
UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA

Tesis doctoral

**Melatonina en suero durante la primera
semana de vida:
Su relación con la actividad antioxidante
en el periodo neonatal**

RAQUEL ÁVILA VILLEGAS

Granada, Marzo de 2008

**Melatonina en suero durante la primera
semana de vida:
Su relación con la actividad antioxidante
en el periodo neonatal**

Lda. Raquel Ávila Villegas

Marzo, 2008

D. Antonio MUÑOZ HOYOS, Profesor Titular de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA: Que **D^a Raquel ÁVILA VILLEGAS**, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado su Trabajo de Investigación Prospectivo para la confección de la Memoria de **TESIS DOCTORAL**, bajo mi dirección sobre el tema: **MELATONINA EN SUERO DURANTE LA PRIMERA SEMANA DE VIDA: SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL PERIODO NEONATAL**, la que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido leída y revisada la presente y estando conforme para su presentación para ser juzgada.

Prof. A. Muñoz Hoyos

En Granada, Marzo de 2008

Dr Antonio Bonillo Perales, Jefe de Servicio de Pediatría del Hospital de Torrecárdenas (Almería),

CERTIFICA: Que **D^a Raquel Ávila Villegas**, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado su Trabajo de Investigación Prospectivo para la confección de la Memoria de **TESIS DOCTORAL**, bajo mi dirección sobre el tema: **MELATONINA EN SUERO DURANTE LA PRIMERA SEMANA DE VIDA: SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL PERIODO NEONATAL** la que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido leída y revisada la presente y estando conforme para su presentación para ser juzgada.

Dr Antonio Bonillo Perales
En Granada, Marzo de 2008

D. Antonio MOLINA CARBALLO, Profesor Asociado de
Pediatria de la Facultad de Medicina de la Universidad de
Granada,

CERTIFICA: Que **D^a Raquel ÁVILA VILLEGAS**,
Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado su Trabajo de
Investigación Prospectivo para la confección de la Memoria de
TESIS DOCTORAL, bajo mi dirección sobre el tema:
**MELATONINA EN SUERO DURANTE LA
PRIMERA SEMANA DE VIDA: SU
RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE EN EL PERIODO
NEONATAL**, la que ha finalizado con todo
aprovechamiento, habiendo sido leída y revisada la presente y
estando conforme para su presentación para ser juzgada.

Prof. A. Molina Carballo

En Granada, Marzo de 2008

A mi marido y nuestras hijas, Irene y Claudia

AGRADECIMIENTOS

Llegado el final de un esfuerzo de años, sería injusto presentar esta tesis doctoral sin tener un recuerdo de agradecimiento a todas aquellas personas que han estado junto a mí, viviendo día a día este trabajo y dándome el ánimo necesario para seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles en los que estaba dispuesta “a tirar la toalla”.

En primer lugar, a mis directores de tesis: al Dr. Antonio Muñoz Hoyos, profesor Titular de Pediatría de la Facultad de Medicina de Granada, por su valiosa dirección y colaboración, fundamentales en el diseño de este proyecto y realización del mismo. Por su optimismo en todo lo que hace, su gran labor en la formación de tantas promociones de pediatras que hemos pasado por sus manos, transmitiéndonos con su quehacer diario el entusiasmo por el ejercicio de la pediatría sin olvidar los principios humanos esenciales. Al Dr. Antonio Bonillo Perales, por su colaboración en la recogida de datos. Además, me gustaría destacar el apoyo, la disponibilidad, el tiempo invertido y el trabajo realizado en esta tesis del Dr. Antonio Molina Carballo. Sin su ayuda esta tesis no se habría terminado. Mil gracias, de todo corazón.

A mi familia: mis padres, Felipe y Loly, por su esfuerzo y sacrificio para que tuviéramos todas las posibilidades en la vida; por su amor incondicional y ser para sus hijas un ejemplo. A mi hermana y amiga Irene, que siempre está a mi lado. A mi esposo, Juanma, siempre dispuesto a ayudarme, a acompañarme, a darme una palabra de ánimo y aliento cuando la he necesitado; y sobre todo gracias por aguantar mis agobios. A Yolanda, mi cuñada, responsable del diseño de la portada de esta tesis, por su apoyo y generosidad ofreciéndome su creatividad y dotes artísticas. Y por último, a mis niñas: Irene y

Claudia. Cuando comencé la elaboración de la tesis no estaban en el mundo ninguna de las dos. Ellas son lo más maravilloso que tengo, el motor y la alegría de mi vida.

A todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS

ABTS: ácido 2,2'-azio-bis 3 etilbenzil-tiazolín-6-sulfónico.
ADN: ácido desoxirribonucleico.
aMT: melatonina.
AMPc: adenosin monofosfato cíclico.
ATP: adenosina trifosfato.
Cl⁻: cloro.
CMV: citomegalovirus.
CoQ: coenzima Q.
DBP: displasia broncopulmonar.
DS: desviación típica.
DMBA: dimetil-benzenantraceno.
ECN: enterocolitis necrotizante.
EDTA: etilendiaminotetraacético.
ESQ: núcleo supraquiasmático.
Fe²⁺: ión ferroso.
Fe³⁺: ión férrico.
FiO₂: fracción inspirada de oxígeno.
FRL: fibroplasia retrolental.
FSH: hormona estimuladora del folículo.
GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas.
GHS: glutation reducido.
GPX: glutation peroxidasa.
GSSG: glutation disulfuro oxidado.
GR: glutation reductasa.
HIV: hemorragia interventricular.
H₂O₂: peróxido de hidrógeno.
HO₂·: radical perhidroxilo.
HPPN: hipertensión pulmonar persistente neonatal.
L·: radical lipídico.
LOO·: radical lipídico peroxilo.
LOOH: hidroperóxidos lipídicos.
LH: hormona luteinizante.
L-NAME: L-nitro-arginina-metil-ester.
Linfocitos NK: linfocitos natural killer.
MDA: malondialdehido.
NAD: nicotinamida-adenina-dinucleótido (forma oxidada).
NADH: nicotinamida-adenina-dinucleótido (forma reducida).
NADPH: nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (forma reducida).
NAT: N-acetiltransferasa.
NE: norepinefrina.

NO: óxido nítrico.
NOS: óxido nítrico sintetasa.
O₂⁻: anión superóxido.
¹O₂: oxígeno singlete.
OH⁻: radical hidroxilo.
8-OH-dG: 8 hidroxideoxiguanosina.
pCO₂: presión parcial de dióxido de carbono.
PCR: proteína C reactiva.
PG: prostaglandina.
PLV: leucomalacia periventricular.
PMN: polimorfonucleares.
PVC: presión venosa central.
RN: recién nacido.
RNBP: recién nacido bajo peso.
RPM: rotura prematura de membranas.
S²: varianza.
Sat. O₂: saturación de oxígeno.
SCA: síndrome de carencia afectiva.
SCG: ganglio cervical superior.
6-SaMT: 6-sulfatoxi-melatonina.
SOD: superóxido dismutasa.
SDR: síndrome de distress respiratorio.
TAM: tensión arterial media.
TAS: tensión arterial sistólica.
TRH: hormona tirotrópica.
TSH: hormona estimulante del tiroides.
T₄: tiroxina.
T₃: triyodotironina.
 \bar{x} : media.

ÍNDICE

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. RADICALES LIBRES.....	3
1.1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.2 TIPOS DE RADICALES LIBRES.....	4
1.2.1 RADICAL SUPERÓXIDO.....	5
1.2.2 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	6
1.2.3 RADICAL HIDROXILO.....	7
1.2.4 OXÍGENO SINGLETE.....	9
1.3 FUENTES DE PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES.....	10
1.3.1 CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES MITOCONDRIALES.....	10
1.3.2 SISTEMA XANTINO-OXIDASA.....	12
1.3.3 METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO...15	
1.3.4 FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES POR CÉLULAS FAGOCÍTICAS.....	15
1.3.5 ADRIAMICINA.....	16
1.3.6 METALES IÓNICOS Y PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES.....	20
1.3.7 CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS.....	21
1.3.8 RADIACIONES IONIZANTES.....	21
1.3.9 CITOCROMO P ₄₅₀	21
1.4 INTERACCIONES DE LOS RADICALES LIBRES.....	23
1.4.1 INTERACCIONES DE LOS RADICALES LIBRES E HIDRATOS DE CARBONO.....	23
1.4.2 INTERACCIONES ENTRE LOS RADICALES LIBRES Y ADN.....	24
1.4.3 INTERACCIONES ENTRE RADICALES LIBRES Y PROTEÍNAS.....	25
1.4.4 INTERACCIONES ENTRE RADICALES LIBRES Y LÍPIDOS.....	26

1.4.4.1	Iniciación.....	28
1.4.4.2	Propagación.....	29
1.4.4.3	Terminación.....	30
1.4.4.4	Lipoperoxidación y patología.....	31
1.5	MECANISMOS ANTIOXIDANTES.....	32
1.5.1	MECANISMOS ENZIMÁTICOS.....	34
1.5.1.1	Catalasa.....	34
1.5.1.2	Superóxido dismutasa.....	36
1.5.1.3	Glutation peroxidasa.....	37
1.5.1.4	Glutation reductasa.....	38
1.5.2	MECANISMOS NO ENZIMÁTICOS.....	39
1.5.2.1	Vitamina E (alfatocoferol).....	40
1.5.2.2	Coenzima Q ₁₀ (ubiquinona).....	42
1.5.2.3	Beta-carotenos.....	43
1.5.2.4	Ácido ascórbico (vitamina C).....	44
2	MELATONINA.....	46
2.1	INTRODUCCIÓN.....	46
2.2	PRODUCCIÓN DE MELATONINA.....	47
2.3	MECANISMOS DE ACCIÓN.....	48
2.4	FUNCIONES DE LA MELATONINA. DIVERSIDAD FUNCIONAL.....	49
2.4.1	FUNCIÓN NEUROENDOCRINA- REPRODUCTORA.....	49
2.4.2	MELATONINA Y SITUACIONES DE ESTRÉS.....	51
2.4.3	MELATONINA Y SISTEMA INMUNOLÓGICO.....	57
2.4.4	MELATONINA Y CRECIMIENTO TUMORAL.....	62
2.4.5	MELATONINA Y ENVEJECIMIENTO.....	65
2.5	MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE.....	66
2.5.1	ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	66
2.5.2	EVIDENCIA <i>IN VIVO</i>	68

2.5.2.1 Interacciones de la melatonina con el ADN.....	68
2.5.2.2 Interacciones de la melatonina con las proteínas.....	70
2.5.2.3 Interacciones de la melatonina con los lípidos.....	71
2.6 PATOLOGÍA POR RADICALES LIBRES EN PEDIATRÍA.....	73
2.6.1 DISPLASIA BRONCO-PULMONAR.....	73
2.6.2 HIPERTENSIÓN PULMONAR PERSISTENTE NEONATAL.....	76
2.6.3 PERSISTENCIA DEL DUCTUS ARTERIOSO.....	77
2.6.4 FIBROPLASIA RETROLENTAL.....	78
2.6.5 ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE.....	80
2.6.6 DAÑO CEREBRAL ISQUÉMICO-HEMORRÁGICO Y DESARROLLO NEUROMOTOR.....	82
2.6.6.1 Participación de la hipoxia-reperfusión.....	82
2.6.6.2 Implicación del hierro no unido a proteínas..	82
II JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	85
1 JUSTIFICACIÓN.....	87
2 OBJETIVOS.....	92
III MATERIAL Y MÉTODOS.....	93
1 MATERIAL.....	95
2 MÉTODOS.....	102
2.1 METODOLOGÍA CLÍNICA.....	102
2.1.1 PROTOCOLO DE ACTUACIÓN AL RECIÉN NACIDO MENOR DE 1.500 g.....	102
2.1.1.1 Control de temperatura y humedad.....	102
2.1.1.2 Líquidos y electrolitos.....	103
2.1.1.3 Glucemia.....	104

2.1.1.4 Alimentación.....	104
2.1.1.5 Soporte ventilatorio.....	105
2.1.1.6 Tratamiento con surfactante.....	108
2.1.1.7 Cuidados de la piel.....	109
2.1.1.8 Infecciones.....	110
2.1.1.9 Hemorragia intracraneana.....	110
2.1.1.10 Hiperbilirrubinemia.....	111
2.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	112
2.2.1 ANALÍTICA GENERAL.....	112
2.2.1.1 Análisis gasométricos y del equilibrio ácido-base.....	112
2.2.1.2 Determinaciones de hematología y bioquímica.....	112
2.2.1.3 Determinaciones microbiológicas.....	113
2.2.2 MEDICIÓN DE MELATONINA.....	113
2.2.2.1 Introducción y principio del test.....	113
2.2.2.2 Almacenamiento y estabilidad.....	114
2.2.2.3 Contenidos del Kit.....	115
2.2.2.4 Material adicional y equipamiento requerido que no está incluido.....	116
2.2.2.5 Almacenaje.....	116
2.2.2.6 Procedimiento del test.....	117
2.2.2.7 Cálculo de resultados.....	119
2.2.2.8 Control de calidad.....	119
2.2.2.9 Cuantificación.....	119
2.2.2.10 Características del ensayo.....	120
2.3 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.....	122
2.3.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	122
2.3.1.1 Medidas de tendencia central.....	123
2.3.1.2 Medidas de dispersión.....	123
2.3.2 INFERENCIA ESTADÍSTICA.....	125
2.3.2.1 Test de comparación de dos medias.....	125
2.3.2.2 Recta de regresión y coeficiente de correlación.....	127
2.3.2.3 Análisis de la varianza (ANOVA).....	128
2.3.2.4 Regresión múltiple.....	133
2.3.2.5 Test de transformación “Z” de Fisher.....	133

2.4 MÉTODO BIBLIOMÉTRICO.....	135
2.4.1 INVESTIGACIÓN DOCUMENTAL.....	135
2.4.2 EMPLEO REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
IV RESULTADOS.....	139
1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	141
2 DESCRIPTIVO HIPÓTESIS B.....	165
3 ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA.....	213
4 ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE DOS VÍAS.....	237
5 ESTUDIOS DE CORRELACIÓN Y REGRESIÓN.....	261
6 TRANSFORMACIÓN “Z” DE FISHER.....	283
V DISCUSIÓN.....	303
VI CONCLUSIONES.....	331
VII BIBLIOGRAFÍA.....	335

I.- INTRODUCCIÓN

1. RADICALES LIBRES

1.1 INTRODUCCIÓN

Halliwell¹ y Cheesman² definen los radicales libres como *sustancias (moléculas o átomos), capaces de una existencia independiente y que poseen uno o más electrones no apareados en su última órbita electrónica*. Esto les confiere una capacidad muy elevada para oxidar moléculas biológicas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y de esta forma alterar la homeostasis de la célula, lesionándola. Este daño celular se denomina “*estrés oxidativo*” y está implicado en la génesis de multitud de procesos morbosos, por lo que actualmente es objeto de gran estudio.

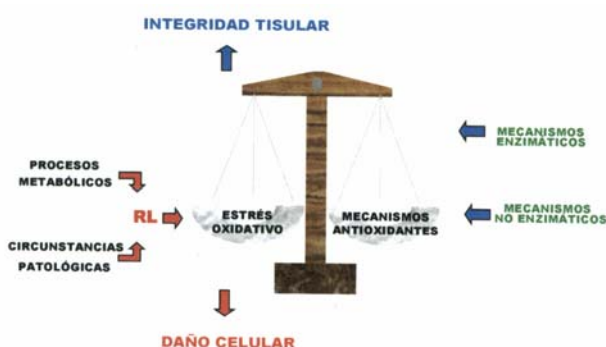


Figura 1: dualidad estrés oxidativo-sistemas antioxidantes.

Los radicales libres se forman continuamente en el organismo y, por ello, existen mecanismos fisiológicos para su neutralización, principalmente, a través de sustancias antioxidantes. El sistema antioxidante es capaz de suprimir la generación de radicales libres, atrapándolos y reparando el daño producido. Sin embargo, existen

situaciones patológicas (como la hipoxia mantenida, la isquemia, etc.) en las que estos mecanismos antioxidantes se desbordan y se produce el daño celular (figura 1).

Cuando un radical libre reacciona con otra sustancia, cediendo o captando un electrón, se convierte en estable, pero a costa de transformar en un radical a dicha sustancia, que a su vez puede reaccionar con otras moléculas (figura 2). Si la molécula diana es un antioxidante, su reactividad será baja y se interrumpirá la cadena^{1,3}. También se interrumpe la cadena si se unen dos radicales libres⁴. Esta gran capacidad para reaccionar hace que la vida media de los radicales libres sea muy corta, dificultando su estudio.

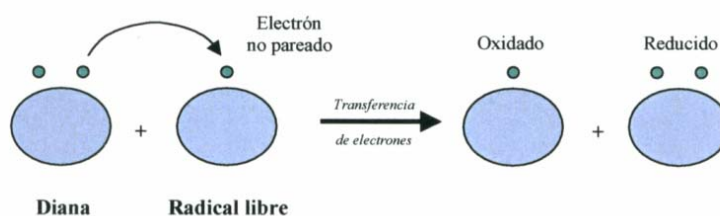


Figura 2: reacción de un radical libre con una molécula.

1.2 TIPOS DE RADICALES LIBRES

Los radicales libres se pueden formar a partir de moléculas orgánicas e inorgánicas de nuestro organismo y, sobre todo, a partir del oxígeno. De los radicales derivados del oxígeno, llamados “*especies reactivas del oxígeno*”, hablaremos más detenidamente por su importancia desde un punto de vista fisiológico y por su implicación en numerosos procesos patológicos. Estos son: anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y peróxido de hidrógeno

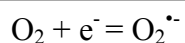
(H₂O₂). Este último, a pesar de no poder ser considerado en sentido estricto un radical libre por no tener electrones desapareados, en presencia de metales de transición como el hierro, es capaz de producir radicales hidroxilo. En la tabla 1 se exponen distintos radicales libres.

Radical	Nombre	Vida media	Blanco biológico
O ₂ ^{•-}	Superóxido	10 ⁻⁵ s	Enzimas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	Estable	Ácidos grasos insaturados
HO [•]	Radical hidroxil	10 ⁻⁹ s	Todas las moléculas
R [•]	R-ilo	10 ⁻⁸ s	Oxígeno
RO [•]	R-oxilo (alcoxilo)	10 ⁻⁶ s	Ácidos grasos insaturados
ROO [•]	R-dioxilo (peroxilo)	7 s	Ácidos grasos insaturados
ROOH [•]	Hidroperóxidos		Ácidos grasos insaturados
O ₂	Oxígeno singlete	10 ⁻⁶ s	H ₂ O
HOCL	Ácido hipocloroso	Estable	Distintas moléculas
NO [•]	R de óxido nítrico	-1s	Distintas moléculas

Tabla 1: radicales libres y especies reactivas de oxígeno.

1.2.1 RADICAL SUPERÓXIDO (O₂^{•-})

Este radical libre se forma por reducción monovalente o monoeléctrica del oxígeno molecular.



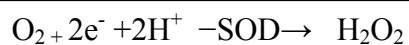
Su principal toxicidad radica en su capacidad para generar peróxido de hidrógeno u otros radicales libres y en ser reductor de iones metálicos de transición².

En la cadena mitocondrial de transporte de electrones, a través de la ubisemiquinona en un 75% y de la NADH deshidrogenasa en un 25%, se encuentra su fuente de producción más importante⁵. Otras fuentes son: reacciones catalizadas por la xantino-oxidasa y la aldehído-oxidasa, el escape de electrones del citocromo P₄₅₀ en el retículo endoplásmico hepático y la autooxidación de moléculas como hemoproteínas, hidroquinonas, catecolaminas, ascorbato, etc⁶.

Una característica importante del anión superóxido es que puede protonarse a pH bajos y transformarse en radical perhidroxilo (HO₂[•]). Éste puede reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados libres “*in vitro*” y producir lipoperoxidación, aunque “*in vivo*” su comportamiento es diferente, reaccionando con los lipoperóxidos ya formados y dando lugar a radicales peroxilo. A pH fisiológicos, la forma protonada del radical la encontramos en menos del 1%.

1.2.2 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H₂O₂)

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es un metabolito del oxígeno intracelular formado por una dismutación del anión superóxido, catalizada por la superóxido dismutasa o, directamente, por reducción bivalente del oxígeno.



Su principal acción citotóxica no se deriva de su capacidad para atravesar membranas biológicas y causar daño oxidativo en las

macromoléculas, sino que radica en generar otros radicales libres más tóxicos, como el radical hidroxilo (HO^\bullet), en presencia de metales de transición como el hierro o el cobre, mediante la reacción de Fenton⁷ (figura 3) o la de Haber-Weiss⁸.

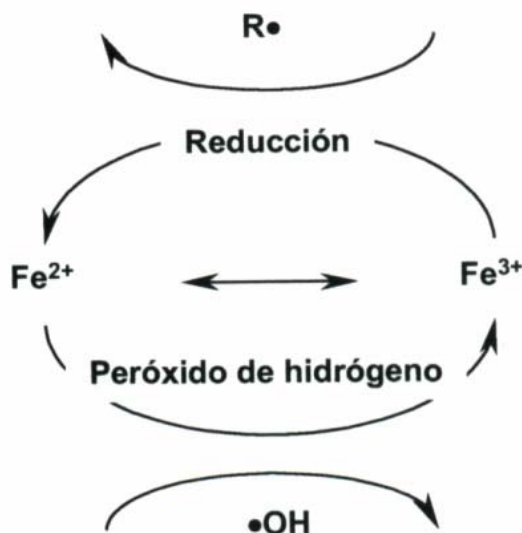


Figura 3: reacción de Fenton.

Las principales fuentes de producción del peróxido de hidrógeno las encontramos, por orden de importancia, en las mitocondrias, en los peroxisomas y el citosol celular.

1.2.3 RADICAL HIDROXILO (OH^\bullet)

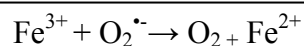
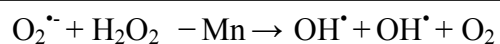
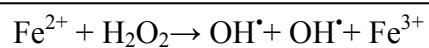
El radical hidroxilo es, de los radicales derivados del oxígeno, el que más interés despierta por su capacidad para reaccionar con cualquier molécula biológica con una constante cercana a $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Es considerado como uno de los principales iniciadores de la peroxidación lipídica⁹.

Se puede producir por:

- la fisión del agua provocada por la exposición a radiaciones ionizantes,
- la reducción del ozono por transferencia electrónica,
- fotones de peróxido de hidrógeno y
- la reacción de Fenton y de Haber-Weiss.

Como hemos comentado anteriormente, la toxicidad de los radicales superóxido y del peróxido de hidrógeno está en la capacidad de producir este radical. Así, el peróxido de hidrógeno en presencia del hierro (Fe^{2+}), se descompone para dar el radical HO^\bullet . Esta es la llamada reacción de Fenton⁷ (figura 3) y es su fuente de producción más importante. También, con la participación del radical superóxido, en presencia de peróxido de hidrógeno y metales de transición, se puede formar OH^\bullet ; es la reacción de Haber-Weiss⁸, también conocida como la reacción de Fenton conducida por el $\text{O}_2^{\bullet-}$

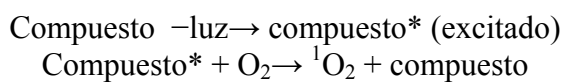


1.2.4 OXIGENO SINGLETE ($^1\text{O}_2$)

Lo mencionaremos porque, a pesar de no ser un radical libre, tiene gran capacidad para reaccionar directamente con macromoléculas, como los ácidos grasos. Sin embargo, no puede ser considerado como iniciador de la peroxidación lipídica debido a que, en su interacción con los ácidos grasos, origina peróxidos sin existir sustracción de hidrógeno, no produciéndose reacciones en cadena.

Obtenemos este radical cuando un átomo de oxígeno absorbe energía, originando una nueva disposición en sus electrones. Esto sucede si ciertos compuestos son iluminados en presencia del oxígeno, de manera que al absorber la luz, adquieren un estado de excitación electrónica y transfieren el exceso de energía al oxígeno, que se convierte en oxígeno singlete¹⁰. Entre los compuestos que tienen esta capacidad se encuentran colorantes, ciertas drogas (tetraciclinas) y distintas sustancias del cuerpo humano, como las porfirinas, riboflavinas y la bilirrubina¹⁰.

Otras vías de producción del oxígeno singlete son: la reacción de peróxidos entre sí y la interacción del ozono con ciertas moléculas biológicas.



1.3 FUENTES DE PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES

La producción de radicales libres en nuestro organismo es constante y continua. En su formación están implicados mecanismos fisiológicos como, por ejemplo, los generados por fagocitos como parte de su papel bactericida, y fenómenos patológicos o accidentales.

De cualquier forma, de su producción se pueden derivar una serie de consecuencias negativas (desnaturalización de proteínas, del DNA, inicio de la peroxidación lipídica, etc) si no son neutralizados por los sistemas antioxidantes de los que disponemos.

A continuación, citaremos las principales vías de producción de radicales libres:

- cadena de transporte de electrones mitocondriales,
- sistema xantino-oxidasa,
- metabolismo del ácido araquidónico,
- células fagocíticas,
- metabolismo de las catecolaminas,
- citocromo P₄₅₀,
- contaminantes atmosféricos y
- metales iónicos.

1.3.1 CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES MITOCONDRIALES

En la cadena de transporte de los electrones encontramos una de las vías más importantes en la formación de radicales libres (figura 4). Del oxígeno que llega a la mitocondria, el 90-95% es transformado en agua por reducción tetravalente y sin formar intermediarios

tóxicos; el otro 5-10% del oxígeno pasa a anión superóxido por una reducción monovalente, en la que intervienen electrones de los transportadores de la cadena. Como ya sabemos, este radical superóxido por acción de la superóxido dismutasa, se convierte en peróxido de hidrógeno y posteriormente, mediante la reacción de Fenton⁷ o de Haber-Weiss⁸, se forma el radical hidroxilo.

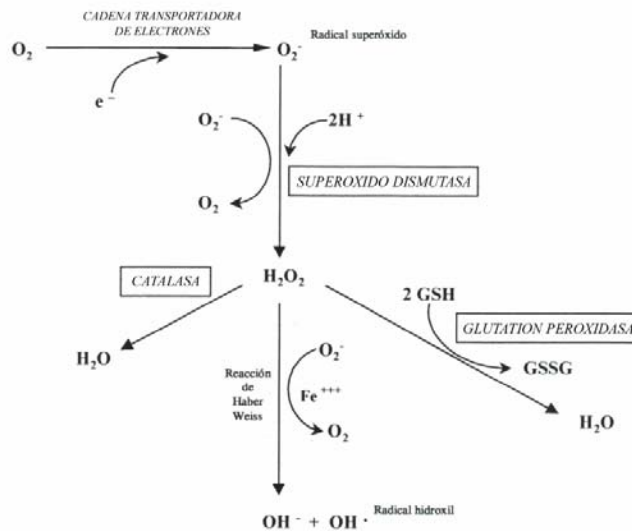


Figura 4: radicales oxigénicos.

De lo expuesto deducimos que, cuando se dan situaciones que provocan un mayor consumo de oxígeno (ejercicio físico, etc), hay un incremento en la formación del radical superóxido, al ser su generación dependiente de la cadena respiratoria mitocondrial. Este aumento de superóxido también sucede si la cadena de transporte de electrones está completamente reducida, como ocurre en situaciones de isquemia y reperusión.

1.3.2 SISTEMA XANTINO-OXIDASA

La xantino-oxidasa es la enzima encargada de la oxidación de la hipoxantina a xantina, y de ésta a ácido úrico. En esta reacción se genera anión superóxido por una reducción monovalente del oxígeno molecular.

En condiciones fisiológicas, encontramos a esta enzima en forma de xantino deshidrogenasa, que no produce radicales libres durante su actividad, ya que utiliza al NAD^+ como aceptor de electrones. En situaciones patológicas de isquemia, se altera la permeabilidad de la célula y hay un aumento del Ca^{2+} citosólico y una mayor producción de enzimas dependientes del calcio, como son las proteasas, que ocasionarán un paso de la xantino-deshidrogenasa a la xantino-oxidasa¹¹, generándose así radicales libres (figuras 5 y 6). Esto sucede en numerosas patologías como el síndrome de distress respiratorio, las quemaduras, en el shock hemorrágico o traumático¹², en la isquemia-reperusión¹³, etc; postulándose la posibilidad de mejorar la clínica del enfermo al utilizar inhibidores de la enzima, como el alopurinol u oxipurinol¹⁴.

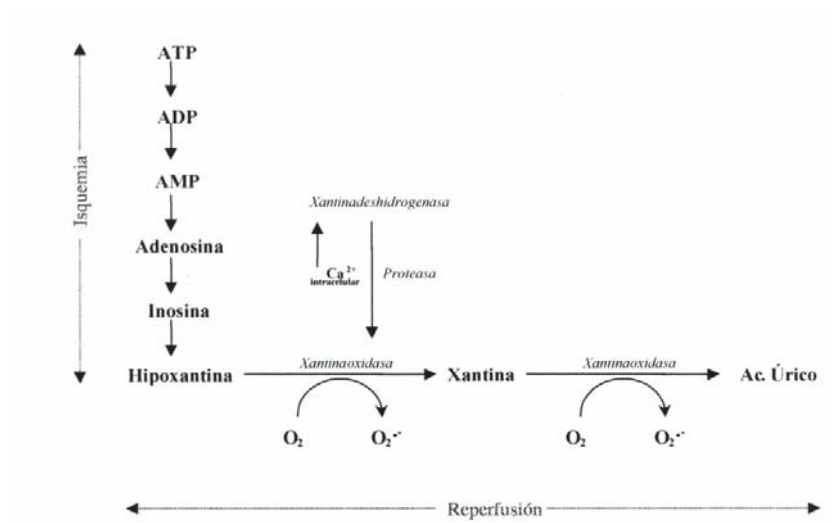


Figura 5: generación del anión superóxido por la xantino-oxidasa en situaciones de isquemia/reperusión.

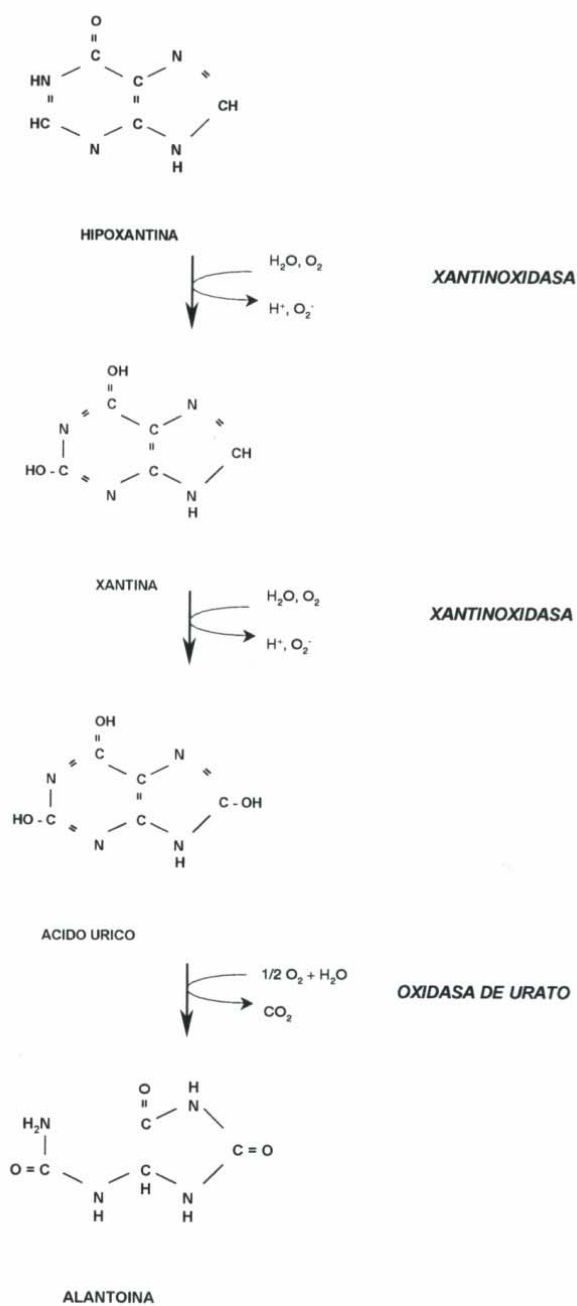


Figura 6: reacciones catalizadas por la xantino-oxidasa y la oxidasa de urato.

1.3.3 METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

El ácido araquidónico es un ácido graso insaturado de cadena larga que posee 20 carbonos en su estructura y cuatro dobles enlaces ($C_{20:4n6}$). Proviene de fosfolípidos de membrana por reacción de la fosfolipasa A_2 y es el precursor de las prostaglandinas y tromboxanos, cuyo papel en numerosos procesos es de sobra conocido por todos (inflamación, dolor, fiebre, regulación de la presión sanguínea, etc).

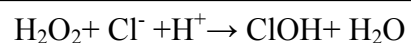
Sobre el ácido araquidónico van a actuar las enzimas catalíticas ciclooxigenasa y lipoperoxidasa. Por medio de la acción de la ciclooxigenasa, el ácido araquidónico se convierte en prostaglandinas, generando radical superóxido, si hay disponibles NADH o NADPH. Vía lipooxigenasa, se puede formar oxígeno singlete¹⁵. Por tanto, en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos a partir del ácido araquidónico, se pueden generar radicales libres.

1.3.4 FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES POR CÉLULAS FAGOCÍTICAS

Durante la actividad de las células fagocíticas, se generan radicales libres como parte de su actividad bactericida. Los neutrófilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares poseen en su membrana el sistema flavoproteico citocromo b_{254} -NADPH oxidasa, capaz de generar radical superóxido durante la actividad fagocitaria, en la que se produce un incremento en el consumo de oxígeno (estallido respiratorio)^{16,17}.

Las células fagocíticas poseen la enzima mieloperoxidasa que tiene una actividad altamente microbicida. Esta enzima actuará sobre el peróxido de hidrógeno, generado a partir del radical superóxido, para oxidar el Cl^- y producir ácido hipocloroso que, a su vez, oxidará

los grupos sulfhidrilos. Si hay una deficiencia congénita de esta enzima se favorece la aparición de infecciones de repetición (Enfermedad Granulomatosa Crónica).



También se forma el radical óxido nítrico (NO) durante la actividad bactericida. Este radical tiene un efecto citotóxico sobre células tumorales, protozoos, helmintos, parásitos, hongos y micobacterias¹⁸. Si reacciona con el radical superóxido se forman peroxinitrilos que, a su vez, pueden dar lugar a OH·.

1.3.5 ADRIAMICINA

La adriamicina es un antibiótico del grupo de las antraciclinas¹⁹ descrito por Brockmann y Vauer en 1950. En su estructura posee un núcleo plano de antraquinona unido a un aminoglucósido (figura 7). Se utiliza en el tratamiento de tumores sólidos como el de mama, tiroides, pulmón, ovario y tejidos blandos²⁰. Su metabolito intermediario es el doxorubicinol, que también posee actividad antitumoral y se elimina por bilis y orina previa metabolización hepática.

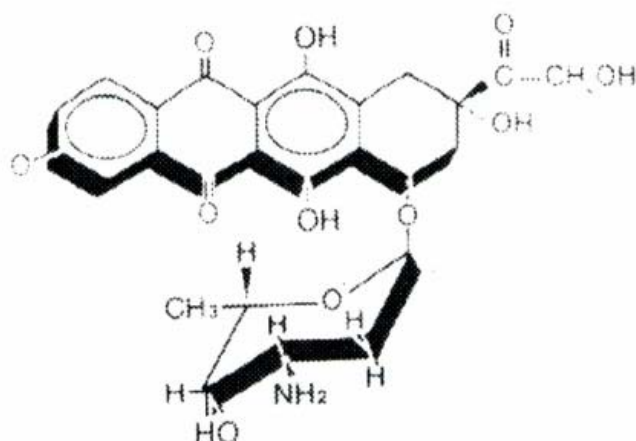


Figura 7: estructura de la adriamicina.

La actividad antitumoral de la adriamicina es debida a su unión a las cadenas del ADN y a las membranas celulares. Al intercalarse entre las cadenas del ADN se produce la inhibición de la síntesis del ADN, RNA y de las proteínas (figura 8). Esta unión de la adriamicina a la cadena de ADN puede visualizarse como bandas de fluorescencia anaranjada-rojiza. La estructura de anillo plano de la adriamicina permanece perpendicular al eje axial de ADN, los anillos B y C permanecen ocultos dentro del ADN y los anillos A y D se proyectan fuera, a cada lado. Los grupos aminoglúcidos añaden estabilidad al enlace a través de la interacción con los glucidofosfatos del ADN. Por otra parte, también puede actuar en las membranas celulares dañándolas. En su unión a la membrana celular existen dos puntos importantes de enlace: el primero en el fosfato de cardiolipina (en abundancia en las membranas de la mitocondria) y el segundo en la proteína espectrina.

La adriamicina se reduce por medio de enzimas oxidorreductasas dependientes del ácido flavínico, generando anión superóxido. Este anión superóxido puede tomar dos vías metabólicas divergentes en función de la disponibilidad de grupos sulfhidrilos detoxificantes:

- vía de la peroxidación lipídica de las membranas mitocondriales,
- vía de la detoxificación de los aniones superóxido.



Figura 8: intercalación de la adriamicina en el ADN.

Por esta razón, se está estudiando la administración de compuestos sulfhidrilos reducidos (N-acetilcisteína), para detoxificar los radicales superóxido, y de vitamina E, para prevenir la peroxidación de membranas lipídicas.

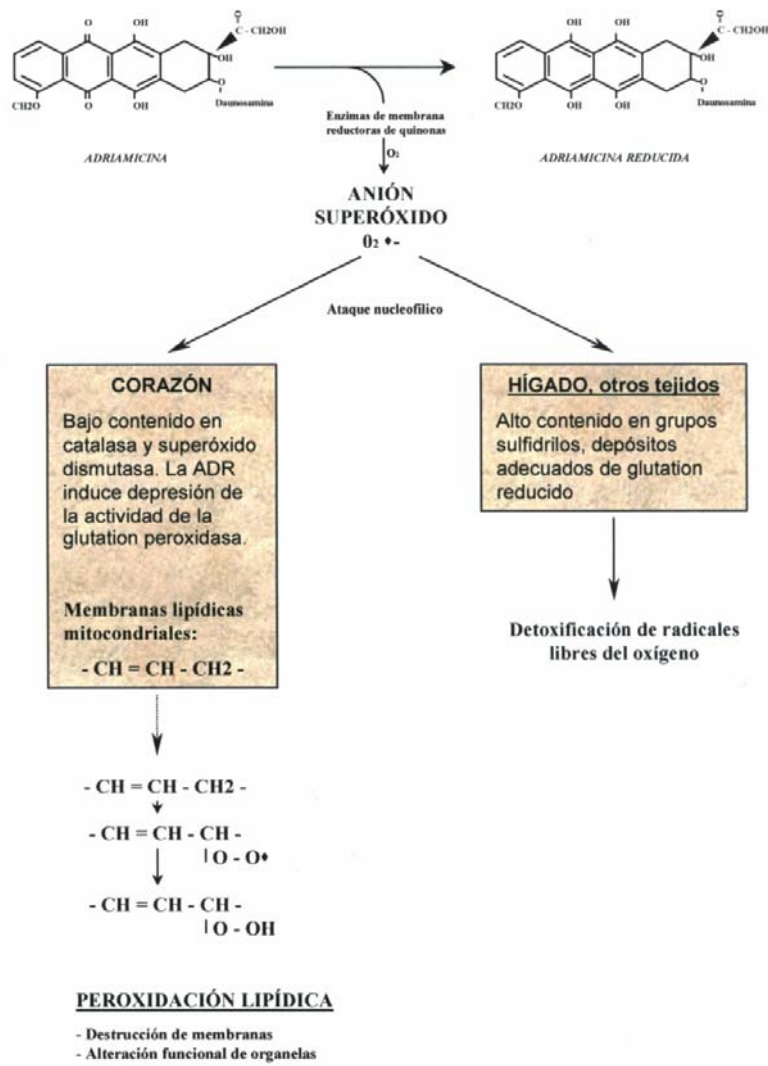


Figura 9: actividad redox de la doxorrubina.

1.3.6 METALES IÓNICOS Y PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES

Algunos metales de transición, principalmente el hierro y el cobre, son necesarios para que el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, de baja reactividad, se conviertan en radicales mucho más reactivos sobre macromoléculas, como el radical hidroxilo. Ejemplo de lo que hablamos lo encontramos en la reacción de Fenton, en la que el ión ferroso se une al anión superóxido para generar radicales hidroxilo. Esta reacción se ve estimulada por agentes reductores como el ascorbato y anión superóxido, que oxidan el ión férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}), ya que el Fe^{3+} no es reactivo con el peróxido de hidrógeno. Por otra parte, el cobre posee in vitro más capacidad para la producción de especies reactivas del oxígeno, lo que provoca un mayor daño en las bases del ADN.

Para evitar el efecto dañino de estos iones metálicos, nuestro organismo posee un sistema de almacenamiento y transporte específico que impide que reaccionen con los radicales libres. Para ello, en el caso del hierro, la transferrina capta el hierro libre circulante en sangre y la ferritina y hemosiderina lo almacenan. Estos mecanismos de defensa pueden fallar, como sucede en situaciones de estrés oxidativo, en las que radicales libres provocan la liberación del hierro desde estas proteínas, viéndose facilitado por agentes reductores como el ácido ascórbico.

1.3.7 CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS

Estamos expuestos diariamente a numerosos contaminantes medioambientales y radicales libres al inhalar el aire que nos rodea. Por ejemplo, dióxido de nitrógeno, ozono, dióxido de azufre, etc.

Otra fuente importante de radicales libres es el humo del tabaco, que posee grandes cantidades de óxido de nitrógeno, óxido nítrico, radicales peroxilo y radicales de carbono.

1.3.8 RADIACIONES IONIZANTES

Los átomos y moléculas pueden ser excitados y convertidos en radicales libres cuando la luz solar o las radiaciones ionizantes inciden sobre ellos. Lo que ocurre es que un electrón apareado del orbital completo salta a un orbital más externo y al cambiar su espín se transforma en un triplete excitado, que ya es un radical libre.

1.3.9 CITOCROMO P₄₅₀

El sistema NADPH / NADPH citocromo P₄₅₀ reductasa / citocromo P₄₅₀ es capaz de reducir compuestos mediante un proceso monovalente, generando radicales libres.

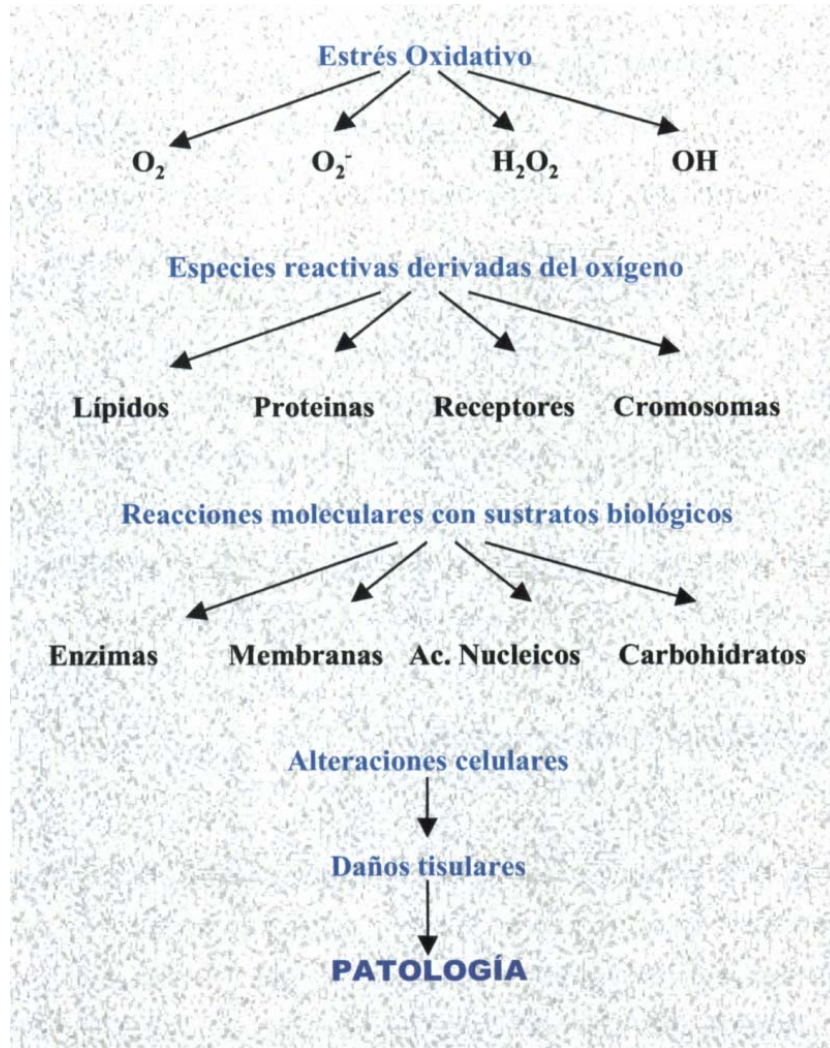


Figura 10: cascada de múltiples alteraciones del metabolismo celular por estrés oxidativo.

1.4 INTERACCIONES DE LOS RADICALES LIBRES

1.4.1 INTERACCIONES DE LOS RADICALES LIBRES E HIDRATOS DE CARBONO

En este apartado vamos a hablar de las interacciones entre los radicales libres y los hidratos de carbono por su implicación en distintas patologías como la diabetes, enfermedades reumatoides, cataratas, etc.

Cuando los azúcares entran en contacto con los radicales libres, en presencia de metales de transición, se autooxidan y se generan nuevos radicales libres. Esto, por ejemplo, ocurre al interaccionar el ácido hialurónico, que mantiene la viscosidad del líquido sinovial, con el radical hidroxilo. El resultado es la despolimerización de la molécula y, como consecuencia, la desestabilización y pérdida de viscosidad del tejido conectivo, apareciendo patología. La enzima superóxido dismutasa inhibe esta reacción.

En condiciones fisiológicas, los monosacáridos pueden autooxidarse al reducir el oxígeno molecular y formar cetoaldehidos e intermediarios oxidantes como el superóxido (O_2^-); en un proceso catalizado por metales de transición^{21,22}. Así mismo, la glucosa es capaz de unirse a proteínas en los grupos amino terminal, iniciando la glicación de las proteínas según la reacción de Maillard.

Proteína +glucosa→ bases de Schiff→ productos de
amadori→ deoxigluconosa→ productos Maillard
(productos de gluconación avanzada)

Los productos generados en esta reacción son altamente reactivos y, por lo tanto, ocasionan un daño importante en la estructura de las proteínas, apareciendo degeneración proteica, disfunción de los macrófagos, etc.

1.4.2 INTERACCIONES ENTRE RADICALES LIBRES Y ADN

La interacción de los radicales libres del oxígeno con el ADN puede ocasionar mutaciones, entrecruzamientos, roturas espontáneas en las cromátidas o pérdida de fragmentos cromosómicos; siendo esto muy deletéreo por ser el ADN la molécula que contiene la información de nuestro material genético. Esta interacción puede ser directa, como en el caso del radical hidroxilo, o indirecta, con el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno (altamente lesivo por su capacidad de atravesar membranas y producir $\text{OH}\cdot$)^{23,24} y las endonucleasas calcio-dependientes. Se produce sobre el ADN nuclear y también sobre el ADN mitocondrial, postulándose la lesión de este último como una de las causas del envejecimiento.

Es decir, tanto los radicales libres como los productos de la lipoperoxidación pueden ocasionar daños importantes en el ADN, como:

- rotura y alteración de las bases por hidroxilación a través del peróxido de hidrógeno, por la reacción de Fenton, y

- entrecruzamientos entre las bandas de ADN. Mecanismo implicado en el envejecimiento y en la transformación maligna.

La alteración más frecuente de las bases púricas es la formación de 8-hidroxiguanina, que en lugar de emparejarse con la citosina lo hace con la adenina. También se pueden dar alteraciones en las bases pirimidínicas, que forman glioles de timina, citosina e hidratos de pirimidina, dando emparejamientos incorrectos y fragmentaciones.

1.4.3 INTERACCIONES ENTRE RADICALES LIBRES Y PROTEÍNAS

Las proteínas son susceptibles de ser atacadas por los radicales libres. En esta interacción la proteína sufre cambios conformacionales, entrecruzamientos catalíticos y pérdida de su capacidad funcional¹. Nuestro organismo dispone de un sistema defensivo, las proteasas, que actúan eliminando las proteínas dañadas para que exista un equilibrio entre ambas.

El ataque de los radicales libres sobre las proteínas puede ser:

- difuso
- selectivo

El ataque *difuso* a las proteínas ocasiona modificaciones generalizadas en las mismas, con desnaturalizaciones, fragmentaciones, agregaciones intra e intercatenarias. Se origina tras la exposición a radiaciones ionizantes, de ozono o en la lipoperoxidación.

El ataque *selectivo* se produce cuando el daño se genera en puntos específicos de la proteína. Los aminoácidos lisina, histidina, arginina y prolina son frecuentemente sitios diana. Las modificaciones

que sufren son normalmente conocidas como “oxidaciones catalizadas por metales”, siendo las enzimas que contienen metales de transición las que presentan mayor riesgo de sufrir daño oxidativo. Una de las consecuencias que se genera de este ataque sobre ellas, es una alteración de la permeabilidad de las células en diferentes tejidos.

1.4.4 INTERACCIONES ENTRE RADICALES LIBRES Y LÍPIDOS

La lipoperoxidación tiene lugar cuando sobre los ácidos grasos poliinsaturados actúan especies radicales, causando un daño oxidativo en los mismos, en un proceso autocatalítico e incontrolable. El término autooxidación nos permite diferenciar este proceso de la oxidación enzimática de ácidos grasos poliinsaturados llevada a cabo por enzimas como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa. Hablamos de proceso incontrolable, porque una vez iniciado éste se producen radicales libres en cascada que llevan a la formación de:

- peróxidos orgánicos,
- metabolitos altamente tóxicos, como los aldehídos, malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal,
- hidrocarburos de cadena intermedia como el pentano o el etano, que pueden servir de marcadores del proceso al eliminarse por la respiración.

La peroxidación lipídica ocasiona un daño importante en las células y en los tejidos. Se distinguen en su formación 3 fases: iniciación, propagación y terminación (figuras 11, 12).

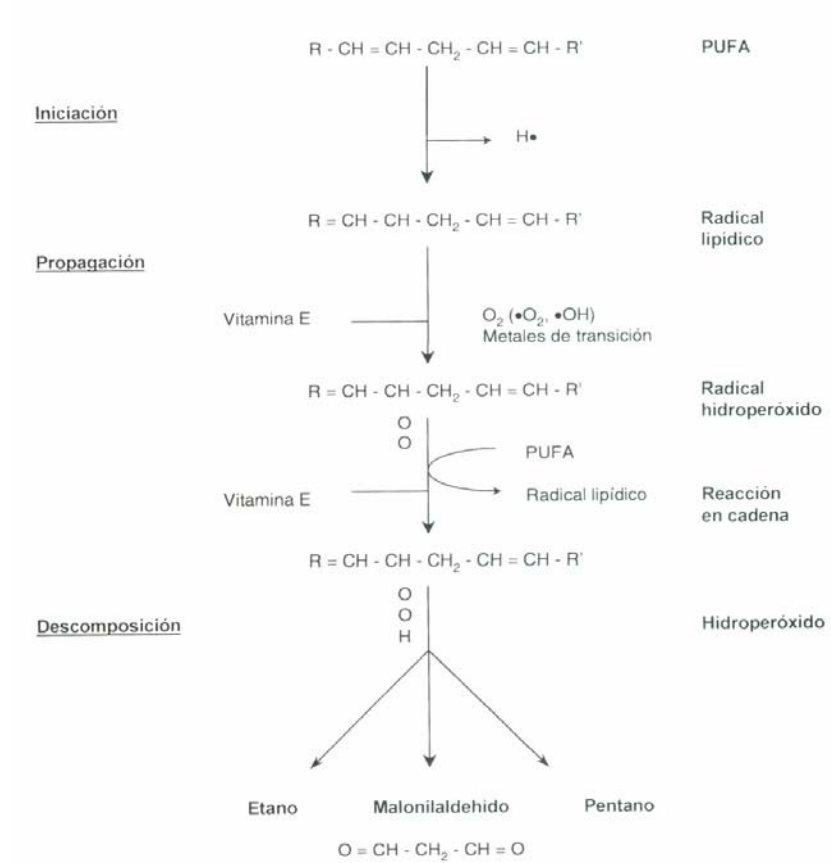


Figura 11: reacciones básicas de la lipoperoxidación.

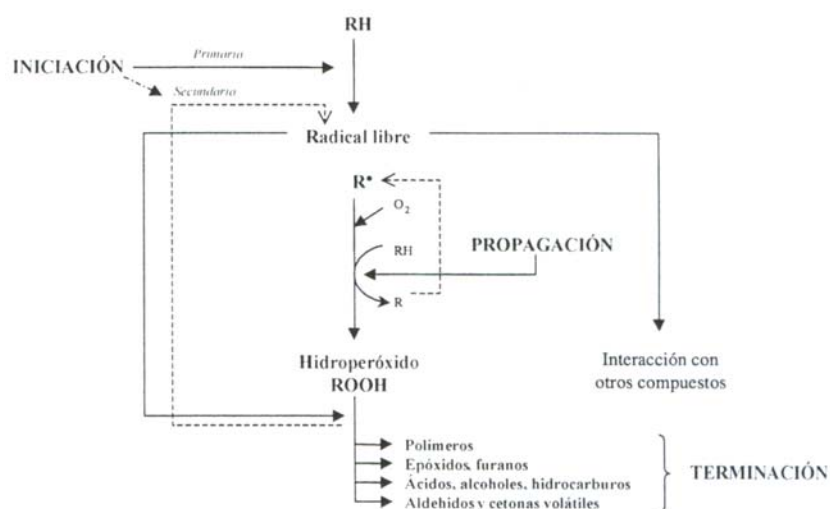
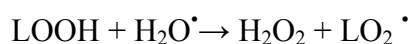
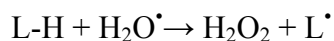
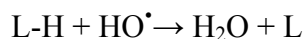


Figura 12: etapas de la lipoperoxidación.

1.4.4.1 Iniciación

El proceso de *iniciación* comienza cuando radicales con capacidad oxidativa captan un átomo de hidrógeno de un metilo de la cadena del ácido graso, dando lugar a un radical lipídico centrado en el carbono^{2,25}. La existencia de dobles enlaces lo facilita, ya que el radical formado se estabiliza deslocalizando el electrón desapareado en los dobles enlaces adyacentes; de esta manera, los ácidos grasos con mayor susceptibilidad de ser atacados por radicales son aquellos con mayor número de dobles enlaces, como el araquidónico, el linoléico y el docosahexaenoico. El radical lipídico centrado en el carbono (L^*), reacciona con el oxígeno dando lugar al radical lipídico peroxilo (LOO^*). Este puede, a su vez, formar hidroperóxidos lipídicos ($LOOH^*$) si interaccionan con otros ácidos grasos y comenzar una nueva cadena de oxidación. Se considera a los hidroperóxidos lipídicos como productos primarios de la peroxidación lipídica.

Dentro de las especies reactivas del oxígeno el radical hidroxilo, fundamentalmente, puede iniciar la peroxidación lipídica. También la forma protonada del anión superóxido y los complejos del hierro.

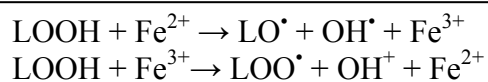


1.4.4.2 Propagación

Entendemos por *propagación o iniciación secundaria*, la activación de la peroxidación lipídica por un radical lipídico. En esta etapa se produce un acumulo de peróxidos lipídicos. En la magnitud de la cadena de propagación influyen multitud de factores como, el propio ácido graso del cual parte, la proporción lípido/proteína existente en la membrana, la concentración de oxígeno o la presencia de antioxidantes, entre otros^{2,25}.

Los hidroperóxidos lipídicos formados son inestables y se rompen en presencia de metales de transición como el hierro o el cobre. Esto es importante porque:

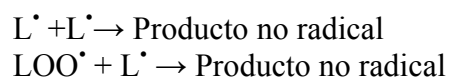
- se generan radicales que propagan la peroxidación lipídica y,
- nacen otros productos que no son radicales y presentan actividad biológica como los aldehidos.



En la práctica resulta muy difícil diferenciar la genuina iniciación por complejos metálicos y las reacciones de propagación dependientes de hidroperóxidos lipídicos preformados.

1.4.4.3 Terminación

Las reacciones de terminación se producen cuando interaccionan dos radicales, rompiendo la cadena de lipoperoxidación y generando productos no radicales. Para que esto tenga lugar es necesaria la presencia de los reactantes en altas concentraciones.



La consecuencia fundamental que se deriva de la peroxidación lipídica es un daño a la membrana celular. Este daño puede producirse por ataque directo sobre ella o, indirectamente, mediante la liberación de productos reactivos².

a) Daño directo a la membrana:

La membrana plasmática de toda célula desempeña un papel capital en el mantenimiento de la integridad celular. Los lípidos y proteínas son los dos componentes mayoritarios en ellas. Una de las características fundamentales de las membranas es su fluidez, que depende en gran parte de los ácidos grasos poliinsaturados que hay en la bicapa de fosfolípidos. De esta forma, la lipoperoxidación puede dañar gravemente la célula al producir cambios en las propiedades de

las membranas y pérdida de la homeostasis iónica. El resultado final, en algunos casos, puede ser la lisis celular.

b) Efectos indirectos de la lipoperoxidación:

La peroxidación lipídica genera una serie de productos que son biológicamente activos y pueden producir un daño en el sitio donde han sido generados o, difundir y ocasionarlo fuera de su lugar de producción. Estos productos son, principalmente, los carbonilos; aunque hay más que se detallan en la tabla 2.

n-Alcanales	2-alquenes	4-hidroxi-alquenes	Otros
Priopanal	Acroleína	4-hidroxi-nonenal	Malondialdehído
Butanal	Centenal	4-hidroxi-hecenal	2,4-heptadienal
Pentanal	Sexenal	4-hidroxi-2,5-nadlenal	2,4-decadienal
Hexanal	Octenal	4,5-dihidrodecenal	5-hidroxi-octenal
Nonanal	Nonenal		Butanona

Tabla 2: productos secundarios de la peroxidación lipídica.

1.4.4.4 Lipoperoxidación y patología

El estudio de la peroxidación lipídica tiene un gran interés por su implicación en numerosas patologías, ya lo postuló en el año 1985 Sevanian A y Hochstein P y posteriormente en el 1993 Halliwell B y Chirico S:

“La peroxidación lipídica ha sido implicada en efectos tóxicos de múltiples productos químicos, así como en múltiples daños a tejidos y en procesos de diversas enfermedades”

“Un aumento en la concentración de los productos finales de la peroxidación lipídica es la más clara evidencia de que los radicales libres están involucrados en muchas enfermedades humanas”.

Sin embargo, no está claro si la peroxidación lipídica es la causa o un efecto de la muerte celular. En la actualidad hay argumentos a favor y en contra de ambas posturas, aunque hay más autores que la consideran un efecto de la muerte celular:

Estrés oxidativo → daño celular → incremento secundario de la lipoperoxidación en las células dañadas

No obstante, se sabe que la lipoperoxidación juega un papel importante en el efecto hepatotóxico de numerosos compuestos y carcinógenos. También se ha implicado en la génesis de numerosas enfermedades como la diabetes, la arteriosclerosis, el envejecimiento, etc.

1.5 MECANISMOS ANTIOXIDANTES

El ser humano está expuesto continuamente a multitud de radicales libres que pueden ocasionar un daño oxidativo en sus tejidos. El organismo dispone de un complejo sistema de defensa, formado por compuestos enzimáticos y no enzimáticos, cuyas funciones son (figura 13):

- supresión de la generación de radicales (antioxidantes preventivos),
- atrapamiento de éstos, y
- reparación del daño producido.

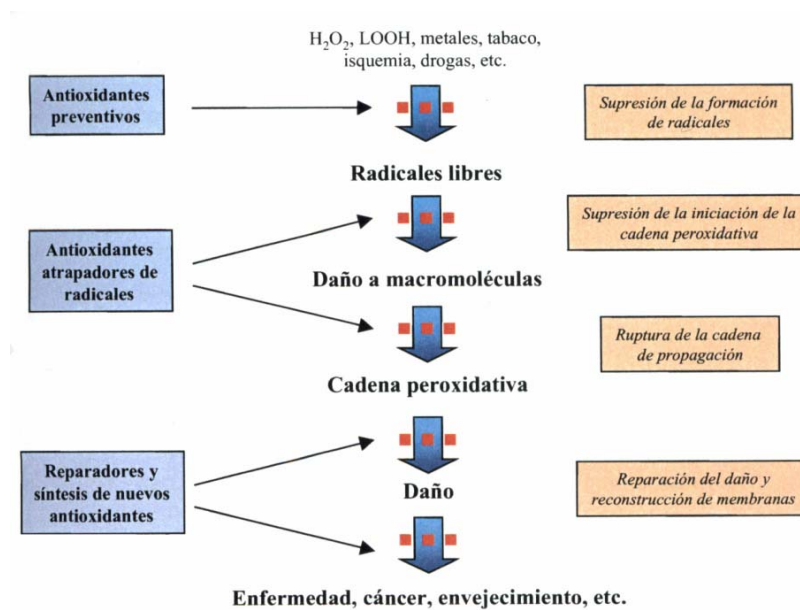


Figura 13: mecanismos antioxidantes frente a los radicales libres.

En la tabla 3 se exponen algunos mecanismos antioxidantes que se explicarán en este apartado.

Clase de compuesto	Molécula	Mecanismo de defensa
Enzimas	Superóxido dismutasa	Conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno
	Catalasa y peroxidasas	Conversión del peróxido de hidrógeno en H ₂ O y O ₂
Misceláneas	Vitamina E y B carotenos	Reacción con radicales libres para prevenir el daño biomolecular: dado que son solubles en lípidos pueden proteger las membranas celulares.
	Ácido úrico y Vitamina C	Reacción con radicales libres en el citoplasma.
	Quelantes de metales	Preventivo ante metales de transición, especialmente Fe y Cu, procedentes de catalizadores de reacciones oxidativas.
	Melatonina	Reacción directa con radicales hidroxilo y proporciona protección in situ frente al daño oxidativo; es altamente difusible, proporcionando protección en todas las partes de la célula.

Tabla 3: mecanismos antioxidantes.

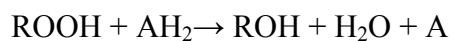
1.5.1 MECANISMOS ENZIMÁTICOS

1.5.1.1 Catalasa

La catalasa es una enzima intracelular ferroporfirínica formada por cuatro subunidades, cada una con un grupo hemo enlazado en su centro activo. Es considerada como uno de los antioxidantes celulares más importantes, presentes en células animales y vegetales²⁶. Se localiza, principalmente, en los peroxisomas (80%) y en el citosol (20%) y su concentración es diferente en los distintos

tejidos del organismo. Un ejemplo de lo que decimos es su alta concentración en órganos como el hígado y su baja o nula presencia en el cerebro.

Posee una doble función catalítica-oxidativa. La función catalítica consiste en la capacidad de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Sin embargo, la afinidad por el peróxido de hidrógeno es baja, por lo que son necesarias altas concentraciones para su descomposición (que suele ser rápida)²⁷; aunque si se superan concentraciones de H₂O₂ de 0,1 M se produce la inactivación de la enzima. También se inactiva en presencia del anión superóxido. La segunda función que posee es la oxidación de donadores de hidrógeno como el metanol, etanol²⁷ o los fenoles, con consumo de peróxidos como el de hidrógeno y los hidroperóxidos alquilo. El que predomine una u otra función depende de la cantidad de H₂O₂ y de donadores de hidrógeno presentes en los tejidos.



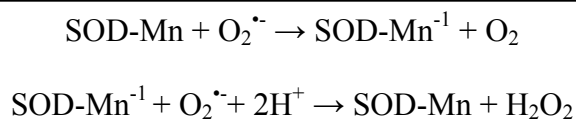
Se ha utilizado experimentalmente en la isquemia-reperfusión del corazón murino, para minimizar la destrucción miocárdica y las arritmias severas.

1.5.1.2 Superóxido dismutasa

Existen tres grandes familias de superóxido dismutasa (SOD), clasificadas según el metal que contienen y su localización en la célula. Dos familias son intracelulares y una es extracelular^{6,28}. Dentro de las *intracelulares* distinguimos: las superóxido dismutasas-cobre/cinc dependientes o citoplasmáticas (Cu, Zn-SOD) y las manganeso-dependientes o mitocondriales (Mn-SOD). Las *citoplasmáticas* están codificadas por un gen que se localiza en el cromosoma 21 humano. Por esta razón, se ha observado una sobreproducción de esta enzima en los pacientes con síndrome de Down, sin embargo, el exceso de peróxido de hidrógeno formado no puede eliminarse por no existir también un aumento de los niveles de glutatión peroxidasa ni de catalasa. Los dos metales que la forman son el cobre y el cinc. El cobre está en el centro activo de la enzima y presenta una actividad catalítica. El cinc tiene un papel estructural. Se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos, aunque sobre todo están en el hígado y sustancia blanca del cerebro. Las *mitocondriales* localizan su gen en el cromosoma 6 humano. Su mayor actividad se expresa en el hígado, corazón y páncreas; y es nula en los eritrocitos.

Las SOD *extracelulares* tienen su gen en el cromosoma 4. Se localizan fundamentalmente en el útero, páncreas y glándulas tiroideas. Su actividad es menor que la que presentan las intracelulares.

El mecanismo de acción general que tienen es la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno.



Entre sus funciones se encuentran: la limitación del daño oxidativo de origen inflamatorio¹ y un papel protector a nivel de la mucosa intestinal en procesos isquémicos²⁹.

1.5.1.3 Glutation peroxidasa (GPX)

1.

El término glutatión peroxidasa engloba a un conjunto de enzimas que catalizan la reacción de hidroperóxidos con glutatión reducido (GSH), dando lugar a la formación de glutatión disulfuro oxidado (GSSG) y el producto de reducción, a hidroperóxidos.



El radical R puede ser cualquier grupo orgánico, alifático, aromático o simplemente el hidrógeno, siendo en este caso el sustrato el H_2O_2 ³⁰.

Se pueden dividir en dos grandes grupos: las *GPX- selenio dependientes* y las *GPX- selenio independientes*. Las *primeras* reciben su denominación por el selenio que contienen en su centro activo. Se localizan principalmente en el citosol (70%)³¹ y en menor proporción en las mitocondrias (30%). Presentan gran afinidad por el peróxido de hidrógeno y por los hidroperóxidos orgánicos. Las *selenio independientes* no contienen selenio en su estructura. Están en el

citosol, las mitocondrias y fracciones celulares que contengan membranas. Su afinidad por el peróxido de hidrógeno es menor.

El mecanismo de acción que presentan es la conversión del peróxido de hidrógeno en agua (H₂O) y oxígeno molecular (O₂), así como la inactivación de otros hidroperóxidos de cadena larga.

En situaciones de estrés, es la glutatión transferasa la que presenta mayor actividad. Estos cambios se han observado en el microsoma de hígado de rata, entre otros órganos^{32,33}.

1.5.1.4 Glutatión reductasa

La glutatión reductasa es la enzima encargada de mantener niveles adecuados de glutatión reducido (GSH) al catalizar la siguiente reacción:



Esto es importante porque el glutatión reducido es necesario como sustrato donador de hidrógenos en la acción de la glutatión peroxidasa; enzima que detoxifica el peróxido de hidrógeno y otros agentes tóxicos.

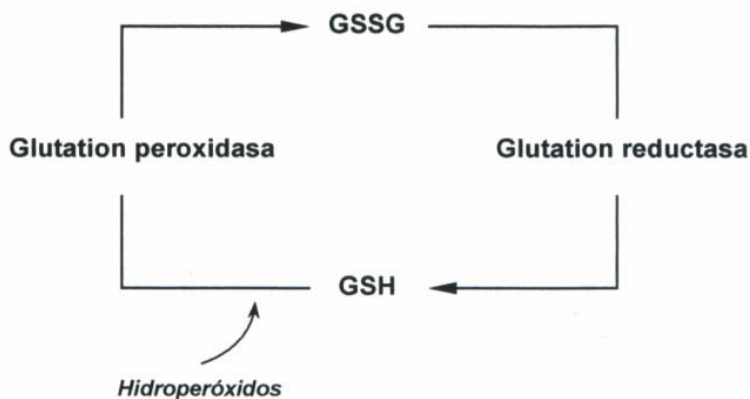


Figura 14: glutatión peroxidasa-reductasa.

En la práctica clínica esta enzima ha sido utilizada para incrementar los niveles de glutatión reducido en pacientes con fibrosis quística, fibrosis pulmonar y SIDA.

1.5.2 MECANISMOS NO ENZIMÁTICOS

En la naturaleza existen un amplio grupo de sustancias no enzimáticas que tienen un papel antioxidante. De ellas destacamos:

- vitamina E (alfa-tocoferol),
- coenzima Q10 (ubiquinona),
- beta carotenos,
- vitamina C (ácido ascórbico),
- melatonina,
- otros antioxidantes.

1.5.2.1 Vitamina E (alfa-tocoferol)

La vitamina E es un potente antioxidante que nos brinda la naturaleza. Su estructura química es la de una molécula de tocol, constituida por un núcleo de hidroxicromona al que se une una cadena de fitilo (figura 15).

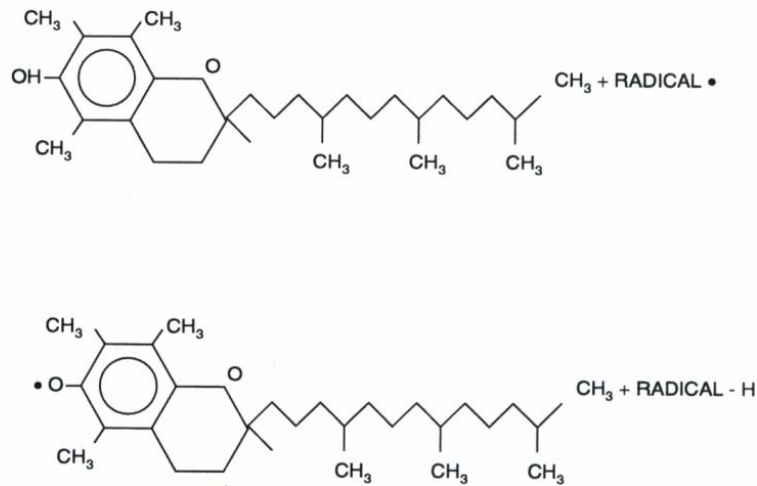
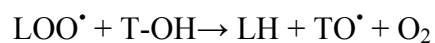


Figura 15: α -tocoferol y radical fenoxilo.

Existen ocho formas isoméricas y éstas se dividen en dos grupos: cuatro con una cadena saturada de fitilo (α , β , γ , δ tocoferol) y cuatro con cadena de fitilo con dobles enlaces en la posición 3', 7' y 11' (α , β , γ , δ tocotrienol). La posición de los grupos metilo en el anillo será la que marque la diferencia entre las formas isoméricas.

Su mecanismo de acción consiste en actuar sobre radicales libres como el oxígeno singlete, el radical lipídico peroxilo (LOO[•]),

etc; para eliminarlos y así impedir que continúe la cadena de formación de nuevos radicales libres³².



Por su carácter lipofílico se le conoce como el “scavenger” de los radicales libres, por actuar previniendo los efectos destructivos del oxígeno sobre los lípidos de las membranas celulares, lipoproteínas y tejidos, preservando así la integridad estructural y funcional de las organelas subcelulares³⁴. Se ha estudiado la capacidad antioxidante lipofílica de la vitamina E³⁵ en los glóbulos rojos, que poseen en su membrana gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y están sometidos a concentraciones elevadas de oxígeno, viendo como la hemólisis de éstos por los radicales libres se ve atenuada al añadir vitamina E al medio.

Otras acciones que se le atribuyen a la vitamina E son:

- estabilizadora de membranas,
- reguladora de la fluidez de membranas,
- inhibidora de la actividad 5-lipooxigenasa,
- moduladora de la actividad de la protein kinasa C, influyendo en la proliferación celular³⁶.

“*In vitro*” se ha descrito cierta capacidad prooxidante al actuar en su forma radical, sin embargo, “*in vivo*” no parece ser relevante esta actividad gracias a la acción de agentes reductores como el ascorbato, ubiquinol o glutathion, que regeneran α -tocoferol.

En diversas patologías como el envejecimiento, el cáncer, la displasia broncopulmonar, la retinopatía del prematuro y la

encefalopatía hipóxico-isquémica se habla de su empleo; pero lo cierto es que no existen estudios concluyentes para su uso.

1.5.2.2 Coenzima Q₁₀ (ubiquinona)

La coenzima Q₁₀ es una quinona liposoluble con una cadena lateral isoprenoide muy larga. Habitualmente está formada por 10 unidades isoprenoides de 5 carbonos en su cadena lateral, de ahí su denominación. Se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos, tanto en su forma oxidada (ubiquinona o CoQ), como en la reducida (ubiquinol o CoQH₂).

Su principal función es actuar como transportador móvil en la cadena de transporte de electrones para impedir la formación de radicales libres, al recoger los equivalentes de reducción de la deshidrogenasa del NADH, entre otras.

La actividad antioxidante de la coenzima Q se realiza por distintos mecanismos (figura 16):

- inhibición de la lipoperoxidación inducida por Fe²⁺-ascorbato,
- interacción directa con radicales libres como el anión superóxido, radicales alquilo y peroxilo, mediante la donación de átomos de hidrógeno a estos radicales,
- inhibición de la síntesis de radicales alquilo y peroxilo al reducir especies perferrilo³⁷,
- regeneración del α -tocoferol para mantener niveles adecuados de vitamina E gracias a la reducción del radical α -tocoferoxilo, e
- impedir la formación de ferril mioglobina, que es un radical formado por la interacción de la mioglobina con el peróxido

de hidrógeno, al reducir ambos compuestos. En este proceso, además, se regenera la forma oxidada de la coenzima Q.

Recientemente se ha comprobado como la coenzima Q se encuentra aumentada en las membranas lipídicas³⁸.

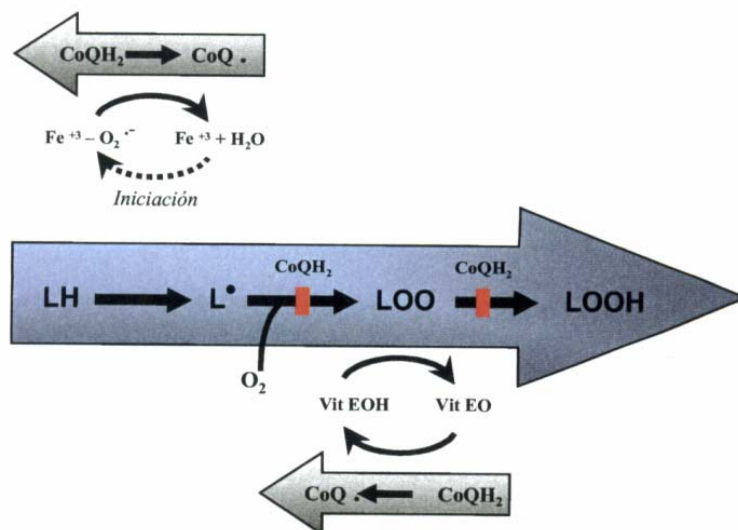


Figura 16: mecanismo de actuación de la Co Q.

1.5.2.3 β -carotenos

Los carotenoides son moléculas que poseen en su estructura 40 átomos de carbono y dobles enlaces conjugados. El prototipo es el β -caroteno^{39,40}, por ser el que mayor cantidad de vitamina A posee.

El papel antioxidante que desempeñan se puede resumir en tres aspectos fundamentales:

1. inhibición de la peroxidación lipídica al interactuar con fuentes enzimáticas que la promueven como el sistema xantino-oxidasa y el NADPH/citocromo P₄₅₀ reductasa^{40,41}, o con fuentes no enzimáticas como las sales de los metales de transición.

2. Limitar el daño oxidativo al reaccionar con especies que generan oxi-radicales como el oxígeno singlete, radical hidroxilo, anión superóxido, ácido hipocloroso y otras especies reactivas⁴².

3. Modulación de los niveles endógenos de otros antioxidantes⁴³.

La actividad antioxidante de los carotenoides depende de la concentración de oxígeno existente, de su estructura química y del efecto acompañante de otros antioxidantes³⁹. Un ejemplo de lo que decimos es la mayor actividad oxidativa de los β -carotenos cuando actúan conjuntamente con el α -tocoferol, por la acción sinérgica de ambos.

1.5.2.4 Ácido ascórbico (vitamina C)

La vitamina C o ácido ascórbico es un potente antioxidante plasmático hidrosoluble que es consumido rápidamente, sufriendo dos procesos oxidativos monovalentes consecutivos con la formación del radical semidihidroascorbato como intermediario. Su contribución a la capacidad antioxidante total es del 0-24%.

