

Radicales libres

Bioquímica y sistemas antioxidantes

Implicancia en la patología neonatal

Dres. Israel Korc¹, Margarita Bidegain², Miguel Martell³

Resumen

Los radicales libres del oxígeno se forman continuamente en el organismo por el metabolismo normal, siendo eliminados por las defensas antioxidantes. Cuando son producidos en exceso pueden ocasionar una lesión tisular, por cuyo motivo han sido implicados en muchas enfermedades. En esta revisión se dan algunas nociones de la química de estos compuestos, se resume el mecanismo de su producción y el papel desempeñado por los iones de los metales de transición. Se insiste también sobre la importancia de la defensa antioxidante, cuya función es prevenir la oxidación, ya sea eliminando las especies reactivas del oxígeno tales como el radical superóxido, el radical hidroxilo o el peróxido de hidrógeno, o previniendo su formación.

Los efectos deletéreos de estos compuestos se pueden observar en diversas patologías del adulto y del niño. El recién nacido, sobre todo pretérmino, es especialmente vulnerable, dado que nace con una protección insuficiente contra los radicales libres del oxígeno. En este sentido se analiza el papel desempeñado por los radicales libres en las siguientes afecciones: encefalopatía hipóxico-isquémica, enterocolitis necrotizante, broncodisplasia pulmonar, retinopatía del prematuro y hemorragia intraventricular. También se señala la importancia de la lipoperoxidación en la administración intravenosa de una emulsión de lípidos.

Palabras clave: Radicales libres. Oxirradicales. Antioxidantes

Enfermedades del recién nacido—etiología
Encefalopatía hipóxico-isquémica
Retinopatía del prematuro
Enterocolitis necrotizante
Broncodisplasia
Hemorragia ventricular
Lípidos intravenosos

Introducción

Una de las paradojas de la naturaleza es que el oxígeno, imprescindible para mantener la vida de los organismos aerobios, en determinadas condiciones pueda ser tóxico, ocasionando a veces la muerte. En 1954 Gerschman y col. ⁽¹⁾ sugirieron que la mayoría de los efectos tóxicos sobre los organismos vivos de una elevada concentración de oxígeno podrían ser debidos a la formación de radicales libres derivados del mismo. Esta afirmación enunciada en 1954, llegó a interesar a los biólogos y a los

1. Profesor de Bioquímica. Ex Director del Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina

2. Pediatra Neonatólogo. Neonatóloga del CLAP

3. Profesor Agregado de Neonatología. Facultad de Medicina. Neonatólogo del CLAP

Centro Latinoamericano de Perinatología (CLAP) OPS/OMS. Montevideo, Uruguay

Correspondencia: Dr. Miguel Martell. Casilla de correo 627

CP 11000. Montevideo, Uruguay.

Presentado 23/6/95

Aceptado 11/8/95

clínicos recién 15 años después, cuando en 1969 McCord y Fridovich⁽²⁾ descubrieron la enzima superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la reacción de eliminación de un radical libre, el superóxido. Hoy se sabe que los radicales libres derivados del oxígeno (denominados también radicales del oxígeno u oxirradicales) están implicados en la patogenia de muchas enfermedades, siendo capaces de dañar, en forma reversible o irreversible, diversas biomoléculas muy importantes para ciertas actividades celulares fundamentales para la vida.

Los efectos deletéreos del oxígeno a través de la formación de radicales libres se pueden observar en diversas patologías tales como los procesos inflamatorios, lesiones por isquemia–reperfusión, carcinogénesis, envejecimiento, etc.⁽³⁾. El recién nacido es especialmente vulnerable a los efectos tóxicos del oxígeno. La adaptación a la vida extrauterina implica un cambio de una PaO_2 de 25–43 mmHg (3,3–5,7 kPa) durante la vida intrauterina⁽⁴⁾ a otra de más del doble, 60–80 mmHg (8,0–10,7 kPa)⁽⁵⁾. Este cambio afecta sobre todo al recién nacido pretermino que nace con una disminución de la concentración de los sistemas antioxidantes⁽⁶⁾. Por otra parte, el síndrome hipóxico–isquémico perinatal, una de las lesiones más frecuentes que puede sufrir el recién nacido, se acompaña de un período de reperfusión de los tejidos isquémicos. En esta etapa de reoxigenación se produce un aumento de formación de radicales libres, empeorando los daños causados por la isquemia⁽⁷⁾.

El propósito de esta revisión es analizar el papel desempeñado por los radicales libres del oxígeno en diversas patologías del recién nacido, que han sido denominadas conjuntamente por Saugstad⁽⁸⁾ “enfermedad de los radicales del oxígeno en neonatalogía”. Veremos especialmente la encefalopatía hipóxico–isquémica, la enterocolitis necrotizante, la retinopatía del prematuro, la broncodisplasia pulmonar y la hemorragia intraventricular. También se analizará la importancia de la peroxidación en la administración intravenosa de una emulsión de lípidos.

Nociones sobre los radicales libres

Definición

Los electrones ocupan regiones en los átomos o moléculas conocidas como orbitales. Cada orbital puede contener un máximo de dos electrones, cada uno de ellos con un spin (giro) en un sentido opuesto al otro. A los dos electrones de un orbital se les denomina electrones apareados. Un enlace químico (enlace covalente) consiste en un par de electrones de spin opuesto que comparten el mismo orbital molecular (electrones apareados), contribuyendo con un electrón cada uno de los átomos que for-

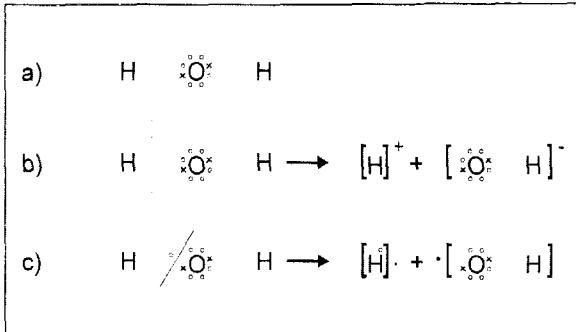


Figura 1. (a) Representación esquemática de las uniones entre el oxígeno y los hidrógenos de una molécula de agua. Cada círculo representa un electrón perteneciente al oxígeno, siendo las cruces electrones de los hidrógenos. (b) Formación de los iones H^+ y OH^- (c) Formación de los radicales libres $\text{H}\cdot$ y $\cdot\text{OH}$. Según Dormandy⁽⁹⁾.

man el enlace. En la figura 1(a) se representa esquemáticamente la unión del oxígeno con el hidrógeno para dar agua⁽⁹⁾. Cuando en el curso de una reacción química se rompe una unión de este tipo, el apareamiento de electrones puede conservarse, lo que en el caso del agua genera dos fragmentos, el ion hidroxilo (OH^-) que se lleva los dos electrones del enlace, y el ion hidrógeno (H^+) que no tiene ninguno (figura 1(b)). Cuando esto ocurre se trata de una fisión heterolítica. Pero también puede tener lugar una fisión homolítica, que para el agua se puede representar como se muestra en la figura 1(c). En este caso se obtienen dos fragmentos, cada uno con electrones no apareados: un radical libre hidrógeno ($\text{H}\cdot$) y un radical libre hidroxilo ($\cdot\text{OH}$).

