad de las burbujas del pulmón normal, le llevó a concluir que se debían haber originado en el alvéolo el cual debería estar recubierto con una capa de baja tensión superficial. Pattle sugirió que la ausencia de dicha sustancia de recubrimiento alveolar podría ser una de las dificultades que enfrentaba un niño prematuro y que, en algunos casos, causaría atelectasia. Esta predicción fue ignorada durante mucho tiempo por los clínicos.

Posteriormente, Clements estudió los cambios en la tensión superficial dependientes del área, observando que a grandes volúmenes pulmonares, la tensión superficial es alta, mientras que a bajos volúmenes pulmonares la tensión se aproxima a cero. En 1957, Clements denominó “surfactante pulmonar” al material que presumiblemente se localizaba en la interfase alvéolo-aire y lo consideró un factor anti-atelectásico.

En 1958, Pattle informó que las burbujas de los pulmones de conejillos de India eran inestables y al año siguiente, Mary Elen Avery y Jere Mead, describieron la incapacidad de los extractos obtenidos de niños que murieron por EMH para disminuir la tensión superficial (13). La EMH de los niños prematuros se debe a una falla primaria de los neumocitos tipo II para producir los CL que son la forma de almacenamiento y secreción del surfactante pulmonar. Estos niños no alcanzan la maduración suficiente de los neumocitos tipo II y de otras estructuras pulmonares.

1. Neumocitos y producción de surfactante

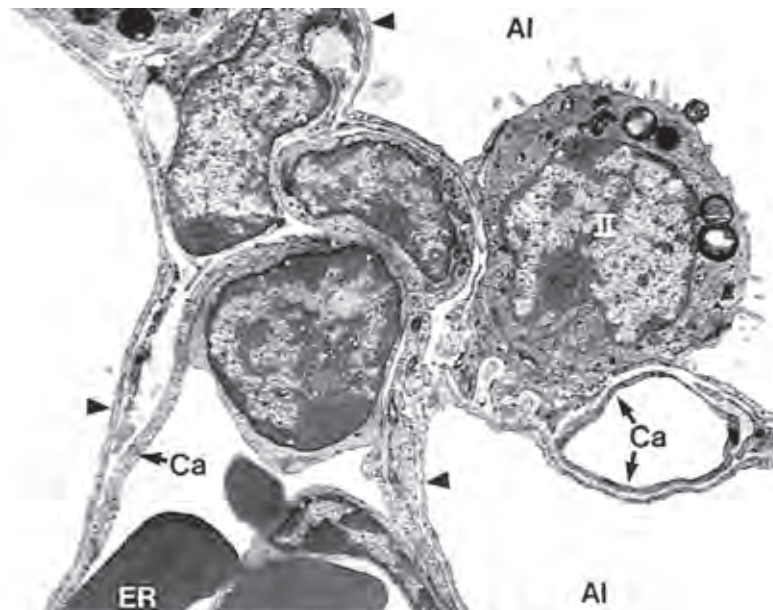
El sistema alveolar tiene dos tipos de células epiteliales, los neumocitos (tipos I y II) y los macrófagos. Los neumocitos tipo I cubren el 95% de la superficie alveolar y son células aplanadas que

contienen unas pocas organelas. Los macrófagos están involucrados en la remoción de surfactante, partículas y microorganismos que ingresan con el aire. Los neumocitos tipo II son responsables de la síntesis, empaquetamiento y secreción del surfactante pulmonar; también hacen la re-captación de los componentes del surfactante desde el espacio alveolar y los reutilizan para la secreción (14). Los neumocitos tipo II se caracterizan por la presencia de CL de 0.2 a 2 μm de diámetro que constituyen un 18 a 24% del citoplasma (figura 1). Estos CL son la forma de almacenamiento del surfactante pulmonar (15) el cual, además de reducir la tensión superficial para evitar el colapso alveolar, juega un papel muy importante en la protección antioxidante, la inhibición de la exudación de líquido desde

el capilar hacia el alvéolo y la defensa contra la infección pulmonar.

El surfactante pulmonar está compuesto por un complejo de fosfolípidos y proteínas. La composición del surfactante pulmonar de numerosas especies de mamíferos es muy similar. Un 80 a 90% del peso del complejo lo constituyen los glicerofosfolípidos, un 10% está dado por el colesterol y el 10% restante por las apoproteínas pulmonares incluyendo SP-A (abreviatura en inglés de proteína surfactante A), SP-B, SP-C y SP-D (16). La principal apolipoproteína es la sialoglicoproteína SP-A (17). EL surfactante también contiene pequeñas cantidades de triglicéridos y ácidos grasos libres. EL cuadro 1 muestra la composición de fosfolípidos del surfactante pulmonar humano.

Figura 1. Neumocito tipo II



Abreviaturas: Al: alvéolo. II: Neumocito tipo II. Ca: capilar alveolar. ER: eritrocito. Tomado de: www.udel.edu/~Wags/histopage/empage/er/er.htm

Cuadro 1. Composición de fosfolípidos del surfactante humano obtenido por lavado pulmonar.