La actividad antioxidante que posee la ejerce al interactuar con especies radicales como el oxígeno singlete, el radical superóxido, hidroxilo, radicales centrados en el nitrógeno y en el sulfuro y lipídicos⁴⁴ (figura 17). Otro mecanismo antioxidante que lleva a cabo es la reacción con el radical tocoferixilo para regenerar α -tocoferol. En neutrófilos activos se ha encontrado una concentración de ácido ascórbico 10 veces superior que en los inactivos, lo que podría suponer un mecanismo de control antioxidante ante la liberación de especies radicales de oxígeno al exterior⁴⁵.

Se ha investigado sobre el papel preventivo del ascorbato en patologías como la diabetes mellitus, cáncer, enfermedades respiratorias, enfermedades coronarias, etc.

Sin embargo, en determinadas ocasiones este potente antioxidante es capaz de actuar como sustancia generadora radicales libres.

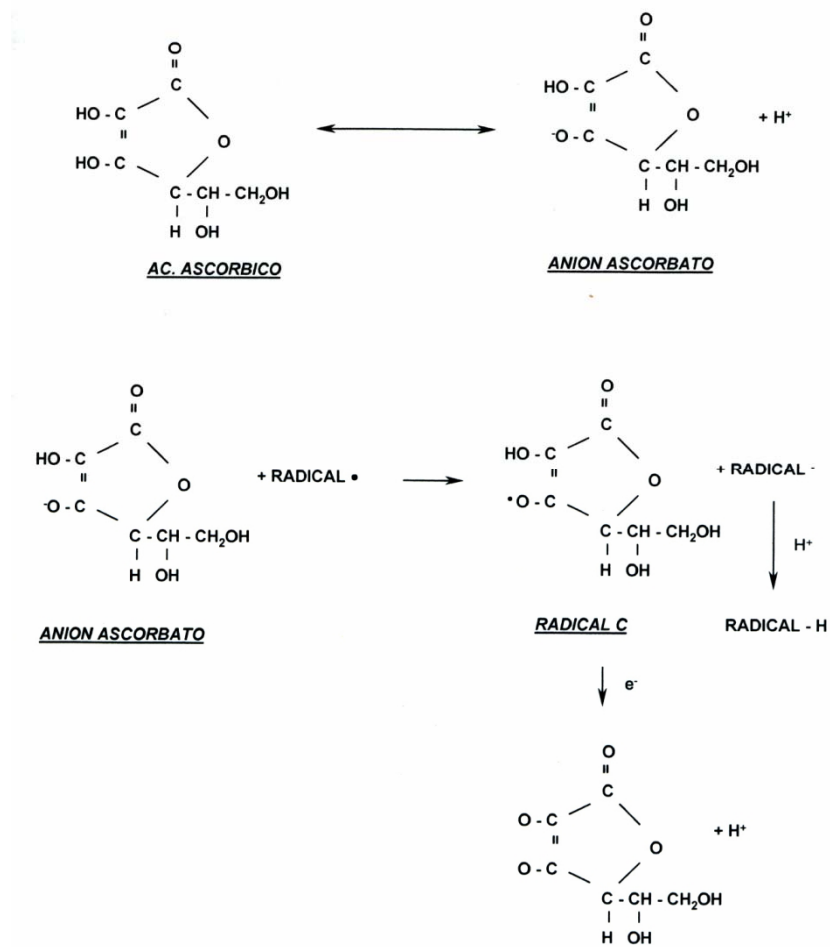


Figura 17: mecanismo de actuación de la vitamina C.

2. MELATONINA

2.1 INTRODUCCIÓN

La melatonina o 5-metoxi-N-acetil-triptamina es una indolamina con similitud estructural a la serotonina (figura 18), presente en organismos tan diferentes como las algas o el ser humano. El término deriva del griego (melanos: negro y tonos: color) y fue utilizado por primera vez en el año 1959 por Lener et al⁴⁶.

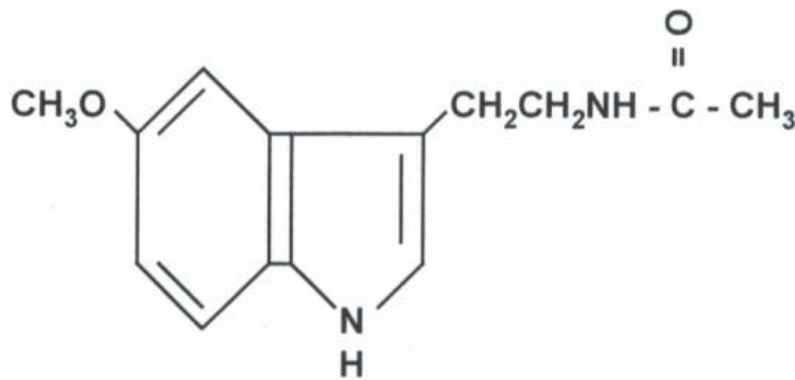


Figura 18: estructura química de la melatonina.

Esta hormona paracrina es sintetizada, mayoritariamente, en los mamíferos en la glándula pineal, aunque también otros tejidos extrapineales la producen⁴⁷: cerebelo, epitelio vía aérea, hígado, riñón, glándula adrenal, timo, tiroides, páncreas, ovario, placenta, endometrio y cuerpo carotídeo; así como células no neuroendocrinas: células natural Killer, plaquetas, leucocitos, eosinófilos, células endoteliales, etc.

Está relacionada con el sistema neuroendocrino y con el reproductor⁴⁸. Su conexión funcional más importante es con el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal⁴⁹.

2.2 PRODUCCIÓN DE LA MELATONINA

En general, se dice que, las células productoras de melatonina pertenecen al sistema neuroendocrino difuso aunque, como hemos visto antes, también existen otros lugares de producción. La melatonina es una hormona derivada de la serotonina⁵⁰.

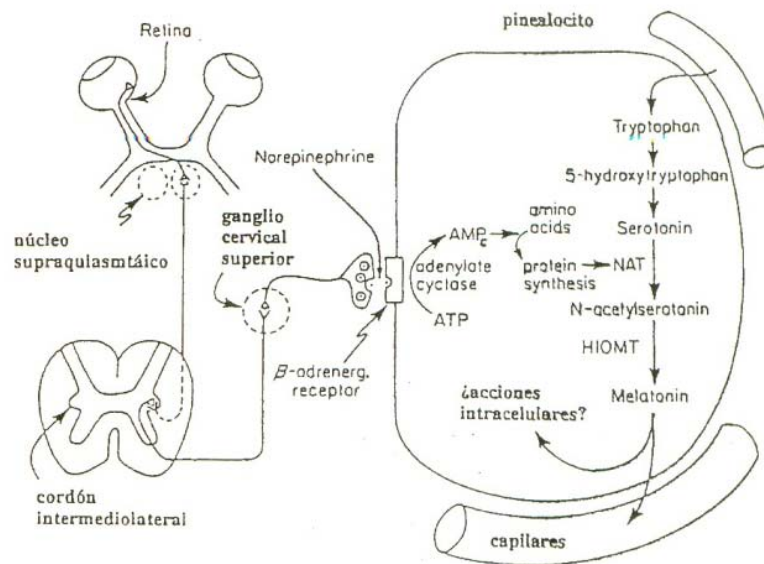


Figura 19: representación de las conexiones neurales entre los ojos y los pinealocitos.

Inicialmente se secreta norepinefrina (NE) en la glándula pineal, ésta interacciona con los receptores α y β adrenérgicos de las membranas pinealocíticas, produciéndose una elevación de los niveles

de AMPc intracelular⁵¹ que estimularán a la enzima N-acetiltransferasa (NAT)⁵². Esta enzima convertirá a la serotonina en melatonina. Se inactiva con la luz solar, por lo que el índice melatonina/serotonina será menor durante el día⁵³ (figura 19).

La secreción de melatonina sigue un ritmo circadiano (diurno/nocturno y estacional), con mayor producción durante la noche y en la oscuridad. También se relaciona con la edad, existiendo una reducción de la actividad funcional glandular con los años. Hoy en día se sabe que esta producción rítmica y secreción de melatonina actúa ajustando y sincronizando los ritmos circadianos de mamíferos y vertebrados no mamíferos.

2.3 MECANISMO DE ACCIÓN

La melatonina es una hormona hidrofílica⁵⁴ y lipofílica⁵⁵, lo que le confiere la capacidad de atravesar cualquier barrera morfofisiológica. Su acción puede estar mediada, o no, por receptores^{56,57}. En las ocasiones en que su acción se ejerce gracias a receptores, éstos se localizan fundamentalmente a nivel del hipotálamo y en la pars tuberalis de la pituitaria anterior⁵⁸⁻⁶⁰ (función nerviosa, reproductora, inmune y renal)⁶¹.

Los receptores de la melatonina incluyen:

- receptores **intracelulares**
- receptores **nucleares**: RZR, ROR (tejido hepático, cerebro)⁶¹⁻⁶⁵.
- receptores **de membrana**: MT₁, MT₂, MT₃. Al unirse la melatonina a los receptores de membrana se produce un incremento de AMPc hacia el interior de la célula. En la actualidad se están descubriendo otros estímulos AMPc independientes⁶⁶. Se distinguen dos tipos de receptores de membrana:

a) ML_1 de alta afinidad (pico-molar), pertenecientes a la familia guanosin-trifosfato “binding-protein”. A su vez se subdividen en dos subgrupos, los ML_{1a} , localizados en la “pars tuberalis” de la hipófisis y en el núcleo supraquiasmático, implicados en la regulación de los ritmos circadianos y la reproducción; y los ML_b localizados en retina y cerebro e implicados en la función retiniana.

b) ML_2 de baja afinidad (nanomolar) y distribución no determinada.

2.4 FUNCIONES DE LA MELATONINA. DIVERSIDAD FUNCIONAL

Una de las características fundamentales de esta hormona paracrina es su gran versatilidad funcional. Participa en acciones relacionadas con el sistema neuro-endocrino-reproductor, respuesta inmune, estrés, envejecimiento, crecimiento tumoral, ciclo sueño-vigilia y detoxificación de radicales libres. Analicemos cada una de estas funciones.

2.4.1 FUNCIÓN NEUROENDOCRINA- REPRODUCTORA

Desde hace unas décadas se conoce el papel que tiene la melatonina como mensajero endocrino de la glándula pineal en el control de la fisiología neuroendocrina⁴⁹, aunque los mecanismos neurales específicos para ejercer esta acción no están aún clarificados, como veremos a continuación.

Antes del descubrimiento de la melatonina, se demostró que la glándula pineal era un órgano endocrino que estaba relacionado con la reproducción⁶⁷ y, además, que la función de esta glándula era

fotoperiódicamente dependiente. Esto llevó a postular que el ciclo anual reproductivo de los animales fotoperiódicos⁶⁸ estaba regulado por el periodo de luz/oscuridad, de forma que al cambiar la duración del día, en función de la estación del año, la pineal recibía la señal de un mensajero endocrino que inhibía o estimulaba la reproducción. Más tarde se descubrió que este mensajero era la melatonina y que era un mensajero pasivo (no tiene función antigonadotrófica), que daba información de la duración del día, siendo las especies las que interpretaban esta señal según lo que les resulta más ventajoso. También se vio que, no sólo era importante la duración del pico de melatonina conseguido por la noche^{69,70}, sino la historia lumínica previa (Hoffman y col)⁷¹. Estos autores demostraron, gracias a los resultados obtenidos en experimentos realizados en el hámster *Dunjariano*, que la misma duración del pico de melatonina podía señalar periodos de órganos reproductivos activos o no, según los niveles previos de ésta. Otros autores como Carter y Goldman⁷² o Bartness y col⁷³ continúan trabajando en esta línea.

Pero, como anteriormente expusimos, los mecanismos neurales específicos que regulan esta acción aún no están clarificados. Se postula la hipótesis de que esta acción se ejerce a través de receptores localizados en la pars tuberalis de la pituitaria anterior^{58-60,74,75}. Estos receptores ante el estímulo de la melatonina intervienen en la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y, por lo tanto, después, de hormona luteinizante (LH) y de la hormona estimuladora del folículo (FSH). Pero, posiblemente, los receptores que están situados en la pars tuberalis de la pituitaria anterior no sean los únicos lugares donde interaccione la melatonina para intervenir en la fisiología

neuroendocrina -reproductora. Se habla de receptores localizados en el hipotálamo⁷⁶, en la pars distalis⁷⁷, incluso a nivel de las propias gónadas^{60,78,79}. Los autores Maywood y Hastings⁸⁰ realizan un trabajo donde exponen estos resultados.

En el año 1994, Pozo y col. afirman que el óxido nítrico⁷⁸ (radical libre), está implicado en la regulación de la liberación de GnRH desde neuronas neurosecretoras hipotalámicas⁸¹, por lo que plantean la posibilidad de que la melatonina, a través de este radical libre, influya en la fisiología reproductiva.

También la melatonina provoca un aumento de los niveles de la hormona tirotrópica (TRH) y, por consiguiente, de TSH, T₄ y T₃⁸²; que según algunos estudios suprime la secreción de hormona de crecimiento⁸³ y regula la secreción de insulina pancreática⁸⁴.

2.4.2 MELATONINA Y SITUACIONES DE ESTRÉS

En la literatura encontramos referentes suficientes para afirmar que la glándula pineal es sensible a diversos estímulos estresantes y que la respuesta dada (aumento de la melatonina) varía en función del tipo de estímulo proporcionado (especificidad cuali-cuantitativa entre el binomio “estímulo-respuesta pineal”).

Se han realizado experiencias de laboratorio que pueden resumirse esquemáticamente bajo los siguientes términos: *"Cuando las ratas son sensibilizadas mediante apropiadas manipulaciones ambientales, capaces de inducir una situación de estrés agudo, se observa como respuesta en el animal un aumento significativo de la síntesis y secreción de aMT, pretendiéndose explicar estas modificaciones hormonales a través de la aparición de determinados cambios en la sensibilidad pineal a las catecolaminas, características*

de la inervación simpática de la glándula pineal o niveles circulantes de catecolaminas".

Sin embargo, autores de gran prestigio como Reiter y Parfitt^{85,86} refieren que, los mecanismos fisiopatológicos que explican los cambios en la secreción de determinadas sustancias son más complejos, siendo muy simple pensar que ante un estímulo externo se produce un aumento de las catecolaminas adrenales o de otro origen que lleva posteriormente al ascenso de melatonina. De hecho, experimentalmente, estos autores han observado como, si se produce un aumento excesivo de las catecolaminas⁸⁶, en lugar de generar un estímulo sobre las terminaciones simpáticas pineales se produce su bloqueo, impidiéndose de esta manera su efecto estimulante sobre el pinealocito (figura 20). *“Al someter a un estrés físico (inmersión en agua) a un grupo de animales de laboratorio se comprobó que solamente aumentaba la actividad NAT si previamente se administró un inhibidor catecolamínico”.*

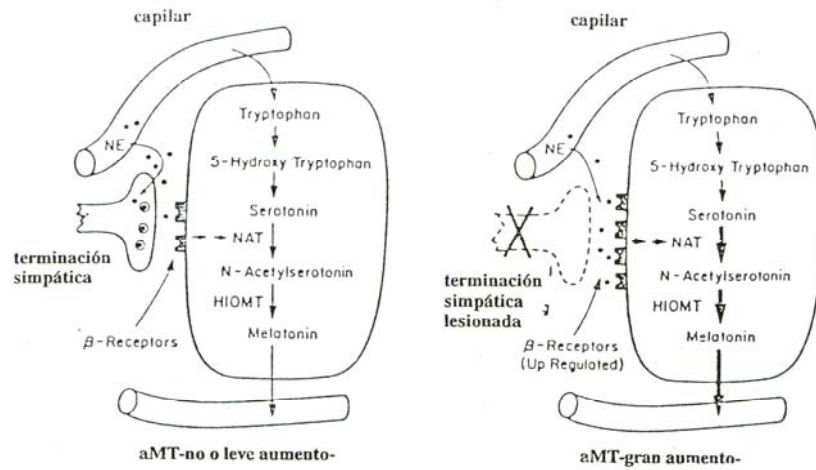


Figura 20: esquema del mecanismo propuesto para la falta de efecto estimulante de las catecolaminas circulantes sobre la producción pineal de melatonina, sugiriendo que las terminaciones nerviosas simpáticas de la glándula pineal retirarían el exceso de catecolaminas circulantes (izquierda). Si se extirpa el SCG o se administra una sustancia inhibidora de las catecolaminas (derecha), la NE circulante podría actuar estimulando el pinealocito. Esta hipótesis no explica por qué algunos tipos de estrés asociados con altos niveles plasmáticos de catecolaminas también pueden estimular la producción de aMT. (Tomado de Reiter).

En esta línea de trabajo, Craft somete a un grupo de ratas a unas condiciones de luz constante (mecanismo capaz de aumentar la densidad de los β receptores en la membrana de los pinealocitos) y observa una respuesta positiva de la pineal a los estímulos catecolamínicos. Otros científicos han demostrado experimentalmente que, ante estímulos estresantes como pueden ser una hipoglucemia producida por la administración de insulina o una inmovilización, se incrementan los niveles de NAT pineal y, por consiguiente, de la melatonina. En cambio, si hay un hiperinsulinismo por una ingesta

elevada de carbohidratos o se extirpan las adrenales, no obtenemos esta respuesta, concluyendo que la adrenal (catecolaminas) son mediadoras en este proceso.

Otros autores como Champney y col⁸⁷ vieron que la respuesta pineal en ratas y hámster a las catecolaminas circulantes, que se elevan tras situaciones de estrés (ruidos, inmersión en agua fría, cambios en las condiciones ambientales, etc.), era diferente. En las ratas se produce un aumento de la NAT pineal y después de aMT, mientras que en el hámster no.

Joshy también trató de ver la respuesta nocturna de la pineal a un estrés agudo como es la inyección nocturna de suero salino. Los resultados fueron inesperados ya que se produjo una disminución de los niveles circulantes de NAT y aMT, que se recuperaban a los 15-20 minutos del estímulo. Si el animal era previamente adrenalectomizado no se observan tales efectos, concluyendo que las glándulas adrenales mediaban el proceso. Sin embargo, posteriormente se realizó una inmersión nocturna en agua a un grupo de ratas y el descenso que se obtuvo en los niveles de NAT y aMT no era suprimido al extirpar las adrenales.

Al igual que sucede en el terreno de la experimentación, los resultados encontrados en humanos son contradictorios. Se han realizado diversos estudios, aunque destacaremos por su importancia un trabajo realizado por Carr y cols, en el que someten a un ejercicio físico agudo (montar en bicicleta) a un grupo de mujeres, y determinan los niveles de aMT alcanzados, encontrando una elevación de hasta un 200-300% de los valores basales. Valores que volvían a la normalidad a los 30 minutos. Luego, un estímulo estresante de cierta

intensidad y duración producía, según estos autores, una elevación de NAT y por consiguiente de aMT. Respuesta que no se consigue con estímulos breves o de poca intensidad.

En este orden de ideas se realizó un estudio para ver la respuesta pineal en función del tipo e intensidad del estímulo, demostrando que a mayor grado de estrés, mayor respuesta pineal (figura 21).

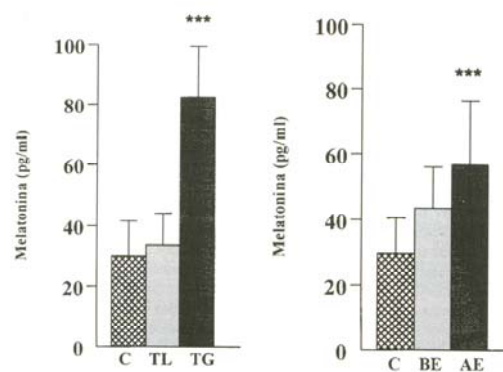


Figura 21: la existencia de un traumatismo intenso (TG), en relación a un grupo control (G-C), y otro con traumatismos leves (TL), así como distintos grados de estrés quirúrgico: bajo (BE) y alto (AE). (Figura de la derecha). Permite demostrar como, a mayor grado de estrés, se puede encontrar una mayor respuesta en la producción de aMT. Hernández Gómez MV: Estudio de la función pineal (tasas plasmáticas de aMT) en distintas situaciones de estrés en el niño. Tesis doctoral, Universidad de Granada, 1992.

Molina⁸⁸, Rodríguez⁸⁹, Martín⁹⁰ y Jaldo⁹¹, han realizado estudios en niños viendo que en situaciones de estrés agudo, como puede ser un sufrimiento fetal, una convulsión, un traumatismo o una intervención quirúrgica; se aumenta la producción de melatonina. Además, se observó que el ritmo de secreción de melatonina en niños normales se altera en niños epilépticos y desaparece por completo en convulsiones febriles⁹² (figura 22), atribuyéndose a la melatonina

cierto papel sobre la excitabilidad neuronal como neurotransmisor inhibitorio⁹³⁻⁹⁵.

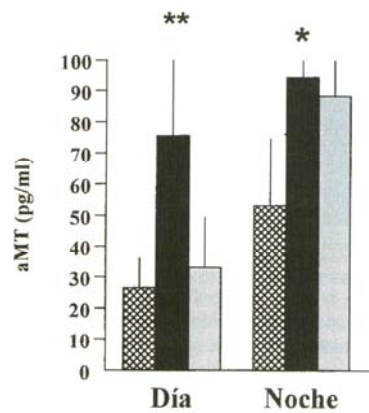


Figura 22: perfil de la secreción de aMT en tres grupos de niños: a) normales (histograma de las izquierdas), b) tras una convulsión febril (parte central), en donde se puede apreciar unos niveles mucho mayores con total desaparición del ritmo de secreción y c) niños con convulsiones epilépticas (histograma de las derechas). Donde se puede advertir la mayor producción de aMT tras una crisis convulsiva de tipo febril, mientras que en la crisis de tipo epiléptica la situación es intermedia a la ofrecida por los otros dos grupos. Molina Carballo A, Muñoz Hoyos A, Rodríguez Cabezas T, Acuña Castroviejo D. Day/night variations in melatonin secretion by pineal gland during febrile and epileptic convulsions in children. *Psychiat Res* 1993; 273-283.

En niños sometidos a un *estrés crónico*, como son los niños con síndrome de carencia afectiva, los niveles de secreción de la melatonina basales y nocturnos disminuyen⁹⁶ (figura 23). Los autores lo explican por la diferente respuesta de la pineal ante un estrés agudo

o crónico, ya que en el segundo caso la glándula se agota y disminuye la secreción de melatonina. Además, si tenemos en consideración la teoría indolamínica de la depresión, es posible que el estado de aislamiento y depresión en que estos pacientes se ven envueltos, de alguna forma, colabore a que la pineal decline en su función de ajuste y sincronización.

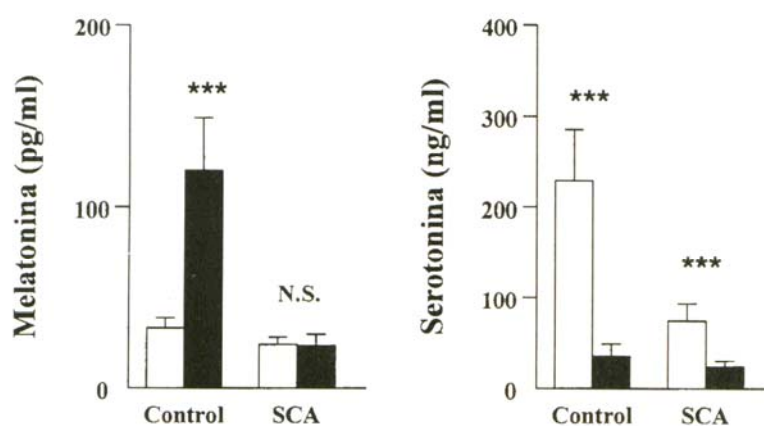


Figura 23: disminución de los niveles circulantes de aMT y serotonina en niños afectados de síndrome de carencia afectiva (SCA), tanto en determinaciones diurnas como en nocturnas en relación a niños normales de la misma edad y sexo. Contreras G. Tesis doctoral, Granada, 1998.

2.4.3 MELATONINA Y SISTEMA INMUNOLÓGICO

Esta función de la melatonina despierta gran interés por su enorme actualidad. La historia comienza con Maestroni que demostró, en animales de experimentación, como la pinealectomía reducía considerablemente el tamaño del timo (glándula con importante función inmunológica). Posteriormente, el grupo de Maestroni⁹⁷

realizará otro experimento con resultados esperanzadores. Dividió a los ratones en dos grupos, al primero le inyectó el virus de la encefalomiocarditis y al segundo, además, previamente le inyectó melatonina. Después, ambos grupos eran sometidos a un estrés igual en términos cualitativos-cuantitativos: administración de dosis subletal de un agente microbiano. En el grupo primero fallecieron > 80% de los animales y en el segundo grupo sólo murieron el 6%.

En el año 1992, Caroleo y col hablan del “*efecto booster de la melatonina*”, consistente en incrementar la respuesta mediada por anticuerpos. El experimento lo realizaron partiendo de dos grupos de ratones a los que se administró antígenos de hematíes de caballo pero, además, a uno de los grupos se le administró también melatonina. En este último grupo, la producción de anticuerpos contra los antígenos de caballo fue el doble.

Neri y col⁹⁸ realizan sus trabajos con un grupo de pacientes oncológicos (33) a los que les administraron, además del tratamiento específico para cada tumor según el protocolo, melatonina (10 mg/día durante un mes). Observaron un aumento de los siguientes mediadores: interleukina-2, γ -interferon y factor de necrosis tumoral.

Además, la melatonina produce una elevación de los niveles de Ig A secretora, de los linfocitos T helper⁹⁹, en los que Maestroni en 1995 encuentra receptores para la melatonina, y observa como la unión de ésta con el receptor produce un aumento de la interleucina-4 y de los linfocitos NK.

Morray y col⁷⁴ observan que al tratar los monocitos “*in vitro*” con aMT, se aumenta su poder fagocítico frente a las células cancerosas hasta en un 73%.

Maestroni y Conti¹⁰⁰ en la revista de “*Journal Pineal Research*”, describen un crecimiento de la médula ósea con la administración de la melatonina.

También se ha descrito un aumento de los factores estimulantes de granulocitos y macrófagos.

Guerrero y cols hablan de una interacción bidireccional entre la glándula pineal y el sistema inmune, de forma que el sistema inmunitario es capaz de modificar la síntesis de melatonina. Ejemplos de lo que decimos lo constituyen: el incremento de melatonina in vitro por la administración de gamma-interferón¹⁰¹, o la alteración en el ritmo de secreción y cantidad de melatonina en enfermos con trastornos de base inmune (psoriasis y eczema atópico).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado como la inmunoterapia en los niños con alergia al olivo produce un descenso de la melatonina y como, al completar la inmunoterapia, las relaciones existentes entre melatonina y β endorfinas desaparecen¹⁰².

Pero la pregunta siguiente que debemos hacernos es: ¿cuáles son los mecanismos por los que la melatonina es capaz de modular el sistema inmune? (tabla 4). En base a la experimentación se formulan las siguiente hipótesis¹⁰³:

1. *Sistema opioide endógeno*: se habla del papel de ciertos péptidos opioides como mediadores de la acción de la melatonina sobre el sistema inmune¹⁰⁴, de hecho, experimentalmente, se ha comprobado como al dar naltrexona (antagonista de los opioides)^{105,106} se pierde el efecto inmunoprotector de la melatonina. También la aMT estimula la liberación de péptidos opioides por los linfocitos T-helper activados¹⁰⁷.

2. *Linfokinas*: se especula sobre su papel como mediadoras de los efectos de la aMT sobre el sistema inmune, por el aumento que produce de interleukina-2 e interferón γ , y éstos a su vez aumentan los niveles de NK y otros mediadores del sistema inmune¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

3. *Sistema linfoide*: se han demostrado sitios de unión (“binding sites”) para la aMT en órganos linfoides de aves¹¹¹, mamíferos, linfocitos humanos¹¹², neutrófilos¹¹³, esplenocitos de ratas¹¹⁴; lo que unido a la gran liposolubilidad de la aMT, explican la acción directa de ésta sobre el tejido linfoide.

4. *Radicales libres*: una de las funciones más importante y estudiada de la aMT, es su papel como neutralizadora de radicales libres¹¹⁵. Esto es de gran importancia por la capacidad lesiva de los radicales libres sobre macromoléculas y elementos celulares.

5. *Acciones indirectas de la melatonina a través de otros sistemas endocrinos*. Se ha sugerido que el eje hipotálamo-hipofiso-gonadal puede estar relacionado con la acción que la melatonina tiene sobre el sistema inmune¹¹⁶, en base a experiencias que demuestran que tanto el fotoperiodo como el tratamiento con melatonina afecta conjuntamente la capacidad reproductora, producción de hormonas sexuales y determinadas funciones inmunes^{117,118}. Además, es bien conocido como la melatonina es capaz de antagonizar el efecto supresor de los corticosteroides sobre el sistema inmune¹¹⁹. Asimismo, se ha sugerido que el timo puede ser un órgano clave para la interacción inmunomodulatoria existente entre melatonina y corticosteroides¹²⁰. Por otra parte, la melatonina posee capacidad para estimular la liberación de TRH, que tiene efectos claros sobre la actividad antiviral y otros aspectos funcionales del sistema

inmune y, en consecuencia, se ha indicado como otro posible intermediario entre melatonina y sistema inmune⁸².

Parámetro	Mecanismo	Efecto
↑ células tumorocidas	Monocitos activados por aMT ↑ presentación antígenos macrófagos ↑ MHC, clase 2, en macrófagos ↑ expresión receptores citotóxicos ↑ toxicidad celular Ac dependiente ↑ actividad celular NK in vivo ↓ actividad celular NK in vitro	Necrosis tumoral
↑ respuesta primaria de Ac	Antagonizada por naltrexona Por monocitos estimulados por aMT	Potenciación de la inmunidad Ac
↑ interleukina-1	Secretada por los monocitos	Potenciación de la respuesta aguda
↑ interleukina-2		Multiplicación y crecimiento LT Estímulo de células Killer Estímulo de LB: ↑ inmunoglobulinas. Estímulo directo de los monocitos
↑ células inmunes IL-2	El efecto inmunoestimulador aMT necesita a la IL-2.	↑ linfocitos, CD25 ⁺ , LT, NK y eosinófilos.
↑ IL-4	Secretada por T4 helper	Hematopoyesis aumentada
↑ péptidos opioides	Secretada por células T	Contrarresta la inmunodepresión provocada por estrés o esteroides
↓ factor necrosis tumoral α	TNF inhibido por aMT, TNF estimula producción de aMT.	Menor caquexia cancerosa
↑ interferon -γ	Secretada por linfocitos	Incrementa la producción aMT por monocitos y

		macrófagos.
↓ IGF-1	¿Por descenso en la transcripción del gen IGF-1?	Menor crecimiento tumoral
↑ afinidad y densidad de receptores tímicos para esteroides adrenales. Hiperplasia tímica	¿?	Modula la respuesta inmune
Potencia VIP	¿Inmunopoioides inducidos por aMT?	Contrarresta la involución tímica provocada por estrés o esteroides.
	↑ cAMP en linfocitos	Regulación de la respuesta inmune

Tabla 4: efectos de la melatonina sobre el sistema inmune.

2.4.4 MELATONINA Y CRECIMIENTO TUMORAL

En las últimas dos décadas se están realizando numerosos estudios para aclarar el papel oncostático de la melatonina. Tamarkin y col¹²¹ administran a ratas DMBA (dimetil-benzenantraceno) para provocarles tumores de mama y observan como la administración de melatonina los previene. En la literatura nos encontramos con muchas referencias sobre el efecto de la administración de aMT o de la pinealectomía en los tumores malignos^{122,123}, y los resultados obtenidos, en ocasiones, resultan contradictorios; probablemente por los distintos tumores estudiados, el empleo de especies animales diferentes, la diferencia de los estudios “*in vivo*” o “*in vitro*”, el momento de administración de la aMT, etc. A continuación señalamos las más importantes:

1. *Efecto de la pinealectomía*: sobre el crecimiento tumoral ha sido referido en los siguientes tipos de tumores: sarcomas, carcinoma Walker¹²⁴, melanoma MMI¹²⁵, melanoma inducido por dimetilbenzantraceno¹²⁶, carcinoma ovárico¹²⁷, tumor de Ehrlich¹²⁸, tumor Yoshida¹²⁹, carcinoma de mama inducido por NMU¹³⁰, fibrosarcoma inducido por MCA¹³¹, epiteloma Guerin¹³² y hepatocarcinoma inducido por dietilaminobenceno¹³³.

2. *Administración de melatonina “in vivo”*: la administración de melatonina se ha mostrado efectiva en los siguientes tipos de tumores: leucemia inducida por LSTRA¹³⁴, carcinoma de mama R3290AC¹³⁵, carcinoma de mama inducido por DMBA¹³⁶, melanoma B16¹³⁷, prolactinoma inducido por DES¹³⁸, adenocarcinoma prostático R3327H¹³⁹, carcinoma mamario inducido por NMU¹⁴⁰, hepatoma Kirkman-Robbins¹⁴¹, epiteloma Guerin¹³³, carcinoma espontáneo de mama C₃ CF₁¹⁴² y carcinoma mamario espontáneo C₃H/Jax¹⁴³. Por otra parte, se han descrito otro tipo de tumores en los que la melatonina no ejerce ninguna influencia, e incluso otros en los que el efecto inhibitorio se va a desarrollar cuando se administran dosis concretas o incluso cuando la melatonina se administra en cierto momento del día^{144,145}.

3. *Efecto de melatonina “in vitro”*: la melatonina se ha visto capaz de inhibir los siguientes tumores: melanoma B7¹⁴⁶, cáncer de pulmón MCF-7¹⁴⁷, el prolactinoma inducido por DES¹⁴⁸, carcinoma de ovario SK-OV-3 y la línea del carcinoma ovárico JA-1¹⁴⁹, el linfoma de células T Jurkak¹⁵⁰, carcinoma de cérvix 180¹⁵¹, sarcoma S180, coriocarcinoma JAR¹⁵², carcinoma mamario C-19¹⁵³, carcinoma de células laríngeas Hep-2¹⁵⁴ y el melanoma M2R¹⁵⁵.

Pero, ¿cual es el mecanismo por el que la melatonina inhibe el crecimiento tumoral?. Se formulan las siguientes hipótesis¹⁵⁶:

1. por un efecto celular directo que incluiría:

- efecto sobre ciclos celulares con actividad antimitótica,
- inhibición de factores de crecimiento tumoral,
- interacción con calmodulina, tubulina y aumento de zonas de comunicación intercelular, y
- actividad sobre receptores de las células tumorales; por ejemplo en cáncer de mama disminuye los receptores para los estrógenos.

2. Por un efecto antioxidante que protege del estrés oxidativo.

3. Por acción inmunomoduladora sobre la actividad tumoral: como ya hemos comentado con anterioridad, la aMT produce un aumento de la respuesta inmune, con mayor producción de interleukina 2 y 4.

Se ha ensayado en pacientes con cáncer avanzado la administración combinada de aMT y radioterapia o quimioterapia (según el tumor). Por ejemplo, en pacientes con cáncer de mama diseminado se observó una disminución de la progresión de la enfermedad al dar tamoxifeno junto con aMT y, en enfermos con glioblastoma tratados con radioterapia y melatonina la supervivencia fue mayor.

Sin embargo, se necesitan más ensayos terapéuticos para poder obtener conclusiones fiables, aunque se abre un campo muy interesante y lleno de esperanza; si no para disminuir la agresividad del tumor, sí para hacer el tratamiento más tolerable a los enfermos, al mejorar la percepción individual de la enfermedad (mejoría del sueño, etc).

2.4.5 MELATONINA Y ENVEJECIMIENTO

En la humanidad ha existido siempre una gran preocupación por las causas que desencadenan el envejecimiento. Hay varias teorías que tratan de explicarlo. La teoría más aceptada actualmente está basada en la acumulación del daño que ocasionan los radicales libres en animales seniles^{157,158}, es decir, envejecemos porque demasiadas células resultan dañadas sin posibilidad de reparación. Teniendo en cuenta el papel antioxidante atribuido a la melatonina y su disminución con la edad avanzada¹⁵⁹⁻¹⁶¹, podría ser ésta un factor importante en la generación de procesos relacionados con el envejecimiento. Otros autores hablan de la relación entre el envejecimiento y el deterioro de la función pineal^{67,159,161,162}, ya que para ellos en esta glándula existe un “reloj” biológico que controla el envejecimiento^{67,163,164}.

Ya hemos comentado que la glándula pineal es el principal órgano productor de aMT, pues bien, para que la aMT envíe una señal nocturna desde esta glándula, debe existir integridad en las neuronas del núcleo supraquiasmático (ESQ), el llamado reloj biológico. El glutamato es el neurotransmisor de las neuronas retinohipotálamicas que termina en el ESQ y genera, tras ser liberado en las células postsinápticas¹⁶⁵, radicales libres. La melatonina protege a estas células del daño que ocasionan estos radicales, pero algunos no son neutralizados y ocasionan un deterioro en las neuronas del ESQ. Esto conduce a una disminución del ritmo de secreción de aMT, que lleva a su vez a una degeneración más rápida de las mismas, al estar menos protegidas frente al ataque de los radicales libres. Se desarrolla de esta forma un círculo vicioso¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

2.5 MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE

La melatonina es un potente antioxidante que participa en la detoxificación de radicales libres nocivos¹⁶⁹, fundamentalmente del radical hidroxilo, gracias a su estructura química (grupo metilo localizado en posición 5-OH del anillo indol)¹⁷⁰. Matuszak revisa la constante “k” para la reacción de la melatonina con los radicales OH[•], estableciéndola en el orden de $2,7 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a un pH de 7,0; lo que implica una protección sustancial. Para esta función la melatonina no posee receptores¹⁷¹.

Además, presenta una acción sinérgica con otros antioxidantes como las vitaminas C y E¹⁷², estimula a enzimas antioxidantes (SOD¹⁷³, glutatión peroxidasa¹⁷⁴) e inhibe la enzima prooxidativa responsable de la síntesis del óxido nítrico¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. También modula la actividad de la ATPasa Ca²⁺-Mg¹⁺ dependiente en el músculo cardíaco^{179,180}.

Existen determinados antioxidantes que dependiendo de las condiciones fisiológicas del organismo tienen un efecto pro ó antioxidante. Esto no le ocurre a la melatonina, que posee sólo un efecto antioxidante.

2.5.1 ESTUDIOS *IN VITRO*

En el año 1993, Reiter y col realizan un estudio in vitro para demostrar que la melatonina es un excelente depurador de radicales libres, especialmente del radical hidroxilo. El primer paso que dan es la producción de radicales OH[•] tras exponer una solución de H₂O₂ a un haz de luz ultravioleta. Pero, como la vida media de estos radicales es muy breve, añadieron al medio un agente quelante que los atrapaba

(5-5 dimetil-pirrolín N-óxido) y les permitía cuantificar, con cromatografía líquida de alta resolución¹⁸¹, el OH[•] producido. Posteriormente, adicionaban aMT y otros antioxidantes (glutathion y manitol) y resultó ser la melatonina 5 veces mejor depurador que el glutathion y cerca de 15 veces mejor que el manitol, por ser el IC₅₀ (concentración requerida para depurar el 50% de los radicales libres) de la aMT de 21 μM y los del glutathion y manitol de 123 μM y 283 μM, respectivamente.

Posteriormente se empleó ABTS (ácido 2,2'-azio-bis 3-etilbenzil-tiazolin-6-sulfónico) y la generación de OH[•] para ensayar la capacidad quelante de radicales de la melatonina, siendo efectiva¹⁸².

También es importante saber que, cuando la aMT reacciona con un radical libre, le cede un electrón pasando la aMT a convertirse en N-acetil N-formil- 5-metoxikinurenamina^{183,184}. Este catión radical indólico formado tiene la capacidad de depurar, a su vez, radicales superóxido que son fuente de producción de radicales hidroxilo; actuando así la aMT en dos niveles. Este metabolito se elimina por la orina y se estudia la posibilidad de ser reciclado intracelularmente, como la vitamina E por su efecto beneficioso.

Otros autores, como Pieri y col⁵⁷, estudiaron la capacidad de la aMT para eliminar el radical LOO[•], comparando la eficacia de ésta con la del trolox (forma soluble en agua de la vitamina E). Demostró ser la aMT el doble de eficaz.

2.5.2 EVIDENCIA *IN VIVO*

A raíz de los estudios in vitro realizados, se presenta a la melatonina como un potente antioxidante que actúa sobre las

macromoléculas (ADN, proteínas y lípidos) a nivel del citosol, núcleo y membranas celulares.

2.5.2.1 Interacciones de la melatonina con el ADN

El ADN es la molécula que porta la información sobre nuestro material genético siendo, por tanto, muy importantes las alteraciones que se produzcan en ella por agentes externos. La melatonina puede atenuar los daños causados por el estrés oxidativo. A continuación expondremos algunos estudios realizados.

Tan y col, dañaban el ADN de ratas al administrarles un carcinógeno (safrol) a 300mg/kg y a un sólo grupo le daban también aMT (0,2 ó 0,4 mgr/kg). A las 24 horas extraían el hígado del animal para analizar su ADN, viendo que el grupo que recibía aMT a 0,2 mg/kg reducía el daño del ADN causado por el carcinógeno en un 40% respecto al grupo que no se le daba. En cambio, si la aMT se daba a dosis de 0,4 mg/kg el daño sólo se reducía respecto al control en un 5%. Con este estudio los autores demostraron la protección que ofrece la aMT frente a carcinógenos como el safrol¹⁸⁵.

Posteriormente, estos mismos autores repitieron el experimento pero respetando el ciclo circadiano de la melatonina, de forma que a un primer grupo le administraban el carcinógeno al inicio de la fase diurna (donde es menor la producción de aMT) y a un segundo grupo se lo administraban al inicio de la fase nocturna (mayor producción de aMT). Los resultados confirmaron lo esperado: en el segundo grupo los daños causados eran significativamente menores. Los autores concluían que los niveles de aMT circulantes son suficientes para evitar el daño provocado por carcinógenos¹⁸⁶.

Otra forma de producir daño en el ADN es a través de la radiación ionizante. Se realizó un estudio para ver si la melatonina también atenuaba el daño que sufría el ADN al ser expuesto a la radiación ionizante (daño causado por radicales OH^{\bullet})^{187,188}. Para ello se utilizaron linfocitos humanos y se partió de 3 grupos (figura 24). Un primer grupo que era el control positivo, es decir, linfocitos que se incubaban con dimetilsulfóxido (DMSO), sustancia conocida como depuradora de radicales libres. El segundo grupo de linfocitos se incubaban con aMT y el tercero sin aMT. Posteriormente todos eran irradiados con 150cGy de radiación γ . Dos días después, se valoraba el daño que habían sufrido los cromosomas al contabilizar el número de transformaciones aberrantes, fragmentos acéntricos y micronúcleos generados. El resultado fue que la aMT, a una concentración de 2 nM, reducía el daño del ADN en un 70% y que la concentración necesaria de DMSO para producir este mismo efecto era 500 veces mayor (1M)^{189,190}. Otros autores, como Blikenstaff y col, también publican acerca del efecto de radioprotección de la aMT sobre el ADN.

La acción depuradora de OH^{\bullet} que tiene la aMT en núcleos celulares es, por un efecto “*per se*” y, posiblemente, por estimular mecanismos que reparan el ADN. El que la melatonina, por su potencial antioxidante, preserve al ADN de los daños que pueda sufrir, quizás pueda ser utilizado en un futuro para disminuir la prevalencia del cáncer¹²².

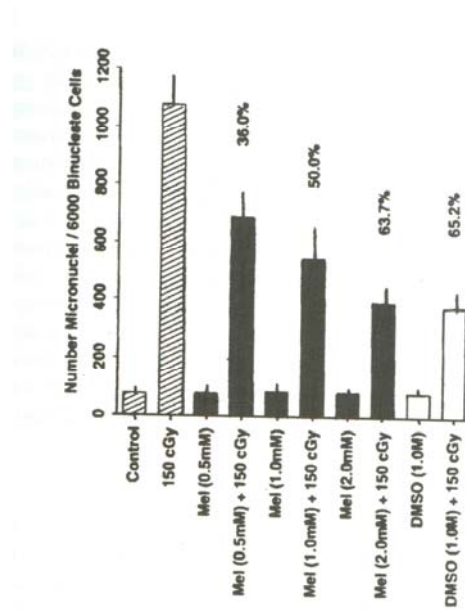


Figura 24: número de linfocitos humanos conteniendo micronúcleos, indicando daño al ADN, tras la exposición a una radiación ionizante de 150 cGy.

2.5.2.2 Interacciones de la melatonina con las proteínas

La melatonina protege a las proteínas del daño causado por el estrés oxidativo. Se sabe que las cataratas son consecuencia de la oxidación de las proteínas del cristalino por radicales del oxígeno¹⁹¹. Se pensó que la aMT podía impedir su formación al actuar como antioxidante y para demostrarlo se administró a ratas recién nacidas BSO (inhibidor de la síntesis de glutatión)¹⁹²; generando cataratas en ellas al hacerlas deficientes en dos antioxidantes: glutatión y aMT, que

no se empieza a sintetizar hasta los 15 días de vida. Observaron que al adicionar aMT al medio las cataratas se evitaban.

Estos resultados son muy interesantes para la práctica clínica ya que con la edad es muy frecuente la aparición de cataratas en los humanos, quizás por la pérdida de aMT con los años¹⁹³⁻¹⁹⁵. Se postula la posibilidad de disminuir su incidencia administrando aMT.

2.5.2.3 Interacciones de la melatonina con los lípidos

La melatonina es una sustancia que por su gran solubilidad y carácter lipofílico⁵⁵ protege a las membranas de la peroxidación lipídica, hecho de gran importancia en órganos como el cerebro que está sometido a una alta producción de radicales libres por el rico consumo de oxígeno y la presencia de los PUFA (ácidos grasos poliinsaturados).

Es de todos conocido el papel de sustancias como la vitamina E como neutralizadora de radicales LOO[•] generados en la peroxidación lipídica. Como hemos mencionado anteriormente, Piere y col⁵⁷ demuestran que la aMT in vitro tiene más potencia para neutralizar los radicales LOO[•] que el trolox (sustancia soluble de vitamina E).

Para comprobar la protección de la aMT sobre los lípidos, a ratas adultas se les administra paraquat (20-70 mg/kg) con o sin aMT. El paraquat¹⁹⁶ es una sustancia que resulta muy tóxica por la gran cantidad de radicales libres que genera. Como marcadores de la peroxidación lipídica se utiliza el malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenal que se miden a las 24 horas. También, la proporción de glutatión total y oxidado ya que con el estrés oxidativo aumenta el

segundo. La lipoperoxidación se reduce de manera muy importante en los grupos en los que se ha administrado la aMT¹⁹⁷.

El cerebro es un órgano muy susceptible a la lipoperoxidación, se cree que las alteraciones neurodegenerativas del envejecimiento están relacionadas con la destrucción del tejido neuronal por los radicales libres. Para ver la potencia de la aMT previniendo la peroxidación lipídica del cerebro, se incubaron homogenizados de cerebro de ratas con y sin ácido kaínico (es neurotóxico y neuroexcitador)^{165,198-200} y con y sin aMT. Se vio que, en aquellos homogenizados en los que se administraba aMT, se reducía de forma concentración dependiente la lipoperoxidación.

Giusti y col²⁰¹ continuaron ampliando estos conocimientos con cultivos primarios de neuronas granulares del cerebelo de ratas, en los que adicionaban kainato y posteriormente aMT. Los efectos neurotóxicos del kainato eran neutralizados con la aMT. Sin embargo, si inicialmente se pretrataban con aMT para prevenir estos efectos y después se administraba el kainato, no observaban esta protección. Los autores argumentan el papel protector de la aMT frente al kainato por su actuación como depuradora de radicales libres.

Por todo lo expuesto podemos concluir diciendo que, el beneficio clínico potencial de la melatonina como antioxidante es notable en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, cataratas seniles, etc. Siendo necesarios ensayos clínicos en humanos que permitan demostrar estas afirmaciones, ya que la evidencia clínica disponible procede de ensayos in vitro y de experimentación animal.

2.6 PATOLOGÍA POR RADICALES LIBRES EN PEDIATRÍA

2.6.1 DISPLASIA BRONCOPULMONAR

La primera definición de displasia broncopulmonar (DBP) fue dada por Northway y col en el año 1967. Ellos describieron la enfermedad pulmonar crónica (EPC) severa como, aquella que padecían neonatos muy pequeños afectados de enfermedad de membrana hialina, y requerían tratamiento con ventilación mecánica y oxígeno. Desde entonces se ha investigado y avanzado mucho sobre el tema y, se sabe que, la DBP puede sobrevenir en niños sin antecedentes de enfermedad de membrana hialina. En la actualidad se acepta la siguiente definición: *“secuelas respiratorias en un niño que alcanza la edad de término pero no puede ser dado de alta debido al requerimiento continuado de oxígeno o ventilación mecánica, o un niño que es dado de alta con oxígeno o ventilación mecánica”*.

Su incidencia está inversamente relacionada con el peso al nacimiento y la edad gestacional, ya que estos neonatos por inmadurez pulmonar requieren, en muchas ocasiones, ser ventilados mecánicamente con oxígeno a altas concentraciones. En los últimos tiempos estamos asistiendo a una incidencia cada vez mayor de la enfermedad por el aumento de la supervivencia de neonatos muy prematuros.

Es una enfermedad multifactorial en la que participan la toxicidad del oxígeno, la ventilación mecánica, la intubación endotraqueal, la filtración aérea, la atelectasia y otros factores como la infección (ureaplasma, chlamydia o citomegalovirus) y el estado

nutricional²⁰²⁻²⁰⁴. Nos centraremos en el primer factor descrito por el tema que nos ocupa: la *toxicidad del oxígeno*.

Cuando administramos oxígeno en concentraciones elevadas a un neonato para tratar una hipoxemia severa, se producen una serie de cambios morfológicos en su pulmón. Inicialmente, aparece una lesión en el epitelio de la vía aérea, alveolar y en el endotelio capilar, que favorecen el edema intersticial y alveolar con formación de membranas hialinas. Esta primera fase recibe el nombre de EXUDATIVA. Si se superan los 7 días, las células epiteliales tipo I son reemplazadas por las tipo II y fibrosis intersticial. FASE PROLIFERATIVA. A los 45 días de vida se produce el destete del oxígeno e inicialmente los pulmones parecen normales, aunque un examen más exhaustivo revela un remodelamiento con aumento del lecho capilar y de la barrera aire-sangre-tejido^{205,206}.

Este daño pulmonar por la toxicidad del oxígeno es mediado por RADICALES LIBRES. Incluyen al: anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. Éstos producen: citotoxicidad sobre células endoteliales- epiteliales y sobre los macrófagos alveolares, inhibición de la síntesis de surfactante, inhibición de la respuesta vascular pulmonar a la hipoxia, inhibición de la reparación pulmonar normal por los fibroblastos con resultado de una alterada deposición del colágeno e inhibición del desarrollo pulmonar normal con menor alveolización. Para proteger al pulmón de las lesiones que ocasionan los radicales libres, el organismo cuenta con antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutathion peroxidasa, etc). Autores como Wilborn y col²⁰⁷ han demostrado experimentalmente que la combinación de Cu-Zn-SOD + catalasa, o Mn-SOD, y en menor medida, desferroxiamina, por separado,

aminoraron la alteración de la morfogénesis y crecimiento pulmonar mediada por los radicales libres en situaciones de hipoxia e hiperoxia. Otros antioxidantes se mostraron ineficaces (alopurinol, n-acetilcisteína -NAC-, ebselen, trolox,...).

En niños prematuros estos sistemas de defensa son inadecuados por su inmadurez y, además, están sometidos a un mayor estrés oxidativo y, por tanto, a una mayor generación de especies reactivas del oxígeno por las siguientes causas:

1. una mayor tasa de *infecciones* que proporcionan un aumento de células inflamatorias.
2. Una elevada proporción de *hierro libre*^{208,209}, que no puede unirse a la transferrina si no es oxidado a férrico por mediación de la ceruloplasmina (disminuída en prematuros)²¹⁰. Además, la actividad de la ceruloplasmina se ve antagonizada por los elevados niveles de vitamina C presentes en el cordón umbilical de los neonatos.
3. Frecuentes episodios de *apnea* con *isquemia*, que tras la *reperfusión* lleva a una elevada producción de superóxido y posteriormente de radicales hidroxil.

Todo lo comentado predispone al prematuro a desarrollar displasia broncopulmonar.

Gracias a una serie de marcadores podemos medir el grado de estrés oxidativo. Éstos se elevan en la DBP y son los siguientes:

- hidrocarburos espirados (ácido malondialdehído-tiobarbitúrico): productos de lipoperoxidación lipídica.
- Alantoína (producto de oxidación del ácido úrico). El índice alantoína/urato es predictor precoz de BDP²¹¹.
- Carboximetilisina (inactivación proteíca).

- Excreción urinaria de 8 hidroxideoxiguanosina (alteración del ADN).
- F₂ isoprostano (peroxidación lipídica del ácido araquidónico).
- 8-isoprostaglandin F₂α²¹².

2.6.2 HIPERTENSIÓN PULMONAR PERSISTENTE NEONATAL

En 1969, Gersony y col. describen un cuadro clínico en dos niños con “*características fisiológicas persistentes de circulación fetal, en ausencia de enfermedades cardíacas, pulmonares, hematológicas o del S.N.C.*”. Estas características de circulación fetal persistente consistían en la existencia de un shunt D-I a través del agujero oval y del ductus. Posteriormente, se comprobó que este patrón hemodinámico podía ocurrir en RN que, además, presentaban: enfermedad pulmonar primaria, hipoglucemia, poliglobulia, asfixia neonatal, etc.

Actualmente, podríamos definir la Hipertensión pulmonar persistente neonatal (HPPN) como: “*un cuadro clínico de cianosis y síndrome de distress respiratorio (SDR) que ocurre principalmente en niños a término y posttérmino y que se caracteriza por una hipertensión pulmonar que produce una hipoxemia grave*”. Esta hipoxemia sería el resultado de un shunt D-I a través del oval y ductus (conductos fetales persistentes).

Inicialmente se utilizó la denominación de Persistencia de Circulación fetal, hoy se habla de Hipertensión Persistente Neonatal, ya que, la hipertensión pulmonar está presente en todos los niños con este síndrome.

Los factores patogénicos que pueden producir hipertensión pulmonar persistente son:

1. *vasoconstricción pulmonar intensa con un lecho vascular normalmente desarrollado*: asfixia perinatal, aspiración meconio, hipoglucemia, neumonía.
2. *Hipertrofia de las arteriolas pulmonares*: hipoxia intrauterina crónica, ingesta de salicilatos.
3. *Hipoplasia de la red vascular pulmonar*: hernia diafragmática, Potter.
4. *Obstrucción relativa del flujo*: policitemia, hipertensión venosa pulmonar.

En la fisiopatología de la HPPN también se ha implicado a los radicales libres²¹³. Experimentalmente se ha comprobado que el sistema hipoxantina-xantinoxidasa provoca vasoconstricción pulmonar, y que ésta puede ser inhibida con la administración de alopurinol (inhibidor de la xantinoxidasa y antioxidante “*per se*” a altas dosis), indometacina o catalasa²¹⁴. En el mismo modelo experimental, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ puede contribuir a la vasoconstricción pulmonar actuando a través del receptor para tromboxano presente en los vasos pulmonares.

2.6.3 PERSISTENCIA DEL DUCTUS ARTERIOSO

El tono de la pared ductal²¹⁵⁻²¹⁷ está regulado, entre otros factores, por el efecto vasoconstrictor del oxígeno y el efecto vasodilatador de las prostaglandinas (PGE_2). Experimentalmente se ha demostrado que, la presencia en el medio de hipoxantina (xantinoxidasa) provoca la apertura del ductus y la producción de PGE_2 , sin embargo, la administración de indometacina (inhibidor de las

prostaglandinas) y de catalasa ("*scavenger*" de radicales libres) provocan su cierre. Por lo que se deduce, que los radicales libres contribuyen a que el ductus permanezca abierto, quizás porque induzcan la producción de PG en la pared ductal.

La implicación del sistema hipoxantina-xantinaoxidasa en la persistencia del ductus y en la aparición de la hipertensión pulmonar persistente (patologías desencadenadas ante una situación de hipoxia) indica que los radicales libres pueden regular la circulación perinatal, por vasodilatación del ductus y vasoconstricción simultánea de la circulación pulmonar.

2.6.4 FIBROPLASIA RETROLENTAL

La retinopatía del prematuro o fibroplasia retroleental (FRL), como la denominó Terry en el año 1942, es un trastorno retiniano vasoproliferativo que ha provocado ceguera en decenas de miles de niños. Afecta principalmente a neonatos prematuros de peso inferior a 1.500 gramos, siendo éste inversamente proporcional a la tasa de prevalencia.

En su patogenia se han implicado muchos factores pero, sin duda, uno de los más importantes es la *hiperoxia*. El efecto del oxígeno sobre los vasos retinianos depende de:

- su estadio de desarrollo (la FRL sólo ocurre en aquellos lactantes cuyos vasos retinianos no han completado su crecimiento centrífugo a partir del disco óptico)²¹⁸.
- Tiempo de exposición al oxígeno.
- La presión parcial de oxígeno en sangre arterial.

En condiciones normales, la hiperoxia provoca una vasoconstricción de la coroides, principal vía de llegada de oxígeno a la retina. Sin embargo, este mecanismo protector parece estar alterado en el recién nacido, posiblemente relacionado con una excesiva producción o actividad del NO, con la consecuencia de un mayor aporte de oxígeno a la retina. El ibuprofeno, como inhibidor de la síntesis de PGs, o la dimetil-tiourea, como limpiadora de radicales libres, no modifican la respuesta retiniana a la hiperoxia en cerdos neonatos. En cambio, sí ocurre vasoconstricción en respuesta a L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa (NOS), que está sobreexpresada en el periodo neonatal. Además, L-NAME previene el incremento de lipoperoxidación inducido por la hiperoxia en la coroides.

La exposición durante 10 días a una concentración de oxígeno del 30% provoca una incidencia del 10% de FRL en prematuros. Pero la concentración máxima que no resulta tóxica no se conoce. Si se sabe que el riesgo aumenta si hay una evolución clínica tórpidas, si se realizan múltiples transfusiones (contienen cantidades altas de hipoxantina) y si el parto es múltiple. En la práctica se recomienda mantener una presión arterial de oxígeno entre 50-80% en el recién nacidos de bajo peso (RNBP) con patología aguda y entre 50-60% en el pretérmino.

La retina es un órgano muy rico en PUFAs, mitocondrias y oxígeno. Para su función necesita un alto consumo de oxígeno que genera gran cantidad de radicales libres, ocasionando éstos una lipoperoxidación en las membranas ricas en PUFAs, que finalmente alteran la retina. El tono de la pared de los vasos retinianos está regulado por el efecto vasoconstrictor del tromboxano A_2 y el

vasodilatador de las prostaciclina (PGI₂). Los mecanismos antioxidantes en los prematuros pueden resultar insuficientes si, además, existe un déficit nutricional. El déficit de magnesio y/o cobre puede aumentar la síntesis de tromboxano A₂, dando lugar a vasoconstricción, isquemia retiniana y proliferación reactiva de los vasos retinianos.

En prematuros fallecidos por síndrome de distress respiratorio se observan altas concentraciones de hipoxantina en el humor vítreo, que pueden ser el sustrato necesario para la formación de radicales libres, por la vía de la xantino-oxidasa.

Posibles factores protectores:

- la vitamina E es un antioxidante²¹⁹ que sí parece prevenir los daños aunque, al no conocerse su relación coste-beneficio, no se puede recomendar como tratamiento profiláctico.

- Algunos estudios relacionan una menor concentración de bilirrubina²²⁰⁻²²² con la fibroplasia retrolental, que podría explicarse por el posible efecto antioxidante de ésta, si bien otros investigadores no comparten estos resultados.

2.6.5 ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE

La enterocolitis necrotizante es la emergencia gastrointestinal neonatal adquirida más común. Afecta, fundamentalmente, al íleon, seguido en frecuencia por el colon ascendente, el ciego, el colon transverso y el rectosigma. Su incidencia está inversamente relacionada con el peso al nacimiento y la edad gestacional.

En su patogenia intervienen diversos factores:

- hipoxia,
- hipotensión arterial,

- acidosis,
- colonización bacteriana. Se han comunicado epidemias de ECN por *escherichia coli*, *klebsiella*, *enterobacter*, *pseudomonas*, *salmonella*, *clostridium difficile*, *c. perfringens*, coronavirus, rotavirus y enterovirus.
- Toxinas o antígenos que actúan sobre pared intestinal,
- mediadores inflamatorios, etc.

Estos factores provocan una hipoperfusión a nivel intestinal, que ocasiona un daño en la membrana basal mucosa, con aumento de la permeabilidad capilar, edema y finalmente degeneración celular y necrosis transmural.

Sin embargo, la ECN no ocurre cuando hay una isquemia en la pared intestinal, sino cuando sucede una reperfusión en la misma, al intentar corregir los factores que la provocan. Con la reperfusión²²³ se produce un importante aumento de radicales libres en el intestino. Radicales libres que proceden del sistema xantino-oxidasa y de los fagocitos, principalmente. Experimentalmente se ha demostrado la existencia de niveles muy elevados de malondialdehído en el intestino de pacientes con ECN, indicando la importancia de la lipoperoxidación lipídica en la patogenia de la enfermedad.

También contribuye a la ECN el déficit nutricional. Así, por ejemplo, los niveles bajos de magnesio aumentan la síntesis de sustancias vasoconstrictoras como las endotelinas, favoreciendo el daño oxidativo y, por tanto, la lipoperoxidación. Ocasionan, además, una menor síntesis de GSH. Por otro lado, los niveles bajos de cobre alteran la actividad de la enzima Cu/Zn SOD²²⁴.

Por la implicación de los radicales libres en esta patología se ha administrado, en modelos animales, alopurinol intravenoso 15 minutos antes de la ECN con buenos resultados²²⁵.

2.6.6 DAÑO CEREBRAL ISQUÉMICO HEMORRÁGICO Y DESARROLLO NEUROMOTOR

2.6.6.1 Participación de la hipoxia-reperfusión

En situaciones de hipoxia se produce un aumento del flujo hacia los órganos nobles como son cerebro, corazón y suprarrenales. Incluso dentro del cerebro la distribución no es uniforme, va a ser mayor en el tallo encefálico y menor en la sustancia blanca, plexos coroideos y corteza; siendo esta última la más susceptible a las lesiones hipóxicas. Para que se consiga esta redistribución del flujo, disminuye la resistencia vascular en estos órganos y aumenta en la periferia. Sin embargo, estos cambios en las fluctuaciones de la perfusión cerebral, asfixia que es seguida de una reperfusión, son muy perjudiciales. En la etapa de reoxigenación se produce un aumento del metabolismo celular neuronal transitorio con gran generación de radicales libres²²⁶.

2.6.6.2 Implicación del hierro no unido a proteínas

El papel que desempeña el hierro en la patología por isquemia-reperfusión es importante²²⁷. La isquemia en los tejidos produce una acidosis, que ocasiona una liberación del hierro que está unido a la transferrina (muy saturada en el periodo neonatal). Este

hierro libre facilita la producción de radicales libres y pasa al plasma donde no puede ser captado.

Se realizó un estudio en tres grupos de neonatos para valorar que relación guardaban los niveles de hierro libre y el desarrollo neuromotor al año de vida. Se vio que se correlacionaban de forma significativa. El primer grupo era el control y se detectó hierro libre en el 30%. En el segundo grupo, que presentaban una asfixia moderada, los niveles eran del 60% y en el último grupo, sometidos a una asfixia grave, eran del 80%. Once de los quince neonatos con asfixia severa presentaron daño cerebral, falleciendo nueve de ellos en el periodo neonatal. En tres de los cuatro neonatos restantes con un desarrollo neuromotor normal al año de vida, no se detectó hierro libre durante el periodo de estudio neonatal²²⁸.

Se plantea la administración de forma preventiva o terapéutica de un antioxidante, para facilitar el aprendizaje de un proceso reflejo, por lo anteriormente expuesto. Experimentalmente, se ha realizado en ratas recién nacidas con buenos resultados²²⁹.

II.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años estamos asistiendo a una gran producción científica acerca de la glándula pineal y su secreción mejor conocida, la N-acetil-metoxitriptamina, lo que nos ha permitido conocer diversas funciones de esta indolamina. Entre ellas se encuentran su capacidad para inducir el sueño y, en consecuencia, su participación en los mecanismos de control vigilia/sueño, función neuroendocrina, depuradora de radicales libres, etc. Sin embargo, aún quedan muchas cuestiones por aclarar. Como expresión de estas afirmaciones y en relación al tema central de este proyecto, recordemos los siguientes hechos:

1. existen evidencias de que, al menos en el terreno de la experimentación animal, la melatonina juega un papel fundamental como mensajero químico endógeno y sincronizador de multitud de variables biológicas que siguen un ritmo circadiano en los seres vivos. Además, participa en el control de los cambios cíclicos estacionales como son: la conducta de apareamiento de los animales, ciertas enfermedades que siguen curso estacional, etc. Por otra parte, se sabe que la melatonina, gracias a su libre paso a través de la placenta, interviene en la sincronización de los centros cronobiológicos en desarrollo del feto. Aspecto este último que constituye una de las premisas fundamentales para el planteamiento de los objetivos que posteriormente describiremos.

2. La literatura de los últimos años relativa a estudios en humanos, recomienda realizar trabajos sobre la secreción pineal en la infancia, debido a que a esta edad se produce la mayor actividad glandular, mientras que en el adulto las concentraciones plasmáticas

llegan en ocasiones a ser prácticamente inexistentes, con una clara disminución de la amplitud del patrón de secreción circadiana.

3. En este sentido, los conocimientos referentes a la época neonatal son muy escasos. Se dispone de algunas comunicaciones referentes a mujeres embarazadas y a las variaciones que aparecen en arteria y vena umbilical durante el parto, así como a los cambios relacionados con los ritmos biológicos, edad y determinadas patologías^{239,240,241}. En este orden de ideas, habrá que destacar especialmente la capacidad del neonato para responder ante ciertos estímulos con una tasa mayor de melatonina (oscuridad continua, situaciones de estrés, etc)^{242,243}.

4. En concordancia con el argumento anterior, describiremos un análisis estadístico y sociométrico de la literatura científica sobre el tema, al objeto de reafirmar las ideas desarrolladas.

Actualmente, una de las principales líneas seguidas por el análisis estadístico y sociométrico de la literatura científica es la que trata de la dispersión de las publicaciones científicas. Para planificar racionalmente la información científica, hay que conocer la distribución de la literatura sobre un tema determinado en zonas de diferente densidad. Los trabajos sobre un tema pueden concentrarse en un número muy reducido de revistas o dispersarse en un número elevado. Las zonas de máxima densidad pueden contener revistas especializadas en el tema, o revistas de tipo general dedicadas a aspectos directa o indirectamente relacionados con dicho tema.

En 1984 Bradford²⁴⁴ formuló la ley que lleva su nombre: “ si las revistas científicas se disponen en orden decreciente de productividad de artículos sobre un tema determinado, puede distinguirse un núcleo de revistas más específicamente consagradas al

tema y varios grupos o zonas que incluyen el mismo número de artículos que el núcleo, siendo el número de revistas en el núcleo y en las zonas siguientes como 1: n: n²:...”. Las principales aplicaciones de este modelo son las siguientes:

a. permite garantizar la inclusión de todas las publicaciones importantes al delimitar la estratificación de las revistas especializadas y las de temática cercana.

b. El estudio del tipo de dispersión de las publicaciones, en especial sus cambios a lo largo del tiempo, orienta acerca de las diversas tendencias de la investigación en las diferentes ramas de la ciencia o de la técnica.

c. Posibilita determinar el número de revistas que incluyen un determinado porcentaje de todos los trabajos sobre una disciplina o sobre un tema.

Por lo tanto, permite resolver el enorme problema de seguimiento de la literatura científica que se publica actualmente. Con la ordenación propuesta por Bradford, es posible calcular con exactitud las revistas que es necesario consultar según el porcentaje de la literatura que se quiera recuperar sobre un tema o disciplina determinada. Esto hace posible, además, prever con precisión el tiempo y dinero necesarios para obtener dicha información.

Aplicando el modelo de Bradford al tema objeto de este proyecto durante un periodo de tiempo comprendido entre 1993-1998, ambos inclusive (suficiente tiempo si tenemos en cuenta el relativamente corto periodo de tiempo en que están apareciendo trabajos sobre esta materia), hicimos un volcado en la principal fuente de información consultada, el *Index Medicus*. Este repertorio constituye el fondo bibliográfico más importante de las ciencias

biomédicas en el que se recogen sólo artículos de revistas. Se fundó en 1960 y se viene publicando desde entonces por la Biblioteca Nacional de Medicina.

Como se puede comprobar en la Tabla 5, el núcleo o zona I de Bradford está compuesto por una sola revista: *J Pineal Res.* España ocupa el tercer lugar después de USA y Japón ²⁴⁵.

Zonas de Bradford	Nº de revistas/z	Revistas acum.	Artículos	Trabajos acum.	Cte de Bradford
Núcleo	1	1	22	22	
Zona 2	3	4	21	43	3
Zona 3	5	9	24	67	1,6
Zona 4	8	17	23	90	1,6
Zona 5	12	29	24	114	1,5
Zona 6	23	52	26	140	1,9
Zona 7	37	89	37	177	1,6

Tabla 5: distribución del número de revistas según zonas de Bradford (1993-1998).

País de publicación	Número de revistas/ número de trabajos
USA	0,67
Japón	0,26
España	0,18
Alemania	0,5
Israel	0
Italia	0,45
Gran Bretaña	1,8

Tabla 6: relación entre el número de revistas y el número de artículos sobre melatonina y niño, indizados en MEDLINE, según el país de publicación (1993-1998).

Un aspecto realmente llamativo es la escasez de referencias bibliográficas referidas a problemas pediátricos.

5. El desarrollo de nuevas ciencias básicas, que en un futuro inmediato tendrán repercusiones de indudable interés clínico (de hecho existen evidencias unánimemente aceptadas de la ritmología de ciertos procesos patológicos), entre las que hay que señalar la CRONOBIOLOGÍA, ha permitido que se inicien a nivel internacional líneas de investigación encaminadas a conocer sus explicaciones y mecanismos íntimos. En este sentido, volvemos a subrayar la escasez de trabajos en humanos, que alcanza cotas aún más bajas en el niño y el neonato. A nivel nacional queremos hacer una mención especial sobre el grupo de Valladolid, dirigido por el Prof. Ardura, gracias al cual ya hay importantes conocimientos sobre la ritmología infantil. Adicionalmente, y como expresión del interés científico del tema, recordaremos como en el transcurso de los últimos cinco años han aparecido en el mercado editorial de la comunidad científica internacional tres revistas. “ *Cronobiología, Chronobiological int y Journal Biological Rhythm*”. Esto nos lleva a interpretar que se trata de una ciencia en desarrollo y con futuro.

2. OBJETIVOS

Los argumentos anteriormente expuestos fueron la base para establecer los objetivos del presente proyecto, los cuales podrían ser definidos mediante los siguientes términos:

1. profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la glándula pineal en el niño.

2. En concordancia con otros trabajos previos de nuestro grupo, en los que se estudiaron la producción pineal de aMT en el cordón umbilical de neonatos con y sin sufrimiento fetal agudo, nos planteamos estudiar la respuesta glandular (mediante la determinación de aMT) en las siguientes situaciones:

- recién nacidos con peso inferior a 1.500g.

- recién nacidos con peso superior a 1.500g.

3. Definir el perfil evolutivo de los niveles sanguíneos de melatonina: al nacimiento, al tercero y al séptimo día de vida. Valorando si los resultados obtenidos guardan relación con el peso, situación clínica y perfil gasométrico.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

El material objeto del presente proyecto ha sido recogido en el servicio de pediatría del Hospital de Torrecárdenas (Almería), durante el periodo de tiempo comprendido entre Enero del 2001 y Agosto del 2002. Durante este periodo, de los neonatos que nacieron en este centro sanitario fueron seleccionados para el proyecto los que reunían las siguientes características:

1. recién nacidos ingresados en la unidad de cuidados intensivos.

2. Ausencia de malformación congénita, padecimiento de anemia, sepsis, trastornos hemodinámicos graves o alteraciones metabólicas.

En cumplimiento de los *Acuerdos de Helsinki*, antes de seleccionar a un paciente se informó a los padres o tutores de la finalidad del estudio y de los procedimientos a realizar sobre el neonato. Las determinaciones de melatonina (aMT) fueron realizadas con los sobrantes de los especímenes sanguíneos tras la realización de la analítica solicitada por el clínico.

Las características generales y los datos de interés obstétricos y perinatales de cada uno de los pacientes seleccionados han sido recogidos en las tablas 7 y 8.

	Embarazo controlado	Portadora E.B.G	ITU	Fiebre intraparto	RPM	Corioamn
Caso 1	si	Nc	no	No	intraparto	no
Caso 2	si	Nc	no	No	48 horas	no
Caso 3	si	Nc	no	No	6 días	no
Caso 4	si	No	no	No	7 días	no
Caso 5	sí	Nc	no	No	intraparto	no
Caso 6	sí	Nc	no	No	intraparto	no
Caso 7	sí	Nc	no	Nc	1 hora	no
Caso 8	sí	Sí	no	No	intraparto	no
Caso 9	sí	Sí	no	No	15 horas	no
Caso 10	sí	Nc	no	No	< 7 días	no
Caso 11	sí	No	no	No	intraparto	no
Caso 12	sí	Nc	no	No	no	no
Caso 13	sí	Nc	nc	No	> 24 horas	no
Caso 14	sí	Nc	nc	No	1 hora	no
Caso 15	nc	Nc	no	Sí	96 horas	no
Caso 16	no	Nc	nc	Nc	nc	nc
Caso 17	sí	Nc	no	No	30 días	no
Caso 18	sí	Nc	no	No	1 hora	no
Caso 19	sí	Nc	no	No	intraparto	no
Caso 20	si	Si	nc	No	intraparto	no
Caso 21	si	Si	no	Nc	1 hora	no
Caso 22	si	Nc	no	No	intraparto	no
Caso 23	si	No	no	No	intraparto	no
Caso 24	si	Nc	no	No	31 horas	no
Caso 25	nc	Nc	no	No	8 horas	no
Caso 26	si	Nc	no	No	1 hora	no
Caso 27	si	Nc	no	Nc	nc	no
Caso 28	si	Nc	no	Nc	nc	no
Caso 29	si	No	no	No	1 hora	no
Caso 30	si	Nc	no	No	nc	no
Caso 31	no	Nc	no	No	36 horas	no
Caso 32	si	Nc	no	Nc	intraparto	no
Caso 33	si	Nc	no	No	40 horas	no
Caso 34	si	Nc	no	No	>24 horas	no
Caso 35	si	Si	no	No	intraparto	no

Tabla 7: factores de riesgo infeccioso en el grupo general.

	Parto	E.G	Peso (g)	Talla (cm)	P.C (cm)	Apgar1 /5
Caso 1	Cesárea	32	1480	40	30	8/10
Caso 2	Eutócico	30	1540	41	28	9/10
Caso 3	Cesárea	28	1070	35	27	9/10
Caso 4	Eutócico	26	870	36	29	9/10
Caso 5	Cesárea	33	1220	44.5	25	9/10
Caso 6	Cesárea	30	1130	37	28	5/7
Caso 7	Cesárea	30	1370	40	27	9/10
Caso 8	Cesárea	32	1080	36	27.5	9/10
Caso 9	Eutócico	30	1300	41	29	9/10
Caso 10	Cesárea	31	1060	37	29	7/9
Caso 11	Cesárea	32 ⁺⁵	1220	38	28	9/10
Caso 12	Cesárea	32	950	38	25.5	10/10
Caso 13	Eutócico	29	1370	39	28	5/8
Caso 14	Eutócico	29	1200	36	26	6/10
Caso 15	Cesárea	31	1420	38	31	7/7
Caso 16	Eutócico	31	960	36	26	4/8
Caso 17	Cesárea	27-28	1030	36	25.5	2/7
Caso 18	Eutócico	32	1490	36	31	9/10
Caso 19	Cesárea	30	1400	40	29	9/10
Caso 20	Cesárea	32	1800	54	31	9/10
Caso 21	Vacuo	39	2850	48	31	3/7
Caso 22	Cesárea	38	2700	47	34	7/9
Caso 23	Cesárea	39	4400	54	36	5/5
Caso 24	Eutócico	34	2375	48	33	8/9
Caso 25	Cesárea	33	2120	44	33	8/10
Caso 26	Eutócico	35 ⁺³	2200	47.5	32.5	9/9
Caso 27	Cesárea	34	1860	43	32	7/10
Caso 28	Cesárea	34	2300	48	34	7/10
Caso 29	Eutócico	39	2200	46	32	8/8
Caso 30	Eutócico	30	1600	42	29	5/8
Caso 31	Eutócico	34	2325	49	35	9/10
Caso 32	Cesárea	34	2265	44	31	6/9
Caso 33	Cesárea	40	2800	50	35.5	2/5
Caso 34	Cesárea	28	1690	38	30	5/9
Caso 35	Cesarea	39	2800	48	33	6/9

Tabla 8: factores somatométricos en el grupo general.