Un radical libre es por definición toda especie química capaz de una existencia independiente, que contenga en su capa electrónica más externa uno o más electrones no apareados, es decir que se encuentren solos en un orbital. Se representa en la fórmula por un punto (\cdot). La mayoría de los compuestos biológicos no son radicales, siendo denominados por tal motivo no–radicales.

Los electrones son más estables cuando están apareados en un orbital. Los radicales libres, por contener electrones no apareados son inestables y más reactivos que los no–radicales. Si se encuentran dos radicales libres, pueden combinar sus electrones no apareados y formar un enlace covalente. Un radical libre también puede donar su electrón no apareado a un compuesto no–radical, o apropiarse de un electrón de otra molécula para formar su par electrónico. En estos casos el radical deja de serlo y la otra molécula se transforma en un radical. Así se puede iniciar y perpetuar una cadena de reacciones como ocurre por ejemplo en la peroxidación de ácidos grasos insaturados.

Si bien en este trabajo nos ocuparemos preferentemen-

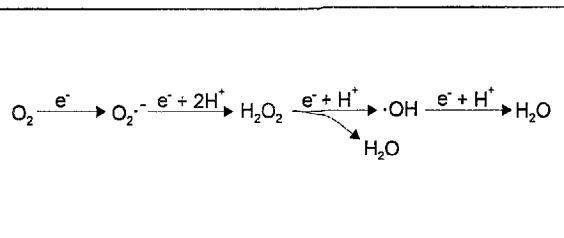


Figura 2. Esquema de la reducción univalente del oxígeno. Tomado de ⁽¹⁰⁾. O_2^- - radical superóxido. H_2O_2 : peróxido de hidrógeno. $\cdot OH^-$ - radical hidroxilo. e^- - electrón

te de los oxirradicales, es necesario señalar que los radicales libres pueden estar centrados en elementos muy diversos de los que debemos mencionar por su importancia biológica, además del oxígeno, el hidrógeno, el carbono, el azufre y el nitrógeno.

Radicales libres derivados del oxígeno

En la mayoría de las células aerobias más de 90% del oxígeno consumido por ellas es reducido a agua por el mecanismo respiratorio mitocondrial, en cuya etapa final 4 electrones y 4 protones (iones hidrógeno) son transferidos casi simultáneamente a una molécula de oxígeno. ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$). Pequeñas cantidades de oxígeno pueden ser metabolizadas por otras vías, de las cuales nos interesa señalar la reducción univalente o monovalente. En estos casos la molécula de oxígeno acepta un electrón por vez, dando origen a un grupo de compuestos intermedios que constituyen los radicales libres derivados del oxígeno. Estos son oxidantes y por lo tanto tóxicos. En la figura 2 que tomamos de Srivastava y col. ⁽¹⁰⁾ se representan en forma esquemática los estadios de reducción univalente del oxígeno por adición sucesiva de electrones.

Como se señala en el esquema, los intermedios de la reducción univalente del oxígeno son sucesivamente el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, dando finalmente agua. Debemos mencionar que en algunas condiciones el oxígeno puede pasar a un estado de excitación muy reactivo denominado oxígeno singlete (1O_2) que es un oxidante muy enérgico. El H_2O_2 y el 1O_2 no son radicales libres porque carecen de electrones no apareados.

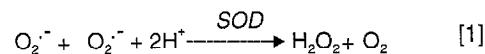
Formación en las células de los radicales libres del oxígeno

El superóxido se genera en la mayoría de las células aerobias por transferencia de un electrón al oxígeno molecular como producto colateral del transporte electrónico.

Existe una serie de enzimas cuya actividad normal puede generar el radical superóxido. Entre ellas se en-

cuentra el sistema xantina deshidrogenasa – xantina oxidasa del que nos ocuparemos más adelante. También los sistemas de transporte de electrones mitocondrial, microsomal o de los cloroplastos en los vegetales con clorofila, pueden accidentalmente perder electrones pasando éstos directamente al oxígeno reduciéndolo a superóxido ^(11,12). En condiciones de normoxia aproximadamente 1 o 2% del oxígeno consumido por las mitocondrias sigue esta vía, aumentando mucho durante la hiperoxia ⁽¹³⁾. Los macrófagos pueden generar superóxido durante los procesos inflamatorios por activación de la NADPH oxidasa de sus membranas plasmáticas, el que es utilizado para destruir determinadas cepas bacterianas. También generan otros oxidantes como el ácido hipocloroso (HOCl). El papel de los macrófagos en la producción de radicales libres en los procesos inflamatorios parece ser muy importante en la broncodisplasia, enterocolitis necrotizante y en los mecanismos de isquemia–reperfusión. Algunas reacciones de autooxidación como la de la hemoglobina, del citocromo P-450, de las catecolaminas, etc. también pueden producir superóxido.

La segunda etapa de la reducción univalente del oxígeno es la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede originarse a partir del superóxido en la reacción de dismutación catalizada por la superóxido dismutasa [1].



Esta reacción permite la eliminación del superóxido con formación de peróxido de hidrógeno y oxígeno. También puede ocurrir en ausencia de enzima, pero es muy lenta. Como ya fue señalado el H_2O_2 no es un radical libre. Es sin embargo un oxidante, tóxico para las células, cuya incubación con éste compuesto puede lesionar el ADN, ocasionar la ruptura de membranas, o liberar iones calcio activando las enzimas proteolíticas dependientes de este ion ⁽¹⁴⁾. También se ha atribuido al peróxido de hidrógeno un papel importante en el desarrollo de cataratas seniles ^(15,16).

