

Valoración del daño cerebral tras la administración de surfactante

Brain damage assesment after surfactant administration

Murgia X¹, Rey Santano C¹, Ruiz del Yerro E¹, Mielgo V¹, Andrés L², Valls i Soler A³

¹ Unidad de Investigación en Neonatología. ² Departamento de Anatomía Patológica. ³ Unidad Neonatal, Hospital Universitario de Cruces, Bilbao. España.

Resumen

Objetivo: La terapia de reemplazo de surfactante se asocia frecuentemente a fluctuaciones del flujo sanguíneo cerebral (FSC). Presentamos la administración de surfactante nebulizado para evitar las fluctuaciones del FSC.

Métodos: El estudio se llevó a cabo en muestras cerebrales (congeladas y fijadas) de corderos prematuros que recibieron surfactante instilado (SFinstil, administración clásica) o surfactante nebulizado (SFneb). Se analizaron el FSC regional, la actividad de las enzimas antioxidantes, el Factor de Necrosis Tumoral (TNF α) y el número de células apoptóticas (TUNEL). También se realizó una valoración semi-cuantitativa del daño cerebral por un anatómo-patólogo. Se analizaron zonas corticales (corteza frontal y occipital), zonas internas (tálamo, estriado e hipocampo), el cerebelo y el bulbo cefalorraquídeo.

Resultados: La administración de surfactante nebulizado produjo una respuesta hemodinámica cerebral diferente a la instilación intratraqueal, especialmente en las zonas internas donde a los cinco minutos el FSC registrado resultó ser significativamente superior en el grupo SFinstil. No se registraron diferencias significativas en la actividad de las enzimas antioxidantes. El porcentaje de células positivas para TNF α y el número de células TUNEL positivas en las zonas internas fue significativamente superior en el grupo SFinstil ($p < 0.05$). La valoración histológica determinó un mayor grado de necrosis neuronal ($p < 0.05$) en el tálamo en el grupo SFinstil.

Conclusión: La administración de surfactante en forma de aerosol debería tenerse en cuenta como una alternativa menos agresiva a la instilación intratraqueal.

Palabras clave:

Prematuridad, surfactante, nebulización, flujo cerebral.

Abstract

Objective: Surfactant replacement therapy has been associated with cerebral blood flow (CBF) fluctuations. We propose the administration of aerosolized surfactant to prevent those fluctuations.

Methods: Brain samples (frozen and paraffin-fixed) of preterm lambs received instilled surfactant (SFinstil, common administration) or aerosolized surfactant (SFneb). Regional CBF, the activity of antioxidant enzymes, the number of TNF α positive cells and the number of apoptotic cells (TUNEL) were determined. In addition, a semi-quantitative histological evaluation was performed by an expert pathologist. Cortical zones (frontal and occipital), inner zones (thalamus, striatum and hippocampus), cerebellum and the brain stem were analyzed.

Results: Surfactant delivered as an aerosol produced a different cerebral hemodynamic response than surfactant instillation, especially towards the inner zones, where already five minutes after the start of the therapy the regional CBF was significantly higher in the SFinstil group. There were no differences between groups in the activity of antioxidant enzymes. The percentage of TNF α positive cells and the number of TUNEL positive cells in the inner zones was significantly higher in the SFinstil group. The histological score also showed a significantly higher necrosis in the SFinstil group compared to the SFneb group.

Conclusion: Surfactant delivered as an aerosol should be considered as a less harmful method of surfactant administration.

Key words:

Prematurity, surfactant, nebulization, cerebral fluctuations.

Correspondencia

X Murgia

Hospital Universitario de Cruces (Edif. Anat. Patol 2ª)
Plaza de Cruces s/n. 48903 Barakaldo. Vizcaya. España.
e-mail: xabier.murgiaesteve@osakidetza.net

Introducción

El surfactante pulmonar es una sustancia compuesta por lípidos y proteínas que recubre la superficie alveolar. En condiciones normales actúa sobre la interfaz aire-agua que se genera en los alveolos, ya que, por sus propiedades tensoactivas, reduce la tensión superficial al final de la espiración evitando el colapso pulmonar. En el humano su síntesis comienza en el último tercio de la gestación y, por lo tanto, la mayoría de los bebés prematuros, especialmente los de menor edad gestacional (menos de 30 semanas), no disponen de un reservorio de surfactante necesario para respirar por sí mismos y, en un buen número de ellos, se diagnostica el síndrome de distrés respiratorio (SDR).

A los bebés con el SDR establecido o con sospecha de desarrollarlo se les aplica, mediante instilación intratraqueal, surfactante natural exógeno, es decir, surfactante natural extraído de otros mamíferos a través del tubo endotraqueal. Esta terapia revolucionó el manejo clínico del SDR [1] dotando a los neonatólogos de una herramienta esencial para tratar esta patología. Sin embargo, desde su aprobación para uso clínico, la terapia de reemplazo de surfactante permanece, aún hoy, como un área de investigación muy activa.

Si bien es cierto que los ensayos clínicos demuestran que el surfactante exógeno mejora el intercambio gaseoso (O_2 y CO_2), disminuye la incidencia de neumotórax y reduce la mortalidad [2], también deben tenerse en consideración algunos de los aspectos negativos. En primer lugar, para la administración de surfactante es preceptiva la intubación del bebé, que en sí misma es una maniobra compleja que cada vez tiende más a evitarse en la medida de lo posible. Además, para lograr una mejor distribución y, por lo tanto, una mayor respuesta terapéutica, la dosis completa de surfactante (200 mg/Kg) debe instilarse de forma rápida, en menos de un minuto [3], y se han descrito episodios transitorios de hipoxia, desaturación e hipercapnia [4][5] debidos a la obstrucción del tubo endotraqueal o de las vías aéreas superiores inmediatamente tras la instilación. Además, derivados de estos efectos se han visto casos de hipotensión, anomalías en el electroencefalograma y fluctuaciones del flujo sanguíneo cerebral (FSC) [4] que deben tenerse muy en cuenta debido a que la frágil vasculatura de los bebés prematuros los predispone a sufrir daño cerebral, dejando, en muchas ocasiones, secuelas permanentes [6].

