



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL CENTRAL "DR. IGNACIO MORONES PRIETO"

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA
ESPECIALIDAD DE NEONATOLOGIA
**"CONTEO DE CUERPOS LAMELARES Y SU ASOCIACIÓN CON FACTORES
CLÍNICOS EN PREMATUROS CON ALTO RIESGO DE SDR"**

GLADYS KARINA PEREZ RENDON

DIRECTOR DE TESIS
DRA MA. VICTORIA LIMA ROGEL

CO – DIRECTORA
MTRA. ANAMARÍA BRAVO RAMÍREZ

CO-ASESORA
DRA. NORMA VERONICA ZAVALA ALONSO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIDAD EN
NEONATOLOGÍA

TÍTULO DE TESIS
"CONTEO DE CUERPOS LAMELARES Y SU ASOCIACIÓN CON FACTORES
CLÍNICOS EN PREMATUROS CON ALTO RIESGO DE SDR"

PRESENTA
GLADYS KARINA PEREZ RENDON

Firmas

DIRECTORA DE TESIS Dra. Victoria Lima Rogel	
CO-DIRECTORA Mtra. Anamaría Bravo Ramírez	
CO-ASESORA Dra. Norma Verónica Zavala Alonso	

Sinodales	
Dr. Francisco Jesús Escalante Padrón	
Dra. Ana Ruth Mejía Elizondo	
Dra. Cristina González Amaro	
M. en C. Ma. del Pilar Fonseca Leal Jefe de Investigación y Posgrado Clínico de la Facultad de Medicina	Dra. Ana Ruth Mejía Elizondo Coordinador de la Especialidad Neonatología

RESUMEN

Introducción: El Síndrome de Dificultad Respiratoria (SDR) ocurre en 60% de los prematuros con edad gestacional de 29-28 semanas de gestación en 30% de los nacidos entre 28-34 SDG. La indicación de surfactante es clínica ya que al nacimiento no se cuenta con radiografía de tórax inmediata para corroborar el SDR. De acuerdo a lo reportado en la literatura la cuantificación de cuerpos lamelares (CCL) en aspirado gástrico es una prueba predictora rápida para diagnóstico temprano de SDR. **Objetivos:** Fue evaluar el conteo de cuerpos lamelares y su asociación con factores clínicos en prematuros de alto riesgo para SDR. **Diseño:** Estudio transversal y analítico. **Material y métodos:** Estudio realizado en pacientes de Neonatología del HCMP en el periodo comprendido septiembre 2016- febrero 2018, con edad gestacional entre 26-34 SDG y SDR. Se analizaron 15 muestras para conteo de cuerpos lamelares por CellDyn de los cuales 7 muestras se analizaron por microscopia electrónica. Muestreo no probabilístico no aleatorizado. Las variables categóricas se analizaron mediante prueba exacta de Fisher. Se utilizó coeficiente de correlación de Spearman. Para el análisis estadístico el paquete Rcmdr 2.4-2, del software R versión 3.4.3, con un nivel de confianza del 95%. El nivel de significancia fue de $p \leq 0.05$. Para el análisis estadístico se utilizó SPSS v. 17. Para el análisis estadístico prueba de R versión 3.0. **Resultados:** Se incluyeron 39 muestras de pacientes con EG de 24-34.2 SDG, peso $1,093.8 \pm 247.5$ g, diagnósticos de TTRN 41%, SDR 20.5%, NIU 38.5%. En 15 pacientes se realizó CCL, valores $21.8 - 568,000/\mu\text{L}$. 24 muestras se desecharon por estar contaminadas por sangre, meconio o viscosidad elevada. Todos los pacientes requirieron de CPAPn al nacer y de estos el 48.7%, se intubaron. 59% permanecieron en CPAPn y 5% en puntas nasales, días oxígeno 57.1 ± 38.2 días, fallecieron 6 pacientes, peso varió de 760-1480g y la EG $24-33.1$ SDG, tres no recibieron esteroides prenatales, 3 fallecieron antes de los 7 días (2 PCA y 1 neumotórax) y 3 fueron muertes tardías. Los pacientes con VMA tuvieron cifras más bajas de CCL cuando se compararon con CPAPn y PN con $p < 0.001$. La variabilidad CCL tanto por microscopia electrónica y contador



plaquetario en relación al diagnóstico radiológico a su ingreso mostró un menor número de CL ante SDR y NIU con una $p < 0.001$ significativa.

Conclusiones: Los pacientes que requirieron de ventilación mecánica tuvieron cifras más bajas de CCL comparadas con los métodos no invasivos similar a lo reportado en otros estudios. La prueba de CCL es un método no eficaz ya que en 61.5% de los pacientes no fue posible determinar CCL por las características del contenido gástrico.



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Tesis para obtener el Diploma de la Especialidad en



DEDICATORIAS

Es mi deseo como sencillo gesto de agradecimiento, dedicarles la tesis en primera instancia a mis padres Dionicia Rendón Ruiz y Rubén Pérez Olvera quienes permanentemente me apoyaron con espíritu alentador, contribuyendo incondicionalmente a lograr mis metas y objetivos propuestos. A mi hija Paris Dalí por ser mi principal inspiración. A mis hermanos José y Dennis que siempre han permanecido conmigo en todo momento y me han brindado su apoyo.

A los docentes que me han acompañado durante el largo camino, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos.

Dedico este trabajo de igual manera a mi directora de tesis la Dra. Lima por su fortaleza, dedicación y por acompañarme en la realización de este proyecto que enmarca el último escalón para adquirir mi título.



AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud, principalmente está dirigida al Dios por haberme dado la existencia y permitirme llegar a este momento tan importante.

Igualmente agradezco muy profundamente a todos los organismos y personas que hicieron posible la realización del mismo, entre los que se deben mencionar nuestra casa de estudios durante los dos últimos años el Hospital Central Ignacio Morones Prieto, Universidad Autónoma de San Luis Potosí por haberme dado la oportunidad de ingresar al sistema de educación. A mis maestros la Dra. Victoria Lima y Mtra. AnaMaría por su enseñanza y apoyarme de manera incondicional para la realización de este proyecto de tesis. A la Dra. Zavala por apoyarnos con la disponibilidad del microscopio electrónico. A la Dra. Mejía, Dr. Roque, Dra. Cristina, Dra. Villegas y Dr. Escalante por ser parte importante de mi formación académica.

Quiero agradecer nuevamente a mi familia por su paciencia y apoyo incondicional en todo momento sin ellos no hubiese sido posible llegar hasta donde ahora he llegado, gracias por brindarme la oportunidad de seguir preparándome, brindarme cariño y amor siempre que lo he necesitado.

Gracias a mis grandes amigos y compañeros por estar en los momentos más difíciles y apoyarme en toda situación.

A todas y todos quienes de una u otra forma han colocado un granito de arena para el logro de este trabajo agradezco de forma sincera su valiosa colaboración.