El H_2O_2 atraviesa fácilmente las membranas y accede a toda la célula. Su toxicidad local depende de la presencia de enzimas tales como la catalasa y la glutatión peroxidasa que lo destruyen. Depende también de la velocidad con que es convertido a radicales muy reactivos como el radical hidroxilo, siendo muy probable que el daño celular ocasionado por el H_2O_2 y el O_2^- sea el resultado de esta conversión. El radical hidroxilo tiene una vida media muy corta (1 nanosegundo), lo que le permite actuar únicamente en el lugar de su formación o en su proximidad. Dependiendo del sitio de formación del

• OH, éste puede no tener efectos biológicos o puede occasionar cambios celulares muy importantes, como podría ser su acción sobre la estructura del ADN. Posiblemente el daño biológico causado por el • OH mejor estudiado, es la estimulación de una reacción en cadena conocida como peroxidación lipídica o lipoperoxidación. Cuando este radical se genera cerca de las membranas biológicas, puede atacar los ácidos grasos de los fosfolípidos que las constituyen, preferentemente los poli-insaturados como por ejemplo el ácido araquidónico. Se constituye una reacción en cadena en que un • OH puede dar lugar a que cientos de moléculas de ácidos grasos se conviertan en lipohidroperóxidos cuya acumulación desorganiza la función de la membrana, pudiendo incluso llegar a destruirla. Además los lipohidroperóxidos se pueden descomponer en una serie de productos citotóxicos, siendo los aldehídos los más perjudiciales. Los radicales lipoperoxí que se forman y los aldehídos citotóxicos pueden occasionar un daño importante a las proteínas de las membranas inactivando enzimas y receptores.

Papel de los iones de metales de transición en las reacciones de radicales libres.

La formación del radical hidroxilo depende de una reacción catalizada por iones de metales de transición (hierro, cobre), siendo los iones hierro, aparentemente, los más probables promotores de las reacciones de los radicales libres. En la reacción de Fenton [2], el ion ferroso reacciona con el peróxido de hidrógeno dando lugar a la formación del radical hidroxilo que es muy reactivo e interacciona rápidamente con el ADN, las proteínas y los lípidos⁽¹⁷⁾.

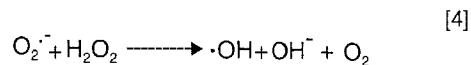


Reacción de Fenton [2]

La célula recibe de la sangre el hierro como ion férrico unido a la transferrina⁽¹⁸⁾. El complejo formado por la transferina y el hierro es captado por receptores específicos de la superficie celular siendo internalizado por endocitosis. El medio ácido del endosoma libera el ion férrico de la transferrina que puede ser incorporado en algunas proteínas o almacenado como ferritina, mientras que el complejo transferrina-receptor es reciclado a la superficie celular. El ion férrico, además de liberado de la transferrina, también puede ser movilizado de la ferritina, constituyéndose el *pool* de hierro no unido a las proteínas necesario para la injuria oxidativa y que puede ser retirado de la circulación por quelantes del ion férrico, tales como la desferroxamina⁽¹⁹⁾. El ion férrico reacciona con el superóxido como se indica en [3].



En su conjunto las reacciones [2] y [3] son conocidas como reacción de Haber-Weiss, siendo el resultado neto de ambas representado en [4].



Todas las reacciones que generan O_2^- , debido a la reacción de dismutación también forman H_2O_2 . Habiendo flujo continuo de O_2^- , éste puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno para generar el • OH que de este modo se iría formando durante el metabolismo oxidativo normal⁽¹¹⁾.

Especies reactivas del oxígeno

La mayor fuente de radicales libres en los sistemas biológicos es el oxígeno. Ya hemos señalado que el peróxido de hidrógeno, que es un oxidante, no es un radical libre por no tener en su estructura electrones no apareados. La denominación “especies reactivas del oxígeno” designa colectivamente al O_2^- y al • OH, que son radicales libres, y al H_2O_2 que no lo es⁽²⁰⁾. También, por ser un oxidante enérgico, es incluido en este grupo, sin ser un radical libre, el ácido hipocloroso (HOCl) producido por las células fagocíticas en una reacción entre el ion cloruro y el peróxido de hidrógeno catalizada por la mieloperoxidasa. De acuerdo con lo que antecede se da el nombre de oxidantes, al O_2^- , H_2O_2 , • OH y HOCl⁽²⁰⁾, aunque estrictamente esta denominación es válida solamente para el H_2O_2 , • OH y HOCl, dado que en algunas circunstancias el O_2^- puede ser reductor.

También se considera como una especie reactiva del oxígeno al radical libre óxido nítrico, NO^- ⁽²¹⁾. Este es sintetizado a partir de la arginina por la enzima óxido nítrico sintetasa en las células endoteliales, los neutrófilos, las neuronas y las microglías. A pesar de sus múltiples funciones fisiológicas (vasodilatación, prevención de la agregación plaquetaria, neurotransmisión, etc.), el óxido nítrico es muy tóxico, dado que puede aumentar la toxicidad del superóxido al reaccionar con él para dar peroxinitrito que es tóxico, y que además, en ciertas condiciones, se descompone dando lugar a la formación de radical hidroxilo y dióxido de nitrógeno⁽²²⁾.

Defensa antioxidante

Las células cuentan con una serie de mecanismos que las protegen contra el estrés oxidativo. Este se puede definir como un trastorno del equilibrio entre los radicales libres oxidantes y los mecanismos antioxidantes en favor de los primeros, y que lleva a la producción de un daño celular⁽²¹⁾. En otras palabras, estrés oxidativo se refiere a un au-