En un intento por reducir los efectos deletéreos de la terapia con surfactante, se han realizado diferentes iniciativas para administrar el surfactante de una forma más gradual. No obstante, tanto la infusión lenta y controlada por bomba [7], como la instilación de surfactante en dosis fraccio-

nadas [8] han fracasado como alternativas. El surfactante nebulizado es una forma de administración prometedora para el tratamiento del SDR [9] y podría evitar tanto la intubación de los bebés como la obstrucción de las vías aéreas y, por consiguiente, las fluctuaciones del FSC. Partiendo de muestras cerebrales de corderos prematuros, obtenidas en un estudio previo, hemos diseñado el presente experimento para evaluar el daño cerebral tras la administración de surfactante tanto de forma tradicional (instilado) como de forma nebulizada.

Material y métodos

Las muestras cerebrales utilizadas en este estudio derivan de experimentos in vivo llevados a cabo en corderos prematuros en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Cruces en el periodo comprendido entre 2007 y 2010. Los experimentos llevados a cabo en animales cumplieron estrictamente la legislación vigente en lo que respecta a la investigación con animales (RD1201/2005).

Los corderos prematuros fueron extraídos mediante cesárea y trasladados a la unidad neonatal experimental, donde después de la resucitación cardiopulmonar fueron aleatoriamente incluidos en uno de los dos grupos de estudio [10]. Al igual que en los experimentos in vivo, las muestras obtenidas y analizadas en este estudio están divididas en dos grupos. Por un lado, el grupo de muestras SF instilado (SF instil) (n=7), compuesto por muestras de cerebro de corderos prematuros congeladas y fijadas que recibieron como tratamiento surfactante de forma clásica, es decir, instilación endotraqueal. Y por otro, el grupo compuesto por muestras SF nebulizadas (SF neb) (n=7) con muestras de cerebro de corderos prematuros congeladas y fijadas que recibieron como tratamiento SF intratraqueal nebulizado [11].

Utilizamos muestras congeladas a $-80^{\circ}C$ para la determinación de estrés oxidativo e inflamación, muestras fijadas en formol para la determinación del FSC regional (FSCr) y muestras fijadas en bloques de parafina para la valoración anatómico-patológica y la determinación de la muerte celular (TUNEL). Se analizaron diferentes zonas corticales (corteza frontal y occipital), zonas internas (tálamo, estriado e hipocampo), cerebelo y bulbo céfalo-raquídeo.

Determinación del FSCr mediante la técnica de las microesferas coloreadas

Para la determinación del FSCr se emplearon microesferas de 15 μm de diámetro de poliestireno coloreadas (Dye Track®, Triton Tech. Inc, San Diego, EEUU) [12][13], que fueron inyectadas en cuatro tiempos diferentes a través de

la arteria subclavia, cinco minutos después del inicio de la terapia, instilación o nebulización, y tras una hora, tres horas y seis horas después del inicio de la terapia. La infusión de 1 mL de microesferas (3×10^6 microesferas inyectadas) se realizó durante aproximadamente 60 segundos. De forma simultánea se realizó la medición del flujo de la arteria carótida (flujo de referencia). Debido a su tamaño (15 μm), las microesferas quedaron atrapadas en la microvasculatura cerebral. Este hecho permite recuperarlas *post mortem*, pudiendo así determinar el FSCr en los diferentes tiempos de inyección. Para ello, cada pieza fue pesada y disgregada con KOH 4M. Las microesferas presentes en la muestra disgregada fueron recuperadas usando filtros de 10 μm de poro mediante filtración por vacío. La determinación de la concentración de cada uno de los cuatro tipos de microesferas coloreadas introducidos en los diferentes intervalos se realizó mediante espectrofotometría (Hewlett-Packard, CA, EEUU) a cuatro longitudes de onda ($\lambda_{\text{blanco}} = 370 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{amarillo}} = 448 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{rojo}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{azul}} = 672 \text{ nm}$). Según la ley de Lambert-Beer, el valor de la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de microesferas presentes en cada muestra. Conociendo el número de microesferas recibidas por todo el cerebro (suma de las microesferas en todas las regiones), se calculó el porcentaje recibido por cada una de las regiones:

$\% \text{ recibido} = \text{número microesferas región} \times 100 / \text{número microesferas totales en cerebro}$

Finalmente, para la determinación del flujo recibido en cada una de las regiones, se tiene en consideración el flujo de referencia, que fue tomado en el momento exacto de la inyección de las microesferas y el peso de cada región a estudiar:

$\text{FSCr (mL} \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{min)} = \% \text{ recibido} \times Q_{\text{car}} \text{ (mL} \cdot \text{min}^{-1}) / \text{peso (g)}$

Determinación de TNF- α mediante citometría de flujo

Partiendo de tejido cerebral congelado, las muestras fueron sometidas a una descongelación gradual con el fin de preservar la integridad celular. Los tejidos fueron sometidos a dos ciclos de incubación con tripsina, seguidos por una disgregación mecánica suave con pipetas Pasteur preparadas para ello. Posteriormente, se efectuó la centrifugación a 1.500 g durante 10 minutos, a 4°C, de la que se descartó el sobrenadante. Los *pellets* celulares fueron re-suspendidos en alcohol frío al 60% para su posterior análisis.

Para el inmunoensayo se tomaron 300 μl del disgregado celular de cada región. Tras lavarlo con PBS y permeabilizarlo con PBS-tritón, la suspensión celular se incubó durante la noche con anti-TNF α específico ovino a una dilución

1/20 (AbD serotec, MorphoSys, EEUU). El revelado se llevó a cabo incubando la suspensión celular durante una hora con un anticuerpo secundario fluorescente recomendado por el fabricante del anticuerpo primario en una dilución de 1/200 (Alexa Fluor, AbD serotec MorphoSys, EEUU). En total fueron analizadas 10.000 células de cada región cerebral con el citómetro de flujo (Cytomics FC 5000 MCL, Beckman Coulter, EEUU).

