

## PREMIO MARTÍNEZ VALVERDE 2003

**Análisis de la secreción nocturna de serotonina y ácido 5-hidroxi-indol-acético en niños con baja talla**

**Autores: Contreras Chova F, Cevallos Ortega I, Narbona López E, Ruiz Cosano C, Uberos Fernández J, Rodríguez Argente del Castillo F, Fernández García JM.**

**Departamento de Pediatría. Hospital Universitario S. Cecilio. Granada**

### Introducción

El concepto de tiempo y las periodicidades ambientales relacionadas, ya era familiares para el hombre prehistórico. Los intentos para medir el tiempo datan probablemente de hace unos 30.000 años. Algunos de estos tempranos intentos están expresados en yacimientos arqueológicos, mostrando relaciones aparentes en su construcción a los ciclos del sol, la luna y las estrellas. Aunque por lo general, antiguamente, se había creído que los cambios cíclicos en el organismo representaban exclusivamente los efectos de los cambios cíclicos ambientales, las primeras observaciones que llevaron al reconocimiento de la naturaleza **endógena** de ciertas periodicidades fueron hechas en 1729 cuando el astrónomo francés Ortons de Mairan informó que los cambios diarios en la posición de los apéndices del heliotropo persistían en oscuridad continua. En el hombre, Thomas Lacock expresó en 1842 el concepto de que la periodicidad se originaba desde el interior del sistema (origen isotérico) o estaba provocado por la actuación de factores periódicos desde fuera (origen exotérico) o por una combinación de ambos (endoexotérico). Esta observación ha sido extendida y confirmada bajo condiciones experimentales mas precisas para muchas especies desde el eucariota al hombre. Se hizo evidente que los organismos no responden pasivamente a los cambios ambientales, sino que tienen sistemas internos exactos de medición del tiempo o "relojes". Este concepto de relojes biológicos se desarrolló durante los años 50 á 60 por Bünning, Hastings, Scheweinger, Aschoff, Richter, Pittendrigh, Menaker y otros. En mamíferos, el núcleo supraquiasmático (NSQ) es probablemente el sistema oscilatorio circadiano, el cual como marcapasos conduce ciertos ritmos circadianos neuroendocrinos como los de la ACTH, TSH y prolactina. La destrucción física o la inhibición neurotóxica del NSQ conduce al cese de esos ritmos neurohormonales. Sin embargo, después de la destrucción del NSQ, ciertos ritmos circadianos del organismo persisten, incluyendo el descanso-actividad, ingesta y bebida, temperatura corporal y la secreción de corticosterona. Por otra parte, Virey (1814) exploró los ritmos diurnos humanos en relación a la salud y la enfermedad. En la primera tesis en cronobiología para el doctorado en medicina, presentada en la Universidad de París en 1814 enfatizó la importancia del tiempo en la investigaciones terapéuticas. La primera mención de un tratamiento medido con el tiempo, de acuerdo con la etapas de un ritmo, fue presentado por Balfour (1815), que intentó predecir la fiebre de acuerdo con el ciclo lunar y de acuerdo con el horario de ataques previos. Balfour sugirió que el tratamiento debería estar cronometrado de acuerdo con la aparición esperada del siguiente ataque de la enfermedad. Edward Smith, en 1861, informó de un grado más alto de toxicidad del etanol por la mañana y resaltó que los efectos de esa droga dependen del estado del ciclo. También informó de una periodicidad circadiana en el momento de la muerte: "La muerte ocurre mucho mas frecuentemente a partir de la 1 y hasta la 5 h a.m.; que a otras horas del día o de la noche", lo que ha sido confirmado desde entonces en numerosas ocasiones por muchos investigadores. De esta observación extrajo la conclusión de que "los pacientes deberían ser cuidadosamente vigilados a esas horas vulnerables". Como precursor de la **Cronofarmacología** moderna, Smith declaró que "la eficiencia del remedio dependerá tanto de la elección del período correcto para la administración del fármaco como de las propiedades del mismo". Estos tempranos informes estuvieron durante mucho tiempo olvidados hasta la mitad del siglo veinte cuando se vuelve a dar importancia al control horario del tratamiento de acuerdo con el curso rítmico de la enfermedad, por ejemplo, la hora a la cual la insulina se debía administrar a los pacientes diabéticos (Von Mersdorf). De

los años 50 a los 70, la experimentación animal en roedores mostraron que la sensibilidad y resistencia de los animales a una amplia gama de agentes nocivos, incluyendo muchas drogas usadas en medicina, estaba claramente en dependencia con la fase del ritmo circadiano en el momento de la administración. De esta forma surgió el concepto de **Cronofarmacología**, el cual se ha extendido a humanos en estudios realizados por Reinberg, Halberg<sup>1</sup> y muchos otros desde principios de los años 60, se ha desarrollado rápidamente durante las últimas dos décadas, y se ha acumulado una gran cantidad de literatura al respecto (Aschoff y Wever 1976; Bünning y col., 1973; Conroy y Mills 1970; Halberg 1959; Haus y col., 1980, 1988; Haus y Halberg 1980; Reinberg y Ghata 1964). Muchos de estos cambios tiempo-dependientes ocurren en intervalos regulares y así representan los ritmos, que son en cierto grado predecibles en el tiempo. Con el uso de procedimientos estadísticos de ritmometría, vemos que una gran proporción de la variabilidad encontrada en la mayoría de las series de medidas de variables biológicas puede ser debida a una multitud de ritmos en diferentes rangos de frecuencia (Halberg y col. 1965; Halberg y Panofsky 1961; Halberg y Reinberg 1976; Haus y col., 1980, 1981; Panofsky y Halberg 1961). **La Cronobiología** es la ciencia que investiga y cuantifica objetivamente los mecanismos de esta estructura tiempo-biológica incluyendo las manifestaciones rítmicas de la vida (Halberg<sup>2</sup> y col., 1977). Para el objeto del presente proyecto interesa especialmente el concepto de ritmo ultradiano (menos de 20 horas), porque se encuentran en los sistemas biológicos como fenómenos ubicuos con una gama amplia de frecuencias, que van desde milisegundos a unas pocas horas. Los ritmos ultradianos incluyen ritmos en el EEG, la frecuencia respiratoria y cardíaca, ritmos en la presión de sangre, la alteración entre el movimiento rápido de ojo (REM) y el sueño no REM, secreciones hormonales, etc. Algunos de estos no se relacionan claramente en la frecuencia, mecanismos causales e importancia funcional. Otros, pueden relacionarse con los ritmos ultradianos de otras variables en la misma gama de frecuencia, sugiriendo algunos osciladores comunes (Pavlou y col., 1990). Determinados ritmos ultradianos como, la secreción y la concentración en plasma de ciertos polipéptidos y hormonas esteroideas, son menos regulares y menos reproducibles que los ritmos circadianos de los mismas variables, y pueden ser considerados como pseudoperiódicos, pulsátiles o episódicos. Aunque la distribución aleatoria de los picos secretorios de estas hormonas, se asume frecuentemente, la observación más cercana y los medios apropiados de análisis estadístico (Veldhuis y Johnson<sup>3</sup> 1986) frecuentemente dan a conocer modelos con cambios repetitivos (p.e., rítmico) en la frecuencia y amplitud sobre la escala de 24-h. Las interacciones entre el sistema circadiano y ciertos ritmos ultradianos, se observan en el sistema endocrino. En algunos parámetros hormonales, el oscilador circadiano parece modular ambos, la magnitud y la frecuencia de los pulsos hormonales. La repetición de episodios secretorios en el sistema endocrino varía desde menos de 1h a aproximadamente 4 h. La amplitud de frecuencia y la distribución sobre las 24-h, son características de cada hormona. En algunas variables, los pulsos secretorios varían en la amplitud y frecuencia como una función de la fase circadiana. El número promedio de pulsos informado sobre un espacio de tiempo de 24-h, fue alrededor 15 para ACTH, 12 para la prolactina, 9 para TSH, y 4 para la hormona de crecimiento (Van Cauter y Honinckx 1985). La colocación temporal de estos pulsos sobre el espacio de tiempo de 24-h, varía según la variable, p. ej., los pulsos de hormona de crecimiento que ocurren después de la iniciación de sueño, los pulsos más altos de la TSH durante la tarde y las horas nocturnas, pero aparentemente no relacionado con el sueño y los pulsos más grandes y más frecuentes de la ACTH y el cortisol, durante la noche avanzada y horas tempranas de mañana (Desir y col., 1986; Wehrenberg y col., 1982; Pohl y Knobil 1982; Sassin y col., 1969). El efecto fisiológico de algunas hormonas sobre sus órganos diana, depende más, de su secreción pulsátil que de su secreción continua o dosificación terapéutica. Pero también en otros, como TSH e insulina, su acción parece estar aumentada por esta forma de secreción, la cual parece ser óptima para obtener la respuesta fisiológica apropiada (Matthews y col., 1983; Bratusch-Marrain y col., 1986; Pohl y Knobil 1982). Hay evidencia considerable de pulsatibilidad hormonal originada en el NSQ, aunque se conoce relativamente poco en este momento en lo que concierne a la naturaleza simple o múltiple de los marcadores involucrados, su interacción, modulación y regulación de retroalimentación, por otros ritmos con marcadores iguales o relacionados. Durante las tres últimas décadas el avance en las técnicas de medición con monitores de variables fisiológicas y de laboratorio ha facilitado la introducción de la **Cronobiología**<sup>4</sup> en la medicina clínica. El advenimiento de ordenadores electrónicos durante este mismo tiempo ha permitido el uso de métodos estadísticos de inferencia para la medición cuantitativa de cambios relacionados en el tiempo en funciones corporales y su evaluación con cifras estadísticamente significativas. Estos avances han abierto nuevos proyectos para el reconocimiento y comprensión de la anormalidad y en el tratamiento de la enfermedad, y permiten una aplicación significativa y eficiente en el costo de conceptos cronobiológicos y métodos de medicina clínica. Junto con los recientes avances en **Cronofarmacología**, una aplicación de este tipo parece ahora oportuna y urgente en algunas otras áreas como la Pediatría.<sup>5,6,7,8</sup>