FOSFOLÍPIDO	PORCENTAJE
FOSFATIDILCOLINA SATURADA	67.5
FOSFATIDILCOLINA NO SATURADA	49.7
FOSFATIDILGLICEROL	17.7
FOSFATIDILETANOLAMINA	10.0
ESFINGOMIELINA	5.3
FOSFATIDILINOSITOL	4.0
FOSFATIDILSERINA	3.6
OTROS	1.6
	8.0

MODIFICADO DE ROONEY SA (18)

Los fosfolípidos más abundantes en el surfactante pulmonar son la fosfatidilcolina (lecitina o dipalmitoil-lecitina), que constituye el 70 a 80%, y el fosfatidilglicerol, que constituye un 5 a 10%. Cerca del 70% de la fosfatidilcolina es saturada con dos residuos de ácido palmítico (dipalmitoil-fosfatidilcolina, denominada también dipalmitoil-lecitina o simplemente lecitina). Este componente es el principal responsable de disminuir la tensión superficial y dar estabilidad al alvéolo. La dipalmitoil-fosfatidilcolina tiene un extremo polar e hidrofílico, dado por el residuo colina, el cual se orienta hacia el líquido alveolar, y un extremo no polar e hidrofóbico, dado por las cadenas de ácido palmítico, que se orienta hacia el aire.

El 10% del surfactante pulmonar está constituido por las apoproteínas SP-A, SP-B, SP-C y SP-D asociadas a los lípidos. Estas proteínas regulan la estructura, propiedades biofísicas y metabolismo de las lipoproteínas. La proteína SP-A es una proteína multimérica que tiene un peso molecular de 26 a 38 kDa. Esta apoproteína tiene un papel muy importante en el ensamblaje y mantenimiento de

la monocapa alveolar ya que controla la secreción y captación del surfactante pulmonar por los neumocitos tipo II. La SP-A también juega un papel en la inmunomodulación, aumentando la migración y capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares (19). La SP-A media la actividad micoplásmica de los macrófagos alveolares (20) e interviene en la eliminación del *Streptococcus* del grupo B. El factor de necrosis tumoral alfa inhibe el RNA mensajero y la síntesis de SP-A, por lo que podría ser un factor para el SDR; mientras que, en fetos con corioamnionitis, la elevación de la interleukina-6 promueve la maduración pulmonar fetal induciendo la síntesis de SP-A y disminuyendo el SDR en los neonatos (21). La SP-A también inhibe la secreción de fosfatidilcolina y facilita la captación de fosfolípidos por los neumocitos tipo II. Los fosfolípidos y la SP-A se secretan coordinadamente al alvéolo (22).

La apoproteína SP-B se secreta en forma independiente de los CL. La forma madura de la proteína tiene un peso molecular de 7 a 8 kDa y tiene una distribución periódica de residuos polares y no polares característicos de proteínas asociadas a superficies de membrana de las interfases aire/líquido (22).

La secreción del surfactante ocurre mediante exocitosis de los CL. El proceso ocurre por fusión de la membrana limitante que rodea los CL con la membrana plasmática del los neumocitos tipo II. La secreción *in vitro* del surfactante es estimulada por los agonistas β -adrenérgicos, catecolaminas, adenosina y toxina del cólera, agentes éstos que activan la adenilciclase e incrementan el AMP cíclico (AMPc). La síntesis de surfactante es estimulada también por glucocorticoides, prolactina, hormonas tiroideas, insulina y estrógenos (22, 23).

La depuración del surfactante de los alvéolos puede ocurrir por varias vías incluyendo ingestión por macrófagos alveolares, ascenso a las vías

aéreas, degradación enzimática en la superficie alveolar y re-captación por neumocitos tipo II y otras células. El surfactante puede ser internalizado nuevamente a los CL y secretado; un 25 a 95% del surfactante pulmonar hace reciclaje (24).

2. Las vías metabólicas de síntesis de fosfolípidos del surfactante

La concentración de fosfatidilcolina (lecitina) en el líquido amniótico es menor que la de esfingomielina hasta la semana 30 de la gestación; entre las semanas 30 y 32 de gestación la concentración de ambos fosfolípidos se iguala y después de la semana 32 continúa aumentando la producción de lecitina, mientras que la producción de esfingomielina disminuye. La producción de lecitina es máxima a la semana 35 de gestación. Se acepta que una relación $L/E \geq 2$ es indicativa de madurez pulmonar fetal (25). El fosfatidilglicerol (FG) aparece normalmente alrededor de la semana 35 de gestación y aumenta progresivamente hasta el término de la gestación. El fosfatidilinositol (FI) aumenta después de la semana 30 de gestación, alcanza un pico a las semanas 36 a 37 y luego disminuye gradualmente (26).