ÍNDICE

RESUMEN	I
DEDICATORIAS	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ANTECEDENTES.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	10
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	12
SUJETOS Y MÉTODOS.....	13
ÉTICA.....	19
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	30
LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFIA.....	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Variables demográficas.....	20
Cuadro 2 Variables maternas.....	21
Cuadro 3 Surfactante.....	21
Cuadro 4 Evolución intrahospitalaria.....	23
Cuadro 5 CCL y ventilación al ingreso.....	24
Cuadro 6 Características generales de pacientes con MEC.....	26
Cuadro 7 Relación CCL MEC y peso al nacer.....	26
Cuadro 8 CCL por contador plaquetario y diagnóstico radiológico.....	28
Cuadro 9 CCL por MEC y diagnóstico radiológico.....	28

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1 Relación de CLL y modo de administración de oxígeno.....	25
Gráfica 2 Relación de CCL por contador plaquetario vs MEC.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

SDR: Síndrome de dificultad respiratoria

CCL: Conteo de cuerpos lamelares

INSURE: Intubación-surfactante-extubación

nCPAP: Presión positiva continua de la vía aérea nasal

SDG: Semanas de gestación

TTRN: Taquipnea transitoria del recién nacido

NIU: Neumonía intrauterina

VMA: Ventilación mecánica asistida

ATQ: Área tocoquirúrgica

MEC: Microscopía electrónica computarizada



ANTECEDENTES.

El síndrome de distress respiratorio (SDR) es una condición pulmonar que produce insuficiencia respiratoria desde el nacimiento, que aumenta en severidad los primeros dos días de vida y que es ocasionada por una deficiencia del surfactante alveolar, asociado con una inmadurez de la estructura pulmonar; clínicamente se manifiesta por cianosis, taquipnea, quejido espiratorio y retracciones; radiológicamente se visualiza la imagen clásica de vidrio esmerilado y broncograma aéreo. The Vermont Oxford Neonatal Network define el SDR como el recién nacido que tiene una $PaO_2 < 50$ Torr o mmHg (< 6.6 kPa) en aire ambiente, cianosis central o necesidad de incremento de la FiO_2 para mantener la PaO_2 arriba de 50 mmHg (> 6.6 kPa) así como la apariencia clásica de la radiografía de tórax y de no ser tratada con surfactante se produce la muerte por hipoxia y falla respiratoria¹.

La incidencia de SDR se incrementa con una edad gestacional menor; en el año 2010 el EuroNeoNet informó una incidencia del 92% en RN de 24 a 25 semanas, del 88% entre RN de 26 a 27 semanas, del 76% en prematuros de 28 a 29 semanas y del 57% de 30 a 31 semanas².

La prematuridad y el SDR son las primeras causas de hospitalización en las unidades de cuidado intensivo neonatal, el SDR se presenta en prematuros menores de 34 semanas de gestación³.

Cada año, aproximadamente nacen 137 millones de niños, de los cuales 2,6 millones de bebés mueren antes de cumplir un mes de edad. Alrededor de 15 millones son prematuros y 35% fallece por complicaciones⁴.

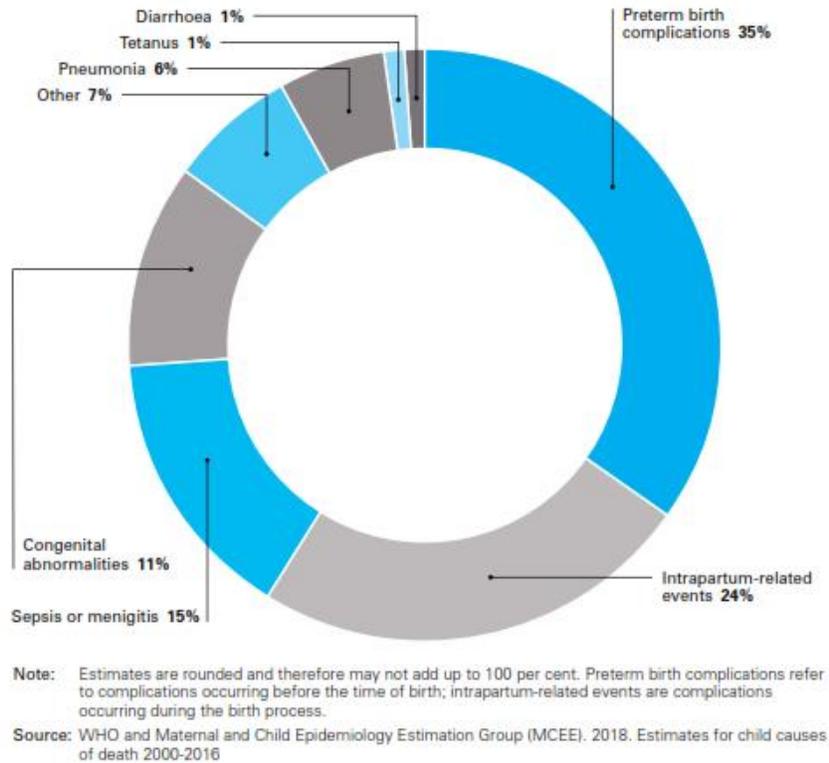


Figura 1. Causas de mortalidad del recién nacido 2016

En México, se registró un total de 26 399 defunciones en menores de un año en el 2014, 13 089 correspondió a las afecciones originadas en el período perinatal (49.5%) del cual se reportan 5 800 defunciones (44.3%) secundarias a dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios ⁵. En el 2015 se reportó una tasa de mortalidad en menores de un año del 11.7 siendo el 53% en el periodo neonatal de los cuales el 18% fueron prematuros.





El SDR se presenta en países desarrollados y subdesarrollados con una frecuencia que varía del 15-50%. La diferencia en las tasas de mortalidad y morbilidad es consecuencia de diversos tratamientos e insumos existentes en cada institución hospitalaria. Además de otros factores de riesgo se ha observado que un porcentaje elevado no reciben glucocorticoides prenatales ^{6,7}.

FISIOPATOLOGIA

El surfactante pulmonar está compuesto por una mezcla lipídoprotéica que reviste la superficie de los alvéolos pulmonares. Su función es disminuir la tensión superficial de la interfase líquido-aire para evitar el colapso del espacio alveolar en la espiración, y facilitar la expansión pulmonar en la inspiración.

El surfactante pulmonar es secretado por las células epiteliales tipo II del alvéolo, en los cuerpos lamelares. En el espacio alveolar, éstos se despliegan para generar una estructura matricial denominada mielina tubular. El componente mayoritario de la monocapa son los fosfolípidos (80-90%). Sólo un 10% está compuesto por proteínas específicas (*surfactant-protein*) que se denominan SP-A, SP-B, SP-C y SP-D ³⁶.

El SDR es la dificultad respiratoria secundaria a la asociación entre la deficiencia de factor tensoactivo pulmonar e inmadurez pulmonar por disminución de las células alveolares epiteliales tipo II; o por disfunción del surfactante secundario a otras enfermedades pulmonar (Neumonía, Asfixia o SAM) ya que la liberación de mediadores inflamatorios altera la permeabilidad pulmonar y produce edema pulmonar e inactivación de surfactante. Si existe deficiencia de surfactante, los pulmones tenderán a colapsarse durante la espiración, lo que obliga al RN a efectuar un mayor trabajo respiratorio y utilizar presión pulmonar de apertura



elevada semejante a la primera inspiración. La rigidez de los pulmones atelectásicos y la disminución de la flexibilidad de la pared torácica, que se retrae al descender el diafragma conduce a hipoxemia progresiva, si el colapso es masivo, se produce también insuficiencia ventilatoria con hipercarbia, que se incrementa por la fatiga de los músculos respiratorios. La hipoxemia y acidosis elevan la resistencia vascular pulmonar que agrava aún más al RN. Las alteraciones funcionales características de este síndrome son: disminución de la distensibilidad pulmonar y de la capacidad residual funcional con alteración de la relación ventilación/perfusión (V/P). El resultado patológico es la aparición de un exudado rico en fibrina y proteínas en el espacio alveolar lo que forma membranas hialinas las cuáles constituyen una barrera para el intercambio gaseoso que provoca mayor disminución de la síntesis de surfactante y grave alteración en intercambio gaseoso. El papel de los glucocorticoides es especialmente importante, ya que inducen la formación de lípidos y apoproteínas del surfactante fetal ^{8,9}.