## Justificación y objetivos

El desarrollo de las mencionadas ciencias básicas, como la **Cronobiología**, ha permitido que se inicien a nivel internacional líneas de investigación encaminadas a profundizar en el conocimiento de sus mecanismos íntimos. En este sentido queremos subrayar la escasez de trabajos en humanos que alcanza cotas aún más bajas en el niño y en el neonato. Una gran cantidad de sustancias del metabolismo, en especial, hormonas, presentan un ritmo ligado a la jornada de 24 horas o ritmo circadiano, el cual se expresa de forma más o menos intensa en función de la sustancia de que se trata, lo cual debe estar ligado al correspondiente mecanismo de regulación. Lo mismo ocurre para la liberación en picos episódicos o liberación oscilatoria. En el niño, se admite que los procesos de crecimiento y desarrollo juegan un destacado papel como factores reguladores de los ritmos de producción hormonal. En la actualidad no existen suficientes conocimientos que demuestren la regulación genética de ritmos pulsátiles de secreción, aunque han sido descritos experimentos de gran interés que demuestran que la función endocrina es un proceso rítmico y pulsátil determinado genéticamente. Los hechos esbozados deben ser suficientes para caracterizar la secreción pulsátil y rítmica de hormonas como fenómeno determinado genéticamente, que refleja un sistema biológico y a la vez con características individuales, considerando los distintos parámetros que se producen a nivel funcional en este sistema. Ahora bien, si nos preguntamos qué efectos fisiológicos tiene esta ritmicidad y secreción pulsátil, la cuestión tiene en principio una explicación específica aplicada a la Endocrinología. Esta periodicidad de diferentes concentraciones en la fase diurna y nocturna puede ser como los valores nocturnos bajos de ACTH-Cortisol un fenómeno económico-biológico, las hormonas que regulan el rendimiento activo agudo son menos necesarias durante el sueño, al contrario que la hormona de crecimiento y la N-Acetil-5-Metoxi-Triptamina, con su liberación nocturna acentuada. Se debe hacer un intento de explicación económica que propone que la menor actividad nocturna basal del organismo durante la noche deja más espacio metabólico a procesos anabólicos a largo plazo como es el caso del crecimiento (para la GH) o la acción antioxidante y protectora celular atribuida a la aMT, quizás como novedad de mayor interés en el proyecto que presentamos debemos decir, que con relación a la **serotonina** (5-Hidroxi-Triptamina) (5HT) y el **Ácido 5-Hidroxi-Indol-Acético** (5HIAA), no se conoce prácticamente nada, ni de su patrón secretor nocturno, ni de su significado funcional en niños con baja talla. Consideraciones que en definitiva fueron la base argumental para elaborar los objetivos del presente proyecto, los cuales definimos bajo los siguientes términos: 1) Incorporar nuevos procedimientos informáticos y estadísticos al conocimiento de la funcionalidad neurosecretora de 5HT y 5HIAA en el niño. 2) Describir en niños con baja talla el patrón neurosecretor de 5HT y 5HIAA. 3) Analizar en los casos que sea posible mediante la aplicación del análisis de cosinor, si la producción de 5HT y 5HIAA se ajusta a un patrón de secreción rítmica (ultradiana) en el transcurso de las horas nocturnas. 4) Mediante las apropiadas técnicas y algoritmos de clasificación, estudiar si en los grupos de niños con baja talla, finalmente catalogados como, Retraso Constitucional del Crecimiento, Baja Talla Familiar y Déficit Neurosecretor de GH, y con la aproximación metodológica que permite el estudio de estos pacientes, definir pulsos de producción de 5HT y 5HIAA tanto en el conjunto de la muestra como en cada uno de los grupos finales. 5) Calcular la secreción integrada de 5HT y 5HIAA durante el período tiempo comprendido entre las 21.00 y las 09.00 horas con la finalidad de: a) Describir patrones -si los hubiera- de secreción propios de cada uno de los grupos de estudio incluidos en el proyecto. b) Establecer posibles diferencias entre los mismos. 6) Analizar las analogías y diferencias existentes en este tipo de pacientes con relación a los patrones de secreción de aMT, 5HT y 5HIAA.