Las enzimas necesarias para la síntesis de los fosfolípidos del surfactante se han localizado en los microsomas y en el citosol de los neumocitos tipo II²⁴. Existen por lo menos dos mecanismos para la síntesis de dipalmitoil-fosfatidilcolina: 1) la síntesis de novo a partir de diacilgliceroles saturados y 2) la deacilación y reacilación de fosfatidilcolina 1-saturada-2-insaturada que involucra a la fosfolipasa A2 y a las aciltransferasas (27).

La enzima limitante de la tasa es la CTP:colinafosfato-citidiltransferasa. Esta enzima puede ser regulada por procesos de fosforilación-defosforilación dependientes del AMPc y por mecanismos dependientes de proteína quinasa C. Las sustancias que

aumentan la formación de AMPc o activan la proteína quinasa C estimulan la secreción de CL. El FG y el FI se sintetizan a partir del CDP-diacilglicerol. El FG se sintetiza en las mitocondrias (28).

Hay dos vías de síntesis de la lecitina (fosfatidilcolina):

1. La “vía de la fosfocolintransferasa” que se inicia con la fosforilación de la colina a fosfocolina utilizando el ATP como donador del fosfato. Luego la fosfocolina se transforma en citidilfosfocolina utilizando como donador al citidiltrifosfato (CTP). Finalmente, la citidilfosfocolina y el diacilglicerol, el cual proviene del ácido fosfatídico, son los substratos de la enzima fosfotransferasa de colina para dar como producto final a la fosfatidilcolina. Esta vía se activa a las 35 semanas de gestación.
2. La “vía de la transferasa de metilo” utiliza un producto no tensioactivo, la fosfatidiletanolamina que, por acción de la enzima metiltransferasa produce palmitoilmiristoillecitina. Se activa desde la semana 22 a 24 de la gestación y aumenta hasta el término e incluso después del parto (29).

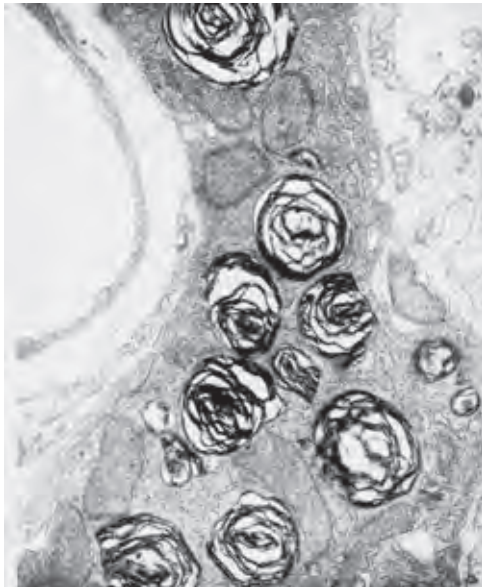
Por su lado, el FG se sintetiza por la vía del ácido fosfatídico. En el primer paso el ácido fosfatídico se convierte en citidilfosfodiácilglicerol utilizando como donador al CTP, posteriormente este compuesto se transforma en fosfato de fosfatidilglicerol el cual se convierte finalmente en FG.

3. Los cuerpos lamelares

Los CL son estructuras subcelulares que se han detectado en varios tipos de células tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Los CL producidos por los neumocitos tipo II son los más conocidos (figura 2). Un neumocito tipo II promedio contiene 150 ± 30 CL y la tasa de secreción basal

in vivo es de aproximadamente 15 CL por hora en el pulmón de rata. Los CL se observan en los neumocitos tipo II fetales del humano desde las semanas 20 a 24 de gestación y se encuentran en LA desde la semana 26 de gestación (30).

Figura 2. Cuerpos lamelares del neumocito tipo II



Tomado de: library.luhs.org/.../Vol%203/slides/image18.html

En general los CL son organelas especializadas para almacenamiento y secreción de ciertos lípidos, como ocurre con el sistema surfactante de los neumocitos tipo II, y para las capas sellantes impermeables de las células epiteliales de la piel, la capa hidrofóbica de la mucosa gástrica y la lubricación de las articulaciones (22, 28). Muchos otros tipos de células de origen epitelial producen CL en condiciones normales. Estas organelas se observan en condiciones patológicas tales como: alteraciones genéticas del metabolismo de los lípidos, durante la curación de heridas, procesos

degenerativos del cerebro o del sistema nervioso y por efecto de drogas tóxicas (22).

Los CL pueden estar rodeados por una membrana y tener un núcleo compuesto de membranas multilamelares. Estas estructuras contienen enzimas lisosomales y apolipoproteínas que regulan su función e integridad. Para su formación es posible que el material membranoso, proveniente del retículo endoplásmico, de las mitocondrias o de otras estructuras, sea dirigido por el aparato de Golgi hacia los CL. Los componentes lipídicos que se incorporan a los CL se originan en diferentes sitios: la fosfatidilcolina en el retículo endoplásmico, la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina en las mitocondrias, la esfingomiélin en el aparato de Golgi y el colesterol en el retículo endoplásmico o por endocitosis (22). Se ha encontrado que la proteína ABCA3 (ATP-binding cassette protein 3) transporta los lípidos a través de la membrana celular o de la membrana limitante de los CL. Para enriquecer los CL en fosfatidilcolina esta proteína podría transportar la fosfatidilcolina hacia los CL o extraer fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélin o esfingolípidos de los CL (31).

