

**VALORACIÓN DE LA RESPUESTA NEONATAL ANTE
EL ESTRÉS OXIDATIVO. ANÁLISIS COMPARATIVO
ENTRE RECIÉN NACIDOS A TÉRMINO Y
PRETÉRMINOS**

Francisco Contreras Chova

Julio J. Ochoa Herrera

Antonio Bonillo Perales

Antonio Molina Carballo

José Uberos Fernández

Eduardo Carbona López

Manuel González-Ripoll Grazón

Eduardo De Arayo Nepomuceno

Antonio Muñoz Hoyos

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La gestación en general y el nacimiento en particular suponen un período crítico en la existencia. Por ello, el acortamiento del período de gestación de los seres vivos constituye, per se, una importante alteración en su desarrollo. La terminación precoz de una gestación puede ser contemplada, desde un punto de vista médico, como un proceso patológico en sí mismo, por cuanto que es causa de importantes enfermedades derivadas directa o indirectamente de la misma, como la hemorragia ventricular, la retinopatía de la prematuridad, enfermedad crónica pulmonar, etc.

De otra parte, en los últimos años estamos asistiendo al desarrollo de nuevas teorías que explican el mecanismo fisiopatológico de diversas enfermedades, basadas en el descubrimiento del daño que produce el estrés oxidativo por acumulación de radicales libres, y que desempeñan un importante papel en la génesis de muchas enfermedades en el período neonatal, sobre todo en recién nacidos prematuros. Aunque son diversos los estudios que han analizado estos procesos, describiendo un mayor grado de estrés oxidativo en los prematuros, la literatura médica publicada hasta el momento a este respecto adolece de los siguientes problemas: 1) La mayoría de los trabajos publicados se refieren a crías de animales de experimentación. 2) Son escasos los estudios que valoran los cambios en la presencia tanto de radicales libres como de mecanismos antioxidantes en el tiempo, centrándose habitualmente en determinaciones en cordón, y a las pocas horas de vida. 3) Habitualmente se trata de datos sobre prematuros afectados de una patología en concreto. 4) Los mecanismos antioxidantes estudiados suelen determinarse en diversos tejidos o en plasma, cuya composición y elementos pueden modificarse rápidamente por el tipo de alimentación, transferencia materna, etc.

Con estos antecedentes, nos planteamos como objetivos del trabajo que presentamos los que seguidamente se detallan:

1) Describir el patrón de respuesta normal del recién nacido a término ante un estrés oxidativo. 2) Analizar si en el recién nacido pretérmino con menos de 1500 gramos y con más de 1500 gramos la respuesta biológica ante el estrés oxidativo difiere o no del recién nacido a término. 3) Valorar si las consecuencias fisiopatológicas de un distrés respiratorio agudo en algunos de los grupos de pacientes citados con anterioridad, así como determinados elementos concomitantes (tipo de parto, puntuación de Apgar al nacimiento, oxigenoterapia, etc) son capaces de modificar la respuesta al estrés oxidativo que a priori se conoce. 4) Finalmente, se pretende estudiar si la incapacidad de algunos de estos grupos de recién nacidos para neutralizar el daño producido por los radicales libres puede tener en la fase aguda consecuencias graves y determinantes o no.

INTRODUCCIÓN

Radicales libres

Los radicales libres se definen como cualquier sustancia (molécula o átomo) capaz de una existencia independiente, que contiene uno ó más electrones no apareados en su última órbita electrónica. Su situación energética es, por tanto, muy inestable, por lo que son altamente reactivos y de vida media corta. Su presencia genera una cadena de reacciones de transferencia de electrones con las moléculas vecinas, que a su vez se convierten en radicales libres.

La interrelación de los radicales libres con las moléculas de su entorno produce un daño denominado estrés oxidativo (que no es sino el exceso de radicales libres),

implicado en la patogénesis de una gran variedad de procesos patológicos en el ser humano. Se consideran cuatro sistemas celulares básicos como elementos diana del daño producido por los radicales libres: la respiración aeróbica, la síntesis de proteínas, la membrana celular y el ADN de la célula. En biología humana el estrés oxidativo procede de variadas fuentes, por lo que los radicales libres no sólo se generan por la producción a partir de oxígeno, sino que existen otras moléculas que los producen, procediendo generalmente de cadenas metabólicas. En muchos casos, no obstante, los radicales libres cumplen una función fisiológica predeterminada en los seres vivos. Se puede concluir, por tanto, que los radicales libres, por su capacidad de fijación a todo tipo de moléculas, están implicados en una gran variedad de procesos, tanto fisiológicos como patológicos.

Para mantener el equilibrio entre la presencia de radicales libres en los procesos fisiológicos y su exceso patológico los organismos poseen los denominados *sistemas antioxidantes*, cuya función es el mantenimiento del citado equilibrio (*balance oxidativo*). Los antioxidantes son compuestos con capacidad de inhibir significativamente, a concentraciones relativamente bajas, la tasa de oxidación. Cada antioxidante ejerce su función en un locus concreto. El equilibrio entre sistemas de daño celular y sistemas de prevención o reparación de dicho daño se puede ver alterado en determinadas enfermedades y situaciones patológicas.

Mecanismos antioxidantes

Los seres vivos disponen, como ya ha sido expuesto con anterioridad, de unos complejos sistemas que tienen como misión la minimización del daño producido por el estrés oxidativo, con el objetivo fundamental de mantener el llamado “equilibrio oxidativo”. Los mecanismos antioxidantes conforman un complejo primario de defensa,

compuesto fundamentalmente por la catalasa, la superóxido dismutasa, y las enzimas del ciclo redox del glutatión (GPX, GR, G6PDH) y un complejo secundario, en el que se integran sustancias de diversas características morfoquímicas tanto enzimáticas como no enzimáticas (vitaminas E, C, melatonina, bilirrubina, etc). Ambos sistemas tienen como misión la retirada de las especies reactivas del oxígeno y otros hidroperóxidos generados durante el metabolismo normal y durante determinadas situaciones patológicas.

Radicales libres y patología pediátrica

En la edad pediátrica cada vez son más los hallazgos significativos en los que se implica al estrés oxidativo como fuente de daño en mayor o menor grado. No obstante, los neonatos a término sanos cuentan con mecanismos de protección más adecuados frente a los efectos de los radicales oxigenados libres que los adultos o los prematuros, debido a un mayor nivel, fundamentalmente a nivel plasmático, de antioxidantes, como la bilirrubina, y a un menor contenido en lípidos oxidables. Los recién nacidos pretérmino deben soportar un grado de estrés oxidativo mayor que los nacidos a término, y con un sistema antioxidante, como ya se ha citado, inmaduro aún.

Esta mayor exposición del prematuro a la acción de los radicales libres derivados del oxígeno motiva una participación de éstos en procesos como la broncodisplasia pulmonar, la retinopatía de la prematuridad, el daño hepatocelular o la fibroplasia retrolental, así como en la hemorragia intraventricular de los pretérminos, la enterocolitis necrotizante o la encefalopatía hipóxico-isquémica, entre otras. No obstante, el concepto de la falta de preparación del prematuro para combatir el estrés oxidativo se basa fundamentalmente en la experimentación con animales. En seres humanos pretérminos sin embargo, aún son escasos los estudios que relacionen

directamente el desarrollo ontogénico y la expresión de las enzimas antioxidantes en los distintos tejidos.

MATERIAL

Para desarrollar el presente trabajo fue seleccionado un material humano compuesto por un total de 147 recién nacidos, los cuáles, para dar cumplimiento a los objetivos propuestos fueron clasificados de acuerdo a los siguientes criterios:

1) Grupo Control (GC). Compuesto por una parte importante de las muestras, 63/147 (42,85%), todas ellas clasificadas como recién nacidos sanos, con un peso al nacimiento adecuado a la edad gestacional. No recogiendo en su historia, tanto en la etapa gestacional como en el parto y el período neonatal inmediato, ninguna incidencia de interés clínico.).

2) Grupo A (GA). Integrado por 57/147 (38,7%) recién nacidos, con un peso al nacimiento inferior a los 1500 gramos, con un total de 19 nacidos mediante parto eutócico y 38 nacidos mediante cesárea.

3) Grupo B (GB). Constituido por 27/147 (18,36%) neonatos, cuyo peso al nacimiento mayor de 1500 gramos y menor de 2500 gramos, con un total de 7 nacidos mediante parto eutócico y 20 nacidos mediante cesárea.

Las características de los recién nacidos incluidos en los grupos A y B se recogen de forma resumida en la (Tabla I). De cada recién nacido se obtienen los siguientes datos: edad gestacional, sexo, tipo de parto, Apgar al minuto y los 5 minutos, somatometría al nacimiento (peso, talla, perímetro cefálico).

Una vez clasificados los pacientes en los tres grupos descritos con anterioridad, se procedió a diseñar una estrategia de estudio de acuerdo al esquema recogido en la (Figura 1). En el diseño experimental, como puede comprobarse, se incluyeron los

aspectos siguientes: A) Identificación de cada grupo. B) Momentos en los que se obtuvieron las muestras; 1) cordón umbilical; 2) a las 3 horas de vida; 3) a las 72 horas de vida y 4) a la semana de vida. C) Identificación y medición cada variable y el grupo al que pertenece; 1) variables perinatales 2) variables incluidas dentro del concepto de estrés oxidativo.

Tabla I. Datos somatométricos medios en recién nacidos de los grupos A y B

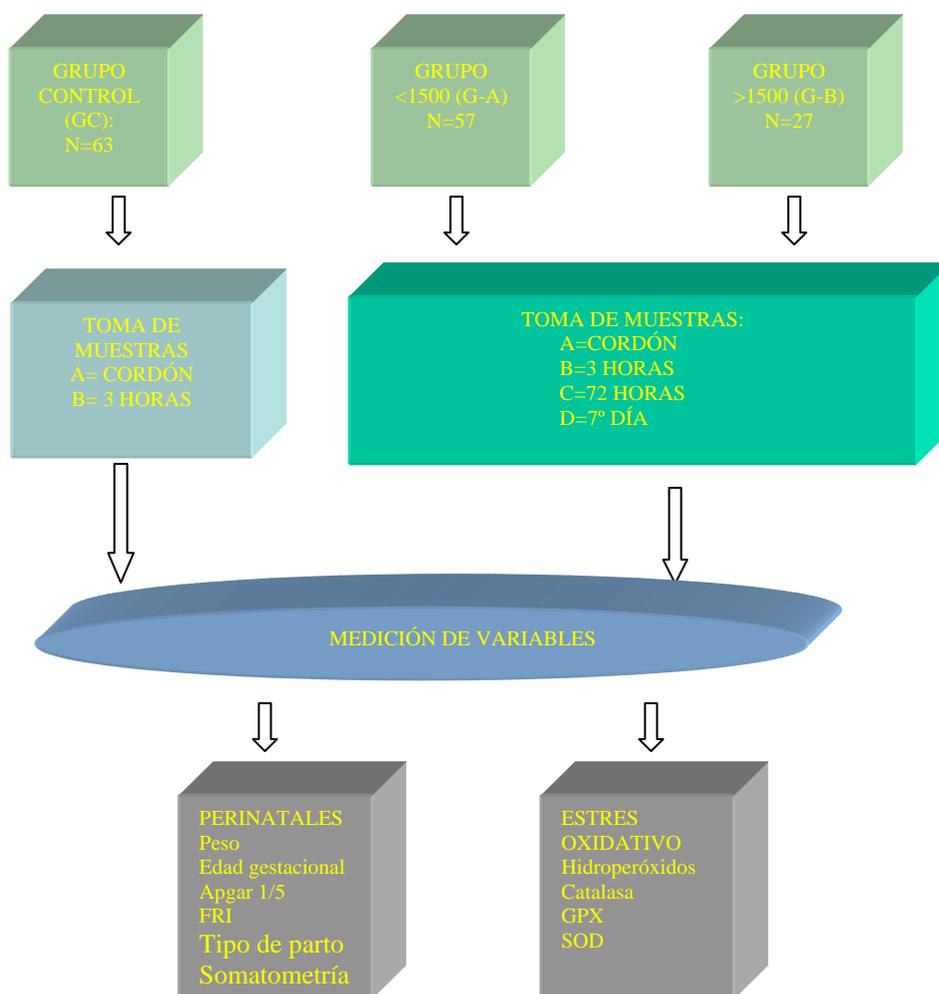
| | <1500 gramos Media (DS) | >1500 gramos Media (DS) |
|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Peso | 1052 (244) | 1904 (261) |
| Talla | 37,08 (3,27) | 42,21 (3,21) |
| P. cefálico | 26,23 (2,38) | 30,78 (1,34) |
| Edad gestacional | 29,24 (2,49) | 33 (2,77) |
| Apgar 1 | 5,84 (2,64) | 4,14 (2,62) |
| Apgar 5 | 8,16 (1,79) | 6,85 (2,41) |

MÉTODOS

1. Método clínico

La asistencia y el cuidado de los recién nacidos, tanto recién los nacidos normales (GC), como en los recién nacidos patológicos (GA) y (GB), fueron realizadas según las normas estandarizadas de cuidados y reanimación neonatal utilizadas en nuestra Unidad Neonatal, así como en las recomendaciones asistenciales del Pediatric Working Group of the International Liaison Committee on Resuscitation, revisadas en las guías de 2000.

Figura 1. Diseño experimental del estudio



2. Método analítico

En cada paciente se procedió como se describe: 1) Obtención de muestras sanguíneas en los momentos previamente definidos en el diseño experimental (T_0 = muestras procedentes del cordón umbilical) (T_1 = muestras obtenidas de sangre periférica a las tres horas de vida) (T_2 = muestras obtenidas de sangre periférica a las 72 horas de vida) (T_3 = muestras periféricas obtenidas de sangre periférica a la semana de vida). 2) Determinaciones analíticas de acuerdo a las variables definidas con anterioridad, según la metodología que se describe:

Preparación de las muestras: De cada paciente se extraen 2 ml de sangre en los momentos descritos anteriormente, depositando cada muestra en tubos con EDTA, manteniendo la temperatura estable a 4°C. Posteriormente se centrifugan a 2500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4-8°C, en centrífuga modelo Beckman GS-6R. El plasma obtenido se congela a -80° en tubos eppendorf hasta el procesamiento analítico del mismo. **Obtención de membranas de eritrocito:** Se basa en el método descrito y publicado por Hanahan y Ekholm, con ligeras modificaciones. **Hidroperóxidos en membrana:** La determinación de hidroperóxidos a nivel de membrana se realiza siguiendo el método modificado de Jiang GY et al. **Determinación de la actividad catalasa:** Se sigue el método descrito por Aebi, basado en la lectura mediante espectrofotometría de la actividad catalasa. **Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD):** El método para la determinación de la actividad SOD se basa en la inhibición producida por la SOD sobre la reducción citocromo c. Para ello se utiliza la técnica de Fridovich, con algunas modificaciones. **Determinación de la actividad glutathion peroxidasa (GPX):** Para la determinación de la actividad de la GPX se procede según la técnica descrita por Flohe en 1984.