## Material

Los pacientes objeto del presente estudio fueron seleccionados de entre los atendidos en la Unidad de Endocrinología Infantil de nuestro Servicio de Pediatría, durante un período de tiempo continuado de seis años. Todos ellos con las características comunes de presentar un retraso del crecimiento, circunstancia que tras ser valorada en su conjunto, condujo a la necesidad de realizar un estudio de secreción integrada de GH. Ante toda consulta por posible retraso del crecimiento, desde el punto de vista médico, lo que interesa no es sólo saber si el niño es más bajo de la media normal, sino más bien si los patrones de crecimiento son los que cabría esperar, suponiendo que los factores exógenos y

endógenos que influyen sobre el mismo funcionan a la perfección, para llevarlo a una talla que esté de acuerdo con la de sus progenitores. De estas consideraciones se desprenden tres aspectos fundamentales para valorar el crecimiento: 1) Situación del sujeto a estudiar con respecto a los estándares de un grupo homogéneo de individuos normales de la misma edad, sexo y grupo étnico: **valoración estadística de la talla.** 2) Ritmo de crecimiento expresado en cm/año y valorado en un período de al menos 6 meses: **valoración dinámica de la talla.** 3) Relación entre la talla del sujeto a estudiar con la talla de los padres: **valoración familiar de la talla.**

Una elemental clasificación de baja talla permite distinguir entre baja talla variante de la normalidad, que incluye la baja talla familiar y el retraso constitucional del crecimiento, y baja talla patológica que a su vez puede ser desproporcionada debida a displasias óseas u otras causas como raquitismo, y proporcionada. La baja talla patológica proporcionada puede deberse a causas prenatales como el retraso de crecimiento intrauterino, algunos síndromes dismórficos o a anomalías cromosómicas, o bien, a causas postnatales entre las que se incluyen la malnutrición, enfermedades crónicas y endocrinopatías. Dado este amplio abanico de posibilidades etiológicas la conducta a seguir ante cualquier consulta por baja talla requiere el desarrollo de una minuciosa valoración del paciente con la realización de: **A) La historia clínica** : donde se recogen ; **antecedentes familiares, antecedentes personales y el motivo de consulta.** **B) Examen físico** que consistirá en; **una evaluación por aparatos , la valoración del desarrollo puberal,** expresándola según los estadios de Tanner **y una evaluación auxológica.** **C) Exámenes complementarios** que incluyen; **perfil analítico general, anticuerpos anti gliadina y antiendomiso, cariotipo, radiografía de la mano izquierda, pruebas de función tiroidea pruebas específicas cuyo objetivo es detectar una deficiencia de GH.**

Esta sistemática constituye el protocolo de actuación de nuestro servicio para el estudio de un niño con baja talla y que fue el que se aplicó a la muestra seleccionada, la cual, en función del protocolo de estudio de baja talla, fue diagnosticada finalmente de Retraso Constitucional del Crecimiento, Baja Talla Familiar y Déficit Neurosecretor de GH, diagnósticos que empleamos para diferenciar cada uno de los grupos en que fue dividido el material, en las (**Tablas I y II**) recogemos de forma resumida algunas de sus características y resultados obtenidos en el estudio endocrinológico. La muestra objeto del presente estudio, estaba compuesta por 25 niños, los cuales fueron clasificados, según el diagnóstico final, en tres grupos: a) Grupo con **baja talla familiar**, compuesto por 12 pacientes, con una edad comprendida entre los 5 y 11 años, siendo un 69% mujeres y un 31% varones . b) Grupo con **Déficit neurosecretor de GH,** compuesto por 9 pacientes, entre 4 y 10 años de edad, con cuatro mujeres y cinco varones. c) Grupo con **retraso constitucional del crecimiento,** formado por 4 pacientes, entre 7 y 10 años de edad, siendo 1 mujer y 3 varones. En principio hay que admitir que la muestra finalmente seleccionada no es muy amplia, pero es necesario considerar para obviar este inconveniente los siguientes aspectos: a) En primer lugar las dificultades encontradas para su selección téngase en cuenta que se tardaron seis años para poder lograr los 25 niños seleccionados, ya que entre otras muchas dificultades hay una que fue la más determinante, consistente en conseguir la autorización por parte de los padres o tutores para la obtención de muestras, las cuales finalmente eran obtenidas del sobrenadante que el laboratorio de hormonas desechaba ; y b) La gran información que obtenemos en cada caso al poder medir hasta veinticinco muestras consecutivamente obtenidas en cada uno de los pacientes, muestreo que en el ámbito pediátrico hay que considerar como excepcional.

**Métodos: 1) Método clínico.** El desarrollo del método clínico se fundamenta en el denominado protocolo de baja talla, que incluye la aplicación de los siguientes procedimientos: **A) Anamnesis detallada: a) Antecedentes familiares:** entre lo cuales es imprescindible conocer la talla de los familiares cercanos al paciente lo que permitirá calcular la **"talla diana"** del paciente. Otro dato que debe solicitarse a los padres es la edad en que ambos progenitores y hermanos mayores tuvieron el desarrollo puberal, así como la presencia de enfermedad hereditaria en la familiar, Condiciones socioeconómicas y ambiente familiar. **b) Antecedentes personales:** donde la recogida de los datos debe remontarse al período de gestación. Siendo de gran importancia las condiciones en que se desarrolla el parto, puesto que las maniobras violentas, presentación de nalgas, situaciones de asfixia, etc, pueden ser causa de lesiones a nivel del eje hipotálamo-hipófisis y originar déficits hormonales con la consiguiente repercusión sobre el crecimiento. Con respecto a la vida postnatal se debe insistir no sólo acerca de la existencia de cualquier tipo de enfermedad más o menos crónica, sino también sobre el régimen alimentario del niño desde el nacimiento y las circunstancias socio-familiares en las que tiene lugar el desarrollo del paciente. **c) Motivo de consulta:** se recogerán datos sobre el tiempo de evolución de la talla baja, el momento en que lo

observaron y algunas circunstancias que puedan acompañar a la misma (crisis de hipoglucemia, mediciones previas, etc.) los cuales pueden ayudar a establecer el diagnóstico. **B) Examen físico completo** que incluirá: **a) Evaluación por aparatos** con objeto de detectar alguna anomalía que haya podido pasar desapercibida con anterioridad, y la valoración del estado nutritivo del paciente. **c) Evaluación somatométrica .b) La valoración del desarrollo puberal**, expresándolo según los estadios de Tanner. **C) Exámenes complementarios** que incluyen: **a) Perfil analítico general:** hemograma completo, glucosa, urea, creatinina, proteínas totales, calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, sideremia y orina, con objeto de descartar alguna patología subclínica que pudiera pasar desapercibida. **b) Anticuerpos anti gliadina y anti endomisio**, en situaciones de sospecha de patología digestiva crónica. **c) Cariotipo** que debe realizarse a toda niña con baja talla, dada la elevada frecuencia del síndrome de Turner, también puede ser conveniente realizarlo en algunos niños para poder excluir alteraciones cromosómicas autosómicas, especialmente si tienen otras anomalías. **d) Radiografía de la mano y muñeca izquierda** para conocer la maduración ósea. **e) Las pruebas de función tiroidea**, especialmente la determinación de TSH y T<sub>4</sub> séricas, descartan la presencia de un hipotiroidismo. **f) Pruebas específicas una deficiencia de GH**. Incluyéndose en este sentido; **Tests de despistaje:** ejercicio + propranolol., sueño: pretratamiento con esteroides sexuales. **Tests definitivos:** (Dos pruebas negativas descartan bioquímicamente el déficit de GH) como; hipoglucemia insulínica, clonidina. arginina, L-Dopa, glucagón. Consideramos clásicamente un déficit total de GH cuando su respuesta a dos pruebas de estímulo es menor de 5 ng/ml, catalogándose de déficit parcial si dicha respuesta se sitúa entre 5 y 10 ng/ml. **Secreción integrada de GH:** consideramos déficit de GH cuando la secreción integrada de GH es inferior o igual a 3.2 ng/ml . **Estímulo de GH con GRF:** cuyo objetivo es complementar aquellos casos de secreción de GH dudosa o deficitaria. **Determinación de GH en orina:** su correlación con la GH sérica parece adecuada en estadios prepuberales. pero no así durante la pubertad. **Niveles basales de IGF-I:** útil en el nanismo tipo Laron.