La secreción del surfactante ocurre por exocitosis de los CL, proceso que inicia con la fusión de membranas. El calcio interviene en el acoplamiento entre el estímulo y la secreción y en el mecanismo de la exocitosis de los CL (32). Después de la fusión de las membranas, ocurre recuperación de las proteínas de la membrana de los CL hacia el interior de los neumocitos tipo II; ambos procesos pueden estar regulados en forma concurrente (33). La internalización de la proteína SP-A requiere de la clatrina (14,33) lo que sugiere que la SP-A actúa con los neumocitos tipo II por la vía clásica de endocitosis mediada por receptor (34). Los componentes de la membrana son redistribuidos entre los CL pre-existentes en la célula (16).

4. Riesgos y beneficios de los corticoides antenatales

Desde la publicación de Liggins y Howie en 1972 (35), se ha demostrado en varios experimentos controlados que la administración antenatal de corticoides en gestantes con parto pretérmino tiene beneficios a corto plazo, tales como, disminución de en un 40% de la mortalidad, disminución del SDR y disminución de la hemorragia intracraneal de los neonatos (36). Los glucocorticoides aumentan los mRNA y la síntesis de SP-A y SP-B, así como el contenido de sintetasa de ácidos grasos, colágeno y elastina en el pulmón fetal (22). En muchas especies los corticoides aumentan la síntesis de los fosfolípidos mayores del surfactante por aumento de la actividad de enzimas de la síntesis de los lípidos tales como: colina-fosfotransferasa, fosfocolina-citidiltransferasa. Lisofosfatilcolina-aciltransferasa, sintetasa de ácidos grasos y glicerofosfato-fosfatidiltransferasa. Los corticoides también aceleran la aparición de los CL. En respuesta a los corticoides, los fibroblastos del pulmón producen Factor Fibroblasto-Neumocito que aumenta la producción de fosfolípidos por los neumocitos tipo II (35).

A pesar de que estudios con animales han mostrado disminución del crecimiento somático, cerebral y pulmonar cuando se usan corticoides antenatales (37), los experimentos aleatorizados en humanos han suministrado muy poca evidencia de efectos deletéreos (38,39). Doyle y colaboradores (40) analizaron a la edad de 14 años a 154 supervivientes quienes pesaron al nacer menos de 1.501 gramos, de los cuales 78 (51%) habían recibido una dosis de corticoides antenatales, encontrando mayores puntajes z para estatura, menor tasa de parálisis cerebral y mayor cociente intelectual en los niños que recibieron corticoides antenatales. No encontraron diferencias en la función pulmonar entre el grupo que había recibido corticoides y el grupo control.

C. PRUEBAS DE MADURACIÓN PULMONAR FETAL

Las pruebas de maduración pulmonar fetal se realizan en muestras de LA obtenidas por amniocentesis. La prueba más frecuentemente usada es la relación L/E. Además se han descrito otros métodos tales como: la prueba de Clements, la determinación del FG, la absorbancia del LA a 650 nm, la fluorescencia polarizada, la microviscosidad del LA, métodos de inmunoaglutinación y enzimáticos para medir lecitina y esfingomielina, la espectrofotometría para determinar los fosfolípidos que contienen colina y el recuento de CL. Las pruebas más utilizadas son las siguientes:

1. Relación lecitina/esfingomielina

A la semana 20 de gestación la concentración de lecitina en LA es muy baja, alrededor del 21% del total de lípidos; mientras que la concentración de esfingomielina es del 51%. Al avanzar la gestación el nivel de esfingomielina permanece casi constante mientras que el de lecitina continúa aumentando, incrementándose en forma aguda después de la semana 35. Así, en el pulmón maduro la lecitina comprende del 50 al 80% del total de los fosfolípidos del surfactante. El nivel constante de esfingomielina proporciona un estándar interno para comparación con la lecitina, que constituye la base de la prueba.

La concentración de lecitina y esfingomielina se determinan por el método de Gluck y colaboradores (25) utilizando separación por cromatografía en capa fina. La razón L/E descrita por estos autores se considera como el patrón de oro para determinar la madurez pulmonar fetal. Los valores críticos de la relación L/E en función de la madurez pulmonar fetal se dividen en tres categorías: inmadura, transicional y madura. Una relación $L/E \leq 1.5$

indica inmadurez, una relación L/E entre 1.5 y 1.9 indica una condición transicional y una relación L/E de 2 a 2.5 o mayor indica madurez.