3. Método estadístico

3.1 Estadística descriptiva

A continuación se expondrán los resultados del análisis estadístico descriptivo realizado, mediante figuras y tablas, que explicitan los siguientes elementos estadísticos: *Medidas de tendencia central:* Para el estudio de los datos recogidos en la presente experiencia, se consideró necesario reflejar la media aritmética muestral de las distintas variables. *Medidas de dispersión:* Para el presente estudio se emplearon: rango, varianza, desviación típico o estándar (D.S.) *Medidas de forma:* Asimetría y curtosis.

3.2 Inferencia estadística

En el presente estudio se sometió a las variables objetivo de la investigación a un test de normalidad de variables (test de Kolmogorov-Smirnov). Posteriormente, aquellas variables cuya distribución fue *no normal* fueron procesadas mediante la aplicación del logaritmo neperiano a cada uno de sus valores con objeto de obtener distribuciones normales, sobre las que aplicar los tests referidos a continuación, cuya finalidad básica, en el contexto de la inferencia estadística, es la obtención de posibles conclusiones acerca de una población a través de la información que proporciona una muestra determinada de la misma. Los tests de inferencia estadística empleados fueron los siguientes: Test de la T de Student o test de comparación de medias independientes, análisis de la varianza (ANOVA), y estudios de correlación y regresión entre variables.

RESULTADOS

A continuación se procede a la presentación de los principales resultados obtenidos en el presente estudio, que serán subdivididos, para una mejor estructuración de los mismos, en dos grandes apartados: el primero comprende todos los datos obtenidos mediante el análisis *estadístico descriptivo* de las diferentes variables del estudio, en tanto que el segundo apartado resume la *inferencia estadística* realizada sobre los principales ítems del presente trabajo.

1. Estadística descriptiva

Ya descrita en el capítulo anterior, mediante la exposición de los datos fundamentales descriptivos de las diversas variables del estudio se pretende describir y analizar una serie de parámetros, sin entrar aún en la inferencia o el establecimiento de conclusiones acerca de los mismos. En este sentido, en el presente apartado recopilaremos, como *medidas de centralización*, la media; se señalan así mismo los valores mínimo y máximo para cada variable en cada uno de los grupos de estudio.

Valoración de la respuesta neonatal ante el estrés oxidativo

Como *medidas de dispersión* se emplean y citan el rango, la desviación típica (D.S.), y la varianza. Finalmente, como *medidas de forma* se citan la asimetría y la curtosis. Las siguientes tablas (Tablas II-XVIII) describen los datos reseñados anteriormente, referidos a los parámetros de estudio fundamentales de la presente investigación.

Tabla II. Estadística descriptiva de la variable hidroperóxidos de membrana (ng/ml) en recién nacidos sanos en cordón umbilical y al ingreso en la Unidad Neonatal.

| | Cordón | Ingreso |
|-------------------|---------------|----------------|
| Media (DS) | 24,944(4,309) | 22,791(3,689) |
| Varianza | 18,570 | 13,616 |
| Mínimo | 15,069 | 14,320 |
| Máximo | 39,627 | 29,023 |
| Rango | 24,558 | 9,704 |
| Asimetría | 0,516 | -0,404 |
| Curtosis | 1,475 | 0,183 |

Tabla III. Estadística descriptiva de la variable hidroperóxidos de membrana (ng/ml) en recién nacidos de peso <1500 gramos al ingreso, 3^{er} día, 7^o día y cordón.

| | Ingreso | 3^{er} día | 7^o día | Cordón |
|-------------------|----------------|---------------------------|--------------------------|---------------|
| Media (DS) | 27,75(8,77) | 25,2(4,97) | 26,63(4,87) | 27,74(6,78) |
| Varianza | 76,98 | 24,77 | 23,8 | 47,31 |
| Mínimo | 10,79 | 15,06 | 14,83 | 15,6 |
| Máximo | 61,95 | 37,6 | 34,23 | 38,51 |
| Rango | 51,16 | 22,53 | 19,39 | 22,90 |
| Asimetría | -0,33 | 1,59 | 0,11 | 0,27 |
| Curtosis | -0,61 | 6,18 | -0,09 | -0,46 |

Tabla IV. Estadística descriptiva de la variable hidroperóxidos de membrana (nmol/mg) en >1500 gramos al ingreso, 3^{er} día, 7^o día y cordón.

| | Ingreso | 3^{er} día | 7^o día | Cordón |
|-------------------|----------------|---------------------------|--------------------------|---------------|
| Media (DS) | 29,673(5,041) | 27,834(3,104) | 26,381(4,081) | 31,742(6,517) |
| Varianza | 26,208 | 10,323 | 17,585 | 44,598 |
| Mínimo | 20,465 | 24,046 | 19,186 | 22,255 |
| Máximo | 37,209 | 33,116 | 33,674 | 43,907 |
| Rango | 16,744 | 9,069 | 14,488 | 21,651 |
| Asimetría | -0,218 | 0,615 | 0,053 | 0,226 |
| Curtosis | -1,049 | -1,040 | -0,037 | -0,431 |

Tabla V. Estadística descriptiva de la variable catalasa en recién nacidos sanos en cordón umbilical y al ingreso.

| | Cordón | Ingreso |
|-------------------|---------------|----------------|
| Media (DS) | 0,308(0,173) | 0,301(0,059) |
| Varianza | 0,030 | 0,040 |
| Mínimo | 0,149 | 0,183 |
| Máximo | 0,944 | 0,403 |
| Rango | 0,794 | 0,220 |
| Asimetría | 1,950 | 0,327 |
| Curtosis | 3,749 | -0,660 |

Tabla VI. Estadística descriptiva de la variable catalasa en recién nacidos de peso <1500 gramos al ingreso, 3^{er} día, 7^o día y cordón.

| | Ingreso | 3^{er} día | 7^o día | Cordón |
|-------------------|----------------|---------------------------|--------------------------|---------------|
| Media (DS) | 0,276 (0,133) | 0,252(0,097) | 0,278(0,151) | 0,258(0,101) |
| Varianza | 0,018 | 0,01 | 0,023 | 0,01 |
| Mínimo | 0,19 | 0,12 | 0,12 | 0,10 |
| Máximo | 0,71 | 0,51 | 0,92 | 0,47 |
| Rango | 0,69 | 0,38 | 0,80 | 0,37 |
| Asimetría | 1,41 | 1,02 | 3,01 | 0,72 |
| Curtosis | 3,60 | 0,45 | 11,931 | -0,207 |

Tabla VII. Estadística descriptiva de la variable en recién nacidos de peso catalasa en >1500 gramos al ingreso, 3^{er} día, 7^o día y cordón.

| | Ingreso | 3^{er} día | 7^o día | Cordón |
|-------------------|----------------|---------------------------|--------------------------|---------------|
| Media (DS) | 0,261(0,089) | 0,246(0,039) | 0,243(0,049) | 0,197(0,039) |
| Varianza | -0,008 | 0,002 | 0,002 | 0,002 |
| Mínimo | 0,159 | 0,171 | 0,174 | 0,132 |
| Máximo | 0,509 | 0,287 | 0,326 | 0,266 |
| Rango | 0,350 | 0,116 | 0,152 | 0,133 |
| Asimetría | 1,514 | -0,987 | 0,173 | 0,155 |
| Curtosis | 2,750 | 0,606 | -0,741 | -0,452 |

Tabla VIII. Estadística descriptiva de la variable superóxido dismutasa (SOD) en recién nacidos sanos en cordón umbilical y al ingreso.

| | Cordón | Ingreso |
|-------------------|----------------|----------------|
| Media (DS) | 97,508(69,581) | 85,789(31,288) |
| Varianza | 4841,631 | 978,976 |
| Mínimo | 31,356 | 39,572 |
| Máximo | 352,459 | 170,48 |
| Rango | 321,103 | 883,187 |
| Asimetría | 1,999 | 0,569 |
| Curtosis | 4,541 | 0,997 |

Valoración de la respuesta neonatal ante el estrés oxidativo

Tabla IX. Estadística descriptiva de la variable superóxido dismutasa (U/mg) en recién nacidos de peso <1500 gramos al ingreso, 3^{er} día, 7^o día y cordón.

| | Ingreso | 3 ^{er} día | 7 ^o día | Cordón |
|-------------------|--------------|---------------------|--------------------|---------------|
| Media (DS) | 61,61(26,50) | 72,91(24,96) | 93,86(45,378) | 70,458(33,52) |
| Varianza | 702,69 | 623,24 | 2059,24 | 1124,06 |
| Mínimo | 14,91 | 18,31 | 38,57 | 17,90 |
| Máximo | 138,63 | 142,51 | 213,31 | 122,56 |
| Rango | 123,72 | 124,203 | 174,74 | 104,65 |
| Asimetría | 0,882 | 0,45 | 1,105 | 0,285 |
| Curtosis | 1,852 | 0,85 | 0,797 | -1,377 |

Tabla X. Estadística descriptiva de la variable superóxido dismutasa (U/mg) en recién nacidos de peso >1500 gramos al ingreso, 3^{er} día, 7^o día y cordón.

| | Ingreso | 3 ^{er} día | 7 ^o día | Cordón |
|-------------------|----------------|---------------------|--------------------|----------------|
| Media (DS) | 68,314(24,334) | 77,443(9,519) | 120,269(38,48) | 47,031(16,824) |
| Varianza | 592,177 | 90,614 | 1481,014 | 283,047 |
| Mínimo | 32,896 | 59,134 | 74,745 | 28,006 |
| Máximo | 114,659 | 90,003 | 209,323 | 84,527 |
| Rango | 81,763 | 30,868 | 134,577 | 56,520 |
| Asimetría | 0,316 | -0,833 | 1,366 | 1,144 |
| Curtosis | -0,706 | 1,032 | 1,980 | 1,237 |

Tabla XI. Estadística descriptiva de la variable glutatión peroxidasa (GPX) en recién nacidos sanos en cordón umbilical y al ingreso.

| | Cordón | Ingreso |
|-------------------|----------------|----------------|
| Media (DS) | 48,187(19,533) | 37,537(12,293) |
| Varianza | 381,547 | 151,125 |
| Mínimo | 9,432 | 7,700 |
| Máximo | 142,450 | 63,525 |
| Rango | 133,018 | 151,125 |
| Asimetría | 2,070 | -0,039 |
| Curtosis | 9,837 | 0,509 |

Tabla XII. Estadística descriptiva de la variable glutatión peroxidasa (U/mg) en recién nacidos de peso <1500 gramos al ingreso, 3^{er} día, 7^o día y cordón.

| | Ingreso | 3 ^{er} día | 7 ^o día | Cordón |
|-------------------|----------------|---------------------|--------------------|----------------|
| Media (DS) | 48,595(29,738) | 52,24(25,907) | 48,468(21,088) | 76,920(45,083) |
| Varianza | 884,351 | 671,210 | 444,724 | 2032,501 |
| Mínimo | 6,756 | 9,933 | 19,943 | 31,435 |
| Máximo | 159,967 | 155,347 | 117,636 | 181,027 |
| Rango | 153,210 | 145,414 | 97,693 | 149,591 |
| Asimetría | 0,882 | 1,803 | 1,235 | 1,065 |
| Curtosis | 1,852 | 5,614 | 2,553 | 0,253 |

Valoración de la respuesta neonatal ante el estrés oxidativo

Tabla XIII. Estadística descriptiva de la variable glutation peroxidasa (U/mg) en recién nacidos de peso >1500 gramos al ingreso, 3^{er} día, 7^o día y cordón.

| | Ingreso | 3 ^{er} día | 7 ^o día | Cordón |
|-------------------|----------------|---------------------|--------------------|----------------|
| Media (DS) | 40,274(23,716) | 48,358(37,265) | 42,012(23,757) | 53,607(16,043) |
| Varianza | 562,494 | 1388,698 | 564,407 | 257,408 |
| Mínimo | 7,103 | 24,486 | 17,248 | 33,456 |
| Máximo | 94,825 | 138,099 | 105,374 | 84,507 |
| Rango | 87,722 | 113,613 | 88,126 | 51,051 |
| Asimetría | 1,057 | 2,535 | 2,123 | 0,781 |
| Curtosis | 1,277 | 6,762 | 5,447 | -0,104 |

Tabla XIV. Estadística descriptiva de la variable peso al nacimiento en los tres grupos de estudio

| | Recién nacidos sanos | <1500 gramos | >1500 gramos |
|-------------------|----------------------|--------------|--------------|
| Media (DS) | 2734(547) | 1052(244) | 1904(261) |
| Varianza | 300078 | 59675 | 68240 |
| Mínimo | 2000 | 400 | 1620 |
| Máximo | 3750 | 1500 | 2500 |
| Rango | 1750 | 1160 | 755 |
| Asimetría | 0,310 | -0,104 | 0,941 |
| Curtosis | -0,897 | -0,516 | -0,001 |

Tabla XV. Estadística descriptiva de la variable edad gestacional en los tres grupos de estudio.

| | Recién nacidos sanos | <1500 gramos | >1500 gramos |
|-------------------|----------------------|--------------|--------------|
| Media (DS) | 37,18(1,599) | 28,81(2,53) | 33,00(2,77) |
| Varianza | 2,599 | 6,42 | 7,71 |
| Mínimo | 35 | 24 | 28 |
| Máximo | 40 | 33 | 36 |
| Rango | 5 | 9 | 8 |
| Asimetría | -0,057 | -0,321 | -0,960 |
| Curtosis | -1,197 | -0,582 | -0,164 |

Tabla XVI. Estadística descriptiva de las variables Apgar 1/ Apgar 5 en recién nacidos <1500g y >1500 gramos al ingreso.

| | Apgar 1 | | Apgar 5 | |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | <1500 gramos | >1500 gramos | <1500 gramos | >1500 gramos |
| Media (DS) | 5,84(2,64) | 4,14(2,62) | 8,16(1,79) | 6,85(2,41) |
| Varianza | 6,973 | 6,901 | 3,223 | 5,824 |
| Mínimo | 1 | 0 | 4 | 3 |
| Máximo | 10 | 9 | 10 | 10 |
| Rango | 9 | 9 | 6 | 7 |
| Asimetría | -0,019 | 0,293 | -0,683 | 0,041 |
| Curtosis | -1,177 | -0,765 | -0,252 | -1,422 |

Tabla XVII. Estadística descriptiva de la variable pH en <1500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

| | Ingreso | 3 ^{er} día | 7 ^o día |
|-------------------|------------|---------------------|--------------------|
| Media (DS) | 7,32(0,12) | 7,37(0,05) | 7,37(0,05) |
| Varianza | ,01 | ,00 | ,00 |
| Mínimo | 7,05 | 7,31 | 7,29 |
| Máximo | 7,55 | 7,50 | 7,45 |
| Rango | ,64 | ,40 | ,17 |
| Asimetría | -,34 | 1,19 | -,41 |
| Curtosis | ,39 | ,62 | -,51 |

Tabla XVIII. Estadística descriptiva de la variable pH en >1500 g al ingreso, 3^{er} y 7^o día.

| | Ingreso | 3 ^{er} día | 7 ^o día |
|------------|------------|---------------------|--------------------|
| Media (DS) | 7,28(0,14) | 7,31(0,09) | 7,35(0,05) |
| Varianza | 0,02 | 0,01 | 0,00 |
| Mínimo | 6,91 | 7,10 | 7,30 |
| Máximo | 7,48 | 7,46 | 7,46 |
| Rango | 0,57 | 0,36 | 0,16 |
| Asimetría | -1,10 | -0,80 | 1,29 |
| Curtosis | 1,52 | 1,48 | 1,95 |

2. Inferencia estadística

A continuación se presentan los resultados correspondientes a cada grupo de variables en las distintas operaciones efectuadas:

2.1 Análisis comparativo entre los distintos grupos

a) Análisis de la varianza

El objetivo de este método es la puesta de manifiesto, si las hubiere, de diferencias en el estrés oxidativo y los mecanismos antioxidantes enzimáticos analizados en los distintos grupos y en los cuatro momentos del estudio. Con el objetivo de una mayor practicidad y más fácil comprensión de los datos de las variables, se reflejan los resultados en las (Figuras 2-21), sobre los que se resaltan aquellas comparaciones estadísticamente significativas de la siguiente manera: *= $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. En el pie de cada una de las figuras se describen más detalladamente tanto la evolución de los datos como los valores de p correspondientes al análisis estadístico.