MANIFESTACIONES CLINICAS

Síndrome de dificultad respiratoria caracterizado por la presencia de diversos signos los cuales suelen aparecer aproximadamente desde el nacimiento, alcanzando el acmé entre las 12 y las 24h. Dentro de los signos se presentan los siguientes:

1. Polipnea: mediante el incremento de la frecuencia respiratoria ($>60x'$), intento de compensar el volumen corriente disminuido.
2. Aleteo nasal: Incrementa el área de sección transversal a nivel nasal, disminuyendo la resistencia de la vía aérea superior, éste puede ser leve o acentuado.
3. Quejido: intento del recién nacido por producir una PEEP mediante la exhalación contra una glotis cerrada. Su propósito es mantener cierto grado de capacidad residual funcional.

4. Retracción: los músculos accesorios de la respiración se retraen para ayudar a vencer el incremento en la presión requerida para inflar los pulmones.
5. Cianosis: reflejo de trastorno en la oxigenación de la hemoglobina, puede llegar a ser evidente cuando el contenido de hemoglobina desoxigenada es menor a 3 g por 100 ml ^{9,10}.

DIAGNOSTICO

Exámenes de laboratorio:

Gasometría indica una acidosis respiratoria con hipoxemia que rápidamente va progresando hasta acidosis mixta, dentro de las primeras 6 horas después del nacimiento ¹⁰.

Técnicas de imagen:

En la valoración del recién nacido con SDR los hallazgos radiológicos típicos incluyen: volumen pulmonar reducido (< de 7 espacios intercostales), broncograma aéreo, aumento de la vascularidad e infiltrado reticulogranular fino, difuso, homogéneo y bilateral.

La clasificación radiológica según estadio:

1. Infiltrado reticulogranular con presencia de broncograma aéreo confinado a los bordes de la silueta cardiopulmonar claramente definidos.
2. Infiltrado reticulogranular con broncograma aéreo periférico evidente que rebasa la silueta cardiaca y aumento en densidad pulmonar.
3. Infiltrado reticulogranular con disminución de la radiotransparencia pulmonar y broncograma que rebasa la silueta cardiaca hasta la línea medio clavicolar.

4. Opacidad total pulmonar con imagen de “vidrio despulido” sin presencia de broncograma aéreo y con borramiento de la silueta cardiaca.

TRATAMIENTO

Dentro de las recomendaciones reportadas en las Guías del Consenso Europeo para el tratamiento del SDR, se encuentra la prevención y atención prenatal adecuada para tratar de evitar la prematuridad. Actualmente, la intervención con mayor evidencia investigada para inducir madurez pulmonar fetal es la administración de esteroides prenatales a toda mujer entre las 23 y 34 semanas de gestación en riesgo de parto prematuro. Como efecto aumenta las concentraciones de cortisol y corticosteroides conjugados, producidos principalmente por el feto, lo que incrementa la relación de lecitina/ esfingomielinina y acelera los efectos de los esteroides endógenos. El efecto bioquímico mejor descrito es la inducción de células alveolares o epiteliales tipo II que incrementan la producción de surfactante ¹¹.

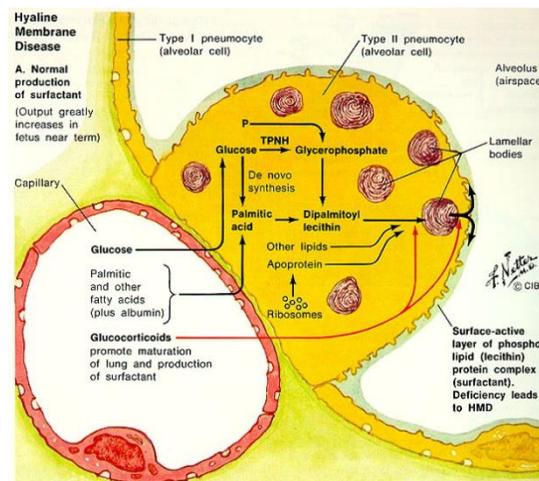


Figura 2. Estructura alveolar, efecto de los Corticoesteroides sobre las células epiteliales tipo II y producción de surfactante. Tomado de google imagen.



El tratamiento actual del síndrome de dificultad respiratoria o enfermedad de membrana hialina es la administración de surfactante con diversas técnicas de acuerdo a la condición clínica y embriológica del neonato, como ejemplo la técnica de INSURE, una combinación con nCPAP temprano, surfactante temprano o profiláctico, o intubación y continuar a extubación temprana o con ventilación mecánica en pacientes que presentan insuficiencia respiratoria progresiva o grave ^{1, 12}.

El SDR y la prematurez son una de las causas principales de mortalidad y morbilidad e ingreso a las terapias intensivas neonatales, por lo que hay una gran necesidad de determinar un método predictor de maduración pulmonar no invasivo, fácil y accesible al nacimiento para su tratamiento oportuno con la administración temprana de surfactante intratraqueal¹²⁻¹⁴, ya que la optimización de surfactante por el costo es primordial, además de evitar la asistencia ventilatoria con presión positiva que incrementa el volumen corriente y puede producir lesión pulmonar. Existen diversos métodos para predecir maduración pulmonar mencionada en la literatura; sin embargo la mayoría están confinados al periodo prenatal.

En 1989 Dubin describe el conteo de cuerpos lamelares (CCL) en líquido amniótico, presentes en el citoplasma de las células epiteliales tipo II, desde las semanas 20 a 24 de gestación liberados en los alvéolos fetales y posteriormente en el líquido amniótico y desde las 26 semanas de gestación por los movimientos respiratorios fetales. Los CL contienen surfactante "empaquetado", compuesto principalmente de fosfolípidos. Debido a la similitud del tamaño del cuerpo lamelar al tamaño de las plaquetas, el conteo de los CL puede realizarse con un contador celular sanguíneo automatizado ¹⁵.



El conteo de cuerpos lamelares puede realizarse en líquido amniótico ¹⁶⁻¹⁸, aspirado traqueal ¹⁹⁻²¹ y aspirado gástrico ²²⁻²⁴ para la estimación de la madurez pulmonar en los recién nacidos prematuros. Actualmente para identificar a los niños de alto riesgo para SDR y que se beneficiaran con la profilaxis de surfactante o terapia temprana ²⁵⁻²⁸.

Diversos estudios han evaluado el CCL en el aspirado gástrico frente a otras pruebas físicas (SMT- prueba estable de microburbujas) mostrando ventaja al no requerir de un equipo especial para medición; siendo rápido, práctico y no dependiente de operador ²⁸.

