ESPECTROFOTOMETRIA DEL LIQUIDO AMNIOTICO

Titulación de Bilirrubinas y Proteínas Totales

Prof. Alvaro Velasco Chiriboga[1]
Prof. Arturo Rodríguez Soto[2]
Inst. Miguel Suárez[3]

Introducción

Las bases experimentales para demostrar que la bilirrubina proviene de la destrucción de los hematíes, fueron establecidas por Virchow y comprobadas posteriormente por Aschoff y Mann (7), quedando así abierto un amplio campo de investigación en la fisiología y patología del manejo de estos pigmentos por el organismo humano.

La desintegración de los hematíes en sus componentes, globina, biliverdina y Fe, se efectúa en el sistema retículo endotelial por acción de un sistema enzimático identificado como una hemooxidasa (1, 28). Esta biliverdina es rápidamente convertida a bilirrubina no conjugada (Bilirrubina indirecta de Van den Berg) por acción de una reductasa. La bilirrubina no conjugada es un compuesto insoluble en agua y no puede, por tanto, ser transportada por vía sanguínea en forma libre. Su movilización se hace por fijación de su molécula a una molécula de proteína, especialmente albúmina, así se transporta al hígado en donde se conjuga con el ácido uridín difosfoglucurónico (UDPGA) (9), formando el compuesto diglucurónico de bilirrubina, que, por ser altamente soluble en agua, es fácilmente eliminado por la bilis.

La bilirrubina no conjugada, es lipofílica; su presencia en forma libre en los tejidos, conduciría a su fijación celular (5) produciendo graves daños intracelulares irreversibles, como sucede en el Kernicterus.

A diferencia del adulto, el hígado fetal es incapaz de conjugar la bilirrubina (6) por tener niveles muy bajos de deshidrogenasa, pirofosforilasa y glucorinil transferasa, enzimas indispensables para la conjugación de bilirrubina (véase Fig. 1), y formación de UDPGA. La capacidad de conjugación de bilirrubina se aumenta al final del embarazo y se completa en los primeros días de vida del recién nacido.

A pesar de la incapacidad del hígado fetal para conjugar la bilirrubina, los niveles del pigmento en la sangre del cordón umbilical del recién nacido son muy bajos, lo cual

1. Prof. Asociado Facultad de Medicina Universidad Nacional.
2. Prof. Asistente Facultad de Medicina Universidad Nacional.
3. Inst. Bioquímica Facultad de Medicina Universidad Nacional.

Glucosa + adenosintrifosfato ⟶ Glucosa 6 fosfato

Uridindifosfato (UDP) + ATP ⟶ Uridintrifosfato + adenosindifosfato (ADP)

UTP + Glucosa 1 fosfato $\xrightarrow{(a)}$ Uridindifosfoglucosa + pirofosfato

UDP glucosa $\xrightarrow[\text{DPN}]{(b)}$ Acido UDP glucurónico (UDPGA)

UDPGA + Bilirrubina no conjugada ⟶ Glucuronido de bilirrubina + UDP

a) UDP glucosa pirofosforilasa.
b) UDP glucosa deshidrogenasa.
c) Glucuroniltransferasa.

FIGURA Nº 1 — Reacciones bioquímicas que se efectúan en la formación de la bilirrubina conjugada. (Schenker, 9).

sugiere otra vía de eliminación de la sustancia durante el período de vida intrauterina.

Schenker, Dawber y Schmid (1) han demostrado en cobayos, que inyectando bilirrubina conjugada C14 al feto, ésta no era eliminada por la placenta hacia la circulación materna, pero si se inyecta bilirrubina no conjugada C14, ésta sí pasa libremente a la sangre materna, vía placenta; este traspaso se hace por gradientes de concentración a ambos lados de las membranas vellocitarias (véase Fig. 2). Este intercambio fue observado