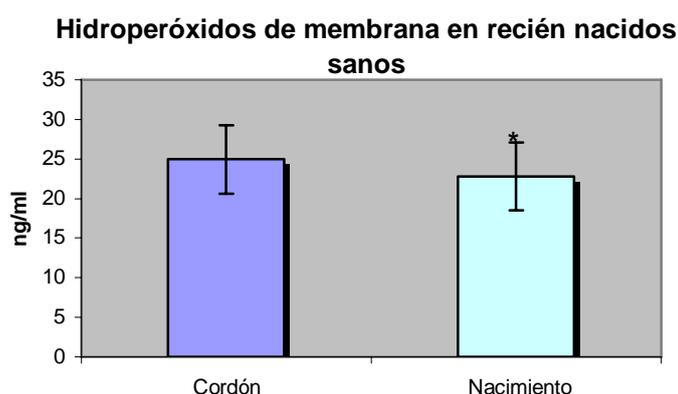


Figura 2. En recién nacidos sanos (grupo control), se aprecia un mayor nivel hidroperóxidos en cordón que a las 3 horas de vida. Al aplicar el test T de Student para muestras dependientes, se concluye que dicha diferencia es estadísticamente significativa, con un valor de $p < 0,05$.

Hidroperóxidos de membrana: comparación entre sanos, <1500 y >1500 en cordón

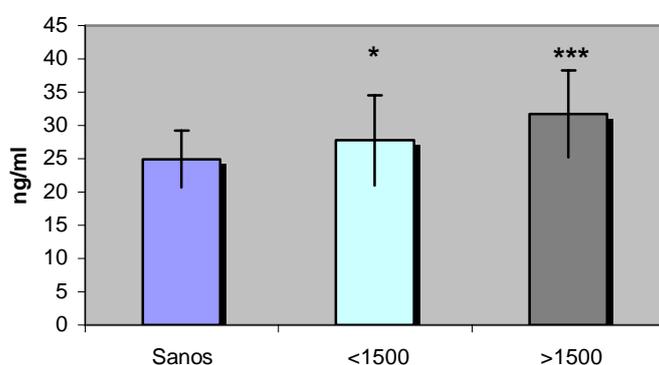


Figura 3. El análisis de la varianza realizado entre las medias de hidroperóxidos de membrana en el grupo control, <1500 y >1500 gramos en cordón ofreció diferencias significativas entre el GC y el grupo de >1500 gramos ($p<0,001$), y entre el grupo de <1500 gramos frente al grupo >1500 gramos ($p<0,05$).

Hidroperóxidos de membrana: comparación entre controles, <1500 y >1500 al nacimiento (3h)

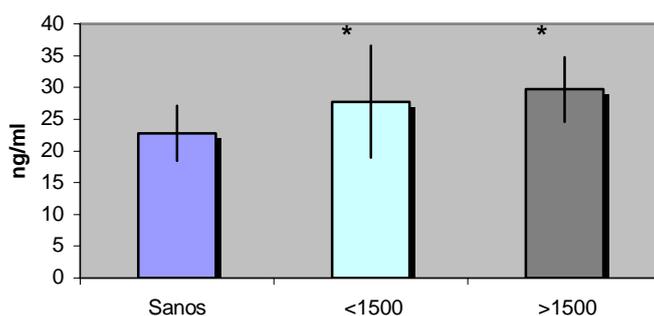


Figura 4. El análisis de la varianza de las medias de los valores de H₂O₂ a las 3 horas de vida entre los distintos grupos, ofreció diferencias significativas ($p=0,019$ y $p=0,001$ respectivamente) entre el grupo de recién nacidos sanos y los grupos de <1500 gramos y >1500 gramos.

Hidroperóxidos de membrana: evolución en <1500 gramos

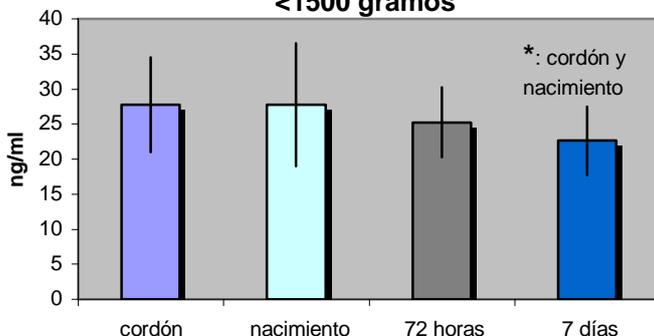


Figura 5. La evolución de los promedios de los valores de hidroperóxidos de membrana a lo largo del tiempo de estudio en <1500 gramos ofreció, al realizar el ANOVA, diferencias estadísticamente significativas entre los datos de cordón y a las 3 horas de vida con respecto del valor medio a los 7 días ($p<0,05$).

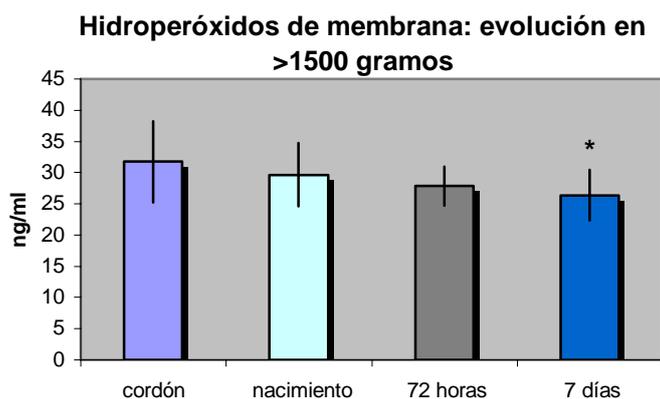


Figura 6. En >1500 gramos, el ANOVA sólo ofreció diferencias estadísticamente significativas entre los valores registrados en cordón y los obtenidos al 7º día ($p<0,05$).

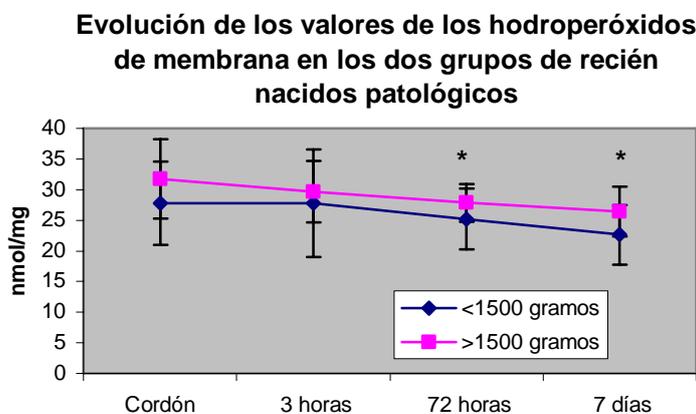


Figura 7. Los recién nacidos de <1500 gramos presentaron un nivel de hidropéroxidos de membrana inferior en todo momento al del grupo de recién nacidos de peso >1500 gramos. En ambos grupos se aprecia un descenso progresivo, más acusado en <1500 gramos, lo que motiva la existencia de diferencias estadísticamente significativas a las 72 horas y a los 7 días de vida ($p<0,05$).

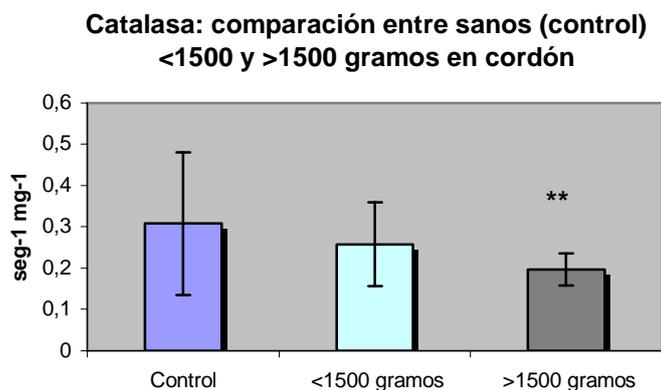


Figura 8. Al comparar la actividad catalasa de cordón en los tres grupos, se aprecia un menor promedio de las cifras en los grupos con recién nacidos enfermos con respecto al control; el ANOVA sólo mostró diferencias estadísticamente significativas entre >1500 gramos y el grupo control ($p=0,002$).

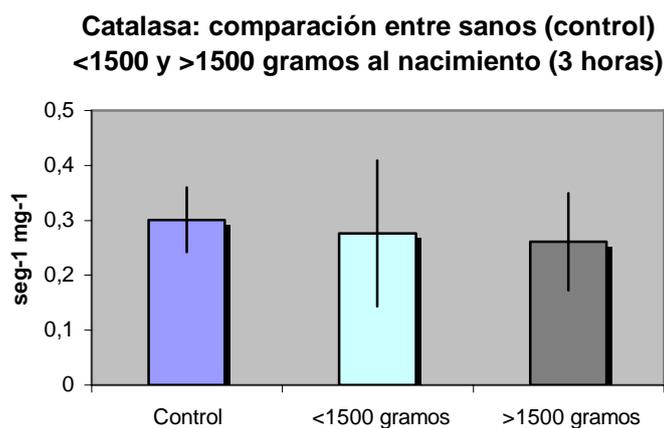


Figura 9. El ANOVA de los valores promedio de la actividad catalasa al nacimiento de los tres grupos de estudio no ofreció diferencias estadísticas significativas.

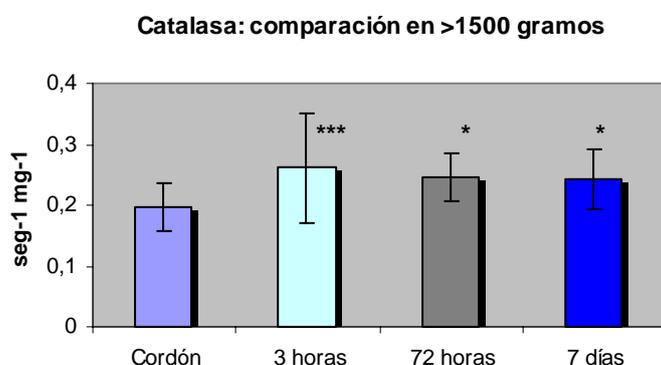


Figura 10. En >1500 gramos, el análisis de la varianza de la actividad catalasa a lo largo de los 7 primeros días de vida sí ofreció diferencias estadísticas significativas entre las muestras obtenidas en cordón umbilical y el resto de determinaciones, con un valor (p) como se describe: $p=0,001$, $p=0,026$, $p=0,041$ para las comparaciones hechas a las 3 h, 72 h y 7 días.

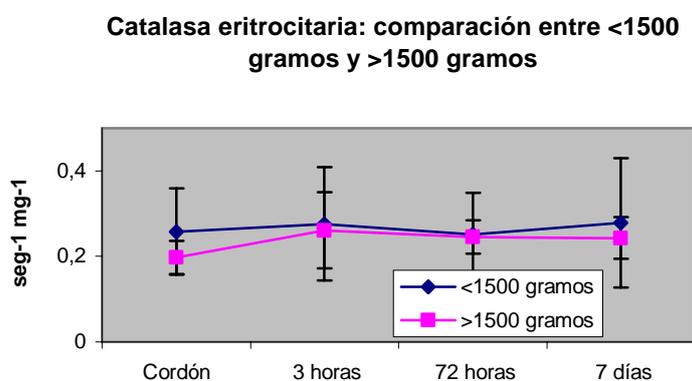


Figura 11. Al establecer la comparación entre la actividad de la catalasa en los grupos A y B (recién nacidos enfermos de peso al nacer <1500 gramos y >1500 gramos respectivamente) en los cuatro momentos de estudio, no se detectaron diferencias estadísticas significativas entre los mismos.

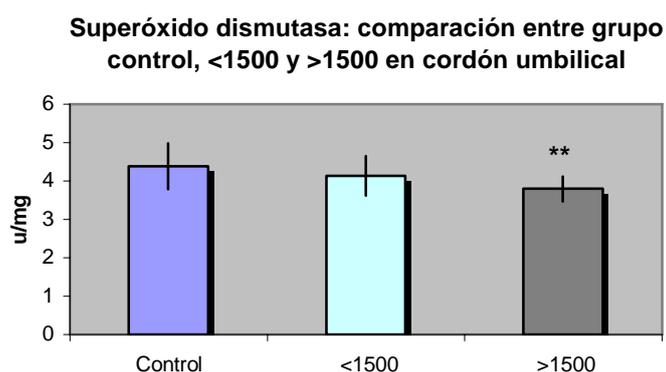


Figura 12. El análisis de la varianza de la SOD entre los tres grupos de estudio en muestras obtenidas en cordón umbilical ofreció diferencias estadísticamente significativas entre los valores del grupo control y el grupo de RN>1500 gramos ($p=0,002$).

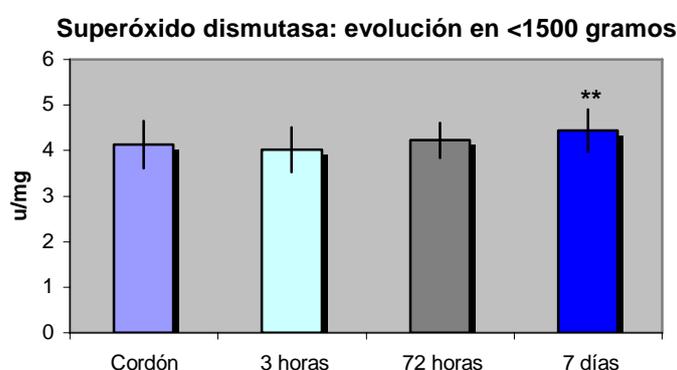


Figura 13. El análisis de la varianza (ANOVA) ofreció diferencias estadísticamente significativas entre la SOD al nacimiento y a los 7 días ($p<0,005$), siendo los valores medios correspondientes a cada uno de estos momentos, como se indica: cordón umbilical=4,132; 3 horas=4,019; 72 horas=4,224; 7 días= 4,437.