La relación L/E puede dar falsos positivos particularmente en gestantes con diabetes gestacional y con diabetes mellitus tipo 2 (41). Por esta razón se han utilizado puntos de corte más altos (relación L/E ≥ 2.5 o > 3) para indicar madurez pulmonar fetal en embarazos complicados con diabetes (42). La prueba practicada en muestras de LA contaminadas con meconio o sangre materna o fetal también pueden dar falsos positivos (relación L/E ≥ 2) (43). Por otro lado, determinar la relación L/E es un proceso complejo, que requiere entrenamiento específico y es muy poco disponible, aún en instituciones de alta complejidad.

2. Prueba de Clements

La prueba de agitación o de estabilidad de la espuma fue descrita en 1972 por Clements (44). La prueba se basa en el hecho de que los compuestos tensioactivos del surfactante tienen la capacidad de formar burbujas al agitarse en presencia de etanol. Para realizarla se hacen diluciones sucesivas de LA en etanol al 95% que se mezclan en diferentes proporciones, se agitan y se dejan en reposo, pasado el tiempo de reposo se observa la formación de burbujas estables en la interfase líquido-aire. Cuando hay un anillo completo y estable de burbujas en los tubos que tienen diluciones 1:2 o mayores de LA hay madurez pulmonar fetal (26). La prueba de Clements puede ser útil cuando no se disponga de otros métodos por su alto valor predictivo positivo (99% a 100%); sin embargo, se han informado valores predictivos negativos desde un 10% hasta un 92%¹. La sensibilidad de las pruebas de maduración pulmonar fetal puede aumentar cuando se realizan en paralelo. La prueba

de Clements también se altera en presencia de sangre, meconio u oligoamnios (44).

3. Determinación de fosfatidilglicerol

El FG se determina por cromatografía bidireccional en capa fina (26). Este fosfolípido aumenta desde la semana 35 hasta el término de la gestación y demostrar cualitativamente su presencia indica madurez pulmonar fetal en el 98% de los casos. La síntesis de FG se retrasa en fetos de madres con diabetes gestacional; sin embargo, su presencia en estos casos indica maduración pulmonar fetal (45). En otros casos, como en ruptura prematura de membranas y en pre-eclampsia, el FG puede aparecer antes de la semana 35 de gestación. A pesar de las ventajas aparentes que tiene esta prueba, se han informado casos en los cuales ocurrió SDR en presencia de FG; por otro lado, su ausencia no significa que sea inevitable el SDR (46).

4. Absorbancia del líquido amniótico a 650 nanómetros

A medida que aumenta la concentración de CL se incrementa la absorbancia del LA a 650 nm. Una absorbancia ≥ 0.15 indica madurez pulmonar fetal. Aunque el método es fácil de realizar y tiene un elevado valor predictivo positivo, tiene una proporción de falsos negativos muy alta, cercana al 80% (47).

5. Fluorescencia polarizada

Consiste en determinar por fluorescencia la relación surfactante-albúmina. Cuando el resultado de fluorescencia polarizada es < 0.260 indica madurez pulmonar (48). La prueba es sencilla, pero el valor predictivo negativo es relativamente bajo (61%).

6. Microviscosidad del líquido amniótico

Se determina por fluorescencia polarizada y se fundamenta en el hecho de que la viscosidad del LA declina desde la semana 32 de la gestación en adelante. Tiene una proporción de falsos negativos muy alta.

7. Determinación de fosfolípidos que contienen colina

Schosinsky y colaboradores (49) describieron un método para determinar los fosfolípidos que contienen colina. El método se basa en la acción de la fosfolipasa D sobre los fosfolípidos, reacción que libera colina. Este compuesto es oxidado, por la colina-oxidasa, a betaína con la producción simultánea de peróxido de hidrógeno el cual se oxida a fenol: éste se acopla a la 4-aminofenazona produciendo un cromógeno rojo que se mide por espectrofotometría a 500 nm. La intensidad del color a 500 nm es directamente proporcional a la concentración de fosfolípidos que contienen colina. La sangre y la bilirrubina producen cierto grado de interferencia.

Dado que algunos autores consideran que la concentración de lecitina es una alternativa adecuada para evaluar la madurez pulmonar (50). Schosinsky y colaboradores hicieron un análisis comparativo de su método con la determinación de lecitina por un método enzimático, encontrando un coeficiente de correlación de 0,945. El método es sencillo, económico, preciso y requiere poco volumen de muestra, pero aún se necesita evaluar su utilidad clínica.

8. Recuento de cuerpos lamelares

Los CL tienen un tamaño similar al de las plaquetas por lo que puede determinarse su concentración en LA utilizando el canal de plaquetas de

los contadores automáticos de hematología (51). El método fue descrito en 1989 por Dubin usando contadores hematológicos que registran un tamaño de partículas ≥ 1.7 fL (52). El recuento de CL puede compararse con las pruebas de absorbancia del LA debido a que la dispersión de la luz, causada por los CL en suspensión, es la responsable del color turbio del LA de los fetos maduros.