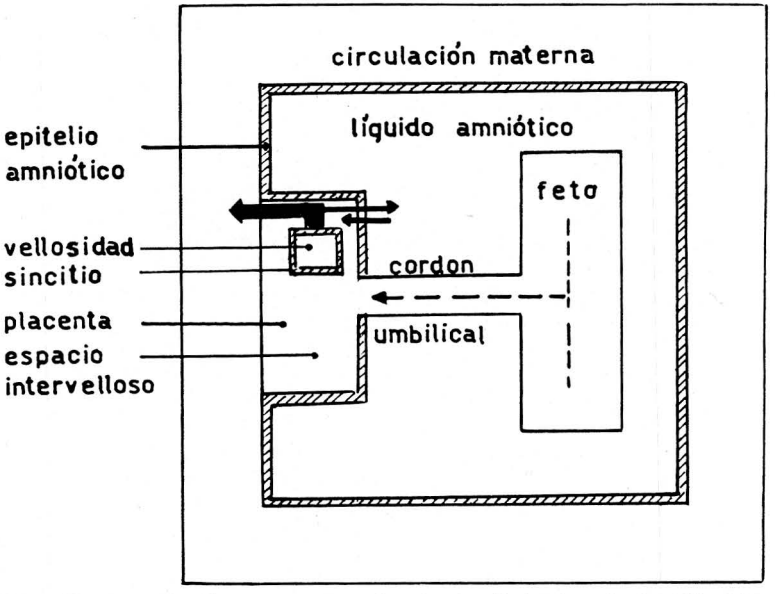


FIGURA Nº 2 — La figura representa la vía de eliminación de la bilirrubina a través de la vellosidad placentaria hacia la sangre del espacio intervelloso y la corriente sanguínea materna, se ve la vía de acceso hacia la cavidad amniótica.

también en los experimentos efectuados por Lester (2). En los primates, el traspaso de bilirrubina es más rápido cuanto mayor sea la madurez de las vellosidades placentarias.

La bilirrubina en el Líquido Amniótico. — La inyección de bilirrubina marcada, al feto, no eleva los valores de bilirrubina en el líquido amniótico, ya que es eliminada por la bilis materna. No se ha demostrado bilirrubina en la orina fetal (10) por cuanto el riñón sólo elimina pigmentos conjugados. Tampoco hay eliminación de bilirrubina por materias fecales, salvo los casos de expulsión meconial. La bilirrubina presente en el líquido amniótico no proviene directamente del feto según puede deducirse de estos hechos.

Bashore (11) inyectó bilirrubina no conjugada a primates en la circulación materna y encontró, casi inmediatamente, niveles de concentración iguales en la sangre fetal y en el líquido amniótico; estos niveles disminuyeron, a igual velocidad, en los tres compartimentos a medida que fue eliminada por la bilis materna. La presencia de bilirrubina en líquido amniótico es debida a una circulación retrógrada desde el espacio intervelloso hacia el líquido, a través de la placa amniocorial de la placenta, este paso estaría regulado por gradientes de concentración a ambos lados de la membrana.

Las variaciones de concentración en líquido amniótico no podían ser medidas con precisión con las técnicas usuales, pero desde que Bevis (12) aplicó la utilidad de la investigación de la banda de Sorel, por métodos espectrofotométricos, en el estudio de los pigmentos pirrólicos, multitud de estudios aparecieron para demostrar que la titulación de este elemento en el líquido amniótico es de gran valor como índice de maduración fetal (10, 36, 17, 26, 20).

Brazie y cols. (36) y Halitzky (37) han descrito una nueva técnica, por extracción con cloroformo, de fácil ejecución en los laboratorios de rutina y que brinda resultados comparables a las técnicas espectrofotométricas.

La titulación de bilirrubina en el líquido amniótico ha resultado de gran valor en los casos de eritroblastosis fetal y en cualquier caso en que se sospeche hemólisis fetal y se ha demostrado que es un índice pronóstico, de alta fidelidad, que sirve como guía en el manejo y conducción de las pacientes que sufren de esta grave patología (27, 36, 14, 15, 16, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 28).

Naturalmente, existen factores de error que han sido claramente expuestos por Liley (41) Bjerre (42), Halitsky (37) y que deben tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados. Los factores de error frecuentes son: presencia de contaminantes, oxihemoglobina, metalbúmina, meconio o bilirrubina proveniente de niveles exagerados en la madre, hepatitis, hemólisis materna, etc.

La patogénesis de la enfermedad hemolítica en el recién nacido fue descrita por Levine y Stetson (31, 32), simultáneamente con el descubrimiento del factor Rh, hecho por Landsteiner y Wiener (33). Se hizo indispensable desde entonces, tratar de valorar el grado de hemólisis en el feto, para adoptar una conducta que permitiera la disminución de la morbimortalidad en esta enfermedad. Liley (13) demuestra la utilidad de la espectrofotometría y traza en nomograma que inter-relaciona el estado fetal y la edad de gestación con la

absorbencia de la luz monocromática a las 450 nm, lo que le permite, posteriormente efectuar la primera transfusión fetal in utero (34). Otros investigadores han descrito otros tipos de nomograma entre ellos, Freda (35) Campbell (18) y Robertson (26); este autor opina que en cada medio debe establecerse un nomograma local de acuerdo a los recursos hospitalarios para la atención del parto y del recién nacido.

Bowman (38, 39) estudia la incidencia y especificidad de anticuerpos maternos en la sensibilización por otros grupos sanguíneos ABO, Mn, Kell, Lutheran, Lewis, Duffy, Kidd, Diego, I, pero no ha reportado la utilidad del estudio de la bilirrubina en estos casos. Freda (3, 40) estudia los casos en los cuales sería necesario la titulación seriada por incompatibilidad de grupos del sistema ABO.