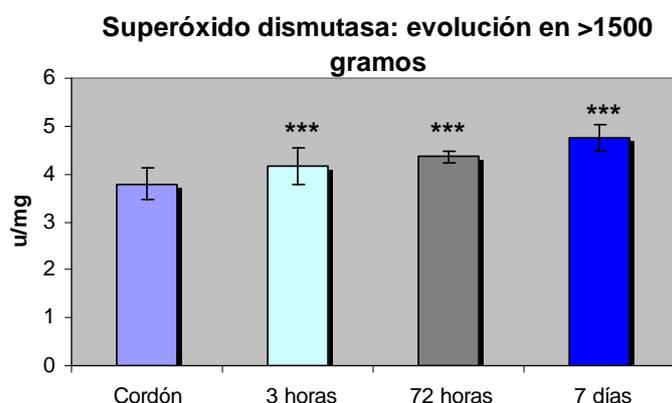


Figura 14. El análisis de la varianza (ANOVA) en >1500 gramos mostró diferencias estadísticamente significativas entre la determinación de cordón y las realizadas, respectivamente: 1) A las 3 horas ($p<0,001$); 2) A las 72 horas ($p<0,001$); 3) A los 7 días de vida ($p<0,001$). Así mismo, también encontramos diferencias significativas entre la toma realizada a las 3 horas y la realizada a los 7 días ($p<0,001$), y entre las tomas efectuadas a las 72 horas y a los 7 días ($p=0,002$).

Superóxido dismutasa: comparación entre <1500 gramos y >1500 gramos

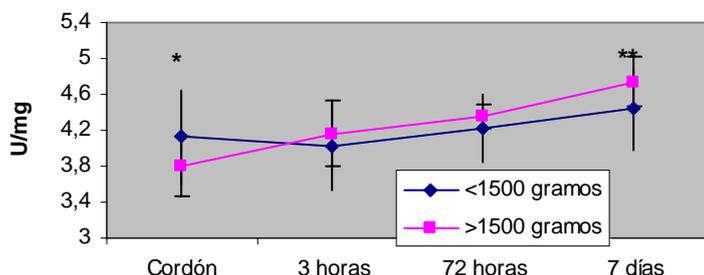


Figura 15. 1) En cordón, existe una diferencia estadísticamente significativa a favor del grupo <1500 gramos. 2) Sin embargo, en neonatos enfermos >1500 gramos se produce un progresivo y considerable aumento de los niveles SOD, que motiva que en el resto de determinaciones los niveles del grupo B sean superiores, y alcanzándose incluso el nivel de significación estadística a los 7 días.

Glutation peroxidasa en recién nacidos sanos

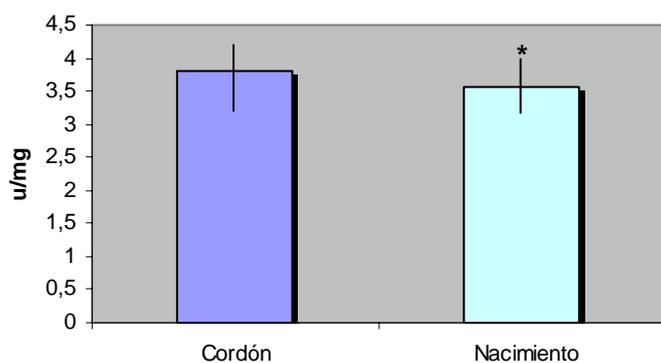


Figura 16. Al comparar la evolución de los valores de GPX en recién nacidos sanos se aprecia un descenso del promedio a las 3h respecto a los datos de cordón, con nivel de significación ($p < 0,05$).

Glutation peroxidasa: comparación entre grupo control, <1500 gramos y >1500 gramos en cordón

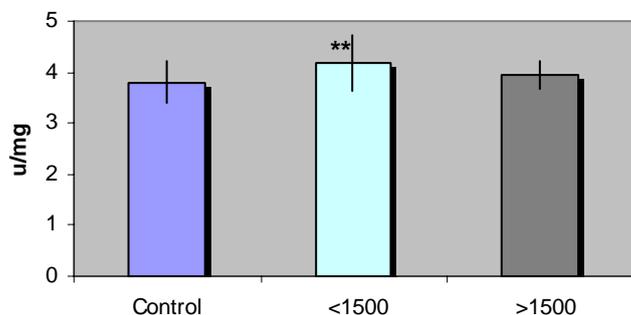


Figura 17. Al comparar los valores medios de la GPX en muestras de cordón umbilical de los tres grupos de estudio mediante la aplicación de un ANOVA, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los valores del grupo control y los RN con <1500 gramos con un valor de $p < 0,01$.

GPX: comparación entre grupo control , <1500 gramos y >1500 gramos al nacimiento (3h)

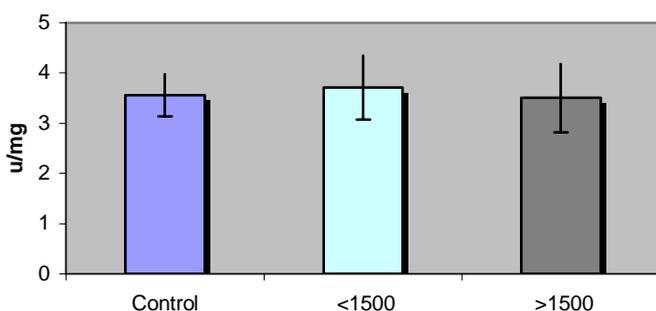


Figura 18. El ANOVA efectuado entre los valores medios al nacimiento de los tres grupos de recién nacidos que se estudiaron no ofreció diferencias estadísticamente significativas al ser sus valores medios y su correspondiente DS muy similares

Glutation peroxidasa: evolución en <1500 gramos

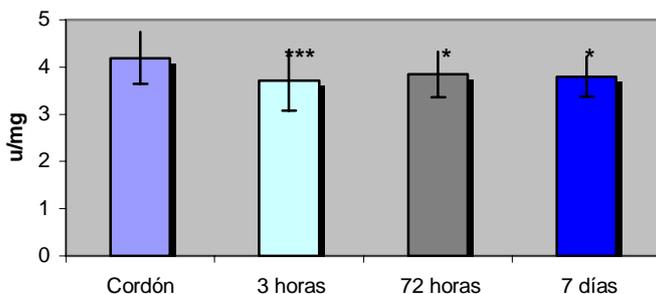


Figura 19. El ANOVA realizado entre las determinaciones efectuadas en RNPT de <1500 gramos ofreció diferencias significativas entre las determinaciones de GPX realizadas en muestras de cordón y las efectuadas posteriormente, en cada uno de los momentos descritos ($p<0,001$; $p<0,05$; $p<0,05$, respectivamente).

Glutation peroxidasa: evolución en >1500 gramos

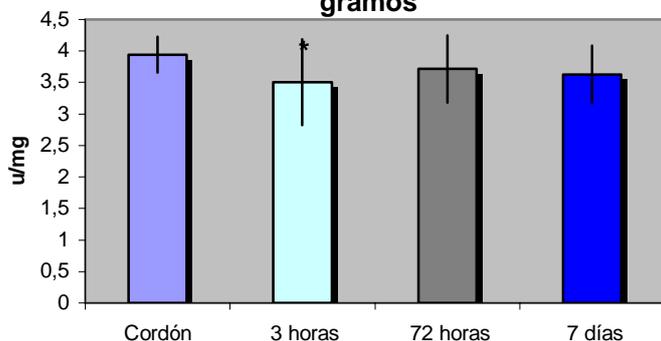


Figura 20. En el grupo de recién nacidos >1500 gramos, el análisis de la varianza sólo ofreció diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre los determinaciones realizadas en muestras de cordón umbilical, y las obtenidas a las 3 horas, mostrando la actividad de esta enzima unos valores medios para cada uno de los momentos como se describe (media y DS): Cordón=3,942+/-0,283; 3 horas= 3,506+/-0,683; 72 horas=3,713+/-0,531; 7 días=3,626+/-0,461.

Glutation peroxidasa: comparación entre <1500 gramos y >1500 gramos

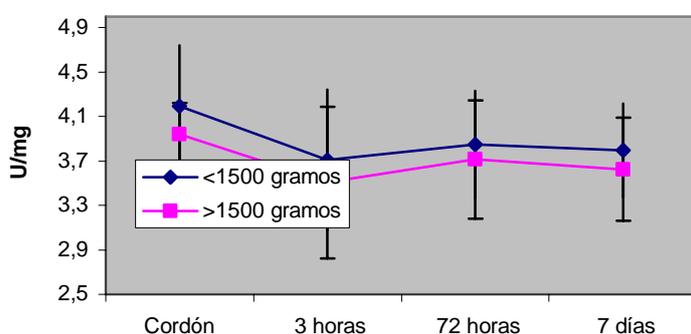


Figura 21. Se puede comprobar cómo la evolución de los niveles de GPX en <1500 gramos y >1500 gramos (grupos A y B) fueron similares y prácticamente paralelos, sin diferencias significativas entre los mismos, aunque sí es evidente un cierto paralelismo en las modificaciones que con el tiempo se producen en ambos grupos.

b) Análisis comparativo entre los grupos (test de la (t) de Student).

Las variables que hemos considerado de mayor interés han sido: sexo (varón/mujer), edad gestacional (RNT sanos frente a 25-30 semanas y 31-37 semanas), tipo de parto (eutócico/cesárea), Apgar 1 (0-5/6-10) Apgar 5 (0-5/6-10) en RNPT, cuyos datos fundamentales se recogen en las (Tablas XVIII-XLIV) y (Figuras 22-29).

Tabla XVIII. Variable hidroperóxidos.

| Sexo | Varón | | Mujer | | | |
|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|------|
| Hidroperóxidos | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | p |
| Cordón | 33,534 | 6,954 | 29,804 | 6,053 | 0,985 | N.S. |
| 3 horas | 28,566 | 7,584 | 27,206 | 4,672 | 0,624 | N.S. |
| 72 horas | 26,593 | 4,762 | 25,355 | 4,589 | 0,741 | N.S. |
| 7 días | 24,568 | 6,697 | 22,273 | 4,530 | 1,023 | N.S. |

Tabla XIX. Variable actividad de la catalasa.

| Sexo | Varón | | Mujer | | | |
|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|---------|
| Catalasa (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | p |
| Cordón | 1,525 | 0,385 | 1,713 | 0,147 | 1,033 | N.S. |
| 3 horas | 1,558 | 0,652 | 1,333 | 0,359 | -1,195 | N.S. |
| 72 horas | 1,344 | 0,379 | 1,624 | 0,260 | 2,382 | 0,024/* |
| 7 días | 1,391 | 0,299 | 1,472 | 0,319 | 0,665 | N.S. |

Valoración de la respuesta neonatal ante el estrés oxidativo

Tabla XX. Variable actividad de la SOD.

| Sexo | Varón | | Mujer | | t | p |
|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|---------|
| | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | | |
| SOD (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | p |
| Cordón | 3,952 | 0,459 | 3,996 | 0,437 | -0,172 | N.S. |
| 3 horas | 4,152 | 0,289 | 4,058 | 0,481 | 0,714 | N.S. |
| 72 horas | 4,392 | 0,272 | 4,056 | 0,457 | 2,541 | 0,017/* |
| 7 días | 4,494 | 0,438 | 4,464 | 0,458 | 0,179 | N.S. |

Tabla XI. Variable hidroperóxidos.

| Edad gestacional (I) | RNT | | Pretérminos | | t | p |
|-----------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|-----------|
| | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | | |
| Hidroperóxidos | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | p |
| Cordón | 24,944 | 4,309 | 29,213 | 6,969 | -3,037 | 0,004/** |
| 3 horas | 22,791 | 3,689 | 28,391 | 7,748 | -4,178 | 0,000/*** |

Tabla XXII. Variable actividad de la catalasa.

| Edad gestacional (I) | RNT | | Pretérminos | | t | p |
|----------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|---------|
| | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | | |
| Catalasa (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | p |
| Cordón | -1,288 | 0,449 | -1,508 | 0,346 | 2,417 | 0,018/* |
| 3 horas | -1,217 | 0,200 | -1,409 | 0,524 | 2,245 | 0,028/* |

Tabla XXIII. Variable actividad de la SOD.

| Edad gestacional (I) | RNT | | Pretérminos | | t | p |
|----------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|----------|
| | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | | |
| SOD (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | p |
| Cordón | 4,388 | 0,600 | 4,010 | 0,491 | 3,121 | 0,003/** |
| 3 horas | 4,384 | 0,385 | 4,069 | 0,455 | 3,090 | 0,003/** |

Tabla XXIV. Variable actividad de la GPX.

| Edad gestacional (I) | RNT | | Pretérminos | | t | p |
|----------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|----------|
| | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | | |
| GPX (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | p |
| Cordón | 3,798 | 0,413 | 4,097 | 0,483 | -2,813 | 0,007/** |
| 3 horas | 3,557 | 0,419 | 3,640 | 0,655 | -0,663 | N.S. |

Tabla XXVI. Variable hidroperóxidos.

| Edad gestacional (II) | 25-30s | | 31-37ss | | t | p |
|-----------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|------|
| | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | | |
| Hidroperóxidos | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | p |
| Cordón | 27,762 | 6,900 | 31,228 | 7,124 | -1,195 | N.S. |
| 3 horas | 27,367 | 4,942 | 29,377 | 9,799 | -0,872 | N.S. |
| 72 horas | 26,038 | 4,709 | 25,399 | 5,058 | 0,428 | N.S. |
| 7 días | 22,430 | 3,957 | 24,460 | 5,646 | -1,252 | N.S. |

Valoración de la respuesta neonatal ante el estrés oxidativo

Tabla XXVII. Variable actividad de la catalasa.

| Edad gestacional | 25-30s | | 31-37s | | | |
|------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|---------|
| (II) | | | | | | |
| Catalasa (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | p |
| Cordón | -1,370 | 0,321 | -1,744 | 0,291 | 2,783 | 0,011/* |
| 3 horas | -1,566 | 0,672 | -1,279 | 0,336 | -1,884 | N.S. |
| 72 horas | -1,478 | 0,389 | -1,388 | 0,273 | -0,846 | N.S. |
| 7 días | -1,496 | 0,324 | -1,259 | 0,391 | -0,201 | 0,05/* |

Tabla XXVIII. Variable hidroperóxidos.