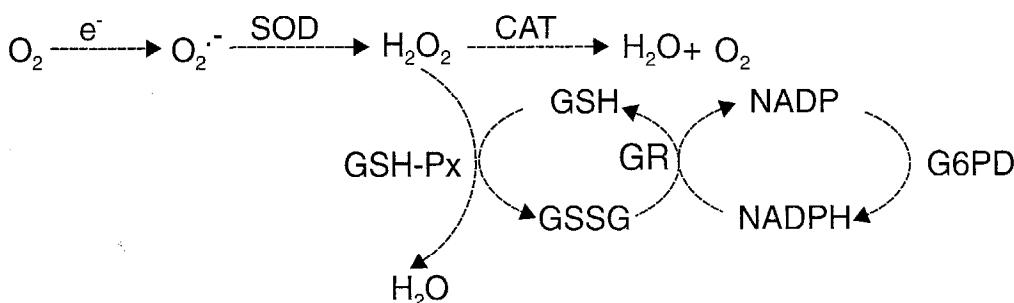


Figura 3. Mecanismo enzimático de eliminación de radicales libres del oxígeno. Tomado de ⁽²³⁾. SOD - Superóxido dismutasa. CAT - Catalasa. GSH-Px - Glutatión peroxidasa. GR - Glutatión reductasa. G6PD - Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. GSH - Glutatión reducido. GSSG - Glutatión oxidado. NADP - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado. NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

mento de producción de superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, contando las células con una serie de mecanismos que las protegen contra este aumento. Existe la posibilidad de prevenir la generación de radicales, de destruir los oxidantes una vez formados, o de reparar los daños producidos por ellos. El organismo puede también compartmentar algunos radicales libres que son generados para fines específicos, como ocurre, por ejemplo, en la fagocitosis en que las enzimas generadoras de oxidantes bactericidas están localizadas en los lisosomas. Todos estos mecanismos pueden ser de dos tipos: enzimáticos y no enzimáticos.

Mecanismos enzimáticos de eliminación de los radicales libres

Sun ⁽²³⁾ divide las enzimas antioxidantes en dos grupos. Un grupo denominado primario, constituido por enzimas involucradas directamente en la eliminación del superóxido, peróxido de hidrógeno o radical hidroxilo, y el otro, secundario, que colabora con el anterior manteniendo la concentración de los metabolitos necesarios para su actividad.

Las enzimas antioxidantes primarias son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px). La SOD cataliza la conversión enzimática del O_2^- en H_2O_2 a una velocidad muy superior de la conversión espontánea [1]. Se trata en realidad de una familia de enzimas, presentes en el citosol y las mitocondrias, habiendo también una forma especial en el líquido extracelular. También se encuentra en las bacterias aerobias. La CAT que elimina el H_2O_2 , está presente en la mayoría de los órganos animales sobre todo en los peroxisomas. Es específica del peróxido de hidrógeno. La GSH-Px complementa la actividad de la catalasa en la metabolización del H_2O_2 , estando localizada predominantemente

en el citoplasma. Esta enzima presenta dos formas, una que requiere selenio para su actividad y que utiliza como sustrato el peróxido de hidrógeno, y otra que no requiere selenio y cataliza la degradación de peróxidos orgánicos, especialmente lipoperóxidos. La reducción de estos peróxidos está acoplada a la oxidación del glutatión reducido (GSH), generando glutatión oxidado (GSSG). El mecanismo de regeneración del GSH a partir del GSSG, se realiza por la acción de la enzima glutatión reductasa que requiere para su actividad la coenzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido). La provisión de NADPH se realiza por el metabolismo de la glucosa a través del ciclo de las pentosas, sobre todo por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Las dos enzimas citadas en último término, constituyen las enzimas secundarias que mencionamos más arriba. En la figura 3 se representa esquemáticamente este mecanismo.

El glutatión reducido es también importante para mantener un *pool* de ácido ascórbico reducido utilizado para suprimir radicales libres.

Los peróxidos también pueden ser eliminados, aunque en un grado menor, por la acción de la enzima glutatión-S-transferasa, dado que los compuestos conjugados con glutatión son metabólicamente inactivos, siendo excretados. Cuando hay un déficit de GSH-Px la actividad de la glutatión-S-transferasa aumenta como un posible mecanismo compensatorio.

Metales de transición como antioxidantes

Hemos visto que los iones de los metales de transición pueden actuar como catalizadores de la formación de radicales libres. Si se mantiene baja la concentración de estos iones metálicos ya sea por agentes quelantes o por su unión con determinadas proteínas, que pueden funcionar como agentes quelantes, se anula su posibilidad de

participar en las reacciones de los radicales libres. Los metales más importantes en este sentido son el hierro, cobre, zinc, manganeso y selenio. Las proteínas que se unen a estos metales son consideradas como antioxidantes primarios porque previenen que estos metales participen en la formación de radicales libres⁽²⁴⁾. Así por ejemplo el hierro se une a proteínas tales como la transferrina, lactoferrina o ferritina y el cobre se une a la albúmina o ceruloplasmina. Los organismos mantienen los iones de los metales de transición secuestrados en las proteínas de almacenamiento (p.ej. ferritina) o de transporte (p.ej. transferrina), siendo este secuestro una parte importante de la defensa antioxidante extracelular⁽²⁵⁾. Las reacciones de los radicales libres pueden ser estimuladas por una lesión tisular o por fármacos citotóxicos utilizados en quimioterapia, que aumentan la cantidad de hierro libre en circulación.

Vitaminas y otros antioxidantes

La función de los antioxidantes de este grupo es interrumpir la propagación de los radicales libres y prevenir la reacción en cadena de la peroxidación.

Uno de los compuestos más importantes de este grupo es la vitamina E, sobretodo el alfa-tocoferol, presente en las membranas celulares y en la LDL (lipoproteína de baja densidad). Su importancia radica en el hecho que es capaz de prevenir la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados por la presencia en su estructura de un grupo -OH (alfa-tocoferol-OH) cuyo hidrógeno es fácilmente separable de la molécula. Durante la peroxidación se generan radicales peroxilo y alcoxilo que se combinan preferentemente con el alfa-tocoferol en lugar de hacerlo con el ácido graso adyacente, terminando la reacción en cadena. El alfa-tocoferol-O[•] (tocoferol radical) que se forma, es muy poco reactivo, siendo incapaz de atacar las cadenas laterales de los ácidos grasos adyacentes. Puede migrar hacia la superficie de la membrana y ser convertido nuevamente en alfa-tocoferol por medio de una reacción con el ácido ascórbico⁽²⁶⁾. Es probable que el glutatión reducido también esté involucrado en la regeneración del alfa-tocoferol a partir de su radical⁽²⁷⁾. El contenido en alfa-tocoferol de la lipoproteína de baja densidad (LDL) circulante, ayuda a aumentar su resistencia a la lipoperoxidación, afectando el desarrollo de la aterosclerosis. Ha sido señalado que niveles plasmáticos bajos de alfa-tocoferol y de vitamina C se correlacionan con una incidencia aumentada de infarto de miocardio y algunas formas de cáncer⁽²⁸⁾. Por otra parte la vitamina C es un buen eliminador de oxidantes tales como el H₂O₂, O₂[•] y •OH. Siendo hidrosoluble, el ascorbato se encuentra en el citosol y en los fluidos extracelulares donde es oxidado por diversos oxidantes a dehidroascor-

bato que protege las partículas lipídicas y las membranas de una oxidación potencial. El dehidroascorbato es reducido nuevamente a ascorbato en una reacción en que interviene el glutatión reducido.