Como se puede apreciar en esta muestra formada por 35 neonatos, las edades gestacionales límites están comprendidas entre 26 y 40 semanas (32,48 s) y los pesos entre 870 y 4.400 g (1.799,86 g).

Para dar cumplimiento a los objetivos que se han descrito con anterioridad, la muestra fue clasificada de acuerdo a las siguientes hipótesis de trabajo:

1. Hipótesis A: bajo este concepto se ha incluido el total de la muestra, N= 35 y se pretende estudiar la evolución que experimentan las distintas variables analizadas y su relación con la aMT, tanto en cordón umbilical como al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

2. Hipótesis B: de esta forma queremos estudiar la existencia de posibles diferencias entre neonatos con peso al nacer inferior a 1.500 g o superior a 1.500 g. Básicamente los momentos de estudio y variables analizadas son las mismas que en la hipótesis A. De tal manera que la muestra según este concepto queda constituida de la siguiente manera:

-*grupo de recién nacidos <1.500 g:* formado por 18 niños, con unas edades gestacionales límites comprendidas entre 26 y 33 semanas (30,26 s) y unos pesos límites comprendidos entre 870 y 1.490 g (1.218,95 g);

-*grupo de recién nacidos >1.500 g,* formado por 17 neonatos con las siguientes características: edades gestacionales entre 30 y 40 semanas (35,125 s) y pesos límites comprendidos entre 1.600 y 4.400 g (2.489,69 g).

Las características generales de esta hipótesis se recogen en las siguientes tablas. (Tabla 9, 10, 11, 12).

Tabla 9: factores de riesgo infeccioso en <1.500 g.

	Embarazo controlado	Portadora E.B.G	ITU	Fiebre intraparto	RPM	Corioamn
Caso 1	si	Nc	no	No	Intraparto	no
Caso 2	si	Nc	no	No	6 días	no
Caso 3	si	No	no	No	7 días	no
Caso 4	sí	Nc	no	No	intraparto	no
Caso 5	sí	Nc	no	No	intraparto	no
Caso 6	sí	Nc	no	Nc	1 hora	no
Caso 7	sí	Sí	no	No	intraparto	no
Caso 8	sí	Sí	no	No	15 horas	no
Caso 9	sí	Nc	no	No	< 7 días	no
Caso 10	sí	No	no	No	intraparto	no
Caso 11	sí	Nc	no	No	no	no
Caso 12	sí	Nc	nc	No	>24 horas	no
Caso 13	sí	Nc	nc	No	1 hora	no
Caso 14	nc	Nc	no	Sí	96 horas	no
Caso 15	no	Nc	nc	Nc	nc	nc
Caso 16	sí	Nc	no	No	30 días	no
Caso 17	sí	Nc	no	No	1 hora	no
Caso 18	sí	Nc	no	No	intraparto	no

Tabla 10: factores de riesgo infeccioso en >1.500 g.

	Embarazo controlad	Portadora E.B.G	ITU	Fiebre intraparto	RPM	Corioamn
Caso 1	si	Si	nc	No	intraparto	no
Caso 2	si	Si	no	Nc	1 hora	no
Caso 3	si	Nc	no	No	intraparto	si
Caso 4	si	No	no	No	intraparto	no
Caso 5	si	Nc	no	No	31 horas	no
Caso 6	nc	Nc	no	No	8 horas	no
Caso 7	si	Nc	no	No	1 hora	no
Caso 8	si	Nc	no	Nc	nc	no
Caso 9	si	Nc	no	Nc	nc	no
Caso 10	si	No	no	No	1 hora	no
Caso 11	si	Nc	no	No	Nc	no
Caso 12	no	Nc	no	No	36 horas	no
Caso 13	si	Nc	no	Nc	intraparto	no
Caso 14	si	Nc	no	No	40 horas	no
Caso 15	si	Nc	no	No	>24 horas	no
Caso 16	si	Si	no	No	intraparto	no
Caso 17	si	nc	no	No	48 horas	no

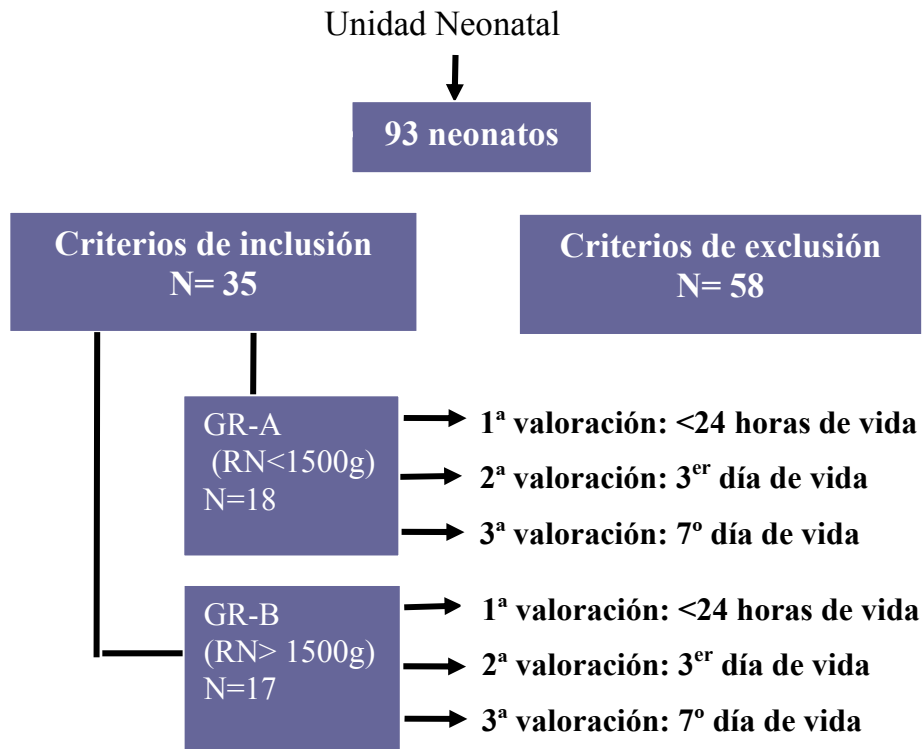
	Parto	E.G.	Peso (g)	Talla (cm)	P.C (cm)	Apgar 1/5
Caso 1	cesárea	32	1480	40	30	8/10
Caso 2	cesárea	28	1070	35	27	9/10
Caso 3	eutócico	26	870	36	29	9/10
Caso 4	cesárea	33	1220	44.5	25	9/10
Caso 5	cesárea	30	1130	37	28	5/7
Caso 6	cesárea	30	1370	40	27	9/10
Caso 7	cesárea	32	1080	36	27.5	9/10
Caso 8	eutócico	30	1300	41	29	9/10
Caso 9	cesárea	31	1060	37	29	7/9
Caso 10	cesárea	32 ⁺⁵	1220	38	28	9/10
Caso 11	cesárea	32	950	38	25.5	10/10
Caso 12	eutócico	29	1370	39	28	5/8
Caso 13	eutócico	29	1200	36	26	6/10
Caso 14	cesárea	31	1420	38	31	7/7
Caso 15	eutócico	31	960	36	26	4/8
Caso 16	cesárea	27-28	1030	36	25.5	2/7
Caso 17	eutócico	32	1490	36	31	9/10
Caso 18	cesárea	30	1400	40	29	9/10

Tabla 11: datos somatométricos en <1.500 g.

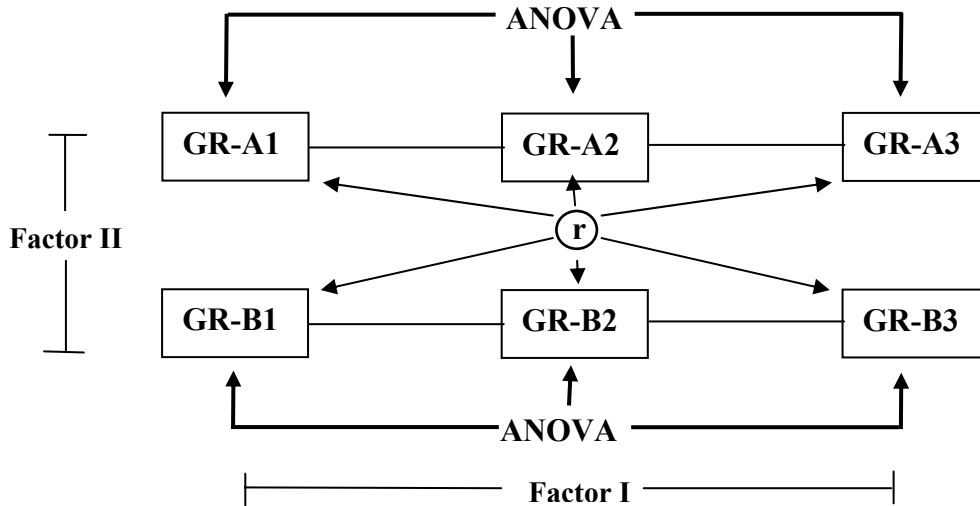
	Parto	E.G.	Peso (g)	Talla (cm)	P.C (cm)	Apgar 1/5
Caso 1	cesárea	32	1800	54	31	9/10
Caso 2	vacuo	39	2850	48	31	3/7
Caso 3	cesárea	38	2700	47	34	7/9
Caso 4	cesárea	39	4400	54	36	5/5
Caso 5	eutócico	34	2375	48	33	8/9
Caso 6	cesárea	33	2120	44	33	8/10
Caso 7	eutócico	35+3	2200	47.5	32.5	9/9
Caso 8	cesárea	34	1860	43	32	7/10
Caso 9	cesárea	34	2300	48	34	7/10
Caso 10	eutócico	39	2200	46	32	8/8
Caso 11	eutócico	30	1600	42	29	5/8
Caso 12	eutócico	34	2325	49	35	9/10
Caso 13	cesárea	34	2265	44	31	6/9
Caso 14	cesárea	40	2800	50	35.5	2/5
Caso 15	cesárea	28	1690	38	30	5/9
Caso 16	cesarea	39	2800	48	33	6/9
Caso 17	eutócico	30	1540	41	28	9/10

Tabla 12: datos somatométricos en >1.500 g.

DISEÑO EXPERIMENTAL



Análisis y estrategias estadísticas



2. MÉTODOS

2.1 METODOLOGIA CLÍNICA

2.1.1 PROTOCOLO DE ATENCIÓN AL R.N <1.500 g

2.1.1.1 Control de temperatura y humedad

El primer problema al que se enfrenta un recién nacido, y más aún si es <1.500 g, es el control de su temperatura por varias razones:

1. mayor superficie expuesta en relación con la masa corporal metabólicamente activa,
2. menor reservorio de calor,
3. características de su piel: fina, con escasa fascia subcutánea y con falta de barrera epidérmica queratinizada.

Las pérdidas de calor pueden ser por convección (cuando la temperatura aire es inferior a la cutánea del niño), por evaporación, por radiación (transferencia de calor desde la piel cálida hasta las paredes circundantes más frías) y por conducción.

Para proporcionarle al neonato un ambiente térmico neutro, se dispone en la actualidad de incubadoras de doble pared o calefactores radiantes con láminas o cubiertas protectoras. En ellas se debe mantener una humedad en torno al 40-50%, para evitar las pérdidas insensibles por evaporación, y una temperatura corporal de 36 a 36,5 °C, que se controla por medio de una sonda cutánea de servocontrol que se coloca habitualmente en zona de hipocondrio derecho. El uso, además, de un envoltorio de plástico transparente ayuda a reducir las pérdidas insensibles y los estímulos sensoriales. También es importante en los neonatos que precisen ventilación mecánica,

humidificar y calentar los gases respiratorios que se administren, así como los instrumentos que vayan a ser utilizados.

2.1.1.2 Líquidos y electrolitos

Estos neonatos requieren un control exhaustivo de los líquidos a infundir, por una mayor pérdida insensible de agua y una inmadurez de su sistema renal. Los líquidos deben ser administrados a través de vías periféricas o centrales, principalmente catéteres umbilicales.

El primer día de vida el tipo de líquido y los volúmenes recomendados, suponiendo que el recién nacido esté en condiciones térmicas neutras, son los siguientes:

500-599 g-----	dextrosa al 5% en agua-----	200 ml/kg/día
600-699 g-----	dextrosa al 5% en agua-----	180 ml/kg/día
700-799 g-----	dextrosa al 5% en agua-----	160 ml/kg/día
800-899 g-----	dextrosa al 5% en agua-----	120 ml/kg/día
900-999 g-----	dextrosa al 5% en agua-----	100 ml/kg/día

A partir del segundo día de vida el manejo de los líquidos variará en función de los electrolitos, el peso, la función renal, etc. Teniendo siempre en cuenta que un excesivo aporte de líquidos favorece la aparición de conducto arterioso persistente y otras patologías. Por tanto, es imprescindible diariamente valorar el estado de hidratación del neonato por medio:

- del peso corporal,

- de la diuresis y densidad urinaria:

* primeras 12 horas----cualquier volumen es aceptable.

* Entre las 12-24 horas de vida: 0,5ml/kg/h.

* 2º día: 1-2 ml/kg/h.

- * Posteriormente: 3-3,5 ml/kg/h.
- Constantes hemodinámicas:
 - * frecuencia cardiaca: 140-160 lpm,
 - * tensión arterial,
 - * PVC: tomada en vena umbilical.
- Determinación de electrolitos:
 - * sodio
 - * potasio.

2.1.1.3 Glucemia

La glucemia es un parámetro bioquímico que debe controlarse rigurosamente, ya que los neonatos <1.500 g están más predispuestos a sufrir episodios de hipoglucemias o hiperglucemias, debiendo mantener una infusión de glucosa de 4-6 mg/kg/minuto. La monitorización de la glucemia y glucosuria nos indicarán las modificaciones que tendremos que realizar.

2.1.1.4 Alimentación

Existe controversia respecto al momento de iniciar la alimentación en RN < 1.500 g que requieren ventilación por patología pulmonar. Hasta hace poco tiempo, se prefería demorar el inicio de la alimentación porque se pensaba que ésta facilitaba el desarrollo de enterocolitis necrotizante (ENC). Sin embargo, los estudios realizados que comparan esta práctica con el inicio precoz de alimentación hipocalórica, llegan a la conclusión de que no hay diferencias en cuanto a la incidencia de ECN y, además, el inicio precoz de la alimentación reduce el número de días de nutrición parenteral, disminuyendo la colestasis y favoreciendo el metabolismo del calcio.

No obstante, en aquellos neonatos hemodinámicamente inestables (shock, hipotensión, etc) se debe posponer el inicio de la alimentación.

Pero, cuando el neonato pueda iniciar la alimentación, ¿cómo debemos darla?. La opción más fisiológica e ideal es la alimentación por succión, con pecho o biberón, sin embargo, aunque la capacidad de succión está presente desde la 24 semana de edad gestacional, normalmente hasta la 34 semana no tienen una succión coordinada y activa. Cuando la alimentación por succión no es posible, recurriremos a dar la alimentación por sonda nasogástrica o a la nutrición parenteral cuando la enteral no es posible.

2.1.1.5 Soporte respiratorio

Debido a la inmadurez pulmonar que presentan los neonatos <1.500 g, la mayoría precisan un soporte respiratorio. En la actualidad disponemos de distintas alternativas cuya elección dependerá del estado clínico del recién nacido:

- con presión positiva continua en la vía aérea (CPAP nasal, CPAP por tubo endotraqueal),
- ventilación mecánica y
- los menos, con alta frecuencia.

La *presión positiva continua en la vía aérea* está siendo utilizada cada vez con más frecuencia en las unidades neonatales. Para su aplicación se pueden emplear máscaras (CPAP con máscara), cánulas nasales (CPAP nasal) o un tubo endotraqueal (CPAP endotraqueal). Impide la atelectasia de un pulmón deficitario en surfactante, mejora la ventilación de espacios aéreos con bajo V/Q, disminuye la vasoconstricción local, el circuito derecha-izquierda y

mejora la saturación arterial de oxígeno. Sin embargo, si la presión en la vía aérea es excesiva, puede haber retención de CO₂.

La *CPAP nasal* es la más utilizada, no sólo en el síndrome de dificultad respiratoria leve, sino también tras la extubación para evitar el colapso de la vía aérea. Las presiones empleadas oscilan entre 2-8 cm H₂O y una de las complicaciones que presenta es la distensión gástrica, que se evitará colocando sonda rectal.

Otra manera de utilizar la *CPAP* es *con tubo endotraqueal*, siendo a menudo una medida intermedia al suspender la ventilación mecánica.

Pero en muchas ocasiones no es suficiente y los neonatos precisan ser intubados y sometidos a *ventilación mecánica*. El tamaño del tubo endotraqueal utilizado variará en función del peso, de forma que un tubo de 2,5 mm de diámetro es apropiado para los < 1 kg y de 3 mm para los que pesan entre 1 y 2 Kg. La intubación se prefiere que sea orotraqueal para evitar las deformaciones nasales que causa la intubación nasotraqueal, aunque en la decisión final influye la destreza del pediatra. Una vez intubado el neonato debe verificarse la colocación adecuada del tubo por medio de una radiografía de tórax y ajustar los parámetros del respirador. Los recomendados para los respiradores de ciclo de tiempo con límite de presión son:

- frecuencia: 20-60 resp/min (habitualmente 30).
- Tiempo inspiratorio (IT): 0,3-0,5 segundos.
- Presión inspiratoria pico (PIP): 12-20 cm de agua.
- Presión media en la vía aérea (MAP): menor de 8 cm de agua.
- FiO₂: según lo requerido por los valores iniciales de PO₂ 6-8 L/min.

Debemos emplear la mínima presión posible en la vía aérea para evitar el barotrauma y la patología pulmonar crónica, permitiendo

una acidosis respiratoria leve-moderada (pH de 7,25-7,32 y PCO₂ de 45-58 mm Hg).

El estado ventilatorio del RN debe ser monitorizado frecuentemente mediante:

1. la determinación de gases en un catéter colocado en la arteria umbilical,
2. oximetría de pulso.

Los valores deseados de gases son: PO₂ de 45-60 mmHg, PaCO₂ de 45-55 mm Hg, siendo aceptables valores mayores si el pH continúa entre 7,25 y 7,32. Los cambios bruscos en la coloración del neonato, en los gases o en el estado clínico indican la necesidad de realizar radiografía de tórax y actuar conforme a lo encontrado. En ocasiones, simplemente es necesario aspirar las secreciones del tubo endotraqueal.

Pero, ¿cuándo puede ser extubado el RN?. Dependerá de la presencia o no de los siguientes criterios:

1. frecuencia del respirador inferior a 10 ciclos/ minuto.
2. FiO₂ inferior al 30%,
3. frecuencia respiratoria espontánea regular,
4. volumen corriente adecuado (3,8-5,0 ml/kg),
5. valores estables de gases y
6. hallazgos radiológicos estables en exámenes seriados.

2.1.1.6 Tratamiento con surfactante

En los últimos años, la utilización del surfactante en el tratamiento de los neonatos <1.500 g con enfermedad de membrana hialina ha aumentado la supervivencia de los mismos y acortado la necesidad de ventilación mecánica, reduciendo las secuelas derivadas de ella. La primera experiencia con éxito en uso del surfactante exógeno la comunicó Fujiwara en el año 1980. Desde entonces se han comercializado varios tipos de surfactantes. Se dispone de *surfactantes naturales* modificados: survanta (origen bovino) y curosurf (origen porcino); de *surfactantes artificiales*: exosurf y de uso sólo experimental, *surfactantes naturales de líquido amniótico humano*. Está demostrada la mayor eficacia de los surfactantes naturales frente a los sintéticos.

La acción de estos preparados es sustituir al surfactante natural perdido, inactivado o simplemente ausente por la edad gestacional del neonato. Permiten una reducción de la tensión superficial y una estabilización de la interfase aire alveolar-agua para prevenir el colapso alveolar.

En cuanto a su utilización, existen dos posibilidades:

1. tratamiento profiláctico, o
2. tratamiento de rescate.

Es un hecho contrastado, que el tratamiento profiláctico es preferible al de rescate en la enfermedad hialina establecida, dado que reduce la necesidad de soporte ventilatorio y la incidencia de complicaciones a medio y largo plazo. Esto es especialmente cierto en neonatos < 30 semanas de edad gestacional.

La dosis recomendada es 100 mg/kg, con instilación traqueal directa. Inmediatamente tras su administración se deben modificar los parámetros respiratorios (presión pico, FiO_2 , etc), para evitar barotrauma.

2.1.1.7 Cuidados de la piel

Como hemos comentado anteriormente, la piel del neonato <1.500 g es muy delicada, ya que posee un estrato córneo escasamente desarrollado y una epidermis muy delgada, que aumentan las pérdidas de calor y favorecen la aparición de infecciones. El cuidado, por tanto, de esta piel debe ser meticuloso:

1. limitar la cinta adhesiva aplicada sobre la piel y usar una barrera protectora artificial, si es posible, por debajo de las telas adhesivas.

2. Utilizar el oxímetro de pulso para el control de la temperatura, desechando el uso de electrodos transcutáneos de oxígeno o dióxido de carbono.

3. No emplear de rutina bolsas colectoras de orina ni manguitos de presión arterial, ya que el plástico puede producir cortes en la piel.

4. Aplicar profilaxis ocular.

5. En la preparación de la piel para los procedimientos médicos, aplicar una mínima cantidad de povidona iodada, limpiando la piel posteriormente con agua tibia estéril.

6. No usar agentes que irriten o sequen la piel (alcohol, etc).

7. Para retirar las cintas adhesivas, los electrodos, etc., puede ser útil el empleo de torunda con agua estéril o aceite de triglicéridos de cadena media, no el alcohol.

8. Limpiar las zonas sucias con torundas de algodón y agua tibia, evitando el baño.

2.1.1.8 Infecciones

Las infecciones son uno de los mayores problemas a los que se enfrentan estos neonatos. Sistemáticamente se les deben realizar cultivos seriados (hemocultivos, urocultivos), ya que muchos nacen infectados o de un medio infectado. Se les trata con ampicilina y un aminoglucósido (habitualmente gentamicina), previa recogida de los cultivos. Posteriormente, en función de las infecciones nosocomiales que se vayan presentando, la pauta antibiótica se modificará según el antibiograma recibido.

2.1.1.9 Hemorragia intracraneana

El prematuro está más predispuesto a presentar hemorragias intracraneanas (periventricular-intraventricular) por las anomalías en la autorregulación de las arteriolas, la presencia de una matriz germinal subependimaria muy vascularizada, etc.

Clínicamente, su presencia puede pasar desapercibida en un 50% de casos, por lo que es necesario realizar sistemáticamente ecografías craneales en estos neonatos, que nos permiten clasificar las hemorragias en 4 grados:

1. *hemorragia subependimaria* (matriz germinal), con hemorragia intraventricular mínima o sin ella.

2. *Hemorragia intraventricular definida*, pero sin que ningún ventrículo lateral esté lleno de sangre.

3. *Hemorragia intraventricular* que llena y distiende completamente un ventrículo lateral.

4. *Hemorragia de la matriz germinal* con extensión en la sustancia blanca adyacente y asociada con hemorragia intraventricular y agrandamiento ventricular.

En nuestra unidad no se realiza ningún tratamiento farmacológico profiláctico, pero sí se intenta prevenir su aparición:

- evitando las oscilaciones excesivas en la presión arterial y el volumen minuto (administración de transfusiones con lentitud), con

- manipulaciones mínimas,

- manteniendo un buen sistema de apoyo cardiovascular, evitando acidosis, hipoxemia, etc. y

- posición del neonato en flexión, en decúbito lateral o ventral con cambios cada 4 horas o cuando se requiera.

2.1.1.10 Hiperbilirrubinemia

Se deben monitorizar los niveles de bilirrubina cada 12 horas, al menos. Según los días de vida, la edad gestacional y el peso al nacimiento, disponemos de tablas que nos indican los niveles de bilirrubina que debemos mantener. Algunas unidades neonatales plantean el uso de la fototerapia inmediatamente después del nacimiento para evitar el ascenso de los niveles de bilirrubina. En

raras ocasiones, si la fototerapia fracasa, se tiene que recurrir a la exanguinotransfusión.

2.2 METODOLOGÍA ANALÍTICA

2.2.1 ANALÍTICA GENERAL

Siguiendo el protocolo de atención hospitalaria a neonatos con la problemática de los grupos de estudio en el presente proyecto, en cada uno de los pacientes se realizaron los siguientes procedimientos:

2.2.1.1 Análisis gasométricos y del equilibrio ácido-base

Empleando para ello muestras obtenidas del talón, en unas ocasiones, o de arteria umbilical cuando ésta estaba canalizada. En estos casos se siguió el protocolo de enfermería de la unidad que incluye: estabilización del paciente, calentamiento de la extremidad, asepsia local, etc. Finalmente la muestra se trasladó al analizador de gases AUS-Check, obteniéndose los resultados inmediatamente y mediante un registro gráfico que se incluía en la historia de cada paciente.

2.2.1.2 Determinaciones de hematología y bioquímica

De forma similar y en los momentos indicados, se obtuvieron muestras sanguíneas (vena umbilical) para la determinación de los parámetros hematológicos correspondientes a las tres series y bioquímicos generales (equilibrio iónico, función renal, enzimas

hepáticos, PCR, etc). Determinaciones que fueron realizadas en los laboratorios centrales de nuestro hospital, donde obviamente se considera que el peso de los pacientes limita la muestra a obtener.

2.2.1.3 Determinaciones microbiológicas

Puesto que en un porcentaje considerable de los pacientes se debieron practicar procedimientos invasivos, por una u otra razón, y por supuesto cuando existían factores de riesgo obstétricos o perinatales, en cada caso se obtuvieron muestras para el laboratorio de microbiología, tanto de secreciones periféricas como centrales. Se remitieron en las condiciones establecidas por el protocolo microbiológico los especímenes correspondientes al laboratorio de microbiología para su cultivo y búsqueda de su antibiograma correspondiente.

2.2.2 MEDICIÓN DE MELATONINA

2.2.2.1 Introducción y principio del test

La melatonina, la principal hormona segregada por la glándula pineal, es un modulador clave de los biorritmos circadianos y anuales. Este perfil circadiano en los fluidos corporales es una marca excelente para establecer el reloj biológico. Durante el día los niveles plasmáticos de melatonina son bajos y se elevan por la tarde. Durante la noche los niveles más altos se producen alrededor de las 3 de la madrugada en la mayoría de los humanos sanos.

Como es un modulador general de los biorritmos humanos, la melatonina está envuelta en la coordinación de funciones como el sueño, el humor, la reproducción y la actividad del sistema inmune. El perfil de secreción de la melatonina puede estar alterado en condiciones tales como desórdenes del sueño, trastornos afectivos, depresión o alteraciones menstruales.

El kit de ensayo contiene material para medir los niveles de melatonina en plasma y suero.

El procedimiento de análisis sigue el principio básico del *radioinmunoensayo* (figura 25), que implica la competición entre un antígeno radioactivo y otro no radiactivo por un número fijo de receptores de anticuerpos. La cantidad del antígeno marcado con I^{125} unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración analizada de la muestra. Cuando el sistema está en un equilibrio, el anticuerpo unido al antígeno radioactivo es precipitado con un 2º anticuerpo (anti-anticuerpo) en la presencia de polietilenglicol. El precipitado es analizado con un contador gamma. La cuantificación de las muestras desconocidas se consigue por comparación de su actividad con una curva de referencia preparada con estándares desconocidos.

2.2.2.2 Almacenamiento y estabilidad

Los reactantes deben estar almacenados entre 2-8 °C. No utilizar componentes más allá de la fecha de caducidad mostrada en la etiqueta del kit. No mezclar los reactivos que provengan de lotes distintos.

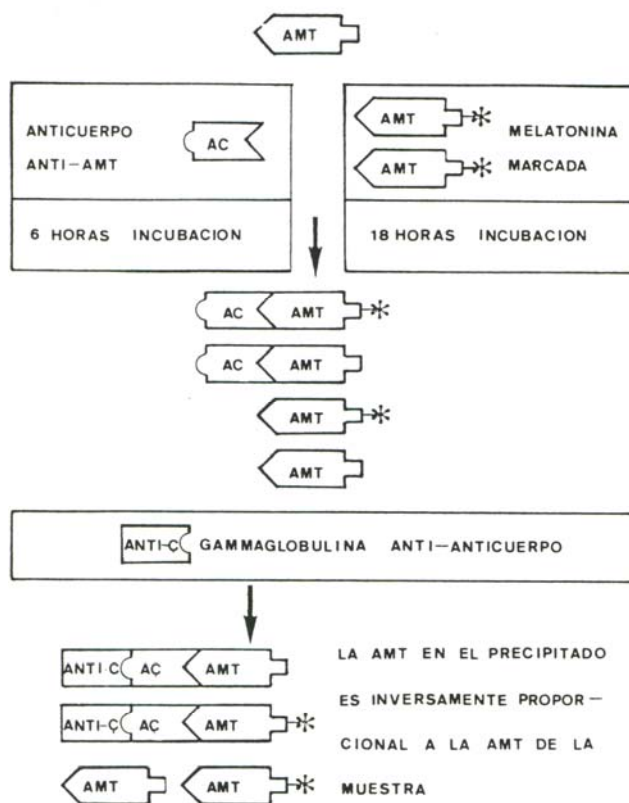


Figura 25: principios del RIA de melatonina.

2.2.2.3 Contenidos del kit

- Estándar A (BA 0801): 0 pg/ml de melatonina. 1 x 2 ml.
- Estándar B (BA 0802): 1,25 pg/ml de melatonina. 1 x 1 ml.
- Estándar C (BA 0803): 5 pg/ml de melatonina. 1 x 1 ml.
- Estándar D (BA 0804): 20 pg/ml de melatonina. 1 x 1 ml.
- Estándar E (BA 0805): 80 pg/ml de melatonina. 1 x 1 ml.
- Estándar F (BA 0806): 320 pg/ml de melatonina. 1 x 1 ml.

- Control 1 (BA 0851): 1 x 1 ml.
- Control 2 (BA 0852): 1 x 1 ml.
- Buffer ensayo: 1 x 6 ml. Precaución en su uso porque es corrosivo.
- Enzima: 2 x 3 ml el vial.
- Buffer enzima: 2 x 4 ml. Precaución en su uso porque es corrosivo.
- Anticuerpo antimelatonina: 1 x 5,25 ml, de conejo. Colorea de azul.
- Melatonina marcada con I^{125} : 1 x 5,5 ml, actividad <200 kBq. Colorea de rojo.
- Reactivo precipitante (γ globulina anti-anticuerpo de melatonina): 55 ml.

2.2.2.4 Material adicional y equipamiento requerido que no está incluido

- pipetas automáticas de 25, 50, 100 y 500 μ l.
- Tubos y rejillas adecuadas.
- Centrífuga con capacidad para al menos 3000 g.
- Aparatos adecuados para aspirar o decantar los tubos.
- Vortex.
- Contador gamma.
- Agua destilada.

2.2.2.5 Almacenaje

El test puede ser usado con EDTA en plasma así como con heparina en plasma y suero. Las muestras hemolíticas y especialmente lipídicas no deberían usarse para el ensayo porque dan valores falsamente bajos. Las muestras de plasma deben ser almacenadas para

más de 24 horas a 2-8 °C. Para periodos más largos (más de 6 meses), las muestras deben ser almacenadas a -20 °C. Evitar congelar y descongelar repetidamente.

2.2.2.6 Procedimiento del test

A) Preparación de reactantes

**Estándares de plasma:* reconstituir el estándar A con 2 ml de agua destilada, estándar B-F cada uno con 1 ml. La reconstitución de estándares que no vayan a ser usados inmediatamente deben ser congelados a -20 °C (en alícuotas) y deben ser descongelados sólo una vez.

**Controles 1 & 2:* reconstituir cada control con 1ml de agua destilada. La reconstitución de los controles que no sean usados inmediatamente deben ser congelados a -20 °C (en alícuotas) y deben ser descongelados sólo una vez.

**Enzima:* reconstituir el contenido del vial con 3 ml de enzima buffer antes de usar. Mezclar cuidadosamente (30 minutos dando vueltas). La reconstitución de las enzimas no puede ser congelada y tiene que ser usada sólo una vez. Sólo se proporcionan más viales de la enzima si se piden.

B) Melatonina RIA (plasma y suero)

Dejar que los reactivos y muestras alcancen temperatura ambiente y después numerar los tubos del ensayo (polipropileno). Recomendamos por duplicado.

1. Introducir 100 µl del estándar A en tubos para NSB (unión no específica).

2. Introducir 100 µl del estándar A-F, controles y muestras del paciente en los tubos respectivos.
3. Pipetear 25 µl de la solución de la enzima en todos los tubos (excepto los de actividad total), mezclar en seguida y centrifugar 1 minuto a 500 g.
4. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C).
5. Pipetear 50 µl de Buffer-ensayo dentro de todos los tubos (excepto totales) y mezclar en seguida.
6. Pipetear 50 µl del trazador I¹²⁵ en todos los tubos.
7. Pipetear 50 µl de anticuerpo antimelatonina en todos los tubos (excepto totales y NSB).
8. Mezcle bien y centrifuge durante 1 minuto a 500 g.
9. Incubar durante 15 a 20 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 20° C).
10. Añadir 500 µl de anticuerpo-antimelatonina (2-8 °C) en todos los tubos (excepto totales).
11. Incubar durante 15 minutos a 2-8 °C.
12. Centrifuge durante 15 minutos a 3000 g (preferiblemente refrigerado).
13. Decantar o aspirar el sobrenadante con cuidado (excepto totales).
14. Contar todos los tubos durante 1 minuto en el contador gamma.

2.2.2.7 Cálculo de resultados

Restar la media cpm (desintegraciones por minuto) de la unión no específica (NSB) a la media de la referencia cero (estándar A), estándar del B-F, control 1&2 y las muestras de los pacientes. Construimos una curva estándar con una gráfica con el porcentaje de cpm de cada estándar, en relación con el cpm de la referencia cero (B-NSB/BO-NSB %) con su correspondiente concentración.

La concentración de los controles y las muestras de los pacientes pueden ser leídos de la curva estándar usando su porcentaje de B-NSB/BO-NSB %.

2.2.2.8 Control de calidad

Es recomendable el uso de las muestras control de acuerdo a las leyes federales del estado y usar controles de niveles normales y patológicos. El LDN u otros controles comerciales deben estar dentro de los intervalos de confianza. Los intervalos de confianza de los controles LDN están impresos en las etiquetas de los viales controles.

2.2.2.9 Cuantificación

La curva de calibración para la concentración de melatonina en las muestras puede ser obtenida por la realización de gráficas en las que en el eje Y se representa el porcentaje B/Bo de los valores medidos para los 6 estándar y en el eje X sus concentraciones correspondientes. Los resultados para muestras desconocidas pueden ser calculados usando una de las siguientes curvas experimentales:

“spline fits, Akima o 4 parámetros logísticos”. La siguiente gráfica es un ejemplo de una curva típica de calibración para la melatonina RIA

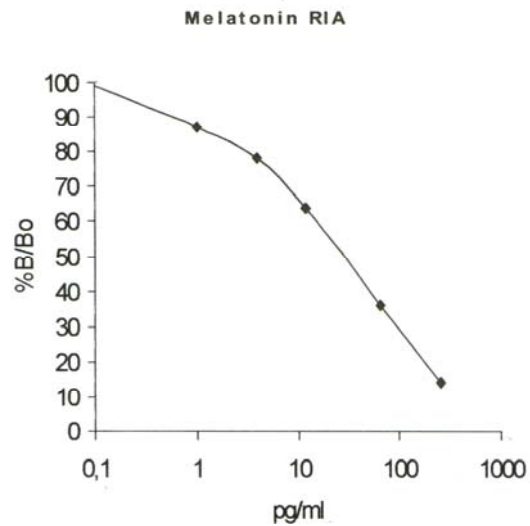


Figura 26: curva de calibración de la aMT.

2.2.2.10 Características del ensayo

A) Especificidad

Varias sustancias pueden provocar reacciones cruzadas con el antígeno de la melatonina, pudiendo ser analizadas. En el listado siguiente, relacionamos dichas sustancias con las razones entre la concentración molar de melatonina y la concentración molar del componente examinado al 50% que desplaza el trazador de melatonina.

Sustancia	Reactividad cruzada (%)
Melatonina	100.00
N-acetilserotonina	0.80
5-Metoxitriptofol	0.70
5-Metoxitriptamina	0.08
6-Metoxitriptamina	<0.01
5-Metoxiindol-3-acido acético	<0.01
Serotonina	<0.01
DL-triptofano	<0.01
DL-5-metoxitriptofano	<0.01
5-hidroxi-L-triptofano	<0.01

Tabla 13: reacciones cruzadas de compuestos con el antígeno de la aMT.

B) Rangos de referencia

Las siguientes concentraciones de referencia dadas deberían ser tomadas como una guía solamente. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus valores normales.

Las concentraciones de melatonina dependen de la edad y del ritmo circadiano con un pico máximo entre las 1 y 3 de la madrugada. Este máximo es, normalmente, claramente mayor que los valores durante el día. La concentración más alta encontrada en niños es a la edad de 3 años. Adultos sanos muestran concentraciones de melatonina superiores a 15 pg/ml en plasma y suero durante el día.

C) Sensibilidad

Los valores más bajos detectados fueron determinados tomando 3 desviaciones estándar de cpm de la referencia cero y leyendo los correspondientes valores de la curva estándar. Para plasma y suero es de 0,75 pg/ml.

D) Reproductibilidad

La reproductibilidad del test de RIA fue investigada mediante la determinación intra e inter-ensayo de los coeficientes de variación por la repetición de los valores de dos muestras de plasma con diferentes concentraciones de melatonina.

2.3 METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

2.3.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Por su propia definición, la estadística se considera ligada a los métodos científicos en la toma, organización, recopilación, presentación y análisis de los datos, tanto para la deducción de conclusiones, como para tomar decisiones razonables de acuerdo con tales análisis. La parte de estos resultados que pretende sencillamente describir y analizar una serie de datos sin sacar conclusiones o hacer inferencias sobre un grupo mayor se llama “estadística descriptiva o deductiva”. Es considerada como aspecto básico para desarrollar posteriormente inferencias sobre los valores de las variables pertenecientes a la muestra y transportarlas a la población.

2.3.1.1 Medidas de tendencia central

Un promedio es un valor que es típico o representativo de un conjunto de datos. Como tales valores tienden a situarse en el centro de la extensión de datos ordenados según la magnitud, los promedios se conocen también como “medidas de centralización”. Se pueden definir varios tipos de estas medidas; entre ellas la más interesante es la media aritmética (muestral).

La *media aritmética* de un conjunto de n números: x_1, x_2, \dots, x_n , que se presentan con frecuencias absolutas f_1, f_2, \dots, f_n , respectivamente es:

$$X = \frac{\sum f_i x_i}{\sum f_i} = \frac{f_1 x_1 + f_2 x_2 + \dots + f_n x_n}{f_1 + f_2 + \dots + f_n} = \frac{\sum f_i x_i}{N}$$

2.3.1.2 Medidas de dispersión

A veces, no basta con conocer los valores centrales, siendo preciso determinar en que medida los datos numéricos están agrupados o no alrededor de la media. Al grado en que los datos numéricos tienden a extenderse alrededor de un valor medio se le denomina “variación o dispersión de los datos”. En esta experiencia se emplearon las siguientes medidas de dispersión:

A) Rango: definido como la diferencia entre el mayor y el menor representante de una distribución.

B) Desviación típica (DS): de todas las medidas de dispersión, es el estadígrafo que más se utiliza en la práctica; siendo necesaria su comprensión para la definición de otros muchos estadígrafos. Se define la desviación típica como la raíz cuadrada de la media aritmética de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media.

$$S = \sqrt{\sum f_i (x_i - \bar{x})^2 / N} = \sqrt{\sum (f_i x_i)^2 / N - \bar{x}^2}$$

C) Varianza: se define como el cuadrado de la desviación típica:

$$S^2 = \frac{\sum f_i (x_i - \bar{x})^2}{N}$$

D) Coefficiente de variación: estadígrafo empleado fundamentalmente para determinar la fiabilidad de técnicas y homogenización de los datos seleccionados. Se expresa mediante un porcentaje (en consecuencia independiente de las unidades utilizadas). Se define por el cociente entre la desviación típica y la media.

$$C.V = \frac{S}{\bar{x}}$$

E) Error estándar de la media: el error típico de la media es un estadígrafo que viene expresado por el cociente entre la desviación

típica y la raíz cuadrada del número de individuos que componen la muestra. En términos conceptuales, el error típico es pequeño respecto de las unidades de medida, el estadígrafo considerado presenta una variación menor de muestra a muestra, por tanto se puede tener más confianza en los resultados obtenidos.

2.3.2 INFERENCIA ESTADÍSTICA

2.3.2.1 Test de comparación de dos medias

Aceptada la hipótesis de la normalidad, empleamos test paramétricos para la comparación de dos medias a partir de dos tipos de muestras diferentes:

A) Muestras independientes:

Dadas dos muestras de tamaño n_1 y n_2 , con x_1 y x_2 de medias muestrales; al tratarse de muestras independientes, la variable $x_1 - x_2$ tendría por media la diferencia de las medias y por varianza la suma de las varianzas. Por tanto, se cumpliría que:

$$\bar{x}_1 - \bar{x}_2 \rightarrow N(\mu_1 - \mu_2; \sqrt{\frac{\delta_1^2}{n_1} + \frac{\delta_2^2}{n_2}})$$

Y como $H_0 \equiv \mu_1 = \mu_2$ es equivalente a $H_0 \equiv \mu_1 - \mu_2 = 0$, se puede deducir que el test consistirá en comparar con una t_α , la t_{exp} obtenida mediante la siguiente expresión.

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{\delta_1^2}{n_1} + \frac{\delta_2^2}{n_2}}}$$

Una vez obtenida la t experimental y, comparada con la t_α de la distribución T de Student, si la t_{exp} es menor o igual que t_α , se acepta la hipótesis nula (H_0), es decir, que las medias son iguales. En caso contrario, cuando la t_{exp} es mayor que la t_α se acepta la hipótesis alterativa (H_1), que indica que las medias son distintas, y con un error α .

B) Muestras apareadas

Cuando las variables son independientes, como ocurre en el caso de muestras apareadas, consideramos la variable $d = x_1 - x_2$ (diferencias entre cada par de valores apareados de las dos muestras). Con ello, la hipótesis $H_0 \rightarrow \mu_1 = \mu_2$ sólo se cumplirá si $\mu_d = 0$. En consecuencia la comparación de dos medias se convierte en un test de hipótesis para una media. De esta forma podemos calcular la siguiente expresión:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{d}|}{\frac{Sd}{\sqrt{n}}}$$

Comparada con una t_α en la distribución t de Student con n-1 grados de libertad. La regla de decisión es igual que en el apartado anterior.

2.3.2.2 Recta de regresión y coeficiente de correlación

Partiendo de “n” pares de valores cuantitativos (x_1, y_1) , (x_2, y_2) , (x_n, y_n) , pertenecientes a una muestra de n individuos, en los cuales (x_i) corresponden a una variable e (y_i) a otra, se puede obtener una nube de puntos sencillamente representando en un sistema de ordenadas los valores correspondientes a cada uno de los pares citados. Concuera la ecuación de la recta de regresión de y sobre x:

$$y - \bar{y} = \frac{S_{xy}}{S_x^2} (x - \bar{x})$$

en la que S_x^2 es la varianza de los valores muestrales x_1, x_2, \dots, x_n, y , S_{sxy} la covarianza, que se obtiene según el cálculo siguiente:

$$S_{xy} = \text{Covarianza} = \sum \frac{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n}$$

Para medir el grado de relación entre las variables se utiliza el coeficiente de correlación de Pearson, que corresponde a la siguiente expresión:

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x S_y}$$

Para conocer la dependencia/independencia de las variables a partir del coeficiente de correlación (r), se parte de un test de hipótesis en el que:

$H_0 = r = 0$ (independiente)

$H_1 = r \neq 0$ (dependiente)

Obteniéndose una t_{exp} donde, (n) no es el número de parejas, y (r) la correlación muestral, que se contrastará con una t_{α} teórica con $(n-2)$ grados de libertad. De manera que si: $t_{exp} > t_{\alpha}$; $r \neq 0$; y las variables x e y son independientes con un error α .

2.3.2.3 Análisis de la varianza (ANOVA)

El tipo de distribución y las características de algunas de las variables analizadas, recomendaron realizar una transformación matemática de la misma, al objeto de igualar las varianzas. Y dado que las variaciones de la media guardan una relación rectilínea con la desviación típica, éste objeto se logra aplicando una transformación logarítmica.

A) Análisis de la varianza de dos vías no balanceadas

Por diversas razones, el número de observaciones por casilla (subclase) de una clasificación múltiple puede ser desigual. Esto sucede en el modelo experimental diseñado en esta experiencia, en el que la muestra se ha clasificado en base a los factores o variables de interés (grupos) y (días), no ejerciendo ningún tipo de control sobre la manera en que se distribuyen los números.

Para el análisis de la tabla de dos vías comentadas, con unos determinados efectos de filas y columnas, se procede de la siguiente manera:

A.1- Test de interacción

Se hace normalmente para poder contrastar un modelo aditivo de las muestras de las casillas, esto es:

$$\bar{x}_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

donde: \bar{x}_{ij} es la media de las observaciones en la fila i y en la columna j .

Puesto que la diferencia $\bar{x}_{ij} - \bar{x}_{ij}$ de las medidas de las casillas proveniente de los valores del modelo aditivo anteriormente señalado, representa las interacciones fila *columna, se realiza un test (F) de la razón:

$$\frac{\sum \sum (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_{ij})^2}{[(I-1)(J-1)s^2]}$$

donde s^2 es la varianza entre casillas.

Desafortunadamente, con n_{ij} distintos el contraste del modelo aditivo requiere despejar una serie de ecuaciones lineales, similares a aquellas necesarias para el contraste de una regresión múltiple. Cuando las interacciones son importantes, unos test muy elementales pueden señalar la presencia de interacciones, sin la necesidad de contrastar el modelo aditivo.

A.2- Interacciones significativas

Si las interacciones son significativas, se procede al estudio por separado de los efectos fila en cada columna, y viceversa; con vista a comprender la naturaleza de las observaciones y obtener un resumen de los resultados. El efecto global para las filas y columnas, se indica en la expresión:

$$\bar{x}_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Es frecuentemente de escaso interés, dado que el efecto de cada factor depende del nivel del otro.

A.3- Interacción no significativa

Si la interacción aparece como no significativa, la suma de resultados se escribe según el menor de los cuadrados estimados a_i , b_j de los efectos de fila y columna en el modelo aditivo.

A.4- Análisis de las medias de casillas no balanceadas

En este método, las medidas de las casillas \bar{x}_{ij} son tratadas como si estuvieran todas ellas realizadas con el mismo número de observaciones. La experiencia sugiere que si la razón entre la mayor y

la menor es menor que (2), esta aproximación es adecuada para hacer un test (F) de interacciones y para analizar comparaciones entre medias de filas y columnas cuando las interacciones pueden resultar ser no significativas.

Usando el modelo aditivo, con unos efectos fijos de filas y columnas:

$$\bar{x}_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

donde: ε_{ij} es la media de las n desviaciones al azar. Por lo tanto, si σ^2 es la varianza para cada observación, la varianza de \bar{x}_{ij} es $\varepsilon \sigma^2 / n_{ij}$. Con I filas y J columnas, el total de la varianza de las $I J$ medias de las casillas será:

$$(\sigma^2 / I J) (1/n_{11} + 1/n_{12} + \dots + 1/n_{IJ}) = \sigma^2 / n_h$$

donde n_h es la media armónica de los n_{ij} .

En el análisis no balanceado, el estimador de la varianza es:

$$S^2 = \sum \sum \sum (X_{ijk} - \bar{x}_{ij})^2 / \sum \sum (n_{ij} - 1)$$

Cuando examinamos los efectos principales, observamos cada media de fila como poseedora de un error estándar $\pm s / \sqrt{bn_h}$, y cada media de columna con un error $\pm s / \sqrt{an_h}$.

A.5- Diseño con tamaño proporcionales

A veces las n_{ij} parecen ser aproximadamente proporcionales en su total de filas y columnas; esto es: $n_{ij} = n_i \cdot n_j / n$. En este caso, una

buena aproximación para el análisis del menor de los cuadrados se obtiene usando el número actual de medidas de casilla, \bar{x}_{ij} , pero reemplazando el n_{ij} por el número proporcional $n_{ij} = n_i, n_j / n$.

A.6- Cálculo del estimador de la varianza en el modelo aditivo:

Si las observaciones individuales en una tabla de dos vías son independientes con una varianza residual (σ^2), el modelo aditivo para el cálculo de media por casilla es:

$$\bar{x}_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

con una varianza σ^2 / n_{ij}

El análisis encuentra una estimación m , a y b que minimiza la suma balanceada de los restantes cuadrados.

$$\sum \sum (X_{ijk} - m - a_i - b_j)^2$$

Este análisis también proporciona un test (F) de las interacciones.

Como se indicó previamente, el parámetro (a) se necesita únicamente para mostrar hasta que punto la media de la fila i difiere de la global y de modo similar para (b) con respecto a las columnas. Por tanto, con I filas y J columnas, hay $I+J-1$ parámetros a estimar. Un método para el cálculo manual de este modelo fue aportado por Yale en 1934. Sin embargo, el cálculo manual resulta muy tedioso cuanto tanto I como J exceden de tres, por lo que es deseable el uso de un programa de ordenador que aporte el rendimiento preciso. En este

caso, se empleó el paquete informático SPSS/PC para Windows, versión 6.2, en español.

2.3.2.4 Regresión múltiple

Mediante ella se busca la posible relación existente entre tres o más variables. Se investiga poder estimar una variable biológica, no en función de los valores que pueda tomar otra, sino en función de los valores que puedan tomar dos o más. La ecuación de regresión tiene la siguiente forma:

$$(z) = a(x) + b(y) + c$$

o generalizando $(N) = a(A) + b(B) + \dots + m(M) + n$.

Los coeficientes de las sucesivas variables (a, b, ..., m) juntamente con el término independiente (n), una vez calculada, proporcionan la ecuación de regresión que ya no será una recta sino un plano o un hiperplano.

Un cálculo convencional requiere la utilización del álgebra y espacios mediante rectas y matrices en el que no vamos a entrar, porque los programas automáticos de ordenador los resuelven con rapidez y sencillez.

2.3.2.5 Test de transformación “Z” de Fisher

Se pretende contrastar la hipótesis nula que consiste en afirmar que no existen diferencias entre dos coeficientes de correlación r_1 , r_2 y r_3 , r_4 de las poblaciones (NA) y (NB).

$$H_0 \equiv r_{1,2} = r_{3,4}$$

El primer paso consiste en transformar cada coeficiente en el estadístico *Z de Fisher*, para lo que se utiliza la siguiente expresión:

$$Z = \frac{1}{2} \{ \ln(1+r) - \ln(1-r) \}$$

Posteriormente se calculará el error típico de la diferencia de *z*, el cual será estimado mediante la siguiente expresión:

$$S_{DZ} = A (S_{x1}^2 + S_{x2}^2) = \sqrt{\frac{1}{(N_A - 3)^2} + \frac{1}{(N_A - 3)^2}}$$

Procediéndose finalmente a realizar el contraste de significación entre los dos valores de *z*, el cual se obtendrá tras calcular:

$$Z = \frac{Z_1 - Z_2}{S_{DZ}}$$

Si existe una diferencia significativa entre los dos estadísticos Z_1 y Z_2 , se puede deducir que también la hay entre los coeficientes de correlación de las poblaciones.

2.4 MÉTODO BIBLIOMÉTRICO

2.4.1 INVESTIGACIÓN DOCUMENTAL

El objetivo central de este capítulo se concreta en la búsqueda, en las fuentes de documentación, de las referencias bibliográficas correspondientes al tema de trabajo.

El sistema utilizado pasa por la elaboración de las palabras clave del proyecto: “*glándula pineal, melatonina, sufrimiento fetal agudo, radicales libres*”

De acuerdo con Blanchard R., los pasos seguidos en la investigación documental fueron los siguientes:

a) *Determinación genérica del área a investigar*: se llevó a cabo una primera consulta en las enciclopedias, diccionarios, tratados, manuales y textos en la parte referente a las materias que en un principio motivaron el tema de la tesis.

b) *Inicio de la formación bibliográfica*: el proceso de consulta se va completando con la toma de notas y referencias que finalmente constituirán la bibliografía de la tesis.

c) *Considerar la actualidad e interés del tema objeto de la investigación*: para lo cual se seleccionarán, del material documental encontrado, las líneas de los autores que más próximamente investigan, considerando el estado actual de la línea de investigación, el interés social y sus posibilidades de desarrollo.

d) Superando el punto anterior y en la nueva línea, establecimos unos *objetivos concretos* como hipótesis del trabajo que desarrollaríamos.

e) Consulta de las *fuentes documentales* en relación a los objetivos concretos elegidos, determinando las fuentes primarias en: literatura organizada (monografías y tratados), y no organizada (revistas, etc) en las que encontramos la información necesaria. Fueron revisados los siguientes repertorios médicos:

- Index Medicus – MEDLINE: <http://www.nlm.nih.gov/>;
<http://www.pubmed.gov/>
- Current Content: <http://portal.isiknowledge.com/>
- Excerpta Médica: www.excerptamedica.com/
- Índice Médico Español: <http://bddoc.csic.es:8080/index.jsp> .

f) Posteriormente, se consultaron los catálogos y ficheros de los Centros de Documentación existentes en Granada, utilizando para ello la lista formada previamente de los ficheros y palabras clave según se ha indicado. Realizando una *investigación* referente al *material “no organizado”*, artículos de revistas, conferencias, informes y boletines.

2.4.2 EMPLEO DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Tras la reunión de Enero de 1978, el grupo de Vancouver ha pasado a convertirse en el *Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas*. Son ya más de 150 las revistas que han acordado que los trabajos se remitan con las normas según el estilo “Vancouver” que textualmente en el capítulo de Referencias Bibliográficas dice así:

“Las referencias bibliográficas se han de numerar siguiendo el orden en que son mencionadas por primera vez en el texto. Señalar las citas en el texto, las tablas y los pies de las figuras por medio de

numeración árabe (entre paréntesis). Las referencias que son citadas sólo en las tablas o en los pies de las figuras se numerarán de acuerdo con el orden que es correspondiente al referido en el texto por primera vez a la tabla o las figuras”.

Utilizar el modo de citar en el que se basa la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos empleada en el *Index Medicus*.

Los títulos de las revistas han de abreviarse según el estilo empleado en el *Index Medicus* para lo cual se consultó el *List of Journal Indexed* que aparece cada año en el número de Enero en el *Index Medicus*.

Así mismo, el resto de las recomendaciones en la confección de tablas y ficheros fueron tomadas en consideración para la elaboración del proyecto de Tesis Doctoral, de los cuales queremos destacar el siguiente texto: “Las figuras deberán ser de calidad profesional, tanto los dibujos como las reproducciones fotográficas, considerándose inaceptable marcarlas con letras hechas a mano o con máquina de escribir”.

IV.- RESULTADOS

1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Tabla 14. Descripción estadística de la variable **melatonina (aMT)** (pg/ml) en neonatos al ingreso, 3^{er} día, 7^o día y cordón.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día	Cordón
Media (DS)	81,54 (11,28)	79,98 (6,00)	89,35 (13,44)	87,30 (4,35)
Intervalo confianza 95%	58,44-104,64	67,61-92,35	61,31-117,39	78,59-96,01
Media recortada al 5%	73,54	77,83	82,51	85,14
Mediana	62,60	72,16	68,40	84,80
Varianza	3689,21	936,98	3793,74	1117,16
Desv. típ.	60,74	30,61	61,59	33,42
Mínimo	24,68	33,37	34,70	27,60
Máximo	307,99	164,80	268,80	218,39
Rango	283,31	131,43	234,10	190,79
Amplitud intercuartil	44,75	34,57	45,88	43,90
Asimetría	2,46	1,31	1,986	1,28
Curtosis	6,76	2,01	3,52	3,60

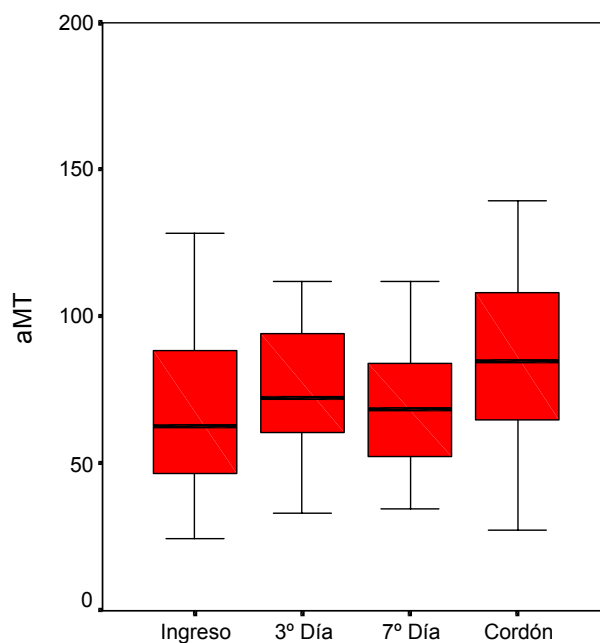


Tabla 15. Descripción estadística de la variable **leucocitos** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	14334,57(1892,79)	10113,23(1179,81)	13621,92(2075,95)
Intervalo confianza 95%	10487,95-18181,19	12522,73-7703,73	17897,43-9346,42
Media recortada al 5%	12935,48	9117,44	11880,98
Mediana	11840,00	8580,00	10970,00
Varianza	125393278,487	43150742,58	112048960,154
Desv. típ.	11197,914	6568,92	10585,318
Mínimo	3140	4590	5910
Máximo	52500	41470	60000
Rango	49360	36880	54090
Amplitud intercuartil	7950,00	4220,00	5512,50
Asimetría	2,207	3,90	3,675
Curtosis	4,773	18,02	15,575

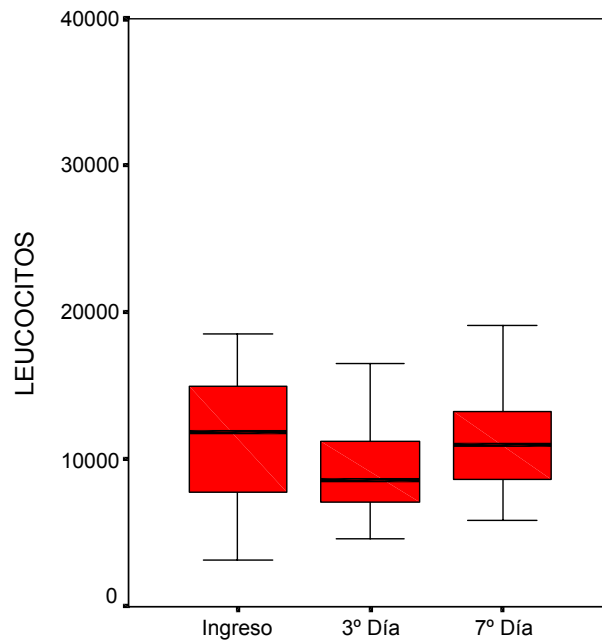


Tabla 16. Descripción estadística de la variable **polimorfonucleares (PMN)** en neonatos al ingreso, 3^{er} día y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	5246,00(1096,88)	4639,52(866,00)	3390,15(588,65)
Intervalo de confianza 95%	7475,13-3016,87	6408,12-2870,91	4602,50-2177,81
Media recortada al 5%	4239,68	3949,50	2993,76
Mediana	3210,00	3600,00	2960,00
Varianza	42110236,471	23248637,258	9009217,575
Desv. típ.	6489,240	4821,684	3001,536
Mínimo	240	200	210
Máximo	29000	26955	15648
Rango	28760	26755	15438
Amplitud intercuartil	4960,00	2090,00	2285,00
Asimetría	2,748	3,568	2,909
Curtosis	8,047	15,614	11,041

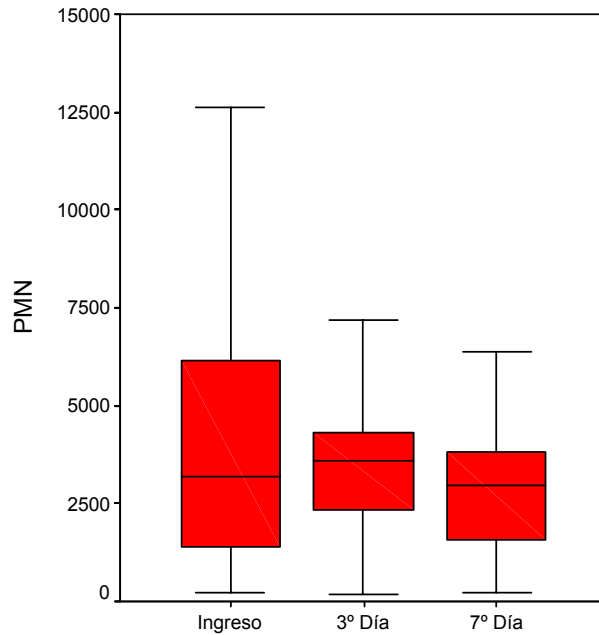


Tabla 17. Descripción estadística de la variable **hematocrito (%)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	54,35(1,22)	49,06(1,16)	41,81(1,17)
Intervalo de confianza 95%	56,83-51,86	51,42-46,70	44,223-39,400
Media recortada al 5%	54,82	48,855	41,72
Mediana	55,10	49,900	42,10
Varianza	52,41	41,536	35,63
Desv. típ.	7,24	6,4449	5,97
Mínimo	31,5	38,0	30,4
Máximo	65,5	65,5	54,9
Rango	34,0	27,5	24,5
Amplitud intercuartil	8,10	8,400	8,77
Asimetría	-1,00	,408	,18
Curtosis	1,71	,502	-,21

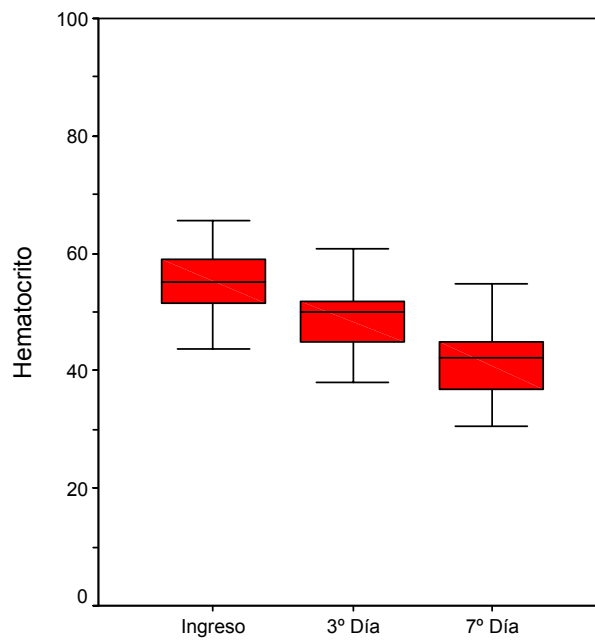


Tabla 18. Descripción estadística de la variable **hemoglobina (g/dl)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	17,25(,40)	17,36(1,12)	13,96(,43)
Intervalo de confianza 95%	18,07-16,43	19,64-15,08	14,84-13,08
Media recortada al 5%	17,37	16,48	13,95
Mediana	17,30	16,20	13,75
Varianza	5,68	38,66	4,73
Desv. típ.	2,38	6,22	2,17
Mínimo	10,1	11,3	10,1
Máximo	21,3	48,6	17,8
Rango	11,2	37,3	7,7
Amplitud intercuartil	3,00	3,20	3,62
Asimetría	-,74	4,46	,31
Curtosis	1,28	22,70	-,81

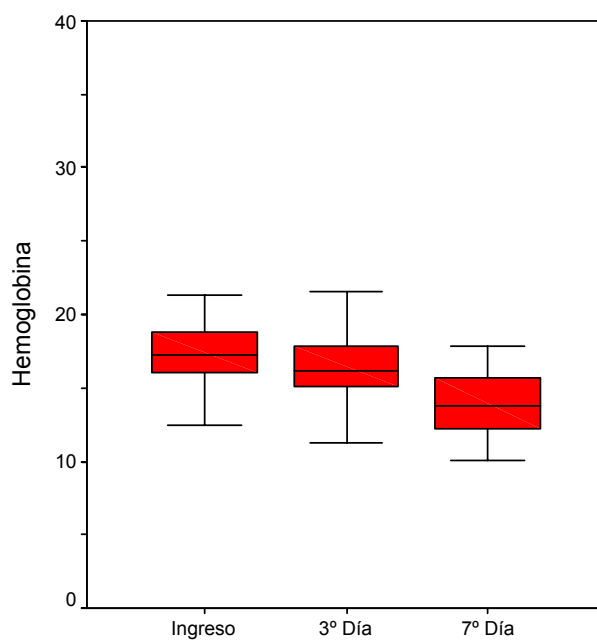


Tabla 19. Descripción estadística de la variable **plaquetas** ($*10^3/\text{mcl}$) en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	256671,43(15871,50)	294303,23(23050,27)	392192,31(28783,17)
Intervalo de confianza 95%	288926,20-224416,65	341378,15-247228,30	451472,35-332912,26
Media recortada al 5%	254603,17	290362,01	393290,60
Mediana	254000,00	265000,00	394000,00
Varianza	8816660924,37	16470756989,25	21540241538,46
Dev. típ.	93897,08	128338,45	146765,94
Mínimo	27500	68000	80000
Máximo	507000	577000	704000
Rango	479500	509000	624000
Amplitud intercuartil	114000,00	140000,00	196250,00
Asimetría	,46	,79	-,21
Curtosis	1,22	,21	-,06

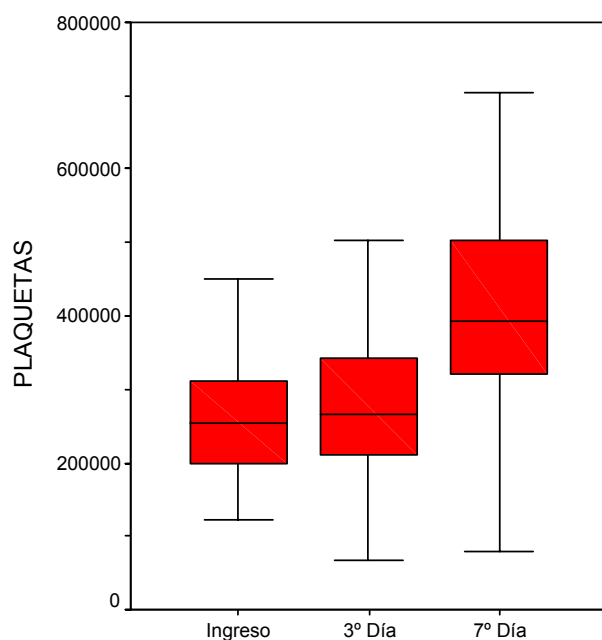


Tabla 20. Descripción estadística de la variable **sodio (mEq/l)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	135,97(,52)	137,48(,79)	136,44(1,13)
Intervalo de confianza 95%	137,02-134,92	139,09-135,88	138,76-134,13
Media recortada al 5%	136,10	137,47	136,96
Mediana	136,00	139,00	138,00
Varianza	9,32	19,19	34,26
Desv. típ.	3,05	4,38	5,85
Mínimo	127	129	115
Máximo	141	147	146
Rango	14	18	31
Amplitud intercuartil	4,00	4,00	6,00
Asimetría	-,62	-,37	-1,91
Curtosis	,92	,16	6,10

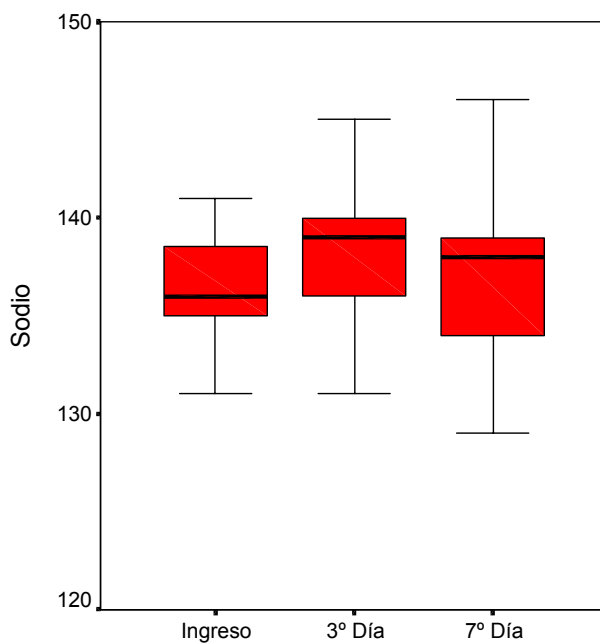


Tabla 21. Descripción estadística de la variable **potasio (mEq/l)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	5,05(,14)	4,77(,15)	4,68(,13)
Intervalo de confianza 95%	5,33-4,760	5,08-4,45	4,95-4,41
Media recortada al 5%	5,03	4,76	4,69
Mediana	4,90	4,60	4,60
Varianza	,69	,75	,46
Desv. típ.	,83	,86	,68
Mínimo	3,7	3,0	3,2
Máximo	6,7	7,0	6,0
Rango	3,0	4,0	2,8
Amplitud intercuartil	,90	1,100	1,00
Asimetría	,63	,371	-,18
Curtosis	-,26	,488	-,39

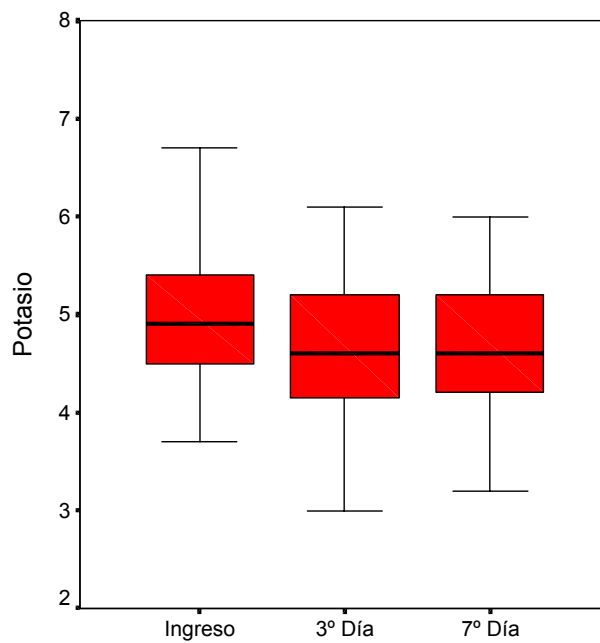


Tabla 22. Descripción estadística de la variable **calcio (mg/dl)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	11,68(2,39)	9,25(,14)	9,738(,17)
Intervalo de confianza 95%	16,55-6,81	9,53-8,97	10,08-9,394
Media recortada al 5%	9,33	9,23	9,70
Mediana	9,20	9,20	9,70
Varianza	200,73	,58	,76
Desv. tip.	14,17	,76	,87
Mínimo	7,7	7,9	8,3
Máximo	93,0	11,0	12,0
Rango	85,3	3,1	3,7
Amplitud intercuartil	,80	1,00	,90
Asimetría	5,89	,40	,82
Curtosis	34,80	-,10	,65

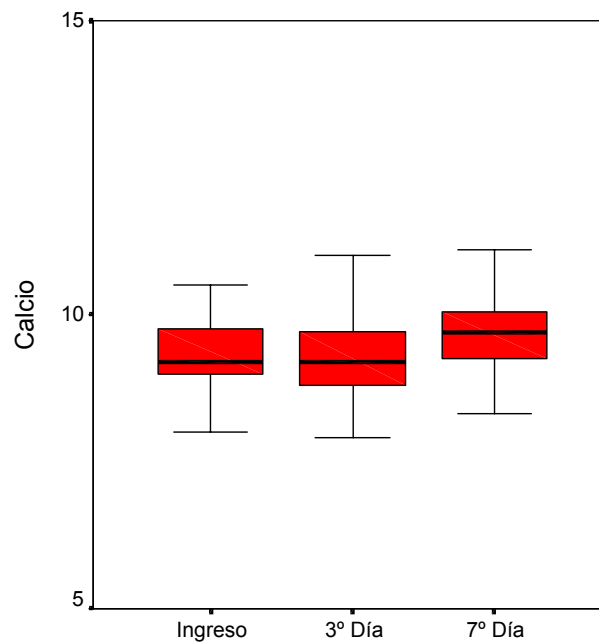


Tabla 23. Descripción estadística de la variable **urea (mg/dl)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	25,49(1,42)	29,00(2,17)	25,30(2,71)
Intervalo de confianza 95%	28,38-22,59	33,44-24,56	30,86-19,73
Media recortada al 5%	25,43	28,59	24,42
Mediana	26,00	28,00	23,00
Varianza	70,96	146,27	197,83
Desv. típ.	8,42	12,09	14,06
Mínimo	11	10	6
Máximo	41	54	62
Rango	30	44	56
Amplitud intercuartil	11,00	16,00	21,00
Asimetría	-,08	,69	,86
Curtosis	-,78	-,30	,79

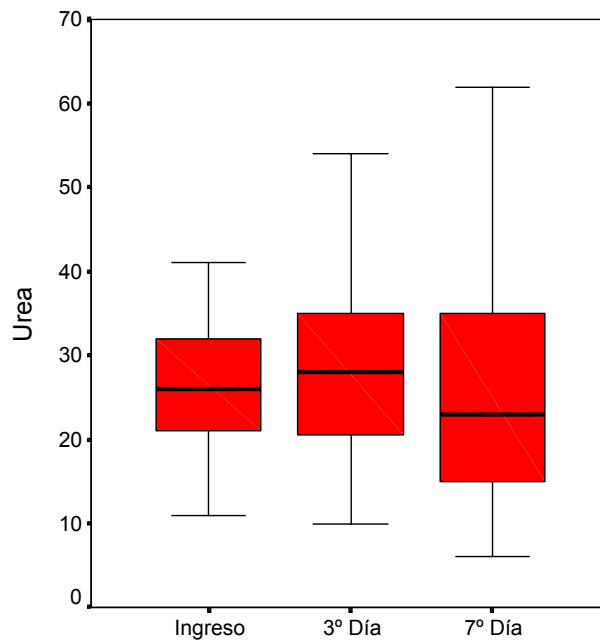


Tabla 24. Descripción estadística de la variable **creatinina (mg/dl)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	,76(,031)	,76(,029)	,67(,035)
Intervalo de confianza 95%	,82-,69	,82-,70	,75-,60
Media recortada al 5%	,75	,75	,675
Mediana	,80	,80	,60
Varianza	,03	,03	,033
Desv. típ.	,18	,16	,18
Mínimo	,40	,60	,30
Máximo	1,40	1,30	1,00
Rango	1,00	,70	,70
Amplitud intercuartil	,30	,30	,20
Asimetría	,94	1,11	,25
Curtosis	3,65	2,11	-,11

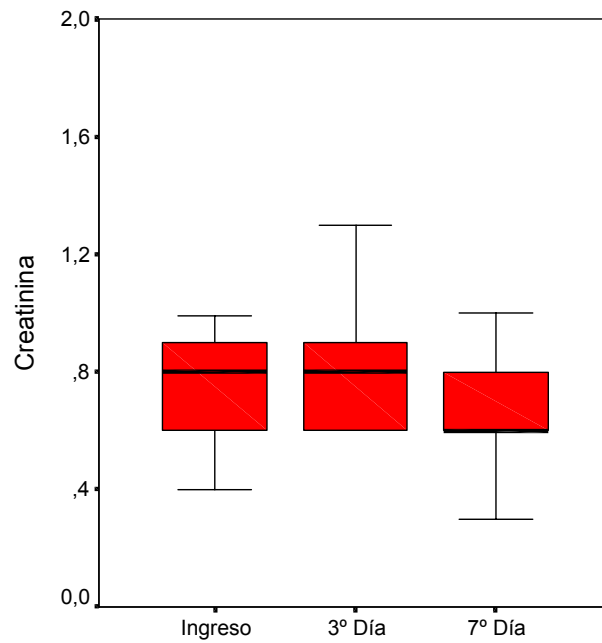


Tabla 25. Descripción estadística de la variable **glucosa (mg/dl)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	54,00(6,95)	81,84(3,85)	95,74(3,62)
Intervalo de confianza 95%	68,13-39,87	89,70-73,98	103,19-88,29
Media recortada al 5%	50,25	82,92	95,13
Mediana	45,00	82,00	96,00
Varianza	1640,42	459,01	354,51
Desv. típ.	40,50	21,42	18,83
Mínimo	0	9	63
Máximo	175	121	138
Rango	175	112	75
Amplitud intercuartil	42,75	23,00	30,00
Asimetría	1,52	-,88	,52
Curtosis	2,26	3,65	,17