En el estudio de Verder, el método utilizado para el conteo lamelar se realizó en muestras de contenido gástrico obtenida por aspirado con sonda en los primeros 30- 45 min al nacimiento que se procesa en una centrifuga durante 2 minutos a 500 g, analizándose el sobrenadante con el cuantificador plaquetario inmediatamente ²⁹.

El resultado del recuento de CL se informa como número de CL/ μ L y puede verse afectado cuando el aspirado está contaminado con meconio, incrementándose falsamente. La sangre completa puede reducir el recuento de CL, mientras que la sangre lisada osmóticamente puede aumentarlo. Al igual los valores falsos positivos se observan en aspirados gástricos diluidos ante la presencia de polihidramnios, fenómeno raramente observado en los partos prematuros ²⁹. El análisis de muestras con proceso de congelación y descongelación no parecen cambiar los resultados. Se ha observado en las muestras congeladas a 4 Celsius una estabilidad por 2 semanas, cuando se piensa cuantificar con microscopio electrónico. Con respecto a la centrifugación algunos estudios reportan disminución en el conteo cuando no se estandarizan las fuerzas gravitacionales del contador. Las muestras se desechan cuando el contenido gástrico es viscoso por el riesgo de daño al equipo de los contadores celulares ²⁸⁻²⁹.

No obstante, además de las diferencias esperadas en las características operativas y en los puntos de corte informados por los autores, también se han obtenido resultados discordantes cuando se usan diferentes tipos de contadores de hematología, por resultados no homogéneos. Un estudio comparativo encontró que el Sysmex XE-2100 (Sysmex) mostró la mejor consistencia (86%) con el Coulter Gen-S (Beckman Coulter), seguido por el ADVIA 120 (Bayer Corporation) (78%), y la consistencia del Cell-dyn 3500 (Abbott Laboratorios) con el Coulter Gen-S fue del 66% ³⁰.

Verder en su primer estudio reporto el conteo de cuerpos lamelares como predictor de síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y severidad en recién nacidos menores de 32 semanas de gestación, tomando un punto de corte ≤ 2000 CL/ μ L con sensibilidad de 73% y especificidad de 70%. Alrededor del 75% de los menores de 30 semanas de gestación podrían ser diagnosticados con esta prueba ²⁹.

En comparación con su segundo estudio en pacientes muy prematuros y prematuros extremos (24-29 sdg), utilizo un grupo control a los que se realizó la relación alveolo-arterial de oxígeno para la suplementación de surfactante temprano, comparado con el grupo de intervención al cual se le administro surfactante de acuerdo al conteo de cuerpo lamelares, las variables de desenlace necesidad de ventilación mecánica o muerte a los 5 días de vida extrauterina. En los resultados se concluye que en la prueba de conteo de cuerpos lamelares es un indicador de madurez pulmonar y por lo tanto de indicación de surfactante en recién nacidos de muy bajo peso ³¹.



JUSTIFICACIÓN.

Los fallecimientos de recién nacidos, o neonatos, constituyen el 53% de las muertes en niños menores de cinco años, 18% es por prematuridad y la principal causa es SDR. En el Hospital Central en el 2015, ingresaron 373 pacientes a la unidad de cuidados intensivos neonatales de los cuales 70 contaban con diagnóstico de SDR, 38 pacientes recibieron tratamiento con surfactante en sala y el restante de manera selectiva. La optimización de la aplicación del surfactante evita costos elevados y disminuirá la morbilidad relacionada, sobre todo aquellos a los cuales se les administra surfactante de manera profiláctica.

El diagnóstico de SDR o enfermedad de membrana hialina se establece en base al cuadro clínico y la imagen radiológica. El uso de las pruebas diagnósticas está determinado en parte por las necesidades del clínico, quien desea pruebas altamente sensibles en algunas circunstancias y en otras desea pruebas altamente específicas, en el proceso diagnóstico esto se refleja en el punto donde se fijan el umbral diagnóstico y el umbral terapéutico. Entonces la preferencia por una prueba diagnóstica depende de la sensibilidad y especificidad para el inicio del tratamiento oportuno en base a los resultados; es por eso que se busca un estándar de oro predictor de maduración pulmonar.

Algunos autores informaron la ventaja del conteo de cuerpos lamelares para reducir la proporción de pacientes que recibirán surfactante, cuando se compara con los criterios clínicos y radiográficos.



HIPÓTESIS.

La edad gestacional, el peso y el sexo son factores clínicos que se asocian al CCL en los pacientes con SDR.

En caso de ser afirmativo podría considerarse una herramienta predictora de madurez pulmonar y anticipar la aplicación de surfactante temprano en niños con alto riesgo de SDR.



OBJETIVOS.

Objetivo General:

Evaluar el conteo de cuerpos lamelares en los pacientes con alto riesgo de SDR.

Objetivo Específico:

Identificar a los recién nacidos con alto riesgo de SDR.

Realizar el CCL en aspirado gástrico en los primeros 45 minutos al nacimiento.

Evaluar la asociación del peso, edad gestacional y el sexo con el CCL.

Objetivo secundario:

Comparar los resultados obtenidos por el contador de hematología de la institución vs microscopia electrónica de un grupo piloto de pacientes.

SUJETOS Y MÉTODOS.

LUGAR Y DURACIÓN.

Pacientes de Neonatología del Hospital Central Ignacio Morones Prieto, que ingresaron al servicio con diagnóstico de SDR, previo conteo lamelar de aspirado gástrico en el periodo comprendido julio 2016- julio 2018. El protocolo fue revisado y aceptado por el Comité de Investigación con registro 53-16.

UNIVERSO, UNIDADES DE OBSERVACION, METODOS DE MUESTREO, Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Todos los recién nacidos dentro del periodo comprendido con edad gestacional entre 26-34 o menores a 1250g que reunieron criterios de SDR, fueron sometidos a un aspirado gástrico. El conteo CL se realizó en la secreción gástrica obtenida tan pronto como fue posible, recibiendo tratamiento temprano con surfactante aquellos con criterios clínicos de SDR.

Se tomó una muestra con sonda orogástrica flexible de 5 u 8 Fr según la edad gestacional del paciente, tomando en cuenta la medida de filtro nasal al lóbulo de la oreja y la mitad de la distancia entre la apéndice xifoidea y la cicatriz umbilical, en forma sutil se extrajo 0.5 a 3 ml de contenido gástrico, que se dividió en dos alícuotas, una se congeló a -80 Celsius, y la otra se procesó de forma inmediata, con centrifugación a 500g durante 2 minutos en una centrifuga PowerSpin™ centrifuge, y se analizaron los cuerpos lamelares en un contador para plaquetas CellDyn 3700 (esta es una prueba que se realiza en el día a día en el servicio de Obstetricia del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, a las pacientes de embarazos prematuros en líquido amniótico para el conteo de cuerpos lamelares y decisión de madurez pulmonar, por lo que está ampliamente validada).

Con respecto al procesamiento de las muestras para microscopia electrónica de barrido se realizó el siguiente procedimiento:

Se partió de muestras congeladas sin tratamiento previo. Una vez descongeladas se siguió el protocolo. Después del tiempo de fijación se procedió a centrifugar las muestras (5,000rpm por 5 min), antes de cada cambio de solución.