Los carotenoides eliminan los radicales peroxilo, sobretodo a una tensión baja de oxígeno, tal como se encuentra en el organismo. El licopeno es uno de los antioxidantes carotenoides más potentes. La forma reducida de la coenzima Q, el ubiquinol 10, es muy efectivo como eliminador de radicales peroxilo lipídicos, pudiendo funcionar también como regenerador de la vitamina E oxidada.

El ácido úrico también puede eliminar radicales libres, siendo un estabilizador del ascorbato. También la glucosa y el piruvato pueden eliminar radicales •OH, y según algunos estudios, la coenzima NADPH y la carnitina también pueden reducir el estrés oxidativo.

Bilirrubina: un antioxidante potencial en el recién nacido

Es bien conocido el hecho que una elevada concentración de bilirrubina plasmática puede ser la causa de una lesión neurológica en el recién nacido (kernicterus). En nuestro medio, ya en el año 1945 Peluffo se ocupó del tema⁽²⁹⁾ y en 1960 Ramón Guerra y col. publicaron un estudio sobre la bilirrubina y la espectrofotometría sérica de 59 casos de enfermedad hemolítica fetal⁽³⁰⁾. Hoy se sabe que es la bilirrubina no conjugada y no unida a la albúmina (llamada también "bilirrubina libre") la que es tóxica para las células nerviosas, y que esta toxicidad puede ser prevenida si la bilirrubina está unida a la albúmina. Los niños prematuros, con un peso bajo al nacer, pueden desarrollar un kernicterus con una concentración de bilirrubina plasmática más baja que los de término.

A pesar de su toxicidad potencial, casi 95% de los niños de término y prematuros, tienen una hiperbilirrubinemia en los primeros días de vida, lo que sugiere que de algún modo la bilirrubina puede ser necesaria para los recién nacidos. En 1987 Stocker y col.⁽³¹⁾ reportaron que la bilirrubina tiene funciones antioxidantes con capacidad de destruir radicales libres *in vitro*. En este sentido sería beneficiosa en los neonatos, los que en el momento de nacer se ven expuestos a un ambiente relativamente hiperóxico, con formación potencial de radicales libres derivados del oxígeno, pudiendo actuar la bilirrubina como antioxidante. Posteriormente, en 1991, Benaron y Bowe⁽³²⁾ postularon que *in vivo* la bilirrubina no sólo actuaría como un antioxidante, sino que sería consumida en una reacción mediada por radicales libres. Es de hacer notar que el estudio de Benaron y Bowe fue solo retrospectivo y no demostró en forma directa el consumo de bilirrubina. Estudios recientes incluyen en forma definitiva a la bilirrubina entre los antioxidantes plasmáticos del recién nacido⁽³³⁾. En este sentido Hegyi y col.⁽³⁴⁾

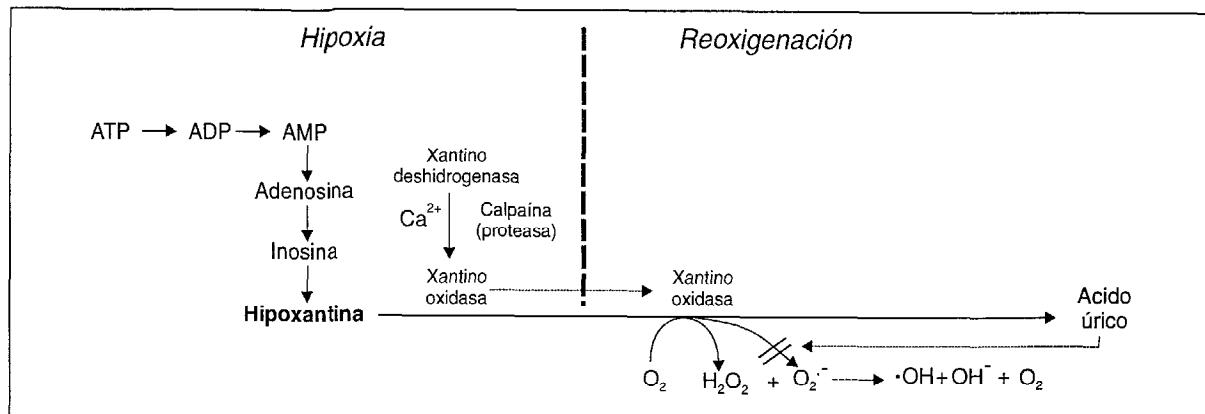


Figura 4. Formación de radicales de oxígeno por el sistema hipoxantina-xantina oxidasa. Durante la hipoxia se acumula hipoxantina que es oxidada en la etapa de reoxigenación a xantina y luego a ácido úrico por la actividad catalítica de la enzima xantina oxidasa. Al mismo tiempo se forman peróxido de hidrógeno y radical superóxido, que al reaccionar entre sí dan origen al radical hidroxilo. Por otra parte el ácido úrico es un antioxidante eliminador de radicales libres. Basado en (8) y (38). ATP - Adenosina trifosfato. ADP - Adenosina difosfato. AMP - Adenosina monofosfato

insisten sobre la función protectora de la bilirrubina en las enfermedades por radicales de oxígeno en los recién nacidos pretérmino, señalando que encontraron niveles superiores de bilirrubina asociados a una menor incidencia de lesiones mediadas por estos compuestos.

Reparación de los daños producidos por los oxidantes

Una vez producida la lesión por los radicales libres, la zona dañada puede ser degradada o reparada. Existen enzimas de reparación del ADN, así como la posibilidad de degradar las proteínas dañadas por los radicales libres, o de metabolizar los hidroperóxidos lipídicos.