| Tipo de parto | Eutócico | | Cesárea | | | |
|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|---------|
| Hidroperóxidos | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | p |
| Cordón | 23,232 | 4,947 | 32,966 | 5,405 | -4,352 | 0,000/* |
| 3 horas | 28,868 | 3,382 | 28,523 | 9,422 | 0,088 | N.S. |
| 72 horas | 26,096 | 2,072 | 25,754 | 4,954 | 0,283 | N.S. |
| 7 días | 22,973 | 3,728 | 23,343 | 5,674 | -0,172 | N.S. |

Tabla XXIX. Variable actividad de la catalasa.

| Tipo de parto | Eutócico | | Cesárea | | | |
|---------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|---------|
| Catalasa (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | -1,309 | 0,305 | -1,645 | 0,331 | 2,353 | 0011/* |
| 3 horas | -1,290 | 0,835 | -1,420 | 0,541 | 0,493 | 0,029/* |
| 72 horas | -1,539 | 0,457 | -1,404 | 0,355 | -0,801 | N.S. |
| 7 días | -1,389 | 0,574 | -1,380 | 0,331 | -0,052 | N.S. |

Tabla XXX. Variable actividad de la SOD.

| Tipo de parto | Eutócico | | Cesárea | | | |
|---------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|---------|
| SOD (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | 4,056 | 0,595 | 4,042 | 0,538 | 0,061 | N.S. |
| 3 horas | 3,421 | 0,554 | 4,133 | 0,388 | -3,837 | 0,000/* |
| 72 horas | 4,331 | 0,329 | 4,304 | 0,281 | 0,210 | N.S. |
| 7 días | 4,504 | 0,505 | 4,444 | 0,442 | 0,326 | N.S. |

Tabla XXXI. Variable hidroperóxidos.

| Apgar 1 | 0-5 | | 6-10 | | | |
|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|------|
| Hidroperóxidos | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | 29,520 | 8,080 | 28,476 | 4,999 | 0,331 | N.S. |
| 3 horas | 27,634 | 4,814 | 28,693 | 12,732 | -0,363 | N.S. |
| 72 horas | 25,896 | 4,001 | 24,844 | 5,633 | 0,621 | N.S. |
| 7 días | 23,332 | 4,530 | 22,926 | 6,637 | 0,203 | N.S. |

Valoración de la respuesta neonatal ante el estrés oxidativo

Tabla XXXII. Variable actividad de la catalasa.

| Apgar 1 | 0-5 | | 6-10 | | | |
|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|---------|
| Catalasa (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | -1,500 | 0,337 | -1,563 | 0,407 | 0,386 | N.S. |
| 3 horas | -1,424 | 0,391 | -1,227 | 0,298 | -1,618 | N.S. |
| 72 horas | -1,477 | 0,324 | -1,411 | 0,414 | -0,504 | N.S. |
| 7 días | -1,527 | 0,256 | -1,192 | 0,299 | -3,283 | 0,003/* |

Tabla XXXIII. Variable actividad de la SOD.

| Apgar 1 | 0-5 | | 6-10 | | | |
|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|------|
| SOD (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | 3,983 | 0,614 | 4,168 | 0,402 | -0,767 | N.S. |
| 3 horas | 4,061 | 0,456 | 4,060 | 0,446 | 0,004 | N.S. |
| 72 horas | 4,287 | 0,178 | 4,310 | 0,360 | -0,223 | N.S. |
| 7 días | 4,423 | 0,385 | 4,580 | 0,525 | -0,972 | N.S. |

Tabla XXXIV. Variable actividad de la GPX.

| Apgar 1 | 0-5 | | 6-10 | | | |
|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|---------|
| GPX (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | 4,022 | 0,469 | 4,063 | 0,570 | -0,186 | N.S. |
| 3 horas | 3,485 | 0,873 | 3,763 | 0,397 | -1,153 | N.S. |
| 72 horas | 3,886 | 0,319 | 3,871 | 0,705 | 0,082 | N.S. |
| 7 días | 3,599 | 0,341 | 3,980 | 0,437 | -2,744 | 0,010/* |

Tabla XXXV. Variable hidroperóxidos.

| Apgar 1 (2) | 0-5 | | Control (9-10) | | | |
|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|-----------|
| Hidroperóxidos | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | 29,520 | 8,080 | 24,944 | 4,309 | 10,594 | 0,005/* |
| 3 horas | 27,708 | 4,722 | 22,791 | 3,689 | 1,414 | 0,000/*** |

Tabla XXXVI. Variable actividad de la catalasa.

| Apgar 1 (2) | 0-5 | | Control (9-10) | | | |
|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|-------|
| Catalasa (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | -1,500 | 0,337 | -1,288 | 0,449 | 0,770 | N.S. |
| 3 horas | -1,217 | 0,200 | -1,413 | 0,386 | 2,845 | 0,032 |

Tabla XXXVII. Variable actividad de la SOD.

| Apgar 1 (2) | 0-5 | | Control (9-10) | | | |
|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|-------|
| SOD (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | 3,983 | 0,614 | 4,388 | 0,600 | 0,263 | 0,033 |
| 3 horas | 4,015 | 0,501 | 4,384 | 0,385 | 0,698 | 0,006 |

Valoración de la respuesta neonatal ante el estrés oxidativo

Tabla XXXVIII. Variable actividad de la GPX.

| Apgar 1 (2) | 0-5 | | Control (9-10) | | | |
|-------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|------|
| GPX (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | 4,022 | 0,469 | 3,798 | 0,413 | 1,092 | N.S. |
| 3 horas | 3,470 | 0,419 | 3,557 | 0,858 | 8,899 | N.S. |

Tabla XXXIX. Variable hidroperóxidos.

| Apgar 5 | 0-5 | | 6-10 | | | |
|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|---------|
| Hidroperóxidos | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | 31,953 | 7,096 | 28,569 | 7,093 | 0,867 | N.S. |
| 3 horas | 29,439 | 2,812 | 27,622 | 9,826 | 0,543 | N.S. |
| 72 horas | 28,093 | 2,505 | 24,902 | 4,981 | 1,928 | 0,014/* |
| 7 días | 23,796 | 4,247 | 23,106 | 5,644 | 0,294 | N.S. |

Tabla XL. Variable actividad de la GPX.

| Apgar 5 | 0-5 | | 6-10 | | | |
|----------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|---------|
| GPX (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | 3,721 | 0,201 | 4,107 | 0,517 | -1,446 | 0,029/* |
| 3 horas | 3,135 | 0,763 | 3,729 | 0,678 | -2,243 | 0,031/* |
| 72 horas | 3,879 | 0,294 | 3,879 | 0,567 | 0,000 | N.S. |
| 7 días | 3,668 | 0,304 | 3,763 | 0,439 | -0,416 | N.S. |

Tabla XLI. Variable hidroperóxidos.

| Apgar 5 (2) | 0-5 | | Control (9-10) | | | |
|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|-------|
| Hidroperóxidos | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | 31,953 | 7,096 | 24,944 | 4,309 | 2,207 | 0,004 |
| 3 horas | 29,076 | 2,668 | 22,791 | 3,689 | 1,228 | 0,000 |

Tabla XLII. Variable actividad de la catalasa.

| Apgar 5 (2) | 0-5 | | Control (9-10) | | | |
|---------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--------|-------|
| Catalasa (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | -1,697 | 0,122 | -1,288 | 0,449 | 2,483 | 0,004 |
| 3 horas | -1,473 | 0,559 | -1,217 | 0,200 | 11,175 | N.S. |

Tabla XLIII. Variable actividad de la SOD.

| Apgar 5 (2) | 0-5 | | Control (9-10) | | | |
|-------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|-------|
| SOD (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | 3,964 | 0,355 | 4,388 | 0,600 | 1,346 | N.S. |
| 3 horas | 4,384 | 0,385 | 3,885 | 0,470 | 0,154 | 0,007 |

Tabla XLIV. Variable actividad de la GPX.

| Apgar 5 (2) | 0-5 | | Control (9-10) | | | |
|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|------|
| GPX (ln) | X ₁ | DS ₁ | X ₂ | DS ₂ | t | P |
| Cordón | 3,721 | 0,413 | 3,798 | 0,201 | 0,560 | N.S. |
| 3 horas | 3,280 | 0,755 | 3,557 | 0,419 | 7,507 | N.S. |

Actividad de la catalasa en función de la edad gestacional

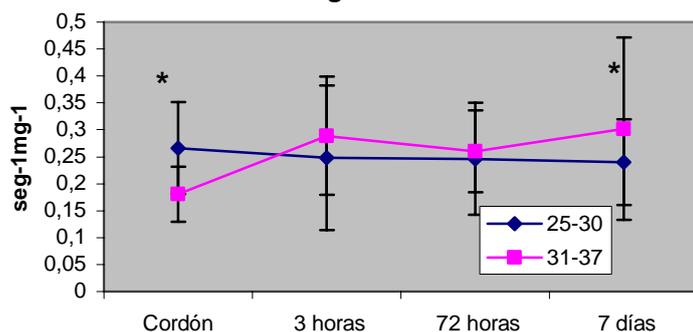


Figura 22: evolución de la actividad catalasa en recién nacidos enfermos en función de la edad gestacional. Como se puede observar, se parte inicialmente de situaciones muy distintas entre las distintas EG consideradas, ya que en cordón la actividad enzimática es mayor en el grupo de menor EG, para producirse una inversión de las situaciones posteriormente, llegándose a alcanzar a los 7 días incluso el nivel de significación estadística ($p < 0,05$).

Hidroperóxidos en función del tipo de parto

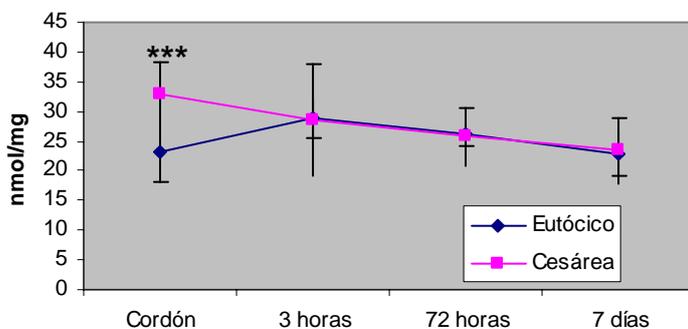


Figura 23. En función del tipo de parto, es evidente como a partir de las 3 horas de vida la presencia de hidroperóxidos se iguala en ambos grupos. Destacándose además en cordón umbilical un nivel significativamente mayor de hidroperóxidos en los partos por cesárea ($p < 0,001$).

Catalasa en función del tipo de parto

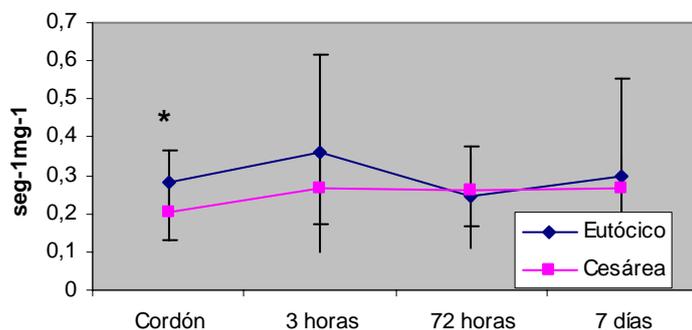


Figura 24. Evolución de la actividad catalasa en recién nacidos enfermos en función del tipo de parto. En este caso, la actividad enzimática en los partos por cesárea es inferior en cordón umbilical y a las 3 h. En el primer caso, incluso con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

SOD en función del tipo de parto

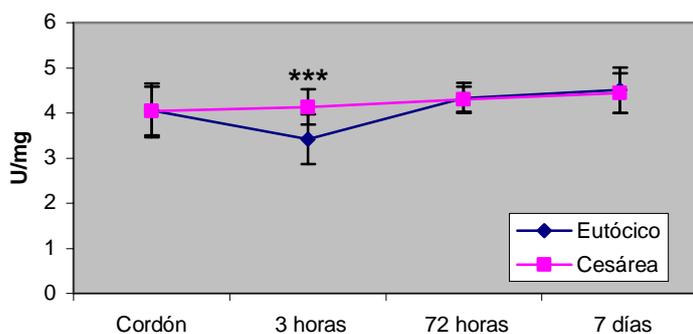


Figura 25. La evolución de la SOD en recién nacidos enfermos en función del tipo de parto, ofreció los resultados que se expresan en las próximas figuras. En ésta se pudo comprobar como la actividad de la SOD a las 3 h de vida fue significativamente mayor en los nacidos mediante un parto por cesárea ($p < 0,001$).

Catalasa en función del Apgar 1

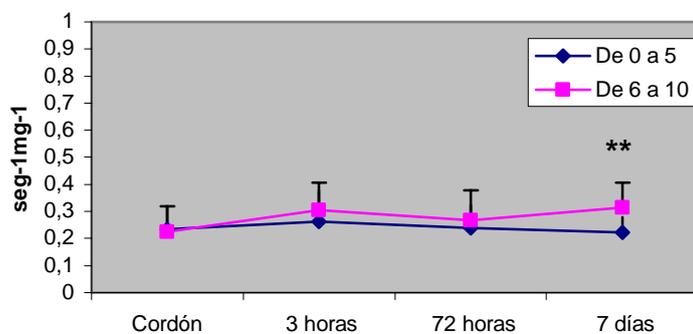


Figura 26. La evolución de la actividad catalasa en recién nacidos enfermos en función del test de Apgar al minuto de vida ofreció solamente en las determinaciones realizadas a los 7 días de vida diferencias entre los grupos formados con mayor o menor puntuaciones del test ($p = 0,003$).

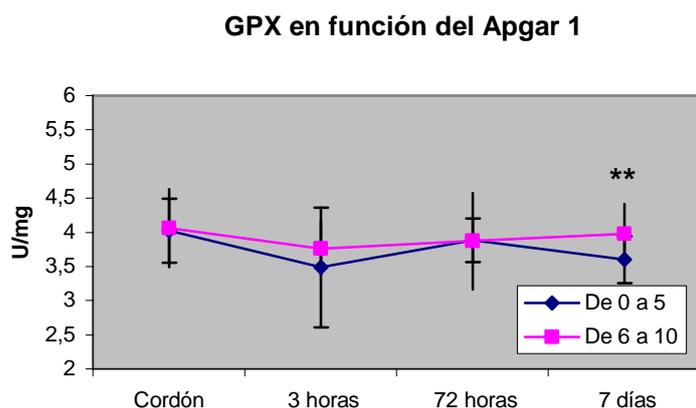


Figura 27. La evolución de la GPX en función del Apgar 1 en recién nacidos enfermos ofreció un perfil evolutivo en cada uno de los momentos del estudio, parecido al descrito con anterioridad en relación a la catalasa. Encontrándose diferencias significativas solamente en las determinaciones realizadas al séptimo día.