Valoración del estrés oxidativo cerebral a través de la actividad de las enzimas antioxidantes

Para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes se realizó una homogenización agresiva (ruptura celular completa) del tejido cerebral en solución de *buffer* fosfato. Tras la homogenización, se centrifugaron las muestras a 15.000 g, durante 10 min en frío, y se recogieron los sobrenadantes para su análisis. La actividad de la catalasa se midió determinando la descomposición de H_2O_2 con el espectrofotómetro a 240 nm, teniendo en cuenta que se define como unidad de enzima (U) de catalasa a la cantidad de enzima que reacciona con 1 μmol de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$. Para ello, se realizó un ensayo en el que a 3 ml de tampón fosfato (con H_2O_2 al 30% v/w) se le añadieron 50 μL de la muestra problema (sobrenadante). Posteriormente, se midió durante dos minutos el incremento de la densidad óptica a 240 nm. De la misma forma, se llevaron a cabo ensayos de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) midiendo la reducción de H_2O_2 a H_2O por la GPx. Una unidad (U) de GPx se define como la cantidad de NADPH oxidado/min. Además, también se midió la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) mediante un *kit* comercial (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, EEUU). Una unidad (U) de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para conseguir la dismutación del 50% del radical superóxido.

Por último, se determinó el DNA en los sobrenadantes mediante una técnica fluorimétrica basada en la intercalación de un fluoróforo (Hoechst 33342) en la doble hebra del DNA. Los resultados de las enzimas antioxidantes se presentan como U/ μg de DNA.

Estudio histológico

Las muestras, divididas en las siete regiones previamente mencionadas, fueron deshidratadas, aclaradas e incluidas en parafina de forma automatizada (Citadel, Thermo scientific, MA, EEUU), y posteriormente se llevaron a cabo cortes de 5 μm de grosor en el micrótopo (Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Alemania) sobre portaobjetos previamente tratados con polilisina.

Marcado de células apoptóticas (TUNEL)

La valoración de la apoptosis se llevó a cabo mediante un *kit* comercial ApopTag (Intergene, NY, USA) por el método de marcaje in situ del DNA fragmentado o técnica de TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labelling*), que tiene su fundamento en la detección de la rotura del DNA internucleosomal, típica de la apoptosis. Las secciones de 5 µm de parafina fueron desparafinadas en xilol, hidratadas mediante concentraciones decrecientes de alcohol etílico (100%, 96%, 70%) y posteriormente pretratadas con 20 µg/mL de proteinasa K durante 30 minutos, a 37°C. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada incubando los bloques en H₂O₂ al 3% durante 15 minutos. Después de lavar con PBS y *buffer* de equilibrio, las secciones fueron incubadas con desoxi-transferasa terminal (TdT) a 37°C en cámara húmeda durante una hora. La reacción fue detenida mediante *stop buffer* durante 10 minutos. Después de varios lavados con PBS, la reacción fue revelada con diaminobenzidina (DAB, 10 mg/mL). Finalmente, las secciones fueron contrateñidas con verde de metilo y deshidratadas en etanol a concentraciones crecientes y citrosol, antes de ser montadas con medio de montaje.

La presencia de células apoptóticas se determinó teniendo en cuenta, además de la positividad, las características morfológicas típicas de la apoptosis. Se contaron todos los campos consecutivos en el microscopio (Olympus BX50) y el número total de células TUNEL positivas de cada espécimen. La cantidad de apoptosis se expresa como el número de células TUNEL+/mm².

Valoración histológica del daño cerebral

Secciones cerebrales de 5 µm de grosor montadas sobre portaobjetos fueron sometidas a una tinción de rutina con hematoxilina-eosina. Posteriormente, un patólogo experto no familiarizado con el diseño experimental valoró el daño cerebral observado en 20 campos a 20x utilizando los siguientes parámetros: necrosis neuronal (presencia de más de cinco células necróticas por campo) 0-20, edema (vacuolización del neuropilo) 0-3, inflamación (manguitos perivasculares inflamatorios) 0-3, hemorragia (microfocos hemorrágicos) 0-3 e infarto (presencia-ausencia) 0 o 1.

Análisis estadístico

En todas y cada una de las técnicas llevadas a cabo en el presente estudio, los resultados obtenidos se han analizado en primera instancia con las diferentes regiones cerebrales agrupadas en zonas corticales (corteza frontal y occipital), zonas internas (tálamo, estriado e hipocampo) y cerebelo y bulbo. Además, todas estas regiones se han analizado tam-

bién estadísticamente de forma individual. Todas las variables están representadas como la media ± desviación estándar. La comparación entre los grupos se realizó por medio de un análisis unifactorial de la varianza (ANOVA) con la corrección de Bonferroni-Dunn.

Resultados

Determinación del FSCr

La administración de surfactante en forma de aerosol produjo una respuesta hemodinámica cerebral diferente a la instilación intratraqueal. Cinco minutos después de iniciar la terapia con surfactante, e independientemente de la región analizada, los animales tratados con surfactante instilado mostraban un mayor FSC que los tratados con SF nebulizado (Figura 1). Aunque no se registraron diferencias significativas en términos de FSC en las zonas corticales, si se observaron diferencias significativas en el cerebelo y bulbo cefalorraquídeo a los 180 y 360 minutos, y en las zonas internas a los cinco minutos y a los 180 minutos. En todos estos casos, el FSC registrado fue significativamente mayor en el grupo de surfactante instilado.

En lo que a las zonas internas se refiere, la instilación de surfactante produjo un aumento significativo del FSC en el tálamo y en el hipocampo en comparación con el grupo tratado con surfactante nebulizado, incluso tan pronto como cinco minutos después de haber iniciado ambas terapias. Además, también se hallaron diferencias significativas en el tálamo a los 180 minutos y en el hipocampo a los 360 minutos.