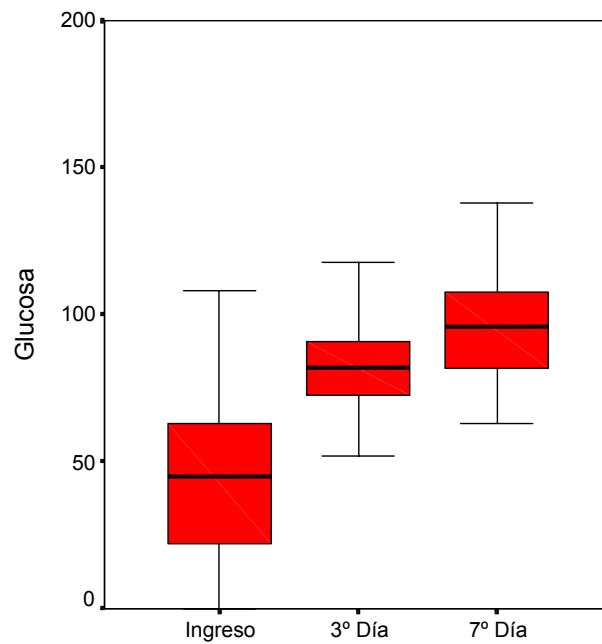


Tabla 26. Descripción estadística de la variable **proteína C reactiva (PCR) (mg/dl)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	,3612(.17)	,6758(.16916)	,8770(.27843)
Intervalo confianza 95%	,7019-,0204	1,0213-,3303	1,4494-,3047
Media recortada al 5%	,1680	,5211	,6236
Mediana	,1300	,4200	,5600
Varianza	,954	,887	2,093
Desv. típ.	,97664	,94184	1,44675
Mínimo	,00	,00	,00
Máximo	4,27	5,20	7,70
Rango	4,27	5,20	7,70
Amplitud intercuartil	,2000	,4100	,5600
Asimetría	3,847	4,039	4,350
Curtosis	13,851	18,689	20,666

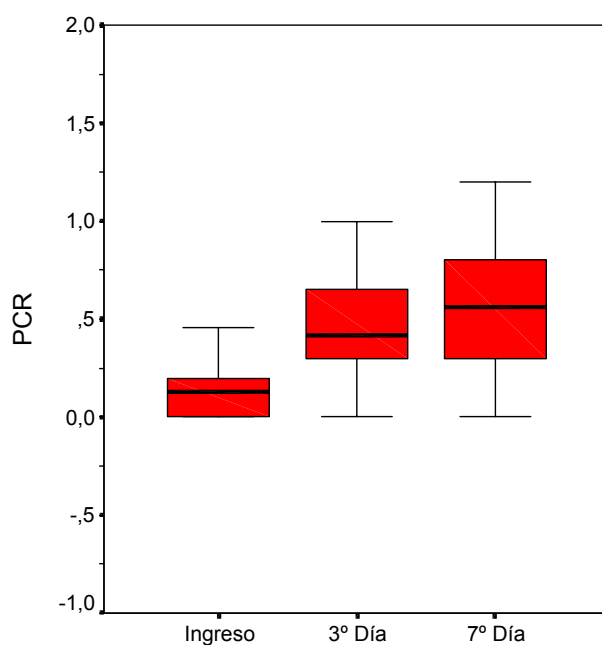


Tabla 27. Descripción estadística de la variable **frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	54,17(3,47)	51,68(2,37)	55,57(4,02)
Intervalo confianza 95%	61,23-47,11	56,51-46,85	63,83-47,32
Media recortada al 5%	51,45	51,77	52,63
Mediana	49,00	50,00	53,50
Varianza	422,62	173,49	453,22
Desv. típ.	20,56	13,17	21,29
Mínimo	32	18	32
Máximo	154	78	150
Rango	122	60	118
Amplitud intercuartil	15,00	17,00	15,75
Asimetría	3,578	,03	3,41
Curtosis	16,59	,46	14,81

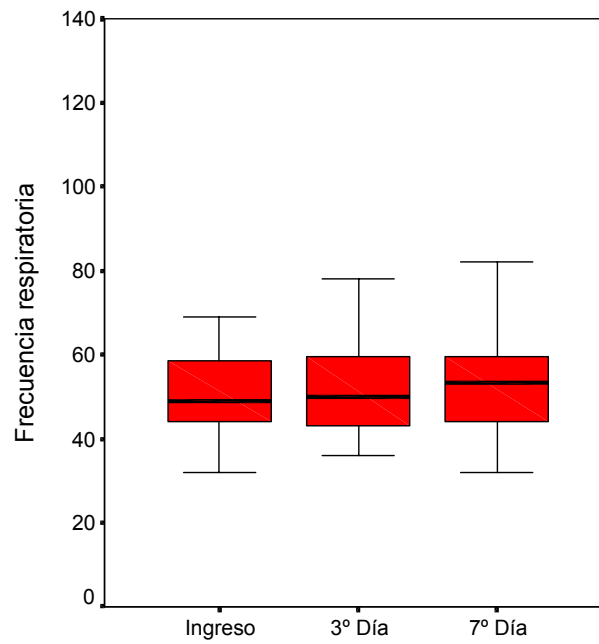


Tabla 28. Descripción estadística de la variable **frecuencia cardiaca (latidos por minuto)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	138,17(3,67)	149,87(2,72)	145,25(4,71)
Intervalo confianza 95%	145,62-130,72	155,42-144,32	154,92-135,58
Media recortada al 5%	139,74	150,35	147,07
Mediana	141,00	152,00	143,50
Varianza	470,73	229,05	621,90
Desv. típ.	21,70	15,13	24,94
Mínimo	42	110	52
Máximo	180	175	188
Rango	138	65	136
Amplitud intercuartil	15,00	19,00	16,00
Asimetría	-2,39	-,37	-1,65
Curtosis	11,09	,13	6,67

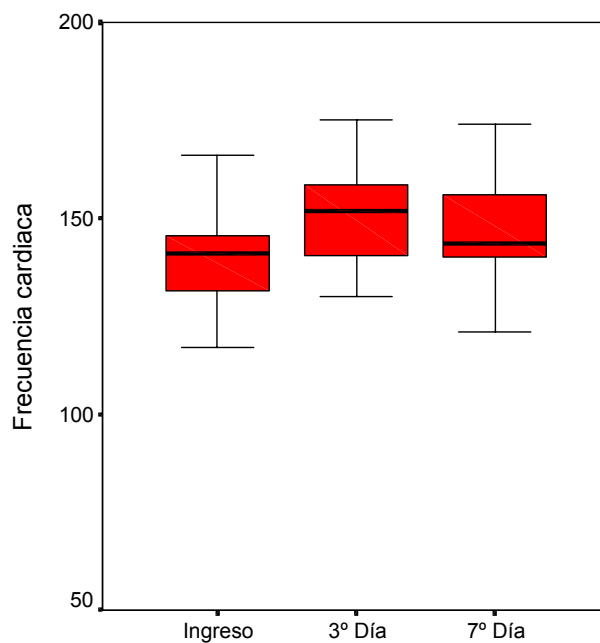


Tabla 29. Descripción estadística de la variable **tensión arterial sistólica (mmHg)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	62,31(2,41)	65,87(1,65)	64,14(2,69)
Intervalo confianza 95%	67,22-57,41	69,24-62,50	69,65-58,63
Media recortada al 5%	61,60	65,68	64,81
Mediana	60,00	64,00	64,50
Varianza	204,10	84,58	202,05
Desv. típ.	14,29	9,20	14,21
Mínimo	40	47	25
Máximo	97	91	87
Rango	57	44	62
Amplitud intercuartil	18,00	9,00	17,75
Asimetría	,82	,55	-,73
Curtosis	,44	1,29	,79

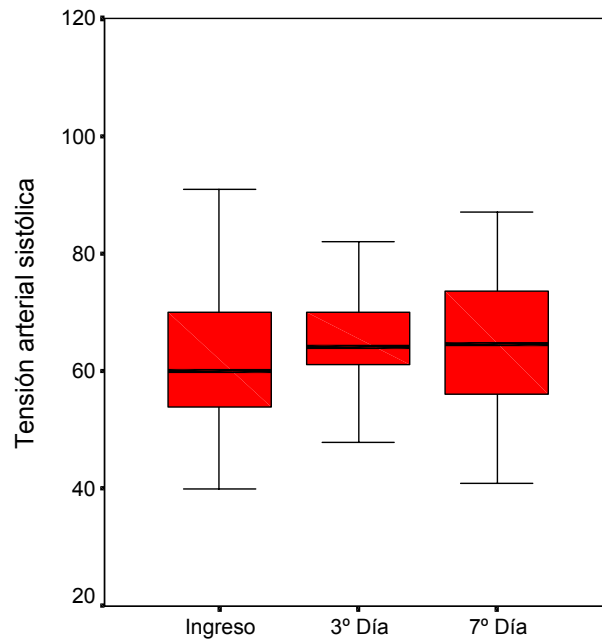


Tabla 30. Descripción estadística de la variable **tensión arterial media (mmHg)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	41,03(1,93)	45,32(1,56)	45,41(2,31)
Intervalo confianza 95%	44,95-37,10	48,52-42,13	50,15-40,66
Media recortada al 5%	40,94	45,08	45,45
Mediana	41,00	44,00	43,00
Varianza	130,50	75,96	143,87
Desv. típ.	11,42	8,71	11,99
Mínimo	22	31	24
Máximo	60	64	65
Rango	38	33	41
Amplitud intercuartil	21,00	14,00	19,00
Asimetría	,07	,32	-,015
Curtosis	-1,07	-,79	-1,03

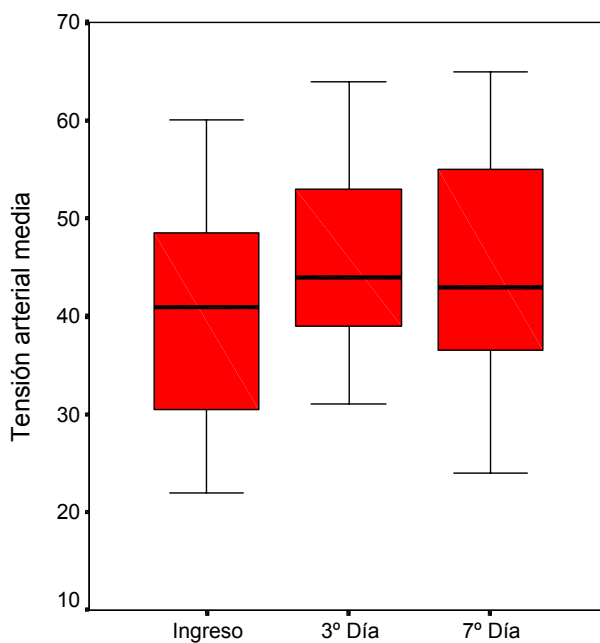


Tabla 31. Descripción estadística de la variable **fracción de oxígeno en el gas inspirado (FiO₂)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	,34(.03)	,27(.02)	,23(.01)
Intervalo confianza 95%	,39-.29	,31-.23	,25-.21
Media recortada al 5%	,32	,26	,22
Mediana	,30	,21	,21
Varianza	,02	,01	,00
Desv. típ.	,16	,11	,059
Mínimo	,21	,20	,20
Máximo	,80	,60	,50
Rango	,59	,40	,30
Amplitud intercuartil	,19	,09	,00
Asimetría	1,41	2,02	3,90
Curtosis	1,99	3,25	17,04

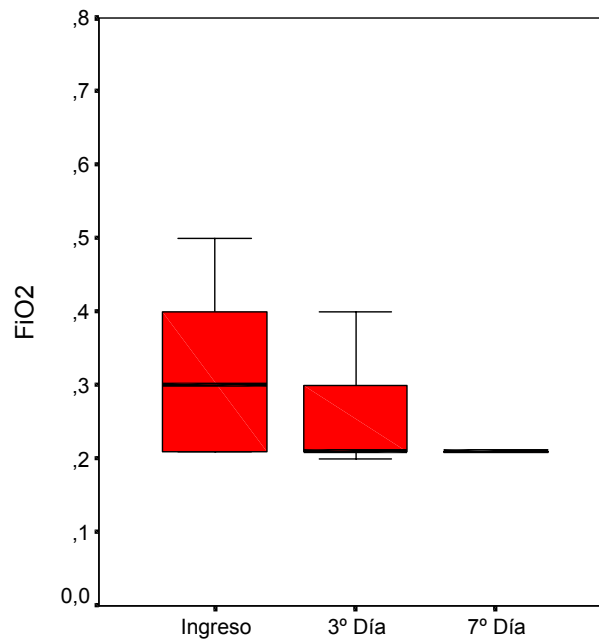


Tabla 32. Descripción estadística de la variable **saturación parcial de oxígeno (Sat. O₂)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	94,76(1,33)	92,85(2,88)	93,83(1,16)
Intervalo confianza 95%	97,54-91,99	98,82-86,89	96,20-91,45
Media recortada al 5%	95,29	95,47	94,44
Mediana	97,00	96,00	96,00
Varianza	39,22	199,38	39,00
Desv. típ.	6,26	14,12	6,24
Mínimo	80	30	76
Máximo	100	100	100
Rango	20	70	24
Amplitud intercuartil	5,50	3,75	7,00
Asimetría	-1,46	-4,18	-1,59
Curtosis	,94	18,79	2,04

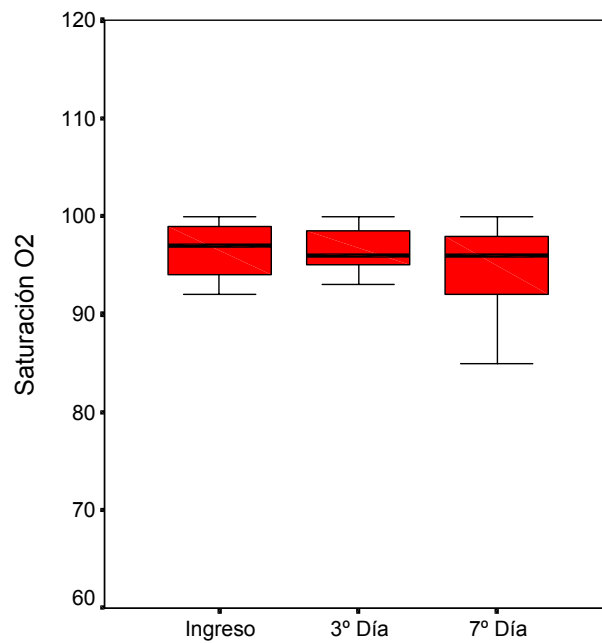


Tabla 33. Descripción estadística de la variable **presión parcial de oxígeno (pO₂)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	63,70(6,62)	41,29(1,67)	41,10(1,65)
Intervalo confianza 95%	77,16-50,24	44,70-37,88	44,49-37,71
Media recortada al 5%	58,60	41,36	41,36
Mediana	50,10	41,65	40,90
Varianza	1488,54	83,56	76,62
Desv. típ.	38,58	9,14	8,75
Mínimo	26,2	20,0	20,5
Máximo	221,3	61,7	58,2
Rango	195,1	41,7	37,7
Amplitud intercuartil	36,15	10,90	10,77
Asimetría	2,52	-,31	-,64
Curtosis	7,85	,24	,38

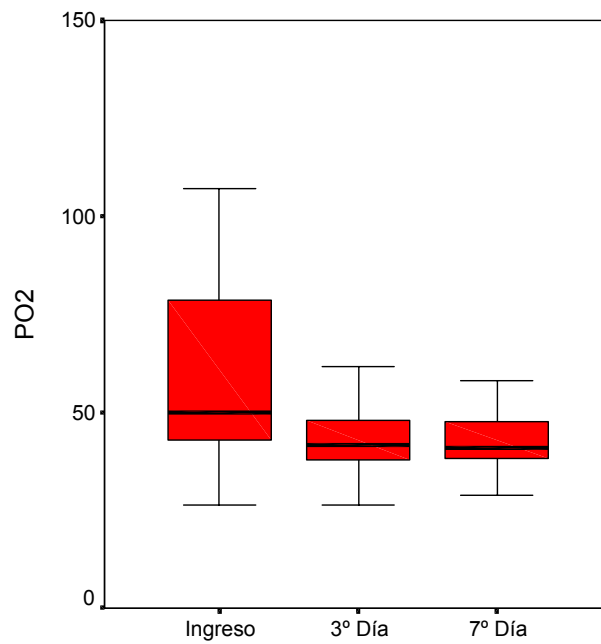


Tabla 34. Descripción estadística de la variable **presión parcial de dióxido de carbono (pCO₂)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	49,85(2,78)	44,64(1,57)	45,88(1,56)
Intervalo confianza 95%	55,51-44,19	47,85-41,43	49,08-42,69
Media recortada al 5%	49,40	44,75	45,50
Mediana	46,50	44,70	46,10
Varianza	271,40	76,52	67,91
Desv. típ.	16,47	8,75	8,24
Mínimo	25,3	28,2	28,9
Máximo	82,0	58,6	72,5
Rango	56,7	30,4	43,6
Amplitud intercuartil	29,20	12,50	11,45
Asimetría	,40	-,019	,95
Curtosis	-1,01	-,95	2,95

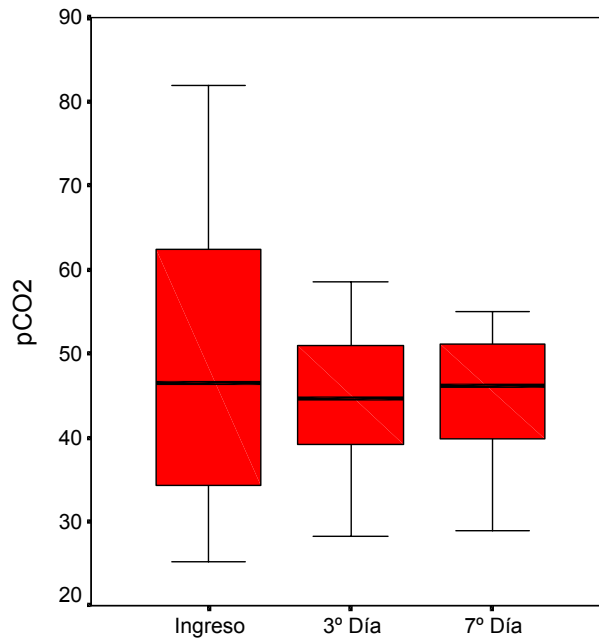


Tabla 35. Descripción estadística de la variable **pH** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	7,30(.02)	7,34 (.014)	7,36(.01)
Intervalo confianza 95%	7,34-7,25	7,37-7,32	7,38-7,35
Media recortada al 5%	7,30	7,35	7,36
Mediana	7,32	7,34	7,36
Varianza	,02	,01	,00
Desv. típ.	,13	,076	,05
Mínimo	6,91	7,10	7,29
Máximo	7,55	7,50	7,46
Rango	,64	,40	,17
Amplitud intercuartil	,17	,08	,08
Asimetría	-,82	-,75	,14
Curtosis	1,17	2,77	-,75

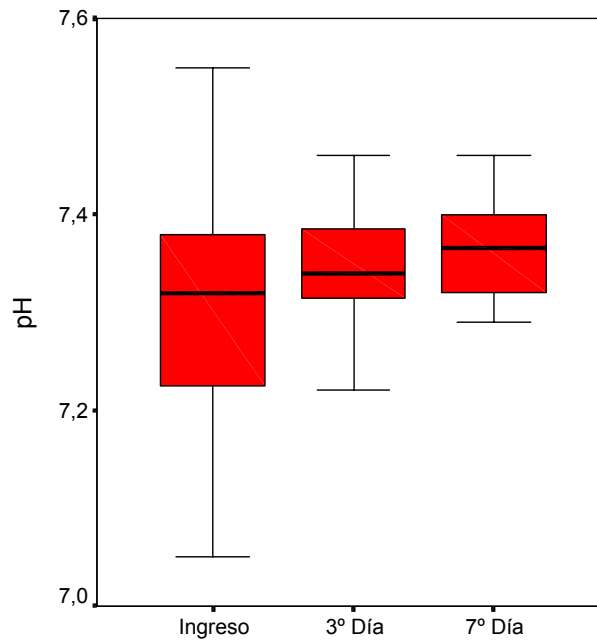


Tabla 36. Descripción estadística de la variable **bicarbonato** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	23,92(,62)	24,92(,87)	26,28(,96)
Intervalo confianza 95%	25,17-22,66	26,71-23,14	28,25-24,31
Media recortada al 5%	23,97	25,09	26,10
Mediana	24,00	26,00	26,65
Varianza	13,36	23,72	25,78
Desv. típ.	3,65	4,87	5,08
Mínimo	16,00	13,60	17,20
Máximo	31,00	33,00	41,00
Rango	15,00	19,40	23,80
Amplitud intercuartil	5,60	7,10	7,50
Asimetría	-,23	-,649	,42
Curtosis	-,65	-,294	1,46

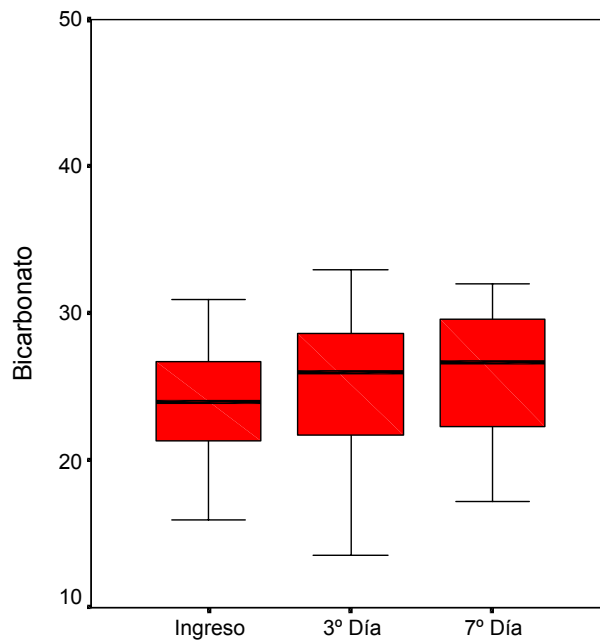
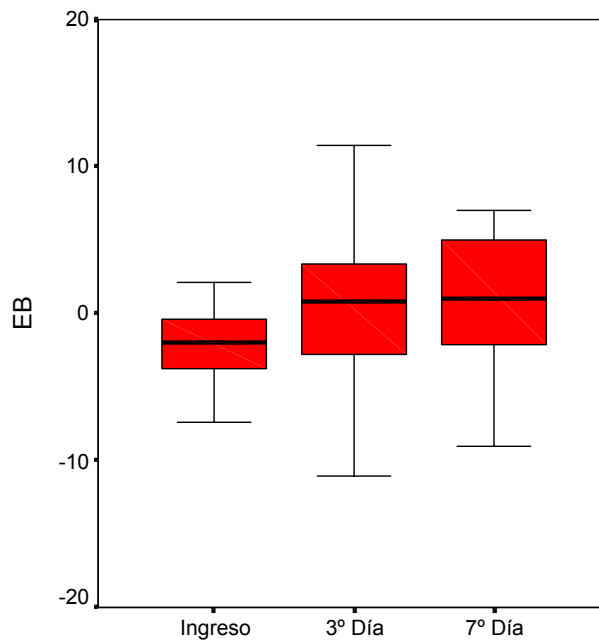


Tabla 37. Descripción estadística de la variable **exceso de bases (EB)** en neonatos al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	-2,20(,80)	-,12(,97)	1,057(1,01)
Intervalo confianza 95%	-,58-3,82	1,86--2,09	3,13--1,01
Media recortada al 5%	-2,18	,06	,93
Mediana	-2,00	,80	1,05
Varianza	22,18	28,99	28,49
Desv. típ.	4,71	5,38	5,34
Mínimo	-16,5	-14,0	-9,0
Máximo	11,4	11,4	15,8
Rango	27,9	25,4	24,8
Amplitud intercuartil	3,70	7,50	7,27
Asimetría	-,10	-,72	,33
Curtosis	2,97	,70	1,04



2. DESCRIPTIVO HIPÓTESIS B

Tabla 38. Descripción estadística de la **melatonina (aMT) (pg/ml)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	63,17(6,21)	71,38(6,80)	79,30(16,13)
Intervalo confianza 95%	76,40-49,93	85,80-56,97	114,15-44,46
Media recortada al 5%	61,36	68,89	71,25
Mediana	61,00	66,47	67,43
Varianza	617,18	785,64	3642,27
Desv. típ.	24,843	28,030	60,35
Mínimo	30,46	33,37	34,70
Máximo	128,40	154,36	268,80
Rango	97,94	120,99	234,10
Amplitud intercuartil	18,24	20,15	29,86
Asimetría	1,65	1,78	2,75
Curtosis	2,98	4,23	8,27

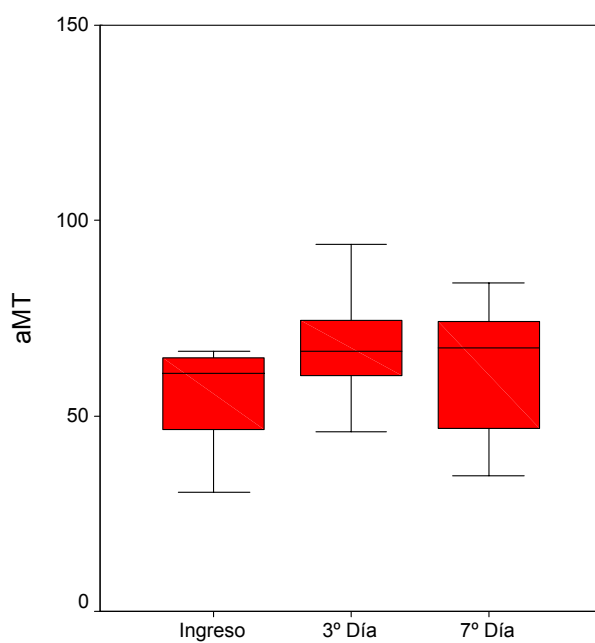


Tabla 39. Descripción estadística de la variable **melatonina (pg/ml)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	104,16(22,92)	96,21(30,05)	109,45(24,05)
Intervalo confianza 95%	154,11-54,21	154,11-73,11	168,29-50,61
Media recortada al 5%	97,25	94,45	105,45
Mediana	84,40	94,40	78,74
Varianza	6832,17	903,29	4047,43
Desv. típ.	82,66	30,05	63,62
Mínimo	24,68	59,41	59,41
Máximo	307,99	164,80	231,42
Rango	283,31	105,39	172,01
Amplitud intercuartil	94,59	28,80	89,49
Asimetría	1,560	1,53	1,43
Curtosis	2,045	3,44	1,45

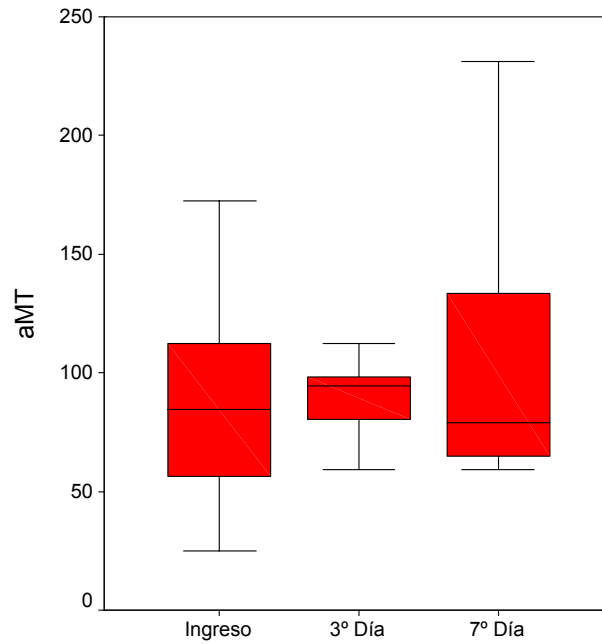


Tabla 40. Descripción estadística de la variable **leucocitos** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	10925,56(1724,41)	10435,56(1954,89)	11775,56(1246,02)
Intervalo confianza 95%	14563,74-7287,37	14560,01-6311,10	14404,43-9146,68
Media recortada al 5%	9923,40	9036,17	11211,73
Mediana	9000,00	8165,00	10760,00
Varianza	53524673,20	68788720,26	27946226,14
Desv. típ.	7316,06	8293,90	5286,42
Mínimo	3140	4590	5910
Máximo	36750	41470	27790
Rango	33610	36880	21880
Amplitud intercuartil	5847,50	4627,50	5162,50
Asimetría	2,76	3,42	1,78
Curtosis	9,62	12,90	4,14

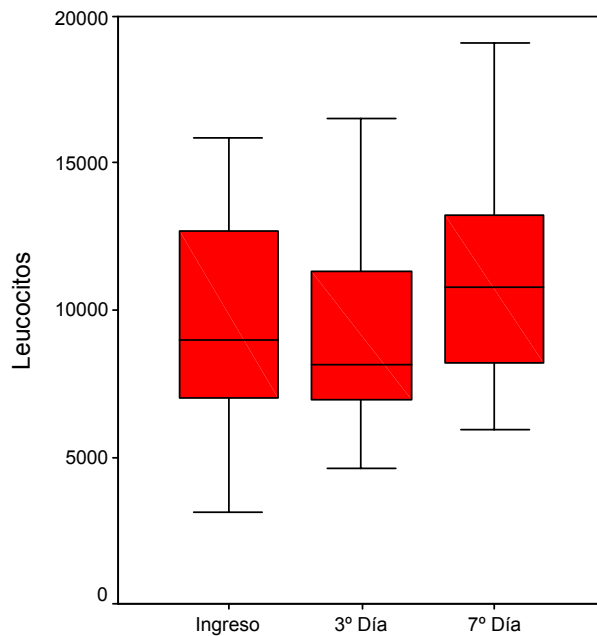


Tabla 41. Descripción estadística de la variable **leucocitos** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	17944,12(3278,03)	9666,92(879,45)	17776,25(6162,54)
Intervalo confianza 95%	24893,24-10995,00	11583,07-7750,77	32348,35-3204,15
Media recortada al 5%	16672,91	9352,69	16040,83
Mediana	12760,00	8580,00	11015,00
Varianza	182673563,23	10054539,74	303815341,07
Desv. típ.	13515,68	3170,89	17430,30
Mínimo	6270	6690	6790
Máximo	52500	18300	60000
Rango	46230	11610	53210
Amplitud intercuartil	13435,00	3890,00	7557,50
Asimetría	1,74	1,85	2,60
Curtosis	2,37	4,04	7,01

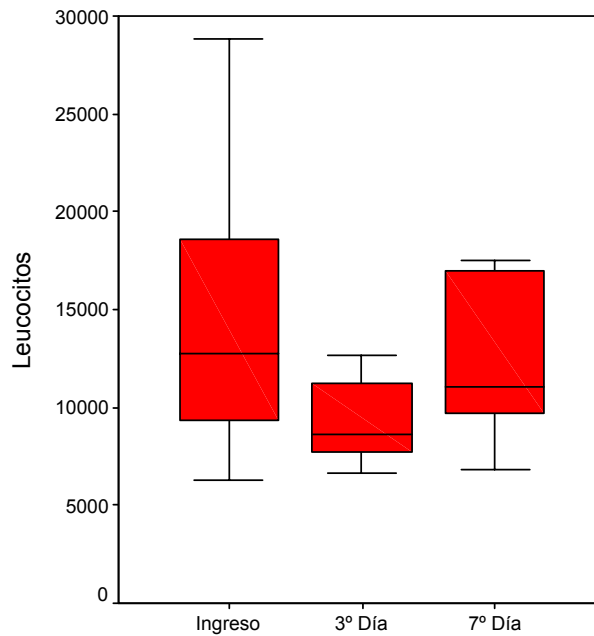


Tabla 42. Descripción estadística de la variable **polimorfonucleares** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	2651,67(555,1)	4818,61(1447,76)	3493,00(796,09)
Intervalo confianza 95%	3822,82-1480,52	7873,11-1764,11	5172,60-1813,40
Media recortada al 5%	2431,30	3845,40	3000,11
Mediana	2370,00	2650,00	3020,00
Varianza	5546367,65	37728093,55	11407563,41
Desv. típ.	2355,07	6142,320	3377,51
Mínimo	240	200	210
Máximo	9030	26955	15648
Rango	8790	26755	15438
Amplitud intercuartil	2805,00	2597,50	2270,00
Asimetría	1,49	3,10	2,97
Curtosis	2,31	10,69	10,63

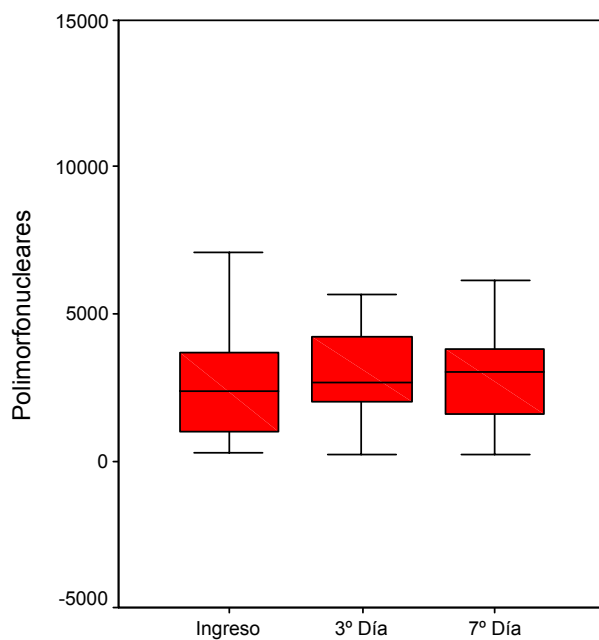


Tabla 43. Descripción estadística de la variable **polimorfonucleares** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	7992,94(2000,03)	4391,54(592,17)	3158,75(740,21)
Intervalo confianza 95%	12232,82-3753,07	5681,7-3101,30	4909,07-1408,43
Media recortada al 5%	7253,82	4370,04	3087,50
Mediana	5640,00	3910,00	2525,00
Varianza	68002059,56	4558730,77	4383298,21
Desv. típ.	8246,34	2135,12	2093,63
Mínimo	290	820	1220
Máximo	29000	8350	6380
Rango	28710	7530	5160
Amplitud intercuartil	6075,00	2580,00	4000,00
Asimetría	1,96	,67	,99
Curtosis	3,20	,12	-,67

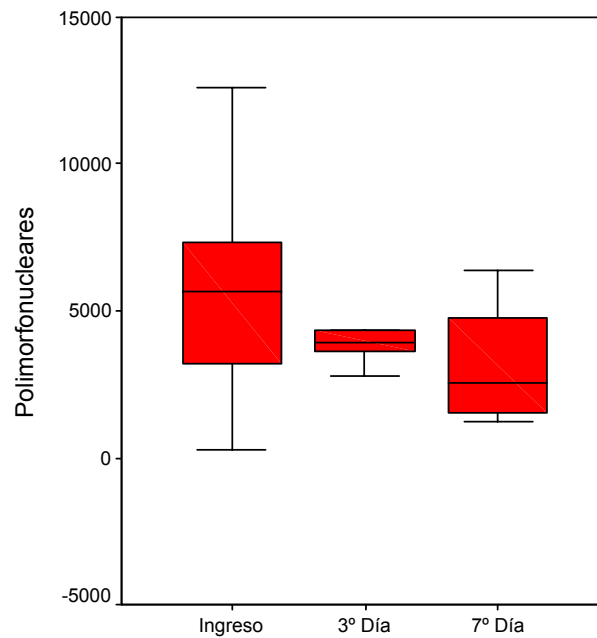


Tabla 44. Descripción estadística de la variable **hematocrito (%)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	55,55(1,55)	49,11(1,95)	40,76(1,59)
Intervalo confianza 95%	58,82-52,28	53,24-44,99	44,11-37,40
Media recortada al 5%	55,86	48,82	40,54
Mediana	55,00	49,80	40,30
Varianza	43,32	68,81	45,50
Desv. típ.	6,58	8,29	6,74
Mínimo	40,0	38,0	30,4
Máximo	65,5	65,5	54,9
Rango	25,5	27,5	24,5
Amplitud intercuartil	8,60	13,5	8,37
Asimetría	-,51	,350	,61
Curtosis	,42	-,77	-,26

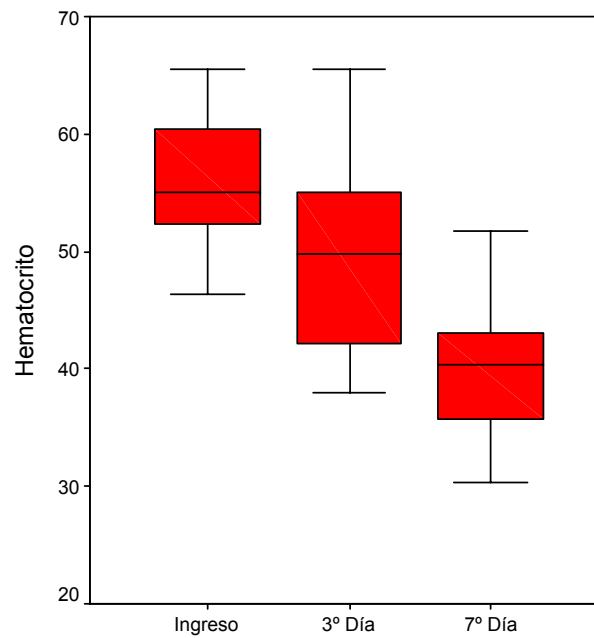


Tabla 45. Descripción estadística de la variable **hematocrito (%)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	53,07(1,91)	48,99(,70)	44,19(,96)
Intervalo confianza 95%	57,12-49,02	50,51-47,47	46,47-41,91
Media recortada al 5%	53,73	49,12	44,11
Mediana	55,10	49,90	43,85
Varianza	61,10	6,34	7,44
Desv. típ.	7,87	2,52	2,73
Mínimo	31,5	43,6	41,0
Máximo	62,7	52,1	48,7
Rango	31,2	8,5	7,7
Amplitud intercuartil	10,45	3,85	4,57
Asimetría	-1,29	-,70	,57
Curtosis	2,26	-,04	-,93

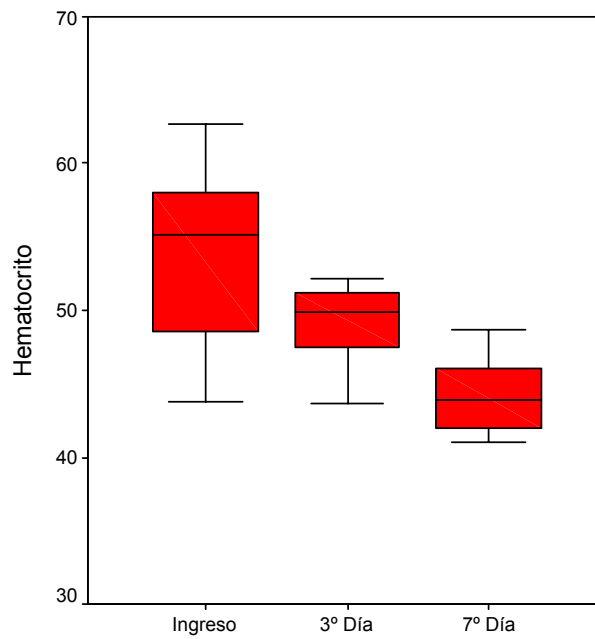


Tabla 46. Descripción estadística de la variable **hemoglobina (g/dl)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	17,74(,55)	18,32(1,90)	13,84(,53)
Intervalo confianza 95%	18,90-16,57	22,33-14,30	14,97-12,71
Media recortada al 5%	17,832	17,02	13,765
Mediana	17,700	16,90	13,050
Varianza	5,499	65,19	5,161
Desv. típ.	2,3450	8,07	2,2719
Mínimo	12,5	11,3	11,2
Máximo	21,3	48,6	17,8
Rango	8,8	37,3	6,6
Amplitud intercuartil	2,900	4,32	3,125
Asimetría	-,483	3,39	,735
Curtosis	,153	13,08	-,806

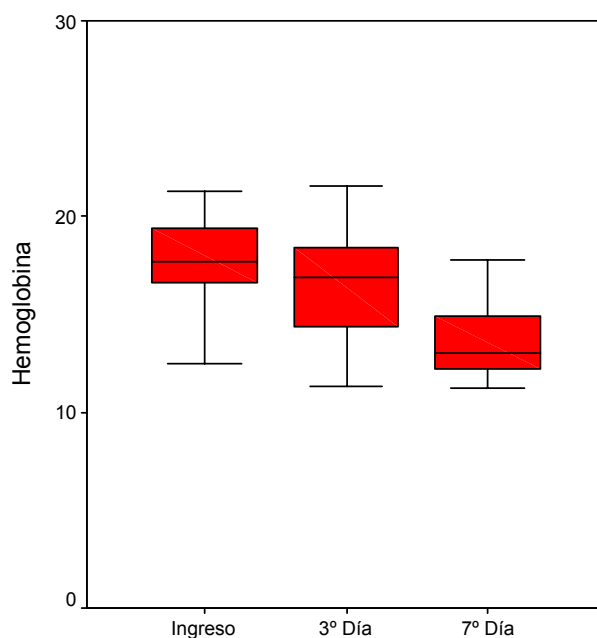


Tabla 47. Descripción estadística de la variable **hemoglobina (g/dl)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	16,74(,58)	16,05(,28)	14,24(,73)
Intervalo confianza 95%	17,97-15,51	16,66-15,43	15,95-12,52
Media recortada al 5%	16,90	16,03	14,34
Mediana	16,90	16,20	14,25
Varianza	5,69	1,05	4,22
Desv. típ.	2,39	1,02	2,05
Mínimo	10,1	14,4	10,1
Máximo	20,6	18,0	16,5
Rango	10,5	3,6	6,4
Amplitud intercuartil	2,85	1,80	2,70
Asimetría	-1,16	,09	-1,09
Curtosis	2,77	-,30	1,65

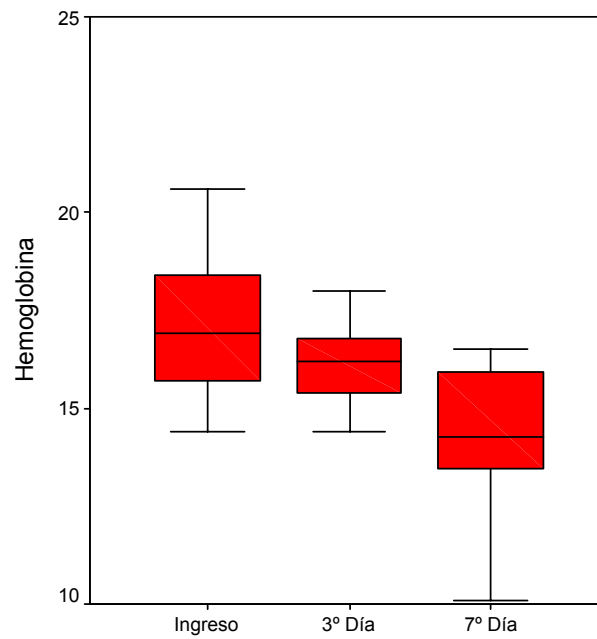


Tabla 48. Descripción estadística de la variable **plaquetas (*10³/mcl)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	260722,2(22703,09)	311222,2(33341,62)	407000(37874,40)
Intervalo confianza 95%	308621,55- 212822,90	381566,90- 240877,55	486908,01- 327091,99
Media recortada al 5%	254802,47	309969,14	408666,67
Mediana	237000,00	292500,00	433000,00
Varianza	9277741830,06	20009947712,418	25820470588,23
Desv. típ.	96321,03	141456,522	160687,49
Mínimo	121000	68000	80000
Máximo	507000	577000	704000
Rango	386000	509000	624000
Amplitud intercuartil	113500,00	212000,00	219750,00
Asimetría	1,14	,424	-,49
Curtosis	1,49	-,459	,10

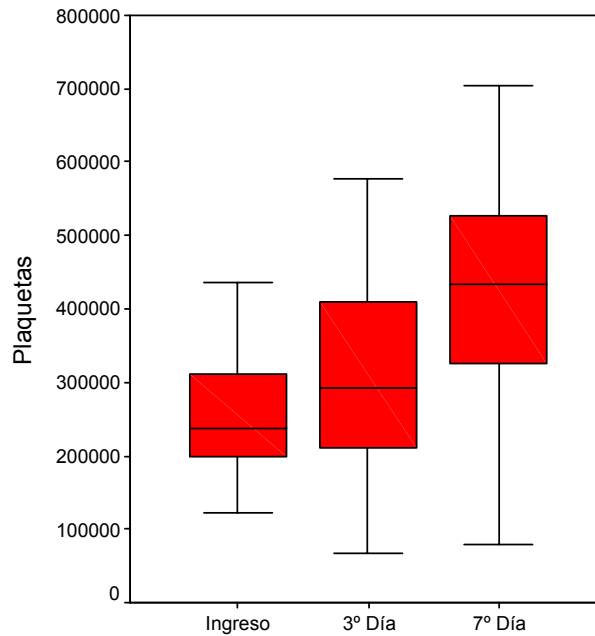


Tabla 49. Descripción estadística de la variable **plaquetas** ($*10^3/\text{mcl}$) en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	252382,3(22803,25)	270876,9(30135,03)	358875(39354,36)
Intervalo confianza 95%	300723,08- 204041,63	336535,13- 205218,32	451933,27- 265816,73
Media recortada al 5%	253841,50	262863,25	357527,78
Mediana	254000,00	232400,00	323500,00
Varianza	8839797794,12	11805563589,74	12390125000,00
Desv. típ.	94020,20	108653,41	111310,94
Mínimo	27500	120000	202000
Máximo	451000	566000	540000
Rango	423500	446000	338000
Amplitud intercuartil	127000,00	103500,00	168500,00
Asimetría	-,28	1,65	,65
Curtosis	1,46	4,23	-,10

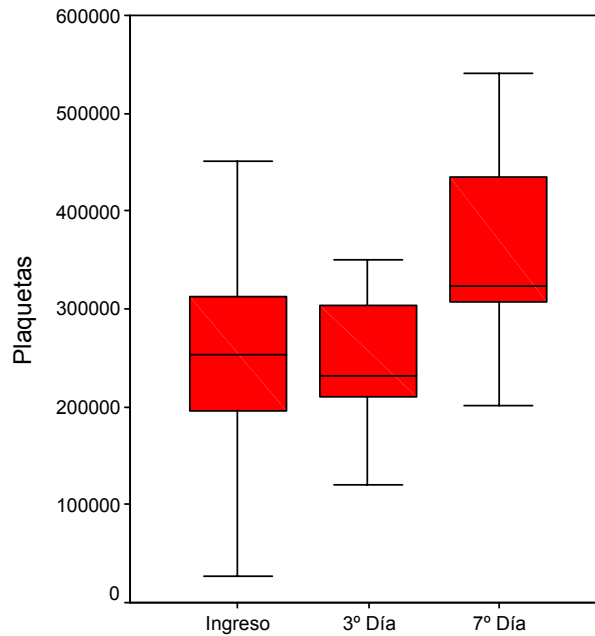


Tabla 50. Descripción estadística de la variable **sodio (mEq/l)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	136,50(,70)	138,17(1,12)	137,33(1,03)
Intervalo confianza 95%	137,97-135,03	140,53-135,81	139,50-135,17
Media recortada al 5%	136,56	138,19	137,26
Mediana	136,00	139,00	138,00
Varianza	8,73	22,50	18,94
Desv. típ.	2,96	4,74	4,35
Mínimo	131	129	130
Máximo	141	147	146
Rango	10	18	16
Amplitud intercuartil	4,00	4,25	7,75
Asimetría	-,11	-,36	,03
Curtosis	-,76	,22	-,61

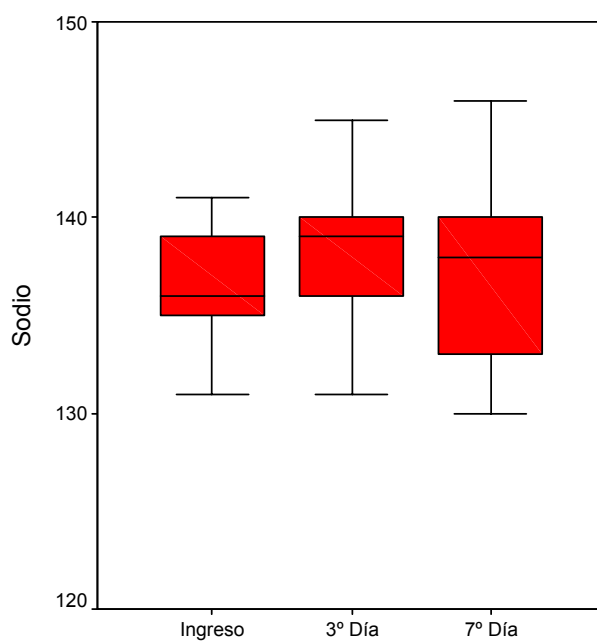


Tabla 51. Descripción estadística de la variable **sodio (mEq/l)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	135,41(,76)	136,54(1,05)	134,67(2,70)
Intervalo confianza 95%	137,03-133,80	138,83-134,24	140,90-128,43
Media recortada al 5%	135,62	136,71	135,41
Mediana	136,00	138,00	138,00
Varianza	9,88	14,44	65,75
Desv. típ.	3,14	3,80	8,11
Mínimo	127	129	115
Máximo	140	141	141
Rango	13	12	26
Amplitud intercuartil	3,50	5,50	6,50
Asimetría	-1,12	-1,05	-2,19
Curtosis	2,17	-,11	4,92

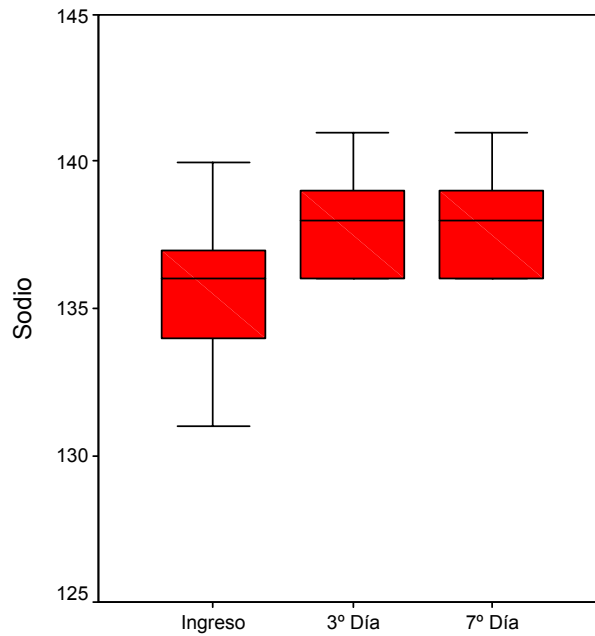


Tabla 52. Descripción estadística de la variable **potasio (mEq/l)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	5,15(,23)	4,61(,21)	4,65(,16)
Intervalo confianza 95%	5,63-4,67	5,05-4,17	4,98-4,32
Media recortada al 5%	5,14	4,62	4,64
Mediana	4,90	4,50	4,50
Varianza	,93	,79	,45
Desv. típ.	,96	,89	,67
Mínimo	3,7	3,0	3,4
Máximo	6,7	6,0	6,0
Rango	3,0	3,0	2,6
Amplitud intercuartil	1,67	1,35	1,05
Asimetría	,55	,02	,32
Curtosis	-,87	-,69	-,43

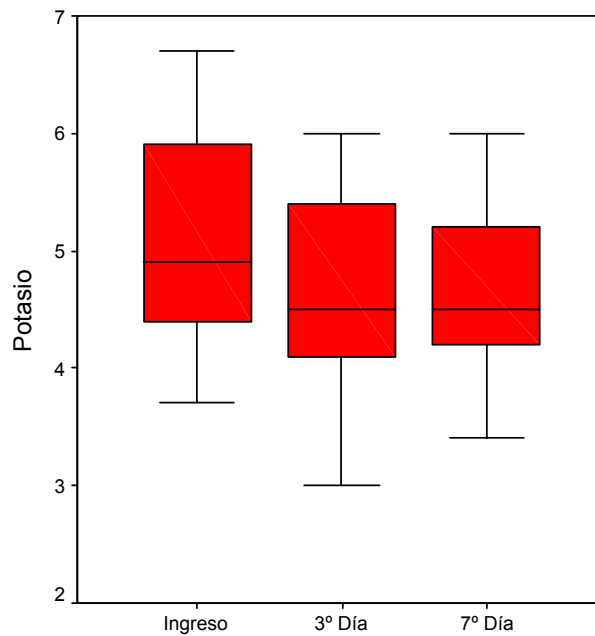


Tabla 53. Descripción estadística de la variable **potasio (mEq/l)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	4,93(,16)	4,98(,22)	4,73(,25)
Intervalo confianza 95%	5,28-4,59	5,47-4,49	5,30-4,16
Media recortada al 5%	4,92	4,93	4,78
Mediana	5,00	4,80	5,00
Varianza	,46	,66	,55
Desv. típ.	,68	,81	,74
Mínimo	3,7	4,0	3,2
Máximo	6,4	7,0	5,5
Rango	2,7	3,0	2,3
Amplitud intercuartil	,80	,80	1,05
Asimetría	,39	1,42	-1,14
Curtosis	,27	2,32	1,05

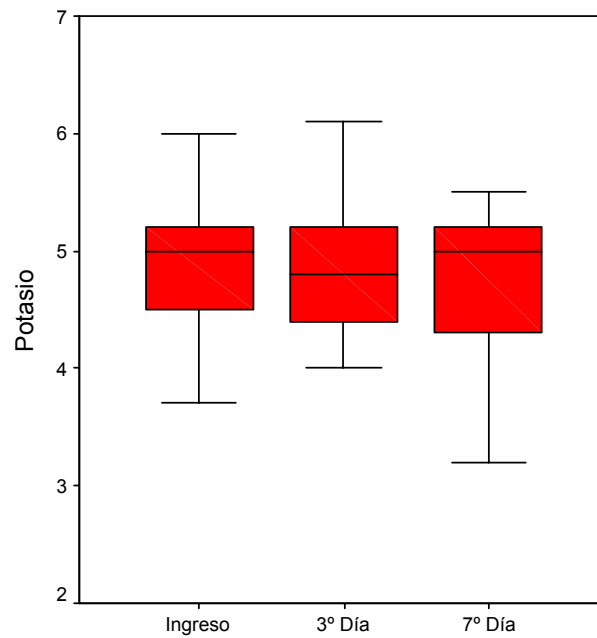


Tabla 54. Descripción estadística de la variable **calcio (mg/dl)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	9,22(,18)	9,39(,19)	9,94(,22)
Intervalo confianza 95%	9,61-8,84	9,80-8,99	10,40-9,48
Media recortada al 5%	9,24	9,39	9,90
Mediana	9,20	9,20	9,75
Varianza	,59	,65	,85
Desv. típ.	,77	,81	,92
Mínimo	7,7	7,9	8,6
Máximo	10,5	11,0	12,0
Rango	2,8	3,1	3,4
Amplitud intercuartil	,80	1,07	1,42
Asimetría	-,23	,38	,74
Curtosis	-,07	-,05	-,14

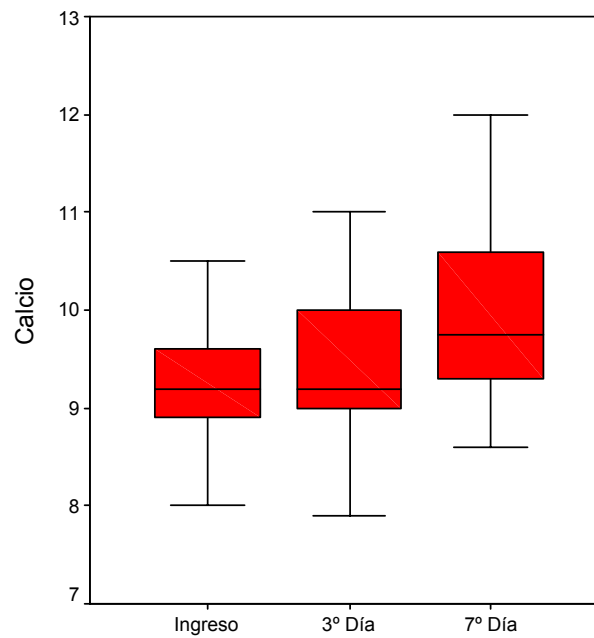


Tabla 55. Descripción estadística de la variable **calcio (mg/dl)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	14,28(4,92)	9,05(,18)	9,32(,20)
Intervalo confianza 95%	24,71-3,84	9,46-8,65	9,78-8,87
Media recortada al 5%	10,25	9,05	9,34
Mediana	9,30	9,00	9,60
Varianza	412,00	,45	,35
Desv. típ.	20,30	,67	,59
Mínimo	8,1	8,0	8,3
Máximo	93,0	10,1	10,1
Rango	84,9	2,1	1,8
Amplitud intercuartil	,95	1,25	1,00
Asimetría	4,16	,14	-,61
Curtosis	16,95	-,97	-,80

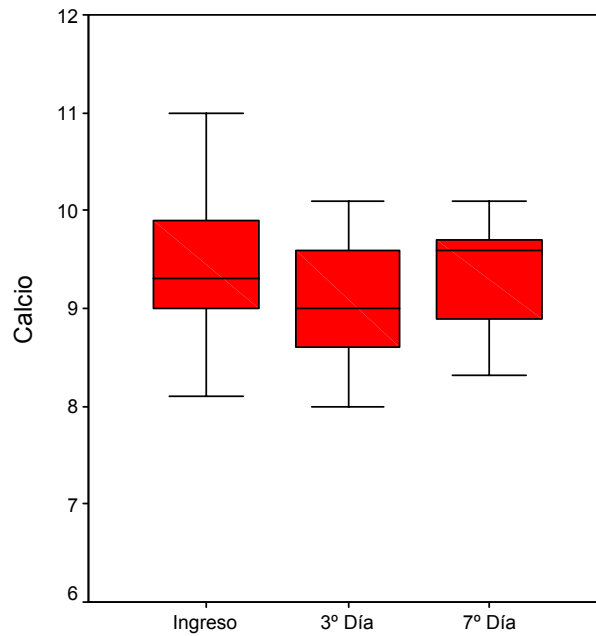


Tabla 56. Descripción estadística de la variable **urea (mg/dl)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	24,06(1,87)	30,44(3,21)	27,06(3,73)
Intervalo confianza 95%	28,01-20,10	37,21-23,67	34,93-19,18
Media recortada al 5%	24,01	30,27	26,28
Mediana	22,50	29,50	24,00
Varianza	63,11	185,32	250,53
Desv. típ.	7,94	13,61	15,83
Mínimo	12	10	6
Máximo	37	54	62
Rango	25	44	56
Amplitud intercuartil	12,75	23,00	22,00
Asimetría	-,13	,24	,72
Curtosis	-1,11	-1,04	,11

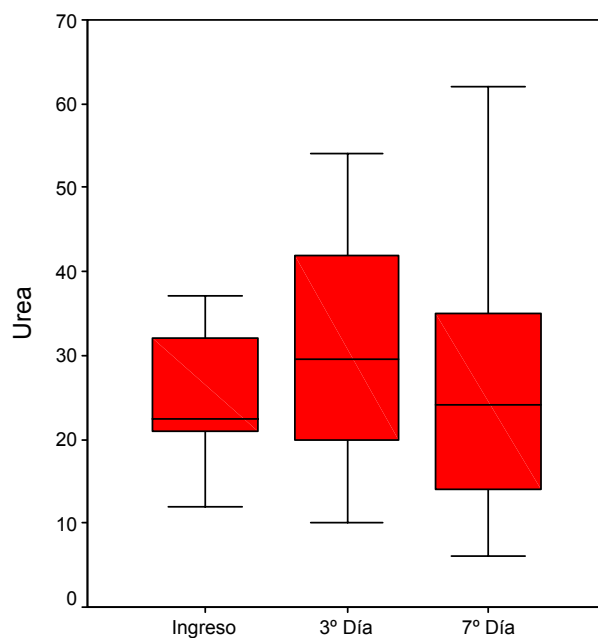


Tabla 57. Descripción estadística de la variable **urea (mg/dl)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	27,00(2,16)	27,00(2,71)	21,78(3,16)
Intervalo confianza 95%	31,57-22,43	32,91-21,09	29,06-14,50
Media recortada al 5%	27,11	26,11	21,81
Mediana	28,00	23,00	22,00
Varianza	79,00	95,67	89,69
Desv. típ.	8,89	9,78	9,47
Mínimo	11	16	6
Máximo	41	54	37
Rango	30	38	31
Amplitud intercuartil	12,00	9,00	14,50
Asimetría	-,17	1,91	-,12
Curtosis	-,55	4,49	-,13

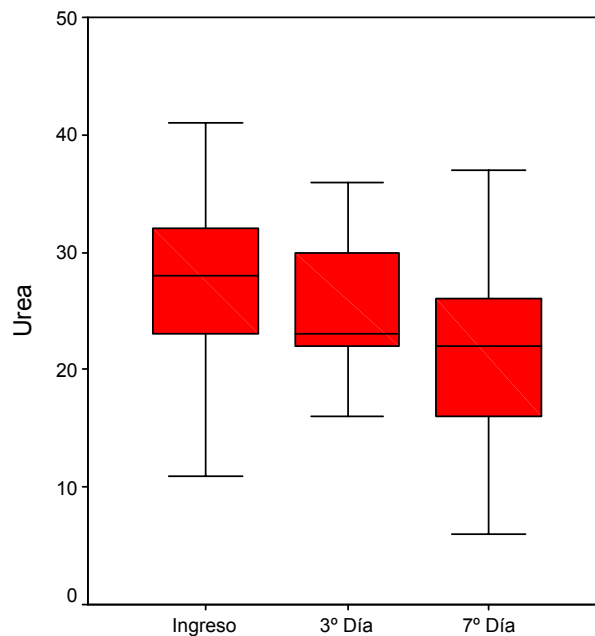


Tabla 58. Descripción estadística de la variable **creatinina (mg/dl)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	,69(.03)	,76(.04)	,67(.04)
Intervalo confianza 95%	,77-62	,85-68	,77-58
Media recortada al 5%	,70	,74	,68
Mediana	,70	,75	,65
Varianza	,02	,03	,04
Desv. típ.	,15	,18	,19
Mínimo	,40	,60	,30
Máximo	,90	1,30	1,00
Rango	,50	,70	,70
Amplitud intercuartil	,20	,28	,22
Asimetría	-,64	1,58	,05
Curtosis	-,11	3,77	-,21

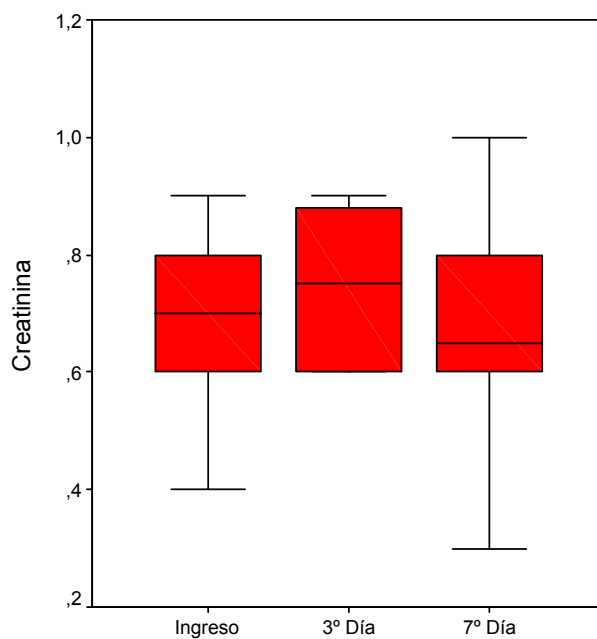


Tabla 59. Descripción estadística de la variable **creatinina (mg/dl)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	,82(.05)	,76(.04)	,67(.06)
Intervalo confianza 95%	,92-,72	,85-,67	,81-,53
Media recortada al 5%	,80	,76	,66
Mediana	,80	,80	,60
Varianza	,04	,02	,03
Desv. típ.	,19	,15	,16
Mínimo	,60	,60	,46
Máximo	1,40	1,00	1,00
Rango	,80	,40	,54
Amplitud intercuartil	,20	,30	,17
Asimetría	1,52	,09	1,17
Curtosis	3,94	-1,73	1,67

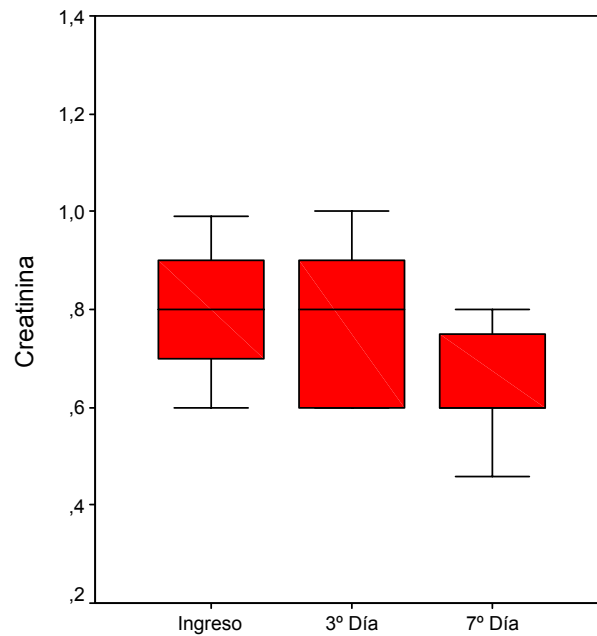


Tabla 60. Descripción estadística de la variable **glucosa (mg/dl)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	58,39(10,23)	85,28(4,90)	100,22(4,41)
Intervalo confianza 95%	79,97-36,81	95,61-74,95	109,52-90,92
Media recortada al 5%	54,27	85,14	100,19
Mediana	45,00	78,50	98,00
Varianza	1883,78	431,39	349,71
Desv. típ.	43,40	20,77	18,70
Mínimo	16	52	63
Máximo	175	121	138
Rango	159	69	75
Amplitud intercuartil	48,25	33,00	22,25
Asimetría	1,49	,51	,45
Curtosis	1,88	-,78	,78

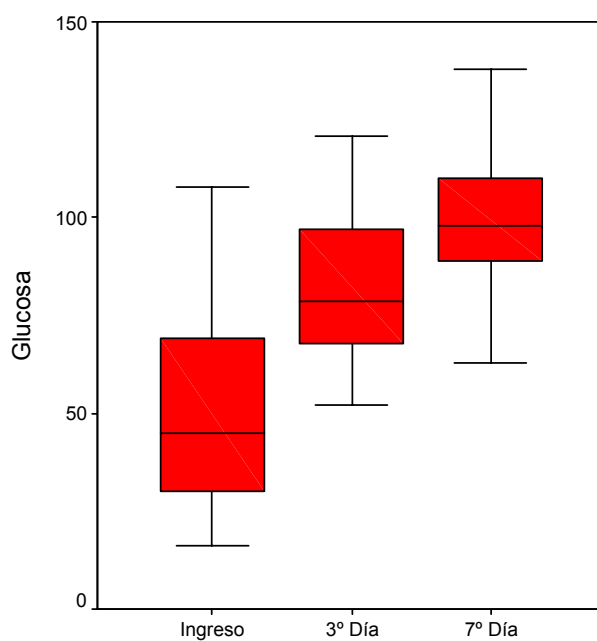


Tabla 61. Descripción estadística de la variable **glucosa (mg/dl)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	49,06(9,44)	77,08(6,16)	86,78(5,51)
Intervalo confianza 95%	69,18-28,95	90,51-63,64	99,49-74,07
Media recortada al 5%	45,63	79,81	86,31
Mediana	45,50	83,00	80,00
Varianza	1424,86	494,08	273,44
Desv. típ.	37,747	22,23	16,54
Mínimo	0	9	69
Máximo	160	96	113
Rango	160	87	44
Amplitud intercuartil	41,75	14,50	29,00
Asimetría	1,70	-2,72	,85
Curtosis	4,29	8,35	-,83

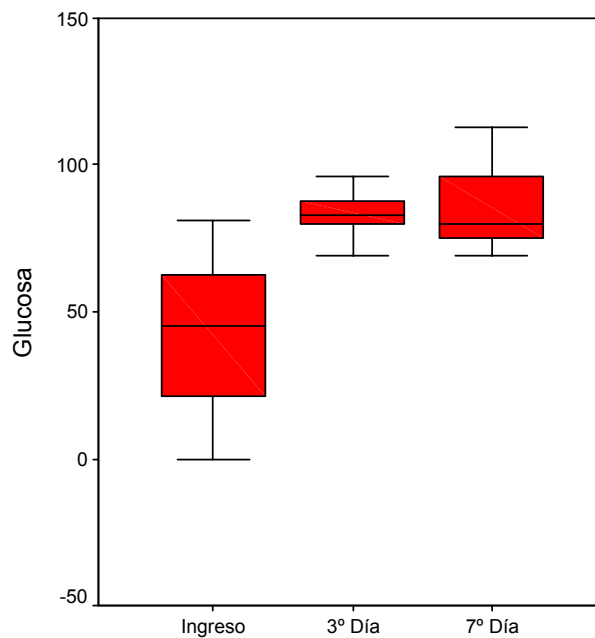


Tabla 62. Descripción estadística de la variable **proteína C reactiva (PCR)** en neonatos <1500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	,34(0,25)	,42(0,08)	1,17(.40)
Intervalo confianza 95%	,87--,.18	,58-.26	2,02-.32
Media recortada al 5%	,14	,40	,86
Mediana	,10	,32	,64
Varianza	1,04	,10	2,91
Desv. típ.	1,02	,32	1,70
Mínimo	,00	,00	,16
Máximo	4,27	1,21	7,70
Rango	4,27	1,21	7,54
Amplitud intercuartil	,19	,32	,73
Asimetría	4,05	1,10	3,68
Curtosis	16,55	,97	14,47

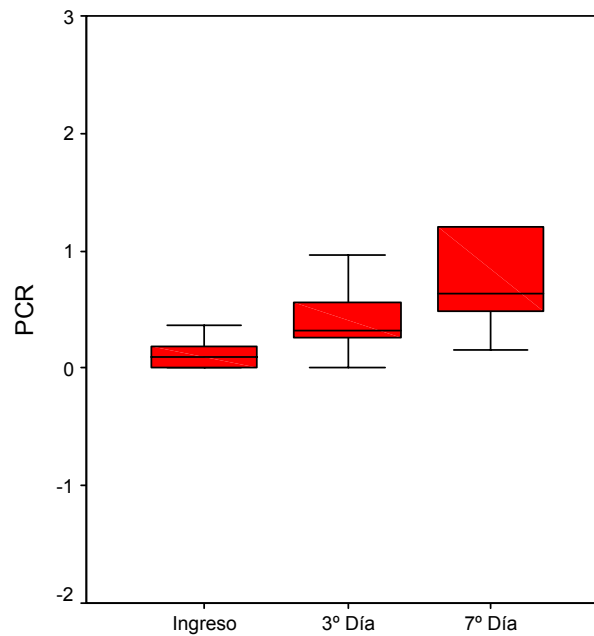


Tabla 63. Descripción estadística de la variable **proteína C reactiva (PCR)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	,38(,23)	1,03(,38)	,29(,07)
Intervalo confianza 95%	,87-- ,12	1,85- ,21	,46- ,13
Media recortada al 5%	,19	,85	,29
Mediana	,14	,60	,30
Varianza	,93	1,84	,05
Desv. típ.	,96	1,36	,21
Mínimo	,00	,00	,00
Máximo	4,10	5,20	,60
Rango	4,10	5,20	,60
Amplitud intercuartil	,10	,48	,43
Asimetría	4,04	2,84	-,07
Curtosis	16,49	8,58	-1,40

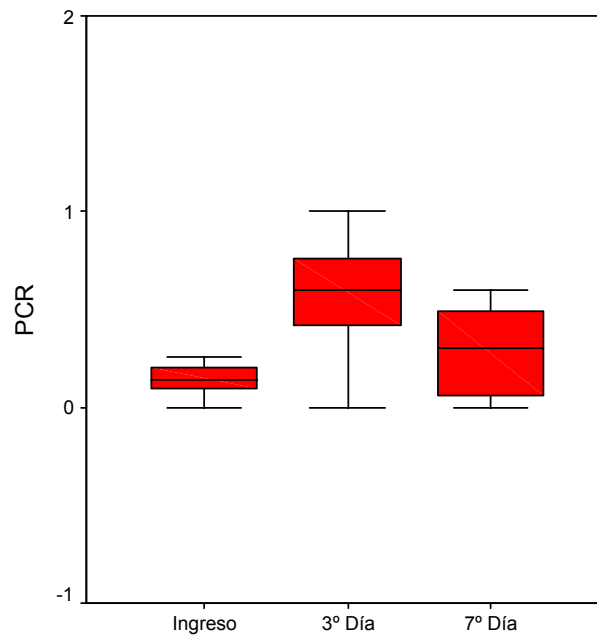


Tabla 64. Descripción estadística de la variable **frecuencia respiratoria (rpm)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	56,72(6,53)	51,22(3,51)	57,61(6,12)
Intervalo confianza 95%	70,49-42,95	58,62-43,83	70,52-44,70
Media recortada al 5%	52,69	51,58	53,90
Mediana	48,50	49,00	52,00
Varianza	766,92	221,24	673,90
Desv. típ.	27,69	14,87	25,96
Mínimo	32	18	32
Máximo	154	78	150
Rango	122	60	118
Amplitud intercuartil	19,00	20,00	18,00
Asimetría	2,82	-,09	2,88
Curtosis	9,39	,36	10,06

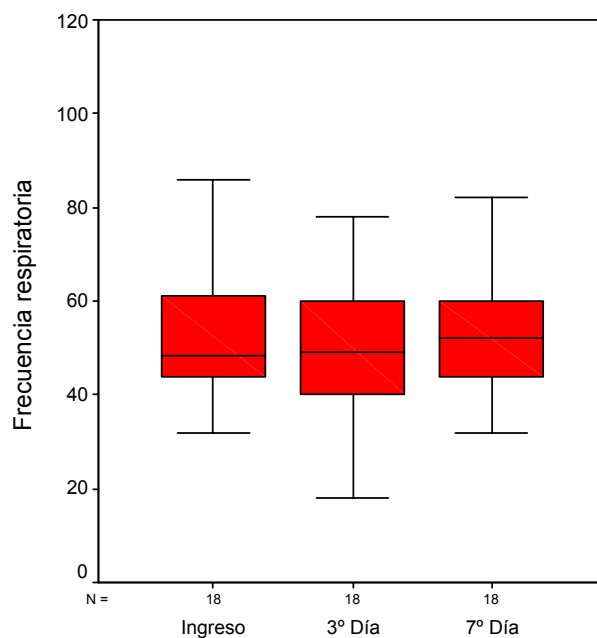


Tabla 65. Descripción estadística de la variable **frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	51,47(2,00)	52,31(3,03)	51,90(2,52)
Intervalo confianza 95%	55,71-47,23	58,92-45,70	57,60-46,20
Media recortada al 5%	51,41	51,90	52,06
Mediana	50,00	52,00	54,50
Varianza	68,14	119,56	63,43
Desv. típ.	8,25	10,93	7,96
Mínimo	36	36	39
Máximo	68	76	62
Rango	32	40	23
Amplitud intercuartil	14,00	16,50	14,25
Asimetría	,12	,64	-,39
Curtosis	-,48	,28	-1,48

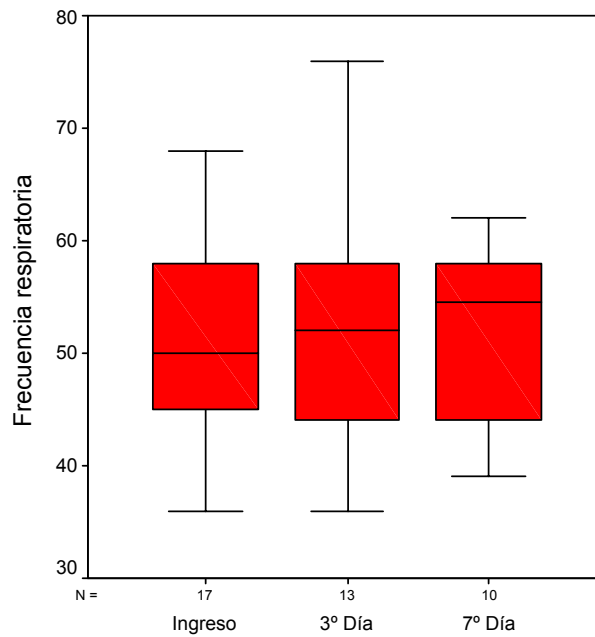


Tabla 66. Descripción estadística de la variable **frecuencia cardiaca (latidos por minuto)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	136,17(6,72)	149,17(4,05)	144,89(7,09)
Intervalo confianza 95%	150,35-121,99	157,72-140,61	159,85-129,92
Media recortada al 5%	138,96	150,07	147,65
Mediana	139,50	153,00	143,50
Varianza	813,21	296,03	905,52
Desv. típ.	28,52	17,21	30,09
Mínimo	42	110	52
Máximo	180	172	188
Rango	138	62	136
Amplitud intercuartil	21,00	27,25	29,75
Asimetría	-2,01	-,52	-1,52
Curtosis	7,05	-,18	4,80