Mecanismo de la agresión hipóxico-isquémica

En la fase inicial de la agresión hipóxico-isquémica, cuando ésta es de suficiente severidad, se produce una alteración del metabolismo energético celular con disminución de las reservas de ATP. Cuando la presión parcial del oxígeno mitocondrial cae por debajo de determinados valores críticos ($<0,1$ mmHg), la producción de ATP por fosforilación oxidativa disminuye, con acumulación simultánea de ADP y AMP debido a la hidrólisis del ATP (35). Posteriormente también el ADP es utilizado con fines energéticos, y el AMP es degradado para dar sucesivamente adenosina, inosina e hipoxantina (figura 4). Luego de la resucitación, las concentraciones de ATP, ADP y AMP nunca se recuperan completamente (36) y la pérdida de estos compuestos refleja la severidad de la destrucción tisular (37).

Con la pérdida de ATP, los procesos metabólicos que requieren un aporte de energía se ven comprometidos. Hay una alteración de la bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP dependiente, lo que origina una acumulación intracelular de

Na^+ , Cl^- y H_2O , (edema citotóxico). Otra función ATP dependiente alterada es la salida del Ca^{2+} a través de la membrana celular con acumulación intracelular de este ion.

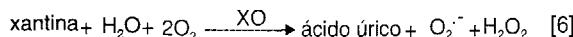
El aumento del ADP y AMP estimula la glucolisis que es un mecanismo poco eficiente para generar ATP, dado que consume 18 veces más glucosa que la fosforilación oxidativa mitocondrial. La oxidación anaerobia de la glucosa por este mecanismo, aumenta la producción de ácido láctico, dando lugar a una acidosis láctica (acidosis metabólica).

Si bien la isquemia con anoxia no favorece la generación de oxirradicales, en la etapa de reperfusión con reoxigenación se produce un verdadero estallido de formación de estos compuestos (7). Cuando en modelos de órganos aislados la reperfusión es separada experimentalmente de la reoxigenación, las lesiones más importantes están asociadas con la admisión del oxígeno y no con el restablecimiento del flujo sanguíneo (38). Este fenómeno ha sido denominado "paradoja del oxígeno" (oxygen paradox), habiéndose propuesto que los radicales del oxígeno están involucrados en la producción de la lesión causada durante la reperfusión (39). McCord (7) sugirió que durante la isquemia con anoxia, algunas enzimas que normalmente no generan radicales libres cambian de carácter y se convierten en generadores de los mismos cuando se aporta oxígeno. Es el caso de la xantina deshidrogenasa que en estas condiciones se convierte en xantina oxidasa.

Esta enzima es sintetizada como xantina deshidrogenasa (XD), que no puede transferir electrones al oxígeno molecular, sino que lo hace a la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), reduciéndola a $\text{NADH} + \text{H}^+$ [5]:



En determinadas condiciones experimentales la xantina deshidrogenasa puede convertirse en xantina oxidasa (XO), que en lugar de reducir el NAD⁺ puede transferir electrones al oxígeno molecular, produciendo superóxido y peróxido de hidrógeno [6]. Estos pueden reaccionar entre sí dando origen al radical hidroxilo (figura 4).



McCord [7] y sus colaboradores encontraron que la conversión de la XD a XO ocurre también *in vivo* en tejidos isquémicos por acción de la calpaína, una proteasa dependiente de iones calcio (Ca²⁺). Por lo tanto, aunque la reoxigenación de los tejidos es por un lado beneficiosa, por el otro ocasiona un aumento de formación de oxirradicales oxidantes, empeorando el daño causado por la isquemia. El agregado de antioxidantes cuando se restituye la oxigenación tiene un efecto protector. Los antioxidantes utilizados incluyen la SOD y la desferroxamina, la última un quelante de los iones hierro [25]. También el allopurinol y otros inhibidores de la xantina oxidasa tienen un efecto protector.

En resumen, las alteraciones fisiopatológicas más importantes de la fase inicial de la agresión hipóxico-isquémica son el agotamiento de las reservas de energía con alteración de varias funciones celulares que requieren su aporte, acompañado de una desviación del metabolismo aerobio al anaerobio y cambio de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa. Esta fase inicial es seguida por otra de reperfusión con reoxigenación de los tejidos hipóxico-isquémicos (fase tardía). En esta fase, la xantina oxidasa utiliza el oxígeno molecular produciendo el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno. De la reacción entre ambos resulta la formación del radical hidroxilo.

Implicancia en la patología neonatal

Encefalopatía hipóxico-isquémica del recién nacido
Hay aún información insuficiente sobre la relación existente entre la formación de radicales libres del oxígeno y el daño cerebral producido por la hipoxia-isquemia del recién nacido [37]. En un trabajo reciente Palmer y Vannucci [40] afirman que la terapia preventiva de la lesión cerebral producida por la hipoxia-isquemia perinatal debe incluir el uso de los inhibidores o eliminadores de oxirradicales [40].

Como ya fue señalado, durante la hipoxia-isquemia hay una pérdida de ATP con acumulación de hipoxantina que es metabolizada en la fase de reoxigenación por la enzima xantina oxidasa a xantina primera y ácido úrico

después, con producción de superóxido y peróxido de hidrógeno (figura 4). En el cerebro la xantina oxidasa se encuentra en las células endoteliales de la microvasculatura [41] habiendo también otras fuentes de formación de superóxido tales como el metabolismo de ácidos grasos libres y de las prostaglandinas, trastorno de la fosforilación oxidativa mitocondrial, o activación de neutrófilos y macrófagos [40]. Por otra parte, Armstead y col. [42] habían señalado con anterioridad la aparición de oxirradicales en el espacio subaracnóideo de cerdos recién nacidos sometidos a hipoxia-isquemia. Según Rosenberg y col. [43] estos compuestos serían importantes en la producción de la lesión tisular en la etapa de reperfusión cerebral que sigue a la asfixia. Si bien Vetteranta y Raivio [44] no pudieron detectar la actividad de xantina oxidasa en el cerebro de fetos humanos, Palmer y col. [45] demostraron que el allopurinol, que es un inhibidor de esta enzima [46], disminuye el daño cerebral producido por la anoxia-isquemia. Se debe tener en cuenta también, que el allopurinol podría tener un efecto neuroprotector independiente de la inhibición de la xantina oxidasa, por su acción de eliminador de radicales libres [47] u otros efectos que deben ser estudiados [45].

Es de hacer notar que el recién nacido humano, en particular el pretérmino, puede ser particularmente susceptible a lesiones producidas por radicales libres debido a un déficit relativo de la superóxido dismutasa cerebral y relativa dificultad de secuestrar iones hierro [40]. Resulta también necesario mencionar que es probable que las microglías activadas contribuyan a la lesión cerebral hipóxico-isquémica del animal neonato por la producción de óxido nítrico [40].