Determinación de TNF-α mediante citometría de flujo

En relación a los datos de TNFα, éstos se presentan, por un lado, como el porcentaje de células que han demostrado positividad para el anticuerpo en el inmunoensayo, y por otro, como la mediana de intensidad de fluorescencia. Para valorar la intensidad de fluorescencia se ha optado por la mediana de intensidad ya que presenta la ventaja de no estar afectada por los valores de intensidad extremos, que son frecuentes en citometría de flujo.

En lo que al número de células positivas para TNFα se refiere, no se registraron diferencias significativas ni en las zonas corticales, ni en el cerebelo-bulbo (Figura 2) entre los grupos estudiados. Por el contrario, el número de células positivas para TNFα registradas en el grupo tratado con surfactante instilado resultó ser significativamente superior a las observadas en los animales tratados con surfactante nebulizado. En conjunto, no se observaron diferencias significativas en las zonas corticales, ni en las

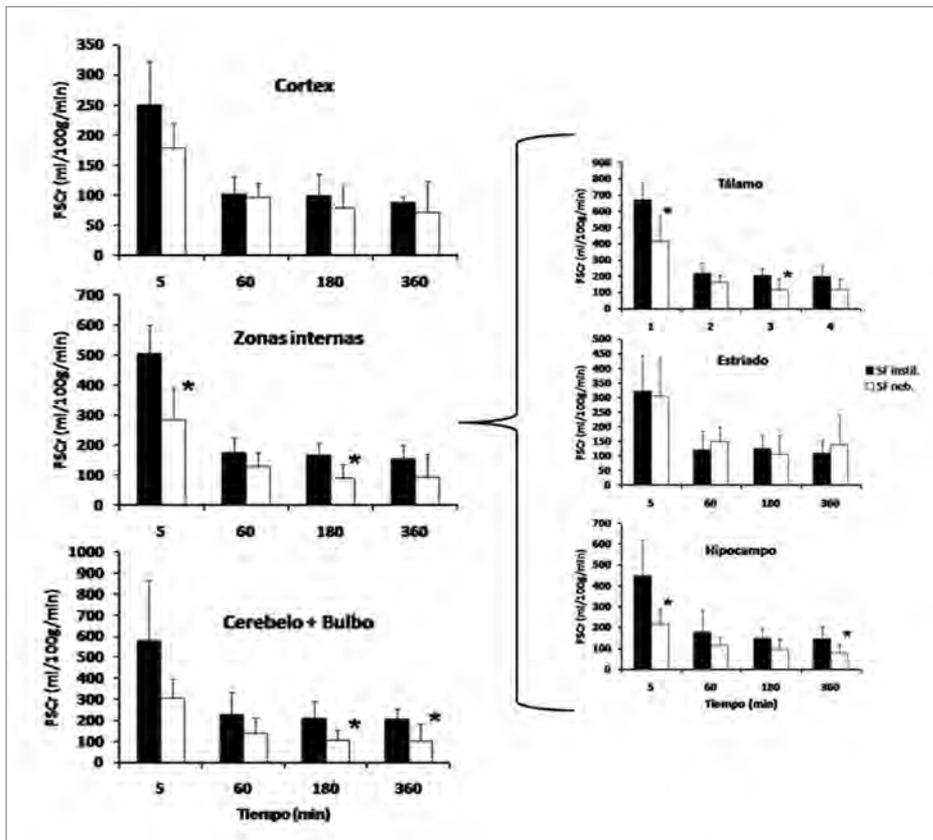


Fig. 1. Evolución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) tras la administración de surfactante de forma instilada (SF instil, barras negras) o nebulizada (SF neb, barras blancas) a los 5, 60, 180 y 360 min después de haber iniciado la terapia con surfactante. A la izquierda, la distribución del FSC en las zonas corticales (cortex), zonas internas y cerebelo-bulbo cefalorraquídeo. En el panel de la derecha se muestra desglosada la distribución del FSC en las zonas internas. Se muestran la media \pm desviación estándar. * Vs. SF instil, $p < 0.05$, ANOVA.

Fig. 2. A la izquierda, representación del porcentaje de células positivas para TNF α , y a la derecha, representación de la mediana de la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, u.a.) en los grupos de surfactante instilado (SF instil, barras negras) y nebulizado (SF neb, barras blancas). En las representaciones gráficas de la parte superior están representadas las zonas corticales (CX), las zonas internas (INTERN) y el cerebelo-bulbo cefalorraquídeo (CB+B). En las representaciones gráficas de la parte inferior están representadas las zonas internas: tálamo (T), estriado (E) e hipocampo (HC). Se muestran la media \pm desviación estándar. * Vs. SF instil, $p < 0.05$, ANOVA.