La finalidad del presente trabajo es establecer la concentración de la bilirrubina y de las proteínas totales en nuestro medio, en pacientes normales, a diferentes edades de gestación para delinear su utilidad como índice de maduración estableciendo las curvas de valores promedios, diagrama de dispersión y correlación (43). Con los datos obtenidos se correlacionará la relación que exista entre proteínas y bilirrubina que se describió bioquímicamente.

El conocimiento de los valores normales será base de comparación con estudios posteriores de casos patológicos.

Material y Métodos

Ochenta muestras de líquido amniótico fueron obtenidas por amniocentesis transabdominal de ochenta pacientes con embarazo normal entre 22 y 42 semanas de gestación. Las pacientes provenían del servicio prenatal del Instituto Materno Infantil "Concepción Villaveces de Acosta" de Bogotá. La normalidad fue establecida por evaluación clínica y comprobación por exámenes paraclínicos: Serología, cuadro hemático, orina. Se descartaron pacientes con Rh negativo.

Después de la amniocentesis se siguió su embarazo hasta la terminación espontánea del mismo y se valoró el recién nacido descartándose los casos que terminaron con niño prematuro, ictericia o cualquier otra patología, se descartaron así mismo, los embarazos prolongados.

De esta manera se analizaron 65 resultados de pacientes y niños absolutamente sanos. La edad de gestación en el momento de la punción se estableció de acuerdo al dato del primer día de la última menstruación. Las muestras de líquido amniótico obtenido fueron centrifugadas a 3.000 RPM o filtradas, inmediatamente después de obtenidas, para evitar contaminación de sangre en la punción. Una porción del líquido obtenido se envió al laboratorio de bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional, debidamente protegido de la luz, el contenido fue analizado inmediatament, días después de su almacenamiento en nevera. Los análisis espectrofotométricos se hicieron en aparato marca Bauer & Lomb; los resultados obtenidos, estudiados según método recomendado por Liley (13), en papel semilogarítmico, buscando el pico de la bilirrubina a los 450 nm y estableciendo la línea basal entre los datos obtenidos a los 375 y 450 nm.

Otra porción del líquido se envió al laboratorio del Hospital San Juan de Dios en donde se procesó el lí-

quido con la técnica de Looney (47) para titular las proteínas totales.

Para el análisis final se agruparon los datos obtenidos de acuerdo a la edad gestacional en grupos de dos semanas a partir de la vigesimasexta.

Los datos obtenidos por espectrofotometría fueron trasladados a papel milimetrado (44) y se configuró la curva de variación de acuerdo a la edad de gestación.

Se estudiaron los valores promedios, variación standard y gráfica de correlación de bilirrubina y proteínas, separadamente.

Posteriormente se compararon las dos variantes, bilirrubina y proteína entre sí, para establcer el coeficiente de correlación, ecuación de regresión y línea de regresión.

Semanas de gestación	Nº Casos	Bilirrubina D.O. X	Sx	Proteína Mgrs.% X	Sx
— 26	7	.088	.035	424	94.8
26 y 27	3	.054	.015	372	37.7
28 y 29	10	.041	.014	323	129
30 y 31	8	.037	.019	256	98
32 y 33	6	.027	.022	205	94
34 y 35	10	.021	.019	208	58
36 y 37	5	.020	.007	165	57.8
38 y 39	6	.017	.006	173	53.9
40 y 41	6	.014	.006	163	43.4
42 y 43	4	.024	.017	171	51

TABLA Nº 1 — Valores de concentración de bilirrubina y proteínas en las pacientes estudiadas. Variación standard de las mismas.

Resultados

Los resultados obtenidos con la titulación de bilirrubina en el líquido amniótico (Tabla 1) representan valores descendentes progresivos (Gráficas 3 y 4). El valor promedio en la 36ª semana corresponde a un diferencial óptico de 0.20 (Sx 0,007). Teniendo en cuenta la variación standard solamente dos casos mayores de 36 semanas dan cifras mayores; siete casos por debajo de esta cifra son embarazos de menos de 36 semanas.