$$\sigma^2 = \frac{RSS}{n - 3}$$

**2) Método analítico.** Las variables y procedimientos analíticos que se desarrollaron en el proyecto fueron: a) La medición de la hormona de crecimiento que se realizó mediante radioinmunoensayo: el principio del ensayo está basado en la competición de la GH de la muestra con la GH contenida en los reactivos, la cual está fijada a un número limitado de anticuerpos en los lugares de unión. b) La medición de serotonina y ácido-5-hidroxi-indol-acético que fueron determinadas mediante cromatografía líquida de alta presión, considerada actualmente la técnica de análisis más versátil y ampliamente utilizada para la separación e identificación de moléculas. El método por el cual se separan las moléculas es la detección electroquímica, método de elección para el análisis de sustancias fácilmente oxidables como es el caso del triptófano y sus derivados ( serotonina y el ácido-5-hidroxi-indol-acético).

**3) Método estadístico.** El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la aplicación de las siguientes técnicas: **a) Análisis de la varianza de una y dos vías.** **b) Análisis de Cosinor.** El análisis de cosinor, consiste en la representación de la extensión de datos por la función coseno que más se ajuste a la siguiente expresión:

$$y_i = M + A \cos (\omega t_i + \phi)$$

Donde; y<sub>i</sub> = valor del punto i, M= mesor o valor medio del ritmo, A = amplitud de la función, ω = frecuencia angular de la curva, φ = acrofase o tiempo en que se alcanza el valor máximo, t<sub>i</sub> = tiempo en que se mide el punto i. Dicha función es tal que la suma cuadrada de las diferencias de cada uno de los valores a la curva sea la mínima entre todas las posibles elecciones. Este análisis es una técnica potente porque puede tratar con tiempos de muestreo irregulares, integrados o puntuales y permite calcular los parámetros que nos definen el ritmo circadiano: **Mesor:** concepto que expresa el valor medio de la función (se corresponde con la media aritmética de la extensión de datos). En la siguiente expresión se detalla la fórmula a aplicar para calcularlo. **Par amplitud-acrofase:** la amplitud hace referencia al valor de la curva en cada uno de los puntos que la definen. La acrofase es el momento (hora) en la que se alcanza la máxima amplitud; se expresa en grados, considerando que las 24 horas se corresponden con 360 grados. **Varianza residual:** la varianza residual se calcula mediante la siguiente expresión:

Donde RSS es la suma residual de cuadrados o suma de cuadrados de desviaciones a la curva. **Porcentaje de ritmo:** evalúa el porcentaje de variabilidad de los datos representados por la curva coseno ajustada. Para calcularlo, se hace una comparación directa entre la variabilidad de los datos en torno a la curva ajustada (RSS) y la variabilidad total presente (TSS). Un porcentaje alto indica un buen ajuste de los datos a la función y, por tanto, habla en favor de la existencia de ritmo circadiano.

$$\text{Porcentaje de ritmo (\% V)} = \frac{TSS - RSS}{TSS} 100$$

Donde TSS es la suma total de cuadrados o suma de cuadrados de desviaciones a la media. Un ajuste perfecto sería aquel en el que el porcentaje de ritmo fuese del 100% (en ese caso RSS sería cero). En el mismo sentido, el análisis del coseno investiga si los datos son mejor descritos por una curva coseno que por una línea recta. El ajuste significativo de los datos a la curva (indica la existencia de ritmo circadiano) se define como aquel en el que la amplitud de la curva ajustada es significativamente distinto de cero. Si se cumple el supuesto anterior admitiremos la existencia de ritmo circadiano. Resumiendo, el análisis del coseno es una técnica versátil y, cuando se usa adecuadamente, potente. Al igual que cualquier otro método, debe ser utilizado con el debido reconocimiento de sus limitaciones y de los factores que pueden socavar la validez de los resultados. c) **Análisis cluster.** El nombre de *cluster analysis* se utiliza para definir una serie de técnicas, fundamentales algoritmos, que tienen por objeto la búsqueda de grupos similares de individuos o de variables que se van agrupando en conglomerados. Dada una muestra de individuos, de cada uno de los cuales se dispone de una serie de observaciones, el *cluster analysis* sirve para clasificarlos en grupos lo más homogéneos posible en base a las variables observadas. Los individuos que queden clasificados en el mismo grupo serán tan similares como sea posible. Para Sokar y Sneath (1963), dos de los autores que más han influido en el desarrollo del *cluster analysis*, "la clasificación es uno de los procesos fundamentales de la ciencia, ya que los fenómenos deben ser ordenados para que podamos entenderlos". Antes de iniciar un *cluster analysis* deben tomarse tres decisiones: 1) Selección de las variables relevantes para identificar a los grupos; 2) Elección de la medida de proximidad entre los individuos; 3) Elección del criterio para agrupar individuos en conglomerados. Es decisiva la selección de las variables que realmente son relevantes para identificar a los grupos, de acuerdo con el objetivo que se pretenda lograr en el estudio. De lo contrario, el análisis carecerá de sentido. Para la selección de la medida de proximidad es conveniente estar familiarizado con este tipo de medidas, básicamente similitudes y distancias, ya que los conglomerados que se forman lo hacen en base a las proximidades entre variables o individuos. Puesto que los grupos que se forman en cada caso depende de la proximidad, distintas medidas de proximidad pueden dar resultados distintos para los mismos datos. Para elegir el criterio de agrupación conviene conocer, como mínimo los principales métodos de *cluster analysis*, en "Clasificación de los métodos de cluster analysis". El programa de análisis cluster es un algoritmo basado en un análisis estadístico de detección de picos, diseñado para localizar todos los incrementos y decrementos significativos de una serie de datos en relación a modelos de variación dosis dependiente. La combinación de incrementos y decrementos significativos da lugar a picos mientras que las regiones delimitadas por un incremento significativo y un decremento significativo pero que no contienen variaciones significativas internas se denominan regiones interpicos (valles). El programa utiliza las mejores estimaciones de error del investigador para detectar grupos de muestras que están significativamente aumentados con respecto a los datos precedentes y posteriores establecidos por un test de t de Student. El programa utilizará los verdaderos replicados asociados con cada muestra (por ejemplo si hay disponibles tres o mas replicados), la estimación óptima del promedio del coeficiente de variación o la desviación estándar aplicable a dicha serie de datos, o (preferiblemente) la estimación de variaciones dosis dependientes.

$$\frac{n}{4\sigma^2} A^2 > F_{1-\alpha} \text{ con } F_{\alpha} \text{ en la distribución } F \text{ de Snedecor} \\ (2, n-3 ; g.l.)$$