El recuento de CL no se afecta cuando el LA está contaminado con cantidades pequeñas de meconio, aunque aumenta falsamente cuando está presente una cantidad considerable (53). El recuento también aumenta falsamente con la presencia de moco (53) lo que limita su utilización en muestras obtenidas por vía vaginal. La sangre completa puede reducir falsamente el recuento de CL, mientras que la sangre lisada osmóticamente puede aumentarlo. El recuento de LA no parece alterarse por la conservación refrigerada del LA hasta por dos semanas (54).

El resultado del recuento de CL se informa como número de CL/ μ L de LA. En general, un recuento > 50.000 CL/ μ L concuerda con una relación L/E > 2.0 en el 70% de los casos. Sin embargo, se han descrito varios puntos de corte para determinar madurez pulmonar fetal y, en consecuencia, diferentes características operativas de la prueba. Dubin (52) recomienda un punto de corte de 26.000 CL/ μ L para LA centrifugados y de 40.000 CL/ μ L para LA no centrifugados; Lee y colaboradores (55) informaron una sensibilidad del 100% y una especificidad del 80% con un punto de corte de 50.000 CL/ μ L y, en nuestro medio, Cifuentes (56) informó un valor predictivo positivo del 94% y un valor predictivo negativo del 82% utilizando un punto de corte de 16.000 CL/ μ L*. Finalmente, un meta-análisis de Wijnberger LD y colaboradores (57) informó una sensibilidad entre el 71 y el 100% y una especificidad entre el 73 y el 100%. Estos autores informaron que las curvas de las caracte-

rísticas operativas del receptor (curvas ROC) para la predicción del SDR del recién nacido, mostraban un desempeño ligeramente mejor del recuento de CL que la relación L/E (58).

El recuento de CL es una técnica sencilla, de bajos costos y con buenas características operativas, por lo que se ha considerado como la primera elección para el estudio de la madurez pulmonar fetal (58). No obstante, además de las esperadas diferencias en las características operativas obtenidas con distintas prevalencias y diversos puntos de corte, se han obtenido resultados discordantes según si hay o no centrifugación (58), cuando hay diferencias en las técnicas de centrifugación (59) y cuando se usan diferentes tipos de contadores de hematología para hacer el conteo de CL. Un estudio comparativo encontró que el Sysmex XE-2100 (Sysmex) mostró la mejor concordancia (86%) con el Coulter Gen-S (Beckman Coulter), seguido por el ADVIA 120 (Bayer Corporation) (78%), y que la concordancia del Celdyn 3500 (Abbott Laboratorios) con el Coulter Gen-S fue del 66% (59). Por estas razones se requiere que las instituciones investiguen las características operativas de la prueba y establezcan el punto de corte apropiado para su laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Alfredo Jácome, por la revisión, comentarios, sugerencias y correcciones a este trabajo.

REFERENCIAS

- Sadler TW. Capítulo 13. Aparato respiratorio. En: Sadler TW. *Langman Embriología Médica*. Editorial Médica Panamericana - Williams & Wilkins. Bogotá. Sexta Edición. 1993. pp.234-241.
- McMurtry IF. Editorial: Introduction: pre- and post-natal lung development, maturation, and plasticity. *AJP - Lung* 2002; 282:341-344.
- Kling DE, Lorenzo HK, Trbovitch AM, Kinane TB, Donahoe PK, Schnitzer JJ. MEK-1/2 inhibition reduces branching morphogenesis and causes mesenchymal cell apoptosis in fetal rat lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L370-L378.
- Young SL, Evans K, Eu JP. Nitric oxide modulates branching morphogenesis in fetal rat lung explants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L379-L385.
- Strayer M, Savani RC, Gonzales LW, Zaman A, Cui Z, Veszelszky E, et al. Human surfactant protein B promoter in transgenic mice: temporal, spatial, and stimulus-responsive regulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L394-L404.
- Willet KE, Kramer BW, Kallapur SG, Ikegami M, Newnham JP, Moss TJ, et al. Intra-amniotic injection of IL-1 induces inflammation and maturation in fetal sheep lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L411-L420.
- Srinivasan S, Strange J, Awonuson F, Bruce MC. Insulin-like growth factor I receptor is downregulated after alveolarization in an apoptotic fibroblast subset. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282: L457-L467.
- Hednick HL, Kaban JM, Pacheco BA, Losty PD, Doody DP, Ryan DP, et al. Prenatal glucocorticoids improve pulmonary morphometrics in fetal sheep with congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 217-221.
- Ijsselstijn H, Pacheco BA, Albert A, Sluiter W, Donahoe PK, de Jongste JC, et al. Prenatal hormones alter antioxidant enzymes and histology in rats with congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol* 1997; 272: L1059-L1065.
- Willet KE, Jobe AH, Ikegami M, Kovar J, Sly PD. Lung morphometry after repetitive antenatal glucocorticoid treatment in preterm sheep. *Am J Respir Int Care Med* 2001; 163: 1437-1443.
- Boland R, Joyce BJ, Wallace M, Stanton H, Fosang AJ, Pierce RA, et al. Cortisol enhances structural maturation of the hypoplastic fetal lung in sheep. *J Physiol* 2003; 554: 505-517.
- Avery ME. Surfactant Deficiency in Hyaline Membrane Disease. The Story of Discovery. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1074-1075.
- Avery ME, Mead J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *Am. J. Dis. Child* 1959; 97:517.
- Schaller-Bals S, Bates SR, Notarfrancesco K, Tao J-Q, Fisher AB, Shuman H. Surface-expressed lamellar body membrane is recycled to lamellar bodies. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L631-L640.