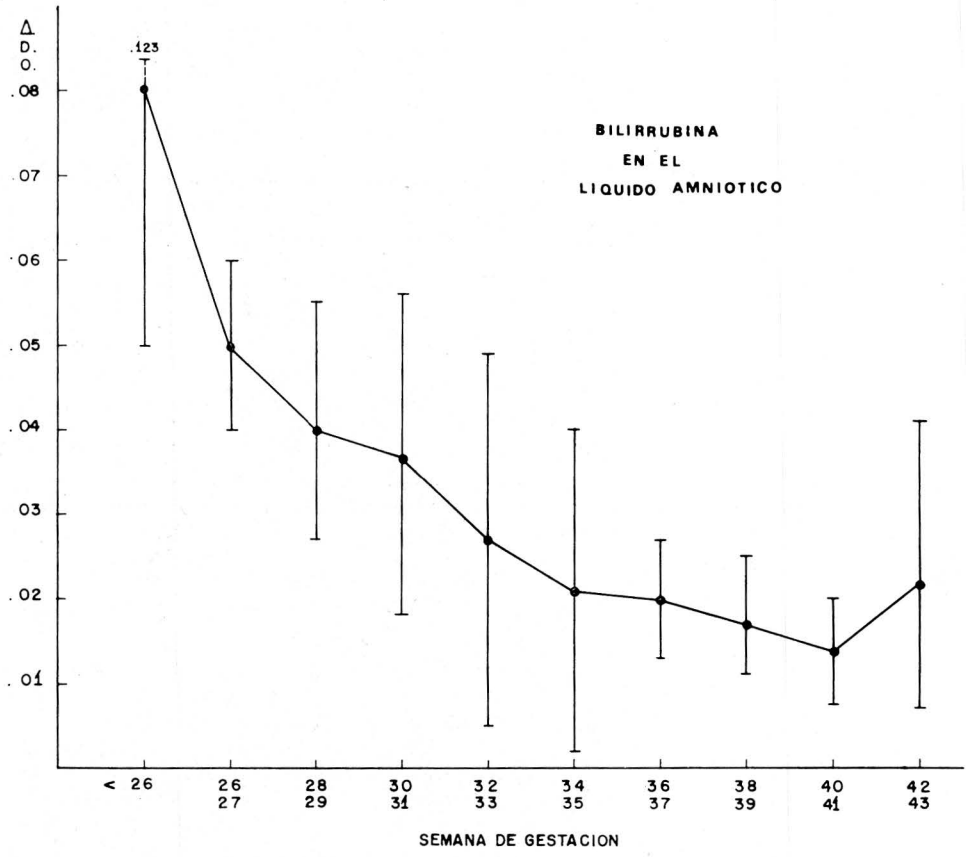
La línea de regresión, descendente, se encontró con la ecuación Y = 0.19 - 0.0048 X. El índice de correlación entre valores de incremento de densidad óptica y semanas de gestación es: r = - 0.90.

La línea de regresión está en límites similares a los establecidos en el nomograma de Liley en la zona A.

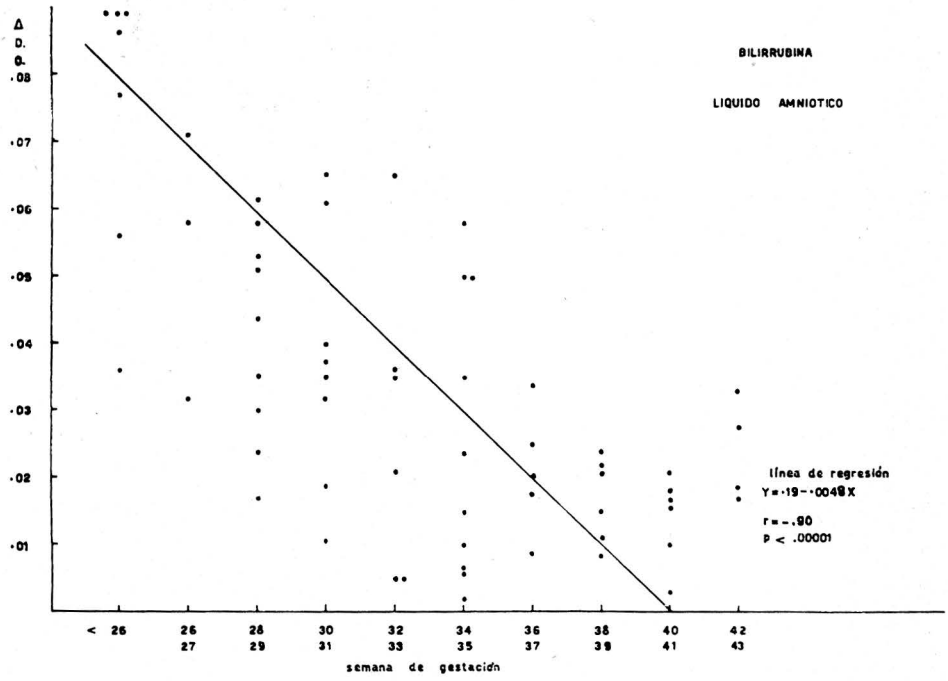
Las proteínas también se encontraron correlacionadas con la edad gestacional, de una manera descendente (Gráficas 5 y 6). Tomando la edad 36 semanas como límite de maduración fetal, encontramos que la concentración promedio en este punto es del 165 mgrs.% (S x 57). Solamente dos casos mayores de esta fecha demuestran cifras mayores. En ningún caso menor de esta edad gestacional las cifras fueron menores a las enunciadas.