## Resultados

**1) Perfil secretor.** Dentro del capítulo de la estadística descriptiva creemos que puede ser muy ilustrativo expresar gráficamente el perfil secretor de los datos en cada uno de los momentos horarios en los que dividimos la muestra. En este sentido vamos a diferenciar cuatro perfiles diferentes: **a) En el primero, denominado perfil secretor global**, se recogen los valores medios horarios en cada uno de los momentos del estudio de la totalidad de la muestra, lo que viene a representar en cada uno de los puntos la media de todos los casos. **(Fig.-1)** Con esta consideración realizamos la gráfica correspondiente y en ellos podemos deducir los siguientes hechos: 1) La comparación del perfil de ambos metabolitos muestra como la tasa media de 5HIAA es muy inferior a la ofrecida por la 5HT. 2) La 5HT parece mostrar una clara tendencia a disminuir la tasa de secreción en el transcurso de las horas nocturnas, ya que se advierten en la figura dos claros ascensos coincidiendo con las horas puntas; o lo que es lo mismo, mayor elevación al amanecer y clara disminución con el periodo oscuro. 3) En relación al 5HIAA, además del bajo nivel medio encontrado, es fácilmente evidenciable la escasa variación encontrada durante el periodo estudiado. **b) En el segundo perfil hemos representado los casos que finalmente fueron diagnosticados de Baja Talla Familiar.** En su gráfica **(Fig.-2)** se pueden advertir como datos de mayor interés los siguientes: 1) Menores niveles de 5HIAA que de 5HT, y 2) Un patrón general similar al del grupo global. **c) En el tercero de los perfiles (Fig.-3) se representan los valores medios horarios correspondientes al grupo con Déficit Neurosecretor de GH** y como en los casos anteriores puede apreciarse: 1) Menores niveles de 5HIAA, 2) Descenso al llegar las horas nocturnas, 3) Elevación al amanecer 4) Presencia de picos con mayores niveles de producción durante la noche de 5HT. **d) Finalmente, en el cuarto perfil (Fig.-4) representamos los valores medios correspondientes al grupo con Retraso Constitucional del Crecimiento**, donde podemos apreciar; 1) Menores niveles nocturnos de 5HIAA. 2) Descenso al llegar la noche más exagerado que en los otros grupos. 3) Aumento al amanecer de mayor magnitud que en los otros grupos.

**2) Análisis de la varianza de una vía.** Siguiendo las instrucciones y recomendaciones de Minor y Waterhouse<sup>9</sup>, una de las formas de analizar diferencias y existencia de ritmos puede ser la aplicación de un análisis de la varianza, el cual, bajo el objetivo de este propósito, sería de una sola vía al considerar el conjunto de la muestra como un sólo grupo, y ser cada uno de los momentos horarios del estudio las variables a analizar. A continuación pasamos a describir los datos de mayor interés: **a) Respecto al grupo general:** en el caso del 5HIAA el valor de la (F) experimental en este análisis estadístico alcanzó una cifra de 2.85 mayor que la (F) teórica, en consecuencia se aceptó la existencia de diferencias significativas entre las medias **(Tabla III)**. Al existir un desigual número de casos entre las variables se aplicó el test de Bonferroni para el análisis posterior, al objeto de conocer en que momento del proceso se producen las diferencias. En el análisis posterior fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las primeras muestras horarias y de las últimas muestras horarias. En cambio, en el caso de la 5HT la realización del análisis de la varianza de una vía ofreció un valor de (F) experimental de 0.71 inferior a la (F) teórica y en consecuencia sin diferencias significativas entre sus valores medios correspondientes a cada uno de los momentos del estudio. **(Tabla VII)**. **b) Grupos diagnósticos:** en las consideraciones por grupos diagnósticos los resultados encontrados fueron los siguientes:

**Variable 5HIAA:** **1) Grupo con Baja Talla Familiar:** el valor de (F) experimental alcanzó una cifra de 2.28 y en consecuencia al ser mayor que la (F) teórica, estadísticamente significativa. En el análisis posterior al Anova encontramos que las diferencias se establecieron entre las variables V1-V23, V1-V24 y V1-V25 en todos los casos con un valor de  $p < 0.05$ . **(Tabla IV)**. **2) Grupo con Déficit Neurosecretor de GH:** en este grupo no fueron encontradas diferencias estadísticamente significativa, al encontrarse un valor de (F) experimental de 0.78. **(Tabla V)**. **3) Grupo con Retraso Constitucional del Crecimiento:** tampoco, en este caso, encontramos diferencias significativas entre las variables con un valor de (F) de 0.65 ( $p = N.S.$ ) **(Tabla VI)**

**Variable 5HT:** En el caso de la 5-Hidroxitriptamina (serotonina), en ninguno de los análisis

estadísticos realizados en función de los tres diagnósticos se encontraron diferencias significativas, habiéndose obtenido unos valores de (F) experimental para cada caso de 0.28 (p=N.S.) en el grupo con Baja Talla Familiar; 0.67 (p=N.S.) en el grupo con Déficit Neurosecretor de GH; y de 0.45 (p=N.S.) en el grupo con Retraso Constitucional del Crecimiento. (**Tablas VIII, IX y X**)

**3)Análisis de la varianza de dos vías.** En la consideración metodológica seguida en esta apartado del análisis de los datos, se ha realizado un análisis de la varianza de dos vías. Dicho análisis se realiza en función a dos factores: Factor I (Diagnósticos: Baja Talla Familiar, Déficit Neurosecretor de GH y Retraso Constitucional del Crecimiento) y Factor II (Horas). Existió significación estadística respecto al 5HIAA (**Tabla XI**) al considerar la hora como factor clasificador con una F de 2.09 y p = 0.002. En la (**Fig.-5**) se representa gráficamente cada una de las determinaciones realizadas de Ácido-5-Hidroxi-Indol-Acético, en cada uno de los momentos horarios en que se dividió el estudio donde cada valor expresa el valor medio de todos los casos en ese momento sin distinguir diagnósticos. Al aplicar el análisis de la varianza de dos vías al Ácido-5-Hidroxi-Indol -Acético respecto al factor de clasificación diagnósticos, encontramos un valor de F experimental superior a la F teórica, por lo que podemos afirmar que existe diferencia estadísticamente significativa con un valor de p = 0.016, debiéndose destacar que el grupo con DGH, en promedio presenta cifras menores de Ácido-5-Hidroxi-Indol-Acético que el resto de los grupos (**Fig.-6**). Con respecto a la 5-Hidroxi-Triptamina (serotonina) en la (**Fig.-7**) se representan los valores medios de serotonina y las desviaciones estándar de cada una de las determinaciones observadas en cada uno de los momentos horarios en que se dividió el estudio. En el análisis estadístico realizado se obtuvo una (F) experimental de 0.86, inferior a la teórica, por lo que no se pueden definir diferencias significativas con respecto a esta monoamina (**Tabla XII**). Con respecto al factor de clasificación diagnósticos, y como podemos apreciar en la (**Fig.-8**) tampoco encontramos diferencias significativas al ser la (F) experimental 0.93 inferior a la teórica.