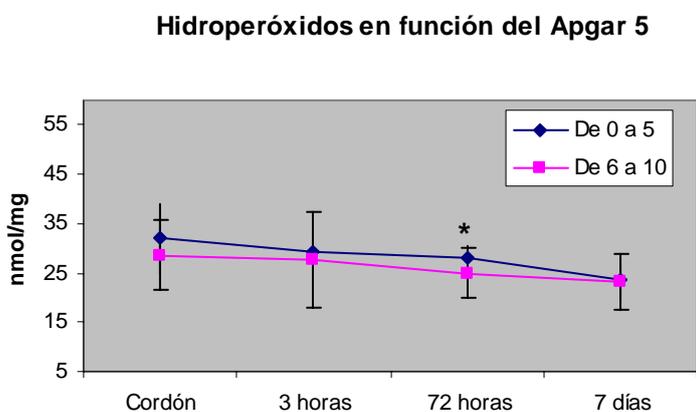


Figura 28. La evolución de los hidroperóxidos de membrana en función del Apgar 5 fue muy similar en ambos grupos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas a las 72 horas de vida, con un mayor nivel entre los que tuvieron una menor puntuación ($p < 0,05$).

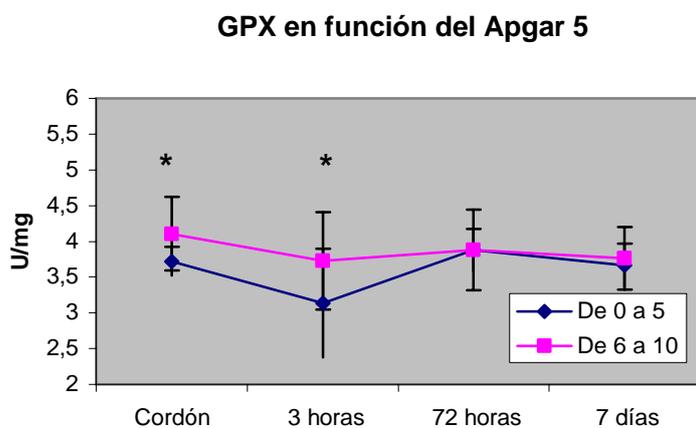


Figura 29. La evolución de la GPX en función del Apgar 5 en recién nacidos enfermos ofreció los valores que se recogen en la figura. Probablemente estos datos se adapten mejor a una interpretación fisiológica global de la situación, al encontrarse diferencias significativas en cordón y a las 3 horas de vida.

C) Estudio de correlación y regresión entre las variables

En el siguiente apartado lo que se pretende es conocer el grado de relación, si existe, entre distintas variables, con objeto de establecer conclusiones acerca del grado de interrelación entre las mismas. En la (Tabla XLV) se detallan los resultados de mayor relevancia, una vez realizado el estudio de correlación y regresión con las principales variables de nuestro estudio. Resultados que a continuación se reflejan en las (Figuras 30-34).

Tabla XLV. Resultados de mayor interés obtenidos del análisis de correlación y regresión efectuado sobre las variables de mayor interés de nuestro estudio.

| DATOS DE ESTRÉS OXIDATIVO GRUPO CONTROL | | | | | |
|--|-----------|-------|------------------------|--------|-------|
| Variables relacionadas | r/p | R/p | y=a+bx | F | p |
| Cat_A-SOD_A | 0,523/*** | 0,274 | y=0,179 +(1,326E-03)x | 17,354 | 0,000 |
| DATOS DE ESTRES OXIDATIVO GRUPO A (R.N. ENFERMOS <1500 GRAMOS) | | | | | |
| GPX_D-Hidm_D | 0,361 | 0,130 | y=7,115 + 4,090x | 8,394 | 0,005 |
| Cat_C-SOD_C | 0,345/** | 0,119 | y=-2,746 + 0,313 | 8,403 | 0,005 |
| Cat_C-GPX_C | 0,344/* | 0,118 | y=-0,467 - 0,252x | 4,299 | 0,046 |
| Cat_D-SOD_D | 0,341 | 0,116 | y=-2,713 + 0,303x | 7,374 | 0,009 |
| Cat_A-Cat_B | 0,496 | 0,246 | y=-0,493 + 0,515x | 5,232 | 0,036 |
| SOD_B-SOD_C | 0,342 | 0,117 | y=5,321 - 0,268x | 7,659 | 0,008 |
| GPX_A-GPX_B | 0,416 | 0,173 | y=6,020 -0,548x | 7,102 | 0,012 |
| GPX_A-GPX_C | 0,367 | 0,135 | y=2,495 + 0,325x | 5,286 | 0,028 |
| GPX_A-GPX_D | 0,593 | 0,351 | y= 5,598 -0,419x | 8,663 | 0,010 |
| Leuc_B-SOD_B | 0,564 | 0,318 | y=4,240 + (-8,93E-06)x | 6,983 | 0,018 |
| PMN_B-Cat_B | 0,595 | 0,354 | y=-1,47 + (6,197E-05)x | 5,471 | 0,041 |
| PMN_B-SOD_B | 0,696 | 0,485 | y=4,608 + (-1,42E-04)x | 10,350 | 0,008 |
| Peso_A-Hid_A | 0,448 | 0,201 | y=17,69 +(9,706E-03)x | 7,027 | 0,013 |
| Peso_D-Cat_D | 0,767 | 0,588 | y=-2,92 + (6,716E-04)x | 8,562 | 0,026 |
| EG_A-Hidme_A | 0,472 | 0,223 | y=-7,339 + 1,232x | 8,021 | 0,008 |
| EG_A-Cat_A | 0,560 | 0,314 | y=1,228 + (-9,27E-02)x | 5,495 | 0,037 |
| EG_D-Cat_D | 0,410 | 0,168 | y=-3,16 + (6,126E-02)x | 5,247 | 0,030 |

Valoración de la respuesta neonatal ante el estrés oxidativo

| DATOS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN GRUPO B (R.N. ENFERMOS >1500 GRAMOS) | | | | | |
|---|-------|-------|--------------------------|--------|-------|
| Hidme _A -Cat _A | 0,682 | 0,465 | $y=-5,008 + (-22,368)x$ | 7,837 | 0,021 |
| Cat _C -GPX _C | 0,842 | 0,708 | $y=-0,117 + (-2,735)x$ | 12,131 | 0,018 |
| Cat _D -GPX _D | 0,699 | 0,488 | $y=-2,811 + 0,392x$ | 6,675 | 0,036 |
| Hid _A -Hid _C | 0,843 | 0,711 | $y=16,778 + 0,353x$ | 14,781 | 0,009 |
| Hid _A -Hid _D | 0,786 | 0,618 | $y=11,276 + 0,472x$ | 12,950 | 0,007 |
| Cat _B -Cat _D | 0,706 | 0,498 | $y=-2,035 + (-0,452)x$ | 6,939 | 0,034 |
| Cat _C -Cat _D | 0,672 | 0,451 | $y=-2,594 + (-0,809)x$ | 11,498 | 0,004 |
| Leuc _B -GPX _B | 0,559 | 0,313 | $y=4,047 + (-3,59E-05)x$ | 5,467 | 0,038 |
| PMN _B -GPX _B | 0,734 | 0,538 | $y=3,961 + (-7,42E-05)x$ | 13,993 | 0,003 |
| pH _B -Hidme _B | 0,609 | 0,371 | $y=-93,417 + 17,115x$ | 5,909 | 0,035 |
| pH _C -SOD _C | 0,882 | 0,778 | $y=18,043 + (-1,871)x$ | 10,497 | 0,048 |
| Peso _A -Hidm _A | 0,630 | 0,397 | $y=66,54 + (-1,85E-02)x$ | 9,219 | 0,009 |
| Peso _A -Cat _A | 0,767 | 0,588 | $y=-2,92 + (6,716E-04)x$ | 8,562 | 0,026 |
| EG _A -GPX _A | 0,543 | 0,295 | $y=1,8 + (6,441E-02)x$ | 5,849 | 0,030 |

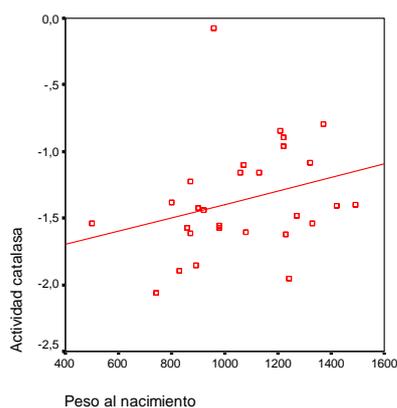


Figura 30: Recta de regresión entre la variable peso al nacimiento (independiente) y la actividad catalasa (dependiente) a los 7 días de vida en recién nacidos de peso al nacer <1500 gramos. ($r=0,767$; $p<0,05$) ($y=-2,926+(6,716E-04)x$).

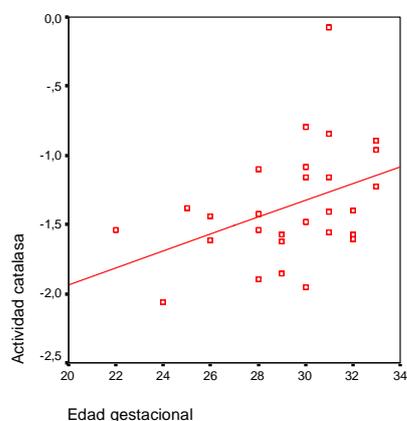


Figura 32: De manera semejante a lo mostrado en la figura anterior con respecto al peso, a los 7 días de vida la EG y la actividad catalasa mostraron un grado de correlación estadísticamente significativo ($r=0,410$; $p<0,05$) ($y=-3,163+(6,126E-02)x$).

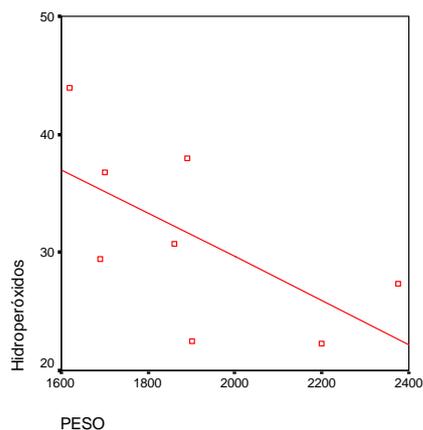


Figura 33: Recta de regresión entre la variable peso (independiente) e hidroperóxidos de membrana (dependiente) en cordón de recién nacidos de peso al nacer >1500 gramos ($r=0,630$; $p=0,009$); $(y=60,4547+(-1,85E-02)x)$.

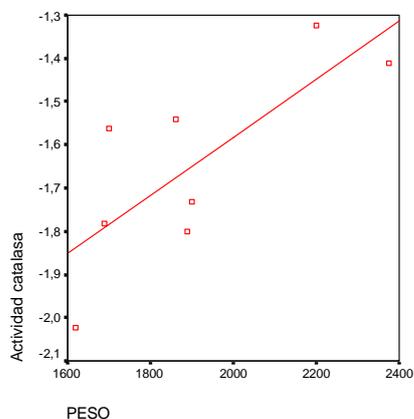


Figura 34: Recta de regresión entre la variable peso (independiente) y actividad catalasa (dependiente) en cordón de RNPT >1500 gramos. ($r=0,767$, $p=0,026$) $(y=-2,926+(6,716E-04)x)$.

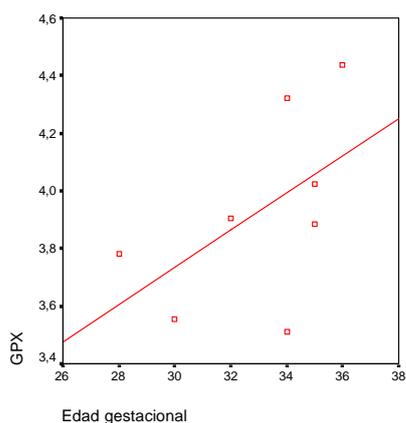


Figura 35: Recta de regresión entre la variable edad gestacional (independiente) y GPX (dependiente) en cordón de recién nacidos de peso al nacer >1500 gramos ($r=0,543$; $p=0,03$); $(y=1,802+(6,441E-02)x)$.

DISCUSIÓN

Principales factores relacionados con alteraciones en el balance estrés oxidativo/mecanismos antioxidantes enzimáticos en nuestro estudio

1. Edad gestacional

El grado de maduración fetal juega un papel fundamental en la susceptibilidad al desarrollo de diversos procesos que afectan al prematuro, y que condicionan de manera decisiva su mayor morbimortalidad. Por otra parte, si en general puede afirmarse que el recién nacido a término está expuesto a un mayor grado de estrés oxidativo, esta aseveración se hace aún más evidente en el recién nacido pretérmino, por lo que algunos autores sugieren que pueda incluso tratarse de un evento fisiológico. No obstante, cabe señalar que los estudios realizados en humanos son, comparativamente, menos numerosos que los procedentes de la experimentación animal.

Hidroperóxidos de membrana eritrocitaria

En nuestro estudio, el grado de hidroxidación eritrocitaria fue significativamente superior en los dos grupos estudiados de RNPT frente al grupo control de recién nacidos a término sanos tanto en cordón como a las tres horas de vida ($p < 0,05$), lo que coincide con las experiencias científicas realizadas y publicadas hasta la fecha. Sin embargo, los estudios efectuados hasta el momento se basan fundamentalmente en prematuros de edad gestacional superior a las 30 semanas, por lo que las edades gestacionales de algunos de los pacientes incluidos en nuestra experiencia de estudio permite una mayor precisión a la hora de valorar este aspecto. Así, se procedió a la división de los RNPT en dos grupos en función de su edad gestacional un primer grupo compuesto por RNPT con edades gestacionales comprendidas entre 25 y 30 semanas (inclusive), y un segundo grupo compuesto por

RNPT de edad gestacional entre 31 y 37 semanas. El nivel de hidroperoxidación en ambos grupos siguió un descenso semejante, desde unos elevados niveles iniciales, prácticamente en paralelo, reflejando una respuesta adaptativa y evolutiva similar; sin embargo, fue llamativo el hallazgo de unas mayores cifras medias de H₂O₂ en el grupo de neonatos de entre 31 y 37 semanas en cordón, a las 3 horas de vida y a los 7 días, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre sí, quizá por la gran variabilidad de las cifras obtenidas, lo que motivó una elevada desviación estándar. Las razones de estos hallazgos pueden ser múltiples, como una posible mayor protección a menores edades gestacionales conferida por los sistemas antioxidantes maternos (aspecto éste no bien estudiado hasta el momento), o bien por la patología concomitante de los recién nacidos incluidos en el estudio. En cualquier caso, este hallazgo merece sin duda una mayor profundización, para una mejor comprensión de la respuesta oxidativa en función de la edad gestacional del recién nacido.