15. Tierney, DE. Lung surfactant: some historical perspectives leading to its cellular and molecular biology. *Am J Physiol* 1989; 257: L1-L12.
16. Mendelson CR, Giggaram V. Hormonal control of the surfactant system in fetal lung. *Ann Rev Physiol* 1991; 53: 415-440.
17. Wright JR, Clements JA. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Resp Dis* 1987; 135: 426-444.
18. Rooney SA. The surfactant system and lung phospholipid biochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 439-460.
19. Manz-Keinke H, Plattner H, Schlepper-Schaper J. Lung surfactant protein-A enhances serum-independent phagocytosis of bacteria alveolar-macrophage. *Eur J Cell Biol* 1992; 57: 95-100.
20. Hickman-Davis J, Gibas-Erwin J, Lindsey JR, Matalon S. Surfactant protein A mediates mycoplasma-cidal activity of alveolar macrophages by production of peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4953-4958.
21. Shimoya K, Taniguchi T, Matsuzaki N, Moriyama A, Murata Y, Kitajima H, Fujimura M, Nakayama M. Chorioamnionitis decreased incidence of respiratory distress syndrome by elevating fetal interleukin-6 serum concentration. *Hum Reprod* 2000; 15(10):2234-2240.
22. Schmitz G, Muller G. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res* 1991; 32: 1539-1570.
23. Chander A, Fisher AB. Regulation of lung surfactant secretion. *Am J Physiol* 258 (Lung Cell. Mol. Physiol. 2): L241-L253, 1990. Kalina M, Socher R. Internalization of pulmonary surfactant into lamellar bodies of cultured rat pulmonary type II cells. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 483-492.
24. Kalina M, Socher R. Internalization of pulmonary surfactant into lamellar bodies of cultured rat pulmonary type II cells. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 483-492.
25. Gluck L, Kulovich M, Borer RC Jr, Keidel WN. The interpretation and significance of the lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1974; 120: 142-156.
26. Hallman M, Kulovich MV, Kirkpatrick E, Sugarman RG, Gluck L. Phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol in amniotic fluid: indices of lung maturity. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 125:613-617.
27. Rustow B, Kunze, D. Diacylglycerol synthesized in vitro from glycerol-3-phosphate and the endogenous diacylglycerol are different substrate pools for the biosynthesis of phosphatidylcholine in rat lung microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 835: 273-278.
28. Harding PGR, Chan F, Casola PG, Fullows GF, Wong T, Possmayer F. Subcellular distribution of enzymes related to phospholipid synthesis in developing rat lung. *Biochim Biophys Acta* 1983; 750: 373-382.
29. Nájuez H, Ruiz AI, Bautista A, Angel E. Capítulo 23. Maduración Pulmonar Fetal. En: Nájuez H, Ruiz AI y colaboradores: *Texto de Obstetricia y Perinatología. Una contribución a la enseñanza del arte, ciencia y tecnología.* Universidad Nacional de Colombia, Instituto Materno Infantil. 1ª. Edición. Lito Camargo Limitada, Bogotá, agosto de 1999. pp. 359-369.
30. Snyder JM, Mendelson CR, Johnston JM. The morphology of lung development in the human fetus. In: Nelson GH, ed. *Pulmonary development: transition from intrauterine to extrauterine life.* New York: Marcel Dekker, 1985: 19-46.
31. Mulugeta S, Gray JM, Notarfrancesco KL, Gonzales LW, Koval M, Feinstein SI, et al. Identification of LBM180, a lamellar body limiting membrane protein of alveolar type II cells, as the ABC transporter protein ABCA3. *J Biol Chem* 2002; 277 (25): 22147-22155.
32. Haller T, Auktor K, Frick M, Mair N, Dietl P. Threshold calcium levels for lamellar body exocytosis in type II pneumocytes. *Am J Physiol* 1999; 277 (Lung Cell. Mol. Physiol. 21): L893-L900.
33. Bates SR, Tao J-Q, Schaller S, Fisher AB, Shuman H. Lamellar body membrane turnover is stimulated by secretagogues. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol* 2000; 278: L443-L452.
34. Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR. Endocytosis. *Physiol Rev* 1997; 77: 759-803.
35. Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 1972; 50:515-525.
36. Crowley PA. Prophylactic corticosteroids for preterm delivery: Cochrane review. In: *The Cochrane Library*, I. Oxford, UK: Update Software; 1999.
37. Taeusch HW Jr. Glucocorticoid prophylaxis for respiratory distress syndrome: a review of potential toxicity. *J Pediatr* 1975; 87:617-623.
38. Collaborative Group on Antenatal Steroid Therapy. Effects of antenatal dexamethasone administration in the infant: long-term follow-up. *J Pediatr* 1984; 104:259-267.
39. Schmand B, Neuvel J, Smolders-deHaas H, Hoeks J, Treffers PE, Koppe JG. Psychological development of children who were treated antenatally with corticosteroids to prevent respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1990; 86:58-64.