**4) Análisis de cosinor.** Mediante el desarrollo de esta técnica estadística, se pretende analizar la posibilidad de que en el diseño del presente trabajo, podamos demostrar la existencia de una secreción rítmica. El análisis de cosinor consiste en la representación de la extensión de datos por la función coseno que más se ajuste a la siguiente expresión:

$$y = M + A \cos(\omega t + \phi)$$

El análisis de cosinor investiga si los datos son mejor descritos por una curva coseno que por una línea recta. Un ajuste significativo ( p < 0.05) es aquel donde la probabilidad de que los datos sean ajustados tan bien por una curva coseno como por una línea recta es < 5%. El ajuste significativo de los datos a la curva, lo cual indica la existencia de ritmo circadiano (ultradiano en nuestro caso) se define como aquel en el que la amplitud de la curva ajustada es significativamente distinto de cero. Si se cumple este supuesto admitiremos la existencia de ritmo ultradiano a un nivel de significación  $\alpha$ . Desarrollando el análisis estadístico de los datos correspondientes a cada uno de los casos estudiados se obtuvo una función coseno -la que mejor se ajusta a la nube de puntos-. Dichas funciones se corresponden con curvas sinusoidales como se representa en las (**Fig.-9**) (**Fig.-10**) (**Fig.-11**) (**Fig.-12**) (**Fig.-13**) (**Fig.-14**), en cada una de ellas se ha representado por una parte la nube de puntos que se corresponde con las pares de valores hora/serotonina y hora/5-Hidroxi-Indol-Acético respectivamente y por otra, la representación gráfica de la función coseno que hace mínimas las distancias de cada uno de los puntos a la curva. Como se puede comprobar al analizar el porcentaje del ritmo y el test de amplitud-acrofase, en el grupo con baja talla familiar los casos 1, 5 y 6 presenta una secreción rítmica ultradiana de 5HIAA, al igual que el caso 13 del grupo con déficit neurosecretor de GH y el caso 22 del grupo con retraso constitucional del crecimiento. En cambio en lo referente a la serotonina, sólo presentó una secreción rítmica ultradiana el caso 14 del grupo con déficit neurosecretor de GH. Lo que parece indicar que la serotonina y el metabolito final de la vía de los hidroxindoles no siguen un patrón nocturno de secreción ultradiana. (**Tabla XIII**) (**Tabla XIV**).



**5) Análisis cluster.** La moderna adquisición de técnicas y procedimientos estadísticos ha permitido que puedan ser analizados aspectos de gran interés práctico relacionados con los distintos modos de secreción hormonal. Experiencias que se han ido recogiendo en distintos programas informatizados y técnicas estadísticas como son la autocorrelación, el análisis de Fourier, los conceptos de copulsatilidad y deconvolución, etc; avances que están permitiendo conocer mejor importantes facetas de la fisiología endocrina en el niño. Empleando algunos de estos procedimientos, con la metodología descrita con anterioridad pasamos a describir someramente consideraciones de interés en los resultados obtenidos. Como se puede observar a continuación los picos encontrados en los diferentes grupos son los siguientes (**Tabla XV**): a) Grupo con Baja Talla Familiar, presenta un total de 34 picos en cuanto al Ácido 5-Hidroxi-Indol-Acético y de 30 picos respecto a la serotina. b) Grupo con Déficit Neurosecretor de GH, presenta un total de 22 picos en cuanto al Ácido 5-Hidroxi-Indol-Acético y de 23 picos respecto a la serotina. c) Grupo con Retraso Constitucional del Crecimiento, presenta un total de 7 picos en cuanto al Ácido 5-Hidroxi-Indol-Acético y también 7 picos respecto a la serotina. Estos resultados evidencian la existencia de pulsos secretores (picos) en los tres grupos con un promedio de 3.09 pico por niño y 2.77 para el 5HIAA Y 5HT respectivamente, en los niños con Baja Talla Familiar, de 3.14 y 3 respectivamente, en grupo con Déficit Neurosecretor de GH, y 3 y 3 respectivamente en el grupo con Retraso Constitucional del crecimiento. Por lo tanto, parece evidente la existencia de una secreción pulsátil de serotonina y de 5 HIAA, observándose un promedio de picos de 3 en la secreción tanto de serotonina como de su metabolito el 5-HIAA, promedio que ha sido muy similar en el los tres grupos de estudio. Esto obliga a hacer referencia a un trabajo muy similar realizado anteriormente por nuestro grupo, en el que se encontró evidencia de secreción pulsátil nocturna de N-Acetil-5-Metoxi-Triptamina con un promedio menor de picos en los niños con déficit de GH, con respecto a los grupos con baja talla familiar y retraso constitucional del crecimiento, aunque esta diferencia al aplicar distintos test estadísticos no fue significativa.

Al analizar los picos nocturnos de serotonina y 5HIAA podemos observar como en los tres grupos el momento de inicio de la producción de los picos es anterior para el 5HIAA que para la serotonina con antelación de 30-60 minutos de este con respecto a la serotonina. Siguiendo en la descripción de los picos, a la hora de comparar los tres grupos podemos observar como la mayoría de los picos se producen en la primera mitad del período oscuro, pero mientras que en los grupos con Baja Talla Familiar y Retraso Constitucional del Crecimiento comienzan a producirse en la posición 3-5 correspondiente a las 22.00-23.00 horas para el 5HIAA y en la posición 3-7 correspondiente a las 22.00 - 00.00 horas para la serotonina; en el grupo con Déficit Neurosecretor de GH el comienzo de la aparición de picos es más tardío observándose en la posición 6-8 correspondiente a las 23.30 - 00.30 horas para el 5HIAA y en la posición 9-11 correspondiente a las 01.00 - 02.00 horas. Según estas observaciones, a pesar no haber diferencias entre los tres grupos en cuanto al número de picos, si parece observarse una aparición más tardía de estos en el grupo con Déficit Neurosecretor de GH con respecto a los grupos con Baja Talla Familiar y Retraso Constitucional del Crecimiento, en los que la baja talla es considerada como una variante de la normalidad.

Por otra parte, como se recoge en la (**Tabla XVI**), los valles hallados en los distintos grupos son los siguientes: a) Grupo con Baja Talla Familiar, presenta un total de 29 valles en cuanto al Ácido 5-Hidroxi-Indol-Acético y de 37 valles respecto a la serotina. b) Grupo con Déficit Neurosecretor de GH, presenta un total de 20 valles en cuanto al Ácido 5-Hidroxi-Indol-Acético y de 22 valles respecto a la serotina. c) Grupo con Retraso Constitucional del Crecimiento, presenta un total de 9 valles en cuanto al Ácido-5-Hidroxi-Indol-Acético y de 10 valles respecto a la serotina.

En el mismo orden de ideas y ya en una consideración global, hemos querido recoger los conceptos más amplio, referidos fundamentalmente a la funcionalidad global en el período de oscuridad, encontrando, los siguientes hechos: 1) Respecto a las medias correspondientes al área total, sólo se encontraron diferencias significativas en lo referente a la secreción nocturna de 5HIAA con una F experimental de 3.79 ( $p < 0.05$ ), siendo mayor el área total en el grupo con Retraso Constitucional del Crecimiento (**Tabla XVII**). 2) En lo referente al valor medio, no encontramos diferencias significativas con una (F)

experimental de 0.28 para el 5HIAA y de 0.05 para la serotonina. 3) Finalmente como se recoge en la (Tabla XVIII) la concentración integrada de serotonina y 5HIAA en los tres grupos de diagnóstico considerados (BTF, DGH y RCC), no ofrecieron diferencias significativas entre ellos.