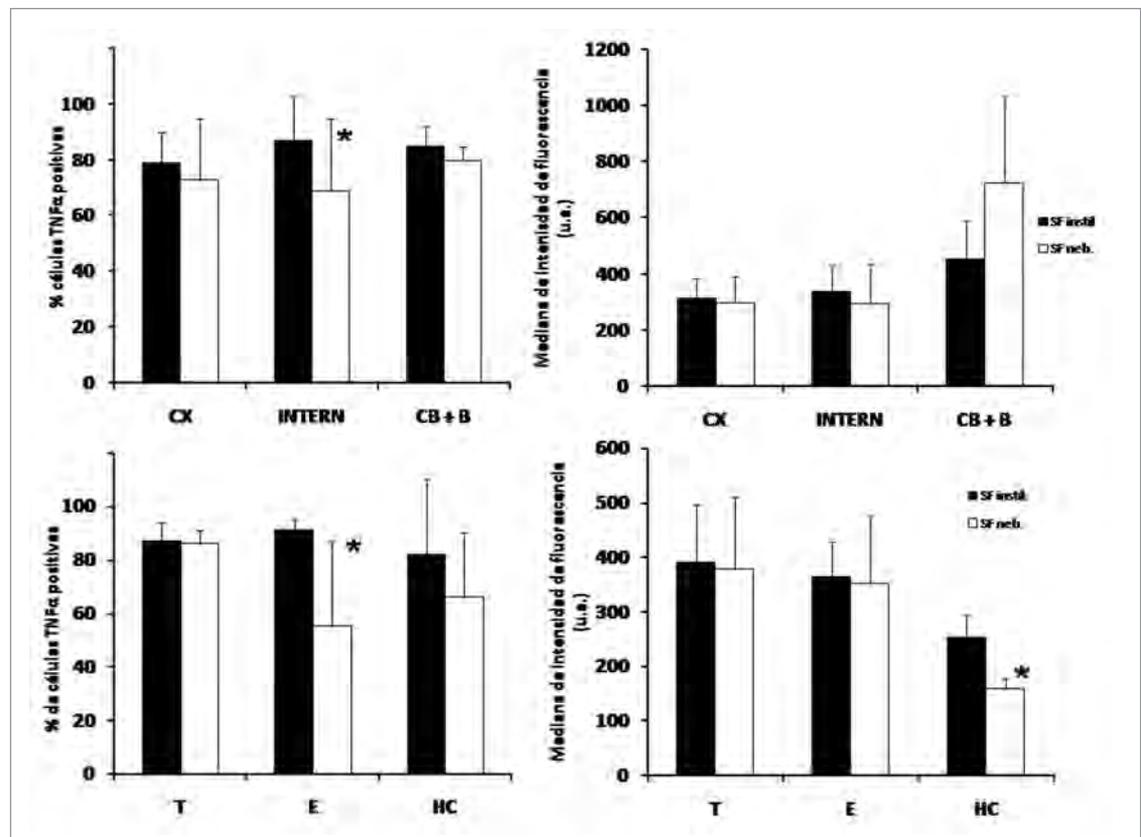


Tabla 1. Actividad, en unidades por microgramo de DNA, de las enzimas antioxidantes

Región cerebral	Grupo tratamiento	Catalasa (U / µg DNA)	GPx (U / µg DNA)	SOD (U / µg DNA)
CX.	SF instil.	0,5 (0,24)	0,012 (0,0009)	5,87 (2,58)
	SF neb.	0,46 (0,21)	0,010 (0,0008)	6,4 (1,9)
INTERN.	SF instil.	0,72 (0,19)	0,012 (0,0070)	9,18 (3,29)
	SF neb.	0,77 (0,28)	0,015 (0,0058)	7,61 (2,39)
CB + B.	SF instil.	0,75 (0,46)	0,017 (0,004)	6,23 (1,82)
	SF neb.	0,78 (0,60)	0,022 (0,008)	8,56 (3,04)

(Glutation Peroxidasa (GPx) y Superóxido Dismutasa (SOD); surfactante instilado (SF instil), surfactante nebulizado (SF neb) en las zonas corticales (CX), en las zonas internas (INTERN) y en el cerebelo-bulbo cefalorraquídeo (CB+B). Se muestran la media ± desviación estándar).

zonas internas, ni en el cerebelo-bulbo en términos de intensidad de fluorescencia.

Analizando en detalle las zonas internas se registró un porcentaje significativamente mayor de células positivas para TNF α en el estriado de los animales que recibieron surfactante instilado en comparación con aquellos que recibieron surfactante nebulizado. Asimismo, la mediana de intensidad de fluorescencia también fue significativamente superior en el hipocampo, en el grupo de animales tratados con surfactante instilado.

Valoración del estrés oxidativo cerebral a través de la actividad de las enzimas antioxidantes

Los resultados obtenidos tras la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes se recogen en la tabla 1. No se registraron diferencias significativas en la actividad de ninguna de las tres enzimas analizadas (catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) en ninguna de las regiones analizadas (ni de forma individual, ni colectiva).

Marcado de células apoptóticas (TUNEL)

No se registraron diferencias significativas en el conteo de células TUNEL positivas (Figura 3) entre los grupos en las zonas corticales, ni en el cerebelo-bulbo. No obstante, en las zonas internas, el número de células TUNEL positivas registradas por milímetro cuadrado fue significativamente mayor en los animales tratados con surfactante instilado en comparación con aquellos que recibieron surfactante nebulizado. En las zonas internas la mayor diferencia, y la única significativa entre los grupos, se registró en el estriado, aunque en el tálamo también se observó una importante tendencia hacia un menor número de células TUNEL positivas en el grupo de surfactante nebulizado.