1.- Se fijó con glutaraldehído al 3% en buffer. Buffer de Sörensen (Fosfato de sodio 100mM pH 7.4).

77 ml de fosfato bibásico 0.1M PM 268.07.

23 ml de fosfato monobásico 0.1M PM 120.

2.- Lavado 3 veces con buffer.

3.- Se sumergió la muestra en tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% en buffer durante 1h.

4.- Lavado 3 veces con buffer.

5.- Deshidratación con etanol: H₂O al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% durante 15 min en cada cambio.

6.- Etanol absoluto por 15 min, 3 veces.

7.- Secado al punto crítico.

Equipo: Secadora al punto crítico Marca Tousimis, Modelo Samdri-PVT-3D



8.- Se montaron las muestras.

9.- Procedimiento de ionizado o baño en oro.

Equipo: Marca Cressington Modelo sputter coated 108auto.



10.- Las muestras se entregaron una vez procesadas para su observación en el laboratorio de la Facultad de Estomatología de la UASLP.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

- Inclusión:
 - Ambos géneros.
 - Edad gestacional 24-34 semanas.
 - Que reúnan criterios de SDR.
 - Pacientes con criterios clínicos para aplicación de surfactante.
 - Consentimiento informado.
- Exclusión:
 - Muestras de aspirado gástrico contaminadas con meconio o sangre.
 - Pacientes con los siguientes diagnósticos: Malformaciones congénitas letales. Ruptura de membranas mayor a 3 semanas por riesgo de hipoplasia pulmonar.
- Eliminación:
 - Muestras que no se lograron procesar.

VARIABLES EN EL ESTUDIO

Definición de Variables

Dependiente				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Cuerpo lamelar	Estructura unitaria localizada en el citoplasma de las células epiteliales tipo II.	Punto de corte 8000 o mas	CL/ μ L	Continua
Independiente				
Peso	Cantidad de masa de un individuo que puede ser expresada en varias unidades de medición.	<1250	gramos	Continua
Edad Gestacional	Tiempo desde el último día de la última menstruación, que es alrededor de 2 semanas antes de la ovulación y la fertilización hasta su nacimiento.	24-30	semanas	Continua
Sexo	Genero del paciente	Hombre Mujer	Fenotipo	Categórica Dicotómica

TIPO DE MUESTREO: Muestreo no probabilístico, no aleatorizado.

CALCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA: Para el cálculo del tamaño de la muestra se usó modelo lineal.

Conteo de cuerpos lamelares ~ sexo+ peso+ edad gestacional



El conteo de cuerpos lamelares es una variable continua. Las variables explicativas son continuas y dicotómicas y por lo tanto contribuye con tres grado de libertad, por lo que se necesitó un mínimo de 30 pacientes y un recomendado de 60 de acuerdo con Peduzzi, Concato y Feinstein ³².



ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Las variables continuas se expresaron en promedio \pm desviación estándar, o como mediana y rangos intercuartílicos cuando no se cumplieron los requisitos de normalidad y las categóricas como frecuencias. Para mortalidad y variables categóricas se analizaron mediante prueba exacta de Fisher. Se utilizó coeficiente de correlación de Spearman. Para el análisis estadístico el paquete Rcmdr 2.4-2, del software R versión 3.4.3, con un nivel de confianza del 95%.



ÉTICA.

Se consideró una investigación con riesgo mínimo y controlable, ya que los pacientes fueron sometidos a toma de muestras de aspirado gástrico a su nacimiento, sin excluir su ingreso o tratamiento hospitalario independientemente del valor en el conteo de cuerpos lamelares.

Se solicitó consentimiento informado por la madre o padre del paciente. Por lo anteriormente mencionado el estudio se ajustó a las normas institucionales, de la Ley General de Salud³⁴ y de las normas de la Conferencia de Helsinsky de 1964 y su revisión en 2013³⁵.

RESULTADOS.

Se incluyeron 39 muestras de aspirado gástrico de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. De la 39 muestras a 15 se logró realizar conteo de cuerpos lamelares por contador plaquetario institucional, 9 muestras se enviaron a microscopia electrónica, 2 de las cuales se eliminaron del estudio por falla en su preparación. El resto de las muestras no se lograron preparar ni realizar el CCL.

El rango de edad gestacional fue entre 24 y 34.2 semanas con una edad promedio de 31 SDG, 56.4% correspondieron al sexo masculino. El rango de peso neonatal al ingreso fue entre 690 y 1630 g con un promedio de 1093.8 g, como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Variables Demográficas.

Variables demográficas	N = 39
Edad gestacional (semanas)	31[3.35](24 – 34.2)
Peso (g)	1,093.8±247.5(690 – 1,630)
Sexo (F/M)	17/22(43.6/56.4%)

Media ± DE (mínimo – máximo) Mediana [RIQ] (mínimo – máximo)

De los 39 pacientes, el 92.3% los nacieron por vía abdominal y 22 embarazadas recibieron corticoides prenatales de los cuales 68.2% fue con betametasona. Como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Variables maternas.

VARIABLES MATERNAS	Porcentaje
Vía de nacimiento	
Abdominal	36(92.3%)
Parto	3(7.7%)
Corticoides antenatales	
Dexametasona	7(31.8%)
Betametasona	15(68.2%)
No. de dosis	1[2](0 – 4)
No. de ciclos	0[1](0 – 2)

Media \pm DE (mínimo – máximo) Mediana [RIQ] (mínimo – máximo)

25 (64%) pacientes ameritaron de surfactante por criterios clínicos de SDR y solo se administró 1 dosis de poractant alfa. De los cuales 10 de ellos fueron candidatos a la aplicación del mismo con técnica INSURE y 15 por intubación, como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Surfactante.

SURFACTANTE	Porcentaje
Intubación	15(38.4%)
INSURE	10(25.6%)
Surfactante (Curosurf)	25(64%)
No. de dosis	1
No requirieron surfactante	14(36%)

Media \pm DE (mínimo – máximo) Mediana [RIQ] (mínimo – máximo)



La ventilación no invasiva (CPAPn o PN) al ingreso a terapia intensiva neonatal fue posible en 25/39 (64%) y 14 (36%) se intubaron. Todos los pacientes requirieron de CPAPn al nacimiento y de estos 23 permanecieron con dicha ventilación.

El diagnóstico radiológico correspondió en un 41% a TTRN, con una mediana de 3.5 horas entre su nacimiento y la toma de radiografía. 38.5% cumplieron criterios para NIU y el restante de los pacientes se les realizó diagnóstico de SDR.

En 17 pacientes se presentó neumonía como infección asociada a la atención de la salud como complicación durante su estancia hospitalaria.

El promedio de días de estancia hospitalaria fue de 60.1 ± 35.5 y la necesidad de oxígeno de 57.1 ± 38.2 días.

16 (41%) fueron menores de 30 SDG por lo cual se incrementó la incidencia de displasia broncopulmonar hasta 69.2%. Como se muestra en el cuadro 4.

De los 39 pacientes fallecieron 6 el peso varió de 760-1480g y la EG 24-33.1SDG, tres no recibieron esteroides prenatales, 3 fallecieron antes de los 7 días (2 PCA y 1 neumotórax) y 3 fueron muertes tardías.