## Discusion

En principio hemos de adelantar que establecer una discusión con otros trabajos similares es difícil, puesto que no hemos encontrado en la literatura ninguna aportación que se dedique al estudio de "tipos de secreción" de estos dos metabolitos del triptófano en niños con baja talla. Aunque son evidentes sus relaciones con determinadas patologías. Pero no por ello, vamos a desistir de comentar varios aspectos que nos parecieron desde el principio realmente apasionantes. A) En primer lugar discutir algunas consideraciones bioquímicas y neurológicas, que de alguna manera han servido para que en los últimos años se consolide una nueva disciplina llamada Neuroendocrinología, la cual nos ha posibilitado un mejor conocimiento de mecanismos y consecuencias clínicas de gran trascendencia práctica<sup>10,11,12,13,14</sup>. En este orden de ideas hay que recordar que el núcleo fundamental de esta aportación parte del aminoácido triptófano, el cual ha de ser administrado con la dieta por su naturaleza de ser un aminoácido esencial. En su metabolización, la célula sigue distintas vías, pero hay un paso fundamental que es el de la formación de serotonina (5HT), considerado como una encrucijada metabólica puesto que a partir de él se van a producir otros de gran importancia como son las distintas kynureninas, hidrox y metoxi-indoles, destaca de forma especial para el interés de esta discusión la formación del ácido 5-Hidroxi-Indol-Acético. Ambos metabolitos han representado durante las últimas décadas interesantes temas de investigación en la patología del adulto (síndromes serotoninérgicos, trastornos depresivos, trastornos neurológicos, etc.) y prácticamente no se ha escrito casi nada en relación al niño. En la especie humana, Attanasio y cols<sup>15</sup> han observado una diferencia significativa entre los niveles de serotonina diurnos y nocturnos desde el nacimiento, a lo que hay que añadir que sólo un 2-5% del triptófano ingerido sigue esta vía metabólica, hecho importante que ya permite hablar de una producción rítmica, que en el caso de la 5HT es de predominio diurno. Casi toda la 5HT circulante se almacena en las plaquetas, habiéndose identificado en ellas receptores para imipramina no diferenciables de los que están presentes en las terminaciones nerviosas serotoninérgicas del SNC. En cambio para el 5HIAA, no se han descrito ritmos de secreción, aunque es presumible que existan, puesto que si lo tienen enzimas relacionadas. De la importancia de conocer si existe o no producción variable en función del tiempo, habla una editorial del redactor jefe de New England J of Med, en la que exige que para los estudios hormonales se describa con precisión el momento horario en el que se hace el estudio. Recomendación que recogemos en estas líneas por la trascendencia que tiene para la clínica identificar bien la normalidad y la patología. 2) En segundo lugar creemos de especial interés relacionar estos hallazgos con la clínica. Para ello, considerando las plaquetas como un modelo de terminación nerviosa serotoninérgica, algunos estudios han encontrado un descenso en las concentraciones plaquetarias de serotonina en pacientes depresivos y su recuperación tras el tratamiento<sup>16,17</sup>. Otros, han demostrado un descenso de las concentraciones plasmáticas tanto de triptófano como de serotonina (5HT) en pacientes depresivos, así como un aumento estadísticamente significativo en el período de mejoría del estado anímico. El concepto actual sobre la base bioquímica de los trastornos afectivos se establece sobre la base de una alteración en los sistemas monoaminérgicos centrales. Junto a un estado deficitario de triptamina, jugarían un papel las catecolaminas u otros "falsos neurotransmisores" en el sistema serotoninérgico; otras formas de desequilibrio del sistema neurotransmisor central indoleaminas-catecolaminas; alteraciones en las enzimas relacionadas con las catecolaminas (MAO, COMT), y posibles contribuciones a cargo de las sustancias psicopatógenas indoleamínicas. Es conocida la estrecha e importante relación existente entre serotonina y 5HIAA con la depresión en general y con individuos que se han suicidado. A nivel nacional Sainz<sup>18</sup> y Aguilar<sup>19</sup> han podido demostrar la disminución de estos productos tanto en orina como en sangre en niños que sufren carencias afectivas. Estudios farmacológicos anteriores a la formulación de ésta hipótesis habían sugerido que el mecanismo de acción de los antidepresivos tricíclicos y de los IMAO, se ejercía por una mayor actividad de las vías nerviosas que usan, respectivamente, NE o 5HT

como neurotransmisor. Las alteraciones en los mecanismos serotoninérgicos a nivel del SNC pueden dar lugar tanto a una disregulación del humor (estado anímico) como de la agresividad. En los animales está bien establecido la relación entre conducta agresiva y sistemas serotoninérgicos centrales<sup>20</sup>.

En un modelo experimental con ratones, una menor disponibilidad de triptófano inducida por una dosis de L-metionina-RS-sulfoximina (MSO) (sustancia análoga a la metionina) conduce a un descenso en la síntesis de serotonina cerebral, con la aparición de trastornos de evolución semicrónica que recuerda a las convulsiones tipo "gran mal"<sup>21</sup>. Shaywitz<sup>22</sup> et al, refieren igualmente una relación entre aminas cerebrales y epilepsia.

Silverstein, F y Jonson, MV<sup>23</sup>, encuentran en siete lactantes afectados de Síndrome de West un descenso medio del 40% en la concentración de HA en LCR, en relación con un grupo control. No señalando diferencias respecto a la concentración de HVA. La alteración en el metabolismo de la HT parece jugar un papel importante en la fisiopatología del síndrome de West y en otras epilepsias mioclónicas (p.e., epilepsia mioclónica progresiva). En individuos adultos que padecen un cuadro de mioclonias de etiología postanóxica, hay una degeneración de las neuronas serotoninérgicas junto con un descenso en la concentración de HW, y con carbidopa, señalándose un aumento de HA y HVA en LCR, junto a un descenso plasmático de triptófano, tanto antes como después del aporte de triptófano<sup>24</sup>. Las neuronas serotoninérgicas se sitúan principalmente en, y alrededor, de la línea media (rafe) del puente y zonas posteriores del tronco cerebral las singulares características del sueño en el síndrome de West, se vinculan a una alteración de esta zona o de sus proyecciones neuronales hacia centros superiores y/o por la modulación patológica de los circuitos neuronales sobre los que influyen. Los mecanismos serotoninérgicos juegan un importante papel en la liberación de ACTH por la hipófisis<sup>25</sup>. 3) Finalmente consideramos que es importante discutir aspectos metodológicos derivados de las nuevas técnicas y procedimientos estadísticos e informáticas disponibles. Gracias a los estudios de Knobil<sup>26</sup>, se sabe que las concentraciones hormonales sanguíneas no sólo presentan oscilaciones, sino que estas oscilaciones juegan un papel importante en su acción. El significado de la secreción hormonal en pequeñas y circunscritas cantidades viene subrayado por el hecho de que los pulsos del factor liberador de la hormona luteinizante (LHRH) estimulan la secreción de gonadotropinas, mientras que la secreción continuada de este factor hipotalámico inhibe dicha secreción. Con el fin de esclarecer la fisiología de la secreción hormonal de tipo pulsátil, se ha intentado, en lugar de realizar mediciones puntuales y únicas, analizar y describir la dinámica de las concentraciones hormonales en sangre. Para esto se hace necesaria la confección de perfiles hormonales, realizados a intervalos regulares y mediante determinación plasmática, en la que se obtiene el valor de la concentración hormonal. Cuando se definen los pulsos a través de una simple consideración de los perfiles, se hace patente su mala e inexacta reproducibilidad. El objetivo de los modernos procedimientos de análisis para la determinación de los pulsos, es el análisis estandarizado de los perfiles hormonales de diferentes personas o animales de experimentación (con el fin de poder establecer comparaciones). En el niño este aspecto es particularmente difícil, como ha sido reiteradamente documentado. Los pioneros de estas ideas fueron Woodward y cols<sup>27</sup>, Hoffman y cols<sup>28</sup> y Merriam y cols<sup>29</sup>. Posteriormente se confeccionaron algoritmos más detallados, que permitieron un análisis más diferenciado de los pulsos, considerando una secreción basal variable, un flujo a lo largo del tiempo, y una vida media de la hormona.