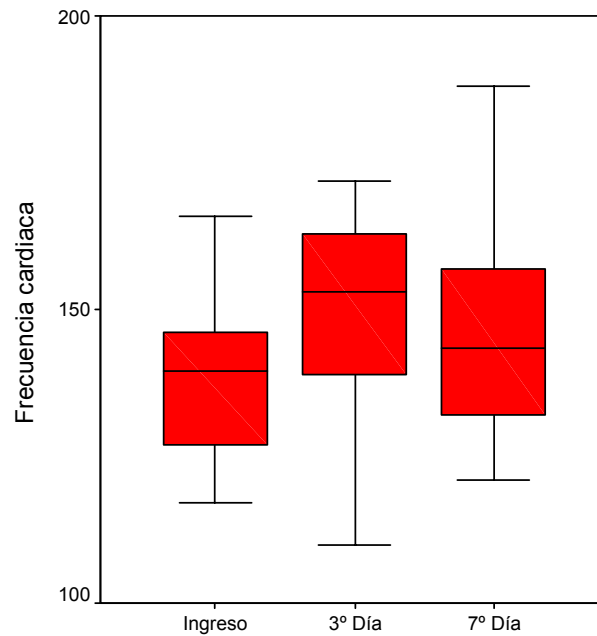


Tabla 67. Descripción estadística de la variable **frecuencia cardiaca (latidos por minuto)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	140,29(2,73)	150,85(3,41)	145,90(3,93)
Intervalo confianza 95%	146,09-134,50	158,28-143,41	154,79-137,01
Media recortada al 5%	140,49	150,61	146,06
Mediana	141,00	150,00	143,00
Varianza	126,97	151,47	154,54
Desv. típ.	11,27	12,31	12,43
Mínimo	117	131	121
Máximo	160	175	168
Rango	43	44	47
Amplitud intercuartil	13,50	14,00	13,00
Asimetría	-,41	,49	-,25
Curtosis	,39	,25	1,50

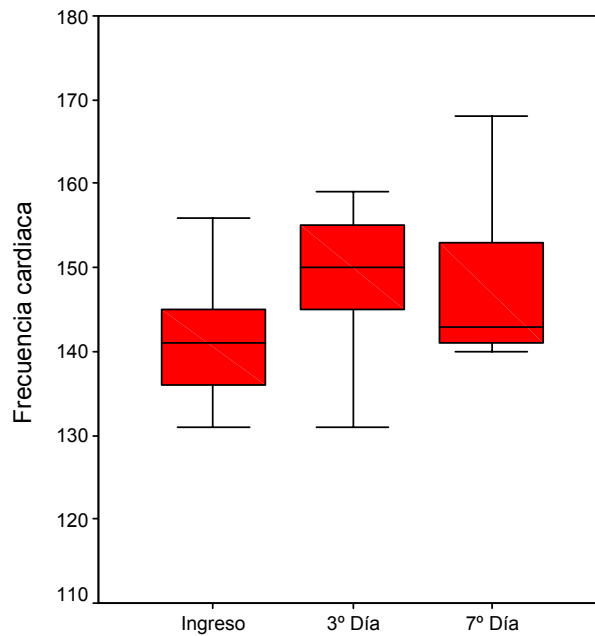


Tabla 68. Descripción estadística de la variable **tensión arterial sistólica (mmHg)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	58,06(3,41)	63,78(1,98)	60,78(3,60)
Intervalo confianza 95%	65,26-50,85	67,96-59,59	68,37-53,18
Media recortada al 5%	56,84	63,70	61,31
Mediana	57,00	64,50	62,50
Varianza	209,70	70,77	233,24
Desv. típ.	14,48	8,41	15,27
Mínimo	42	47	25
Máximo	96	82	87
Rango	54	35	62
Amplitud intercuartil	14,25	10,25	21,50
Asimetría	1,70	-,21	-,59
Curtosis	2,90	,84	,38

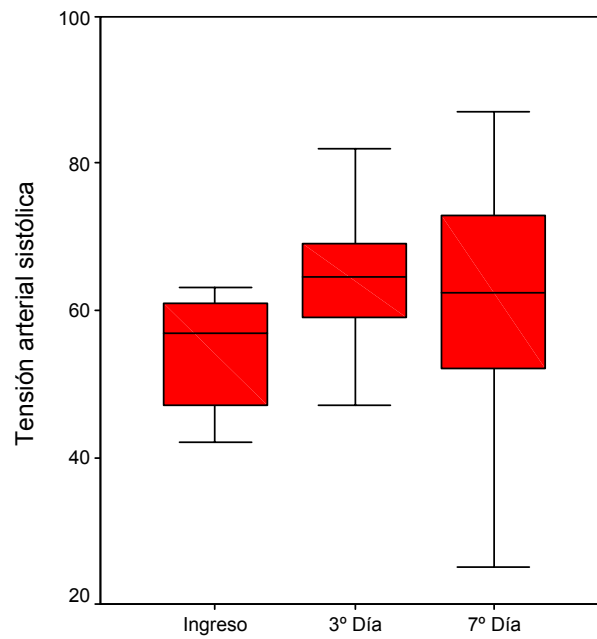


Tabla 69. Descripción estadística de la variable **tensión arterial sistólica (mmHg)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	66,82(3,15)	68,77(2,71)	70,20(3,20)
Intervalo confianza 95%	73,51-60,14	74,68-62,86	77,43-62,97
Media recortada al 5%	66,64	68,08	70,11
Mediana	65,00	63,00	70,50
Varianza	168,90	95,53	102,18
Desv. típ.	12,99	9,77	10,11
Mínimo	40	59	56
Máximo	97	91	86
Rango	57	32	30
Amplitud intercuartil	18,50	14,00	19,25
Asimetría	,241	1,21	,12
Curtosis	1,04	,68	-1,36

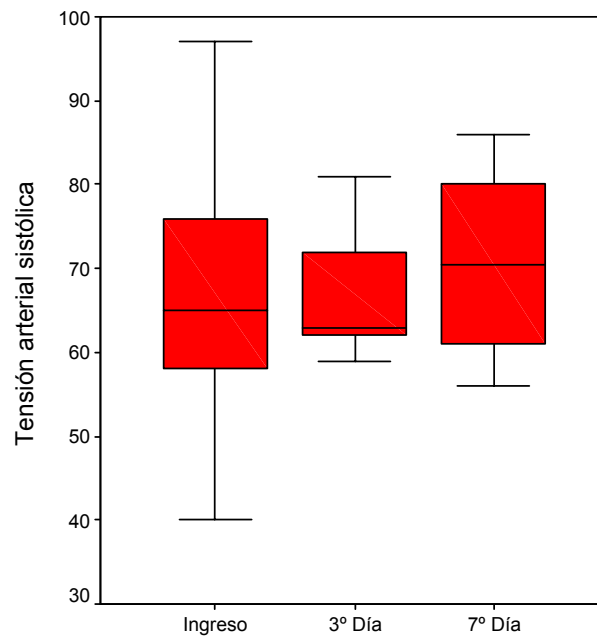


Tabla 70. Descripción estadística de la variable **tensión arterial media (mmHg)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	35,33(2,55)	43,11(2,11)	42,35(2,80)
Intervalo confianza 95%	40,72-29,95	47,57-38,65	48,29-36,41
Media recortada al 5%	34,70	42,62	42,11
Mediana	33,50	40,50	40,00
Varianza	117,29	80,34	133,49
Desv. típ.	10,83	8,96	11,55
Mínimo	22	31	24
Máximo	60	64	65
Rango	38	33	41
Amplitud intercuartil	15,75	13,25	18,00
Asimetría	,96	,90	,33
Curtosis	,31	,21	-,66

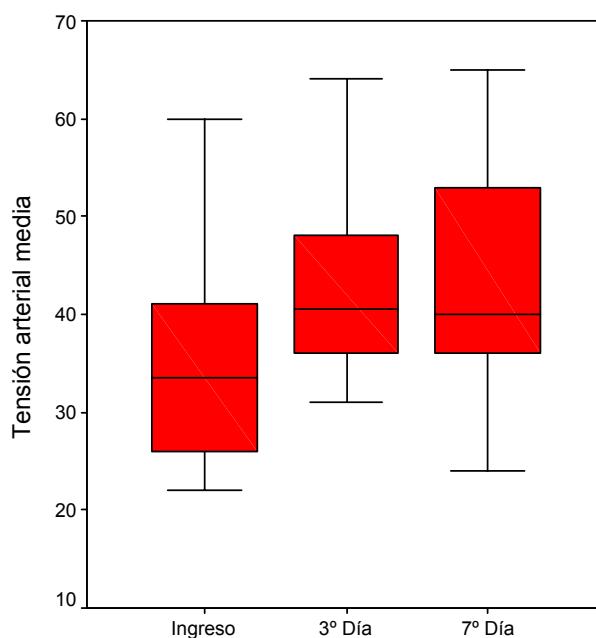


Tabla 71. Descripción estadística de la variable **tensión arterial media (mmHg)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	47,06(2,14)	48,38(2,12)	50,60(3,61)
Intervalo confianza 95%	51,59-42,53	53,01-43,76	58,78-42,42
Media recortada al 5%	47,45	48,48	51,06
Mediana	46,00	50,00	53,50
Varianza	77,56	58,59	130,71
Desv. típ.	8,81	7,65	11,43
Mínimo	27	34	28
Máximo	60	61	65
Rango	33	27	37
Amplitud intercuartil	14,50	11,50	17,75
Asimetría	-,41	-,29	-,70
Curtosis	,11	-,42	,03

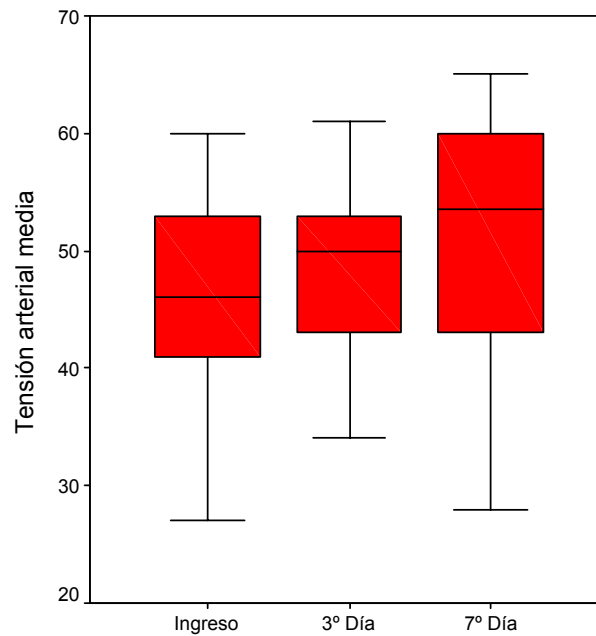


Tabla 72. Descripción estadística de la variable **fracción inspirada de oxígeno (FiO₂)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	,37(.037)	,29(.03)	,24(.02)
Intervalo confianza 95%	,45-,29	,36-,22	,27-,20
Media recortada al 5%	,36	,28	,23
Mediana	,35	,21	,21
Varianza	,02	,02	,00
Desv. típ.	,16	,14	,07
Mínimo	,21	,20	,20
Máximo	,80	,60	,50
Rango	,59	,40	,30
Amplitud intercuartil	,29	,09	,04
Asimetría	1,08	1,70	3,15
Curtosis	1,53	1,57	10,90

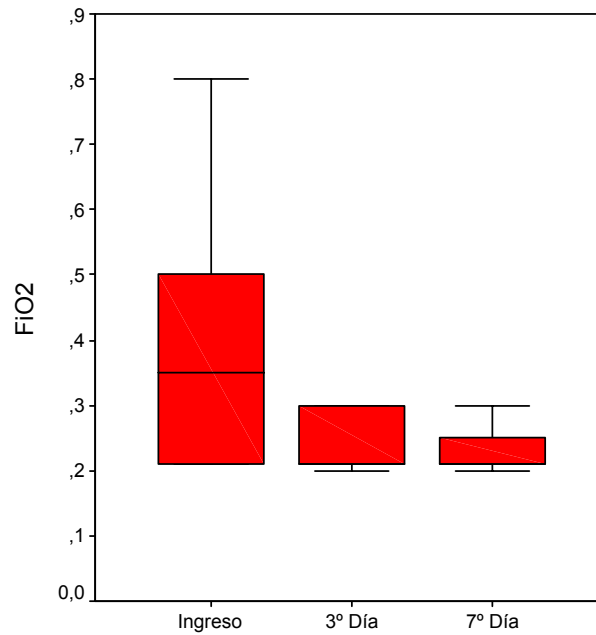


Tabla 73. Descripción estadística de la variable **fracción inspirada de oxígeno (FiO₂)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	,31(,04)	,25(,02)	,21(,00)
Intervalo confianza 95%	,39-,23	,29-,20	,22-,20
Media recortada al 5%	,29	,24	,21
Mediana	,21	,21	,21
Varianza	,02	,00	,00
Desv. típ.	,16	,073	,013
Mínimo	,21	,21	,20
Máximo	,80	,40	,25
Rango	,59	,19	,05
Amplitud intercuartil	,19	,04	,00
Asimetría	2,10	1,79	2,80
Curtosis	5,09	1,75	8,64

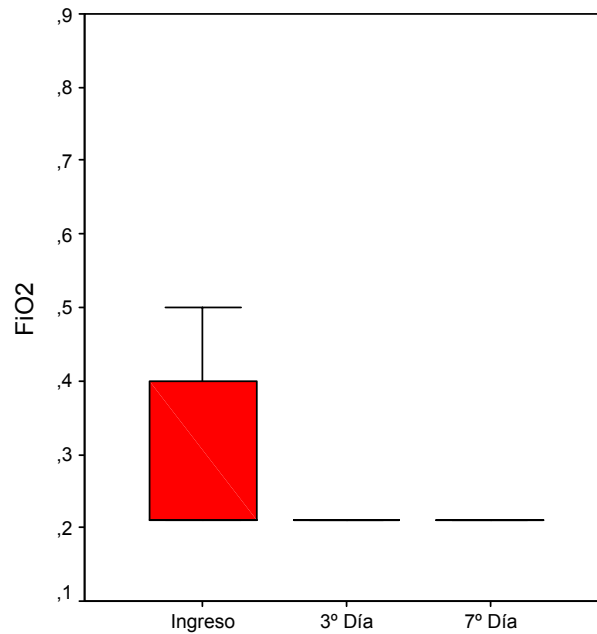


Tabla 74. Descripción estadística de la variable **saturación de oxígeno (Sat. O₂)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	95,52(1,54)	91,67(4,52)	95,28(1,13)
Intervalo confianza 95%	98,85-92,19	101,35-81,98	97,67-92,88
Media recortada al 5%	96,13	94,63	95,59
Mediana	97,00	96,00	97,00
Varianza	33,22	305,95	23,15
Desv. típ.	5,76	17,49	4,81
Mínimo	80	30	85
Máximo	100	100	100
Rango	20	70	15
Amplitud intercuartil	5,25	4,00	3,75
Asimetría	-1,92	-3,57	-1,42
Curtosis	3,60	13,23	,86

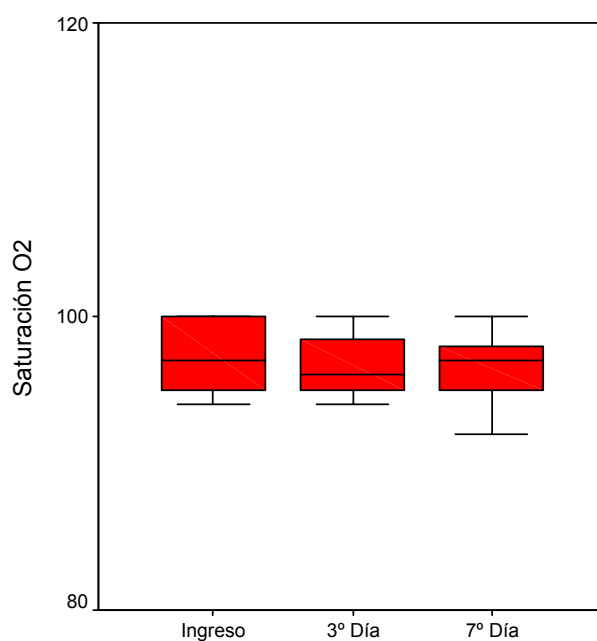


Tabla 75. Descripción estadística de la variable **saturación de oxígeno (Sat. O₂)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	93,44(2,57)	94,83(1,85)	91,45(2,33)
Intervalo confianza 95%	99,51-87,36	99,10-90,57	96,65-86,26
Media recortada al 5%	93,79	95,29	91,89
Mediana	97,50	95,00	94,00
Varianza	52,82	30,75	59,87
Desv. típ.	7,27	5,54	7,74
Mínimo	82	82	76
Máximo	99	100	99
Rango	18	19	23
Amplitud intercuartil	13,50	5,00	8,00
Asimetría	-1,12	-1,95	-1,33
Curtosis	-,58	4,82	,79

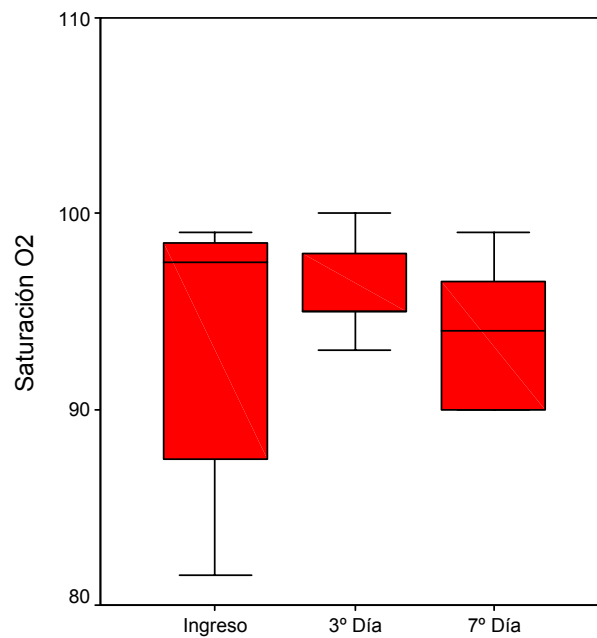


Tabla 76. Descripción estadística de la variable **presión parcial de oxígeno (pO₂)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	75,49(11,51)	42,46(2,28)	42,15(2,43)
Intervalo confianza 95%	99,77-51,21	47,26-37,65	47,28-37,01
Media recortada al 5%	69,71	42,63	42,46
Mediana	56,10	43,30	45,35
Varianza	2383,65	93,40	106,62
Desv. típ.	48,82	9,66	10,32
Mínimo	33,6	20,0	20,5
Máximo	221,3	61,7	58,2
Rango	187,7	41,7	37,7
Amplitud intercuartil	60,50	11,15	14,30
Asimetría	1,79	-,49	-,86
Curtosis	3,65	,89	,06

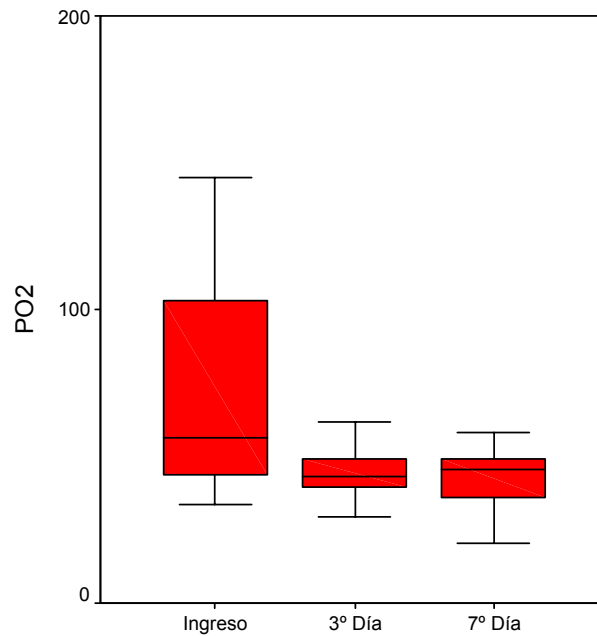


Tabla 77. Descripción estadística de la variable **presión parcial de oxígeno (pO₂)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	50,44(3,70)	39,54(2,42)	39,21(1,49)
Intervalo confianza 95%	58,32-42,55	44,87-34,21	42,59-35,83
Media recortada al 5%	49,81	39,46	39,46
Mediana	49,00	40,85	40,10
Varianza	218,91	70,40	22,28
Desv. típ.	14,79	8,39	4,72
Mínimo	26,2	26,5	29,0
Máximo	86,0	54,1	45,0
Rango	59,8	27,6	16,0
Amplitud intercuartil	12,27	14,50	3,30
Asimetría	1,11	-,23	-1,37
Curtosis	1,80	-,38	1,70

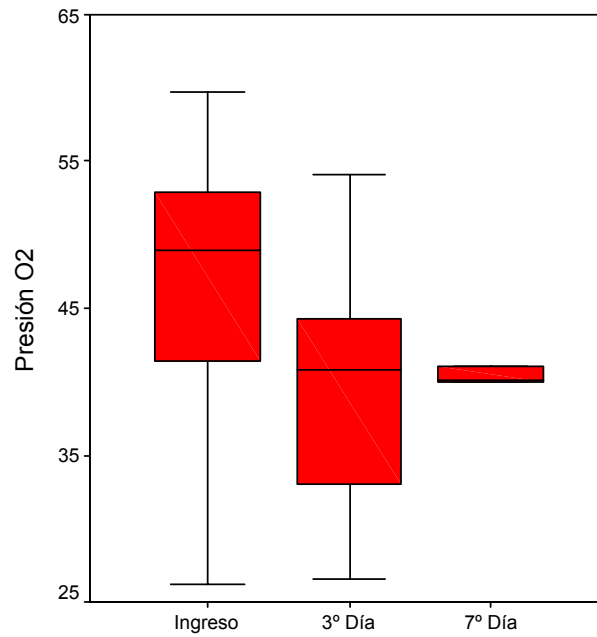


Tabla 78. Descripción estadística de la variable **presión parcial de dióxido de carbono (pCO₂)** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	48,91(3,75)	43,17(1,82)	43,76(2,08)
Intervalo confianza 95%	56,83-40,99	47,00-39,33	48,15-39,37
Media recortada al 5%	48,66	43,22	42,99
Mediana	47,55	41,50	42,40
Varianza	253,64	59,40	77,85
Desv. típ.	15,93	7,71	8,82
Mínimo	25,3	28,2	28,9
Máximo	77,0	57,2	72,5
Rango	51,7	29,0	43,6
Amplitud intercuartil	28,02	10,20	8,85
Asimetría	,32	-,13	1,92
Curtosis	-,91	-,30	6,60

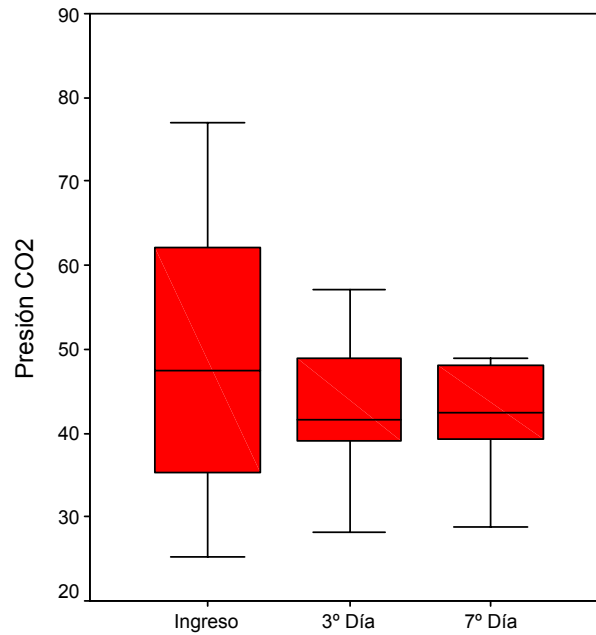


Tabla 79. Descripción estadística de la variable **presión parcial de dióxido de carbono (pCO₂)** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	50,85(4,24)	46,69(2,76)	49,70(1,77)
Intervalo confianza 95%	59,83-41,86	52,71-40,67	53,71-45,69
Media recortada al 5%	50,22	46,88	50,04
Mediana	44,30	45,30	51,60
Varianza	305,19	99,32	31,48
Desv. típ.	17,47	9,96	5,61
Mínimo	30,9	31,4	38,3
Máximo	82,0	58,6	55,0
Rango	51,1	27,2	16,7
Amplitud intercuartil	33,55	19,90	6,62
Asimetría	,47	-,23	-1,40
Curtosis	-1,14	-1,53	,94

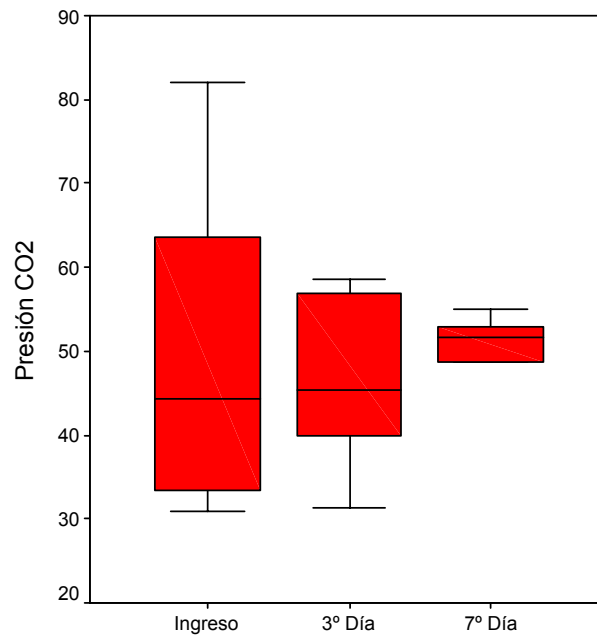


Tabla 80. Descripción estadística de la variable **pH** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	7,32(,03)	7,37(,01)	7,37(,01)
Intervalo confianza 95%	7,38-7,26	7,39-7,34	7,40-7,35
Media recortada al 5%	7,32	7,36	7,37
Mediana	7,33	7,34	7,38
Varianza	,01	,00	,00
Desv. típ.	,12	,05	,05
Mínimo	7,05	7,31	7,29
Máximo	7,55	7,50	7,45
Rango	,50	,19	,16
Amplitud intercuartil	,15	,07	,06
Asimetría	-,34	1,19	-,41
Curtosis	,39	,62	-,51

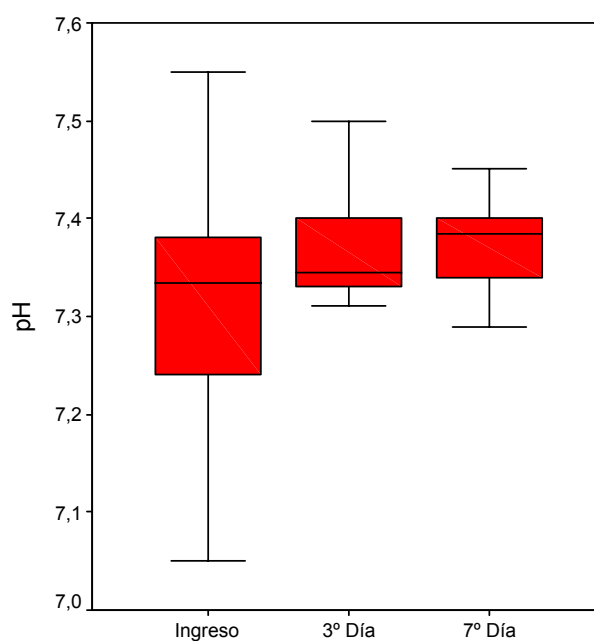


Tabla 81. Descripción estadística de la variable **pH** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	7,28(.03)	7,31(.02)	7,35(.01)
Intervalo confianza 95%	7,35-7,21	7,37-7,26	7,35-7,31
Media recortada al 5%	7,29	7,32	7,35
Mediana	7,32	7,32	7,35
Varianza	,02	,01	,00
Desv. típ.	,14	,092	,05
Mínimo	6,91	7,10	7,30
Máximo	7,48	7,46	7,46
Rango	,57	,36	,16
Amplitud intercuartil	,20	,12	,057
Asimetría	-1,10	-,80	1,29
Curtosis	1,52	1,48	1,95

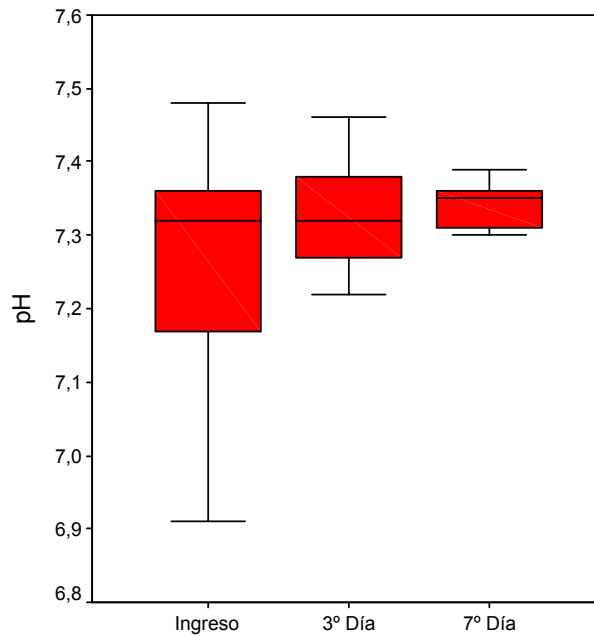


Tabla 82. Descripción estadística de la variable **bicarbonato** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	24,04(,84)	24,04(,88)	25,34(1,37)
Intervalo confianza 95%	25,82-22,26	25,90-22,18	28,23-22,46
Media recortada al 5%	24,00	24,18	24,93
Mediana	24,10	24,70	25,55
Varianza	12,82	14,00	33,71
Desv. típ.	3,58	3,74	5,81
Mínimo	17,80	16,60	17,20
Máximo	31,00	29,00	41,00
Rango	13,20	12,40	23,80
Amplitud intercuartil	5,12	5,95	7,37
Asimetría	-,04	-,40	,89
Curtosis	-,30	-,69	1,82

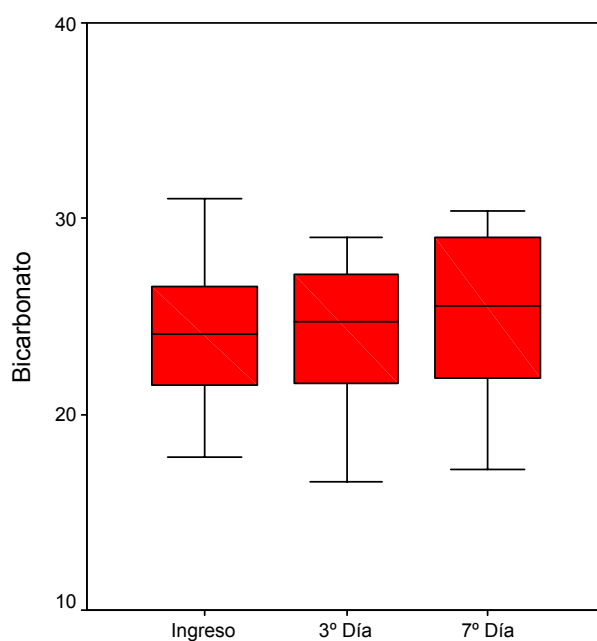


Tabla 83. Descripción estadística de la variable **bicarbonato** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3^{er} día	7^o día
Media (DS)	23,79(,93)	26,14(1,68)	27,96(,94)
Intervalo confianza 95%	25,76-21,81	29,80-22,48	30,08-25,84
Media recortada al 5%	23,97	26,45	28,05
Mediana	24,00	28,20	27,55
Varianza	14,72	36,71	8,76
Desv. típ.	3,84	6,06	2,96
Mínimo	16,00	13,60	22,30
Máximo	28,20	33,00	32,00
Rango	12,20	19,40	9,70
Amplitud intercuartil	6,85	7,30	4,95
Asimetría	-,40	-1,23	-,38
Curtosis	-,86	,41	-,02

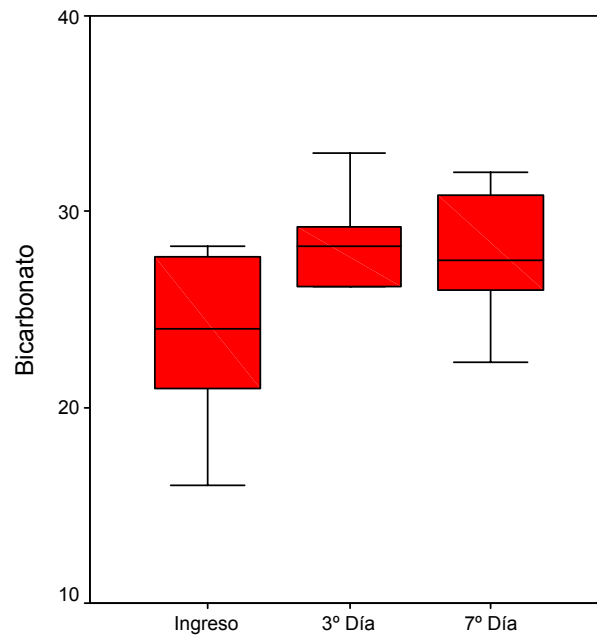


Tabla 84. Descripción estadística de la variable **exceso de bases** en neonatos <1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	-2,42(,96)	-,83(,91)	,33(1,43)
Intervalo confianza 95%	-,39—4,45	1,09--2,76	3,34--2,69
Media recortada al 5%	-2,44	-,69	-,01
Mediana	-2,30	-,20	,90
Varianza	16,69	14,99	36,76
Desv. típ.	4,08	3,87	6,06
Mínimo	-9,5	-8,1	-9,0
Máximo	5,0	3,9	15,8
Rango	14,5	12,0	24,8
Amplitud intercuartil	6,22	6,95	8,00
Asimetría	,17	-,60	,62
Curtosis	-,42	-,73	1,22

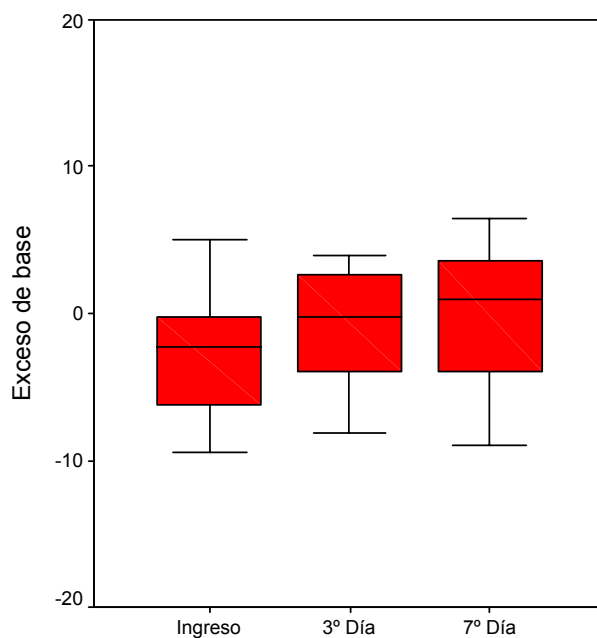
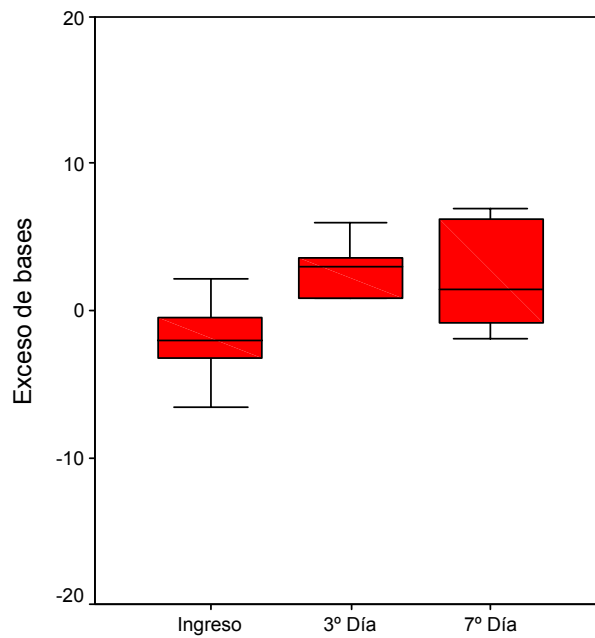


Tabla 85. Descripción estadística de la variable **exceso de bases** en neonatos >1.500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

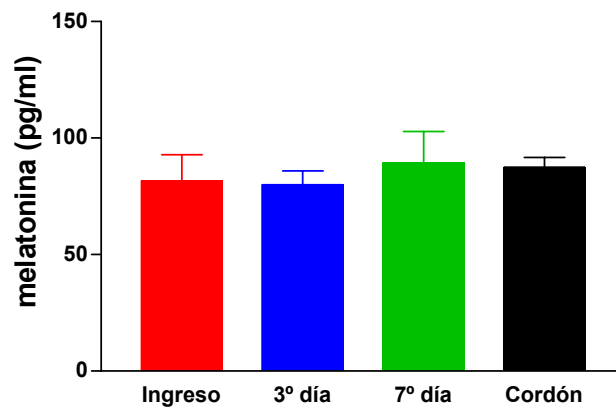
	Ingreso	3 ^{er} día	7 ^o día
Media (DS)	-1,97(1,31)	,88(1,95)	2,37(1,14)
Intervalo confianza 95%	,81--4,75	5,12--3,37	4,96--,-22
Media recortada al 5%	-1,91	1,12	2,35
Mediana	-2,00	3,00	1,45
Varianza	29,29	49,39	13,06
Desv. típ.	5,41	7,03	3,61
Mínimo	-16,5	-14,0	-1,9
Máximo	11,4	11,4	7,0
Rango	27,9	25,4	8,9
Amplitud intercuartil	3,45	6,70	7,45
Asimetría	-,29	-1,09	,22
Curtosis	4,58	,86	-1,85



3. ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE 1 VÍA

Tabla 86. Análisis de la varianza de una vía de la variable melatonina.

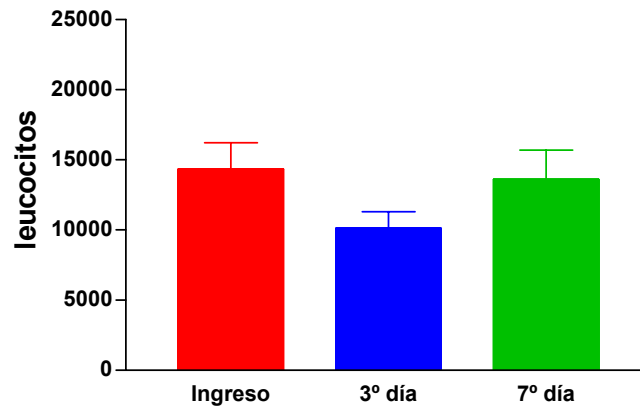
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1711,072	3	570,357	,279	,840
Intra-grupos	267392,373	131	2041,163		
Total	269103,445	134			



Como se puede apreciar, tanto en la tabla como en la figura en la que se representa el análisis estadístico realizado en relación a la variable melatonina, el valor de la F_{exp} fue de 0,279, claramente inferior al valor de la F_{α} teórico. En consecuencia, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro momentos del estudio. Dato que en principio pudiera ser contradictorio con otros referidos con anterioridad por nuestro grupo, pero el hecho de haberse constituido un grupo general sin ningún tipo de selección ni criterio de clasificación (sufrimiento fetal agudo, pretérmino, término, etc) hace que la valoración de este resultado se deba hacer con cautela.

Tabla 87. Análisis de la varianza de una vía de la variable **leucocitos**.

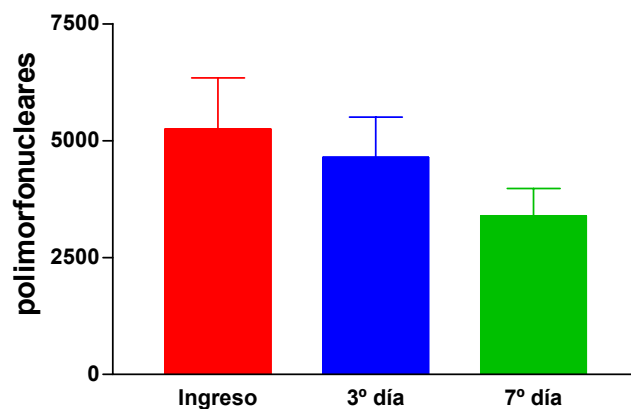
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	323035096,902	2	161517548,451	1,720	,185
Intra-grupos	8359117749,837	89	93922671,346		
Total	8682152846,739	91			



Como se puede apreciar, tanto en la tabla como en la figura en la que se representa el análisis estadístico realizado en relación a la variable leucocitos, el valor de la F_{exp} fue de 1.720, claramente inferior al valor de la F_{α} teórica. Por tanto, podemos concluir que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres momentos de estudio.

Tabla 88. Análisis de la varianza de una vía de la variable **polimorfonucleares**.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	52080087,428	2	26040043,714	,984	,378
Intra-grupos	2354437597,127	89	26454355,024		
Total	2406517684,554	91			



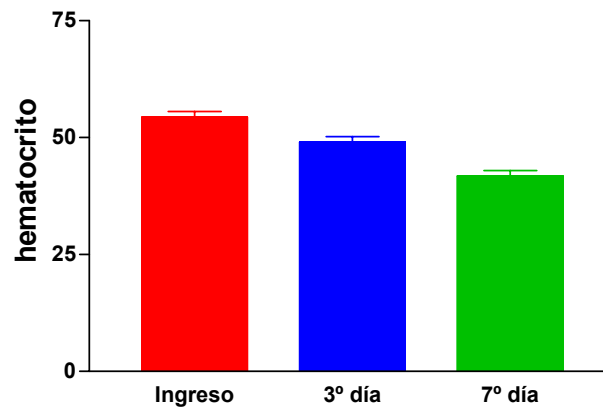
En relación a la variable polimorfonucleares, al realizar el análisis estadístico que se representa en la anterior tabla y figura, no se encontraron diferencias significativas entre los tres momentos de estudio, al obtener una F_{exp} de 0.984, claramente inferior al valor de la F_{α} teórica.

Tabla 89. Análisis de la varianza de una vía de variable **hematocrito**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2343,775	2	1171,888	26,614	,000
Intra-grupos	3918,967	89	44,033		
Total	6262,742	91			

Comparaciones múltiples Variable dependiente: HT Bonferroni

(I) Momento	(J) Momento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ingreso	3° Día	5,284	1,6366	,005	1,291	9,278
	7° Día	12,534	1,7180	,000	8,342	16,726
3° Día	Ingreso	-5,284	1,6366	,005	-9,278	-1,291
	7° Día	7,250	1,7647	,000	2,944	11,556
7° Día	Ingreso	-12,534	1,7180	,000	-16,726	-8,342
	3° Día	-7,250	1,7647	,000	-11,556	-2,944

* La diferencia entre las medias es significativa ($p < 0,05$)

La variable hematocrito, de la que a priori se espera que en los momentos del estudio aparezcan cambios, tuvo un comportamiento en cada uno de los grupos como se expresa en la tabla de ANOVA; produciéndose un descenso progresivo desde el ingreso hasta el 7° día. Descenso que al realizar el correspondiente test de comparación de medias ofreció un valor de F_{exp} de 26.614 ($p < 0,001$). Definida la existencia de diferencias entre los grupos, procedimos a desarrollar un análisis comparativo mediante la aplicación del test de Bonferroni (por la existencia de distinto número de casos). Con su aplicación encontramos que en todas las comparaciones, a posteriori, existían diferencias significativas ($p < 0,05$).

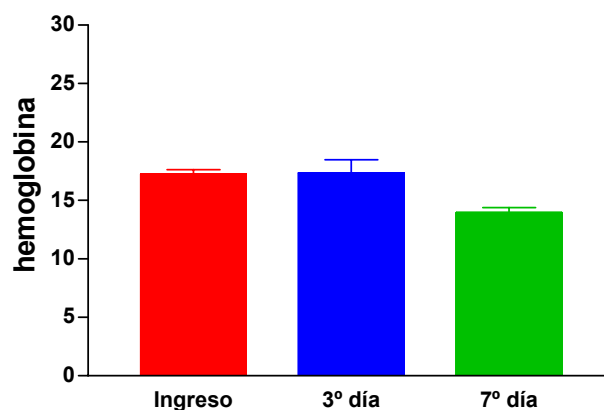
Tabla 90. Análisis de la varianza de una vía de la variable hemoglobina.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	208,840	2	104,420	6,317	,003
Intra-grupos	1471,119	89	16,529		
Total	1679,959	91			

Comparaciones múltiples Variable dependiente: HB Bonferroni

(I) Momento	(J) Momento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior	Límite superior
Ingreso	3° Día	-,110	1,0027	1,00		-2,557	2,337
	7° Día	3,293	1,0526	,007		,724	5,861
3° Día	Ingreso	,110	1,0027	1,00		-2,337	2,557
	7° Día	3,403	1,0812	,007		,765	6,041
7° Día	Ingreso	-3,293	1,0526	,007		-5,861	-,724
	3° Día	-3,403	1,0812	,007		-6,041	-,765

* La diferencia entre las medias es significativa (p<0,05)



El comportamiento que experimenta la variable hemoglobina es similar al de la variable hematocrito, como era de esperar. Se produce de nuevo un descenso progresivo de sus valores desde el ingreso hasta el 7° día. Al realizar el test de comparación de medias se obtuvo un valor de F_{exp} de 6,317. Posteriormente procedimos a desarrollar un análisis comparativo con la aplicación del test de Bonferroni, encontrándose diferencias significativas entre los grupos de estudio señalados en la tabla, con una $p < 0,05$.

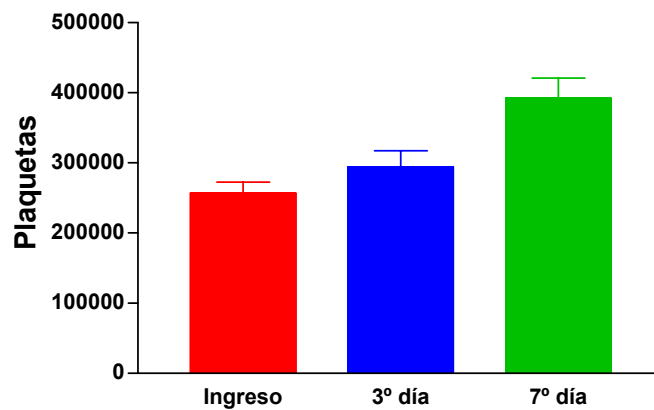
Tabla 91. Análisis de la varianza de una vía de la variable **plaquetas**.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	282313190323,775	2	141156595161,888	9,429	,000
Intra-grupos	1332395219567,529	89	14970732804,130		
Total	1614708409891,304	91			

Comparaciones múltiples Variable dependiente: PLAQUET Bonferroni

(I) Momento	(J) Momento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	Límite inferior	Límite superior
Ingreso	3° Día	-37631,80	30177,18	,647		-111266,25	36002,66
	7° Día	-135520,88	31678,58	,000		-212818,87	-58222,89
3° Día	Ingreso	37631,80	30177,18	,647		-36002,66	111266,25
	7° Día	-97889,08	32538,04	,010		-177284,22	-18493,95
7° Día	Ingreso	135520,88	31678,58	,000		58222,89	212818,87
	3° Día	97889,08	32538,04	,010		18493,95	177284,22

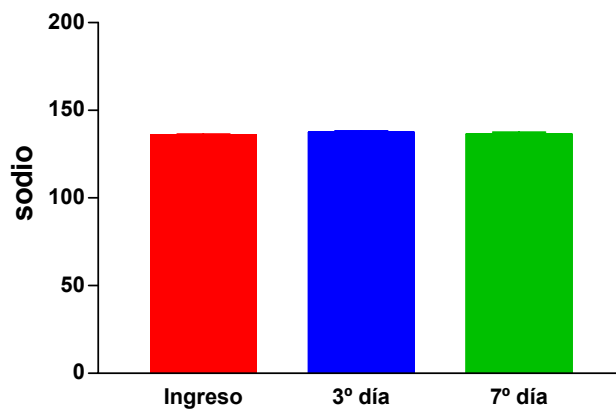
* La diferencia entre las medias es significativa ($p < 0,05$).



La variable plaquetas mostró un comportamiento en cada uno de los grupos como se expresa en la anterior tabla y figura, con un aumento progresivo del número de plaquetas desde el ingreso hasta el 7° día. Al realizar el correspondiente test de comparación de medias se obtuvo un valor de F_{exp} de 9.429. Una vez definida la existencia de diferencias entre los grupos, se realizó un análisis comparativo mediante la aplicación del test de Bonferroni. Con su aplicación encontramos que, en las comparaciones a posteriori señaladas, existían diferencias significativas con $p < 0,05$.

Tabla 92. Análisis de la varianza de una vía de la variable **sodio**.

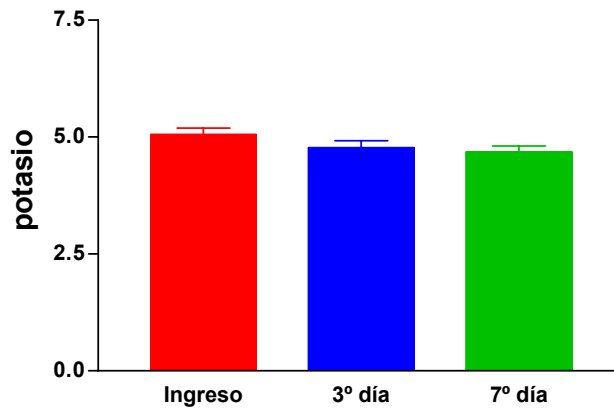
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	38,684	2	19,342	,976	,381
Intra-grupos	1783,380	90	19,815		
Total	1822,065	92			



La variable sodio, como se aprecia en la tabla y figura representada, no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los tres momentos de estudio. El valor de la F_{exp} fue de 0,976, claramente inferior al valor de la F_{α} teórica.

Tabla 93. Análisis de la varianza de una vía de la variable **potasio**.

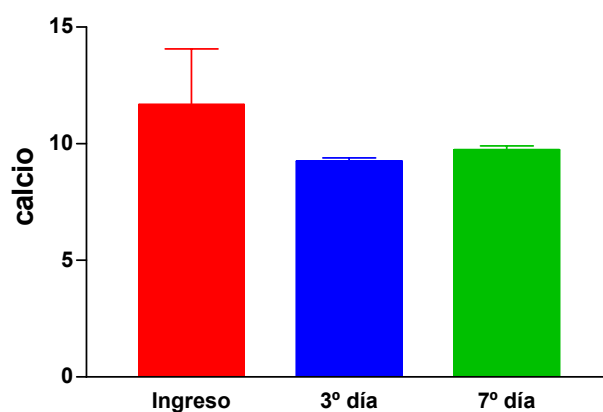
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,350	2	1,175	1,823	,167
Intra-grupos	58,001	90	,644		
Total	60,351	92			



Como se puede apreciar en la tabla y figura representada, tampoco se encontraron, en relación a la variable potasio, diferencias significativas entre los tres grupos de estudio tras realizar el análisis estadístico correspondiente. Se obtuvo una F_{exp} de 1,823, inferior a la F_{α} teórica.

Tabla 94. Análisis de la varianza de una vía de la variable **calcio**.

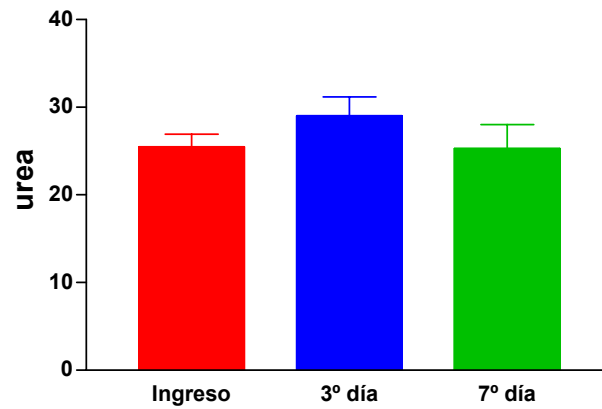
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	109,257	2	54,628	,716	,491
Intra-grupos	6861,979	90	76,244		
Total	6971,236	92			



La variable calcio experimentó un comportamiento, como se puede apreciar en la tabla y figura representada, similar al resto de los iones. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 momentos de estudio, con F_{exp} de 0,716, valor inferior al F_{α} teórico; por lo que se acepta la hipótesis de igualdad entre las distintas medias estudiadas.

Tabla 95. Análisis de la varianza de una vía de la variable **urea**.

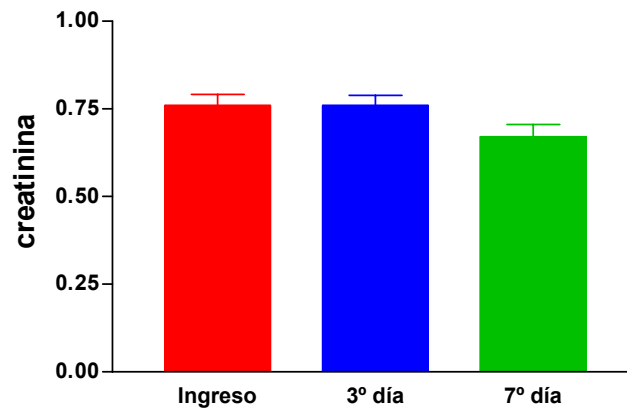
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	267,907	2	133,954	1,009	,369
Intra-grupos	11944,372	90	132,715		
Total	12212,280	92			



En la tabla y figura se aprecia que no existen diferencias estadísticamente significativas en los tres momentos de estudio de la variable urea, con una F_{exp} de 1,009, inferior a la F_{α} teórica.

Tabla 96. Análisis de la varianza de una vía de la variable **creatinina**.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,141	2	,070	2,282	,108
Intra-grupos	2,749	89	,031		
Total	2,890	91			



En esta tabla y figura se puede apreciar que no se produjeron alteraciones en los niveles de creatinina en los tres momentos de estudio. La F_{exp} de 2,282 está por debajo de la F_{α} teórica, por lo que se acepta la hipótesis de igualdad entre las distintas medias estudiadas.

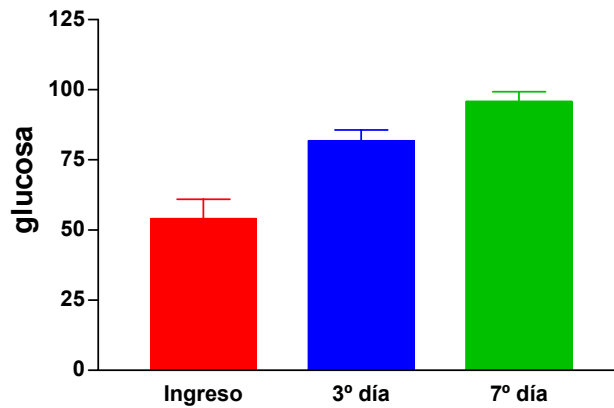
Tabla 97. Análisis de la varianza de una vía de la variable **glucosa**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	28022,056	2	14011,028	16,169	,000
Intra-grupos	77121,379	89	866,532		
Total	105143,435	91			

Comparaciones múltiples Variable dependiente: GLUCOSA Bonferroni

(I) Momento	(J) Momento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ingreso	3° Día	-27,84	7,310	,001	-45,68	-10,00
	7° Día	-41,74	7,588	,000	-60,26	-23,23
3° Día	Ingreso	27,84	7,310	,001	10,00	45,68
	7° Día	-13,90	7,749	,229	-32,81	5,01
7° Día	Ingreso	41,74	7,588	,000	23,23	60,26
	3° Día	13,90	7,749	,229	-5,01	32,81

La diferencia entre las medias es significativa ($p < 0,05$).

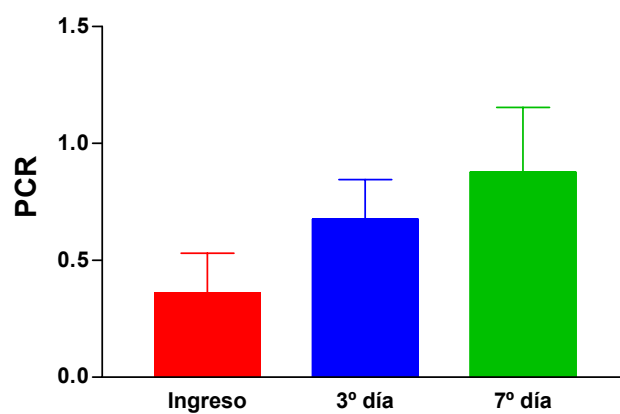


En esta tabla y figura se aprecia un ascenso de los niveles de glucosa desde el ingreso hasta el 7° día. Ascenso que al realizar el correspondiente test de comparación de medias ofreció un valor de F_{exp} de 16,169. Definida la existencia de diferencias entre los grupos, procedimos a desarrollar un análisis comparativo mediante la aplicación del test de Bonferroni. Con su aplicación encontramos que, en las comparaciones señaladas a posteriori, existían diferencias significativas $p < 0,05$.

Tabla 98. Análisis de la varianza de una vía de la variable **proteína C reactiva**.

2.

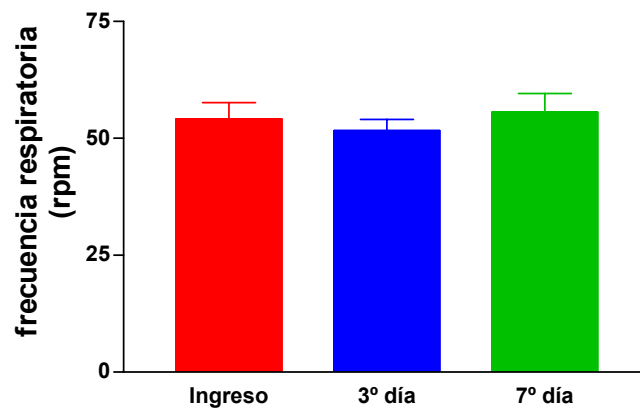
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4,158	2	2,079	1,645	,199
Intra-grupos	112,508	89	1,264		
Total	116,666	91			



En esta tabla y figura se puede apreciar que no existieron diferencias estadísticamente significativas en los tres momentos de estudio. El valor de la F_{exp} de 1,645 está por debajo de la F_{α} teórica para una $p < 0,05$.

Tabla 99. Análisis de la varianza de una vía de la variable **frecuencia respiratoria**.

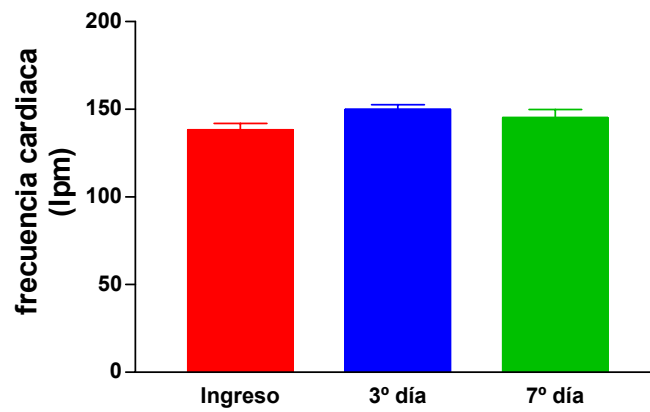
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	232,248	2	116,124	,332	,718
Intra-grupos	31810,603	91	349,567		
Total	32042,851	93			



En relación a la variable frecuencia respiratoria, en la tabla y figura se aprecia que no existieron diferencias estadísticamente significativas en los tres momentos de estudio, al obtener una F_{exp} de 0,332, claramente inferior a la F_{α} teórica.

Tabla 100. Análisis de la varianza de una vía de la variable **frecuencia cardiaca**.

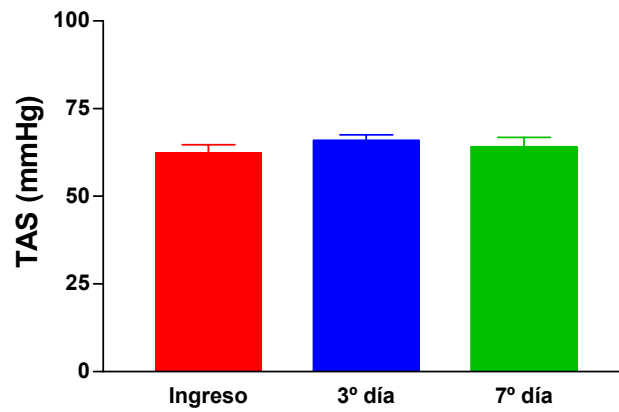
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2299,497	2	1149,748	2,638	,077
Intra-grupos	39667,705	91	435,909		
Total	41967,202	93			



En esta tabla y figura se puede apreciar que no se produjeron diferencias en los valores de la frecuencia cardiaca en los tres momentos de estudio, al obtener una de $F_{\text{exp}} 2,638$, inferior a la F_{α} teórica.

Tabla 101. Análisis de la varianza de una vía de la variable **tensión arterial sistólica**.

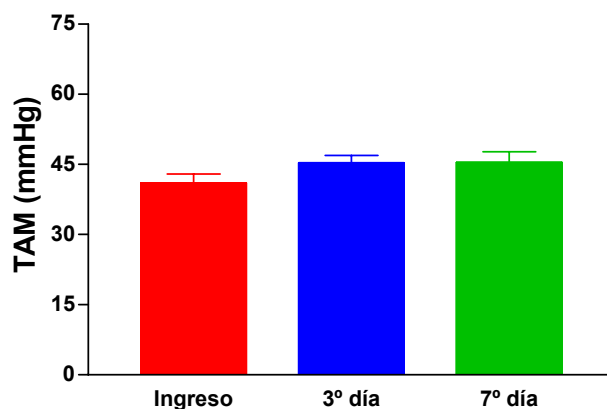
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	208,449	2	104,224	,635	,532
Intra-grupos	14932,455	91	164,093		
Total	15140,904	93			



No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los tres momentos de estudio de la variable tensión arterial sistólica, como se puede apreciar en esta tabla y figura. El valor de la de F_{exp} 0,635 es inferior al de la F_{α} teórica.

Tabla 102. Análisis de la varianza de una vía de la variable **tensión arterial media (TAM) (mmHg)**.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	410,015	2	205,008	1,765	,177
Intra-grupos	10456,264	90	116,181		
Total	10866,280	92			



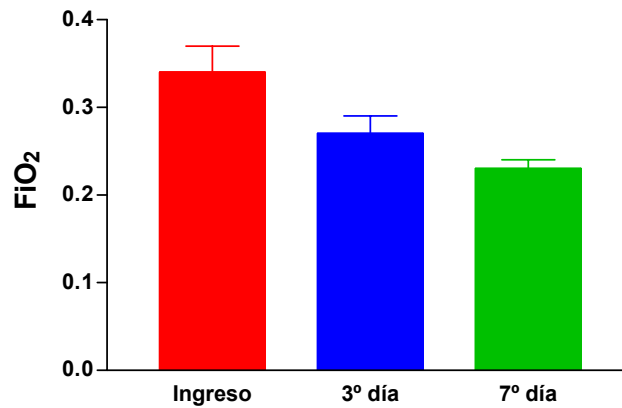
En la tabla y figura se observa, que al realizar el análisis estadístico en relación a la variable tensión arterial media, el valor de la F_{exp} fue de 1,765, claramente inferior al de la F_{α} teórica. En consecuencia, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres momentos de estudio.

Tabla 103. Análisis de la varianza de una vía de la variable **FiO₂**.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,201	2	,100	6,741	,002
Intra-grupos	1,339	90	,015		
Total	1,540	92			

Comparaciones múltiples Variable dependiente: FIO2 Bonferroni

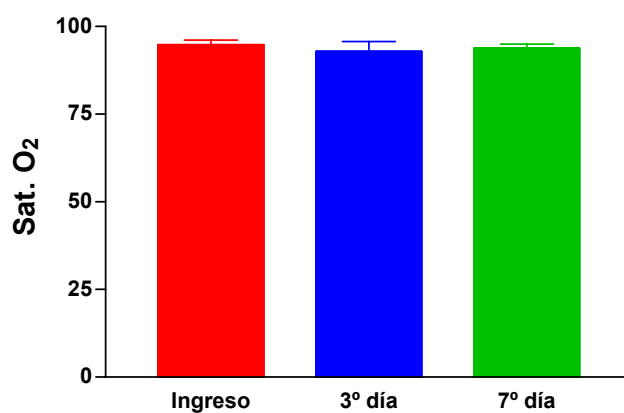
(I) Momento	(J) Momento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ingreso	3° Día	,0698	,03035	,071	-,0042	,1439
	7° Día	,1111	,03093	,002	,0357	,1866
3° Día	Ingreso	-,0698	,03035	,071	-,1439	,0042
	7° Día	,0413	,03205	,602	-,0369	,1195
7° Día	Ingreso	-,1111	,03093	,002	-,1866	-,0357
	3° Día	-,0413	,03205	,602	-,1195	,0369

* La diferencia entre las medias es significativa ($p < 0,05$).

La variable fracción inspirada de oxígeno (FiO₂), tuvo un comportamiento en los tres momentos de estudio como se aprecia en la tabla de ANOVA; produciéndose un descenso progresivo de sus niveles desde el ingreso hasta el 7° día. Al realizar el test de comparación de medias se obtuvo una F_{exp} de 6,741. Posteriormente se realizó un análisis comparativo mediante la aplicación del test de Bonferroni, encontrándose diferencias significativas en las comparaciones señaladas ($p < 0,05$).

Tabla 104. Análisis de la varianza de una vía de la variable **Sat. O₂**.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	41,915	2	20,958	,232	,793
Intra-grupos	6501,588	72	90,300		
Total	6543,503	74			



En la tabla y figura representada se aprecia que no se encontraron diferencias significativas en los tres momentos de estudio para la variable saturación de oxígeno (Sat. O₂) al realizar el correspondiente análisis estadístico. La F_{exp} fue de 0,232.

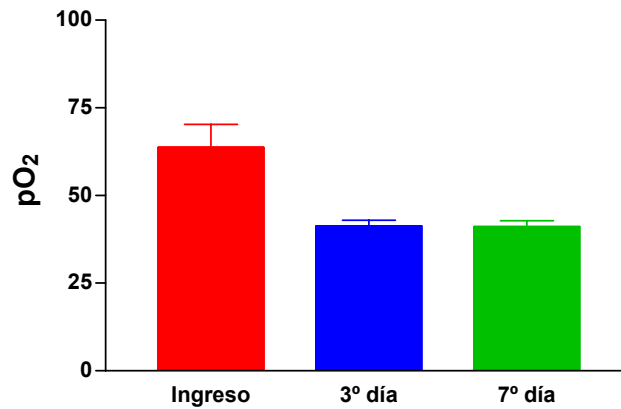
Tabla 105. Análisis de la varianza de una vía de la variable **presión parcial de oxígeno (pO₂)**.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	10853,545	2	5426,772	9,009	,000
Intra-grupos	53613,747	89	602,402		
Total	64467,292	91			

Comparaciones múltiples Variable dependiente: PO₂ Bonferroni

(I) Momento	(J) Momento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ingreso	3º Día	22,410	6,1480	,001	7,408	37,412
	7º Día	22,600	6,2635	,002	7,316	37,884
3º Día	Ingreso	-22,410	6,1480	,001	-37,412	-7,408
	7º Día	,190	6,4494	1,000	-15,547	15,927
7º Día	Ingreso	-22,600	6,2635	,002	-37,884	-7,316
	3º Día	-,190	6,4494	1,000	-15,927	15,547

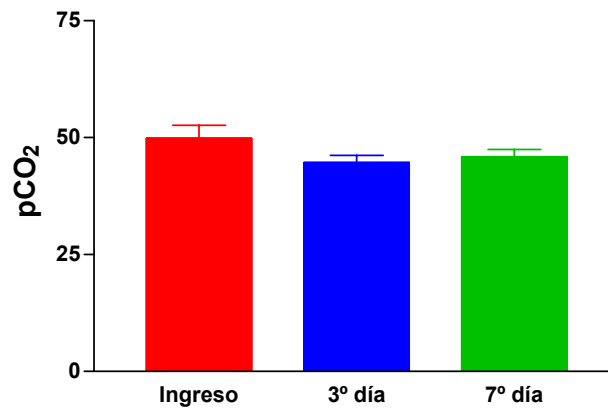
* La diferencia entre las medias es significativa ($p < 0,05$).



En la anterior tabla y figura se observa el comportamiento que experimenta la variable presión parcial de oxígeno, con un descenso marcado de sus valores entre el ingreso y el 3^{er} y 7^o día, y menos acusado entre el 3^{er} y 7^o día. Al realizar el test de comparación de medias se obtuvo una F_{exp} de 9,009; por lo que definida la existencia de diferencias se procedió a la realización de test de Bonferroni, encontrando diferencias estadísticamente significativas en los grupos reflejados en la tabla con $p < 0,05$.

Tabla 106. Análisis de la varianza de una vía de la variable **presión parcial de dióxido de carbono (pCO₂)**.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	491,249	2	245,625	1,673	,193
Intra-grupos	13356,765	91	146,778		
Total	13848,015	93			



Como se puede apreciar en la siguiente tabla y figura, el valor de la F_{exp} fue de 1,673, claramente inferior al valor de la F_{α} teórica. Por tanto, podemos concluir que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres momentos de estudio.

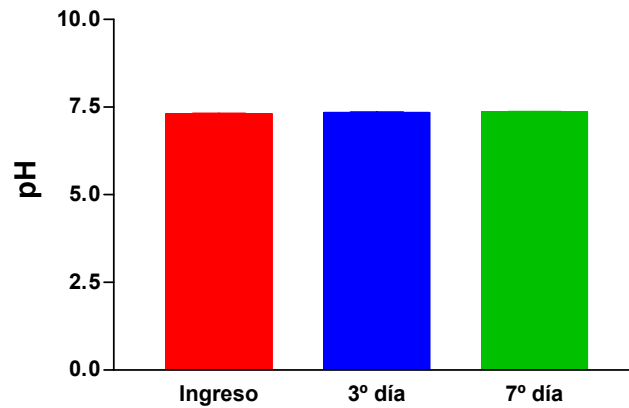
Tabla 107. Análisis de la varianza de una vía de la variable pH.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,072	2	,036	4,020	,021
Intra-grupos	,817	91	,009		
Total	,889	93			

Comparaciones múltiples Variable dependiente: PH Bonferroni

		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
(I) Momento	(J) Momento				Límite inferior	Límite superior
Ingreso	3° Día	-,0451	,02337	,170	-,1021	,0119
	7° Día	-,0656	,02402	,023	-,1242	-,0070
3° Día	Ingreso	,0451	,02337	,170	-,0119	,1021
	7° Día	-,0205	,02470	1,000	-,0807	,0398
7° Día	Ingreso	,0656	,02402	,023	,0070	,1242
	3° Día	,0205	,02470	1,000	-,0398	,0807

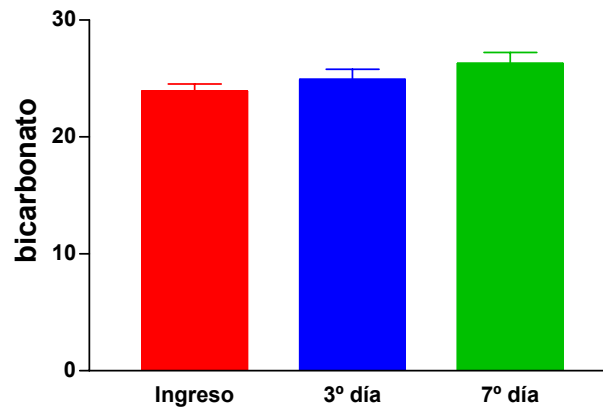
* La diferencia entre las medias es significativa ($p < 0,05$).



Al realizar el test de comparación de medias entre los tres momentos de estudio para la variable pH, obtuvimos una F_{exp} de 4,020, por lo que definida la existencia de diferencias entre los grupos procedimos a desarrollar un análisis estadístico mediante la aplicación del test de Bonferroni, que refleja diferencias significativas al ingreso y 7° día y al 7° día e ingreso, con $p < 0,05$.

Tabla 108. Análisis de la varianza de una vía de la variable bicarbonato.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	86,576	2	43,288	2,116	,126
Intra-grupos	1861,607	91	20,457		
Total	1948,183	93			



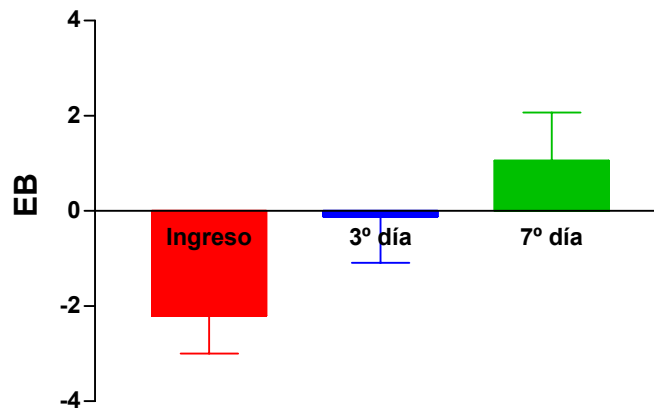
En esta figura se observa que no se produjeron diferencias en los valores de bicarbonato en los tres momentos de estudio (ingreso, 3^{er} y 7^o día). La F_{exp} de 2,116 es inferior al valor de la F_{α} teórica. Por tanto, se acepta la hipótesis de igualdad entre los tres momentos de estudio.

Tabla 109. Análisis de la varianza de una vía de la variable **exceso de bases (EB)**.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	173,781	2	86,890	3,304	,041
Intra-grupos	2393,114	91	26,298		
Total	2566,895	93			

Comparaciones múltiples Variable dependiente: EB Bonferroni

(I) Momento	(J) Momento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ingreso	3° Día	-2,087	1,2648	,307	-5,172	,998
	7° Día	-3,260	1,3002	,042	-6,431	-,089
3° Día	Ingreso	2,087	1,2648	,307	-,998	5,172
	7° Día	-1,173	1,3370	1,000	-4,434	2,088
7° Día	Ingreso	3,260	1,3002	,042	,089	6,431
	3° Día	1,173	1,3370	1,000	-2,088	4,434

* La diferencia entre las medias es significativa ($p < 0,05$).

En esta tabla y figura se puede apreciar que se produjeron alteraciones en los niveles de exceso de bases en los tres momentos del estudio, con una $F_{\text{exp}} 3,304$. Una vez definida la existencia de diferencias entre los grupos procedimos a desarrollar un análisis comparativo mediante la aplicación del test de Bonferroni, mostrando diferencias entre los grupos que quedan reflejados en la tabla ($p < 0,05$).

4. ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE 2 VÍAS

Tabla 110. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **melatonina**

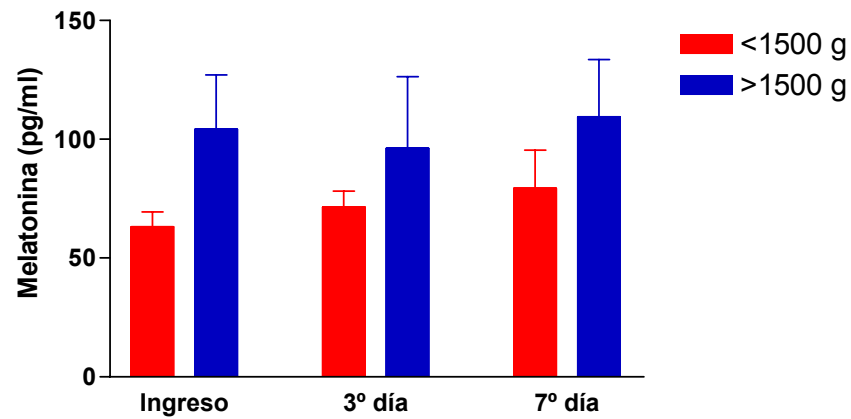
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	523717,04	1	523717,04	29,78	,11
	Error	17587,85	1	17587,85		
MOMENTO	Hipótesis	1560,17	2	780,08	1,76	,36
	Error	888,72	2	444,36		
PESO	Hipótesis	17587,85	1	17587,85	36,80	,017
	Error	1140,56	2,39	477,93		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	888,72	2	444,36	,17	,84
	Error	182675,21	70	2609,65		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,984 MS(MOMENTO * PESO) + 1,550E-02 MS(Error)

d MS(Error)



Como se aprecia en la anterior tabla y figura, al realizar un test de ANOVA de 2 vías con la variable melatonina (aMT), se encontraron diferencias estadísticamente significativas al considerar el factor peso (<1.500 g y >1.500 g), con una f_{exp} de 36,80 y $p= 0,017$. Así como, ausencia de cambios en función del día de obtención de la muestra, aunque en ambos grupos la concentración de aMT aumentó en los primeros días de vida, sin alcanzar una diferencia estadísticamente significativa ($f_{exp}= 1,72$, $p= NS$).

Tabla 111. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **leucocitos**.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección Hipótesis	14426346287,72	1	14426346287,72	41,08	,10
Error	351130391,29	1	351130391,29		
MOMENTO Hipótesis	404403022,33	2	202201511,16	1,48	,40
Error	273381089,88	2	136690544,94		
PESO Hipótesis	351130391,29	1	351130391,29	2,59	,25
Error	278614618,25	2,05	135790212,26		
MOMENTO * PESO Hipótesis	273381089,89	2	136690544,94	1,52	,22
Error	7724552409,5	86	89820376,85		

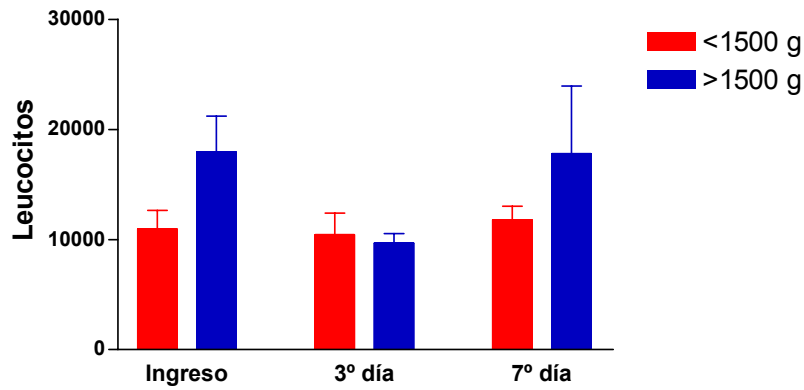
a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,981 MS(MOMENTO * PESO) + 1,921E-02 MS(Error)

d MS(Error)

3.