40. Doyle LW, Ford GW, Rickards AL, Kelly EA, Davis NM, Callanan C, Olinsky A. Antenatal Corticosteroids and Outcome at 14 Years of Age in Children With Birth Weight Less Than 1501 Grams. *Pediatrics* 2000; 106(1): E2.
41. Gabbe SG, Graves CR. Management of Diabetes Mellitus Complicating Pregnancy. *Obstet Gynecol* 2003; 102: 857-68.
42. Gómez G. Capítulo 37. Diabetes y Embarazo. En: Cifuentes R. *Obstetricia de Alto Riesgo*. Sexta Edición. Editorial Distribuna, Bogotá. 2006. pp. 521-538.
43. Ruhl WC, Spellacy WN. Effects of blood or meconium on the determination of the amniotic fluid lecithin/sphingomyelin ratio. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 121: 321-328.
44. Clements JA, Platzker AC, Tierney DF, Hobel CJ, Creasy RK, Margolis AJ, et al. Assessment of the risk of the respiratory-distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. *New Engl J Med* 1972; 286: 1077-1081.
45. Parra MO, Peralta MT. Capítulo 14. Diabetes y Gestación. En: Gómez PI, Ruiz AI (Eds): *Temas de Interés en Ginecología y Obstetricia*. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina. Departamento de Ginecología y Obstetricia. Instituto Materno Infantil, Santa Fé de Bogotá, D.C. Litocamargo, Bogotá. 1999. pp. 157-169.
46. Cunningham MD, McKean HE, Gillispie DH, Greene JW Jr. Improved prediction of fetal lung maturity in diabetic pregnancies: a comparison of chromatographic methods. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 142(2): 197-204.
47. Dubin SB. The laboratory assessment of fetal lung maturity. *Am J Pathol* 1992; 97: 836-843.
48. Herbert WN, Chapman JF, Schonoor MM. Role of the TDX-FLM assay in fetal lung maturity. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 808-818.
49. Schosinsky K, Jiménez M, Olivia Dimas C. Determinación enzimática de fosfolípidos que contienen colina en líquido amniótico. *Rev Costarric Cienc Méd.* [online]. jun. 1998, vol.19, no.1-2 [citado 24 Marzo 2006], p.71-85. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29481998000100007-&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0253-2948.
50. Falconer GF, Hodge JS, Gadd RL. Influence of amniotic fluid volumen on lecithin estimation in prediction of respiratory distress. *BMJ* 1973; ii:689-694.
51. Fakhoury G, Daikoku NH, Benser J, Dubin NH. Lamellar body concentrations and the prediction of fetal pulmonary maturity. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 72-76.
52. Dubin SB. Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity. *Clin Chem* 1989; 35: 612-616.
53. Ashwood ER, Palmer EE, Taylor JS, Pingree SS. Lamellar body counts for rapid fetal lung maturity testing. *Obstet Gynecol* 1993; 81:619-624.
54. Ashwood ER, Oldroyd RG, Palmer SE. Measuring the number of lamellar body particles in amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 289-292.
55. Lee IS, Cho YK, Kim A, Min WK, Kim KS, Mok JE. Lamellar body count in amniotic fluid as a rapid screening test for fetal lung maturity. *J Perinatol* 1996;16:176-180.
56. Cifuentes R. Evaluación de la madurez pulmonar fetal. En: Cifuentes R. *Obstetricia de Alto Riesgo*. 5ª. Edición. 2000. p. 451-466.
57. Wijnberger LD, Huisjes AJ, Voorbij HA, Franx A, Bruinse HW, Mol BW. The accuracy of lamellar body count and lecithin/sphingomyelin ratio in the prediction of neonatal respiratory distress syndrome: a meta-analysis. *BJOG*. 2001;108:583-8.
58. Cifuentes R. Capítulo 23. Evaluación de la Madurez Fetal. En: Cifuentes R. *Obstetricia de Alto Riesgo*. Sexta Edición. Editorial Distribuna, Bogotá. 2006. p. 327-338.
59. Szallasi A, Gronowski AM, Eby CS. Lamellar body count in amniotic fluid: a comparative study of four different hematology analyzers. *Clinical Chemistry* 2003; 49:994-997.