Cuadro 4. Evolución intrahospitalaria.

Evolución intrahospitalaria	Porcentaje
CPAP	23(59%)
PN	2(5%)
VMA	14(36%)
Reintubación	16(41%)
Diagnóstico radiológico inicial (horas)	3.5[3.5](1 – 15)
TTRN	16(41%)
SDR	8(20.5%)
NIU	15(38.5%)
Neumotórax	2(5%)
Neumonía nosocomial	17(43.6%)
Estancia hospitalaria (días)	60.1±35.5(3 – 155)
Necesidad O₂ días	57.1±38.2(3 – 154)
Displasia Broncopulmonar	27(69.2%)
Motivo de alta	
Defunción	6(15.38%)
Mejoría	28(71.79%)
Traslado	5(12.82%)
Edad al egreso	60.1±35.2(3 – 154)

Media ± DE (mínimo – máximo) Mediana [RIQ] (mínimo – máximo)

Se analizó la relación del conteo de cuerpos lamelares con otras variables de interés.

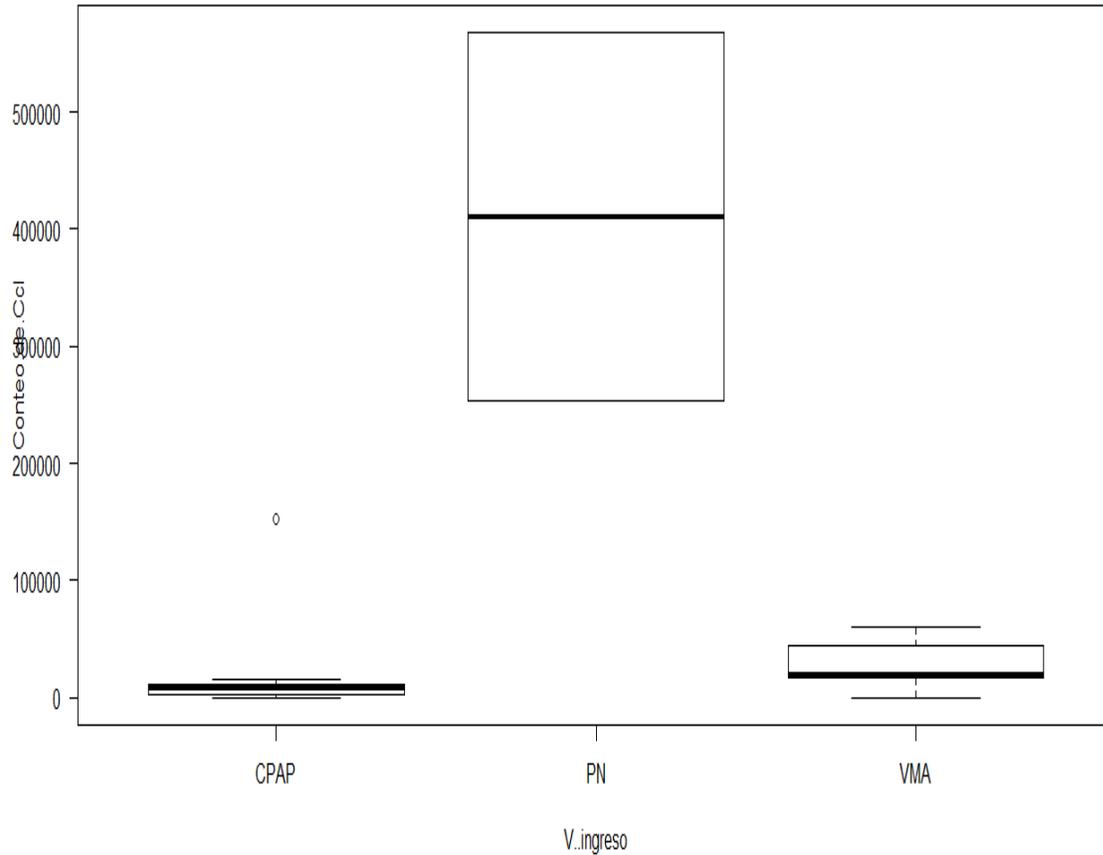
El modelo final fue:

Cuadro 5. CCL ~ Ventilación al ingreso

V ingreso	β estimada	IC al 95%	p	Eta ²
PN	386,175	254,086.95, 518,263.35	<0.001	0.7844
R²: 0.7844, R² ajustada: 0.7484, p<0.001				

La variabilidad del conteo de cuerpos lamelares se puede explicar en un 78.4%, por el modo de administración de oxígeno puntas nasales, ya que estos pacientes su problema pulmonar es leve y la madurez pulmonar es adecuada por lo cual el conteo de cuerpos es mayor 386,175, cuando se compara con los pacientes que tienen algún problema pulmonar moderado a severo o tienen menor inmadurez pulmonar. Los pacientes con VMA tuvieron cifras más bajas de CCL cuando se compararon con CPAPn y PN. Por tanto el conteo de CCL cuenta con una $p < 0.001$ significativa. Como se muestra en el gráfico 1.

Gráfica 1. Correlación entre CCL y modo de administración de O₂ al ingreso



En 15 pacientes se realizó CCL, valores 21.8-568,000/ μ L. 24 muestras se desecharon por estar contaminadas por sangre, meconio o viscosidad elevada.

De las quince muestras se evaluaron 7 muestras con microscopía electrónica y se realizó el conteo en un campo de 40 x, resultando una media de 17.6 ± 7.2 CL. El 71.4% presentó un estado nutricional hipotrófico en base a las curvas de Fenton. La mayoría requirió de surfactante al nacer en un 85.7%. Se observó en un 57.1% de los pacientes el diagnóstico de SDR y la necesidad de intubación. Como se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Características generales de pacientes que se les realizó MEC

Variable	N = 7
CCL MEC	17.6±7.2(9 - 27)
CCL	8,720[14,086.5](72.7 – 153,000)
Peso	1,032.8±271.3(690 – 1,370)
Estado Nutricional	
Eutrófico	2(28.6%)
Hipotrófico	5(71.4%)
Surfactante	6(85.7%)
Intubación	4(57.1%)
INSURE	3(43%)
Diagnóstico	
Neumonía	1(14.3%)
SDR	4(57.1%)
SDR + Neumonía	2(28.6%)