El índice de correlación fue r = - 0.77.

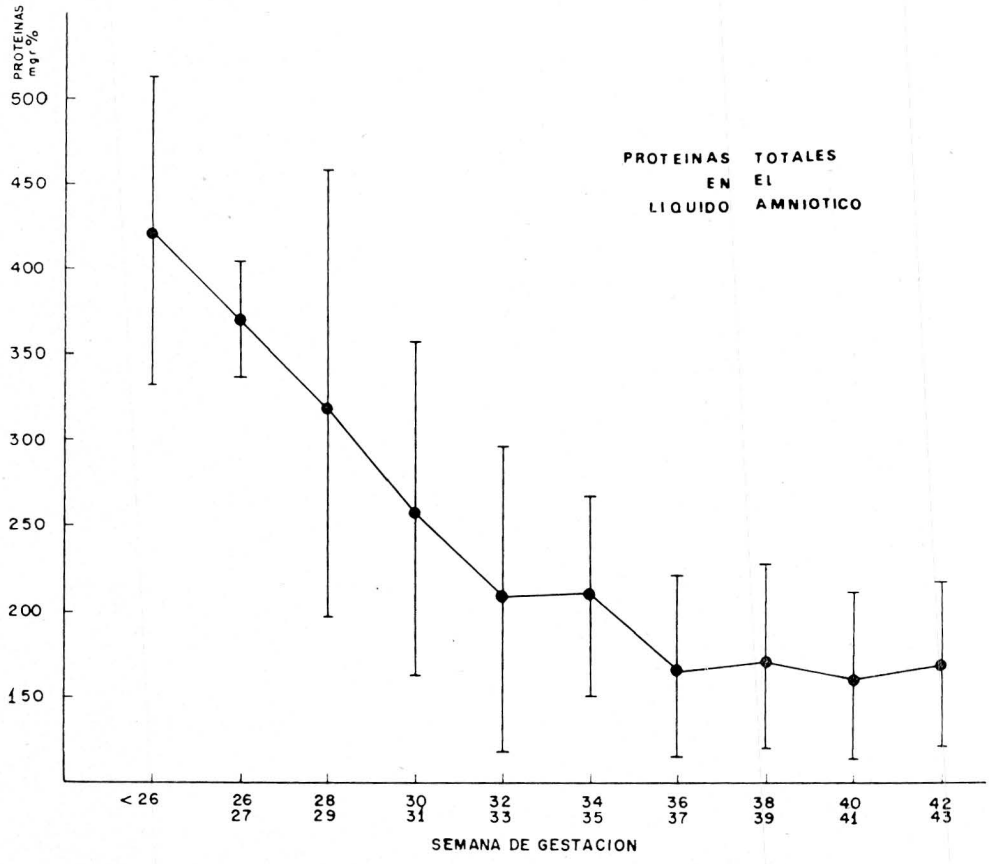
La línea de regresión, descendente se encontró con la fórmula Y = 808 - 16.85 X.



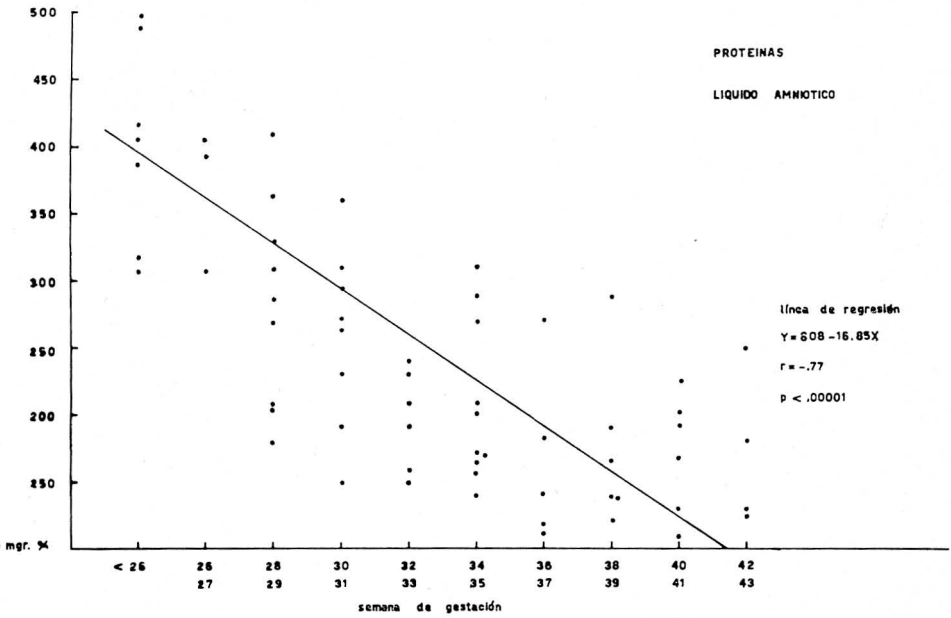
GRAFICA Nº 3 — Representación de los valores promedios y variaciones standard de la bilirrubina en el líquido amniótico. Curva de promedios francamente descendente. Se hace notorio el límite de D.O a 0,02 en la semana 36.