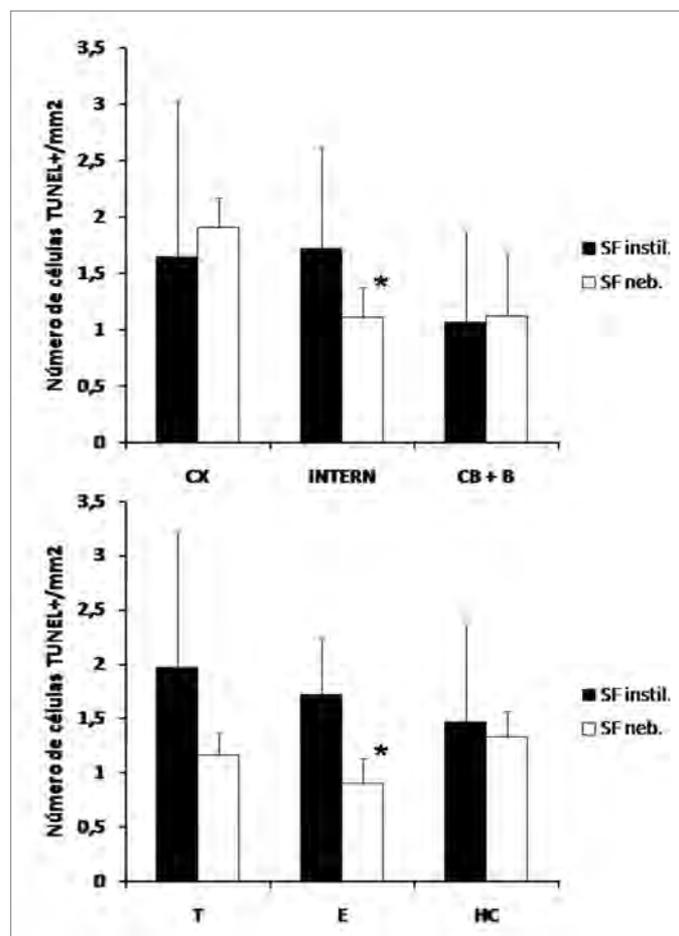


Fig. 3. Número de células TUNEL positivas por milímetro cuadrado en los animales tratados con surfactante instilado (SF instil, barras negras) y en los animales tratados con surfactante nebulizado (SF neb, barras blancas). En la representación de la parte superior están representadas las zonas corticales (CX), las zonas internas (INTERN) y el cerebelo-bulbo cefalorraquídeo (CB+B). En la representación gráfica de la parte inferior están representadas las zonas internas: tálamo (T), estriado (E) e hipocampo (HC). Se muestran la media ± desviación estándar. * Vs. SF instil, p<0.05, ANOVA.

Valoración histológica del daño cerebral

La valoración histológica por parte de un patólogo experto no encontró diferencias significativas para los ítems edema, inflamación e infarto en ninguna de las regiones analizadas en este estudio (Tabla 2). No obstante, se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento en el tálamo, en términos de necrosis neuronal, donde, nuevamente, el daño fue significativamente mayor en los animales que recibieron surfactante instilado. Por el contrario, en las preparaciones de hipocampo de tres animales tratados con surfactante nebulizado se detectó la presencia de hemorragias, lo que contribuyó a que para este ítem el valor obtenido sea significativamente superior en los animales tratados con surfactante nebulizado.

Discusión

Mediante el presente estudio hemos podido demostrar que el tratamiento con surfactante de forma nebulizada en corderos prematuros con SDR severo produce una respuesta hemodinámica cerebral significativamente diferente a la instilación intratraqueal de éste. Además, más allá de las determinaciones hemodinámicas, los indicadores de daño cerebral utilizados en el presente estudio muestran una tendencia hacia un mayor daño en las zonas internas del cerebro en los animales tratados con surfactante instilado en

comparación con los animales que recibieron surfactante nebulizado.

La introducción del surfactante en la práctica clínica revolucionó el manejo clínico del SDR, tras su aprobación a principios de los años 90. No obstante, a pesar de su aprobación oficial, esta terapia se ha mantenido como objeto de una intensa investigación, tanto básica como clínica, en un intento por mejorar su administración y reducir los efectos adversos que se han descrito asociados a esta terapia. Actualmente, para la aplicación de surfactante en neonatos, éstos deben ser primero entubados, hecho que no goza de una gran popularidad entre la comunidad clínica [9]. En la bibliografía son numerosos los casos en los que después de la instilación intratraqueal de esta compleja sustancia se han descrito episodios de desaturación, hipoxia transitoria, hipercarbía, hipotensión y fluctuaciones en el FSC [4]. Precisamente, las fluctuaciones en el FSC son muy preocupantes en la población neonatal debido a que la fragilidad de la microvasculatura cerebral de esta población los predispone al daño cerebral [6].

Los resultados en torno a la hemodinámica cerebral tras la administración de surfactante intratraqueal son heterogéneos. Algunos investigadores han descrito un descenso del FSC tras la administración de surfactante [14], otros un aumento [4][5], y otros estudios informan sobre la estabili-

Tabla 2. Valoración anatomopatológica del daño cerebral mediante necrosis neuronal, edema, inflamación, hemorragia e infarto

Región cerebral	Grupo de tratamiento	Necrosis neuronal (0-20)	Edema (0-3)	Inflamación (0-3)	Hemorragia (0-3)	Infarto (0 o 1)
CO	SF INSTIL.	5,6 (3,4)	1 (0,89)	1 (0,89)	0,33 (0,51)	0,16 (0,40)
	SF NEB.	7,83 (5,19)	1 (0,89)	1,16 (0,40)	0,16 (0,40)	0
CF	SF INSTIL.	5,0 (2,89)	0,66 (0,51)	0,83 (0,75)	0	0
	SF NEB.	3,83 (1,72)	1 (0,63)	0,83 (0,75)	0,33 (0,51)	0,16 (0,40)
T	SF INSTIL.	7,85 (2,19)	0,42 (0,53)	0,42 (0,53)	0	0
	SF NEB.	4,5 (2,07)*	0,66 (0,81)	0,16 (0,40)	0	0
E	SF INSTIL.	3,5 (1,87)	0,50 (0,54)	0,33 (0,51)	0	0
	SF NEB.	2,16 (1,16)	0,33 (0,51)	0,50 (0,54)	0	0
HC	SF INSTIL.	3,83 (0,60)	0,66 (0,81)	0,16 (0,40)	0	0
	SF NEB.	4,83 (0,60)	0,66 (0,81)	0,33 (0,51)	0,5 (0,54)*	0
CB	SF INSTIL.	0,83 (0,75)	0,66 (0,51)	0	0	0
	SF NEB.	0,5 (0,54)	0,33 (0,51)	0,16 (0,40)	0	0
B	SF INSTIL.	2,0 (1,2)	0,33 (0,51)	0	0	0
	SF NEB.	1,2 (0,44)	0,54 (0,24)	0	0	0

(corteza occipital (CO), corteza frontal (CF), tálamo (T), estriado (E), hipocampo (HC), cerebelo (CB) y bulbo cefalorraquídeo (B); surfactante instilado (SF instil), surfactante nebulizado (SF neb). Se muestran la media y la desviación estándar. Los números entre paréntesis de la fila superior (en negrita) delimitan la magnitud de la puntuación para cada ítem. * Vs. SF instil, $p < 0.05$, ANOVA).

dad, sin ningún cambio aparente, del FSC tras la administración de surfactante [15]. No obstante, debe tenerse en cuenta que el tamaño de la muestra de estos estudios era pequeño, que las poblaciones de los diferentes estudios son heterogéneas entre sí, que se utilizaron diferentes preparaciones de surfactante (diferente volumen de carga) y diferentes protocolos de administración, y que los métodos utilizados para la medición del FSC (Doppler, NIRS, sonda ultrasónica de flujo...), así como las zonas de medición (arteria cerebral anterior, arteria cerebral lateral, flujo sanguíneo carotídeo), varían entre los diferentes estudios.