Además de la acción potencial de la radicales libres, el déficit energético celular, la alteración de la bomba de Na⁺-K⁺ con el resultante edema cerebral, la acidosis láctica y el desequilibrio de los aminoácidos excitatorios, son otros mecanismos fisiopatológicos importantes en la producción de la encefalopatía hipóxico-isquémica del recién nacido.

Enterocolitis necrotizante

La enterocolitis necrotizante es una enfermedad que afecta a 10% de los recién nacidos de muy bajo peso [48]. Tradicionalmente se ha vinculado su aparición a una combinación de isquemia intestinal, agentes infecciosos y alimentación [49]. Aunque aun se desconoce la etiología de esta enfermedad, la isquemia-reperfusión parece ser un factor importante en su patogénesis [50]. El intestino neonatal parece ser más susceptible a la lesión isquémica, debido en parte a su pobre circulación colateral en comparación a la del intestino adulto [51]. La agresión isquémica produce en el intestino un aumento de la permea-

bilidad capilar⁽⁷⁾ que se suma a la inmadurez de la mucosa intestinal de los niños pretérmino, sobretodo de los menores de 34 semanas de edad gestacional, lo que permite el pasaje de moléculas de bajo peso⁽⁵²⁾. En un modelo animal neonatal se vio que este aumento de la permeabilidad capilar secundario a la agresión isquémica es aún mayor cuando hay alimento presente en el intestino⁽⁵³⁾.

Los radicales del oxígeno parecen ser directamente responsables del aumento de la permeabilidad capilar secundaria a la isquemia intestinal, ya que inhibidores de la xantino-oxidasa (como el allopurinol) y los lavadores de radicales libres como la superóxido dismutasa y los agentes quelantes del hierro (como la desferroxamina) pueden disminuir la permeabilidad en el proceso de isquemia-reperfusión del intestino⁽⁵⁴⁾. La superóxido dismutasa también ha sido capaz de disminuir el daño intestinal en un modelo animal de enterocolitis necrotizante⁽⁵⁵⁾. Sin embargo se ha comprobado que el intestino del neonato carece de la enzima xantina oxidasa y se cree que especies reactivas del oxígeno tales como el peróxido de hidrógeno, se producirían por la actividad de la NADPH oxidasa de los fagocitos intestinales y estarían involucradas en la lesión intestinal por isquemia⁽⁵³⁾.

El intestino neonatal parece ser más vulnerable a la acción del peróxido de hidrógeno porque carece de catalasa, tiene una actividad baja de glutatión peroxidasa y una actividad elevada de la superóxido dismutasa⁽⁵⁶⁾.

Es interesante destacar que la incidencia de la enterocolitis necrotizante parece ser menor en los niños que reciben leche materna⁽⁵⁷⁾, habiéndose demostrado que el calostro humano tiene propiedades antioxidantes disminuyendo la producción de peróxido de hidrógeno por los macrófagos⁽⁵⁸⁾.

Retinopatía del prematuro

La retinopatía del prematuro (RP), antes denominada fibroplasia retrolental, fue descrita por Terry en 1942⁽⁵⁹⁾, pero recién en 1956 se pudo establecer definitivamente su relación causal con la hiperoxia⁽⁶⁰⁾. A partir de entonces, con el uso más moderado del oxígeno evitando concentraciones superiores a 40%, la incidencia de la RP disminuyó. Sin embargo, en la última década con el aumento de la posibilidad de sobrevida del recién nacido de muy bajo peso, la frecuencia de esta enfermedad aumentó nuevamente⁽⁸⁾. Hoy se acepta que son muchos los factores que contribuyen a su desarrollo, incluyendo tanto la hiperoxia como la hipoxia, la sepsis, la prematuridad con peso muy bajo al nacer, el déficit de vitamina E, los radicales libres derivados del oxígeno, etc.⁽⁶¹⁾.

Saugstad y col.⁽⁶²⁾ encontraron niveles elevados de hipoxantina en el humor vítreo de niños prematuros falle-

cidos a causa de un severo problema respiratorio. Considerando que la hipoxantina es un generador potencial de radicales de oxígeno y que los recién nacidos prematuros tienen una actividad antioxidante sérica baja que aumenta con la edad gestacional⁽⁶³⁾, la acumulación de hipoxantina en los ojos del prematuro podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de la retinopatía del prematuro. Si bien aún no se tienen datos sobre la actividad de la xantina oxidasa en el endotelio vascular del ojo humano, se sabe que los radicales del oxígeno tienen propiedades vasoactivas las que aún no fueron estudiadas en los vasos de la retina. Saugstad admite sin embargo que es razonable especular que los radicales del oxígeno afecten la circulación de la retina⁽⁸⁾.

Hittner y col.⁽⁶⁴⁾ hallaron que la administración de vitamina E a un grupo de niños prematuros disminuyó significativamente la severidad de la RP, lo que fue confirmado en estudios posteriores⁽⁶⁵⁾. Sin embargo, otros autores como Phelps y col.⁽⁶⁶⁾, no encontraron que la vitamina E tenga un efecto protector para el desarrollo de la RP. En este sentido, también Lockitch concluye⁽⁶⁷⁾ que el efecto de la vitamina E sobre la RP es menos convincente que para otras enfermedades. Estos resultados conflictivos indican que la retinopatía de la prematuridad es una enfermedad multifactorial, siendo probable que un solo tratamiento no sea efectivo en todos los casos. Por otra parte es bien sabido que la retina es muy sensible al estrés oxidativo y al déficit de antioxidantes, lo que puede relacionarse con su actividad metabólica y consumo de oxígeno muy elevados⁽⁶⁸⁾.

Broncodisplasia pulmonar

El daño pulmonar debido a la hiperoxia es uno de los principales factores contribuyentes al desarrollo de la broncodisplasia pulmonar (BDP). La lesión pulmonar que surge a consecuencia de la exposición a niveles elevados de oxígeno ha sido ampliamente estudiada en modelos animales. Más de 50% de ratas recién nacidas expuestas a una concentración de oxígeno mayor de 95% muere antes del séptimo día⁽⁶⁹⁾, encontrándose en ellas una lesión pulmonar caracterizada por edema alveolar y hemorragia. Según Freeman y Tanswell⁽⁷⁰⁾ en una primera etapa la lesión pulmonar ocasionada por la hiperoxia se debe a un exceso de producción de radicales libres del oxígeno, que atacan inicialmente las células del epitelio bronquial y alveolar, así como también las del endotelio capilar que se edematizan y necrosan.