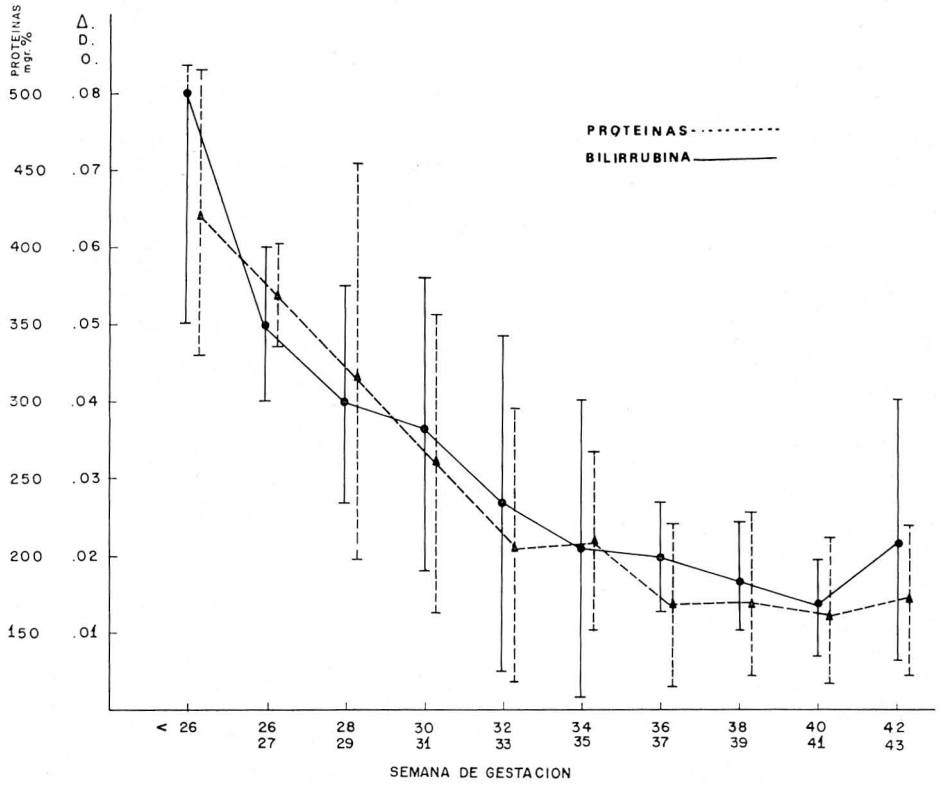
GRAFICA Nº 4 — Gráfica de dispersión y línea de regresión. Se anota una correlación de —0,90, que demuestra una franca y muy buena correlación entre concentración de bilirrubina y edad de gestación.



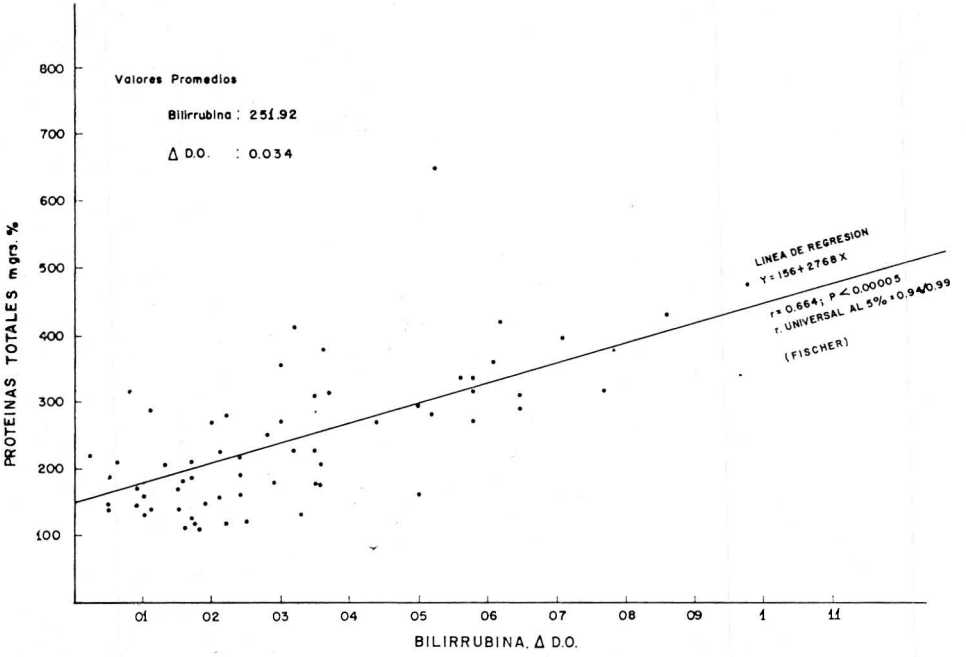
GRAFICA Nº 5 — Representación de los valores promedios y variaciones standard de las proteínas en el líquido amniótico. Curva de promedios francamente descendente. Límite de proteínas a la semana 36 = 165 mgrs.%.