El análisis mediante ANOVA de la variable leucocitos, demostró que no existían diferencias estadísticamente significativas en función de los factores peso ni momento, con una t_{exp} de 2,59 y 1,48 respectivamente; como se aprecia en la anterior tabla y figura.

Tabla 112. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **polimorfonucleares (PMN)**.

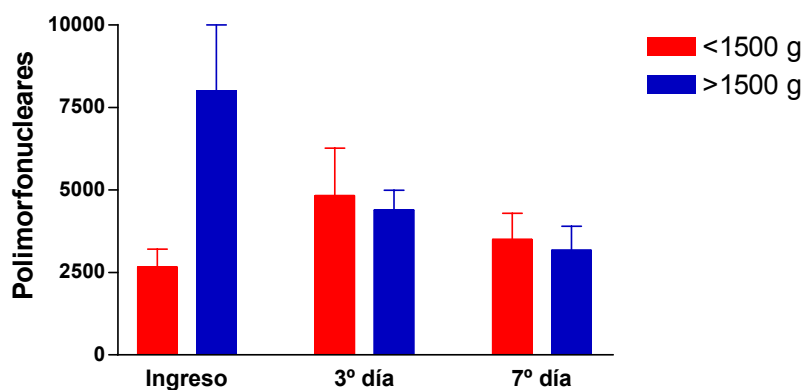
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	1643830409,0	1	1643830409,0	33,49	,11
	Error	49076527,02	3	16355509,01		
MOMENTO	Hipótesis	54119950,40	2	27059975,20	,31	,76
	Error	172058995,97	2	86029497,99		
PESO	Hipótesis	49076527,02	1	49076527,02	,58	,53
	Error	171587891,16	2,02	84846683,06		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	172058995,97	2	86029497,99	3,52	,03
	Error	2103015227,9	86	24453665,44		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,981 MS(MOMENTO * PESO) + 1,921E-02 MS(Error)

d MS(Error)



Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas al realizar test de ANOVA con la variable PMN, ni con relación al factor peso ni al factor momento; como se aprecia en tabla y figura.

Tabla 113. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable hematocrito.

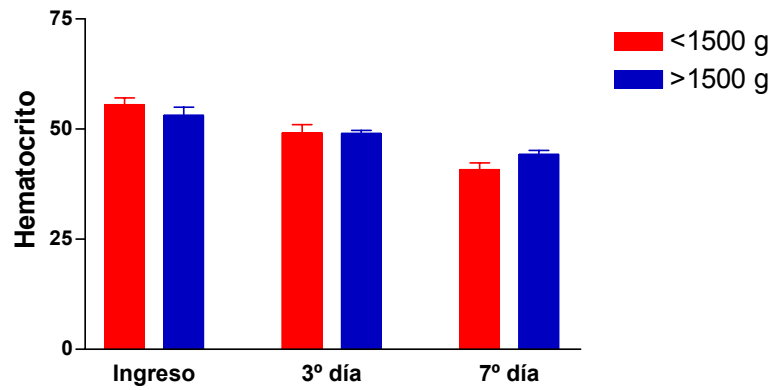
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	199033,77	1	199033,77	122384,01	,00
	Error	1,63	1	1,63		
MOMENTO	Hipótesis	1909,64	2	954,82	16,11	,056
	Error	118,50	2	59,25		
PESO	Hipótesis	1,63	1	1,63	,03	,88
	Error	121,39	2,06	58,96		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	118,50	2	59,25	1,34	,27
	Error	3799,88	86	44,18		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,981 MS(MOMENTO * PESO) + 1,921E-02 MS(Error)

d MS(Error)



El análisis mediante ANOVA demostró un descenso progresivo del hematocrito en función del momento de obtención de la muestra, con una $f= 16,11$ y $p= 0,056$. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en función del peso del recién nacido, como se aprecia en la anterior tabla y figura.

Tabla 114. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable hemoglobina.

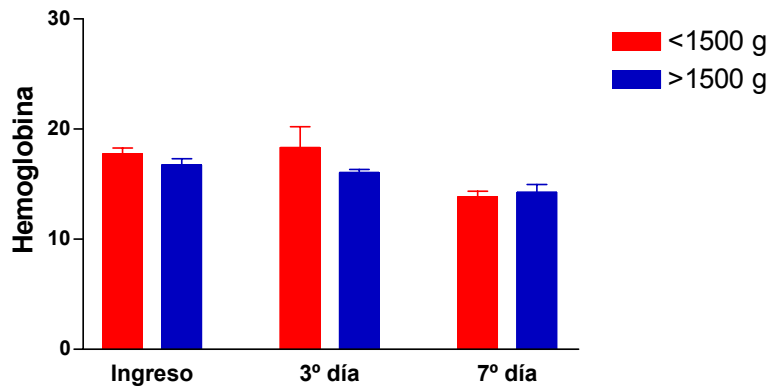
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	21977,20	1	21977,20	1140,70	,02
	Error	19,27	1	19,27		
MOMENTO	Hipótesis	166,69	2	83,34	7,29	,12
	Error	22,87	2	11,43		
PESO	Hipótesis	19,27	1	19,27	1,67	,32
	Error	24,39	2,11	11,53		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	22,87	2	11,43	,69	,50
	Error	1422,62	86	16,54		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,981 MS(MOMENTO * PESO) + 1,921E-02 MS(Error)

d MS(Error)



La variable hemoglobina mostró un comportamiento, al realizar el análisis de ANOVA, como se aprecia en la anterior tabla y figura; sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas ni con relación al factor peso ni al factor momento.

Tabla 115. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **plaquetas**.

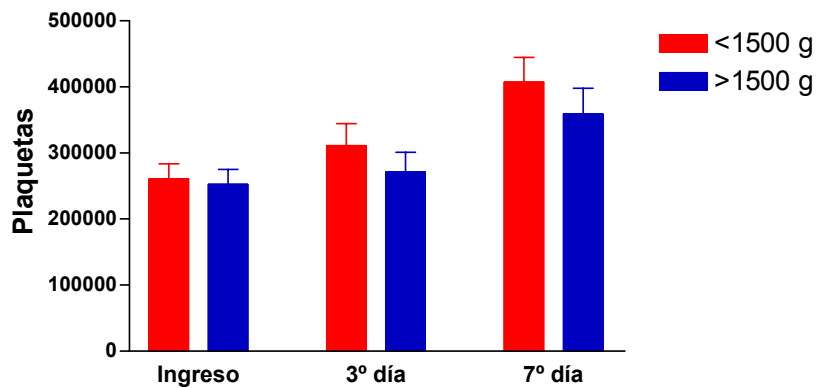
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	810366505334 5,87	1	810366505334 5,87	369,56	,03
	Error	21927743714, 93	1	21927743714, 93		
MOMENTO	Hipótesis	220796522673 ,50	2	110398261336 ,75	32,84	,03
	Error	6723709718,9 8	2	3361854859,4 9		
PESO	Hipótesis	21927743714, 93	1	21927743714, 93	6,11	,11
	Error	8503744265,7 9	2,369	3589137021,8 3		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	6723709718,9 8	2	3361854859,4 9	,22	,80
	Error	130667312500 5,03	86	15193873546, 57		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,981 MS(MOMENTO * PESO) + 1,921E-02 MS(Error)

d MS(Error)



El análisis mediante ANOVA demostró un descenso significativo de las plaquetas en función del día de obtención de la muestra, con una $F= 32,84$ y $p= 0,03$; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en función del peso del recién nacido.

Tabla 116. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **sodio**.

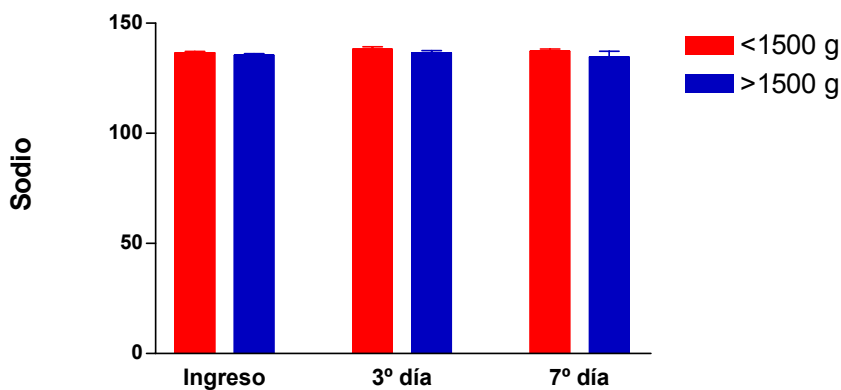
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	1620541,96	1	1620541,96	23125,72	,00
	Error	70,07	1	70,07		
MOMENTO	Hipótesis	37,99	2	18,99	4,26	,19
	Error	8,92	2	4,46		
PESO	Hipótesis	70,07	1	70,07	15,08	,05
	Error	10,35	2,23	4,65		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	8,92	2	4,46	,23	,80
	Error	1710,35	87	19,66		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,988 MS(MOMENTO * PESO) + 1,237E-02 MS(Error)

d MS(Error)



El análisis mediante ANOVA de la variable sodio, demostró que existían diferencias estadísticamente significativas con respecto al peso del recién nacido ($f= 15,08$ y $p= 0,05$), no siendo así en función del momento de obtención de la muestra ($f= 4,26$, $p= 0,19$).

Tabla 117. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **potasio**.

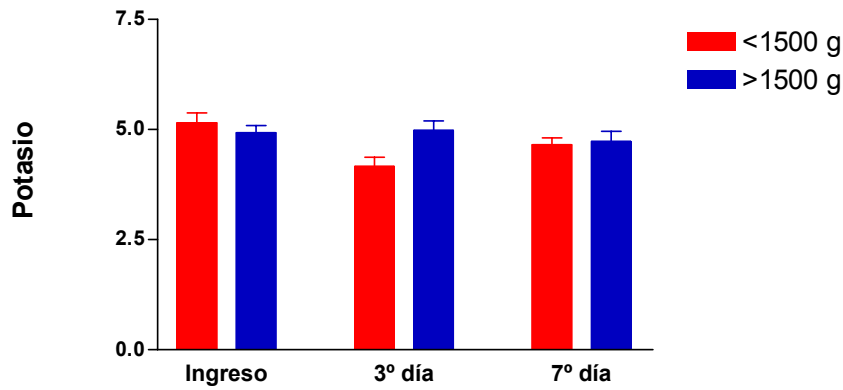
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	2042,77	1	2042,77	14408,47	,00
	Error	,14	1	,14		
MOMENTO	Hipótesis	1,96	2	,98	1,40	,42
	Error	1,40	2	,70		
PESO	Hipótesis	,14	1	,14	,20	,70
	Error	1,44	2,05	,70		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	1,40	2	,70	1,08	,34
	Error	56,50	87	,65		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,988 MS(MOMENTO * PESO) + 1,237E-02 MS(Error)

d MS(Error)



La variable potasio mostró un comportamiento, al realizar el análisis de ANOVA, como se aprecia en la anterior tabla y figura, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas ni con relación al factor peso ni al momento.

Tabla 118. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **calcio**.

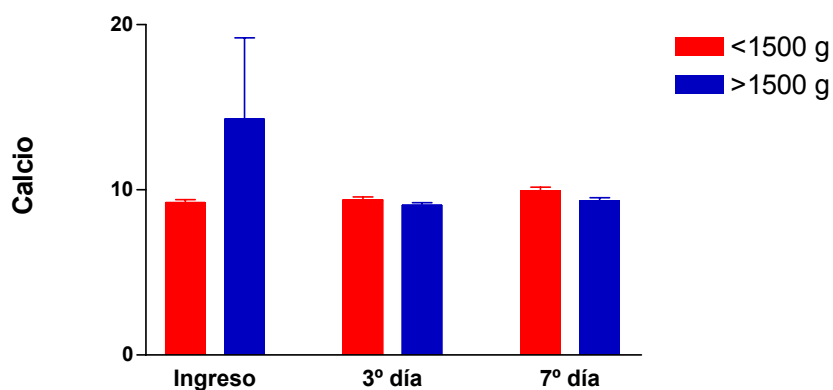
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	9063,70	1	9063,70	224,27	,04
	Error	40,41	1	40,41		
MOMENTO	Hipótesis	119,26	2	59,63	,74	,58
	Error	161,77	2	80,88		
PESO	Hipótesis	40,41	1	40,41	,50	,55
	Error	165,49	2,05	80,83		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	161,77	2	80,88	1,06	,35
	Error	6635,95	87	76,27		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,988 MS(MOMENTO * PESO) + 1,237E-02 MS(Error)

d MS(Error)



Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas, al realizar análisis de ANOVA, con relación a la variable calcio, ni en los distintos momentos de estudio ni en función del peso del recién nacido.

Tabla 119. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **urea**.

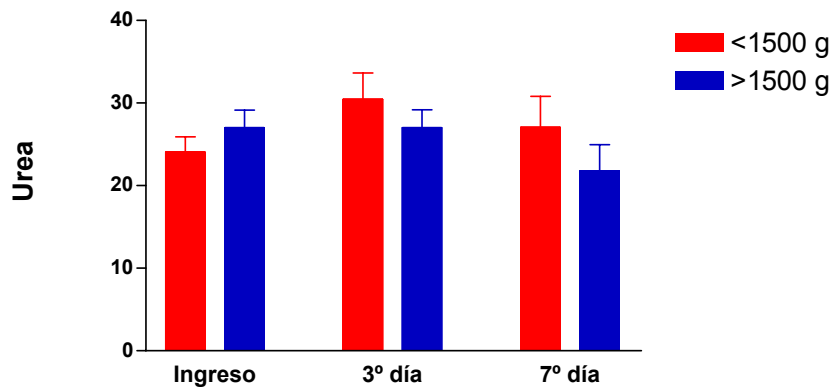
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	59860,50	1	59860,50	741,51	,02
	Error	80,73	1	80,73		
MOMENTO	Hipótesis	283,12	2	141,56	,99	,50
	Error	286,76	2	143,38		
PESO	Hipótesis	80,73	1	80,73	,56	,53
	Error	293,24	2,05	143,26		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	286,76	2	143,38	1,07	,35
	Error	11611,89	87	133,47		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,988 MS(MOMENTO * PESO) + 1,237E-02 MS(Error)

d MS(Error)



La variable urea mostró un comportamiento, al realizar el análisis de ANOVA, como se aprecia en la anterior tabla y figura, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas ni con relación al factor peso ni al momento.

Tabla 120. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **creatinina**.

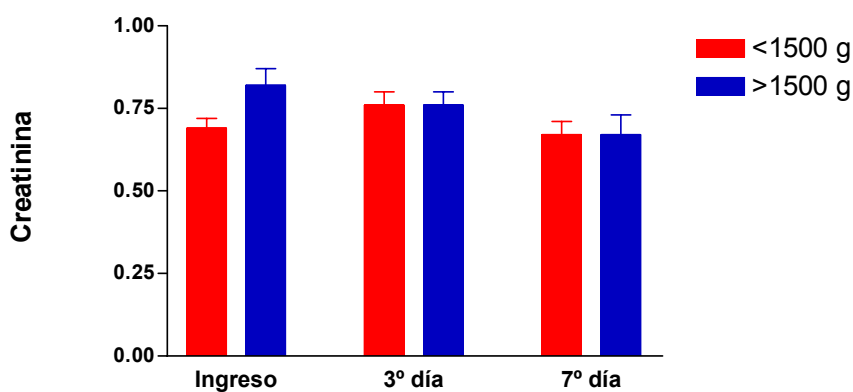
Fuente		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
tipo III						
Intersección	Hipótesis	45,08	1	45,08	1349,70	,02
	Error	3,340E-02	1	3,340E-02		
MOMENTO	Hipótesis	,13	2	6,485E-02	1,40	,42
	Error	9,262E-02	2	4,631E-02		
PESO	Hipótesis	3,340E-02	1	3,340E-02	,73	,48
	Error	9,437E-02	2,052	4,600E-02		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	9,262E-02	2	4,631E-02	1,53	,22
	Error	2,60	86	3,028E-02		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,981 MS(MOMENTO * PESO) + 1,921E-02 MS(Error)

d MS(Error)



Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas, al realizar análisis de ANOVA, con relación a la variable creatinina, ni en los distintos momentos de estudio ni en función del peso del recién nacido.

Tabla 121. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **glucosa**.

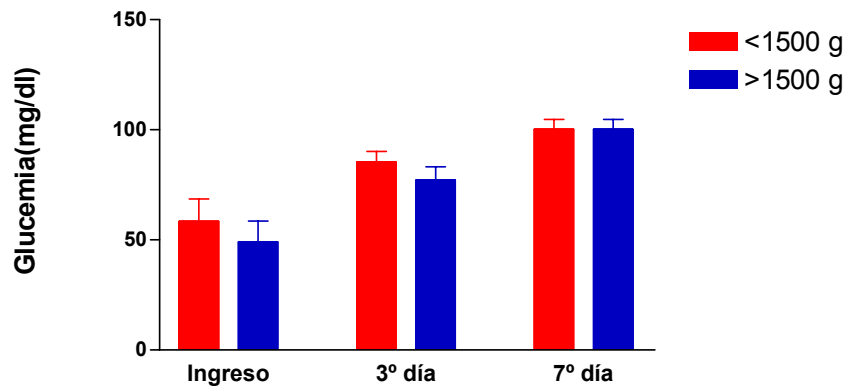
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	500171,08	1	500171,08	217,54	,04
	Error	2299,24	1	2299,24		
MOMENTO	Hipótesis	24608,60	2	12304,30	247,63	,00
	Error	99,38	2	49,69		
PESO	Hipótesis	2299,24	1	2299,24	39,30	,01
	Error	165,56	2,83	58,50		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	99,38	2	49,69	,06	,94
	Error	74792,42	86	869,68		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,989 MS(MOMENTO * PESO) + 1,074E-02 MS(Error)

d MS(Error)



El análisis mediante ANOVA demostró un aumento significativo de la glucemia en función del día de obtención de la muestra, con una $f= 247,63$, $p= 0,00$ y también diferencias significativas en función del peso del recién nacido, siendo la glucemia mayor en el grupo de RN con peso > 1.500 g.

Tabla 122. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **proteína C reactiva (PCR)**.

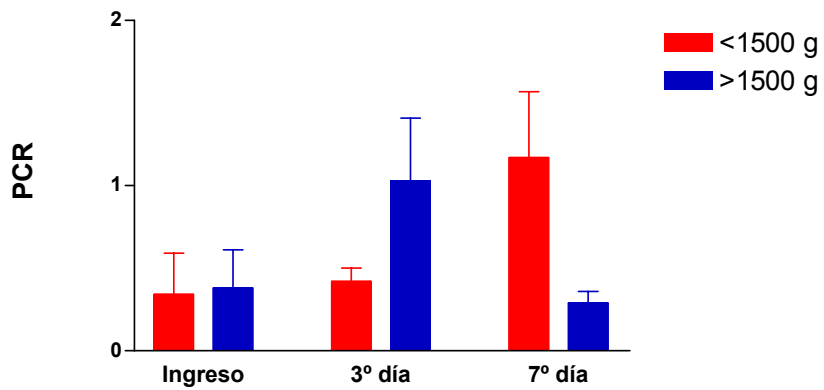
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	31,67	1	31,67	236,90	,04
	Error	,13	1	,13		
MOMENTO	Hipótesis	2,80	2	1,40	,38	,72
	Error	7,38	2	3,69		
PESO	Hipótesis	,13	1	,13	,04	,87
	Error	7,38	2,01	3,66		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	7,38	2	3,69	3,02	,05
	Error	105,12	86	1,22		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,989 MS(MOMENTO * PESO) + 1,091E-02 MS(Error)

d MS(Error)



La variable PCR mostró un comportamiento, al realizar el análisis de ANOVA, como se aprecia en la anterior tabla y figura, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas ni con relación al factor peso ni al momento.

Tabla 123. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **frecuencia respiratoria**.

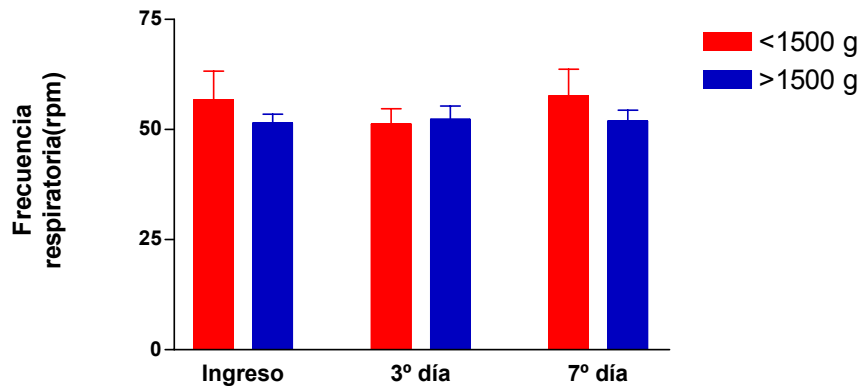
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	256430,85	1	256430,85	1057,71	,02
	Error	242,44	1	242,44		
MOMENTO	Hipótesis	143,86	2	71,93	,67	,60
	Error	215,83	2	107,92		
PESO	Hipótesis	242,44	1	242,44	2,21	,27
	Error	231,44	2,11	109,88		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	215,83	2	107,92	,30	,74
	Error	31350,90	88	356,26		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,992 MS(MOMENTO * PESO) + 7,891E-03 MS(Error)

d MS(Error)



No encontramos diferencias estadísticamente significativas, al realizar análisis de ANOVA, con relación a la variable frecuencia respiratoria, ni en los distintos momentos de estudio ni en función del peso.

Tabla 124. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **frecuencia cardiaca**.

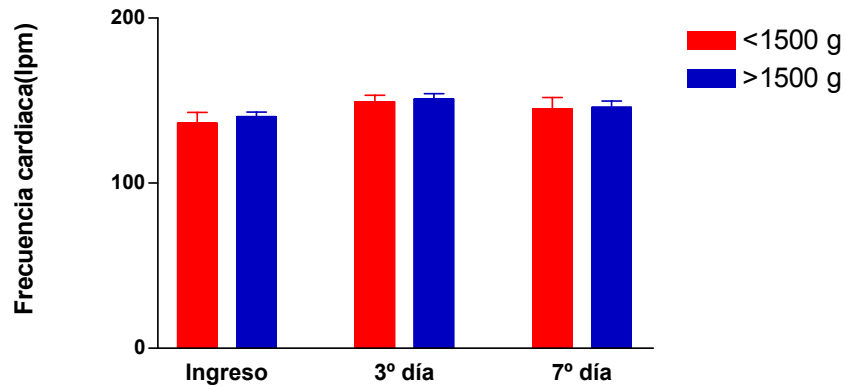
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	1869084,06	1	1869084,06	16180,09	,00
	Error	115,52	1	115,52		
MOMENTO	Hipótesis	2300,81	2	1150,40	54,28	,02
	Error	42,38	2	21,19		
PESO	Hipótesis	115,52	1	115,52	4,70	,13
	Error	67,03	2,73	24,57		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	42,38	2	21,19	,05	,95
	Error	39490,90	88	448,76		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,992 MS(MOMENTO * PESO) + 7,891E-03 MS(Error)

d MS(Error)



El análisis de ANOVA de la variable frecuencia cardiaca, mostró diferencias estadísticamente significativas en función del momento de obtención de la muestra, con una $f= 54,28$ y $p= 0,02$; sin embargo no existía significación considerando el peso del recién nacido.

Tabla 125. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **tensión arterial sistólica (TAS)**.

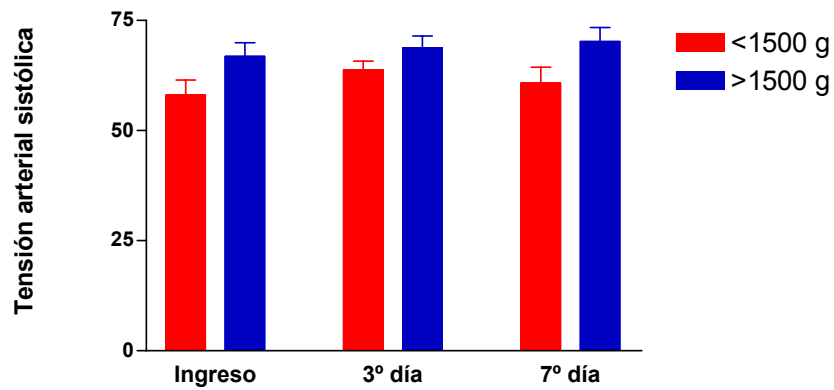
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	374882,18	1	374882,18	280,72	,04
	Error	1335,41	1	1335,41		
MOMENTO	Hipótesis	268,06	2	134,03	3,17	,24
	Error	84,42	2	42,21		
PESO	Hipótesis	1335,41	1	1335,41	30,99	,02
	Error	91,22	2,12	43,09		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	84,42	2	42,21	,27	,76
	Error	13501,54	88	153,43		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,992 MS(MOMENTO * PESO) + 7,891E-03 MS(Error)

d MS(Error)



El análisis mediante ANOVA demostró un aumento de la TAS en el grupo de recién nacido con peso >1500 g, con una $F= 30,99$ y $p= 0,02$. Sin embargo, no existía significación en función del día de medición de la tensión arterial, como muestran la tabla y figura anterior.

Tabla 126. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **tensión arterial media (TAM)**.

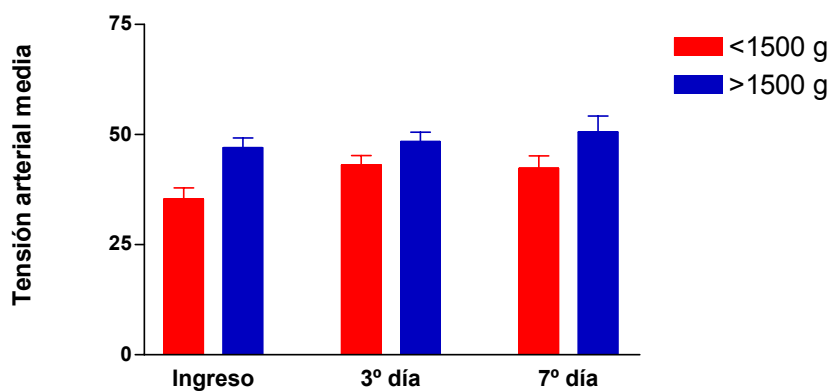
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	175517,17	1	175517,17	111,72	,06
	Error	1571,09	1	1571,09		
MOMENTO	Hipótesis	518,41	2	259,21	3,05	,25
	Error	169,72	2	84,86		
PESO	Hipótesis	1571,09	1	1571,09	18,49	,05
	Error	173,64	2,04	84,99		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	169,72	2	84,86	,86	,43
	Error	8616,08	87	99,03		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,991 MS(MOMENTO * PESO) + 9,105E-03 MS(Error)

d MS(Error)



El análisis mediante ANOVA de la TAM mostró unos mayores valores en el grupo de RN con peso >1.500 g, con una significación $p= 0,05$ y $f= 18,49$. En relación al factor momento no se vio significación.

Tabla 127. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable FiO_2 .

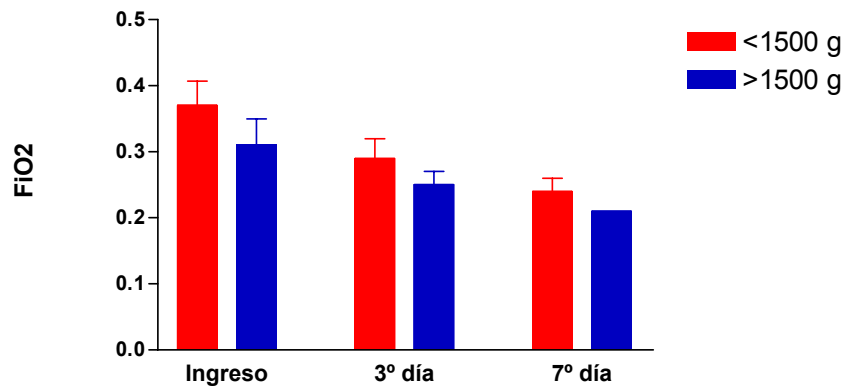
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	6,87	1	6,87	155,90	,05
	Error	4,408E-02	1	4,408E-02		
MOMENTO	Hipótesis	,20	2	,10	41,13	,02
	Error	4,952E-03	2	2,476E-03		
PESO	Hipótesis	4,408E-02	1	4,408E-02	17,14	,05
	Error	5,632E-03	2,19	2,571E-03		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	4,952E-03	2	2,476E-03	,17	,85
	Error	1,29	87	1,478E-02		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,992 MS(MOMENTO * PESO) + 7,730E-03 MS(Error)

d MS(Error)



Como se aprecia en la anterior tabla y figura, al realizar un test de ANOVA de 2 vías con la variable fracción inspirada de oxígeno (FiO_2), se encontraron diferencias estadísticamente significativas al considerar el factor peso (<1.500 g necesidad de mayor FiO_2) y el factor momento (disminución progresiva de la FiO_2), con una f_{exp} de 17,14, $p= 0,05$ y $f_{exp}= 41,13$, $p= 0,02$ respectivamente.

Tabla 128. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **saturación de oxígeno (Sat. O₂)**.

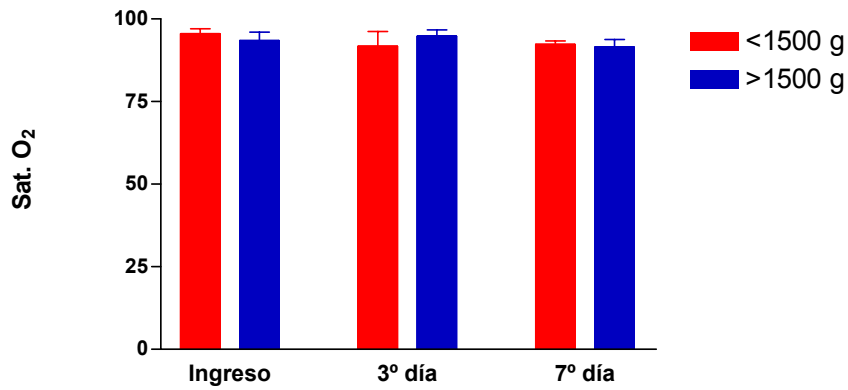
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	607022,49	1	607022,49	42083,36	,003
	Error	14,42	1	14,42		
MOMENTO	Hipótesis	19,81	2	9,90	,12	,89
	Error	157,95	2	78,98		
PESO	Hipótesis	14,42	1	14,42	,18	,71
	Error	160,75	2,03	79,07		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	157,95	2	78,98	,86	,43
	Error	6323,27	69	91,64		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,993 MS(MOMENTO * PESO) + 7,054E-03 MS(Error)

d MS(Error)



La variable saturación de oxígeno mostró un comportamiento, al realizar el análisis de ANOVA, como se aprecia en la anterior tabla y figura, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas ni con relación al factor peso ni al momento del estudio.

Tabla 129. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **presión parcial de oxígeno (pO₂)**.

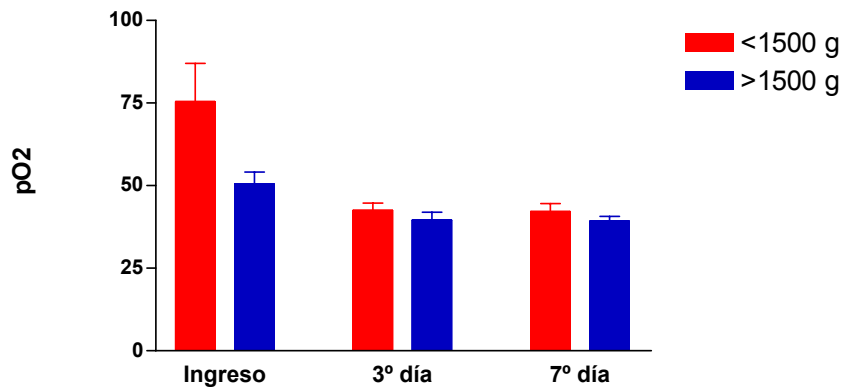
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	202872,75	1	202872,75	87,62	,07
	Error	2315,48	1	2315,48		
MOMENTO	Hipótesis	10220,58	2	5110,29	4,00	,20
	Error	2557,19	2	1278,59		
PESO	Hipótesis	2315,48	1	2315,48	1,82	,31
	Error	2562,25	2,01	1274,12		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	2557,19	2	1278,59	2,28	,11
	Error	48181,14	86	560,25		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,994 MS(MOMENTO * PESO) + 6,224E-03 MS(Error)

d MS(Error)



La variable presión parcial oxígeno mostró un comportamiento, al realizar el análisis de ANOVA, como se aprecia en la anterior tabla y figura, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas ni con relación al factor peso ni al momento del estudio.

Tabla 130. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **presión parcial de dióxido de carbono (pCO₂)**.

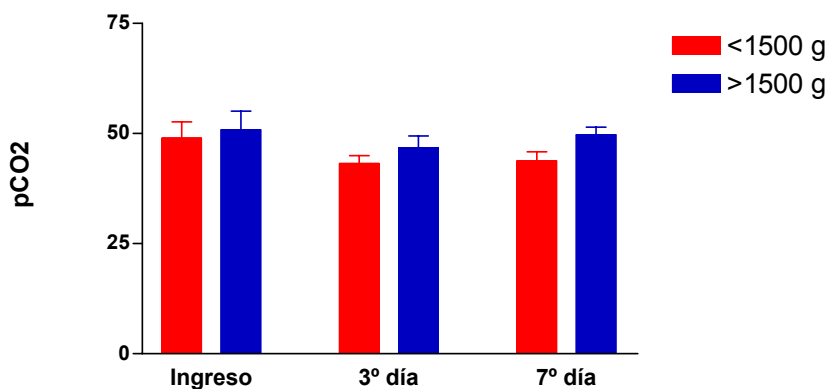
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	199131,85	1	199131,85	616,55	,03
	Error	322,98	1	322,98		
MOMENTO	Hipótesis	410,45	2	205,22	6,91	,13
	Error	59,42	2	29,71		
PESO	Hipótesis	322,98	1	322,98	10,54	,07
	Error	66,22	2,16	30,64		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	59,42	2	29,71	,20	,82
	Error	13003,43	88	147,77		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,992 MS(MOMENTO * PESO) + 7,891E-03 MS(Error)

d MS(Error)



El análisis mediante ANOVA, muestra un aumento significativo de la pCO₂ en el grupo de recién nacido >1.500 g (f= 10,54, p= 0,07). Con relación al momento de estudio, no se halló significación estadística.

Tabla 131. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable pH.

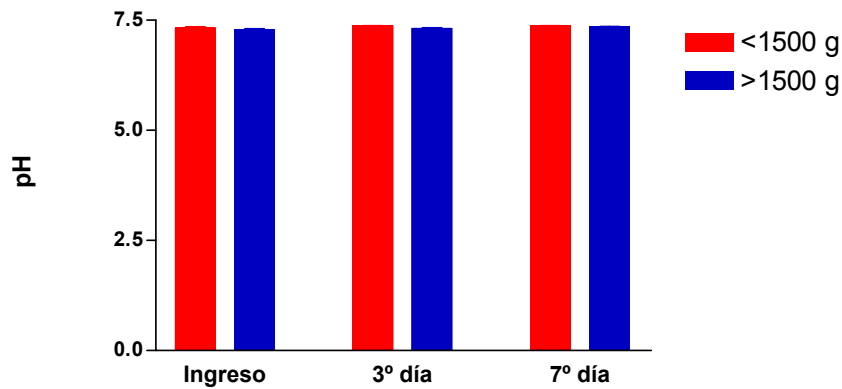
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	4811,37	1	4811,37	149635,06	,00
	Error	3,215E-02	1	3,215E-02		
MOMENTO	Hipótesis	6,290E-02	2	3,145E-02	22,83	,04
	Error	2,754E-03	2	1,377E-03		
PESO	Hipótesis	3,215E-02	1	3,215E-02	22,39	,03
	Error	3,174E-03	2,21	1,436E-03		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	2,754E-03	2	1,377E-03	,15	,86
	Error	,78	88	8,865E-03		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,992 MS(MOMENTO * PESO) + 7,891E-03 MS(Error)

d MS(Error)



El análisis mediante ANOVA demostró un aumento de las cifras de pH en función del peso del recién nacido ($f= 22,39$, $p= 0,03$), así como en relación al día de obtención de la muestra ($f= 22,83$, $p= 0,04$); como se refleja en la anterior tabla y figura.

Tabla 132. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable bicarbonato.

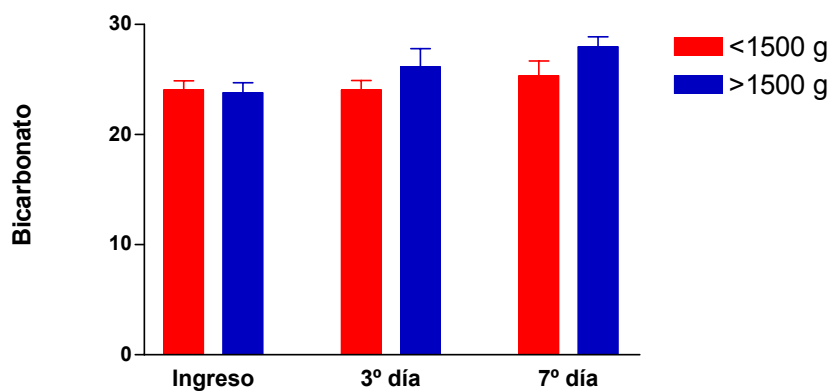
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	56901,50	1	56901,50	1154,86	,02
	Error	49,27	1	49,27		
MOMENTO	Hipótesis	110,92	2	55,46	3,00	,25
	Error	37,02	2	18,51		
PESO	Hipótesis	49,27	1	49,27	2,66	,24
	Error	37,70	2,03	18,52		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	37,02	2	18,51	,91	,40
	Error	1783,97	88	20,27		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,992 MS(MOMENTO * PESO) + 7,891E-03 MS(Error)

d MS(Error)



La variable bicarbonato mostró un comportamiento, al realizar el análisis de ANOVA, como se aprecia en la anterior tabla y figura, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas ni con relación al factor peso ni al momento.

Tabla 133. Análisis de la varianza de 2 vías de la variable **exceso de bases**.

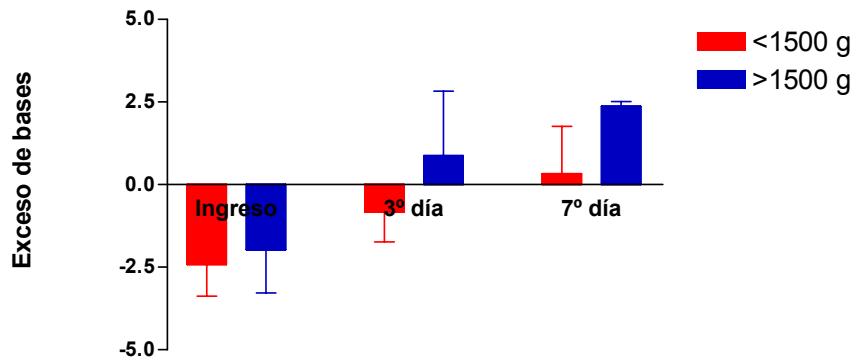
Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	6,78	1	6,78	,15	,76
	Error	43,93	1	43,93		
MOMENTO	Hipótesis	196,60	2	98,30	17,73	,05
	Error	11,09	2	5,54		
PESO	Hipótesis	43,93	1	43,93	7,69	,10
	Error	12,31	2,16	5,71		
MOMENTO * PESO	Hipótesis	11,09	2	5,54	,21	,81
	Error	2342,44	88	26,62		

a MS(PESO)

b MS(MOMENTO * PESO)

c ,992 MS(MOMENTO * PESO) + 7,891E-03 MS(Error)

d MS(Error)



El análisis mediante ANOVA demostró una disminución significativa del exceso de bases en relación al día de obtención de la muestra, con una $f= 17,73$ y $p= 0,05$. En función del peso del recién nacido, no se encontraron diferencias significativas.

5. ESTUDIOS DE CORRELACIÓN Y REGRESIÓN

Considerando que la variable fundamental del estudio es la neurohormona melatonina, creemos que es especialmente interesante analizar la posible relación o influencia que los niveles circulantes de la misma tienen con el resto de las variables identificadas en el protocolo de estudio; ya que se sabe que existen, en condiciones normales, factores que pueden hacer variar las tasas plasmáticas de aMT en un momento dado. En consecuencia, para abordar este análisis de los datos procederemos a desarrollar las siguientes estrategias:

a) en un primer paso y mediante la aplicación del *coeficiente de correlación de Pearson*, se estudiará el grado de relación (positiva o negativa) existente entre la melatonina y el resto de las variables. En aquellos casos en los que encontremos un coeficiente de correlación $> 0,4$, además de calcular el *error de la afirmación (p)*, se procederá en segunda instancia a realizar el *coeficiente de determinación (R)*, con la finalidad de depurar posibles influencias sobre la relación bivalente de factores aleatorios no controlados.

b) En segundo lugar, en aquellas relaciones en las que encontremos un nivel de significación estadístico mayor de 0,4, se realizará un estudio de regresión con el objeto de definir la ecuación o ley capaz de predecir las variaciones de la aMT en función de la elegida como independiente.

Para ello, una vez realizado el análisis matemático, los resultados obtenidos van a ser representados en forma de tablas y figuras (tablas 134 a 136 y figuras 27 a 38).

En las tablas se ha dispuesto una representación de los datos como a continuación describiremos:

1. Hay una tabla para cada grupo, de manera que la tabla 134 expresa los resultados del grupo general al ingreso, la tabla 135 los resultados del grupo general al 3^{er} día y la tabla 136 los resultados del grupo general al 7^o día.

2. En todas ellas la sistemática es la misma, pudiéndose apreciar en su diseño cinco columnas que indican lo siguiente:

- en la primera columna de la izquierda se expresan las variables objeto de relación.
- En la segunda columna, el coeficiente de correlación de Pearson y su grado de significación estadística.
- En la tercera columna, el coeficiente de determinación, igualmente con su correspondiente valor de p. Recordemos el importante valor que ha de asignársele a este último coeficiente para evitar sesgos y resultados aleatorios que se encuentran cuando sólo se emplea el coeficiente de Pearson. En este sentido hemos de destacar que se encontraron diferencias significativas *al ingreso* entre la melatonina y: la edad gestacional, el peso, la talla, el apgar a los cinco minutos, la PCR, la presión de CO₂ y el pH. *Al tercer día* las diferencias se encontraron entre la melatonina y la edad gestacional y el peso. *Al séptimo día* entre la melatonina y el apgar a los 5 minutos, la PCR y la tensión arterial media (TAM).
- En la cuarta columna se recoge la ley o función matemática capaz de predecir los valores de la variable dependiente (aMT), en función de cada una de las otras variables.

- En la última columna representamos también el valor de F de Snedecor, y su correspondiente nivel de significación.

Finalmente, y como anteriormente anunciábamos, en los casos de mayor interés hemos representado gráficamente la nube de puntos y recta de regresión correspondiente a los pares de valores:

Figura 27: aMT y edad gestacional al ingreso.

Figura 28: aMT y peso al ingreso.

Figura 29: aMT y talla al ingreso.

Figura 30: aMT y apgar a los cinco minutos al ingreso.

Figura 31: aMT y PCR al ingreso.

Figura 32: aMT y pCO₂ al ingreso.

Figura 33: aMT y pH al ingreso.

Figura 34: aMT y edad gestacional al 3^{er} día.

Figura 35: aMT y peso al 3^{er} día.

Figura 36: aMT y apgar a los 5 minutos al 7^o día.

Figura 37: aMT y PCR al 7^o día.

Figura 38: aMT y TAM al 7^o día.

Tabla 134. Estudio de correlación y regresión entre melatonina y resto de variables **al ingreso**.

Variables	r/p	R/p	Ecuación de regresión	F/p
Edad Gestacional	0,528/0,003	0,273/0,003	$Y = -197,0 + 8,6x$	10,34/0,003
Peso	0,598/0,001	0,357/0,001	$Y = 1,748 + 4,567E-0,2x$	15,013/0,001
Talla	0,368/0,049	0,136/0,049	$Y = -78,131 + 3,792x$	4,242/0,049
Perim. Cefálico	0,290/NS	0,084/NS	$Y = -83,394 + 5,507x$	2,486/NS
Apgar al minuto	0,252/NS	0,063/NS	$Y = 128,154 - 6,626x$	1,825/NS
Apgar cinco min.	0,362/0,05	0,131/0,05	$Y = 213,834 - 14,812x$	4,084/0,05
Leucocitos	0,206/NS	0,042/NS	$Y = 66,034 + 1,028E-0,3x$	1,196/NS
PMN	0,072/NS	0,005/NS	$Y = 77,960 + 6,256E-0,4x$	0,141/NS
Hematocrito	0,159/NS	0,025/NS	$Y = 148,913 - 1,256x$	0,699/NS
Hemoglobina	0,104/NS	0,011/NS	$Y = 125,914 - 2,603x$	0,297/NS
Plaquetas	0,244/NS	0,059/NS	$Y = 119,694 - 1,50E-0,4x$	1,704/NS
Sodio	0,031/NS	0,01/NS	$Y = 162,853 - 0,600x$	0,026/NS
Potasio	0,102/NS	0,010/NS	$Y = 117,505 - 7,094x$	0,283/NS
Calcio	0,086/NS	0,007/NS	$Y = 148,985 - 7,287x$	0,201/NS
Urea	0,199/NS	0,040/NS	$Y = 118,608 - 1,420x$	1,119/NS
Creatinina	0,023/NS	0,001/NS	$Y = 76,247 + 7,084x$	0,014/NS
Glucosa	0,262/NS	0,069/NS	$Y = 60,722 + 0,377x$	1,993/NS
PCR	0,466/0,012	0,217/0,012	$Y = 69,117 + 26,849x$	7,215/0,012
Frec. respiratoria	0,129/NS	0,017/NS	$Y = 100,740 - 0,349x$	0,453/NS
Frec. cardiaca	0,078/NS	0,006/NS	$Y = 53,730 + 0,204x$	0,163/NS
T. A. sistólica	0,217/NS	0,047/NS	$Y = 26,747 + 0,893x$	1,333/NS
T. A. media	0,226/NS	0,051/NS	$Y = 31,540 + 1,258x$	1,458/NS
FiO ₂	0,170/NS	0,029/NS	$Y = 58,948 + 62,470x$	0,800/NS
Sat. Oxígeno	0,324/NS	0,105/NS	$Y = 360,778 - 3,064x$	1,755/NS
Presión oxígeno	0,002/NS	0,000/NS	$Y = 73,343 + 1,903E-03x$	0,000/NS
Presión CO ₂	0,491/0,007	0,241/0,007	$Y = -9,342 + 1,798x$	8,576/0,007
PH	0,640/0,000	0,404/0,000	$Y = 2131,586 - 281,013x$	18,716/0,000
Bicarbonato	0,141/NS	0,020/NS	$Y = 135,158 - 2,240x$	0,549/NS
Exceso de bases	0,252/NS	0,063/NS	$Y = 75,290 - 3,022x$	1,825/NS

Tabla 135. Estudio de correlación y regresión entre melatonina y resto de variables al 3^{er} día.

Variables	r/p	R/p	Ecuación de regresión	F/p
Edad Gestacional	0,486/0,012	0,236/0,01	$Y = -65,446 + 4,622x$	7,403/0,012
Peso	0,531/0,005	0,282/0,00	$Y = 35,919 + 2,879E-02x$	9,407/0,005
Talla	0,305/NS	0,093/NS	$Y = 7,157 + 1,788x$	2,453/NS
Perim. Cefálico	0,323/NS	0,104/NS	$Y = -24,649 + 3,582x$	2,789/NS
Apgar al minuto	0,370/NS	0,137/NS	$Y = 114,925 + 4,911x$	3,797/NS
Apgar cinco min.	0,316/NS	0,100/NS	$Y = 145,687 - 7,301x$	2,670/NS
Leucocitos	0,241/NS	0,058/NS	$Y = 83,504 - 8,42E-04x$	1,356/NS
PMN	0,279/NS	0,078/NS	$Y = 81,224 - 1,31E-03x$	1,864/NS
Hematocrito	0,062/NS	0,004/NS	$Y = 86,139 - 0,229x$	0,085/NS
Hemoglobina	0,164/NS	0,027/NS	$Y = 101,753 - 1,638x$	0,609/NS
Plaquetas	0,245/NS	0,060/NS	$Y = 90,326 - 5,45E-05x$	1,400/NS
Sodio	0,117/NS	0,014/NS	$Y = 161,109 - 0,625x$	0,304/NS
Potasio	0,241/NS	0,058/NS	$Y = 40,987 + 7,330x$	1,352/NS
Calcio	0,276/NS	0,076/NS	$Y = -2,715 + 8,379x$	1,809/NS
Urea	0,030/NS	0,001/NS	$Y = 76,781 - 5,60E-02x$	0,020/NS
Creatinina	0,208/NS	0,043/NS	$Y = 100,036 - 32,032x$	0,992/NS
Glucosa	0,090/NS	0,008/NS	$Y = 85,451 - 0,121x$	0,179/NS
PCR	0,096/NS	0,009/NS	$Y = 72,290 + 5,149x$	0,204/NS
Frec. respiratoria	0,253/NS	0,064/NS	$Y = 52,390 + 0,436x$	1,505/NS
Frec. cardiaca	0,187/NS	0,035/NS	$Y = 120,758 - 0,303x$	0,793/NS
T. A. sistólica	0,210/NS	0,044/NS	$Y = 112,193 - 0,567x$	1,013/NS
T. A. media	0,107/NS	0,011/NS	$Y = 87,934 - 0,284x$	0,255/NS
FiO ₂	0,044/NS	0,002/NS	$Y = 78,092 - 9,010x$	0,041/NS
Sat. Oxígeno	0,023/NS	0,001/NS	$Y = 73,790 + 3,822E-02x$	0,009/NS
Presión oxígeno	0,374/NS	0,140/NS	$Y = 113,032 - 0,925x$	3,419/NS
Presión CO ₂	0,214/NS	0,046/NS	$Y = 48,593 + 0,593x$	1,052/NS
PH	0,184/NS	0,034/NS	$Y = 521,775 - 60,834x$	0,773/NS
Bicarbonato	0,273/NS	0,074/NS	$Y = 37,880 + 1,511x$	1,767/NS
Exceso de bases	0,296/NS	0,088/NS	$Y = 75,491 + 1,477x$	2,112/NS

Tabla 136. Estudio de correlación y regresión entre melatonina y resto de variables al 7º día.

Variables	r/p	R/p	Ecuación de regresión	F/p
Edad Gestacional	0,158/NS	0,025/NS	$Y = -2,71E-02 + 2,853x$	0,486/NS
Peso	0,222/NS	0,049/NS	$Y = 53,148 + 2,430E-02x$	0,985/NS
Talla	0,208/NS	0,043/NS	$Y = -5,552 + 2,359x$	0,856/NS
Perim. Cefálico	0,119/NS	0,014/NS	$Y = 11,084 + 2,660x$	0,273/NS
Apgar al minuto	0,335/NS	0,113/NS	$Y = 149,613 - 8,788x$	2,410/NS
Apgar cinco min.	0,438/0,047	0,192/0,047	$Y = 257,050 - 18,633x$	4,520/0,047
Leucocitos	0,154/NS	0,024/NS	$Y = 98,660 - 7,90E-04x$	0,411/NS
PMN	0,202/NS	0,041/NS	$Y = 101,142 - 3,72E-03x$	0,727/NS
Hematocrito	0,055/NS	0,003/NS	$Y = 63,529 + 0,579x$	0,051/NS
Hemoglobina	0,105/NS	0,011/NS	$Y = 45,770 + 3,035x$	0,189/NS
Plaquetas	0,140/NS	0,019/NS	$Y = 109,990 - 6,10E-05x$	0,337/NS
Sodio	0,085/NS	0,007/NS	$Y = 192,978 - 0,787x$	0,131/NS
Potasio	0,066/NS	0,004/NS	$Y = 111,416 - 5,443x$	0,079/NS
Calcio	0,140/NS	0,019/NS	$Y = 175,231 - 9,108x$	0,357/NS
Urea	0,070/NS	0,004/NS	$Y = 80,122 + 0,254x$	0,064/NS
Creatinina	0,176/NS	0,031/NS	$Y = 115,027 - 54,669x$	0,545/NS
Glucosa	0,187/NS	0,035/NS	$Y = 139,625 - 557x$	0,656/NS
PCR	0,611/0,004	0,373/0,004	$Y = 63,009 + 22,676x$	10,725/0,004
Frec. respiratoria	0,189//NS	0,036/NS	$Y = 113,137 - 0,473x$	0,670/NS
Frec. cardíaca	0,042/NS	0,002/NS	$Y = 73,245 + 8,787E-02$	0,031/NS
T. A. sistólica	0,227/NS	0,0052/NS	$Y = 144,100 - 0,911x$	0,981/NS
T. A. media	0,592/0,008	0,350/0,008	$Y = 220,528 - 2,812x$	9,169/0,008
FiO ₂	0,006/NS	0,000/NS	$Y = 87,393 - 5,461x$	0,001/NS
Sat. Oxígeno	0,095/NS	0,009/NS	$Y = 7,200 + 0,845x$	0,162/NS
Presión oxígeno	0,100/NS	0,010/NS	$Y = 115,633 - 0,718x$	0,171/NS
Presión CO ₂	0,120/NS	0,014/NS	$Y = 48,527 + 0,832x$	0,246/NS
PH	0,020/NS	0,000/NS	$Y = -88,670 + 23,770x$	0,007/NS
Bicarbonato	0,122/NS	0,015/NS	$Y = 51,381 + 1,338x$	0,255/NS
Exceso de bases	0,130/NS	0,017/NS	$Y = 85,118 + 1,360x$	0,292/NS

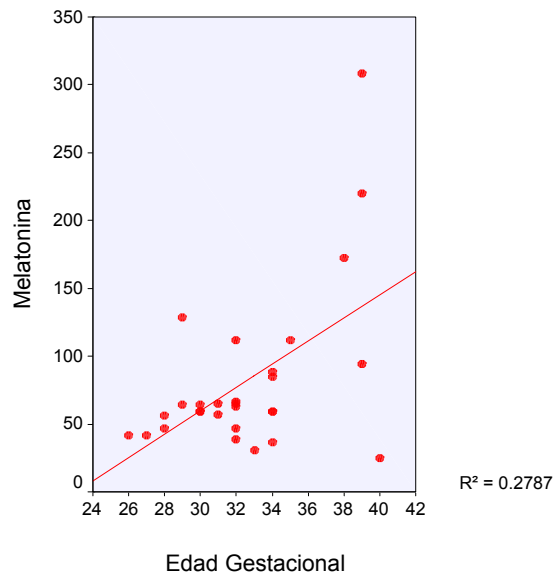


Figura 27: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión entre la melatonina y la edad gestacional al ingreso.

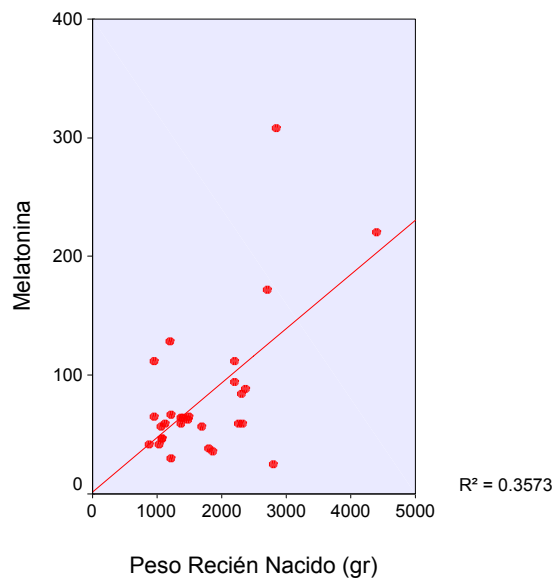


Figura 28: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre melatonina y peso del recién nacido al ingreso.

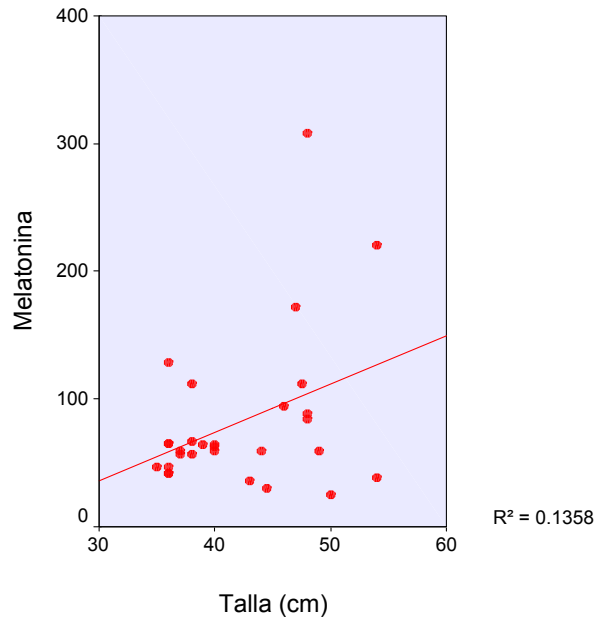


Figura 29: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión de la melatonina y la talla del recién nacido al ingreso.

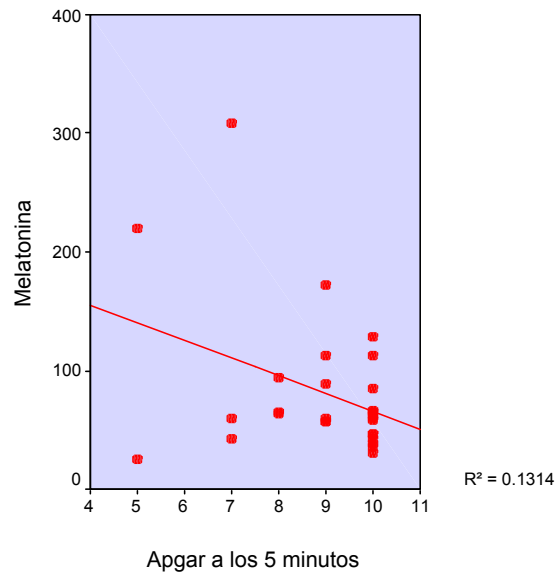


Figura 30: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión entre melatonina y apgar a los 5 minutos al ingreso.

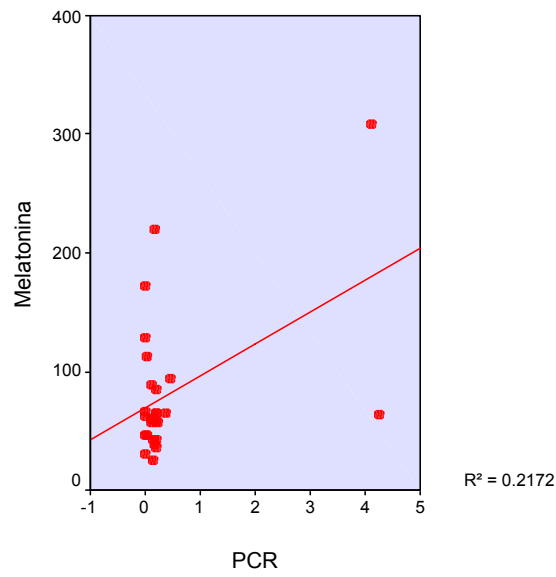


Figura 31: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre melatonina y PCR de neonatos al ingreso.

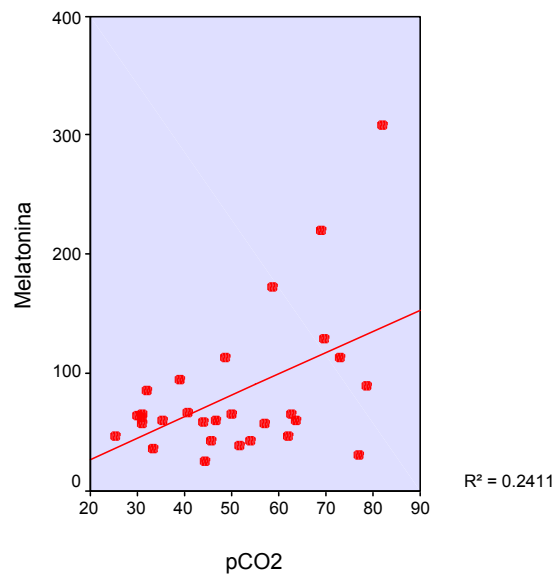
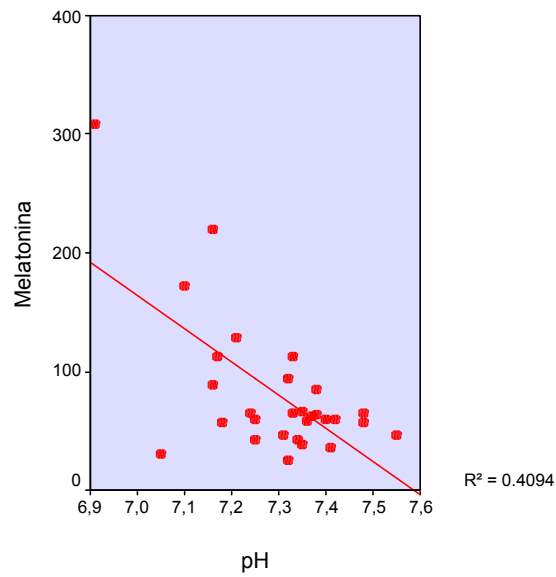


Figura 32: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre melatonina y pCO₂ al ingreso.



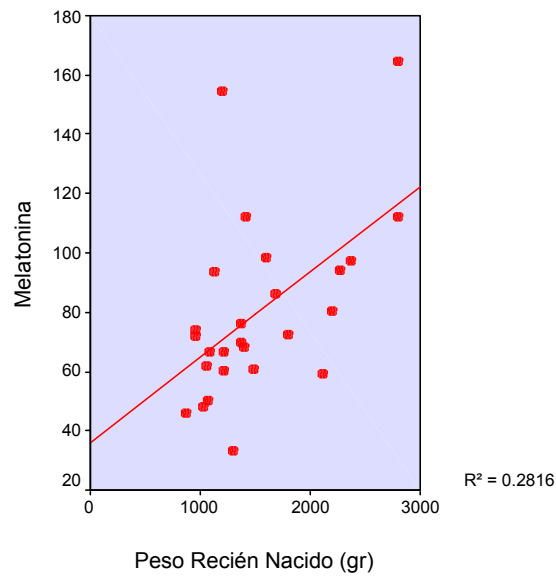


Figura 35: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre la melatonina y el peso del recién nacido al 3^{er} día.

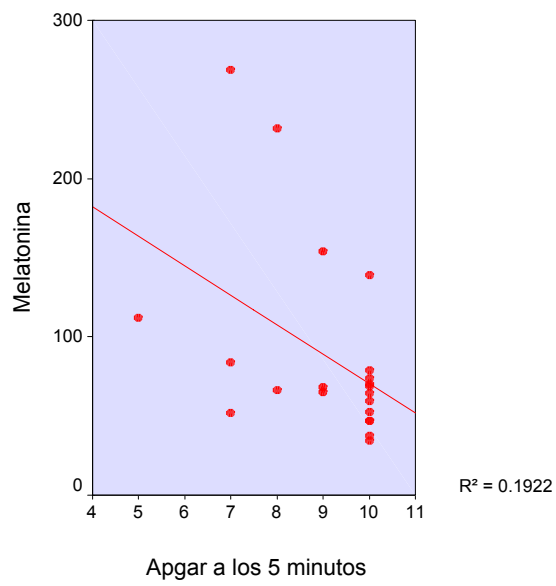


Figura 36: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre melatonina y Apgar a los 5 minutos en neonatos al 7^o día.

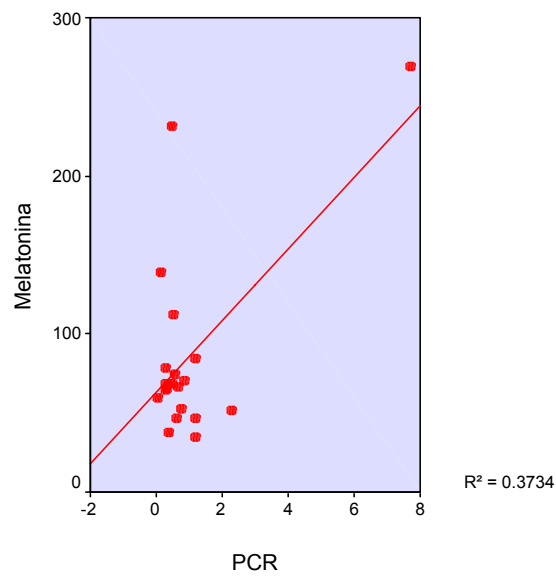


Figura 37: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre melatonina y PCR en neonatos al 7º día.

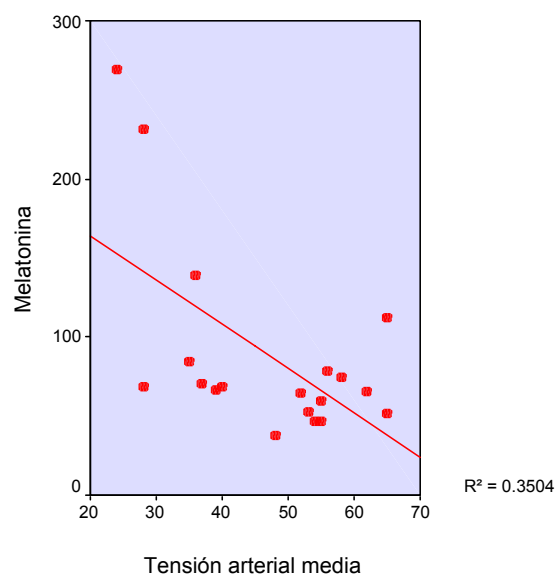


Figura 38: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre melatonina y TAM en neonatos al 7º día.

Tabla 137. Estudio de correlación y regresión entre la melatonina y resto de las variables en recién nacidos <1.500 g al ingreso.

Variables	r/p	R/p	Ecuación de regresión	F/p
Edad Gestacional	0,11/NS	0,13/NS	$Y = 21,01 + 1,39x$	0,18/NS
Peso	0,04/NS	0,001/NS	$Y = 57,58 + 4,73E-03x$	0,19/NS
Talla	0,19/NS	0,04/NS	$Y = 138,09 - 1,98x$	0,55/NS
Perim. cefálico	0,15/NS	0,024/NS	$Y = 123,94 - 2,20x$	0,34/NS
Apgar al minuto	0,02/NS	0,00/NS	$Y = 61,48 + 0,23x$	0,006/NS
Apgar cinco min.	0,18/NS	0,03/NS	$Y = 26,60 + 3,93x$	0,50/NS
Leucocitos	0,181/NS	0,03/NS	$Y = 69,53 - 5,80E-04x$	0,47/NS
PMN	0,25/NS	0,06/NS	$Y = 70,28 - 2,54E-03x$	0,93/NS
Hematocrito	0,04/NS	0,001/NS	$Y = 70,47 - 0,13x$	0,02/NS
Hemoglobina	0,03/NS	0,001/NS	$Y = 56,75 + 0,37x$	0,02/NS
Plaquetas	0,38/NS	0,14/NS	$Y = 88,30 - 9,58E-05x$	2,37/NS
Sodio	0,27/NS	0,08/NS	$Y = 374,21 - 2,28x$	1,15/NS
Potasio	0,19/NS	0,03/NS	$Y = 39,29 + 4,60x$	0,51/NS
Calcio	0,31/NS	0,10/NS	$Y = 150,12 - 9,41x$	1,49/NS
Urea	0,09/NS	0,01/NS	$Y = 70,27 - 0,293x$	0,12/NS
Creatinina	0,05/NS	0,003/NS	$Y = 69,15 - 8,87x$	0,04/NS
Glucosa	0,17/NS	0,03/NS	$Y = 68,57 - 9,45E-02x$	0,42/NS
PCR	0,04/NS	0,002/NS	$Y = 59,58 + 0,83x$	0,02/NS
Frec. respiratoria	0,04/NS	0,002/NS	$Y = 65,13 - 3,38E-02x$	0,02/NS
Frec. cardiaca	0,20/NS	0,04/NS	$Y = 85,83 - 0,17x$	0,58/NS
T. A. sistólica	0,39/NS	0,15/NS	$Y = 26,31 + 0,63x$	2,47/NS
T. A. media	0,37/NS	0,14/NS	$Y = 33,65 + 0,84x$	2,20/NS
FiO ₂	0,51/0,04	0,26/0,04	$Y = 31,25 + 81,45x$	5,01/0,04
Sat. oxígeno	0,19/NS	0,03/NS	$Y = -2,25 + 0,63x$	0,36/NS
Presión oxígeno	0,33/NS	0,11/NS	$Y = 51,19 + 0,17x$	1,74/NS
Presión CO ₂	0,09/NS	0,009/NS	$Y = 55,98 + 0,15x$	0,12/NS
PH	0,00/NS	0,00/NS	$Y = 62,78 + 5,26E-02x$	0,00/NS
Bicarbonato	0,22/NS	0,05/NS	$Y = 28,32 + 1,46x$	0,71/NS
Exceso de bases	0,19/NS	0,04/NS	$Y = 65,56 + 1,14x$	0,55/NS

Tabla 138. Estudio de correlación y regresión entre la melatonina y resto de las variables en recién nacidos <1.500 g al 3^{er} día.

Variables	r/p	R/p	Ecuación de regresión	F/p
Edad Gestacional	0,11/NS	0,012/NS	Y= 22,09+ 1,63x	0,19/NS
Peso	0,20/NS	0,04/NS	Y= 36,18+ 2,97E-02x	0,60/NS
Talla	0,12/NS	0,016/NS	Y= 125,99- 1,44x	0,24/NS
Perim. cefálico	0,08/NS	0,006/NS	Y= 103,77- 1,17x	0,09/NS
Apgar al minuto	0,25/NS	0,062/NS	Y= 94,06- 3,03x	0,99/NS
Apgar cinco min.	0,22/NS	0,05/NS	Y= 116,51- 4,92x	0,74/NS
Leucocitos	0,26/NS	0,06/NS	Y= 80,30- 8,42E-04x	1,05/NS
PMN	0,32/NS	0,1/NS	Y= 78,44- 1,41E-03x	1,67/NS
Hematocrito	0,05/NS	0,002/NS	Y= 79,17- 0,16x	0,03/NS
Hemoglobina	0,11/NS	0,012/NS	Y= 88,93- 1,06x	0,19/NS
Plaquetas	0,23/NS	0,05/NS	Y= 86,17-5,00E-05x	0,84/NS
Sodio	0,07/NS	0,005/NS	Y= 130,22- 0,42x	0,08/NS
Potasio	0,28/NS	0,08/NS	Y= 30,56+ 8,95x	1,32/NS
Calcio	0,34/NS	0,12/NS	Y= -37,79+ 11,59x	1,99/NS
Urea	0,09/NS	0,008/NS	Y= 76,69- 0,174x	0,115/NS
Creatinina	0,20/NS	0,042/NS	Y= 96,33- 32,17x	0,65/NS
Glucosa	0,082/NS	0,007	Y= 80,52- 0,11x	0,10/NS
PCR	0,24/NS	0,06/NS	Y= 62,59+ 20,47x	0,93/NS
Frec. respiratoria	0,28/NS	0,08/NS	Y= 45,12+ 0,51x	1,27/NS
Frec. cardiaca	0,25/NS	0,06/NS	Y= 132,002- 0,40x	0,98/NS
T. A. sistólica	0,22/NS	0,05/NS	Y= 117,32- 0,72x	0,78/NS
T. A. media	0,14/NS	0,02/NS	Y= 89,57- 0,42x	0,30/NS
FiO ₂	0,05/NS	0,002/NS	Y= 74,66- 10,03x	0,03/NS
Sat. oxígeno	0,02/NS	0,00/NS	Y= 77,36- 3,57E-02x	0,005/NS
Presión oxígeno	0,47/0,05	0,22/0,05	Y= 127,39- 1,32x	4,22/0,05
Presión CO ₂	0,33/NS	0,22/NS	Y= 21,08+ 1,16x	1,82/NS
PH	0,055/NS	0,003/NS	Y= -128,04+ 27,07x	0,045/NS
Bicarbonato	0,41/NS	0,17/NS	Y= -1,49E-02+2,97x	2,99/NS
Exceso de bases	0,39/NS	0,15/NS	Y= 73,53+ 2,72x	2,64/NS

Tabla 139. Estudio de correlación y regresión entre la melatonina y resto de las variables en RN <1.500 g al 7º día.

Variables	r/p	R/p	Ecuación de regresión	F/p
Edad Gestacional	0,034/NS	0,001/NS	$Y = 47,24 + 1,07x$	0,014/NS
Peso	0,12/NS	0,01/NS	$Y = 37,06 + 3,60E-02$	0,19/NS
Talla	0,26/NS	0,07/NS	$Y = -241,85 + 8,61x$	0,91/NS
Perim. cefálico	0,09/NS	0,009/NS	$Y = -3,15 + 2,93x$	0,105/NS
Apgar al minuto	0,26/NS	0,07/NS	$Y = 129,43 - 6,81x$	0,90/NS
Apgar cinco min.	0,46/NS	0,21/NS	$Y = 274,71 - 21,37x$	3,18/NS
Leucocitos	0,32/NS	0,10/NS	$Y = 119,55 - 3,61E-03x$	1,36/NS
PMN	0,18/NS	0,03/NS	$Y = 90,07 - 2,94E-03x$	0,42/NS
Hematocrito	0,10/NS	0,01/NS	$Y = 111,89 - 0,92x$	0,13/NS
Hemoglobina	0,08/NS	0,01/NS	$Y = 110,95 - 2,29x$	0,08/NS
Plaquetas	0,31/NS	0,10/NS	$Y = 125,53 - 1,26E-04x$	1,27/NS
Sodio	0,13/NS	0,02/NS	$Y = 314,01 - 1,71x$	0,22/NS
Potasio	0,17/NS	0,03/NS	$Y = 145,81 - 14,39x$	0,38/NS
Calcio	0,37/NS	0,11/NS	$Y = 290,17 - 21,01x$	1,43/NS
Urea	0,23/NS	0,05/NS	$Y = 56,74 + 0,90x$	0,70/NS
Creatinina	0,18/NS	0,03/NS	$Y = 121,32 - 60,96x$	0,42/NS
Glucosa	0,21/NS	0,04/NS	$Y = 140,69 - 0,61x$	0,55/NS
PCR	0,82/0,00	0,67/0,00	$Y = 45,27 + 25,89x$	24,91/0,00
Frec. respiratoria	0,18/NS	0,03/NS	$Y = 102,54 - 0,39x$	0,42/NS
Frec. cardiaca	0,06/NS	0,003/NS	$Y = 63,87 + 0,10x$	0,04/NS
T. A. sistólica	0,25/NS	0,06/NS	$Y = 135,66 - 0,93x$	0,79/NS
T. A. media	0,62/0,02	0,39/0,02	$Y = 218,71 - 3,09x$	7,03/0,02
FiO ₂	0,05/NS	0,002/NS	$Y = 88,09 - 35,87x$	0,03/NS
Sat. oxígeno	0,32/NS	0,10/NS	$Y = -335,44 + 4,35x$	1,36/NS
Presión oxígeno	0,07/NS	0,005/NS	$Y = 59,95 + 0,46x$	0,06/NS
Presión CO ₂	0,02/NS	0,001/NS	$Y = 85,67 - 0,14x$	0,007/NS
PH	0,31/NS	0,99/NS	$Y = -2729,33 + 381,02x$	1,32/NS
Bicarbonato	0,16/NS	0,03/NS	$Y = 40,45 + 1,52x$	0,33/NS
Exceso de bases	0,20/NS	0,04/NS	$Y = 78,27 + 1,79x$	0,50/NS

Tabla 140. Estudio de correlación y regresión entre la melatonina y resto de las variables en RN >1.500 g al ingreso.