Sistemas antioxidantes enzimáticos

La mayoría de trabajos científicos coinciden en atribuir a los recién nacidos prematuros una menor capacidad antioxidante tanto en los mecanismos no enzimáticos como en los enzimáticos, lo que contribuiría a explicar su mayor grado de estrés oxidativo. Otros trabajos, sin embargo, difieren o matizan lo referido anteriormente. Ripalda no halló cambios significativos en la actividad SOD eritrocitaria con el aumento de edad gestacional, aunque sí se hallaron diferencias significativas conforme aumentaba la edad gestacional en la actividad catalasa y GPX eritrocitaria. En función de la muestra estudiada, se sugiere que la estimulación para el proceso de maduración de los sistemas antioxidantes enzimáticos comenzaría entre la semana 28 y 31. Zima et al concluyen que a nivel eritrocitario, la madurez en la actividad SOD se alcanza antes de las 17 semanas de gestación, en tanto de la GPX entre la semana 26 y 35.

En nuestra experiencia, los resultados del análisis comparativo entre el grupo de RNT sanos y el comprendido de RNPT globalmente considerado ofreció diferencias estadísticamente significativas a favor del grupo control en la actividad catalasa y SOD tanto en cordón, como a las 3 horas de vida, lo que sin duda concuerda con la idea de una menor capacidad antioxidante en el recién nacido prematuro. Sin embargo, la actividad GPX ofreció una respuesta divergente, siendo de hecho sus valores medios superiores en el grupo de recién nacidos prematuros (diferencia estadísticamente significativa en la determinación efectuada en cordón) lo que podría deberse a los diversos estadios evolutivos en cuanto a la ontogenia y maduración de la actividad enzimática, ya referidas anteriormente, que coincide en obtener unos niveles de actividad GPX máximos entre las semanas 26 a 35, y superiores al momento del nacimiento.

En cuanto a las posibles diferencias en el grupo de pretérminos en función de la diferente edad gestacional, al efectuar el análisis comparativo entre el grupo de mayor prematuridad (edad gestacional 25-30 semanas) y el de menor grado de inmadurez (31-37 semanas) no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, aunque sí se pudo comprobar cómo a los 7 días de vida los valores medios de actividad catalasa, SOD y GPX eran superiores en el grupo de edad gestacional comprendida entre la 31 y 37 semanas, resultado probablemente de una mayor capacidad de respuesta en el tiempo en cuanto a la actividad enzimática antioxidante conforme avanza la edad gestacional, y por tanto la madurez orgánica y funcional del nuevo ser, aspecto corroborado por el análisis de correlación y regresión que muestra una correlación significativa entre la actividad catalasa y la edad gestacional a los 7 días de vida.

2. Peso al nacimiento

Son aún escasos los trabajos referidos a recién nacidos cuyo peso al nacimiento se sitúe por debajo de los 1500 gramos, punto de corte a partir del cual se denomina al neonato recién nacido de muy bajo peso. Por ello, la presencia en nuestro estudio de un número apreciable de muestras de pacientes de peso inferior a esta cifra (e incluso inferior a 1000 gramos, es decir, pretérminos de muy muy bajo peso) añade un mayor interés a esta exposición.

Hidroperóxidos de membrana eritrocitaria

En el grupo control se detectaron unos niveles medios en cordón superiores a los obtenidos a las 3 horas, diferencia significativa ($p < 0,05$), lo que refleja el descenso adecuado del nivel de estrés oxidativo tras el parto, por la puesta en marcha de los mecanismos adaptativos presentes en un organismo maduro y preparado para la eliminación del exceso de especies reactivas del oxígeno producidas por el nacimiento.

Al comparar los niveles medios de hidroperóxidos de membrana eritrocitaria en cordón entre el grupo control, el grupo A (<1500 gramos) y el grupo B (>1500gramos), se pudo comprobar un menor nivel de H_2O_2 en el GC, frente a los grupos A y B, diferencia que fue estadísticamente significativa entre el GC y el de peso >1500 gramos ($p < 0,001$) y entre el grupo A y el B ($p < 0,05$). Esta tendencia, al analizar los datos a las 3 horas de vida, se confirma, por cuanto que también las cifras de H_2O_2 de membrana eritrocitaria son menores en el grupo control que en los grupos A y B, con diferencias significativas, aunque en este caso, entre GA y GB el estudio comparativo no ofreció significación estadística. Cabe señalar dos observaciones con respecto a este análisis: la primera, previsible, es el menor nivel de estrés oxidativo, en recién nacidos de >2500 gramos, de peso adecuado a la edad gestacional, frente a los recién nacidos de bajo peso al nacer, con independencia de su edad gestacional, según definición de la OMS. El

segundo, y relevante aspecto es el menor nivel medio de H_2O_2 en el grupo de recién nacidos de muy bajo peso frente al de recién nacidos de bajo peso moderado, con diferencias estadísticamente significativas entre sí. Este hecho puede dar lugar a diversas interpretaciones: a) Un mayor grado de protección antioxidante materna en estos niños; b) Un mayor grado de estrés oxidativo materno, por diversas causas, en el grupo de los >1500 gramos; c) La presencia de patologías concomitantes, el tipo de parto y de reanimación, etc, pudieran ser factores de confusión en esta comparación. Posteriormente se procedió a valorar la evolución temporal de los niveles de H_2O_2 en los grupos A y B en las determinaciones base de este estudio, es decir, cordón, 3 horas de vida, 72 horas y 7 días. Tanto en el grupo de <1500 gramos como en recién nacidos de 1500 a 2500 gramos, las cifras medias de hidroperóxidos de membrana eritrocitaria experimentaron un descenso progresivo y sostenido entre los valores obtenidos en cordón y los determinados a la semana de vida extrauterina. Al realizar un ANOVA con estos datos, en ambos grupos de obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cordón y los medidos a los 7 días ($p < 0,05$). Al comparar la evolución entre ambos grupos, puede observarse cómo los niveles de H_2O_2 en el grupo B (>1500 gramos al nacimiento) en las cuatro determinaciones realizadas en el estudio fueron mayores que en los RN con peso <1500 gramos reflejando un mayor grado de estrés oxidativo en dicho grupo. Esta diferencia, de hecho, fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en las determinaciones efectuadas a las 72 horas y a los 7 días de vida. La evolución en cuanto al descenso de los niveles de hidroperóxidos de membrana fue semejante a lo largo de los 7 primeros días de vida.

Sistemas antioxidantes enzimáticos

El análisis de las actividades enzimáticas en el GC, entre los valores de cordón y a las 3 horas de vida arrojó unos valores medios discretamente superiores en cordón de

catalasa y SOD, en tanto que el ANOVA de la actividad SOD sí ofreció diferencias estadísticamente significativas a favor de la actividad enzimática de cordón. En cuanto al estudio de las posibles diferencias entre los tres grupos de neonatos en cordón y a las 3 horas de vida extrauterina, se detecta un mayor nivel medio de actividad catalasa en el grupo de recién nacidos de peso adecuado frente a los recién nacidos de bajo peso, con diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre el grupo control y el grupo de recién nacidos de peso al nacer 1500-2499 gramos. A su vez, encontramos diferencias entre los niveles de actividad enzimática catalasa entre los dos grupos de recién nacidos de bajo peso, a favor del grupo A (<1500 gramos). Una lectura francamente semejante y paralela presentaron los datos de actividad SOD. En análisis de la actividad GPX, en cordón los niveles medios en el grupo de <1500 gramos fueron superiores al resto, con diferencia estadísticamente significativa entre aquel grupo y el de <1500 gramos. En cuanto a la actividad a las 3 horas de vida, aunque los resultados no ofrecieran diferencias significativas, sí se pudo apreciar, al igual que en cordón, un mayor nivel medio de actividad catalasa y SOD en el grupo control, y de actividad GPX eritrocitaria en el grupo A (<1500 gramos al nacimiento).

Cabe ofrecer una perspectiva, llegados a este punto, integradora de los datos ofrecidos hasta el momento, por cuanto que ya en el apartado anterior comentábamos el menor nivel de hidroxidación en el grupo de recién nacidos de muy bajo peso al nacer frente al grupo de recién nacidos de bajo peso moderado. En este sentido, los datos que indican una mayor actividad enzimática en los recién nacidos de menor peso vienen a subrayar la verosimilitud del planteamiento de una mayor capacidad de defensa antioxidante en los recién nacidos de muy bajo peso, al menos en cordón y en los primeros momentos de vida extrauterina, que se traduciría en un menor nivel de estrés oxidativo, en este caso de radicales hidroxidados. El análisis de la evolución durante

los primeros 7 días de vida de la actividad antioxidante enzimática ofreció una lectura diversa: en tanto que los niveles de catalasa y GPX siguieron una evolución paralela tanto en el grupo A como en el B, en general con unas menores cifras medias en el grupo de recién nacidos de peso >1500 gramos (con diferencias que no alcanzan el nivel de significación estadística), la actividad SOD sí experimentó un cambio evolutivo significativo, pasando de unos niveles inferiores ($p < 0,05$) en el grupo B, con respecto al A, a un aumento progresivo en ambos grupos, pero más acentuado en el grupo de recién nacidos de peso al nacimiento entre 1500-2499 gramos con $p < 0,01$ a los 7 días de vida.

3. Tipo de parto

Los datos obtenidos en nuestro estudio reflejan un nivel de actividad catalasa en cordón y a las 3 horas de vida inferior en RNPT mediante parto por cesárea, lo que coincide con lo publicado por autores como Georgeson et al en muestras de cordón. Los niveles de GPX y SOD no experimentaron diferencias significativas, a excepción, paradójicamente, de una mayor actividad SOD en recién nacidos mediante cesárea a las 3 horas, dato que quizá obedezca en realidad a la gran variabilidad en las cifras obtenidas. De forma paralela, se determinó el nivel de estrés oxidativo cuantificado por las cifras de hidroperóxidos de membrana eritrocitaria para valorar la posible existencia de diferencias en función del tipo de parto en recién nacidos, aspecto obviado en la inmensa mayoría de estudios publicados hasta la fecha, a excepción de algunos trabajos⁽²²⁸⁾. Se comprobaron, en sangre de cordón unos niveles de H_2O_2 significativamente inferiores en el grupo de neonatos nacidos mediante parto eutócico, frente al grupo de los nacidos por cesárea. Sin embargo, en las determinaciones posteriores los niveles prácticamente se igualan entre sí, experimentando un descenso progresivo coincidente. Estos datos confirmarían sin duda un mayor grado de estrés oxidativo inicial en los partos por cesárea, algo que por otra parte puede sin más ser explicado simplemente por

el estrés que conlleva un proceso quirúrgico, que sin embargo con posterioridad sería bien “compensado” por el neonato, mediante los diversos sistemas antioxidantes presentes en su medio interno.

4. Apgar al minuto y a los cinco minutos de vida

En nuestro estudio, consideramos preferible el análisis mediante la (t) de Student para datos independientes, en los distintos momentos del estudio (cordón, 3 horas de vida, 72 horas, y 7 días), agrupando a los RNPT (grupos A y B) en dos grupos: Apgar 0-5 y Apgar 6-10 (tanto al minuto como a los 5 minutos de vida). Los datos más interesantes sobre estrés oxidativo y relación con el puntaje de Apgar 1/5 en nuestro estudio fueron los que a continuación se detallan:

Hidroperóxidos de membrana eritrocitaria

El nivel medio de hidroxidación fue mayor en recién nacidos con Apgar 1 y 5 entre 0-5 que en aquellos niños que obtuvieron puntajes de Apgar mayores. Estas diferencias entre grupos fueron mayores en el Apgar 5, ya que de hecho se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) a las 72 horas de vida. Si no se obtuvieron más significaciones estadísticas fue debido fundamentalmente a la gran variabilidad de datos, lo que influyó sobre la D.S.. Parece lógico pensar que una puntuación baja de Apgar a los cinco minutos de vida influya de manera más decisiva sobre el grado de estrés oxidativo que una baja cifra al minuto de vida, ya que refleja un deterioro clínico más sostenido, en unos momentos tan determinantes para el neonato.

Al comparar las cifras de hidroperóxidos de membrana eritrocitaria en recién nacidos sanos (grupo control), cuyo Apgar 1/5 fue de 9/10 o 10/10, y aquellos RNPT que presentaron un menor puntaje de Apgar al minuto y a los 5 minutos de vida (inferior o igual a 5) en cordón y las 3 horas de vida, se obtuvieron diferencias apreciables entre ambos grupos, evidenciándose un mayor nivel de estrés oxidativo en

RNPT cuyo Apgar 1/5 se situó entre 0 y 5, frente al grupo control de RNT sanos de Apgar 9 o 10. Estos datos permiten deducir la posibilidad de un efecto sinérgico entre dos noxas que afectan al neonato pretérmino: de un lado su propia inmadurez orgánica y funcional, y de otro las distintas circunstancias que pueden motivar un deterioro clínico en el período perinatal, reflejado en un bajo score de Apgar.

Sistemas antioxidantes enzimáticos

La actividad catalasa en el grupo de recién nacidos con un Apgar 6-10 en líneas generales presentó unos niveles medios superiores a la de los niños cuyo Apgar fue menor (0-5). De hecho en la determinación efectuada a los 7 días de vida se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$) a favor del grupo de mayor Apgar en el primer minuto de vida. Esta diferencia se acentuó más a la hora de valorar el Apgar a los 5 minutos, aunque las diferencias no alcanzaran significación estadística, debido a la gran variabilidad en el rango de datos obtenidos. La actividad SOD no obtuvo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos estudiados. La actividad GPX sí se vio influenciada de manera más clara por los valores de Apgar al minuto y a los 5 minutos de vida. Así, todos los valores medios, tanto en Apgar 1 como en Apgar 5, fueron superiores en el grupo con mayores puntuaciones (6-10) que en el grupo con Apgar 0-5. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas a los 7 días de vida ($p < 0,05$) al considerar el Apgar 1, y en cordón y a las 3 horas de vida ($p < 0,05$) en el Apgar 5.

Cabe deducir, pues, que al igual que en el nivel de hidropoxidación, el estado clínico inicial del neonato enfermo, reflejado por la puntuación de Apgar al minuto y a los cinco minutos de vida puede influir en el nivel y actividad de los sistemas antioxidantes, en este caso los enzimáticos, con una repercusión negativa en aquellos niños cuyo Apgar se sitúa en valores más bajos, y que por tanto reflejan un estado

clínico sensiblemente peor, con respecto a los pacientes cuyo Apgar se mantiene en unas cifras aceptables, en los que no repercute, por tanto, sobre la actividad enzimática antioxidante. Dicha hipótesis puede verse corroborada al realizar el análisis comparativo entre la actividad antioxidante enzimática en el grupo control (RNT cuyo score de Apgar fue 9 ó 10 tanto al minuto como a los 5 minutos) frente a los RNPT de Apgar inferior (0-5). En dicho análisis, la actividad catalasa y SOD fue superior en el grupo control, aunque la actividad GPX no ofreció diferencias significativas.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación se está en disposición de afirmar que:

1- El estudio e interpretación de la fisiopatología perinatal deberá contemplar los problemas derivados del estrés oxidativo como un aspecto esencial para interpretar la patología y en consecuencia el enfoque terapéutico de los múltiples problemas que presenta el neonato con estas situaciones.