GRAFICA Nº 6 — Gráfica de dispersión y línea de regresión de la proteína comparada con la edad de gestación. Se aprecia un r de —0,77 índice de buena correlación.



GRAFICA Nº 7 — Superposición de concentraciones promedios de bilirrubina y proteínas de líquido amniótico. Véase la relación notoria y paralelismo en el descenso de las dos sustancias.



GRAFICA Nº 8 — Gráfica de dispersión y línea de regresión positiva en la correlación entre bilirrubina y proteínas totales. R = 0,664 R universal al 5% = 94, 99 (Fischer).

Los valores de las proteínas totales son inferiores a los relatados por otros autores nórdicos (45 y 46).

Correlacionando la bilirrubina con la proteína (Gráficas 7 y 8) en unidades cuantitativas, dispuestas en pares de valores para las dos variables, fue posible calcular la constante del cceficiente de correlación que nos permite expresar el grado de asociación entre ambas variables. Se elaboró el diagrama de asociación que nos demuestra una disposición recta y con pendiente positiva.

El coeficiente de correlación fue r = 0,664.

El Es de r fue de 0,125 y el p ≺ 0,00005.

Por prueba Fischer al 5% dentro de un coeficiente de correlación de 0,94 y 0,99 va a encontrarse la correlación del universo. La correlación es muy intensa y significativa.

La recta de regresión fue trazada con la ecuación: Y = 156 + 2768 X.

Conclusiones

Los valores de concentración de bilirrubina y proteínas representan un excelente índice de maduración fetal. La cifra de A.D.O. de 0,020 puede considerarse como límite de maduración, cifras por encima de ella serían de embarazos menores de 36 semanas y por debajo, embarazos mayores de 36 semanas. Esta cifra es un poco más alta que la presentada por otros autores como Belitzky y Pose, quien la fija en 0.015, Mandelbaum en 0.012.

Para las proteínas el límite de la maduración presenta cifras de 165 mgrs. que están por debajo de las cifras encontradas por investigadores nórdicos. Esta deficiencia puede ser debida a limitaciones dietéticas características en el nivel económico de estas pacientes.

La correlación entre bilirrubina y proteínas no es sorprendente por cuanto la bilirrubina es captada por las proteínas.

El descenso de la bilirrubina en el líquido amniótico es explicable por la facilidad del manejo del pigmento a medida que la placenta madura, permitiendo un mayor intercambio materno fetal; por otra parte la mayor maduración del hígado fetal permite un aumento en la conjugación de la bilirrubina al final del embarazo.

No se conocen a fondo las vías de acceso de las proteínas al líquido amniótico pero se cree que aumenta progresivamente hasta la semana 25 y que de aquí en adelante empieza a disminuir por deglución fetal.

Conclusions

The concentration values of bilirubin and proteins represents an excellent index of fetal maturity. The figure of 0,20 of A.D.O. may be considered as a limit of maturity, figures exceeding such would correspond to pregnancies of less than 36 weeks and below same for pregnancies of over 36 weeks. This figure is somewhat higher than the one given by other authors such as Belitzky and Pose, who fix it in 0.015, and Mandelbaum in 0.012.

In the case of proteins the limit of maturity shows figures of 165 mgrs., which are below the figures encountered by northern investigators. This deficiency may be due to dietetical limitations which are characteristic within the economic standard of these patients.

The co-relation between bilirubin and proteins is not surprising since bilirubin is BINDED by the proteins.

The decrease of bilirubin in the amniotic liquid is understandable by the facility in the handling of the pigment as the placenta matures, permitting greater maternal-fetus exchange; furthermore, the greater maturity of the fetal liver enables an increase in the CONJUGATION of bilirubin and the end of the pregnancy.

The routes of access of the proteins to the amniotic liquid are not known well, but it is believed that it progressively increases up to the 25th week and thereafter begins to progressively decrease through fetal deglutition.