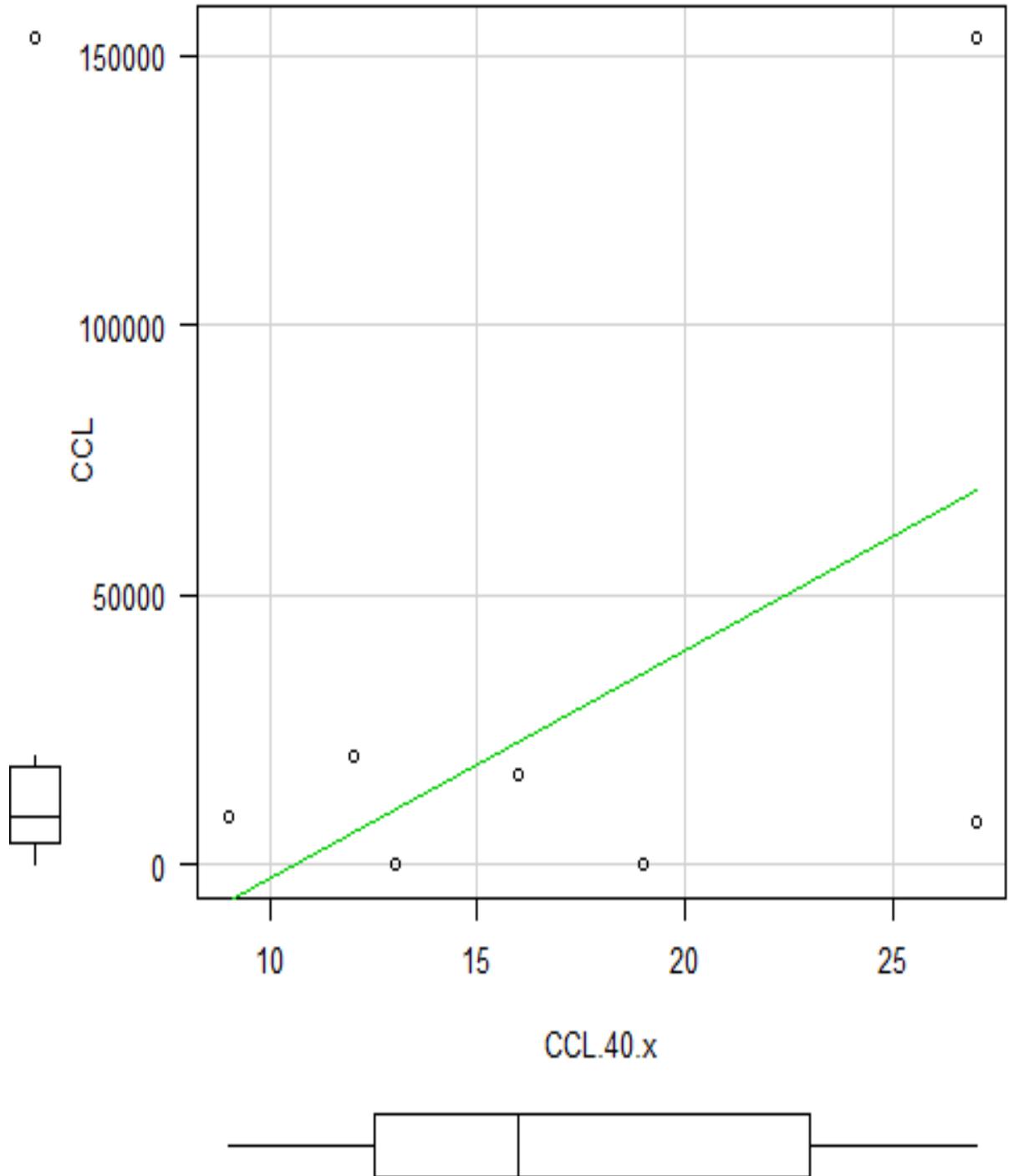
Con el coeficiente de correlación de Spearman, se evaluó la relación del conteo de CL por microscopía y el obtenido con el contador plaquetario y su relación con el peso al nacimiento, como se muestra en el cuadro 7.

Cuadro 7. Relación CCL MEC y peso al nacimiento.

N = 7	rho	p
Contador de hematología	0	1
Peso (g)	-0.523	0.229

No se encontró significancia estadística

Gráfica 2. Relación CCL contador hematológico vs microscopia electrónica



Se analizó la relación del conteo de cuerpos lamelares obtenidos por los dos diferentes métodos de medición, con algunas variables de interés, como se muestra en el cuadro 8.

El modelo final fue:

Cuadro 8. CCL por contador plaquetario ~ Diagnóstico radiológico

V ingreso	β estimada	IC al 95%	Valor de p
SDR	-141,586	-166,775.9, -116,395.6	<0.001
SDR + Neumonía	-148,919	-176,513.0, -121,324.3	<0.001
R²: 0.9855, R² ajustada: 0.9782, p<0.001			

La variabilidad CCL se puede explicar en un **98.5%**, por el diagnóstico radiológico a su ingreso, cuando se tiene diagnóstico de SDR se observa una disminución de 141,586, y al combinarse con Neumonía igualmente disminuye 148,919 CL, con una $p < 0.001$ significativa, esto se explica por la inactivación y deficiencia de surfactante.

Los resultados fueron similares con el conteo obtenido por microscopía electrónica, como se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9. CCL por MEC ~ Diagnóstico radiológico

V ingreso	β estimada	IC al 95%	Valor de p
SDR	-16	-23.25, -8.74	0.005
SDR + Neumonía	-7	-15.29, 1.29	0.07*
Hipotrófico	-6	-11.69, -0.31	0.04
R²: 0.961, R² ajustada: 0.922, p=0.01			

*No significativo



La variabilidad del CCL se puede explicar en un **96.1%** por el diagnóstico, al ser SDR disminuye 16, y al ser hipotrófico disminuye 6, con una $p=0.01$ significativa.



DISCUSIÓN.

Del total de los 39 pacientes, se realizó CCL en 15 (38.4%), el resto no se logró cuantificar por líquido viscoso, meconio, muestra insuficiente (menores de 29 SDG) o hemático, de los cuales 11 (28%) tuvieron valores arriba de 8000 CL/ μ L que fue nuestro punto de corte y de éstos 6 (54%) recibieron surfactante, comparado con Verder en el cual de 192 pacientes aleatorizados (en un periodo de 4 años), el 44% tuvieron estos valores y recibieron surfactante el 35% de ellos.

4(23%) de los pacientes tuvieron menos de 8000 CL/ μ L y a 3(75%) se les aplicó surfactante, comparado con Verder³¹, probablemente como describe Verder el punto de corte debería ser menor.

En el estudio de Daniel el aspirado gástrico se diluyó con ditiotreitól, no se centrifugaron las muestras y su punto de corte fue menor de 42,000 CL/ μ L para predecir síndrome de dificultad respiratoria, el centrifugar la muestra disminuye el número de cuerpos lamelares en 10-40%²⁸, por lo cual nuestro punto de corte fue menor.



LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.

El conteo de cuerpos lamelares es poco práctico debido a la dificultad en la toma de muestras ya sea por viscosidad, muestra insuficiente, sangre o meconio. El periodo de tiempo de recolección de pacientes fue el adecuado de acuerdo a la cantidad de pacientes que ingresan al servicio sin embargo no se logró obtener un mayor número de muestras debido a las limitaciones ya comentadas; a pesar de que en las guías europeas de SDR 2016 se mencione como método predictor y apoyo de prueba diagnóstica³⁷.



CONCLUSIONES.

Los pacientes que requirieron de ventilación mecánica tuvieron cifras más bajas de CCL comparadas con los métodos no invasivos similar a lo reportado en otros estudios.

Cuando se obtuvo el diagnóstico por radiografía de SDR y NIU+ SDR se observaron cifras más bajas de cuerpos lamelares, por inactivación y/o deficiencia de surfactante.

Cuando se correlacionó el conteo de cuerpos lamelares con microscopía electrónica con SDR, NIU +SDR, se encontró disminución en la cuenta de CL en pacientes con SDR.