En el terreno experimental se han llevado a cabo varios intentos con el fin de mantener la eficacia pulmonar de la terapia, pero reduciendo los efectos adversos asociados a ella. En este sentido, se han intentado técnicas como la infusión intratraqueal lenta de surfactante [7][16] o la instilación de pequeñas y múltiples dosis [8]. Mediante estas técnicas, se pretendía reducir la carga aguda de líquido en la tráquea, persiguiendo así evitar las obstrucciones de las vías aéreas superiores pero obteniendo una mejoría progresiva de la función pulmonar. A pesar de las buenas intenciones, estas dos aproximaciones dejaron claro que la instilación intratraqueal de surfactante debe incluir la dosis completa de una sola vez y llevarse a cabo relativamente rápido (menos de un minuto), con el fin de obtener una buena distribución pulmonar y, por consiguiente, una mejora patente del intercambio gaseoso y la mecánica pulmonar.

La nebulización de surfactante es una forma de administración que ha suscitado un gran interés debido a que, por un lado, podría evitar la entubación de los bebés a medio plazo, y porque, por otro lado, permitiría una mejora gradual de la función pulmonar que se reflejaría en la hemodinámica sistémica y cerebral de los pacientes [9]. Podría, por lo tanto, reducir e incluso eliminar las fluctuaciones extremas de FSC observadas durante la instilación. En este sentido, en un estudio previo llevado a cabo en corderos prematuros, nuestro grupo de investigación ha podido demostrar que una dosis estándar de surfactante (200 mg/kg) nebulizado durante 20 minutos produce, a nivel pulmonar, un efecto terapéutico equivalente a la instilación rápida de surfactante, como señalamos en trabajos previos. Además, la terapia con surfactante nebulizado evitó la hipercarbia observada tras la instilación rápida y produjo cambios más graduales en el flujo sanguíneo carotideo, en contraposición con el aumento significativo observado en los animales tratados mediante instilación. En el presente estudio pretendíamos dar respuesta a la pregunta de si estas diferencias en el patrón hemodinámico carotideo se verían reflejadas en diferentes patrones de daño en un análisis cerebral más profundo.

Este es el primer estudio que aborda en detalle, y a diferentes niveles, los efectos cerebrales de la administración de surfactante. El aumento significativo del flujo carotideo observado en nuestro estudio previo en los animales tratados con surfactante instilado, tan pronto como a los cinco minutos tras el comienzo de la terapia, se ha visto reflejado en este estudio en un aumento significativo del FSC hacia las zonas internas del cerebro, en comparación con el grupo de surfactante nebulizado. Nuestra hipótesis se basa en que la hipercarbia observada tras la administración de surfactante mediante instilación intratraqueal se debe a la obstrucción transitoria de las vías aéreas superiores en el proceso de distribución «río abajo» del surfactante. Teniendo en cuenta que el dióxido de carbono arterial es un potente regulador del FSC en neonatos [17], la hipercarbia podría perfectamente explicar el aumento del flujo carotideo y el FSC hacia las zonas internas del cerebro. Un efecto similar de derivación del FSC hacia las zonas internas del cerebro ha sido recientemente descrito en corderos prematuros sometidos a una hipoxia-isquemia fetal prolongada [18]. Teniendo en cuenta que una de las características de la hipoxia-isquemia prolongada es la hipercarbia, este fenómeno podría ser la explicación del aumento del FSC hacia las zonas internas en ambos casos, en un intento de dotar a estas zonas de oxígeno y energía suficientes durante un proceso de «hipoxia» [17]. Desgraciadamente, durante la administración de surfactante mediante instilación, existe un lapso de tiempo que engloba, más o menos, la primera media hora consecutiva a la administración de surfactante, donde debido a la alta eficacia del surfactante pulmonar exógeno y a su alta viscosidad, algunas áreas del pulmón son reclutadas rápidamente, mientras que otras permanecen colapsadas, dando lugar a periodos de alta oxigenación (incluso valores arteriales de oxígeno supra-fisiológicos) y alto contenido arterial de dióxido de carbono, lo cual puede ocasionar un aporte excesivo de oxígeno al cerebro debido al efecto vasodilatador que el dióxido de carbono arterial ejerce sobre la vasculatura cerebral. Debe tenerse en cuenta, además, que el exceso de oxígeno en el cerebro está directamente ligado al daño cerebral en bebés prematuros.

Con el fin de observar si los diferentes tratamientos de surfactante (instilado o nebulizado) producían algún cambio en la actividad antioxidante del cerebro, llevamos a cabo la determinación de la actividad de tres enzimas antioxidantes. Los resultados en ambos grupos de tratamiento fueron similares en todas las regiones cerebrales estudiadas. Si bien la actividad de las enzimas antioxidantes puede utilizarse para valorar el estado oxidativo de los tejidos, la falta de diferencias estadísticas entre los grupos de tratamien-

to no excluye la posibilidad de que existan patrones diferentes de estrés o daño oxidativo, y más bien nos da una idea de que los cerebros de ambos grupos trabajan, en términos antioxidantes, al mismo «ritmo».