BIBLIOGRAFIA

1 SCHENKER, S., DAWBER, N. H., SCHMID, R. J. Clin. Invest. 43: 32, 1964.

2 LESTER, R., BEHRMAN, R. E., LUCEY, J. F. Pediatrics. 32: 416. 1963.

3 WEINER A. S., FREDA V. J., WEXLER, I. Am. J. Obst. & Gynec. 79: 567, 1960.

4 OSTROW J. D., JANDL, J. M., SCHMID, R. J. Clinic. Invest. 41: 1628, 1962.

5 OSTROW J. D., SCHMID R. J. Clinic. Invest. 42: 1286 1963.

6 KLASTING, G. Ann. Rev. Med. 12: 239 1961.

7 SCHMID, R. Das Medizinische Prisma. 1: 3, 1972.

8 HARPER H. Manual de química fisiológica. 3a. Ed. Manuales Modernos Mex.

9 SCHENKER S. Clin. Obst. & Gynec. Ed. Interamericana. 1011 Dic. 1964.

10 MANDELBAUM B., EVANS T. H. Am. J. Obst. & Ginec. 104: 365, 1969.

11 BASHORE R. A. SCHMID F., SCHENKER S. Am. J. Obst. & Gynec. 103: 950, 1969.

12 BEVIS D. C. A. Lancet, 1: 395, 1952.

13 LILEY A. U. Am. J. Obst. & Ginec. 82: 1359, 1961.

14 FREDA V. J. Am. J. Obst. & Ginec. 92: 341, 1965.

15 FREDA V. J. Clin. Obst. & Ginec. 16: 102, 1973.

16 QUEENAN J. T. Am. J. Obst. & Gynec. 104: 396, 1969.

17 DROEGENMUELLER W. JACKSON C. Am. J. Obst. & Ginec. 104: 424, 1969.

18 CAMPBELL C. JAFFE R. BRUGE A. U., Am. J. Obst. & Ginec., 104, 556, 1969.

19 HAWORTH S. G., MILIC A. B., ADAMSON K. Clin. Obst. & Gynec. 1: 194, 1968.

20 BELITZKY R., POSE, V., Archivos de Ginecología y Obst. 29: 109, 1970.

21 SUSSMAN L. Am. J. Obst. & Ginec. 37: 170, 1970.

22 SHULMAN H. Am. J. Obst. & Gynec. 34: 151, 1969.

23 WHITEFIELD C. R. Am. J. Obst. & Gynec. 108: 1238, 1970.

24 CASSADY G., BARNET R. Am. J. Obst. & Gynec. 108: 1010, 1970.

25 FLEMING A. F., WOLF A. J. Clin. Chim. Acta, 12: 67, 1965.

26 ROBERTSON J. G. Am. J. Obst. & Gynec. 103: 713, 1969.

27 LEE T. Y., WEI P. I. Am. J. Obst. & Gynec. 107: 917, 1970.

28 HALITSKY V., KRUMHOLTZ B. A. Am. J. Obst. & Gynec. 106, 1208, 1970.

29 HISH M. Y. MARKO J. JETTS H. Am. J. Obst. & Gynec. 106, 592, 1970.

30 BENTRE G. C. PERKINS P. WAXMAN B. Am. J. Obst. & Gynec. 106: 017. 1970.

31 LEVINE P. Jama, 113: 126, 1939.

32 LEVINE P. KATZIM E., BURNHAM L. Jama. 116: 825, 1939.

33 LANDSTEINER K.. WIENER A. S. Proc. Soc. Exp. Biol. 43: 223, 1940.

34 LILEY A. W. Am. J. Obst. & Gynec. 86: 485, 1962.

35 FREDA V. J. Am. J. Obst. & Gynec. 92: 341, 1965.

36 BRAZIE J. V. BOWES W. A. IBBOTT F. A. Am. J. Obst. & Gynec. 104: 80, 1969.

37 HALITZKY V. KRUMHOLTZ B. A. Am. J. Obst. & Gynec. 106: 1.209, 1970.

38 BOWMAN H. Am. J. Obst. & Gynec. 101: 614, 1968.

39 BOWMAN H. Am. J. Obst. & Gynec. 101: 623, 1960.

40 FREDA V. J., CARTER B. A. Clin. Obst. & Gynec. nteramericc. 978, 1964.

41 LILEY A. W. Am. J. Obst. & Gynec. 86: 485, 1963.

42 BJERRE C. Am. J. Obst. & Gynec. 102: 275, 1968.

43 BANCROFT T. H. Introducción a la bioestadística. Ed. Univ. Bs. As. 1969.

44 SCHULMAN, H. H. Obst. & Gynec. Dig. 9: 31, 1967.

45 JONASSON L. E. Acta Obst. & Gynec. Scand. 51: 187, 1972.

46 CARLTON, M. A., SINHA, R. J. Obst. Gynec. Brit. Comm. 77: 221, 1970.

47 LOONEY, J. M. and WALSH, A. I. J. Biol. Chem. 127, 117. 1939.