Nuevos métodos para el análisis del perfil hormonal intentan obtener conclusiones a partir de las curvas obtenidas de la secreción hormonal. Estos métodos de deconvolución reflejan no solamente el transcurso temporal, sino la dimensión de esta secreción. En concreto, se habla de secreción hormonal copulsátil a la estrecha relación temporal existente entre los pulsos de diferentes hormonas. La secreción sincronizada de diversos factores hipotalámicos liberadores de hormonas puede verse influenciada por estímulos neurales (estrés, neurotransmisores) o humorales (hipoglucemia). Es posible que una sola hormona hipotalámica actúe sobre diversas hormonas hipofisarias (ej: la LHRH estimula la secreción de hormona luteinizante (LH) y folículoestimulante (FSH), la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) estimula

la secreción de hormona estimulante del tiroides (TSH) y prolactina. Lo que no queda claro, es, si estos factores son responsables de la copulsatibilidad de la secreción espontánea fisiológica o no. En este sentido, queremos hacer una llamada de atención acerca de los fenómenos de copulsatibilidad relacionados con la 5HT y 5HIAA, de los que se conocen escasas referencias, ninguna referida a la edad pediátrica, en esta experiencia, al analizar los perfiles secretores parecen existir claras evidencias de copulsatibilidad, lo que amplía el horizonte de estudios futuros en estos pacientes, así como de interpretaciones fisiopatológicas relacionadas con las secreciones hormonales. En este sentido, para los estudios matemáticos de la **copulsatibilidad**<sup>30,31,32</sup> se han utilizado de momento tres tipos diferentes de métodos: a) Simulación de los perfiles. b) Correlación cruzada. c) Procedimiento estadístico: mediante procedimiento estadístico puede calcularse la coincidencia de los pulsos, previamente calculados de manera objetiva. Con esto se evita que una determinada copulsatibilidad, estadísticamente significativa, sea fruto de la casualidad (333- ) (335- ).

Respecto a a los estudios de los **ritmos circadianos**, hay que referirse a Minors y Waterhouse<sup>9</sup>. En este sentido, para el análisis de los ritmos en el período neonatal, en experiencias previas de nuestro grupo, fueron seguidas tres vías de tratamiento de los datos. En la presente aportación hemos seguido el test más potente y recomendado por estos autores (análisis de cosinor) y el análisis de la varianza.

Para la detección de los picos hormonales, siguiendo a Hauffa<sup>33</sup> se deben usar algoritmos validados. Uno de los primeros intentos en la confección de estos algoritmos fue el **método del valor umbral**, diseñado por Santen y Bardin<sup>34</sup>. Se define como pico de una muestra el aumento de la concentración hormonal en más de un 20% con respecto a la muestra anterior. Al final del análisis se obtiene el número y la posición de los picos, el aumento porcentual de cada pico con respecto al nadir anterior, y la concentración media de la secuencia total de datos con las medidas de dispersión. Los problemas de este método surgen cuando se produce un aumento no-lineal del error tipo I (falso pico), cuando existe una fuerte influencia de la frecuencia de obtención de la sangre sobre la frecuencia de los picos<sup>35</sup>. En este sentido, la frecuencia de la obtención de nuestras muestras no permite, por razones de ética, ser aumentada y es posible que pueda sesgarse algún pico hormonal. El **método ULTRA**, diseñado por Van Cauter<sup>36,37</sup>, es de aparición más reciente. Define como pico a aquel momento que se produce posteriormente a un nadir previo, seguido de una disminución hasta alcanzar otro nadir. Un algoritmo muy usado en investigación clínica el es **programa PULSAR**, diseñado por Merrien y Wachter<sup>38</sup>. En el año 1983 se publicó el **programa detector de ciclos**, diseñado por Clifton y Steiner<sup>39</sup>. El algoritmo de este programa determina un valor umbral, que debe ser superado para considerar la existencia de un pico. El **programa DETECT**, diseñado por Oerter y cols<sup>40</sup>, fue elaborado originalmente para la detección de los picos, en los laboratorios clínico-químicos.. El **programa CLUSTER**, diseñado por Veldhuis y Johnson<sup>3</sup> compara paso a paso el nadir de los datos con el test cluster (t-Test), y se detectan los aumentos significativos. Acto seguido se registran las secuencias de datos de las disminuciones de concentración significativas. Allí donde se produce un aumento, después de un nadir, se determina un pico. Existen, por otra parte, diversos modelos de varianza para la variabilidad intraensayo. En un trabajo reciente<sup>41</sup>, se estudiaron a niños con baja talla, y clasificados en tres grupos, RCC, BTF y DPGH, tras la aplicación del protocolo de baja talla. Tras considerar la necesidad de realizar un secreción integrada de GH, se obtuvieron muestras sanguíneas a intervalos de 30 minutos, desde las 21.00 h hasta la 09.00h. El procedimiento empleado en esta experiencia ha sido el Cluster, con unos resultados que demuestran como sobre una secreción mantenida durante la noche (perfil ya descrito de tipo circadiano) se producen picos de secreción hormonal en los tres tipos de pacientes analizados, siendo más frecuentes entre los RCC y menos en los DPGH. Otro tipo de programas son los organizados en forma de **red neuronal**, y representan estructuras con "capacidad de aprender". La introducción en la computadora de secuencias de datos de hormonas, con sus respectivos picos, hace que el programa de ordenador aprenda lo que el usuario considera como pico, y posteriormente se vea capaz de identificar estructuras semejantes. La experiencia y la práctica con este tipo de programas se encuentra, por el momento, limitada.

## **Conclusiones**

- 1) Los problemas éticos derivados de la investigación en humanos y más aún en el niño, dificultan claramente el acceso a un conocimiento más preciso de los patrones de secreción hormonal. En consecuencia será necesario crear nuevos procedimientos metodológicos tanto de laboratorio (micrométodos) como matemáticos e informáticos para poder progresar en el terreno de la Pediatría.
- 2) En principio y en espera de nuevos proyectos que amplíen el tiempo de estudio, en situaciones de normalidad o próximas a ella, podemos aceptar que la secreción de serotonina (5HT) y Ácido-5-Hidroxi-Indol-Acético (5HIAA) no se produce según un patrón de secreción ultradiano en el transcurso de las horas nocturnas
- 3) Como ya se ha definido en relación a la N-Acetil-5-Metoxi-Triptamina y en base a los datos que se aportan en el presente proyecto podemos admitir que la secreción de serotonina y Ácido-5-Hidroxi-Indol-Acético en el transcurso de las horas nocturna presenta sobre una secreción basal tónica y mantenida, pulsos secretores no sujetos a ningún tipo de patrón debido a una amplia variabilidad interindividual.
- 4) En principio y pendiente de realizar estudios más amplios en los que se puedan contemplar valoraciones que incluyan períodos de 24 horas, en función de los resultados obtenidos en esta experiencia podemos aceptar que, en el déficit neurosecretor de GH y en la baja talla familiar la producción de 5HIAA es significativamente más baja que la ofrecida en niños con retraso constitucional del crecimiento.
- 5) Finalmente en relación a la producción de GH hemos de decir que en general en los niños con baja talla no existe el paralelismo descrito con anterioridad, entre N-Acetil-5-Metoxi-Triptamina y GH, considerándose por tanto la producción de GH, 5HT y 5HIAA como totalmente independientes.