Los otros métodos utilizados en el presente estudio para la valoración del daño cerebral sí muestran, en cambio, diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en las zonas internas del cerebro, especialmente en el tálamo y en el estriado. En el caso del TNF α , se observó una mayor inflamación en las zonas internas del cerebro de los animales tratados mediante instilación intratraqueal de surfactante, en comparación con los animales tratados con surfactante nebulizado. Además, el conteo de células TUNEL positivas, utilizado para la determinación de la apoptosis en estudios previos [18], también demostró mayores valores de daño en las zonas internas del cerebro en el grupo de surfactante instilado, nuevamente con una clara tendencia hacia un mayor daño cerebral en el tálamo, y una diferencia significativa en el estriado en comparación con el grupo de surfactante nebulizado. Por último, el *score* histológico de daño cerebral confirmó, de nuevo, un significativamente mayor número de necrosis neuronal en el tálamo de los animales tratados con surfactante instilado, aunque debe hacerse constar que la detección de hemorragia en tres cerebros de los animales tratados con surfactante nebulizado hace que para el ítem hemorragia el resultado sea significativamente mayor en este grupo de tratamiento.

En resumen, el presente estudio llevado a cabo en corderos prematuros demuestra que la instilación intratraqueal de surfactante (método clásico de administración) produce un aumento del FSC inmediatamente tras su aplicación, sobre todo hacia las zonas internas del cerebro, y que este aumento se correlaciona con un mayor daño cerebral en términos de necrosis neuronal, inflamación y células TUNEL positivas, si lo comparamos con la nebulización de surfactante durante 20 minutos. Por lo tanto, la administración de surfactante en forma de aerosol debería tenerse en cuenta como alternativa a la instilación en la práctica clínica actual, ya que se muestra igual de eficaz a nivel pulmonar y reduce algunos de los efectos adversos ligados a la instilación. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet* 1980; 1:55-9.
2. Speer CP, Robertson B, Curstedt T, Halliday HL, Compagnone D, Gefeller O, *et al.* Randomized European multicenter trial of surfactant replacement therapy for severe neonatal respiratory distress syndrome: single versus multiple doses of Curosurf. *Pediatrics* 1992; 89:13-20.
3. Sweet D, Bevilacqua G, Carnielli VP, Greisen G, Plavka R, Didrik SO, *et al.* European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome. *J Perinat Med* 2007; 35:175-86.
4. Kaiser JR, Gauss CH, Williams DK. Surfactant administration acutely affects cerebral and systemic hemodynamics and gas exchange in very low birth weight infants. *J Pediatr* 2004; 144:809-14.
5. Fujii AM, Bailey J, Doros G, Sampat K, Sikes C, Mason MJ, *et al.* Effects of beractant and poractant administration on cerebral hemodynamics. *J Neonatal Perinatal Med* 2009; 2:27-34.
6. Davies MW, Dunster KR, Wilson K, Colditz PB. Perfluorocarbon dosing when starting partial liquid ventilation: haemodynamics and cerebral blood flow in preterm lambs. *Neonatology* 2010; 97:144-53.
7. Segerer H, Van Gelder W, Angenent FWM, Van Woerkens LJ, Curstedt T, Obladen M, *et al.* Pulmonary distribution and efficacy of exogenous surfactant in lung-lavaged rabbits are influenced by the instillation technique. *Pediatr Res* 1993; 34:490-4.
8. Álvarez FJ, Alfonso LF, Gastiasoro E, López Heredia J, Arnáiz A, Valls Soler A. The effects of multiple small doses of exogenous surfactant on experimental respiratory failure induced by lung lavage in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995; 39:970-4.
9. Mazela J, Merritt TA, Finer NN. Aerosolized surfactants. *Curr Opin Pediatr* 2007; 19:155-62.
10. Gastiasoro Cuesta E, Álvarez Díaz FJ, Rey Santano C, Arnáiz Renedo A, Loureiro González B, Valls Soler A. Acute and sustained effects of Lucinactant versus Poractant-alfa on pulmonary gas exchange and mechanics in premature lambs with respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 2006; 117:295-303.
11. Murgia X, Gastiasoro E, Mielgo V, Ruiz del Yerro E, Álvarez Díaz FJ, Lafuente H, *et al.* Surfactant and perfluorocarbon aerosolization by means of inhalation catheters for the treatment of respiratory distress syndrome: an in vitro study. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2011; 24:81-7.
12. Van Bel F, Roman C, Klautz RJM, Teitel DF, Rudolph AM. Relationship between brain flow and carotid arterial flow in the sheep fetus. *Pediatr Res* 1994; 35:329-333.
13. Van Bel F, Van de Bor M, Baan J, Ruys JH, Stijnen T. The influence of abnormal blood gases on cerebral blood flow velocity in the preterm newborn. *Neuropediatrics* 1988; 19:27-32.

14. Cowan F, Whitelaw A, Wertheim D, Silverman M. Cerebral blood flow velocity changes after rapid administration of surfactant. *Arch Dis Child* 1991; 66:1105-9.
15. Terry MH, Merritt TA, Harding B, Schroeder H, Merrill-Henry J, Mazella J, *et al.* Pulmonary distribution of lucinactant and poractant alpha and their peridosing hemodynamic effects in a preterm lamb model of respiratory distress syndrome. *Pediatr Res* 2010; 68:193-8.
16. Krause M, Olsson T, Law AB, Parker RA, Lindstrom DP, Sundell HW, *et al.* Effect of volumen recruitment on response to surfactant treatment in rabbits with lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:862-6.
17. Ashwal S, Dale PS, Longo LD. Patterns of fetal lamb regional cerebral blood flow during and after prolonged hypoxia: studies during the posthypoxic recovery period. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 139:365-72.
18. Rey Santano C, Mielgo V, Gastiasoro E, Murgia X, Lafuente H, Ruiz del Yerro E, *et al.* Early cerebral hemodynamic, metabolic, and histological changes in hypoxic-ischemic fetal lambs during postnatal life. *Front Neurosci* 2011; 5:1-12.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.