Variables	r/p	R/p	Ecuación de regresión	F/p
Edad Gestacional	0,52/NS	0,27/NS	Y= -333,53+ 12,37x	4,01/NS
Peso	0,63/0,02	0,40/0,02	Y= -82,09+ 7,62-02x	7,45/0,02
Talla	0,25/NS	0,06/NS	Y= -121,29+ 4,75x	0,71/NS
Perim. cefálico	0,07/NS	0,005/NS	Y= 2,68+ 3,09x	0,06/NS
Apgar al minuto	0,33/NS	0,11/NS	Y= 183,32- 12,11x	1,35/NS
Apgar cinco min.	0,42/NS	0,18/NS	Y= 272,90- 19,94x	2,42/NS
Leucocitos	0,14/NS	0,02/NS	Y= 88,25+ 7,90E-04	0,22/NS
PMN	0,09/NS	0,009/NS	Y= 112,18- 8,58E-04	0,10/NS
Hematocrito	0,12/NS	0,01/NS	Y= 162,77- 1,13x	0,15/NS
Hemoglobina	0,07/NS	0,004/NS	Y= 139,55- 2,15x	0,05/NS
Plaquetas	0,22/NS	0,05/NS	Y= 147,37- 1,76E-04	0,55/NS
Sodio	0,17/NS	0,03/NS	Y= -492,29+ 4,43x	0,34/NS
Potasio	0,22/NS	0,05/NS	Y= 235,17- 26,61x	0,54/NS
Calcio	0,03/NS	0,001/NS	Y= 142,24- 4,11x	0,01/NS
Urea	0,43/NS	0,18/NS	Y= 213,92- 3,87x	2,43/NS
Creatinina	0,17/NS	0,03/NS	Y= 159,54-66,11x	0,34/NS
Glucosa	0,57/0,04	0,32/0,04	Y= 42,96+ 1,16x	5,28/NS
PCR	0,73/0,005	0,53/0,005	Y= 78,98+ 54,64x	12,30/NS
Frec. respiratoria	0,30/NS	0,09/NS	Y= 251,86- 2,87x	1,07/NS
Frec. cardiaca	0,30/NS	0,09/NS	Y= 169,62+ 1,97x	1,08/NS
T. A. sistólica	0,10/NS	0,009/NS	Y= 66,52+ 0,58x	0,10/NS
T. A. media	0,03/NS	0,001/NS	Y= 116,47- 0,27x	0,01/NS
FiO ₂	0,22/NS	0,05/NS	Y= 70,57+ 103,49x	0,54/NS
Sat. oxígeno	0,46/NS	0,21/NS	Y= 692,954- 6,42x	0,80/NS
Presión oxígeno	0,28/NS	0,08/NS	Y= 146,05- 1,23x	0,83/NS
Presión CO ₂	0,64/0,02	0,41/0,02	Y= -53,25+ 2,92x	7,72/NS
PH	0,86/0,00	0,73/0,00	Y= 3427,61- 457,82x	30,27/0,00
Bicarbonato	0,31/NS	0,10/NS	Y= 255,91- 6,32x	1,18/NS
Exceso de bases	0,41/NS	0,17/NS	Y= 92,92- 5,52x	2,21/NS

Tabla 141. Estudio de correlación y regresión entre la melatonina y resto de las variables en RN >1.500 g al 3^{er} día.

Variables	r/p	R/p	Ecuación de regresión	F/p
Edad Gestacional	0,60/NS	0,36/NS	Y= -62,50+ 4,68x	3,95/NS
Peso	0,63/NS	0,40/NS	Y= 1,36+ 4,34E-02	4,70/NS
Talla	0,12/NS	0,01/NS	Y= 60,59+ 0,77x	0,10/NS
Perim. cefálico	0,25/NS	0,06/NS	Y= -28,80+ 3,91x	0,48/NS
Apgar al minuto	0,44/NS	0,20/NS	Y= 133,75- 5,82x	1,73/NS
Apgar cinco min.	0,35/NS	0,12/NS	Y= 157,09- 7,02x	0,98/NS
Leucocitos	0,75/0,05	0,56/0,05	Y= 25,88+ 6,86E-03	6,34/NS
PMN	0,52/NS	0,27/NS	Y= 70,22+ 3,59E-02	1,82/NS
Hematocrito	0,18/NS	0,03/NS	Y= 132,54- 1,01x	0,17/NS
Hemoglobina	0,45/NS	0,20/NS	Y= 189,81- 6,76x	1,28/NS
Plaquetas	0,20/NS	0,04/NS	Y= 69,49+ 6,12E-05	0,20/NS
Sodio	0,03/NS	0,001/NS	Y= 99,39- 0,11x	0,01/NS
Potasio	0,33/NS	0,11/NS	Y= 119,38- 7,21x	0,60/NS
Calcio	0,49/NS	0,24/NS	Y= 5,96+ 8,71x	1,55/NS
Urea	0,38/NS	0,14/NS	Y= 72,01+ 0,42x	0,84/NS
Creatinina	0,35/NS	0,12/NS	Y= 113,67- 37,59x	0,70/NS
Glucosa	0,19/NS	0,03/NS	Y= 106,08- 0,26x	0,18/NS
PCR	0,63/NS	0,40/NS	Y= 95,83- 14,06x	3,30/NS
Frec. respiratoria	0,07/NS	0,005/NS	Y= 80,12- 7,48E-02x	0,03/NS
Frec. cardiaca	0,16/NS	0,02/NS	Y= 54,62+ 0,19x	0,13/NS
T. A. sistólica	0,74/NS	0,54/NS	Y= 156,59- 1,04x	5,91/NS
T. A. media	0,60/NS	0,36/NS	Y= 133,20- 0,98x	2,81/NS
FiO ₂	0,12/NS	0,01/NS	Y= 78,62+ 19,90x	0,08/NS
Sat. oxígeno	0,83/NS	0,68/NS	Y= -25,52+ 1,20x	6,49/NS
Presión oxígeno	0,18/NS	0,03/NS	Y= 75,61+ 0,24x	0,14/NS
Presión CO ₂	0,35/NS	0,12/NS	Y= 105,35- 0,44x	0,69/NS
PH	0,57/NS	0,32/NS	Y= 733,46- 89,12x	2,36/NS
Bicarbonato	0,21/NS	0,04/NS	Y= 97,10- 0,50x	0,23/NS
Exceso de bases	0,10/NS	0,01/NS	Y= 83,94+ 0,19x	0,05/NS

Tabla 142. Estudio de correlación y regresión entre la melatonina y resto de las variables en RN >1.500 g al 7º día.

Variables	r/p	R/p	Ecuación de regresión	F/p
Edad Gestacional	0,05/NS	0,002/NS	Y= 86,57+ 0,68x	0,01/NS
Peso	0,002/NS	0,00/NS	Y= 109,01+ 2,06E-04x	0,00/NS
Talla	0,12/NS	0,01/NS	Y= 173,63- 1,39x	0,07/NS
Perim. cefálico	0,34/NS	0,11/NS	Y= 410,13- 9,37x	0,64/NS
Apgar al minuto	0,33/NS	0,11/NS	Y= 165,36- 9,55x	0,61/NS
Apgar cinco min.	0,38/NS	0,14/NS	Y= 225,26- 13,29x	0,82/NS
Leucocitos	0,34/NS	0,12/NS	Y= 135,66- 1,12E-02x	0,40/NS
PMN	0,34/NS	0,12/NS	Y= 146,34- 9,66E-02x	0,40/NS
Hematocrito	0,82/NS	0,67/NS	Y= -907,04+ 23,36x	6,14/NS
Hemoglobina	0,66/NS	0,44/NS	Y= -163,72+ 20,22x	2,35/NS
Plaquetas	0,32/NS	0,10/NS	Y= 52,73+ 1,55E-04x	0,34/NS
Sodio	0,08/NS	0,006/NS	Y= 30,19+ 0,54x	0,02/NS
Potasio	0,12/NS	0,01/NS	Y= 56,19+ 9,71x	0,06/NS
Calcio	0,72/NS	0,52/NS	Y= -524,32+ 68,05x	4,26/NS
Urea	0,38/NS	0,14/NS	Y= 147,36- 2,29x	0,67/NS
Creatinina	0,25/NS	0,06/NS	Y= 103,38- 44,61x	0,20/NS
Glucosa	0,09/NS	0,008/NS	Y= 71,66+ 0,36x	0,03/NS
PCR	0,68/NS	0,46/NS	Y= 10,26+ 278,34x	3,40/NS
Frec. respiratoria	0,13/NS	0,02/NS	Y= 147,91- 0,91x	0,07/NS
Frec. cardiaca	0,02/NS	0,00/NS	Y= 88,84+ 9,08E-05	0,00/NS
T. A. sistólica	0,52/NS	0,27/NS	Y= 324,63- 3,14x	1,50/NS
T. A. media	0,82/0,05	0,67/0,05	Y= 320,45- 4,12x	8,09/0,05
FiO ₂	0,93/0,008	0,86/0,008	Y= -648,47+ 3490,45x	24,74/0,008
Sat. oxígeno	0,09/NS	0,008/NS	Y= 46,36+ 0,63x	0,03/NS
Presión oxígeno	0,63/NS	0,40/NS	Y= 426,20-8,75x	2,00/NS
Presión CO ₂	0,58/NS	0,34/NS	Y= -298,96+ 8,19x	1,52/NS
PH	0,55/NS	0,30/NS	Y= 4728,63- 627,82x	1,29/NS
Bicarbonato	0,43/NS	0,19/NS	Y= 474,03- 13,01x	0,68/NS
Exceso de bases	0,31/NS	0,10/NS	Y= 120,36- 6,19x	0,32/NS

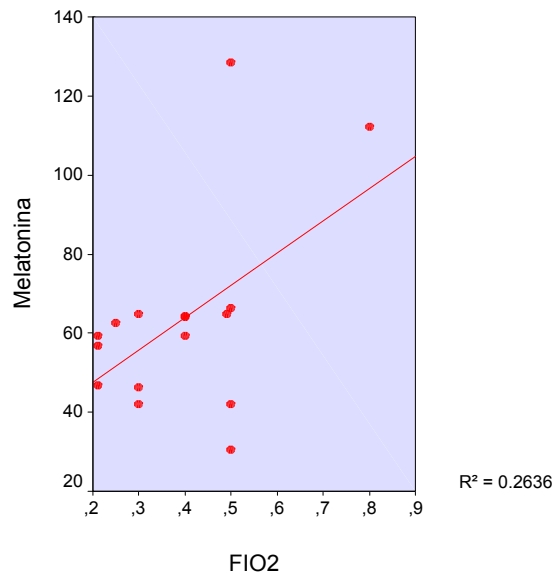


Figura 39: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre aMT y FiO₂ al ingreso en neonatos <1.500 g.

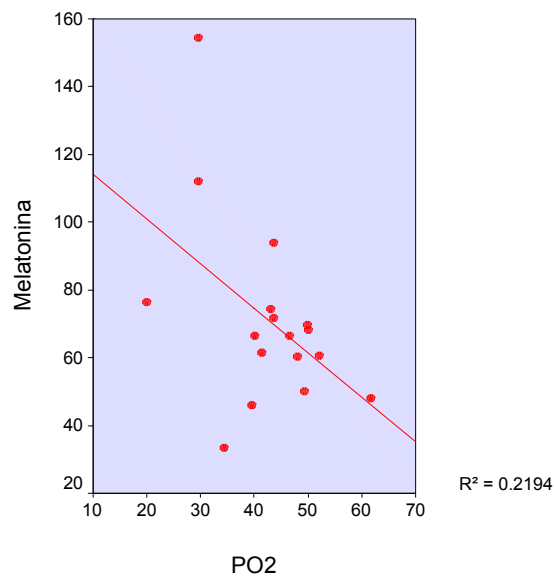


Figura 40: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre aMT y pO₂ al 3^{er} día en neonatos <1.500 g.

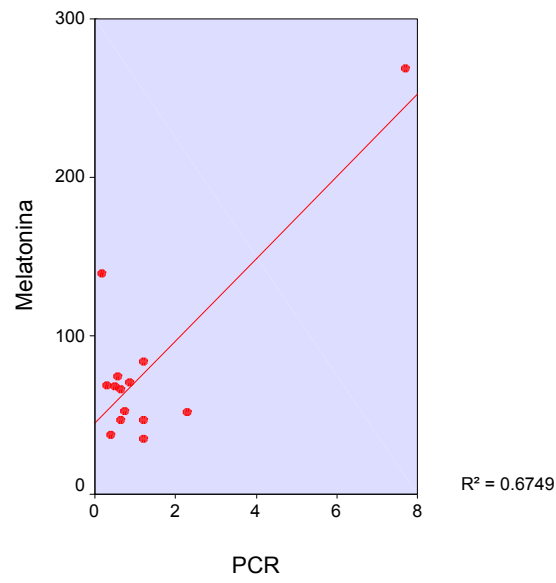


Figura 41: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre aMT y PCR al 7º día en neonatos <1.500 g.

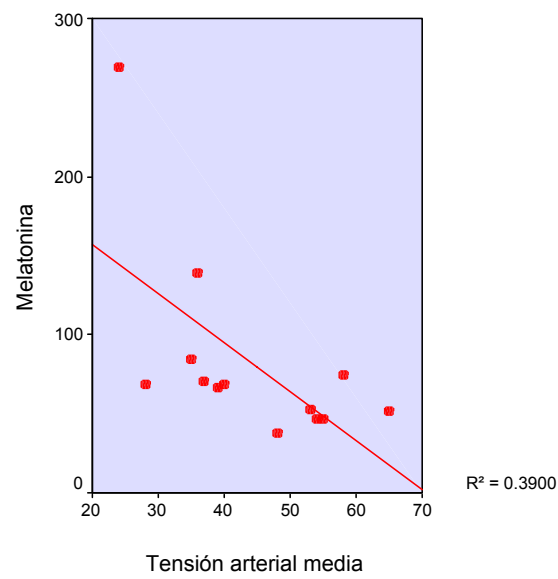


Figura 42: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre aMT y TAM al 7º día en neonatos <1.500 g.

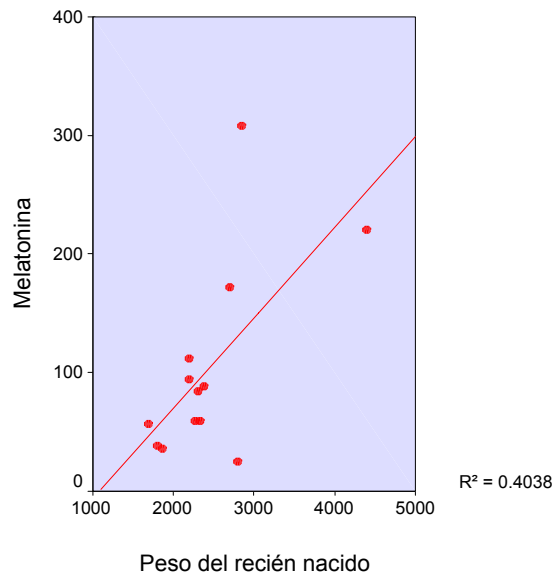


Figura 43: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre aMT y peso del recién nacido al ingreso en >1500 g.

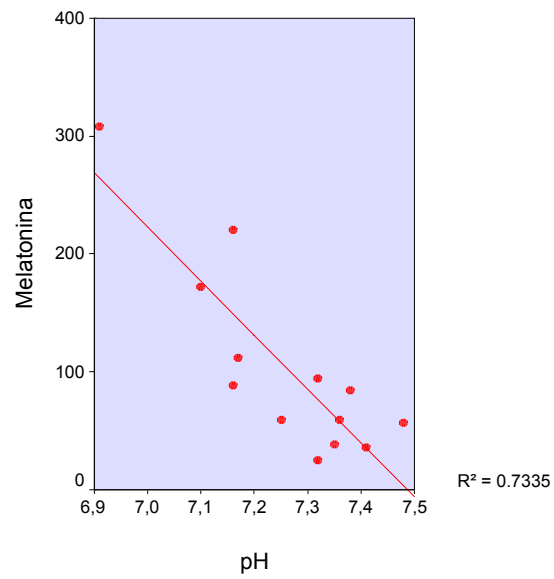


Figura 44: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre aMT y pH al ingreso en neonatos >1.500 g.

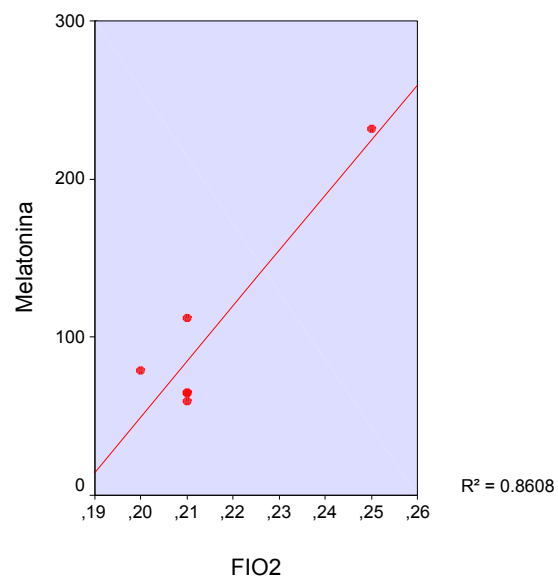


Figura 45: representación gráfica mediante nube de puntos de la recta de regresión existente entre aMT y FiO_2 al 7º día en neonatos >1.500 g.

6. TRANSFORMACIÓN “Z” DE FISHER

Finalmente, en este apartado de los resultados vamos a analizar algunas de las correlaciones encontradas en los estudios precedentes, utilizando el test de transformación de Fisher. Sencillamente pretendemos estudiar si los análisis bivariantes en dos grupos distintos difieren de forma significativa o no. Como se podrá comprobar y como ha sido la línea argumental en todo el proyecto, la variable melatonina fue la referencia para el análisis de este estudio.

En definitiva, tras la aplicación de esta metodología estadística hemos encontrado los resultados reflejados en las tablas 143 a 145.

Gráficamente las que hemos seleccionado de mayor interés se representan en las siguientes figuras: de la 46 a 59.

Tabla 143: Transformación “Z” de Fisher al **ingreso** entre **melatonina y resto variables**.

Variables	Grupo A (r_A/z_A)	Grupo B (r_B/z_B)	Z	p
aMT-EG	0,68/0,83	0,07/0,07	2,04	0,05
aMT-peso	0,89/1,42	0,02/0,02	3,77	0,001
aMT-apgar 1	0,94/1,74	0,27/0,28	3,93	0,001
aMT-apgar 5	0,5/0,56	0,15/0,15	1,09	0,30
aMT-PMN	0,35/0,36	0,76/0,99	-1,70	0,10
aMT-PQT	0,15/0,15	0,47/0,52	-0,99	0,40
aMT-Ca	0,24/0,24	0,92/1,62	-3,70	0,01
aMT-urea	0,73/0,94	0,15/0,15	2,12	0,05
aMT-glucosa	0,53/0,59	0,04/0,04	1,48	0,20
aMT-PCR	0,88/1,40	0,005/0,005	3,74	0,02
aMT-FR	0,88/1,40	0,32/0,34	1,06	0,40
aMT-TAS	0,14/0,14	0,75/0,97	-2,25	0,05
aMT-TAM	0,16/0,16	0,93/1,66	-4,02	0,01
aMT-FiO ₂	0,04/0,04	0,48/0,52	-1,28	0,20
aMT-pCO ₂	0,73/0,94	0,02/0,02	2,49	0,02
aMT-pH	0,99/2,99	0,00/0,00	8,05	0,001
aMT-EB	0,47/0,51	0,16/0,17	0,92	0,40

Grupo A: <1.500 g

Grupo B: >1.500 g

Tabla 144: Transformación “Z” de Fisher al 3^{er} día entre melatonina y resto variables.

Variables	Grupo A (r_A/z_A)	Grupo B (r_B/z_B)	Z	p
aMT-EG	0,67/0,81	0,09/0,09	1,94	0,10
aMT-peso	0,45/0,48	0,07/0,07	1,11	0,30
aMT-Hb	0,67/0,81	0,31/0,32	1,32	0,20
aMT-urea	0,74/0,95	0,40/0,42	1,41	0,20
aMT-FR	0,28/0,29	0,88/1,38	-2,92	0,01
aMT-FC	0,34/0,35	0,74/0,94	-1,57	0,20
aMT-TAS	0,14/0,14	0,75/0,97	-2,24	0,05
aMT-TAM	0,59/0,68	0,15/0,16	1,42	0,20
aMT-StO ₂	0,94/1,74	0,08/0,08	4,44	0,001
aMT-pO ₂	0,06/0,06	0,73/0,93	-2,34	0,02
aMT-pH	0,83/1,20	0,18/0,19	2,73	0,01
aMT-EB	0,12/0,13	0,83/1,20	-2,90	0,01

Grupo A: <1.500 g

Grupo B: >1.500 g

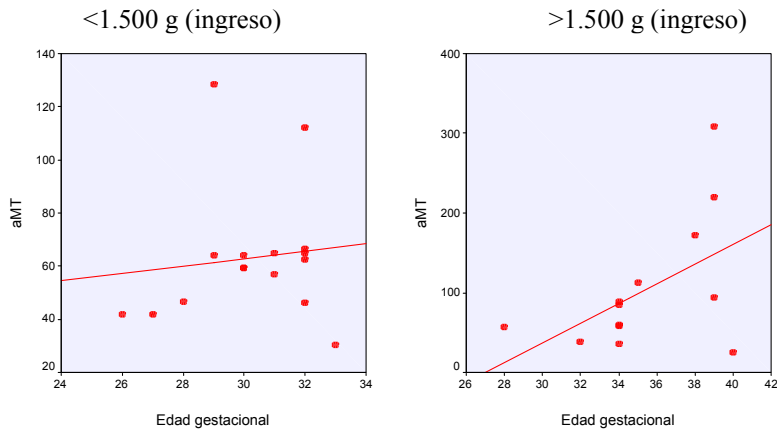
Tabla 145: Transformación “Z” de Fisher al 7° día entre melatonina y resto variables.

Variables	Grupo A (r_A/z_A)	Grupo B (r_B/z_B)	Z	p
aMT-peso	0,67/0,81	0,99/2,99	-5,87	0,01
aMT-talla	0,36/0,38	0,80/1,10	-1,94	0,10
aMT-apagar 5	0,10/0,10	0,41/0,43	-0,89	0,40
aMT-leucos	0,26/0,27	0,57/0,65	-1,01	0,30
aMT-Ht	0,73/0,93	0,09/0,09	2,25	0,05
aMT-Hb	0,77/1,04	0,22/0,22	2,21	0,05
aMT-PQT	0,28/0,29	0,60/0,69	-1,09	0,30
aMT-glucosa	0,47/0,51	0,87/1,31	-2,16	0,05
aMT-FiO ₂	0,87/1,33	0,01/0,005	3,57	0,001
aMT-StO ₂	0,27/0,27	0,86/1,31	-2,80	0,01
aMT-pO ₂	0,81/1,11	0,25/0,26	2,29	0,05
aMT-pCO ₂	0,94/1,70	0,30/0,31	3,71	0,001

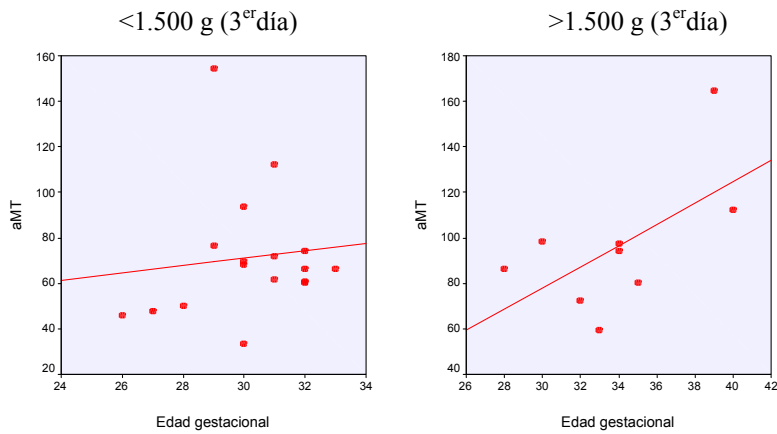
Grupo A: <1.500 g

Grupo B: >1.500 g

Figura 46: transformación “Z” de Fisher entre aMT y edad gestacional al ingreso y 3^{er} día.

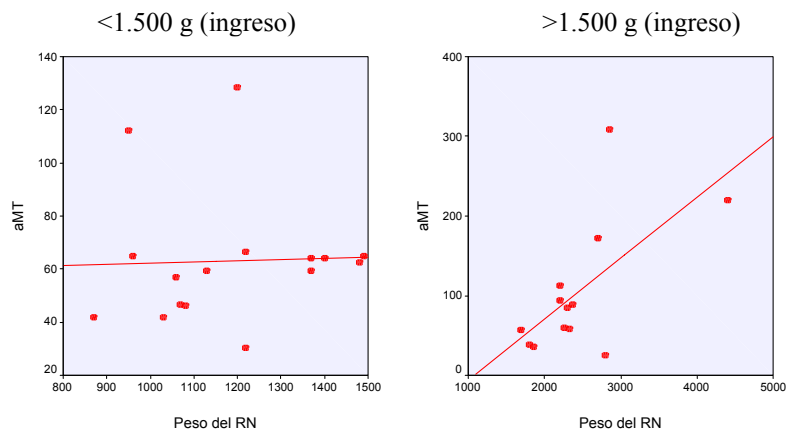


$r_A=0,68/ z_A=0,83 \quad r_B= 0,07/ z_B=0,07 \quad SD_2=0,37 \quad Z=2,04 \quad p=0.05$

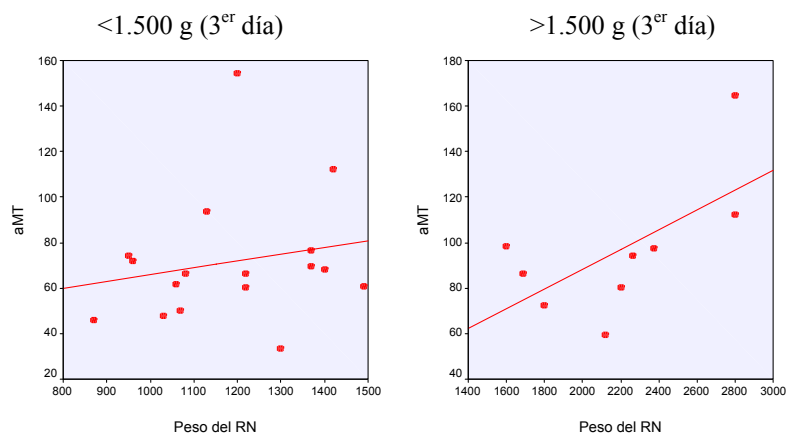


$r_A=0,67/ z_A=0,81 \quad r_B= 0,09/ z_B=0,09 \quad SD_2=0,37 \quad Z=1,94 \quad p=0.10$

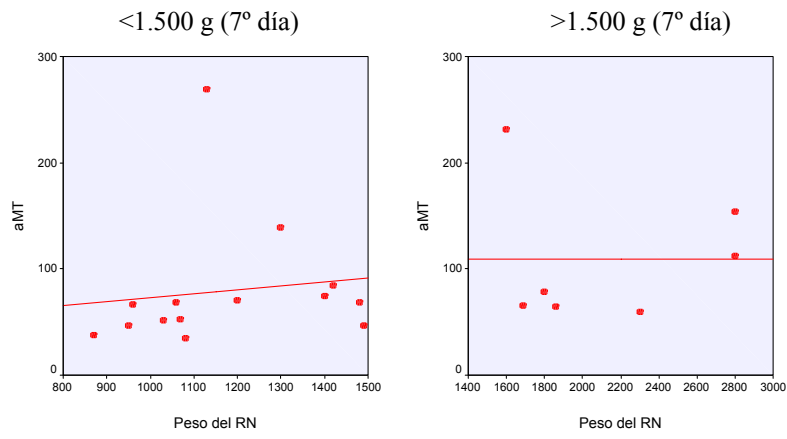
Figura 47: transformación “Z” de Fisher entre aMT y peso al ingreso, 3^{er} y 7^o día.



$$r_A=0,89/ z_A=1,42 \quad r_B= 0,02/ z_B=0,02 \quad SD_2=0,37 \quad Z=3,77 \quad p=0,001$$

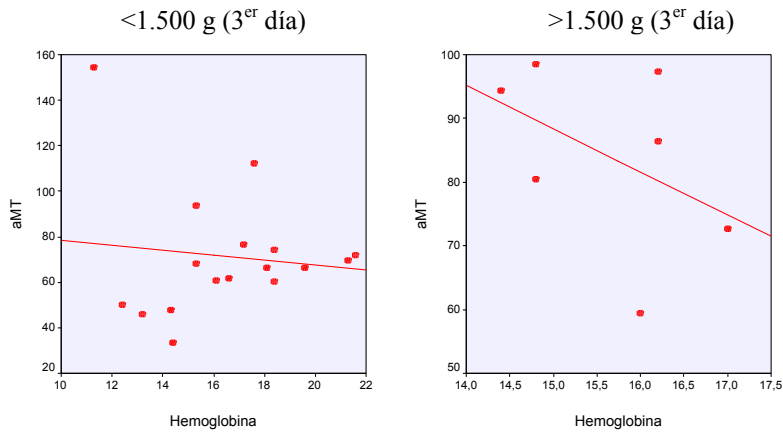


$$r_A=0,45/ z_A=0,48 \quad r_B= 0,07/ z_B=0,07 \quad SD_2=0,37 \quad Z=1,11 \quad p=0,30$$

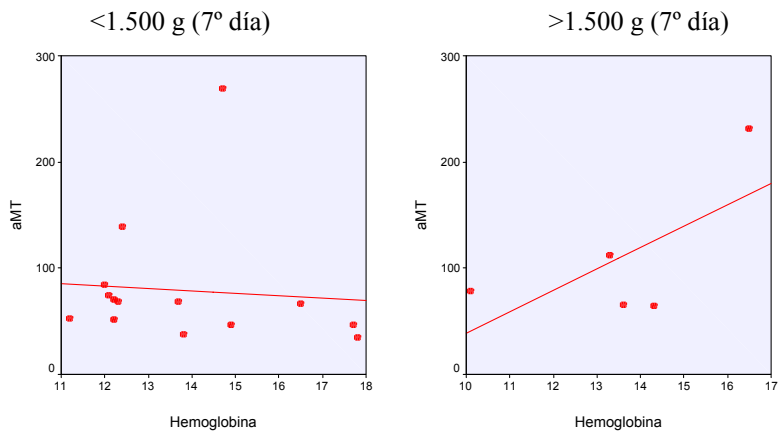


$r_A=0,67/ z_A=0,81 \quad r_B= 0,99/ z_B=2,99 \quad SD_2=0,37 \quad Z=-5,87 \quad p=0,01$

Figura 48: transformación “Z” de Fisher entre aMT y hemoglobina al 3^{er} y 7^o día.

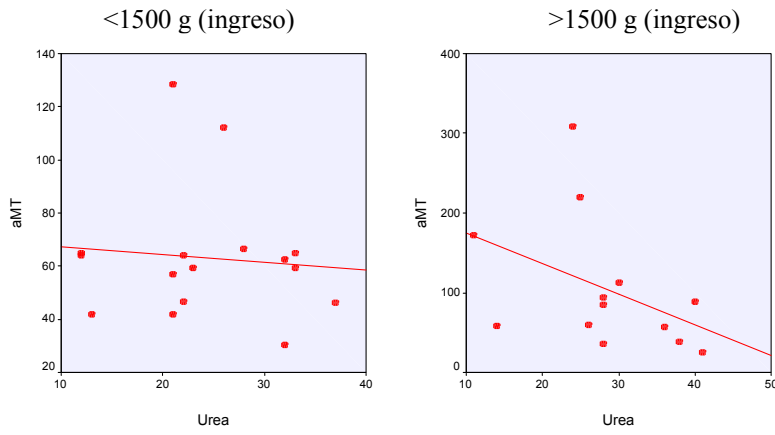


$r_A=0,67/ z_A=0,81 \quad r_B= 0,31/ z_B=0,32 \quad SD_2=0,37 \quad Z=1,32 \quad p=0,20$

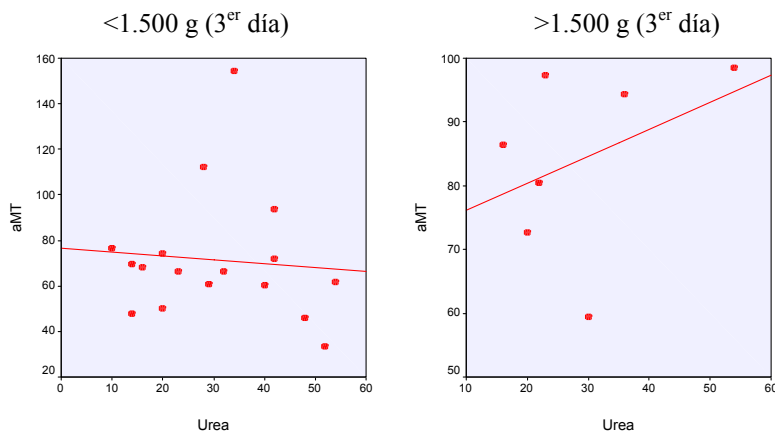


$r_A=0,77/ z_A=1,04 \quad r_B= 0,22/ z_B=0,22 \quad SD_2=0,37 \quad Z=2,21 \quad p=0,05$

Figura 49: transformación “Z” de Fisher entre aMT y urea al ingreso y al 3^{er} día.

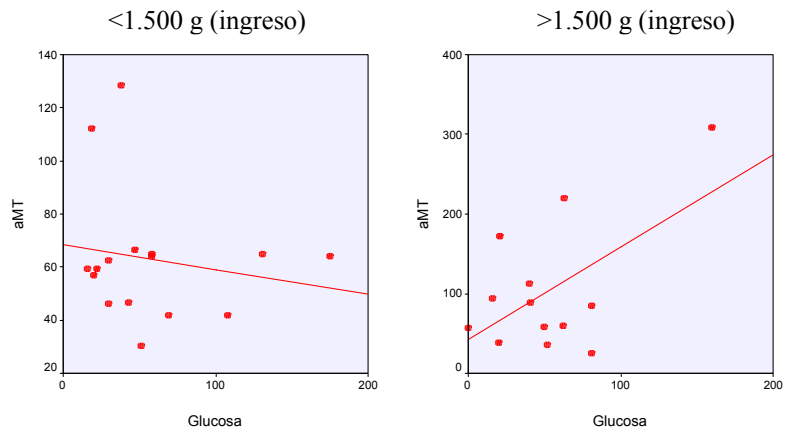


$r_A=0,73 / z_A=0,94 \quad r_B=0,15 / z_B=0,15 \quad SD_2=0,37 \quad Z=2,12 \quad p=0,05$

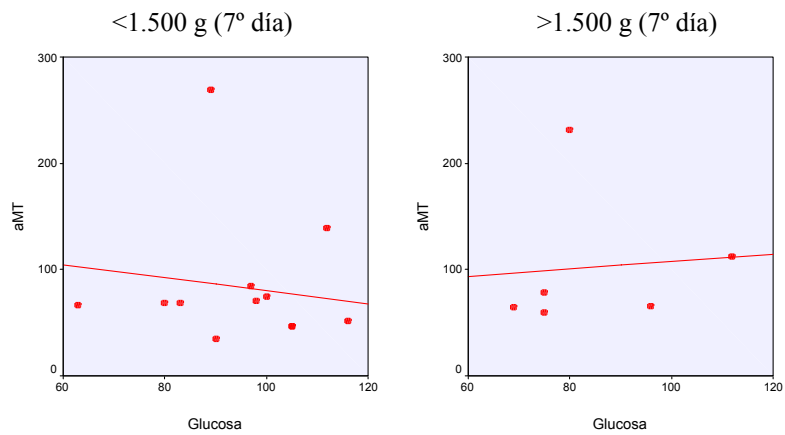


$r_A=0,74 / z_A=0,95 \quad r_B=0,40 / z_B=0,42 \quad SD_2=0,37 \quad Z=1,41 \quad p=0,20$

Figura 50: transformación “Z” de Fisher entre aMT y glucosa al ingreso y al 7º día.

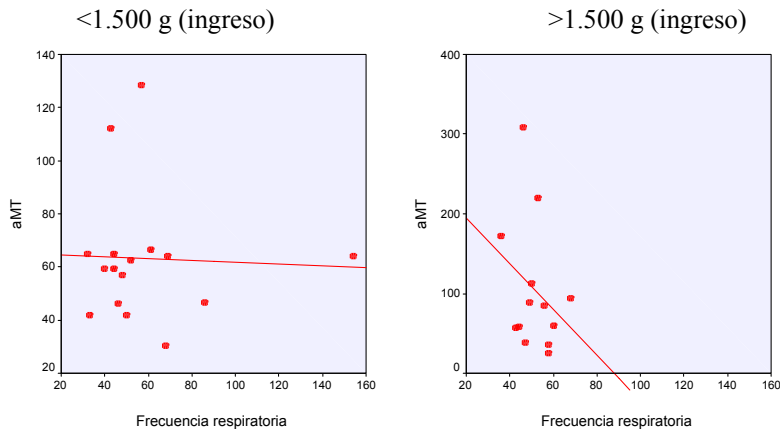


$r_A=0,53 / z_A=0,59 \quad r_B= 0,04 / z_B=0,04 \quad SD_2=0,37 \quad Z=1,48 \quad p=0,20$

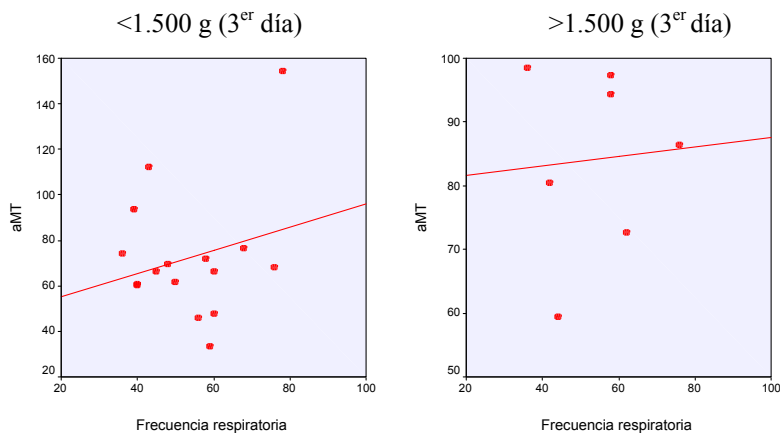


$r_A=0,47 / z_A=0,51 \quad r_B= 0,87 / z_B=1,31 \quad SD_2=0,37 \quad Z=-2,16 \quad p=0,05$

Figura 51: transformación “Z” de Fisher entre aMT y frecuencia respiratoria al ingreso y al 3^{er} día.

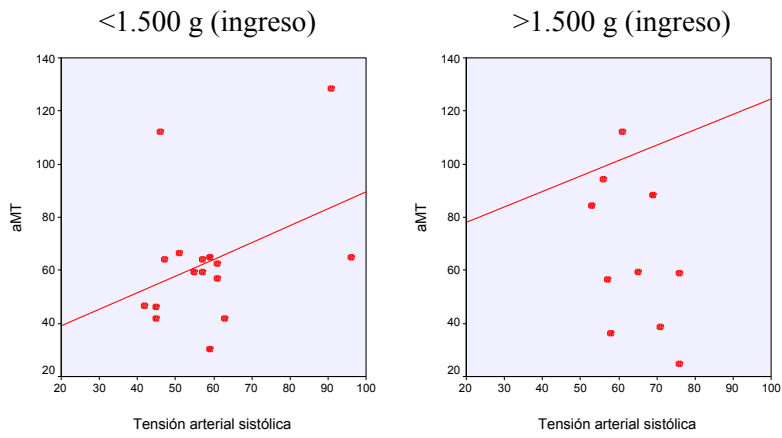


$r_A=0,88 / z_A=1,40 \quad r_B= 0,32 / z_B=0,34 \quad SD_2=0,37 \quad Z=1,06 \quad p=0,40$

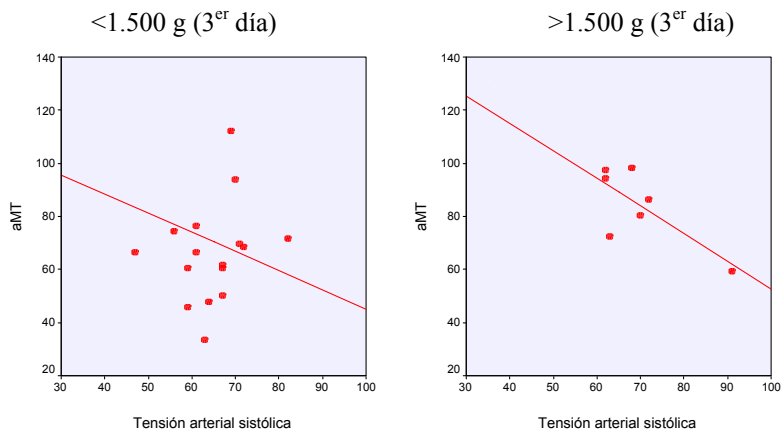


$r_A=0,28 / z_A=0,28 \quad r_B= 0,88 / z_B=1,38 \quad SD_2=0,37 \quad Z=-2,92 \quad p=0,01$

Figura 52: transformación “Z” de Fisher entre aMT y TAS al ingreso y al 3^{er} día.

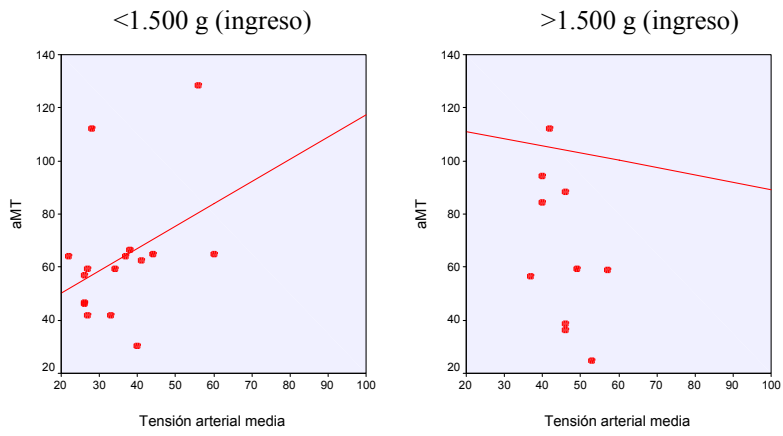


$$r_A=0,14/ z_A=0,14 \quad r_B= 0,75/ z_B=0,97 \quad SD_2=0,37 \quad Z=-2,25 \quad p=0,05$$

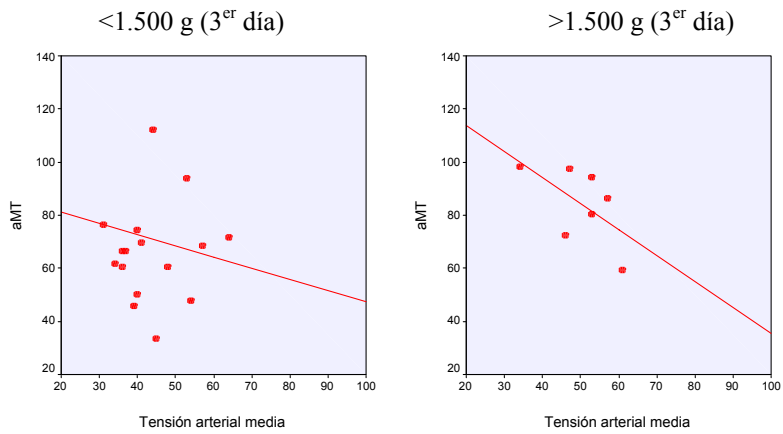


$$r_A=0,14/ z_A=0,14 \quad r_B= 0,75/ z_B=0,97 \quad SD_2=0,37 \quad Z=-2,24 \quad p=0,05$$

Figura 53: transformación “Z” de Fisher entre aMT y TAM al ingreso y al 3^{er} día.

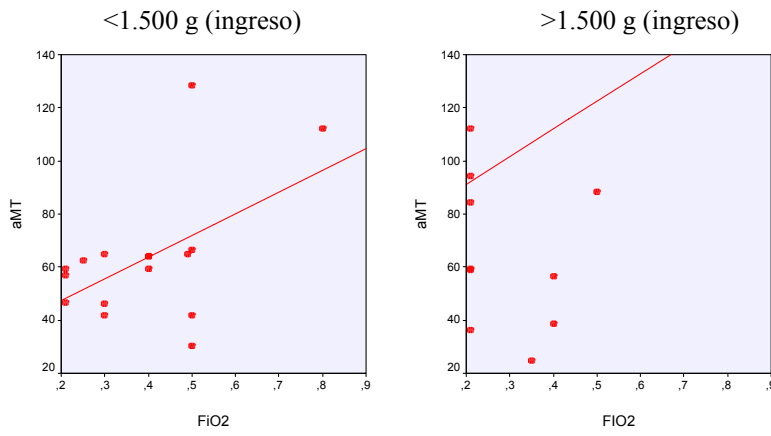


$r_A=0,16/ z_A=0,16 \quad r_B= 0,93/ z_B=1,66 \quad SD_2=0,37 \quad Z=-4,02 \quad p=0,01$

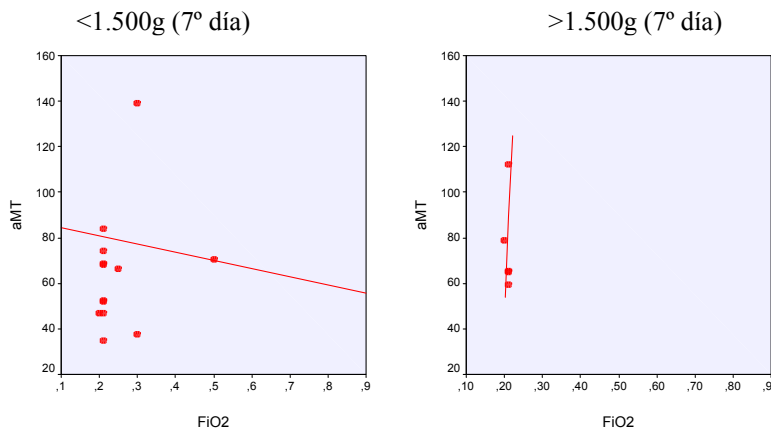


$r_A=0,59/ z_A=0,68 \quad r_B= 0,15/ z_B=0,16 \quad SD_2=0,37 \quad Z=1,42 \quad p=0,20$

Figura 54: transformación “Z” de Fisher entre aMT y FiO₂ al ingreso y al 7º día.

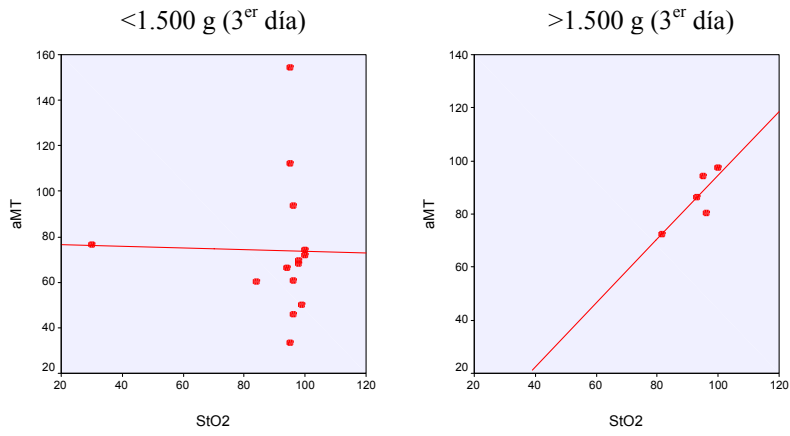


$r_A=0,04/ z_A=0,04 \quad r_B= 0,48/ z_B=0,52 \quad SD_2=0,37 \quad Z=-1,28 \quad p=0,20$

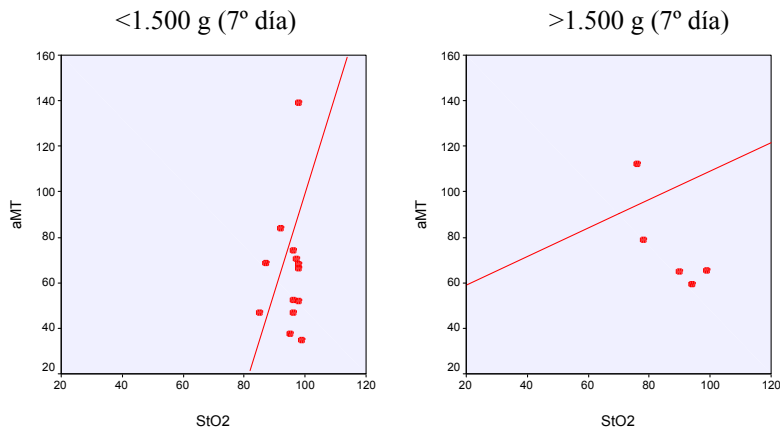


$r_A=0,87/ z_A=1,33 \quad r_B= 0,01/ z_B=0,005 \quad SD_2=0,37 \quad Z=3,57 \quad p=0,001$

Figura 55: transformación “Z” de Fisher entre aMT y Sat O₂ al 3^{er} y al 7^o día.

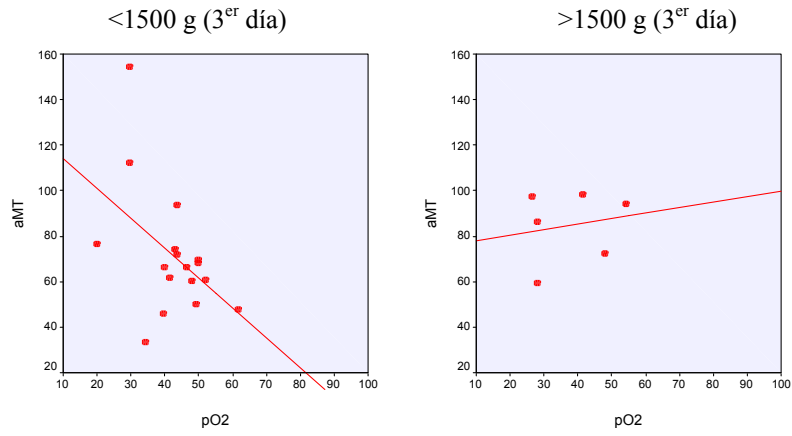


$r_A=0,94/ z_A=1,74 \quad r_B= 0,08/ z_B=0,08 \quad SD_2=0,37 \quad Z=4,43 \quad p=0,001$

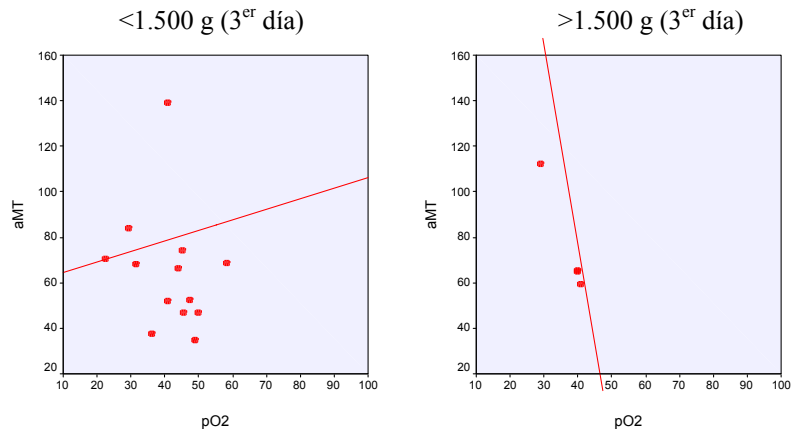


$r_A=0,27/ z_A=0,27 \quad r_B= 0,86/ z_B=1,31 \quad SD_2=0,37 \quad Z=-2,80 \quad p=0,01$

Figura 56: transformación “Z” de Fisher entre aMT y pO₂ al 3^{er} y al 7^o día.

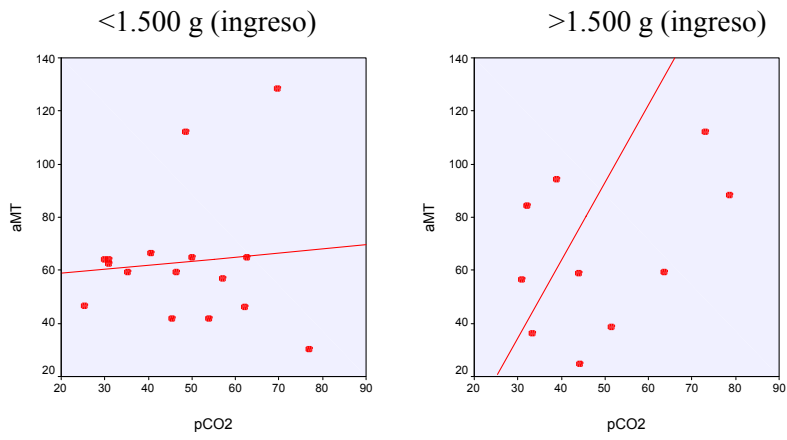


$r_A=0,06/ z_A=0,06 \quad r_B= 0,73/ z_B=0,93 \quad SD_2=0,37 \quad Z=-2,34 \quad p=0,02$

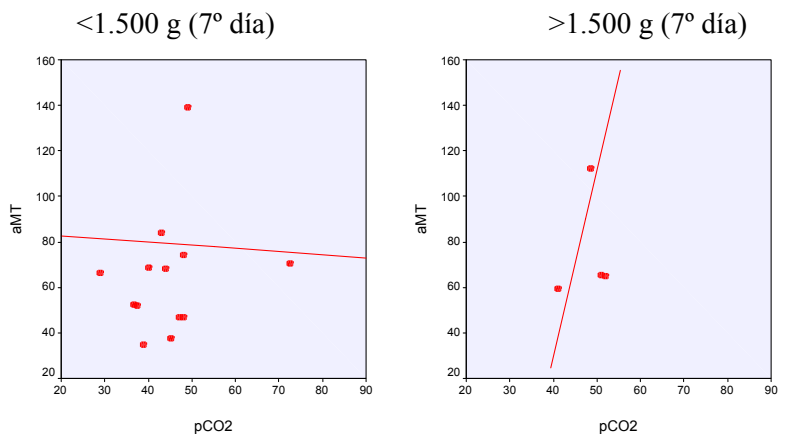


$r_A=0,81/ z_A=1,11 \quad r_B= 0,25/ z_B=0,26 \quad SD_2=0,37 \quad Z=2,29 \quad p=0,05$

Figura 57: transformación “Z” de Fisher entre aMT y pCO₂ al ingreso y al 7° día.

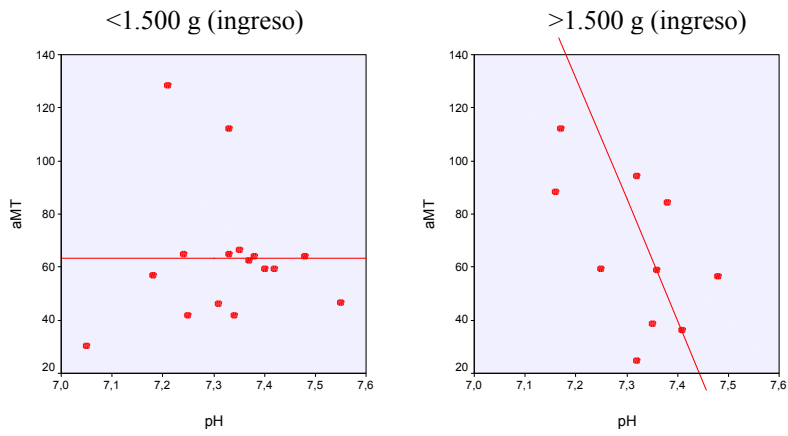


$r_A=0,73/ z_A=0,94 \quad r_B= 0,02/ z_B=0,01 \quad SD_2=0,37 \quad Z=2,49 \quad p=0,02$

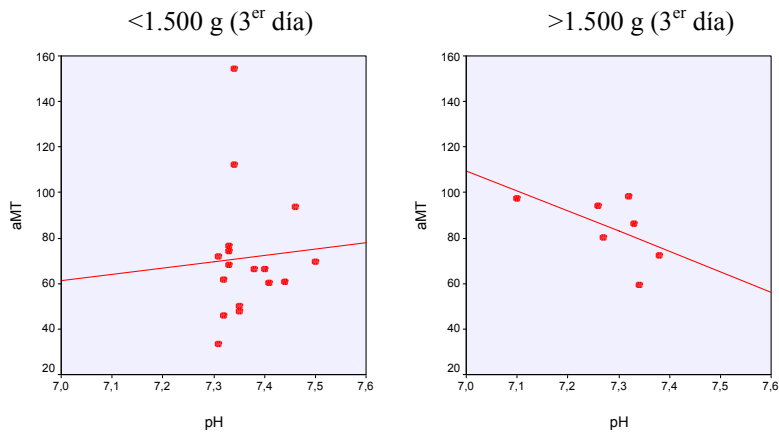


$r_A=0,94/ z_A=1,70 \quad r_B= 0,30/ z_B=0,31 \quad SD_2=0,37 \quad Z=3,15 \quad p=0,001$

Figura 58: transformación “Z” de Fisher entre aMT y pH al ingreso y al 3^{er} día.

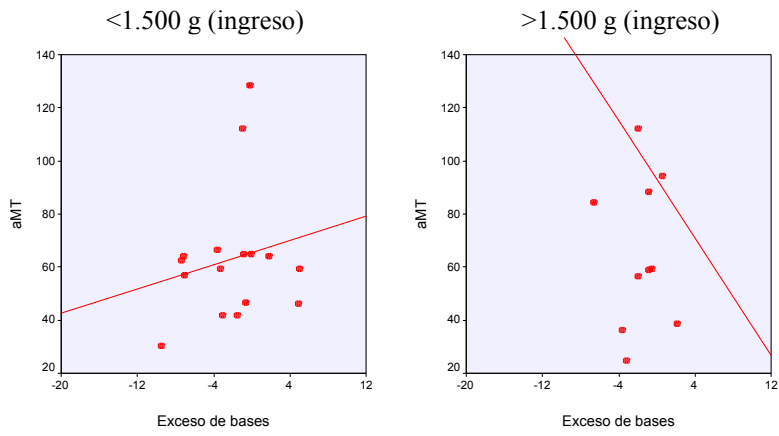


$r_A=0,99/ z_A=2,99 \quad r_B= 0,00/ z_B=0,00 \quad SD_2=0,37 \quad Z=8,05 \quad p=0,001$

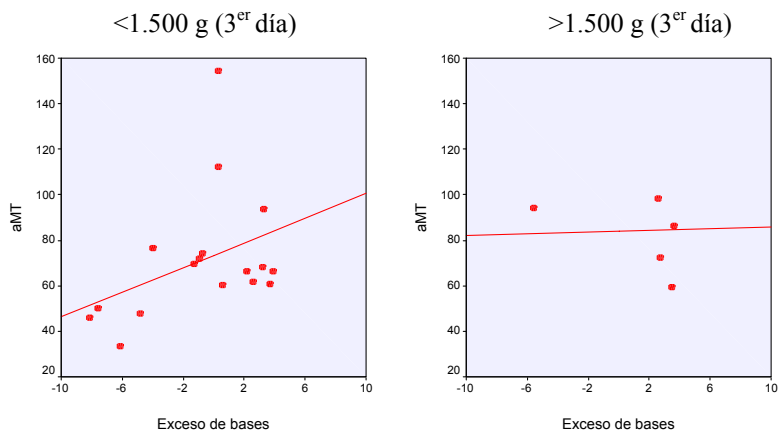


$r_A=0,83/ z_A=1,20 \quad r_B= 0,18/ z_B=0,19 \quad SD_2=0,37 \quad Z=2,73 \quad p=0,01$

Figura 59: transformación “Z” de Fisher entre aMT y exceso de bases al ingreso y al 3^{er} día.



$r_A=0,47/ z_A=0,51 \quad r_B= 0,16/ z_B=0,17 \quad SD_2=0,37 \quad Z=0,92 \quad p=0,40$



$r_A=0,12/ z_A=0,13 \quad r_B= 0,83/ z_B=1,20 \quad SD_2=0,37 \quad Z=-2,8 \quad p=0,01$

V.- DISCUSIÓN

La melatonina, descubierta originalmente como una hormona de la glándula pineal, es producida además por microorganismos, plantas, invertebrados, así como diversos órganos y sistemas de los vertebrados que poseen capacidad neuroendocrina⁴⁷. También por células individualizadas del sistema inmune²³⁰, por las plaquetas o las células endoteliales. La melatonina es una molécula que se ha preservado a lo largo de la evolución, puesto que está presente en todos los organismos, desde los unicelulares a los vertebrados²³¹.

Clásicamente se consideraba que los efectos de la melatonina estaban mediados por su unión a un receptor (como ocurre con su capacidad como moduladora general de todos los biorritmos presentes en los seres humanos); pero más recientemente, se han descrito propiedades no mediadas por un receptor, entre las que se incluyen su actividad como “barrendero” (neutralizante) de radicales libres¹⁹³ y antioxidante indirecto²³². La melatonina posee, además, propiedades oncostáticas²³³, inmunomoduladoras¹⁰⁴ y antienvjecimiento¹⁹³.

En los vertebrados, la melatonina es sintetizada y liberada por la glándula pineal de forma sincronizada con el fotoperiodo. Alcanza sus niveles máximos por la noche. Puesto que la producción de melatonina se activa durante la noche (acrofase sobre las 03:00 h), las concentraciones durante el día pueden tener un origen exclusivamente extrapineal. La tasa circulante de melatonina de procedencia periférica es significativamente menor que la procedente de la glándula pineal. Aunque uno de los principales orígenes extrapineales de la melatonina son los tejidos gastrointestinales, donde la concentración de melatonina es 10-100 veces mayor que en la sangre, existiendo en total, al menos, 400 veces más melatonina que en la glándula pineal. La producción gastrointestinal de melatonina parece estar relacionada

con la periodicidad de la ingesta alimenticia²³⁵. Como característica añadida, la melatonina de procedencia extrapineal no experimenta modificaciones circadianas en su concentración a lo largo del día²³⁶.

Un área de la biomedicina en rápido desarrollo es la protección antioxidante y, especialmente, la neuroprotección. Incluso si no consideramos los datos puntuales en este campo acerca de la utilidad como antioxidante de la melatonina a dosis suprafarmacológicas^{237,238}, disponemos de un notable cuerpo de evidencia que muestra su capacidad protectora en múltiples cultivos celulares y sistemas *in vivo*¹⁷⁸. La actividad antioxidante se ha observado a distintos niveles, incluyendo la atenuación de la producción de radicales libres y los efectos antiexcitadores y antiinflamatorios. La melatonina interacciona eficazmente con distintos tipos de especies reactivas tanto de oxígeno como nitrogenadas, así como con radicales orgánicos, favoreciendo la expresión de enzimas antioxidantes (glutathion peroxidasa, glutathion reductasa, etc) y disminuyendo la expresión de enzimas pro-oxidantes (óxido nítrico sintetasas, lipoxigenasas)²³².

En el periodo neonatal, el conocimiento acerca de la actividad antioxidante de la melatonina es muy escaso, aunque es sabido que el neonato activa su producción de melatonina en respuesta a estímulos estresantes^{239,240}.

Cuando más prematuros son los neonatos, más intenso es el estrés oxidativo al que se ven sometidos y, en consecuencia, es la prematuridad, más que la tasa de oxígeno administrada, la causa del estrés oxidativo en lactantes de muy bajo peso al nacer²⁴¹. Éste es significativamente mayor en la primera semana de vida de los neonatos hipóxicos que en pretérminos control (sanos). En este lapso

de tiempo, el estrés oxidativo también está incrementado en neonatos sin hipoxia, lo que sugiere que el daño provocado por radicales libres también está presente en lactantes con evolución clínica normal^{242,243}.

El feto experimenta un proceso de preparación para el parto que le asegure un adecuado funcionamiento pulmonar en el ambiente relativamente hiperóxico (21% de oxígeno) extraútero, en comparación con la sangre parcialmente desaturada que le llega vía placentaria. En modelos experimentales, la actividad de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa se incrementa antes del parto en una media de 150-200% aproximadamente; incremento paralelo al rápido aumento en el contenido pulmonar de surfactante (10-15%) al final de la gestación²⁴⁴. El incremento de producción de las especies reactivas de oxígeno (estrés oxidativo) en paralelo con el incremento madurativo del sistema enzimático antioxidante (AOE) pulmonar, sugiere que debe ser el aumento de sustrato, el mecanismo primario que controla la mayor expresión del gen AOE, en el proceso de preparación para el parto²⁴⁵. En experimentación animal se observa una estrecha correlación entre la toxicidad pulmonar grave por oxígeno y la incapacidad del animal para inducir su protección antioxidante. Además, los neonatos a término son capaces de inducir mayores niveles de antioxidantes que los pretérmino si son sometidos a elevadas concentraciones de oxígeno o en presencia de patologías asociadas a estrés oxidativo²⁴³. Por esta razón, los neonatos nacidos a término son más resistentes al daño por oxígeno que los nacidos pretérmino o que los adultos. Además de la hiperoxia, otras vías incrementan el estrés por radicales libres en el pretérmino, como el sistema de la xantina-oxidasa, que se activa con los episodios de isquemia-reperfusión²⁴⁶.

Teniendo en cuenta que experiencias puntuales indican la probable utilidad clínica de la melatonina como antioxidante en el periodo neonatal, y que en prematuros con síndrome de distress respiratorio el tratamiento con el antioxidante melatonina disminuye la concentración de varios marcadores de estrés oxidativo en la primera semana de vida²⁴⁷; hemos analizado en la presente tesis doctoral, la distribución longitudinal de las concentraciones diurnas de melatonina en neonatos de ambos sexos nacidos pretérmino, para valorar si su perfil de secreción apoya una posible participación de la melatonina como antioxidante fisiológico, como parte integrante del entramado antioxidante en el periodo neonatal precoz.

El trabajo se llevó a cabo en 35 neonatos ingresados en la Unidad Neonatal, que no presentaban malformaciones congénitas, anemia, sepsis, trastornos hemodinámicos graves o alteraciones metabólicas, tras obtener el consentimiento informado de los padres, así como del *Comité Ético del Hospital*, siguiendo las recomendaciones de la *Declaración de Helsinki*. Las mediciones de melatonina se realizaron con la muestra sobrante de las mediciones analíticas de rutina, indicadas en base al estado clínico de los pacientes.

La edad gestacional de los neonatos se estableció de acuerdo a los criterios físicos y neurológicos de *Dubowitz*²⁴⁸. En la Unidad Neonatal los recién nacidos estuvieron expuestos al régimen de luz-oscuridad habitual en el hospital (con luz ambiental entre las 08:00-21:00 h). Las características generales y la información obstétrica y perinatal de interés de cada uno de los pacientes se recogen en las tablas 7 a 12. La muestra, con 35 neonatos, tenía una edad gestacional comprendida entre 26-40 semanas (media 32,48 s) y unos pesos al

nacer entre 870-4.400 g (media 1.799,8 g). Se clasificó de acuerdo con las siguientes dos hipótesis:

1. Incluyendo el total de la muestra, N= 35, a fin de estudiar la evolución de las distintas variables analizadas y su relación con la concentración de melatonina, a las 09:00 horas de los días 1º, 3º y 7º de vida.

2. Para estudiar la existencia de posibles diferencias entre los subgrupos de neonatos de menos y de más de 1.500 g al nacer. Básicamente, los momentos de estudio y las variables analizadas son las mismas que en la hipótesis previa. De tal manera que la muestra se subdividió en dos grupos:

- Grupo <1.500 g, formado por 18 neonatos: con edades gestacionales entre 26-33 semanas (30,26 s) y pesos al nacer entre 870-1490 gramos (1.218,95 g).

- Grupo > 1.500 g, formado por 17 neonatos (12 pretérminos, 5 a término) con las siguientes características: edades gestacionales entre 30-40 semanas (35,12 s) y pesos entre 1.540-4.400 g (2.489,69 g).

Siguiendo el protocolo clínico hospitalario, en cada uno de los pacientes se realizaron los siguientes procedimientos: gasometría y equilibrio ácido-base, hemograma completo y bioquímica general (balance iónico, función renal, enzimas hepáticas, proteína C reactiva). Se realizaron cultivos de forma sistemática cuando se realizaron procedimientos invasivos o en presencia de factores de riesgo obstétricos y/o perinatales. La concentración de bilirrubina se monitorizó en función de los días de vida, edad gestacional y peso al nacer.

La mayoría de los neonatos menores de 1.500 g precisaron apoyo respiratorio, mediante presión positiva continua de la vía aérea vía nasal (CPAP nasal) (n= 10), excepto 6 pacientes que precisaron ventilación mecánica.

Se midió melatonina en suero, mediante RIA, a las 09:00 horas de los días de vida, 1º, 3º y 7º. Puesto que las variables analizadas son consideradas como variables biológicas típicas (que cumplen los criterios de normalidad), se empleó un test ANOVA-II a fin de comparar dos variables con dos factores:

- factor I: día de obtención de la muestra;
- factor II: peso del neonato.

Las modificaciones de los niveles séricos de melatonina en el periodo neonatal precoz se muestran en la tabla 110. El análisis mediante ANOVA demostró un aumento significativo de melatonina en función del incremento de peso ($F= 36,8$ $p= 0,017$), así como ausencia de cambios en función del día de obtención de la muestra, a pesar de que en ambos grupos de estudio la concentración de melatonina aumentó en los primeros días de vida, sin alcanzar una diferencia estadísticamente significativa ($F: 1,76$; $p= NS$).

En muestras de suero tomadas a las 09:00 h, el valor medio de melatonina en el primer día de vida en el grupo de menores de 1.500 g, fue $63,17 \pm 6,21$ pg/ml, que progresivamente experimentó un ligero incremento hasta $79,3 \pm 6,8$ pg/ml a los 7 días de vida (tabla 38). En el grupo de mayores de 1.500 g, los valores de melatonina fueron significativamente superiores, y también se incrementaron ligeramente, desde $104,16 \pm 22,92$ pg/ml en el primer día hasta $109,45 \pm 24,05$ pg/ml a los 7 días de vida (tabla 39). En todos los grupos la concentración de melatonina aumentó en la primera semana de vida.

Melatonina en cordón umbilical						
Grupos	GCD	GCN	GPD	GPN	GDD	GDN
Arteria umbilical	26,2 (13,6)	75,1 (13,1)	32,8 (21,2)	75,8 (28,6)	45,4 (17,9)	100,9 (26,9)
Vena umbilical	35,6 (25,2)	84,3 (33,8)	34,0 (10,9)	65,1 (31,7)	40,8 (17,1)	97,9 (44,9)

Tabla 146: valores de melatonina (media y desviación estándar entre paréntesis) medidas por RIA, en sangre procedente de cordón umbilical, en distintos grupos de recién nacidos (control, pretérminos, sufrimiento fetal) durante el día y por la noche. GCD= grupo control día; GCN= grupo control noche, GPD= grupo prematuros día; GPN= grupo prematuros noche; GDD= grupo distress fetal día; GDN= grupo distress fetal noche.

Estudios previos han demostrado diferencias entre la concentración sérica de melatonina en arteria y vena umbilicales en neonatos, con mayores concentraciones en vena; diferencias día-noche en la concentración de melatonina²³⁹ y, ausencia de ritmo circadiano de melatonina durante el periodo neonatal precoz²⁴⁰. En consecuencia, el ritmo circadiano de melatonina descrito en la circulación fetal y cordón umbilical de neonatos es un reflejo del ritmo circadiano materno y es debido al paso placentario de ésta. Por tanto, la glándula pineal del feto, aunque activa, no secreta melatonina de modo rítmico

durante esta etapa. Durante el desarrollo, el sistema circadiano alcanza su funcionalidad en etapas precoces y es regulado mediante información lumínica²⁴⁹. Por otra parte, los ritmos circadianos presentes en el feto y neonato, puesto que el sistema circadiano está funcionando en la vida fetal y puede recibir sus impulsos a través de la madre, suponen una fuerte influencia del fotoperiodo prenatal sobre la ontogenia postnatal del ritmo de melatonina²⁵⁰. Un ritmo circadiano autónomo de melatonina aparece después del periodo neonatal y persiste indefinidamente²⁵¹. Se ha documentado que la presencia de pulsos ultradianos de secreción con periodos de 3,4 y 1,5 horas, posiblemente asociados con los ciclos de sueño de movimientos oculares rápidos, caracteriza la secreción nocturna de melatonina en escolares de ambos sexos, pulsos que resultan más afectados por la etapa puberal que por la edad cronológica del escolar^{252, 253}.

El ritmo circadiano de la frecuencia cardiaca fetal (sincronizado con los ritmos maternos de descanso-actividad, frecuencia cardiaca, cortisol, melatonina y temperatura corporal), está presente en las últimas 10 semanas de gestación. Aunque bajo influencia materna, los ritmos que son circadianos antes del nacimiento se convierten en ultradianos al nacimiento. Tanto los lactantes nacidos pretérmino como los a término, muestran un significativo incremento de la amplitud del ritmo de temperatura corporal durante los primeros 3 meses de vida²⁵⁴, que coincide con la ausencia de ritmo de melatonina. Es destacable que, en adultos, la acrofase nocturna de secreción de melatonina se sincroniza perfectamente con el nadir de temperatura corporal. Más aún, y apoyando una posible función protectora de la melatonina, al igual que en el feto (que está sincronizado con la madre), los lactantes

prematuros de bajo riesgo analizados a las 30-40 semanas postconcepción, tienen una maduración similar del sueño (con un incremento del sueño tranquilo y un descenso del sueño en fase indeterminada). Un mayor desarrollo de la organización del sueño, caracterizado por un incremento de las ondas lentas y de husos (spindle) durante el sueño tranquilo y acoplado con el ritmo circadiano, ocurre durante los primeros 6 meses de vida, tanto en lactantes a término como pretérmino²⁵⁴. Estos cambios podrían estar relacionados con la aparición del ritmo de melatonina. Por otro lado, la abundancia de sueño REM durante los primeros 3 meses de vida se ha asociado con el déficit de las funciones atribuidas a la melatonina, mientras que el descenso del porcentaje de sueño REM coincide con la aparición de una mayor secreción de melatonina y la maduración de la glándula pineal²⁵⁵. Estos datos, en conjunto, apoyan que la idea de que la ausencia de ritmo circadiano de melatonina y la baja concentración de esta hormona después del periodo neonatal precoz, pueden tener importancia fisiológica.

Además, el crecimiento intrauterino retardado o el sufrimiento fetal se han asociado a una acusada reducción de la secreción de melatonina durante los primeros 3 meses de vida. La excreción urinaria de 6-sulfatoxi-melatonina (6SaMT) es menor en adultos que tuvieron un crecimiento retardado prenatal o nacieron después de las 40 semanas de gestación²⁵⁶. En adultos jóvenes la excreción de 6SaMT parece relacionarse con la producción de melatonina y el tamaño corporal al nacimiento, relación que paradójicamente no se observa al estudiar niños²⁵⁷. Asimismo, se ha observado que la excreción media diaria de 6SaMT es significativamente menor en lactantes que han sufrido un amago de muerte súbita que en lactantes

control y que en hermanos de fallecidos por un síndrome de muerte súbita del lactante (SMSL, SIDS en inglés). El ritmo diario de excreción de 6SaMT en lactantes afectados por un amago de muerte súbita (ALTE en inglés) muestra un menor valor medio de 24 horas así como una menor amplitud, mientras que tanto la acrofase como el nadir de excreción fue similar en todos los grupos. Durante el seguimiento, entre 6-8 semanas después, se mostró que la excreción de 6SaMT aumentó en todos los casos, lo que se interpreta como un retardo en la ontogenia, más que una deficiencia permanente en la producción de melatonina, en pacientes que sufrieron un amago de muerte súbita²⁵⁸. La administración de melatonina a ratas preñadas previno el daño oxidativo mitocondrial inducido por la isquemia-reperusión sobre el cerebro de las crías nacidas prematuramente²⁵⁹.

En trabajos previos pudimos demostrar que durante el estrés neonatal (sufrimiento fetal agudo) aumenta la producción de melatonina durante la noche, en comparación con neonatos control a término o pretérmino²³⁹. La participación de la melatonina en situaciones de estrés está bien documentada²⁶⁰, siendo considerada esta sustancia como una hormona de estrés.

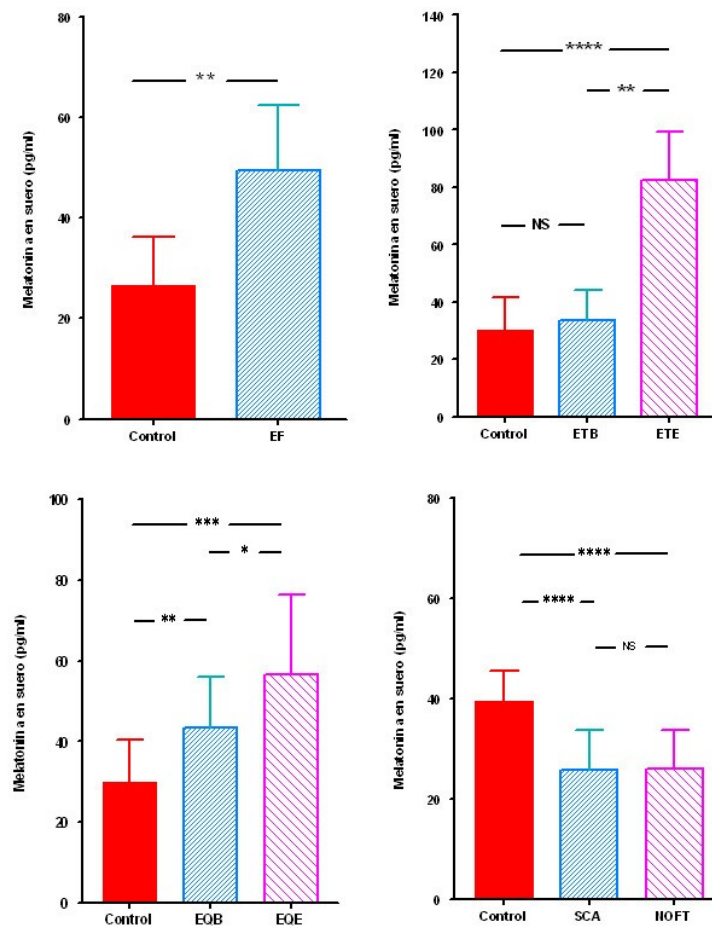


Figura 60: comportamiento de la concentración sérica de melatonina en distintos tipos e intensidad de estrés (Muñoz et al 2006). EF: estrés febril, ETB: estrés traumatismo bajo, ETE: estrés traumatismo elevado, EQB: estrés quirófono bajo, EQE: estrés quirófono elevado, SCA: síndrome carencia afectiva.