La prueba de CCL es un método que puede variar en resultados de acuerdo a la población ya que en 61.5% de los pacientes no fue posible determinar CCL por las características del contenido gástrico.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, Hallman M, Ozek E, Plavka R, *et al.* European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants-2013 Update. *Neonatology* 2013; 103:353-368.
2. EuroNeoStat Annual Report for Very Low Gestational Age Infants 2010. The ENS Project. Hospital de Cruces, Unidad Neonatal 5-D, Plaza de Cruces s/n, 48903 Barakaldo, Spain. Info.euroneonet @euskalnet.net.
3. Engle WA, American Academy of Pediatrics Committee on Fetus and Newborn. Surfactant replacement therapy for respiratory distress in the preterm and term neonate. *Pediatrics* 2008; 121:419-432.
4. Every child alive the urgent need to end newborn deaths. United nations children's fund (UNICEF), 2018.
5. Defunciones generales totales de menores de un año por principales causas de mortalidad, 2014. INEGI. Estadísticas de Mortalidad, actualización mayo 2016.
6. López CC, Santamaría AC, Macías AHA, Cruz GJ. Respiratory distress due to surfactant deficiency in a third-level hospital with no in-patient deliveries. Factors related to mortality. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2010; 67: 98-106.
7. Diagnóstico y Tratamiento de Síndrome de Dificultad Respiratoria en el Recién Nacido. México: Secretaria de Salud; 2009.
8. Clements JA, Avery ME. Lung Surfactant and Neonatal Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157:S59-61.
9. Rodriguez JR. Management of Respiratory Distress Syndrome: An Update. *Respir Care.* 2003; 48:279–86.
10. Robin MD. Evaluation and management of the cyanotic neonate. *Clin Pediatr Emerg Med.* 2008 September; 9(3): 169–175.
11. Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics.* 1972;50:515-25.
12. Verder H, Albertsen P, Ebbesen F, Greisen G, Robertson B, Bertelsen A, *et al.* Nasal continuous positive airway pressure and early surfactant for respiratory distress síndrome in newborns less than 30 weeks gestacion. *Peadiatrics* 1999;103: e24.
13. Kendig JW, Notter RH, Cox C, Reubens LJ, Davis JM, Maniscalco WM, *et al.* A comparison of surfactant as immediate prophylaxis and as

- rescue therapy in newborns of less than 30 weeks gestacion. *N Engl J Med* 19991; 324: 865-871.
14. Egberts J, Brand R, Walti H, Bevilaqua G, Breart G, Gardini F. Mortality, severe respiratory distress syndrome, and chronic lung disease of the newborn are reduced more after prophylactica than after therapeutic administration of the surfactant Curosurf. *Pediatr* 1997; 100: e4.
 15. 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.
 16. Clements JA, Platzker AC, Tierney DF, Hobel CJ, Creasy RK, Margolis AJ, Thibeault DW, Tooley WH, Oh W: Assessment of the risk of the respiratory distress syndrome by a rapid test for surfactant in amniotic fluid. *N Engl J Med* 1972; 286: 1077–1081. 13. Parkinson CE, Harvey D, Talbert D: Surface properties of amniotic fluid bubbles. *Biol Neonate* 1974; 25: 289–299.
 17. Ashwood ER, Oldroyd RG, Palmer SE: Measuring the number of lamellar body particles in amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 289–292.
 18. Neerhof MG, Haney EI, Silver RK, Ashwood ER, Lee IS, Piazza JJ: Lamellar body counts compared with traditional phospholipid analysis as an assay for evaluating fetal lung maturity. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 305–309.
 19. Friedrich W, Haufe M, Schmalisch G, Wauer RR: The stable microbubble test on tracheal aspirate samples from newborn babies for diagnosis of surfactant deficiency and/or surfactant malfunction. *Biol Neonate* 1998;73: 10–18.
 20. Boo NY, Cheong KB, Cheong SK, Lye MS, Zulfiqar MA: Usefulness of stable microbubble test of tracheal aspirate for the diagnosis of neonatal respiratory distress syndrome. *J Paediatr Child Health* 1997; 33: 329–334.
 21. Eckert Seitz E, Fiori HH, Luz JH, Fiori RM: Stable microbubble test on tracheal aspirate for the diagnosis of respiratory distress syndrome. *Biol Neonate* 2005; 87: 140–144.
 22. Chida S, Fujiwara T, Konishi M, Takahashi H, Sasaki M: Stable microbubble test for predicting the Risk of respiratory distress syndrome. II. Prospective evaluation of the test on amniotic fluid and gastric aspirate. *Eur J Pediatr* 1993; 152: 152–156.
 23. Teeratakulpisarn J, Taksaphan S, Pengsaa K, Wiangnon S, Kosuwon W: Prediction of idiopathic Respiratory distress syndrome by the stable

- microbubble Test on gastric aspirate. *Pediatr Pulmonol* 1998; 25:383–389.
24. Fiori HH, Linderholm B, Fiori RM, Robertson B: Computerized image analysis of bubbles in gastric Aspirate for prediction of respiratory distress syndrome. *Acta Paediatr* 2001; 90: 1402–1404.
 25. Verder H, Ebbesen F, Linderholm B, Robertson B, Eschen C, Arroe M, Lange A, Grytter C, Bohlin K, Bertelsen A, Danish-Swedish Multicentre Study Group: Prediction of respiratory distress syndrome by the Microbubble stability test on gastric aspirates in newborns of less than 32 weeks' gestation. *Acta Paediatr* 2003; 92: 728–733.
 26. Fiori HH, Fritscher CC, Fiori RM: Selective surfactant prophylaxis in preterm infants born at menor or = 31 weeks' gestation using the stable microbubble test in gastric aspirates. *JPerinat Med* 2006; 34: 66–70.
 27. Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, Currie JO, Parsons JH, Sutherland PD: Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol* 1979; 86: 615–622.
 28. Daniel IWB, Fiori HH, Piva JP, Munhoz TP, Nectoux AV, Fiori RM. Lamellar body count and stable microbubble test on gastric aspirates from preterm infants for the diagnosis of respiratory distress syndrome. *Neonatology* 2010; 98: 150–5.
 29. Verder H, Ebbesen F, Brand J, *et al.* Lamellar body counts on gastric aspirates for prediction of respiratory distress syndrome. *Acta Pædiatr* 2010;100:175-180
 30. 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.
 31. Verder H, Ebbesen F, Fenger J, *et al.* Early Surfactant Guided by Lamellar Body Counts on Gastric Aspirate in Very Preterm Infants. *Neonatology* 2013; 104:116–122.
 32. Peduzzi P¹, Concato J, Feinstein AR, *et al.* Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis. II. Accuracy and precision of regression estimates. *J Clin Epidemiol*. 1995 Dec;48(12):1503-10.
 33. Baghaei, Purya & Kubinger, Klaus D. (2015). Linear Logistic Test Modeling with R. Practical Assessment. *Research & Evaluation*, 20(1).
 34. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Diario Oficial, primera sección, Decreto abril 2014, pág. 89-95.



35. World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA November 27, 2013 Volume 310, Number 20.
36. Whitsett JA, Weaver TE. Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. N Engl J Med. 2002; 347:2141-8.
37. Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, Hallman M, Ozek E, et al. European Consensus Guidelines on the Management of Respiratory Distress Syndrome – 2016 Update. Neonatology 2017;111:107–125.