2- Como ya ha sido referido con anterioridad en la literatura, con los datos aportados en el presente proyecto podemos concluir que el recién nacido pretérmino presenta un mayor grado de estrés oxidativo en relación al recién nacido a término, reflejado en este caso en un mayor nivel de hidroxidación.

3- Los diferentes grupos de estudio considerados en función del peso (superior e inferior a 1500 gramos) no permiten distinguir, a grandes rasgos, situaciones diferentes, idea que en cierta medida se puede confirmar mediante el análisis del perfil evolutivo de los niveles de estrés oxidativo durante el período neonatal inmediato, el cual sigue un curso paralelo y similar con las mismas variaciones y tendencias en ambos grupos de pretérminos. No obstante, sí se ha comprobado un mayor nivel de hidroxidación y

diferencias en la actividad antioxidante en RNPT de muy bajo peso (<1500 gramos) frente a RNPT de peso al nacer >1500 gramos, aspecto este sobre el que será necesaria una mayor profundización en sucesivos estudios.

4- Considerando los resultados de la experiencia que aportamos, y en relación a lo expuesto anteriormente, podemos afirmar que la actividad enzimática antioxidante relacionada con el nacimiento a término o pretérmino ofrece un perfil característico que guarda una estrecha e íntima relación con la ontogenia y maduración de los sistemas enzimáticos durante la gestación y el período neonatal inmediato. Sólo de esta manera se puede explicar que la actividad de la catalasa y SOD sea mayor en el RNT, mientras que la GPX ofrezca un nivel de actividad superior en el recién nacido pretérmino.

6- Determinados procesos o situaciones inherentes al período perinatal pueden actuar como factores sinérgicos a la propia inmadurez del recién nacido pretérminos como causantes o agravantes de un mayor nivel de estrés oxidativo. Así, elementos como el tipo de parto o el estado clínico en los primeros minutos de vida extrauterina, reflejado en el score de Apgar, pueden modificar sustancialmente tanto el nivel de hidroperoxidación como la actividad antioxidante enzimática.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Welty, S.E. Is there a role for antioxidant therapy in bronchopulmonary displasia?. J. Nutr. 2001;131:947S-950S.
- 2- Kelly, F.J. Free radical disorders of preterm infants. In: Cheeseman, K.H; Slater, T.F. (eds): Free Radicals in Medicine. Churchill Livingstone, London, 1993;pp 669-678.
- 3- Papp, A.; Nemeth, I.; Karg, E.; Papp, E. Glutathione status in retinopathy of prematurity. Free. Radic. Biol. Med. 1999;27(7-8):738-743.

- 4- O'Donovan, D.J.; Fernandes, C.J. Free radicals and diseases in premature infants. *Antioxid. Redox. Signal.* 2004;6(1):169-176.
- 5- Molina, A.; Muñoz, A.; Uberos, J.; Contreras, F. Patología por radicales libres en pediatría. En: Muñoz, A.; Molina, A.; Molina, J.A.; Fernández, J.M.; Acuña, D (eds). *Melatonina. Realidad actual y posibilidades futuras en Pediatría.* Ed. Formación Alcalá 2002;pp:619-679.
- 6- Keeney S.E.; Cress, S.E.; Brown, S.E.; Bidani, A. The effect of hyperoxic exposure on antioxidant enzyme activities of alveolar type II cells in neonatal and adult rats. *Pediatr. Res.* 1992;31:441-444.
- 7- Frank, L.; Price, L.T.; Whitney, P.L. Possible mechanism for late gestational development of the antioxidant enzymes in the fetal rat lung. *Biol. Neonate.* 1996;70:116-127.
- 8- Keeney, S.E.; Mathews, M.J.; Rassin, D.K. Antioxidant enzyme responses to hyperoxia in preterm and term rats after prenatal dexamethasone administration. *Pediatr. Res.* 1993;33:170-180.
- 9- Parmigiani, S.; Payer, C.; Massari, A.; Bussolati, G.; Bevilacqua, G. Normal values of reactive oxygen metabolites on the cord-blood of full-term infants with a colorimetric method. *Acta. Biomed. Ateneo. Parmense.* 2000;71(1-2):59-64.
- 10- Vento, M.; Asensi, M.; Sastre, J.; García, F.; Pallardo, F.V.; Vina J. Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics* 2001; 107(4):642-647.
- 11- Sehgal, A.; Saili, A.; Gupta, R.P.; Bajaj, P. Free oxygen radicals and immune profile in newborns with lung diseases. *J.Trop. Pediatr.* 2000; 46(6):335-337.
- 12- Dennery, P.A. Role of redox in fetal development and neonatal diseases. *Antioxid. Redox. Signal.* 2004;6(1):147-153.

- 13- Kamath, U.; Rao, G.; Raghothama, C.; Rai, L.; Rao, P. Erythrocyte indicators of oxidative stress in gestational diabetes. *Acta. Paediatr.* 1998;87(6):676-679.
- 14- Davis, J.M. Role of oxidant injury in the pathogenesis of neonatal lung disease. *Acta. Paediatr. Suppl.* 2002;91(437):23-25.
- 15- Yamamoto, T.; Shibata, N.; Muramatsu, F.; Sakayori, N.; Kobayashi, M. Oxidative stress in the human fetal brain: an immunohistochemistry study. *Pediatr. Neurol.* 2002;26(2):116-122.
- 16- Georgeson, G.D.; Szony, B.J.; Streitman, K.; et al. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2002;103(2):136-139.
- 17- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Cross, C.E. Free radical, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J. Labo. Clin. Med.* 1992. 119(6):598-620.
- 18- Cheeseman, K.H.; Slater, T.F. An introduction to free radical biochemistry. *British medical Bulletin.* 1993. 49(3):481-493.
- 19- Davies, K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1995;61:1-31.
- 20- Coghlan, J.G.; Flitter, W.D.; Holley, A.E. et al. Detection of free radicals and cholesterol hydroperoxides in blood taken from the coronary sinus of man during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Free Radic. Res. Commun.* 1991;14(5-6):409-417.
- 21- Reiter, R.J.; Guerrero, J.M.; García, J.J.; Acuña-Castroviejo, D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Biochem. Pharmacol.* 1998;56(10):1265-1272.
- 22- Halliwell, B.; Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993, 57(S):715S-722S.

- 23- Nevado Jiménez, A. Valoración del papel antioxidante de la melatonina frente a la intoxicación por adriamicina. Estudio a nivel de hepatocito y eritrocito en ratas wistar (tesis doctoral). 2001,; 3-91.
- 24- Molina, A.; Muñoz,A.; Seiquer,I.; Valenzuela,A. Radicales libres: Consideraciones generales. En: Muñoz, A. Melatonina: Realidad actual y posibilidades futuras en Pediatría. Ed. Formación Alcalá, 2002. 243-244.
- 25- Meier,B.; Radeke,H.; Selle,S.Human fibroblasts release oxygen species in response to treatment with synovial fluids from patient suffering from arthritis. Free Radic. Res. Commun. 1990;8:149-160.
- 26- Sevanian,A.; Hochstein,P. Mechanisms and consequence of lipid peroxidation in biological systems. Ann.Rev.Nutr.5:365-390.
- 27- Fardy,H.; Silverman. Localización celular y lugar específico de acción de cada antioxidante. Arch. Dis. Child. 1995;73:F112-117.
- 28- Babior, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. N. Engla.J.Med. 1978;298:659-668.
- 29- Boreis, A.; Cadenas, E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin-insensitive respiration. FEBS Lett. 1975;54:311-314.
- 30- Fridovich, I. Superoxide dismutase: An adaptation to a paramagnetic gas. J. Biol. Chem. 1989;264:7761-7764.2
- 31- Fridovich, I. Free radicals in Biology. Ed. Pryor. Academic Press, 1976. New York. Vol 1; 239.
- 32- Winterbourn, C.C. Free Radical Toxicology and Antioxidant Defense. Clin Exp Pharmacol Physiol 1995;22:877-880.

- 33- Friel, J.K.; Martin, S.M.; Langdon, M.; Herzberg, G.R.; Buettner, G.R. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infants formulas. *Pediatr. Res.* 2002;51(5):612-618.
- 34- Ripalda, M.J.; Rudolph, N.; Wong, S.L. Developmental patterns of antioxidant defense mechanisms in human erythrocytes. *Pediatr. Res.* 1989;26(4):366-369.
- 35- Ochoa, J.J.; Ramírez, M.C.; Quiles, J.L.; Palomino, N.; Robles, R.; Mataix, J.; Huertas, J.R. Oxidative stress in erythrocytes from prematures and full-term infants during their first 72 h of life. *Free. Radic. Res.* 2003;37(3):317-322.
- 36- Wiedemann, M.; Kontush, A.; Finckh, B.; Hellwege, H.H.; Kohlshutter, A. Neonatal blood plasma is less susceptible to oxidation than adult plasma owing to its higher content of bilirubin and lower content of oxidizable fatty acids. *Pediatr. Res.* 2003;(epub ahead of print).
- 37- Buonocore ,G.; Perrone, S.; Longini, M.; Vezzosi, P.; Marzocchi, B.; Paffeti.; Bracci, R. Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. *Pediatr. Res.* 2002;52(1):46-49.
- 38- Saugstad O.D. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2001;13:147-153.
- 39- Saugstad, O.D. Chronic lung disease: oxigen dogma revisited. *Acta Paediatr.* 2001;90:113-115.
- 40- Weinberger, B.; Watorek, K.; Strauss, R.; Witz, G.; Hiatt, M.; Hegyi, T. Association of lipid peroxidation with hepatocellular injury in preterm infants. *Crit. Care.* 2002;6(6):521-525.
- 41- Varsila, E.; Pitkanen, O.; Hallman, M.; Andersson, S. Immaturity-dependent free radical activity in premature infants. *Pediatr. Res.* 1994;36:55-59.

- 42- Borok, Z.; Buhl, R.; Grimes, G.J.; Bosker, A.D.; Hubbard, R.C.; Holroyd, K.J. Effect of glutathione aerosol in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 1991;338:215-216.
- 43- Lackmann, G.M.; Hesse, L.; Tollner, U. Reduced iron-associated antioxidants in premature newborns suffering intracerebral hemorrhage. *Free Radic Biol Med* 1996;20:407-409.
- 44- Kelly, F.J.; Lubec, G. Hyperoxic injury of immature guinea pig lung is mediated with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics* 2001;107:642-647.
- 45- Saugstad O.D. Resuscitation of newborn infants with room air or oxygen. *Semin. Neonatol.* 2001;6:233-239.
- 46- Donough, J.O'Donovan; Caraciolo, J. Fernandes. Free radicals and diseases in premature infants. *Antioxid. Redox Signal.* 6,169-176.
- 47- International Guidelines for Neonatal Resuscitation; An excerpt from the guidelines 2000 for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care: International Consensus on Science. *Pediatric* 2000;106:e29.
- 48- Hanahan, D.J.; Ekholm, J.E. The preparation of red cell ghosts (membranes). *Methods Enzymol* 1974;31:168-172.
- 49- Lowry, O.H.; Roserbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.G. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 1951;193:265-275.
- 50- Jiang, Z.Y.; Woolard, A.C.S.; Wolff, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1992;26:853-856.
- 51- Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 1984; 150:121-127.
- 52- Fridovich, I. Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem* 1975;44:147-159.

- 53- Flohe, L.; Wolfgang, A.G. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 1984;105:114-121.
- 54- Palomino Urda, N. Estudio comparativo del estrés oxidativo en recién nacidos. Tesis Doctoral. Departamento de Pediatría, Universidad de Granada, 1998.
- 55- Tsukahara, H.; Jiang, M.Z.; Ohta, N.; et al. Oxidative stress in neonates: evaluation using specific biomarkers. *Life. Sci.* 2004;9;75(8):933-938.
- 56- Bazoswka, G.; Jendryczko, A. Antioxidant enzyme activities in fetal and neonatal lung: lowered activities of these enzymes in children with RDS. *Ginekol. Pol.* 1996;67(2):70-74.
- 57- Huertas, J.R.; Palomino, N.; Carrasco, R.; et al. Lipid peroxidation and antioxidants in newborns. *Mol. Aspects. Med.* 1998;18(Suppl):S229-S232.
- 58- Zima, T.; Stipek, S.; Crkovska, J.; Doudova, D.; Mechurova, A.; Calda, P. Activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase in fetal erythrocytes. *Prenatal. Diagn.* 1996;16(12):1083-1085.
- 59- Cañete, R.; Guzmán, J. Concepto y clasificación del retraso de crecimiento intrauterino. En: *Actualizaciones en Endocrinología Pediátrica*. Ergón eds. Madrid 2002;95.
- 60- OMS Expert Committee on Maternal and Child Health. Public health aspects of low birth weight. *Technical Report Series*. Geneva. Suiza 1961;3:217-220.

RESUMEN

Objetivos: Describir el patrón de respuesta normal del RNT ante el estrés oxidativo. Analizar las posibles diferencias en la respuesta biológica ante el estrés oxidativo entre RNT, RNPT de peso al nacimiento <1500 gramos y RNPT de peso >1500 gramos. Valorar las consecuencias que determinados elementos concomitantes (tipo de parto,

puntuación de Apgar, oxigenoterapia) son capaces de modificar la respuesta al estrés oxidativo. Estudiar si la incapacidad de algunos grupos de neonatos para neutralizar el daño producido por radicales libres puede tener en la fase aguda consecuencias graves y determinantes.

Material y métodos: 147 recién nacidos, subdivididos en tres grupos: grupo control (GC), compuesto por 63 recién nacidos a término (RNT) de peso adecuado a edad gestacional, nacidos mediante parto eutócico; grupo A (GA), 57 RNPT de peso <1500 gramos (RNMBP); grupo B (GB) 27 RNPT de peso entre 1500 y 2500 gramos. Se extraen muestras de sangre de cordón umbilical y a las 3h, 72h y 7 días de vida, determinándose el nivel de hidroperóxidos de membrana eritrocitaria, y actividades enzimáticas catalasa, GPX y SOD. Estudio de inferencia estadística mediante análisis de la varianza, test de la t de Student y análisis de correlación y regresión entre variables.

Resultados: Mayor nivel de estrés oxidativo en RNPT que en RNT, así como superior capacidad antioxidante enzimática en general. Perfil evolutivo semejante en la evolución, durante los 7 primeros días de vida, en RNPT de los niveles de hidroperóxidos y actividad enzimática antioxidante. Sorprendentemente, en el GA los niveles de hidroperóxidos y la actividad antioxidante enzimática inicial catalasa, SOD y GPX fue superior frente al grupo de RNPT de peso >1500 gramos. Correlación entre el nivel de hidroperóxidos y la actividad antioxidante catalasa y GPX con la edad gestacional y peso al nacimiento en RNPT. Mayor nivel de estrés oxidativo en cordón de pretérminos nacidos por cesárea que en pretérminos nacidos mediante parto eutócico.