Aunque previamente se había postulado que la glándula pineal permanece insensible (en estado refractario) ante distintos estímulos fisiológicos que ocurren durante las horas de luz, lo cierto es que

diferentes aportaciones muestran que permanece activa a lo largo de las 24 horas del día. Así, para la fiebre, que es el motivo más habitual de consulta en la práctica pediátrica, se demuestra una elevación de la concentración circulante de melatonina (49,33 +/- 12,79 vs 26,54 +/- 9,57 pg/ml en el grupo control). La fiebre, aún siendo habitualmente un síntoma benigno, es una situación de estrés orgánico y la glándula pineal, conforme a las propiedades (sincronizadora, estabilizadora y antiestrés) que se le atribuyen, modifica su fisiología y secreta mayores cantidades de melatonina. Los niveles de melatonina en suero obtenidos por nuestro grupo para distintos tipos de estrés y en subgrupos con distinto grado de intensidad se recogen en la figura 60. Además, y como puede observarse en dicha figura, el aumento de melatonina es proporcional a la intensidad y duración del estrés. Estas aseveraciones ya tuvimos la ocasión de comprobarlas en aportaciones previas^{94,261-263}. Así, 1 hora después de experimentar una situación de estrés agudo, como es una crisis convulsiva, la concentración de melatonina es muy similar a la concentración basal y a la observada 24 horas después del episodio convulsivo aislado (figura 61).

Cada vez un mayor número de evidencias relacionan el estrés psicológico con la expresión clínica de asma y atopia, por la influencia que el estrés tiene sobre la inmunorregulación y sobre las vías del estrés oxidativo, que a su vez modifican la respuesta inflamatoria²⁶⁴.

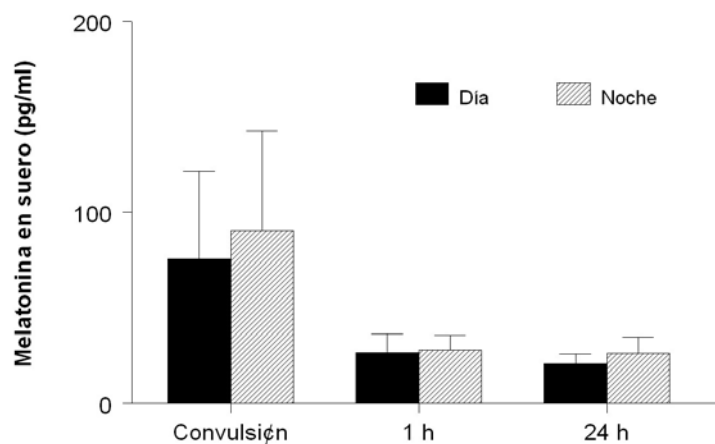


Figura 61: comportamiento evolutivo de la concentración sérica de melatonina durante un episodio convulsivo, 1 hora y justo 24 horas después. Se representan los valores en muestras diurnas y nocturnas.

Nuestro grupo de investigación ha podido demostrar como la concentración de melatonina es menor durante los episodios de dermatitis atópica, con diferencias estadísticamente significativas sólo durante el día, aunque la concentración de melatonina es mayor durante la noche²⁶⁵. La menor concentración diurna de melatonina podría reflejar un descenso de la producción extrapineal, de probable origen en el sistema inmunológico²³⁰.

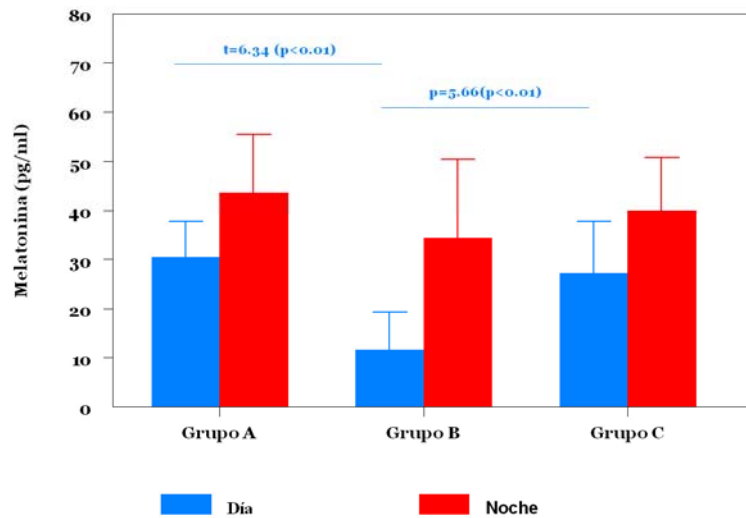


Figura 62: variaciones día/noche de la concentración de melatonina pacientes con dermatitis atópica obtenidas de muestras pareadas. Grupo A: control; Grupo B: crisis severa de dermatitis atópica; Grupo C: dermatitis atópica en fase estable. Se indica, adicionalmente, el grado de significación estadística.

En contraste con las observaciones arriba reseñadas, ante un estrés crónico de leve o moderada intensidad, los cambios neuroendocrinos adaptativos ocurren en un sentido inverso. Así lo demuestran los datos obtenidos en un modelo de estrés crónico de origen psicosocial: el síndrome de carencia afectiva con o sin retraso de crecimiento de causa no orgánica²⁶⁶. La situación de abandono físico y/o las carencias de todo tipo, obligaron a internar a nuestros pacientes en una institución de acogida con separación efectiva de los padres. Observaciones previas indicaron que la concentración sérica matutina de melatonina es menor en estos pacientes que en un grupo

de niños normales de edad y sexo comparables^{90, 267}, datos que hemos vuelto a corroborar en el grupo de pacientes que recoge la presente aportación.

Aunque de signo contrario, también en el estrés crónico de origen psicosocial las modificaciones neuroendocrinas son de mayor cuantía, a mayor duración e intensidad del estrés. Así, en el retraso de crecimiento de causa no orgánica²⁶⁸, que puede ser considerado como la expresión del síndrome de carencia afectiva de mayor gravedad, la concentración sérica de melatonina alcanza su máxima depresión, aunque la diferencia entre ambos grupos de estrés psíquico no logra significación estadística²⁶⁹.

Como vemos, el sentido de la modificación de la melatoninemia es diferente en cuadros agudos y crónicos, y también entre distintas especies, puesto que es diferente la regulación de la producción de melatonina, v.g: entre el ser humano y la rata. Es más, en la rata la respuesta de melatonina en un modelo de estrés agudo es diferente durante el día (incremento de melatonina) que en la noche (descenso de melatonina)²⁷⁰.

En conjunto, estos datos ponen de manifiesto la necesidad e importancia de aclarar el mecanismo implicado en la síntesis y secreción de melatonina en humanos durante los primeros meses de vida. Las elevadas concentraciones de melatonina obtenidas en un estudio previo en el periodo neonatal precoz (media de 148 pg/ml)²⁴⁰, en comparación con los valores presentes en arteria y vena umbilical²³⁹ y con las concentraciones consideradas normales durante los primeros 6 meses de vida (media de 27,3±5,4 pg/mL)²⁷¹, corroboran las observaciones aquí reseñadas.

Creemos que las elevadas concentraciones de melatonina encontradas en el periodo neonatal precoz, y que podrían mantenerse elevadas durante todo el periodo perinatal, tienen una función como antioxidante. La melatonina es un potente antioxidante de bajo peso molecular que alcanza concentraciones especialmente elevadas durante los episodios de isquemia/reperfusión²⁷², incluyendo los que ocurren en recién nacidos durante el parto²³⁹. La elevada producción de melatonina en el periodo neonatal precoz contrasta con los bajos niveles obtenidos en los tres primeros meses de vida cuando descienden las necesidades de antioxidantes; y por lo tanto, no están relacionadas con el ritmo endógeno normal de melatonina. Estas elevadas concentraciones de melatonina parecen proceder de distintos órganos²⁷³, puesto que la pinealectomía no suprime las tasas circulantes de melatonina. Las elevadas concentraciones reseñadas corresponden a las 09:00 h y, en consecuencia, no han sido suprimidas por la exposición matutina a la luz, aparte de la ausencia de un ritmo circadiano maduro en este momento de la vida, y podrían asimismo encontrarse en otros horarios, si se estudiase. Para Tan et al, la melatonina desempeña una función importante en los episodios fisiológicos de isquemia/reperfusión, como integrante del sistema antioxidante de defensa para proteger contra el daño oxidativo potencial inducido por los episodios fisiológicos de isquemia/reperfusión²⁷².

En concordancia con los datos anteriormente expuestos, distintos indicadores de estrés oxidativo están elevados durante el periodo perinatal, con un incremento aún mayor en circunstancias patológicas²⁷⁴, y justifican las elevadas concentraciones compensadoras de antioxidantes. Por ejemplo, la concentración de

isoprostanos, como marcadores de la peroxidación lipídica debida a radicales libres, es mayor en líquido amniótico procedente de embarazos con crecimiento uterino retardado. Los mayores valores de isoprostanos se encuentran en nacidos pretérmino, incluso mayores que en neonatos a término, con una correlación significativa negativa entre la concentración plasmática de isoprostanos y la edad gestacional²⁷⁴. Otros marcadores, como el 8-OH-dG y el malondialdehido (MDA) incrementado en orina de embarazadas, se relacionan con un menor peso neonatal en partos a término²⁷⁵. En mujeres adolescentes fumadoras la actividad de las dos principales enzimas antioxidantes (SOD, GSH-Px) y los niveles plasmáticos de malondialdehido están significativamente elevados, pero la concentración de melatonina fue significativamente menor que en no fumadoras²⁷⁶. Aunque la melatonina puede reducir el daño del sistema respiratorio debido a radicales libres inducidos por el humo del tabaco, el equilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes puede deteriorarse aún más si la adolescente se queda embarazada, con las presumibles consecuencias negativas sobre el feto.

Se ha indicado que la melatonina disminuye el estrés oxidativo en neonatos con asfixia²³⁷, distress respiratorio²⁴⁷, sepsis²⁷⁷, y en aquellos sometidos a cirugía²⁷⁸. La concentración sérica de los productos de peroxidación lipídica (malondialdehido) y de nitritos-nitratos en neonatos con asfixia²³⁷ y sepsis²⁷⁷, está significativamente aumentado en comparación con neonatos normales y, además, disminuye significativamente mediante el tratamiento con melatonina. Por otra parte, esta hormona mejoró el pronóstico de los neonatos sépticos, a juzgar por los parámetros séricos pertinentes. En neonatos con síndrome de distress respiratorio agudo (grado III-IV) tratados

con melatonina, se redujeron las concentraciones de interleukina-6, interleukina-8, factor de necrosis tumoral alfa, así como de nitritos/nitratos, en mediciones realizadas a las 24, 72 horas y a los 7 días, en comparación con neonatos no tratados. Después del tratamiento con melatonina hubo un descenso significativo de la concentración de nitritos/nitratos, que en cambio permanecieron elevados y aumentaron aún más en neonatos con síndrome de distress respiratorio agudo no tratados con melatonina²⁴⁷. El tratamiento con melatonina disminuyó las interleukinas 6 y 8, así como el factor de necrosis tumoral alfa en el aspirado traqueobronquial de neonatos con síndrome de distress respiratorio sometidos a ventilación mecánica, y además mejoró el pronóstico clínico²⁷⁹. Los neonatos no tratados con melatonina y que desarrollaron enfermedad pulmonar crónica (broncodisplasia pulmonar)²⁸⁰, tenían concentraciones mucho más elevadas de estas citokinas proinflamatorias que aquellos que no desarrollaron enfermedad pulmonar crónica²⁸¹.

El sufrimiento fetal agudo, generador de estrés oxidativo elevado, puede complicarse con la aspiración de meconio. Se ha demostrado que el meconio interfiere con la función de los macrófagos alveolares induciendo mayor estrés oxidativo y apoptosis y, además, inactivando el surfactante²⁸². Este proceso puede ser contrarrestado mediante la administración de melatonina exógena²³⁷.

Los prematuros presentan una mayor concentración de hidroperóxidos²⁸³, una menor tasa de α -tocoferol y menor actividad de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, datos que sugieren un importante desbalance entre oxidantes y antioxidantes durante las primeras 72 horas de vida²⁸⁴. Una baja concentración de glutatión se asocia al desarrollo posterior de enfermedad pulmonar crónica en el

prematureo. Y la instilación intratraqueal de glutatión liposomal es eficaz elevando la concentración de glutatión y, además, disminuyendo la de malondialdehído, con lo cual se alcanzan propiedades antioxidantes a nivel bioquímico²⁸⁵.

La concentración plasmática de hipoxantina, xantina, ácido úrico, hidroperóxidos totales y productos avanzados de oxidación proteica, es mayor en neonatos hipóxicos que en controles, con una correlación entre ellos estadísticamente significativa. Cuanto más grave es la hipoxia, mayor es el daño sobre lípidos y proteínas debido a radicales libres²⁸⁶.

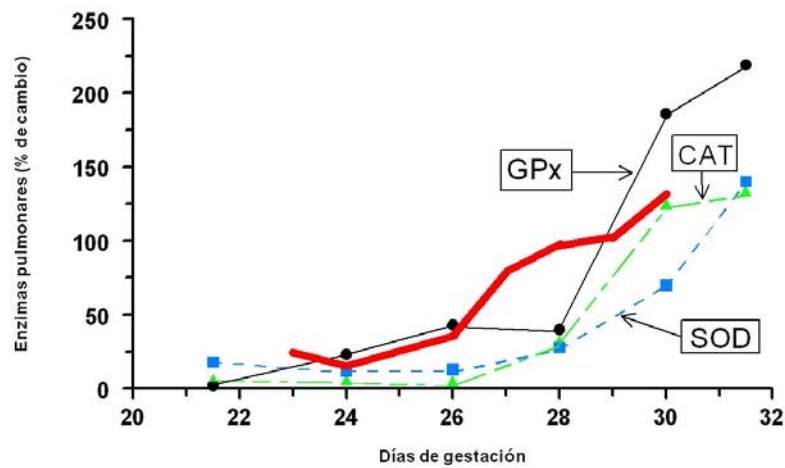


Figura 63: la cronología de desarrollo tanto de los enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, y glutatión peroxidasa) en pulmón fetal, como de la fosfatidilcolina disaturada ("surfactante") al final de la gestación (10-15%) es similar en cuatro animales de laboratorio (rata, conejo, hámster y cobaya). Los cambios evolutivos son: 1) rápido incremento (150-200%) de la concentración en pulmón fetal de las enzimas antioxidantes al final de la gestación; y 2) un rápido incremento paralelo del contenido en surfactante^{244,287}.

Estos parámetros de estrés oxidativo están significativamente más elevados en la primera semana de vida en neonatos hipóxicos que en prematuros control. En este lapso de tiempo también se incrementa de forma significativa el estrés oxidativo en neonatos sin hipoxia, dato que sugiere que el daño por radicales libres es menor que en prematuros con hipoxia pero que también está presente en nacidos no hipóxicos con curso clínico normal²⁴².

Durante las últimas semanas de gestación el feto incrementa su capacidad antioxidante (figura 63) para hacer frente a la relativa hiperoxia de la vida extrauterina, y la melatonina puede ser una de las sustancias antioxidantes inducidas a tal fin. Además, su aporte exógeno en cantidades muy elevadas²³⁷ ha mostrado su utilidad terapéutica, sin que se aprecien efectos secundarios indeseables. En resumen, el prematuro, y en especial su cerebro en desarrollo, es muy vulnerable al daño hipóxico-isquémico, que sigue un proceso evolutivo complejo en el cual se presentan oportunidades de intervención²⁸⁸ y la melatonina, al reducir la producción de radicales libres de oxígeno, puede ser un tratamiento neuroprotector eficaz para el feto²⁸⁹. El descenso de la bilirrubina plasmática, a la que también se le atribuye utilidad antioxidante, es simultáneo al incremento de la capacidad antioxidante del plasma y a un descenso de los parámetros de estrés oxidativo en los prematuros²⁹⁰.

La hipótesis acerca de la existencia de una denominada “Enfermedad por radicales libres oxigenados en neonatología” aún no ha sido demostrada, pero disponemos de un cuerpo de evidencia en progresivo incremento que parece indicar que los radicales libres están implicados en varios procesos patológicos que conducen a cuadros como la enfermedad pulmonar crónica, retinopatía de la prematuridad,

enterocolitis necrotizante y leucomalacia periventricular (PVL), el principal substrato anatómico de la parálisis cerebral en supervivientes de la prematuridad²⁹¹. La patogenia de la PVL se relaciona con los principales factores que interactúan:

1. un desarrollo incompleto del aporte vascular a la sustancia blanca cerebral,

2. un trastorno madurativo-dependiente de la regulación del flujo sanguíneo cerebral que puede subyacer a la propensión al daño isquémico de la sustancia blanca cerebral y,

3. una vulnerabilidad, también maduración-dependiente, de las células precursoras oligodendrogiales (OL), como principal blanco celular de la PVL²⁹².

Las células oligodendrogiales son, durante una etapa madurativa concreta, susceptibles al ataque por radicales libres, que se generan en gran cantidad durante los episodios de isquemia-reperfusión que, además, también provoca un incremento de glutamato intracelular. Esta vulnerabilidad parece relacionarse con un periodo del desarrollo caracterizado por la combinación de defensas antioxidantes deficientes y por la adquisición activa del hierro necesario para la diferenciación oligodendrogial. Como factores contribuyentes están:

1. la elevada probabilidad de ocurrencia de PVL en presencia de hemorragia intraventricular, que podría estar relacionada con incrementos localizados de hierro derivados de la hemorragia;

2. los procesos infecciosos o inflamatorios, tanto maternos como fetales, y las citokinas de ellos derivadas, por alterar la vasculatura y la hemodinámica cerebral, por generar radicales libres, o por su efecto directo sobre los precursores oligodendrogiales vulnerables.

El inicio de la cadena es la inmadurez anatómica y el bajo peso, que al condicionar la necesidad de un tratamiento intensivo con oxígeno suplementario, pueden producir radicales libres en exceso hasta sobrepasar los sistemas naturales de defensa antioxidante contra los radicales libres. También la nutrición parenteral, que puede hacer a los neonatos más propensos al déficit de nutrientes esenciales.

Cuanto más prematuro es el neonato, más propenso al estrés oxidativo y, por tanto, parece ser la prematuridad, más que la administración de oxígeno, la causa del estrés oxidativo en prematuros de muy bajo peso al nacer²⁴¹. En este orden de ideas, un resultado clínico malo se asocia con un incremento en las concentraciones de hidrocarburos exhalados (etano, pentano) y de malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) como productos de la peroxidación lipídica iniciada por el daño tisular (barotrauma, inflamación, infección)^{293,294}. La presencia de mayores concentraciones de hierro y la ausencia de lactoferrina en las fórmulas alimentarias, en comparación con la leche materna, puede ser la responsable de la mayor generación (*in vitro*) de radicales libres y de productos de peroxidación lipídica²⁹⁵. Por otro lado, la probable participación de la melatonina como neuroprotector en estas etapas vitales, se refuerza por la observación de que una baja excreción de melatonina en las primeras semanas de vida, se correlaciona con un retardo en las adquisiciones psicomotoras valoradas a los 3 y 6 meses de edad²⁹⁶, que la encefalopatía de la prematuridad incluye lesión tanto de la sustancia blanca como de las neuronas y axones²⁹⁷, y que la melatonina posee propiedades neuroprotectoras en otros modelos^{238, 289, 298}.

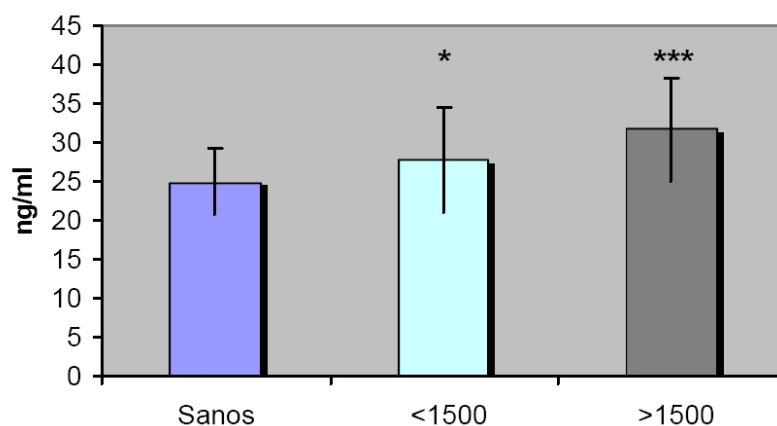


Figura 64: hidroperóxidos de membrana en cordón umbilical en un grupo de neonatos control y dos grupos de prematuros con pesos <1.500 g y ≥ 1.500 g ²⁸³.

Según resultados de nuestro grupo, la concentración de hidroperóxidos, como indicación del grado de estrés oxidativo, es mayor en pretérminos que en neonatos a término en la primera semana de vida ^{283,299,300}. No obstante, y de modo sorprendente, la concentración es mayor en el grupo con peso superior a 1.500 g que en el grupo de peso inferior a 1.500 g (figura 64). Esta observación apoya nuestras afirmaciones acerca de la correlación entre las mayores concentraciones de melatonina en >1.500 g y las mayores necesidades de protección antioxidante en este grupo. La concentración de hidroperóxidos en cordón umbilical es mayor en pretérminos nacidos por cesárea ($p < 0,005$) que en el parto vaginal. A partir del 3^{er} día de vida, la concentración y evolución del peróxido de hidrógeno es comparable en ambos grupos. Por el contrario, la actividad enzimática de la catalasa es mayor en pretérminos nacidos por parto vaginal espontáneo, especialmente en muestras de cordón umbilical y al 3^{er} día

de vida, con diferencias significativas ($p < 0,005$) en cordón umbilical. El nacimiento por cesárea provoca en pretérminos un desbalance entre la concentración de productos derivados del estrés oxidativo y sus mecanismos enzimáticos compensadores, que es rápidamente corregido en las primeras horas de vida, teniendo lugar, posteriormente, una evolución similar en ambos grupos de recién nacidos (cesárea/ parto eutócico)²⁸³.

Como Tan et al.²⁷² señalan, la elevada producción de melatonina en el periodo neonatal, aquí reseñada, es transitoria, no parece estar controlada por la luz, y no muestra variación endógena circadiana alguna, que se desarrolla varios meses después. En neonatos de bajo peso al nacer, corroboramos la presencia de elevadas concentraciones matutinas de melatonina que se mantienen durante la primera semana de vida. Estas tasas de melatonina son similares a las observadas durante la acrofase de secreción pineal nocturna en etapas posteriores, cuando la glándula pineal se sincroniza con las señales lumínicas ambientales.

En el periodo neonatal precoz estas elevadas concentraciones de melatonina parecen proceder de órganos extrapineales (con paso a la circulación sistémica) y pueden ejercer su función antioxidante en respuesta a las elevadas necesidades (aún fisiológicas) de protección antioxidante. Mientras que la concentración de melatonina en sangre es habitualmente baja, a nivel tisular puede exceder en varios órdenes de magnitud a la plasmática²³⁵.

Como Tan et al.²⁷², creemos que la melatonina ejerce una función fisiológicamente importante en el periodo perinatal (que comprende desde la 28 semana de gestación hasta la primera semana

de vida), como componente del sistema de defensa antioxidante que protege contra el daño oxidativo potencial.

Otros autores han estudiado la relación entre la excreción urinaria del principal metabolito de la melatonina (6-sulfatoxi-melatonina), con variables prenatales, perinatales y postnatales, en función de su posible relación con el desarrollo psicomotor. Entre las variables de estudio se incluyeron la evolución del embarazo, parto, periodo postnatal precoz, peso al nacer, patología médica y crecimiento (talla, peso y perímetro cefálico). Los datos acerca del desarrollo psicomotor se obtuvieron a los 1, 3, 6, 9, 12 y 18 meses de edad. Analizaron la relación entre la excreción nocturna de 6-sulfatoxi-melatonina a las 8 y 16 semanas de vida con las variables citadas. La concentración de 6-sulfatoxi-melatonina a las 16 semanas de vida fue significativamente inferior en lactantes con desarrollo psicomotor anormal a los 3 y 6 meses de vida ($p < 0,05$)^{296,301}. No se obtuvieron otras relaciones significativas entre crecimiento, complicaciones perinatales o patología médica, con respecto a la excreción de 6-sulfatoxi-melatonina a las 8 y 16 semanas de vida. Esta línea de trabajo aporta importantes datos para ayudar a definir el papel de la melatonina en las primeras etapas vitales, años en que su secreción es máxima, seguido de un descenso brusco años antes del inicio de los primeros signos físicos de desarrollo puberal (coincidiendo con la adrenarquia) y posteriormente un descenso mantenido y progresivo hasta la senectud.

VI.- CONCLUSIONES

1. Con los datos aportados en el presente proyecto, podemos concluir que el recién nacido menor de 1.500 g de peso al nacimiento, tiene una menor concentración matutina de melatonina que el nacido con más de 1.500 g durante la primera semana de vida.

2. La concentración de melatonina se incrementa con la maduración, y en nacidos a término la concentración matutina es similar a la encontrada durante la acrofase nocturna en preescolares y escolares, cuando la secreción pineal es máxima y experimenta una variación circadiana acoplada a los ciclos de luz / oscuridad.

3. Analizando conjuntamente los datos aportados por esta experiencia, así como otras aportaciones de nuestro grupo, se puede afirmar que: el perfil evolutivo de los niveles de melatonina sigue un curso paralelo con el grado de estrés oxidativo durante el período neonatal inmediato (primera semana de vida), con las mismas variaciones y tendencias en ambos grupos de recién nacidos.

4. El estudio e interpretación de la fisiopatología perinatal deberá contemplar los problemas derivados del estrés oxidativo y su relación con la neurohormona melatonina, como un aspecto esencial para interpretar la patología y, en consecuencia, el enfoque terapéutico de los múltiples problemas que presenta el neonato en estas situaciones.

5. A la luz de los hallazgos que durante los últimos años se vienen describiendo en relación al comportamiento de la fisiopatología perinatal en los procesos que aumentan los fenómenos de oxido-reducción, habría que aceptar que la melatonina formaría parte del entramado fisiológico encargado de contrarrestar el mayor grado de estrés oxidativo presente en estas etapas.

6. Considerando los resultados de la experiencia que aportamos, y en concordancia con otras publicaciones, podemos afirmar que la melatonina parece jugar un papel primordial en las primeras etapas del crecimiento y desarrollo, ya sea mediante su producción in situ en múltiples tejidos y órganos de la economía, para ejercer protección antioxidante local, y/o mediante su producción rítmica circadiana por parte de la glándula pineal.

7. La ausencia de una adecuada producción de melatonina en el periodo neonatal y antes de la maduración circadiana de la glándula pineal, pudiera conllevar efectos deletéreos en etapas posteriores del desarrollo, fundamentalmente del desarrollo psicomotor.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119(6):598-620.
2. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49(3):481-93.
3. Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 1991; 69(21-23):965-8.
4. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000; 49(2 Suppl 1):3-8.
5. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134(3):707-16.
6. McCord JM. Free radicals and heart disease. *Bibl Nutr Dieta* 1989;(43):327-37.
7. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(6 Suppl):1322S-6S.
8. Chance B, Waring A, Saronio C. Low temperature electron transport in cytochrome c in the cytochrome c-cytochrome oxidase reaction: evidence for electron tunneling. *Monograph* 1979; 29:56-73.
9. Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta* 1982; 710(2):197-211.
10. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(5 Suppl):715S-24S.

11. Bracci R. Calcium involvement in free radical effects. *Calcif Tissue Int* 1992; 51(6):401-5.
12. Redl H, Gasser H, Schlag G, Marzi I. Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. *Br Med Bull* 1993; 49(3):556-65.
13. Friedl HP, Smith DJ, Till GO, Thomson PD, Louis DS, Ward PA. Ischemia-reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am J Pathol* 1990; 136(3):491-5.
14. Johnson WD, Kayser KL, Brenowitz JB, Saedi SF. A randomized controlled trial of allopurinol in coronary bypass surgery. *Am Heart J* 1991; 121(1 Pt 1):20-4.
15. Duran N, Gisler GC, Diaz J. Chemiluminescence from an erythrocyte folic acid oxidase from normal individuals and from cancer patients. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1984; 16(4):325-31.
16. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 1984; 73(3):599-601.
17. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull* 1993; 49(3):506-22.
18. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21(4):361-74.
19. Dorr RT, Alberts DS. Pharmacologic antidotes to experimental doxorubicin skin toxicity: a suggested role for beta-adrenergic compounds. *Cancer Treat Rep* 1981; 65(11-12):1001-6.
20. De Vita VT. Principios de quimioterapia. Principios y práctica de oncología. 1988: 238-265.
21. Thornalley PJ, Wolff SP, Crabbe MJ, Stern A. The oxidation of oxyhaemoglobin by glyceraldehyde and other simple monosaccharides. *Biochem J* 1984; 217(3):615-22.

22. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 1987; 245(1):243-50.
23. Nassi-Calo L, Mello-Filho C, Meneghini R. o-phenanthroline protects mammalian cells from hydrogen peroxide-induced gene mutation and morphological transformation. *Carcinogenesis* 1989; 10(6):1055-7.
24. Breimer LH. Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol Carcinog* 1990; 3(4):188-97.
25. Orrenius S, Mcconkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10(7):281-5.
26. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 1970; 50(3):319-75.
27. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-6.:121-6.
28. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 1989; 264(14):7761-4.
29. Kacmaz M, Ozturk HS, Karaayvaz M, Guven C, Durak I. Enzymatic antioxidant defence mechanism in rat intestinal tissue is changed after ischemia-reperfusion. Effects of an allopurinol plus antioxidant combination. *Can J Surg* 1999; 42(6):427-31.
30. Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jensson H, Tahir MK, Warholm M, Jornvall H. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(21):7202-6.
31. Benzi G, Moretti A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* 1995; 16(4):661-74.

32. Aniya Y, Naito A. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver. *Biochem Pharmacol* 1993; 45(1):37-42.
33. Guthenberg C, Alin P, Mannervik B. Glutathione transferase from rat testis. *Methods Enzymol* 1985; 113:507-10.:507-10.
34. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(9-10):951-65.
35. Maiorino M, Chu FF, Ursini F, Davies KJ, Doroshow JH, Esworthy RS. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18-kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *J Biol Chem* 1991; 266(12):7728-32.
36. Moriguchi S, Muraga M. Vitamin E and immunity. *Vitam Horm* 2000; 59:305-36.:305-36.
37. Landi L, Cabrini L, Fiorentini D, Sechi AM, Sartor G, Pasquali P, Masotti L. Coenzyme Q-3 as an antioxidant. Its effect on the composition and structural properties of phospholipid vesicles. *Cell Biophys* 1990; 16(1-2):1-12.
38. Battino M, Ferri E, Gorini A, Federico VR, Rodriguez Huertas JF, Fiorella P, Genova ML, Lenaz G, Marchetti M. Natural distribution and occurrence of coenzyme Q homologues. *Membr Biochem* 1990; 9(3):179-90.
39. Krinsky NI, Wang XD, Tang G, Russell RM. Mechanism of carotenoid cleavage to retinoids. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 691:167-76.:167-76.
40. Gawienowski AM. Integration of the metabolic pathways of steroids, carotenoids, and retinoids. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1999; 34(6):405-10.
41. Dixit R, Mukhtar H, Bickers DR. Studies on the role of reactive oxygen species in mediating lipid peroxide formation in epidermal microsomes of rat skin. *J Invest Dermatol* 1983; 81(4):369-75.

42. Handelman GJ, Packer L, Cross CE. Destruction of tocopherols, carotenoids, and retinol in human plasma by cigarette smoke. *Am J Clin Nutr* 1996; 63(4):559-65.
43. Krinsky NI. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854:443-7.:443-7.
44. Frei B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am J Clin Nutr* 1991; 54(6 Suppl):1113S-8S.
45. Washko P, Levine M. Inhibition of ascorbic acid transport in human neutrophils by glucose. *J Biol Chem* 1992; 267(33):23568-74.
46. Lerner AB, Case JD, Heinzelman RV. Structure of melatonin. *J Am Chem Soc* 1959; 61:6084-5.
47. Kvetnoy IM. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J* 1999; 31(1):1-12.
48. Hoffman RA, Reiter RJ. Pineal gland: Influence on gonads of male hamsters. *Science* 1965; 148:1609-11.:1609-11.
49. Reiter RJ, Fraschini F. Endocrine aspects of the mammalian pineal gland: a review. *Neuroendocrinology* 1969; 5(3):219-55.
50. Saavedra JM, Brownstein M, Axelrod J. A specific and sensitive enzymatic-isotopic microassay for serotonin in tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1973; 186(3):508-15.
51. Mikuni M, Saito Y, Koyama T, Yamashita I. Circadian variation of cyclic AMP in the rat pineal gland. *J Neurochem* 1981; 36(3):1295-7.
52. Chik CL, Ho AK. Multiple receptor regulation of cyclic nucleotides in rat pinealocytes. *Prog Biophys Mol Biol* 1989; 53(3):197-203.
53. Klein DC, Weller JL. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 1970; 169(950):1093-5.

54. Shida CS, Castrucci AM, Lamy-Freund MT. High melatonin solubility in aqueous medium. *J Pineal Res* 1994; 16(4):198-201.
55. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12(2):151-80.
56. Huerto-Delgadillo L, nton-Tay F, itez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res* 1994; 17(2):55-62.
57. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55(15):L271-L276.
58. Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(13):6133-7.
59. Miyazaki T, Sueoka K, Dharmarajan AM, Atlas SJ, Bulkley GB, Wallach EE. Effect of inhibition of oxygen free radical on ovulation and progesterone production by the in-vitro perfused rabbit ovary. *J Reprod Fertil* 1991; 91(1):207-12.
60. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994; 13(5):1177-85.
61. Mor M, Plazzi PV, Spadoni G, Tarzia G. Melatonin. *Curr Med Chem* 1999; 6(6):501-18.
62. Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menéndez-Peláez A, Pablos MI, Burgos A. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res* 1994; 16(2):100-12.

63. Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1993; 82(2):253-6.
64. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; 269(46):28531-4.
65. Carlberg C, Wiesenberg I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res* 1995; 18(4):171-8.
66. Barrett P, Morris M, Choi WS, Ross A, Morgan PJ. Melatonin receptors and signal transduction mechanisms. *Biol Signals Recept* 1999; 8(1-2):6-14.
67. Kloeden PE, Rossler R, Rossler OE. Timekeeping in genetically programmed aging. *Exp Gerontol* 1993; 28(2):109-18.
68. Reiter RJ. Comparative physiology: pineal gland. *Annu Rev Physiol* 1973; 35:305-28.:305-28.
69. Goldman BD. The physiology of melatonin in mammals. *Pineal Res Rev* 1983; 1:145-82.
70. Reiter RJ. The melatonin message: duration versus coincidence hypotheses. *Life Sci* 1987; 40(22):2119-31.
71. Hoffmann K, Illnerova H, Vanecek J. Change in duration of the nighttime melatonin peak may be a signal driving photoperiodic responses in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Neurosci Lett* 1986; 67(1):68-72.
72. Carter DS, Goldman BD. Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. *Endocrinology* 1983; 113(4):1261-7.
73. Bartness TJ, Powers JB, Hastings MH, Bittman EL, Goldman BD. The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception,

- and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res* 1993; 15(4):161-90.
74. Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD, Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol* 1994; 153(6):2671-80.
 75. Weaver DR, Reppert SM. Melatonin receptors are present in the ferret pars tuberalis and pars distalis, but not in brain. *Endocrinology* 1990; 127(5):2607-9.
 76. Malpoux B, Daveau A, Maurice F, Gayraud V, Thiery JC. Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol Reprod* 1993; 48(4):752-60.
 77. Lincoln GA, Clarke IJ. Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 1994; 6(3):251-60.
 78. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 1994; 55(24):L455-L460.
 79. Tilly JL, Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 1995; 136(1):242-52.
 80. Maywood ES, Hastings MH. Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology* 1995; 136(1):144-53.
 81. Rettori V, Dees WL, Hiney JK, Lyson K, McCann SM. An interleukin-1-alpha-like neuronal system in the preoptic-hypothalamic region and its induction by bacterial lipopolysaccharide in concentrations which alter pituitary hormone release. *Neuroimmunomodulation* 1994; 1(4):251-8.

82. Pierpaoli W, Yi C. The involvement of pineal gland and melatonin in immunity and aging. I. Thymus-mediated, immunoreconstituting and antiviral activity of thyrotropin-releasing hormone. *J Neuroimmunol* 1990; 27(2-3):99-109.
83. Smythe GA, Lazarus L. Growth hormone regulation by melatonin and serotonin. *Nature* 1973; 244(5413):230-1.
84. Atkins TW, Matty AJ. The effect of age on some aspects of obese (ob-ob) mouse pancreatic islet morphology and metabolism. *J Endocrinol* 1973; 58(1):xvii.
85. Reiter RJ. The pineal and its indole products: Basic aspect and clinical applications. In: Cohen MP, Foà PP, editors. *The brain as a endocrine organ*. New York: Springer-Verlag, 1995: 96-49.
86. Parfitt AG, Klein DC. Sympathetic nerve endings in the pineal gland protect against acute stress-induced increase in N-acetyltransferase (EC 2.3.1.5.) activity. *Endocrinology* 1976; 99(3):840-51.
87. Champney TH, Steger RW, Christie DS, Reiter RJ. Alterations in components of the pineal melatonin synthetic pathway by acute insulin stress in the rat and Syrian hamster. *Brain Res* 1985; 338(1):25-32.
88. Molina-Carballo A. Glandula pineal y trastornos convulsivos en la infancia: interrelaciones neuroendocrinas en función del ritmo circadiano. Granada: Facultad de Medicina. Departamento de Pediatría, 1989.
89. Rodríguez Cabezas T. Función pineal, ritmos circadianos y estrés: interrelaciones y estudio comparativo entre recién nacidos normales, pretermino y con sufrimiento fetal agudo. Granada: Facultad de Medicina. Departamento de Pediatría, 1990.
90. Martín Medina E. Diagnóstico de salud y valoración de la función pineal en un grupo infantil sometido a una situación de estrés mantenido. Granada: Facultad de Medicina. Departamento de Pediatría, 1990.

91. Jaldo Alba F. Contribución al estudio de la cronobiología neonatal: valoración circadiana de la función pineal durante los 3 primeros días de vida. Granada: Facultad de Medicina. Departamento de Pediatría, 1993.
92. Muñoz A, Acuña D, Martín E, Palmero SG, Molina A, Rodríguez T. Pituitary neuropeptides ACTH and beta-endorphin in the failure to thrive syndrome. *J.Endocrinol.Invest.* 12[suppl 2-5], 168. 1989.
93. Molina A, Acuña D, Rodríguez T, Muñoz A. Melatonin circadian rhythm in normal children and in children with febrile and epileptic convulsions. *J.Endocrinol.Invest.* 12[suppl 2-5], 102. 1989.
94. Molina A, Muñoz A, Rodríguez T, Acuña D, Moreno F, Ruiz C. Interaction between duration of convulsion, refractory postseizure period and melatonin levels. *Neuroendocrinology* 52[suppl 1], 102. 1990. Bordeaux (France). 2nd International Congress of Neuroendocrinology.
95. Muñoz A, Molina A, Rodríguez T, Acuña D, Sánchez M, Jaldo F. Circadian secretion of melatonin in normal children, with febrile and epileptic seizures. *Neuroendocrinology* 52[suppl 1], 102. 1990. Bordeaux (France). 2nd International Congress of Neuroendocrinology.
96. Moreno F, Martín E, Muñoz A, Molina A, Rodríguez T, Palmero SG. Assesment of pineal function in the non organic failure to thrive syndrome. *J.Endocrinol.Invest.* 14[Suppl 9], 200. 1991.
97. Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Pineal melatonin, its fundamental immunoregulatory role in aging and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 521:140-8.
98. Neri B, Brocchi A, Carossino AM, Cinineri G, Gemelli MT, Tommasi MS, Cagnoni M. Effects of Melatonin Administration on Cytokine Production in Patients with Advanced Solid Tumors. *Oncol Rep* 1995; 2:45-7.

99. Ben-Nathan D, Maestroni GJ, Lustig S, Conti A. Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses. *Arch Virol* 1995; 140(2):223-30.
100. Maestroni GJ. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J Pineal Res* 1995; 18(2):84-9.
101. Withyachumnarnkul B, Nonaka KO, Attia AM, Reiter RJ. Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal glands induced by interferon-gamma. *J Pineal Res* 1990; 8(4):313-22.
102. Giron-Caro F, Munoz-Hoyos A, Ruiz-Cosano C, Bonillo-Perales A, Molina-Carballo A, Escames G, Macias M, Acuna-Castroviejo D. Melatonin and beta-endorphin changes in children sensitized to olive and grass pollen after treatment with specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126(1):91-6.
103. Poon AMS, Pang SF. Pineal Melatonin Immune System Interaction. *Front Horm Res* 1996; 21:71-83.
104. Maestroni GJ. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res* 1993; 14(1):1-10.
105. Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. *Clin Exp Immunol* 1987; 68(2):384-91.
106. Maestroni GJ, Conti A, Pierpaoli W. The pineal gland and the circadian, opiate, immunoregulatory role of melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 496:67-77.:67-77.
107. Maestroni GJ, Conti A. The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4+, Thy-1+ cells to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. *J Neuroimmunol* 1990; 28(2):167-76.
108. Caroleo MC, Frasca D, Nistico G, Doria G. Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacology* 1992; 23(2):81-9.

109. Saksela E, Timonen T, Cantell K. Cellular interactions in the augmentation of human NK activity by interferon. *Ann N Y Acad Sci* 1980; 350:102-11.:102-11.
110. Kuribayashi K, Gillis S, Kern DE, Henney CS. Murine NK cell cultures: effects of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. *J Immunol* 1981; 126(6):2321-7.
111. Pang SF, Yuan H, Yu ZH, Wang XL, Tang PL, Yau M. Melatonin binding sites in the nervous and immune systems. In: Fraschini F, Reiter RJ, editors. *Role of melatonin and pineal gland in neuroimmunomodulation*. New York: Plenum Press, 1991: 107-116.
112. Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Osuna C, Guerrero JM. Interaction of melatonin with human lymphocytes: evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated by vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP. *J Pineal Res* 1992; 12(3):97-104.
113. Lopez-Gonzalez MA, Calvo JR, Segura JJ, Guerrero JM. Characterization of melatonin binding sites in human peripheral blood neutrophils. *Biotechnol Ther* 1993; 4(3-4):253-62.
114. Rafii-el-Idrissi M, Calvo JR, Pozo D, Harmouch A, Guerrero JM. Specific binding of 2-[125I]iodomelatonin by rat splenocytes: characterization and its role on regulation of cyclic AMP production. *J Neuroimmunol* 1995; 57(1-2):171-8.
115. Reiter RJ, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60(25):2255-71.
116. Nelson RJ, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ. The influence of season, photoperiod, and pineal melatonin on immune function. *J Pineal Res* 1995; 19(4):149-65.
117. Vaughan MK, Hubbard GB, Champney TH, Vaughan GM, Little JC, Reiter RJ. Splenic hypertrophy and extramedullary

- hematopoiesis induced in male Syrian hamsters by short photoperiod or melatonin injections and reversed by melatonin pellets or pinealectomy. *Am J Anat* 1987; 179(2):131-6.
118. Brainard GC, Watson-Whitmeyer M, Knobler RL, Lublin FD. Neuroendocrine regulation of immune parameters. Photoperiod control of the spleen in Syrian hamsters. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 540:704-6.:704-6.
 119. Aoyama H, Mori N, Mori W. Anti-glucocorticoid effects of melatonin on adult rats. *Acta Pathol Jpn* 1987; 37(7):1143-8.
 120. Persengiev S, Marinova C, Patchev V. Steroid hormone receptors in the thymus: a site of immunomodulatory action of melatonin. *Int J Biochem* 1991; 23(12):1483-5.
 121. Tamarkin L, Cohen M, Roselle D, Reichert C, Lippman M, Chabner B. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. *Cancer Res* 1981; 41(11 Pt 1):4432-6.
 122. Blask DE, Sauer LA, Dauchy R, Holowachuk EW, Ruhoff MS. New actions of melatonin on tumor metabolism and growth. *Biol Signals Recept* 1999; 8(1-2):49-55.
 123. Ronco AL, Halberg F. The Pineal Gland and Cancer. *Anticancer Res* 1996; 16:2033-9.
 124. Rodin AE. The growth and spread of Walker 256 carcinoma in pinealectomized rats. *Cancer Res* 1963; 23:1545-8.:1545-8.
 125. Das Gupta TK, Terz J. Influence of pineal gland on the growth and spread of melanoma in the hamster. *Cancer Res* 1967; 27(7):1306-11.
 126. Aubert C, Prade M, Bohuon C. Effect de la pinealectomie sur les tumeurs melaniques du hamster dore induites par l'administration (per os) d'une soule dose de 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1970; 271(25):2465-8.

127. Das Gupta TK. Influence of the pineal gland on the growth and spread of malignant tumors. *Surg Forum* 1968; 19:83-4.
128. Billitieri A, Bandoni A. Accrescimento e moltiplicazione cellulare del tumore di Ehrlich nel topo, dopop aspotrazione della thiandola pineale. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1969; 45:1647-50.
129. Lapin V. Influence of simultaneous pinealectomy and thymectomy on the growth and formation of metastases of the Yoshida sarcoma in rats. *Exp Pathol (Jena)* 1974; 9(1-2):108-12.
130. Hill SM, Blask DE. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cell(MCF-7) in culture. *Cancer Res* 1988; 48:6121-6.
131. Barone RM, Abe R, Das Gupta TK. Pineal ablation in methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Surg Forum* 1972; 23(0):115-6.
132. Lewinski A, Sewerynek E, Wajs E, Lopaczynski W, Sporny S. Effects of the pineal gland on the growth processes of Guerin epithelioma in male Wistar rats. *Cytobios* 1993; 73(293):89-94.
133. Lacassagne A, Chamorro A, Hurst L, Nguyen BG. Effect de l'epiphysectomie sur l'hepatocancerogenese chez le rat. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1969; 269(11):1043-6.
134. Buswell RS. Letter: The pineal and neoplasia. *Lancet* 1975; 1(7897):34-5.
135. Karmali RA, Horrobin DF, Ghayur T. Role of pineal gland in aetiology and treatment of breast cancer. *Lancet* 1978; 2:1002.
136. Blask DE, Hill SM, Orstead KM, Massa JS. Inhibitory effects of the pineal hormone melatonin and underfeeding during the promotional phase of 7,12-dimethylbenzanthracene-(DMBA)-induced mammary tumorigenesis. *J Neural Transm* 1986; 67(1-2):125-38.

137. Narita T, Kudo H. Effect of melatonin on B16 melanoma growth in athymic mice. *Cancer Res* 1985; 45(9):4175-7.
138. Lissoni P, mainini E, Rovelli F, Mazzi C, Ardizzoia A, Gelosa M, Capra M, Rivolta MR. A clinical study of the pineal hormone melatonin in patients with growth hormone or prolactin secreting pituitary tumours [see comments]. *Eur J Med* 1992; 1(7):407-10.
139. Philo R, Berkowitz AS. Inhibition of Dunning tumor growth by melatonin. *J Urol* 1988; 139(5):1099-102.
140. Blask DE, Pelletier DB, Hill SM, Lemus-Wilson A, Grosso DS, Wilson ST, Wise ME. Pineal melatonin inhibition of tumor promotion in the N-nitroso-N-methylurea model of mammary carcinogenesis: potential involvement of antiestrogenic mechanisms in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; 117(6):526-32.
141. Karasek M, Liberski P, Kunert-Radek J, Bartkowiak J. Influence of melatonin on the proliferation of hepatoma cells in the Syrian hamster: in vivo and in vitro study. *J Pineal Res* 1992; 13(3):107-10.
142. Wrba H, Halberg F, Dutter A. Melatonin circadian-stage-dependently delays breast tumor development in mice injected daily for several months. *Chronobiologia* 1986; 13(2):123-8.
143. Subramanian A, Kothari L. Melatonin, a suppressor of spontaneous murine mammary tumors. *J Pineal Res* 1991; 10(3):136-40.
144. Bostelmann W, Gocke H, Ernst B, Tessmann D. [Effect of melatonin treatment on growth of Walker carcinosarcoma in rats]. *Zentralbl Allg Pathol* 1971; 114(3):289-91.
145. Lapin V, Ebels I. Effects of some low molecular weight sheep pineal fractions and melatonin on different tumors in rats and mice. *Oncology* 1976; 33(3):110-3.
146. Bartsch H, Bartsch C. Effect of melatonin on experimental tumors under different photoperiods and times of administration. *J Neural Transm* 1981; 52(4):269-79.

147. Walker MJ, Chaudhuri PK, Beattie CW, Tito WA, Das Gupta TK. Neuroendocrine and endocrine correlates to hamster melanoma growth in vitro. *Surg Forum* 1978; 29:151-2.:151-2.
148. Blask DE, Hill SM. Effects of melatonin on cancer: Studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Neural Transm* 1986; 21:433-49.
149. Karasek M, Gruszka A, Lawnicka H, Kunert-Radek J, Pawlikowski M. Melatonin inhibits growth of diethylstilbestrol-induced prolactin-secreting pituitary tumor in vitro: possible involvement of nuclear RZR/ROR receptors. *J Pineal Res* 2003; 34(4):294-6.
150. Papazisis KT, Kouretas D, Geromichalos GD, Sivridis E, Tsekrelis OK, Dimitriadis KA, Kortsaris AH. Effects of melatonin on proliferation of cancer cell lines. *J Pineal Res* 1998; 25(4):211-8.
151. Persengiev SP, Kyurkchiev S. Selective effect of melatonin on the proliferation of lymphoid cells. *Int J Biochem* 1993; 25(3):441-4.
152. Chen LD, Leal BZ, Reiter RJ, Abe M, Sewerynek E, Melchiorri D, Meltz ML, Poeggeler B. Melatonin's inhibitory effect on growth of ME-180 human cervical cancer cells is not related to intracellular glutathione concentrations. *Cancer Lett* 1995; 91(2):153-9.
153. Sze SF, Ng TB, Liu WK. Antiproliferative effect of pineal indoles on cultured tumor cell lines. *J Pineal Res* 1993; 14(1):27-33.
154. Bartsch H, Bartsch C, Simon WE, Flehmig B, Ebels I, Lippert TH. Antitumor activity of the pineal gland: Effect of unidentified substances versus the effect of melatonin. *Oncology* 1992; 49:27-30.
155. Bubis M, Anis Y, Zisapel N. Enhancement by melatonin of GTP exchange and ADP ribosylation reactions. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 123(2):139-48.

156. Panzer A, Viljoen M. The validity of melatonin as an oncostatic agent. *J Pineal Res* 1997; 22(4):184-202.
157. Harman D. Free radical involvement in aging. Pathophysiology and therapeutic implications. *Drugs Aging* 1993; 3(1):60-80.
158. Harman D. Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 928:1-21.:1-21.
159. Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendezpelaez A, Chen LD, Saarela S. Melatonin as a free radical scavenger. Implications for aging and age related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 719:1-12.
160. Reiter RJ. Oxidative Processes and Antioxidative Defense Mechanisms in the Aging Brain. *FASEB J* 1995; 9:526-33.
161. Karasek M, Reiter RJ. Melatonin and aging. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23 Suppl 1:14-6.:14-6.
162. Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging: Effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; 91:787-91.
163. Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(2):787-91.
164. Kloeden PE, Rossler R, Rossler OE. Does a centralized clock for ageing exist? *Gerontology* 1990; 36(5-6):314-22.
165. Dykens JA, Stern A, Trenkner E. Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury. *J Neurochem* 1987; 49(4):1222-8.
166. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Lopez-Burillo S. Melatonin, longevity and health in the aged: an assessment. *Free Radic Res* 2002; 36(12):1323-9.
167. Reiter RJ. Potential biological consequences of excessive light exposure: melatonin suppression, DNA damage, cancer and

- neurodegenerative diseases. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23 Suppl 2:9-13.:9-13.
168. Reiter RJ, Tan DX, Pappolla MA. Melatonin relieves the neural oxidative burden that contributes to dementias. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1035:179-96.:179-96.
169. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757(5-6):573-89.
170. Tan D-X, Chen L-D, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1993; 1:57-60.
171. Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D-X, Chen L-D, Manchester L, Guerrero JM. Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol Lett* 1993; 15:103-16.
172. Poeggeler B, Reiter RJ, Hardeland R, Sewerynek E, Melchiorri D, Barlowwalden LR. Melatonin, a Mediator of Electron Transfer and Repair Reactions, Acts Synergistically with the Chain Breaking Antioxidants Ascorbate, Trolox and Glutathione. *Neuroendocrinol Lett* 1995; 17:87-92.
173. Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 1996; 10(8):882-90.
174. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menéndez-Peláez A, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; 26(5):497-502.
175. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29(8):363-72.

176. Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D, Sainz RM, Mayo JC, Ramos S. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. *Biol Signals Recept* 1999; 8(1-2):56-63.
177. Skaper SD, Floreani M, Ceccon M, Facci L, Giusti P. Excitotoxicity, oxidative stress, and the neuroprotective potential of melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 890:107-18.
178. Reiter RJ, Tan DX, Maldonado MD. Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *J Pineal Res* 2005; 39(2):215-6.
179. Chen L-D, Tan D-X, Reiter RJ, Yaga K, Poeggeler B, Kumar P, Manchester LC, Chambers JP. In vivo and in vitro effects of the pineal gland and melatonin on $[Ca^{2+} + Mg^{2+}]$ -dependent ATPase in cardiac sarcolemma. *J Pineal Res* 1993; 14:178-83.
180. Kaneko M, Beamish RE, Dhalla NS. Depression of heart sarcolemmal Ca^{2+} -pump activity by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 1989; 256(2 Pt 2):H368-H374.
181. Pritsos CA, Constantinides PP, Tritton TR, Heimbrook DC, Sartorelli AC. Use of high-performance liquid chromatography to detect hydroxyl and superoxide radicals generated from mitomycin C. *Anal Biochem* 1985; 150(2):294-9.
182. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlowwalden L, Chuang JI, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18:1-11.
183. Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738:419-20.:419-20.
184. Hardeland R, Pandi-Perumal SR. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab (Lond)* 2005; 2:22.:22.

185. Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett* 1993; 70(1-2):65-71.
186. Tan DX, Reiter RJ, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Both Physiological and Pharmacological Levels of Melatonin Reduce DNA Adduct Formation Induced by the Carcinogen Safrole. *Carcinogenesis* 1994; 15:215-8.
187. Littlefield LG, Joiner EE, Colyer SP, Sayer AM, Frome EL. Modulation of radiation-induced chromosome aberrations by DMSO, an OH radical scavenger. 1: Dose-response studies in human lymphocytes exposed to 220 kV X-rays. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1988; 53(6):875-90.
188. Vijayalaxmi, Reiter RJ, Herman TS, Meltz ML. Melatonin and radioprotection from genetic damage: in vivo/in vitro studies with human volunteers. *Mutat Res* 1996; 371(3-4):221-8.
189. Vijayalaxmi, Reiter RJ, Meltz ML. Melatonin protects human blood lymphocytes from radiation-induced chromosome damage. *Mutat Res* 1995; 346(1):23-31.
190. Vijayalaxmi, Reiter RJ, Sewerynek E, Poeggeler B, Leal BZ, Meltz ML. Marked reduction of radiation-induced micronuclei in human blood lymphocytes pretreated with melatonin. *Radiat Res* 1995; 143(1):102-6.
191. Spector A, Garner WH. Hydrogen peroxide and human cataract. *Exp Eye Res* 1981; 33(6):673-81.
192. Calvin HI, Medvedovsky C, Worgul BV. Near-total glutathione depletion and age-specific cataracts induced by buthionine sulfoximine in mice. *Science* 1986; 233(4763):553-5.
193. Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Saarela S. Melatonin as a free radical scavenger:

- implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 719:1-12.:1-12.
194. Reiter RJ, Craft CM, Johnson JE, Jr., King TS, Richardson BA, Vaughan GM, Vaughan MK. Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats. *Endocrinology* 1981; 109(4):1295-7.
 195. Reiter RJ, Richardson BA, Johnson LY, Ferguson BN, Dinh DT. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science* 1980; 210(4476):1372-3.
 196. Ogata T, Manabe S. Correlation between lipid peroxidation and morphological manifestation of paraquat-induced lung injury in rats. *Arch Toxicol* 1990; 64(1):7-13.
 197. Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, Burgos A, Nistico G. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci* 1995; 56(2):83-9.
 198. Coyle JT, Schwarcz R. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 1976; 263(5574):244-6.
 199. Bondy SC, Lee DK. Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain Res* 1993; 610(2):229-33.
 200. van den Pol AN, Wuarin JP, Dudek FE. Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science* 1990; 250(4985):1276-8.
 201. Giusti P, Gusella M, Lipartiti M, Milani D, Zhu W, Vicini S, Manev H. Melatonin protects primary cultures of cerebellar granule neurons from kainate but not from N-methyl-D-aspartate excitotoxicity. *Exp Neurol* 1995; 131(1):39-46.
 202. Frank L. Antioxidants, nutrition, and bronchopulmonary dysplasia. *Clin Perinatol* 1992; 19(3):541-62.
 203. Abman SH, Groothuis JR. Pathophysiology and treatment of bronchopulmonary dysplasia. Current issues. *Pediatr Clin North Am* 1994; 41(2):277-315.

204. Russell GA. Antioxidants and neonatal lung disease. *Eur J Pediatr* 1994; 153(9 Suppl 2):S36-41.
205. Zimmerman JJ. Bronchoalveolar inflammatory pathophysiology of bronchopulmonary dysplasia. *Clin Perinatol* 1995; 22(2):429-56.
206. Zoban P, Cerny M. Immature lung and acute lung injury. *Physiol Res* 2003; 52(5):507-16.
207. Wilborn AM, Evers LB, Canada AT. Oxygen toxicity to the developing lung of the mouse: role of reactive oxygen species. *Pediatr Res* 1996; 40(2):225-32.
208. Mak IT, Weglicki WB. Antioxidant activity of calcium channel blocking drugs. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 1994: 620-630.
209. Berger HM, Lindeman JH, Zoeren-Grobbe D, Houdkamp E, Schrijver J, Kanhai HH. Iron overload, free radical damage, and rhesus haemolytic disease. *Lancet* 1990; 335(8695):933-6.
210. Smith LJ, Anderson J, Shamsuddin M. Glutathione localization and distribution after intratracheal instillation. Implications for treatment. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145(1):153-9.
211. Ogihara T, Kim HS, Hirano K, Imanishi M, Ogihara H, Tamai H, Okamoto R, Mino M. Oxidation products of uric acid and ascorbic acid in preterm infants with chronic lung disease. *Biol Neonate* 1998; 73(1):24-33.
212. Wang Z, Ciabattoni G, Creminon C, Lawson J, FitzGerald GA, Patrono C, Maclouf J. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275(1):94-100.
213. Kinsella JP, Abman SH. Recent developments in the pathophysiology and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1995; 126(6):853-64.

214. Varsila E, Pitkanen O, Hallman M, Andersson S. Immaturity-dependent free radical activity in premature infants. *Pediatr Res* 1994; 36:55-9.
215. Clyman RI. Ductus arteriosus: Current theories of prenatal and postnatal regulation. *Semin Perinatol* 1987; 11:64-71.
216. Clyman RI, Saugstad OD, Mauray F. Reactive oxygen metabolites relax the lamb ductus arteriosus by stimulating prostaglandin production. *Circ Res* 1989; 64:1-86.
217. Keller RL, Tacy TA, Fields S, Ofenstein JP, Aranda JV, Clyman RI. Combined treatment with a nonselective nitric oxide synthase inhibitor (L-NMMA) and indomethacin increases ductus constriction in extremely premature newborns. *Pediatr Res* 2005; 58(6):1216-21.
218. Bossi E, Koerner F. Retinopathy of prematurity. *Intensive Care Med* 1995; 21(3):241-6.
219. Johnson L, Quinn GE, Abbasi S, Otis C, Goldstein D, Sacks L, Porat R, Fong E, Ivoria-Papadopoulos M, Peckham G, . Effect of sustained pharmacologic vitamin E levels on incidence and severity of retinopathy of prematurity: a controlled clinical trial. *J Pediatr* 1989; 114(5):827-38.
220. Benaron DA, Bowen FW. Variation of initial serum bilirubin rise in newborn infants with type of illness. *Lancet* 1991; 338(8759):78-81.
221. Gaton DD, Gold J, xer-Siegel R, Wielunsky E, Naor N, Nissenkorn I. Evaluation of bilirubin as possible protective factor in the prevention of retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol* 1991; 75(9):532-4.
222. Pauly TH, Smith M, Gillespie M. Bilirubin as an antioxidant: effect on group B streptococci-induced pulmonary hypertension in infant piglets. *Biol Neonate* 1991; 60(5):320-6.
223. Cassutto BH, Misra HP, Pfeiffer CJ. Intestinal post-ischemic reperfusion injury: studies with neonatal necrotizing enterocolitis. *Acta Physiol Hung* 1989; 73(2-3):363-9.

224. Caddell JL. A review of evidence for a role of magnesium and possibly copper deficiency in necrotizing enterocolitis. *Magnes Res* 1996; 9(1):55-66.
225. Clark DA, Fornabaio DM, McNeill H, Mullane KM, Caravella SJ, Miller MJ. Contribution of oxygen-derived free radicals to experimental necrotizing enterocolitis. *Am J Pathol* 1988; 130(3):537-42.
226. Buonocore G, Perrone S, Bracci R. Free radicals and brain damage in the newborn. *Biol Neonate* 2001; 79(3-4):180-6.
227. Ferriero DM. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci* 2001; 23(3):198-202.
228. Dorrepaal CA, Berger HM, Benders MJNL, Vanzoerengrobbe D, Vandebor M, Vanbel F, Benders MJ, van Zoeren-Grobbe D, van de Bor M, van Bel F. Nonprotein bound iron in postasphyxial reperfusion injury of the newborn. *Pediatrics* 1996; 98:883-9.
229. Vishnevskaya GV, Gern EI, Adzhimolaev TA. Influence of the inhibition of free-radical oxidation processes in early postnatal ontogenesis on learning in adult rats. *Neurosci Behav Physiol* 1991; 21(6):568-71.
230. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Calvo JR, Karasek M, Guerrero JM. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(2):992-1000.
231. Hardeland R, Fuhrberg B. Ubiquitous melatonin - presence and effects in unicells, plants and animals. *Trends Comp Biochem* 1996; 2:25-44.
232. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36(1):1-9.
233. Panzer A, Viljoen M. The validity of melatonin as an oncostatic agent. *J Pineal Res* 1997; 22(4):184-202.

234. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25(3-4):177-95.
235. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci* 2002; 47(10):2336-48.
236. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(3):313-6.
237. Fulia F, Gitto E, Cuzzocrea S, Reiter RJ, Dugo L, Gitto P, Barberi S, Cordaro S, Barberi I. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *J Pineal Res* 2001; 31(4):343-9.
238. Molina-Carballo A, Muñoz-Hoyos A, Reiter RJ, Sanchez-Forte M, Moreno-Madrid F, Rufo-Campos M, Molina-Font JA, Acuña-Castroviejo D. Utility of high doses of melatonin as adjunctive anticonvulsant therapy in a child with severe myoclonic epilepsy: two years' experience. *J Pineal Res* 1997; 23(2):97-105.
239. Muñoz-Hoyos A, Rodríguez-Cabezas T, Molina-Carballo A, Martínez-Sempere JJ, Ruiz-Cosano C, Acuña-Castroviejo D. Melatonin concentration in the umbilical artery and vein in human preterm and term neonates and neonates with acute fetal distress. *J Pineal Res* 1992; 13(4):184-91.
240. Muñoz-Hoyos A, Jaldo-Alba F, Molina-Carballo A, Rodríguez-Cabezas T, Molina-Font JA, Acuña-Castroviejo D. Absence of plasma melatonin circadian rhythm during the first 72 hours of life in human infants. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(3):699-703.
241. Matsubasa T, Uchino T, Karashima S, Kondo Y, Maruyama K, Tanimura M, Endo F. Oxidative stress in very low birth weight infants as measured by urinary 8-OHdG. *Free Radic Res* 2002; 36(2):189-93.

242. Buonocore G, Perrone S, Longini M, Vezzosi P, Marzocchi B, Paffetti P, Bracci R. Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. *Pediatr Res* 2002; 52(1):46-9.
243. Friel JK, Friesen RW, Harding SV, Roberts LJ. Evidence of oxidative stress in full-term healthy infants. *Pediatr Res* 2004; 56(6):878-82.
244. Frank L, Sosenko IR. Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species. *J Pediatr* 1987; 110(1):106-10.
245. Frank L, Price LT, Whitney PL. Possible mechanism for late gestational development of the antioxidant enzymes in the fetal rat lung. *Biol Neonate* 1996; 70(2):116-27.
246. Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol Neonate* 2005; 88(3):228-36.
247. Gitto E, Reiter RJ, Cordaro SP, La RM, Chiurazzi P, Trimarchi G, Gitto P, Calabro MP, Barberi I. Oxidative and inflammatory parameters in respiratory distress syndrome of preterm newborns: beneficial effects of melatonin. *Am J Perinatol* 2004; 21(4):209-16.
248. Dubowitz LM, Dubowitz V, Goldberg C. Clinical assessment of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr* 1970; 77(1):1-10.
249. Rivkees SA. Mechanisms and clinical significance of circadian rhythms in children. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13(4):352-7.
250. Sivan Y, Laudon M, Tauman R, Zisapel N. Melatonin production in healthy infants: evidence for seasonal variations. *Pediatr Res* 2001; 49(1):63-8.
251. Ardura J, Gutierrez R, Andres J, Agapito T. Emergence and evolution of the circadian rhythm of melatonin in children. *Horm Res* 2003; 59(2):66-72.

252. Salti R, Galluzzi F, Bindi G, Perfetto F, Tarquini R, Halberg F, Cornelissen G. Nocturnal melatonin patterns in children. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(6):2137-44.
253. Muñoz-Hoyos A, Jaldo R, Molina-Carballo A, Escames G, Macías M, Fernández-García JM, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Characterization of nocturnal ultradian rhythms of melatonin in children with growth hormone-dependent and independent growth delay. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(3):1181-7.
254. Mirmiran M, Maas YG, Ariagno RL. Development of fetal and neonatal sleep and circadian rhythms. *Sleep Med Rev* 2003; 7(4):321-34.
255. Sandyk R. Melatonin and maturation of REM sleep. *Int J Neurosci* 1992; 63(1-2):105-14.
256. Kennaway DJ, Flanagan DE, Moore VM, Cockington RA, Robinson JS, Phillips DI. The impact of fetal size and length of gestation on 6-sulphatoxymelatonin excretion in adult life. *J Pineal Res* 2001; 30(3):188-92.
257. Griefahn B, Blaszkewicz M, Brode P, Remer T. Do birth variable data predict melatonin production in 8- to 9-year-old children? Analysis of excreted 6-sulfatoxymelatonin. *Horm Res* 2004; 62(3):156-60.
258. Sivan Y, Laudon M, Kuint J, Zisapel N. Low melatonin production in infants with a life-threatening event. *Dev Med Child Neurol* 2000; 42(7):487-91.
259. Watanabe K, Wakatsuki A, Shinohara K, Ikenoue N, Yokota K, Fukaya T. Maternally administered melatonin protects against ischemia and reperfusion-induced oxidative mitochondrial damage in premature fetal rat brain. *J Pineal Res* 2004; 37(4):276-80.
260. Cardinali DP. Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocr Rev* 1981; 2(3):327-46.
261. Muñoz-Hoyos A, Rodríguez-Cabezas T, Molina-Carballo A, Martínez-Sempere JJ, Ruiz-Cosano C, Acuña-Castroviejo D.

- Melatonin concentration in the umbilical artery and vein in human preterm and term neonates and neonates with acute fetal distress. *J Pineal Res* 1992; 13(4):184-91.
262. Molina-Carballo A, Muñoz-Hoyos A, Rodríguez-Cabezas T, Acuña-Castroviejo D. Day-night variations in melatonin secretion by the pineal gland during febrile and epileptic convulsions in children. *Psychiatry Res* 1994; 52(3):273-83.
263. Molina-Carballo A, Acuña-Castroviejo D, Rodríguez-Cabezas T, Muñoz-Hoyos A. Effects of febrile and epileptic convulsions on daily variations in plasma melatonin concentration in children. *J Pineal Res* 1994; 16:1-9.
264. Wright RJ, Cohen RT, Cohen S. The impact of stress on the development and expression of atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5(1):23-9.
265. Muñoz-Hoyos A, Espín-Quirantes C, Molina-Carballo A et al. Neuroendocrine and circadian aspects (melatonin and β -endorphins) of atopic dermatitis in the child. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007; 18:679-686.
266. Blizzard RM, Bulatovic A. Psychosocial short stature: a syndrome with many variables. 1992;6:687-712. *Baillieres Clin Endocrinol Metabol* 1992; 6:687-712.
267. Muñoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Ruiz-Cosano C, Uberos-Fernández J, Fernández-García JM, Galdó-Muñoz G. Affective Deprivation Syndrome and Non-Organic Failure to Thrive: Psychopathological and neuroendocrinological considerations. 2006.
268. Powell GF. Nonorganic failure to thrive in infancy: an update on nutrition, behavior, and growth. *J Am Coll Nutr* 1988; 7:345-53.
269. Muñoz-Hoyos A, Aguilar-Cordero MJ, Ruiz-Cosano C, Molina-Carballo A, Uberos-Fernández J, Acuña-Castroviejo D, Molina-Font JA. Affective deprivation syndrome and the indoleamine theory of depression: possible correlation. *Eur.J.Clin.Invest*. 25, A20. 1995. Cambridge. 29th Annual

- Meeting of the European Society for Clinical Investigation and the Medical Research Society of Great Britain.
270. Otsuka M, Kato K, Murai I, Asai S, Iwasaki A, Arakawa Y. Roles of nocturnal melatonin and the pineal gland in modulation of water-immersion restraint stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *J Pineal Res* 2001; 30(2):82-6.
 271. Waldhauser F, Weiszenbacher G, Tatzer E, Gisinger B, Waldhauser M, Schemper M, Frisch H. Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66(3):648-52.
 272. Tan DX, Manchester LC, Sainz RM, Mayo JC, Leon J, Reiter RJ. Physiological ischemia/reperfusion phenomena and their relation to endogenous melatonin production: a hypothesis. *Endocrine* 2005; 27(2):149-58.
 273. Kvetnoy I. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23 Suppl 1:92-6.:92-6.
 274. Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Buonocore G, Rossi V, Ciccoli L. Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(5):724-32.
 275. Kim YJ, Hong YC, Lee KH, Park HJ, Park EA, Moon HS, Ha EH. Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. *Reprod Toxicol* 2005; 19(4):487-92.
 276. Ozguner F, Koyu A, Cesur G. Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels. *Toxicol Ind Health* 2005; 21(1-2):21-6.
 277. Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, Cordaro S, Corona G, Trimarchi G, Barberi I. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res* 2001; 50(6):756-60.
 278. Gitto E, Romeo C, Reiter RJ, Impellizzeri P, Pesce S, Basile M, Antonuccio P, Trimarchi G, Gentile C, Barberi I,

- Zuccarello B. Melatonin reduces oxidative stress in surgical neonates. *J Pediatr Surg* 2004; 39(2):184-9.
279. Gitto E, Reiter RJ, Sabatino G, Buonocore G, Romeo C, Gitto P, Bugge C, Trimarchi G, Barberi I. Correlation among cytokines, bronchopulmonary dysplasia and modality of ventilation in preterm newborns: improvement with melatonin treatment. *J Pineal Res* 2005; 39(3):287-93.
280. Bancalari E, Claure N. Definitions and diagnostic criteria for bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol* 2006; 30(4):164-70.
281. Gitto E, Reiter RJ, Amodio A, Romeo C, Cuzzocrea E, Sabatino G, Buonocore G, Cordaro V, Trimarchi G, Barberi I. Early indicators of chronic lung disease in preterm infants with respiratory distress syndrome and their inhibition by melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36(4):250-5.
282. Craig S, Lopez A, Hoskin D, Markham F. Meconium inhibits phagocytosis and stimulates respiratory burst in alveolar macrophages. *Pediatr Res* 2005; 57(6):813-8.
283. Contreras-Chova F. Valoración de la respuesta neonatal frente al estrés oxidativo. Análisis comparativo entre recién nacidos a término y pretérmino. Tesis Doctoral. Granada: Universidad de Granada, 2005.
284. Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Palomino N, Robles R, Mataix J, Huertas JR. Oxidative stress in erythrocytes from premature and full-term infants during their first 72 h of life. *Free Radic Res* 2003; 37(3):317-22.
285. Cooke RW, Drury JA. Reduction of oxidative stress marker in lung fluid of preterm infants after administration of intratracheal liposomal glutathione. *Biol Neonate* 2005; 87(3):178-80.
286. Buonocore G, Perrone S, Longini M, Terzuoli L, Bracci R. Total hydroperoxide and advanced oxidation protein products in preterm hypoxic babies. *Pediatr Res* 2000; 47(2):221-4.

287. Frank L, Sosenko IR. Development of lung antioxidant enzyme system in late gestation: possible implications for the prematurely born infant. *J Pediatr* 1987; 110(1):9-14.
288. Hamrick SE, Ferriero DM. The injury response in the term newborn brain: can we neuroprotect? *Curr Opin Neurol* 2003; 16(2):147-54.
289. Miller SL, Yan EB, Castillo-Melendez M, Jenkin G, Walker DW. Melatonin provides neuroprotection in the late-gestation fetal sheep brain in response to umbilical cord occlusion. *Dev Neurosci* 2005; 27(2-4):200-10.
290. Dani C, Martelli E, Bertini G, Pezzati M, Filippi L, Rossetti M, Rizzuti G, Rubaltelli FF. Plasma bilirubin level and oxidative stress in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003; 88(2):F119-F123.
291. Saugstad OD. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001; 13(2):147-53.
292. Volpe JJ. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 2001; 50(5):553-62.
293. Pitkanen OM, Hallman M, Andersson SM. Correlation of free oxygen radical-induced lipid peroxidation with outcome in very low birth weight infants. *J Pediatr* 1990; 116(5):760-4.
294. Inder TE, Darlow BA, Sluis KB, Winterbourn CC, Graham P, Sanderson KJ, Taylor BJ. The correlation of elevated levels of an index of lipid peroxidation (MDA-TBA) with adverse outcome in the very low birthweight infant. *Acta Pediatr* 1996; 85(9):1116-22.
295. Raghuv eer TS, McGuire EM, Martin SM, Wagner BA, Rebouche CJ, Buettner GR, Widness JA. Lactoferrin in the preterm infants' diet attenuates iron-induced oxidation products. *Pediatr Res* 2002; 52(6):964-72.
296. Tauman R, Zisapel N, Laudon M, Nehama H, Sivan Y. Melatonin production in infants. *Pediatr Neurol* 2002; 26(5):379-82.

297. Volpe JJ. Encephalopathy of prematurity includes neuronal abnormalities. *Pediatrics* 2005; 116(1):221-5.
298. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Macías M, Muñoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Arauzo M, Montes R, Vives F. Cell Protective Role of Melatonin in the Brain. *J Pineal Res* 1995; 19:57-63.
299. Contreras-Chova F, Bonillo-Perales A, Molina-Carballo A, Ochoa-Herrera J, Pérez-Iáñez R, Narbona-López E, González-Ripoll M, Uberos-Fernández J, De Araujo-Nepomuceno E, Muñoz-Hoyos A. Impact of delivery type in the hydroperoxide membrane levels and erythrocytary catalase activity in prematures during the early neonatal period. *European Academy of Paediatrics* 2006. Barcelona: 2006.
300. Contreras-Chova F, Ochoa-Herrera J, Pérez-Iáñez R, Molina-Carballo A, Muñoz-Hoyos A, Narbona-López E, Uberos-Fernández J, De Araujo-Nepomuceno E, González-Ripoll M, Bonillo-Perales A. Evolution of membrane erythrocyte hydroperoxides levels in neonatal period: Comparative analysis between term and preterm newborns. *European Academy of Paediatrics* 2006. Barcelona: 2006.
301. Sivan Y, Laudon M, Tauman R, Zisapel N. Melatonin production in healthy infants: evidence for seasonal variations. *Pediatr Res* 2001; 49(1):63-8.