En una segunda etapa se desarrolla un proceso inflamatorio con una invasión de neutrófilos que agrava el daño pulmonar al producir más radicales libres y liberar mediadores de la inflamación⁽⁷¹⁾. En esta etapa se afectan más las células tipo I del epitelio alveolar, que pare-

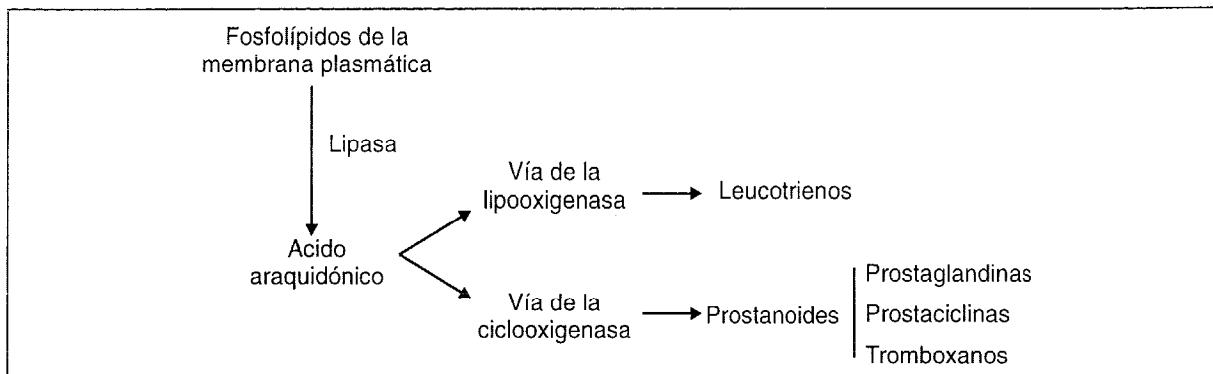


Figura 5. Metabolismo del ácido araquidónico

cen ser más susceptibles a los efectos tóxicos del oxígeno que las del tipo II, que toleran mejor la hiperoxia.

Si el enfermo sobrevive estas etapas iniciales, sobreviene la tercera fase o proliferativa, con intervención de fibroblastos, monocitos y células tipo II que se pueden transformar en las de tipo I. En esta etapa de reparación tendrían importancia ciertos factores de crecimiento producidos por los macrófagos alveolares y las células tipo II.

Otro efecto importante de la hiperoxia es una marcada inhibición del desarrollo pulmonar, habiéndose comprobado que el número de alvéolos y el área de intercambio gaseoso está muy disminuido en los niños con BPD⁽⁷²⁾. Esta interferencia en el crecimiento pulmonar podría estar relacionada con la acción de los radicales libres, sobretodo con el $\cdot\text{OH}$ que es muy agresivo para el ADN celular. La reacción de Haber-Weiss que produce $\cdot\text{OH}$ [4] puede ser inhibida por la acción de agentes quelantes del hierro como la desferroxamina y el 21-aminoesteroide U74389F, que administrados a ratas expuestas a hiperoxia inhiben la falla de crecimiento pulmonar^(73,74).

Existe una serie de hechos experimentales que confirman que los radicales libres contribuyen a la patogenia de la BDP⁽⁸⁾. Saugstad y col.^(75,76) señalaron que el sistema hipoxantina-xantina oxidasa puede ser el causante de lesiones pulmonares, dado que la instilación de esta enzima en la tráquea de determinados animales produce una hemorragia y edema disminuyendo la "compliance" pulmonar. Además la infusión intravenosa de hipoxantina en animales respirando 100% de oxígeno durante 48 horas, también produce una hemorragia y edema pulmonares con abolición de la función del surfactante⁽⁷⁷⁾. Tomando en cuenta que el pulmón contiene xantina oxidasa se puede considerar que el sistema hipoxantina-xantina oxidasa contribuye a la enfermedad crónica pulmonar⁽⁸⁾.

Por otra parte en el aire espirado por prematuros que han desarrollado BDP, se ha encontrado una concentración mayor de pentano y etano que en los que no han

desarrollado esta afección. Es sabido que estos gases son producto de la lipoperoxidación y que su elevada concentración indica una elevada actividad peroxidativa debida a la presencia de radicales de oxígeno⁽⁷⁸⁾. Finalmente, ya fue mencionado que la hiperoxia y los radicales libres de oxígeno inactivan el surfactante con todas sus consecuencias.

Al igual que en otras enfermedades por agresión del oxígeno, el daño pulmonar resultaría de un balance entre la exposición a la hiperoxia y la capacidad defensiva antioxidante del pulmón. A este respecto se debe recordar que las tres enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) aumentan normalmente en el pulmón fetal en el último período de la gestación⁽⁷⁹⁾, por lo que los niños de pretérmino nacerían con cantidades deficientes de ellas⁽⁸⁰⁾. En la etapa prenatal estas enzimas antioxidantes estarían reguladas por hormonas, ya que la administración a la madre de dexametasona produce una aceleración de su desarrollo fetal, paralela al aumento de producción de surfactante⁽⁸¹⁾.

Con el propósito de disminuir los efectos tóxicos del oxígeno y combatir la BDP, se ha intentado la administración de enzimas antioxidantes o la estimulación de su síntesis endógena. Se han observado efectos prometedores con la administración de liposomas encapsulados contenido superóxido dismutasa, o, superóxido dismutasa y catalasa, que son capaces de aumentar la sobrevida de ratas adultas expuestas a una atmósfera de 100% de oxígeno⁽⁸²⁾.

La estimulación de la producción endógena de enzimas antioxidantes es experimentalmente posible con el uso del oxígeno, endotoxinas o citoquinas. Si antes de exponer ratas adultas a 100% de oxígeno se les administra concentraciones subletales del mismo, la actividad de la superóxido dismutasa y de la glutatión peroxidasa aumenta⁽⁸³⁾. Por otra parte la administración de endotoxina previa a la exposición a 100% de oxígeno en ratas adultas produce una mejoría dramática de la sobrevida con un

aumento de la actividad de la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa⁽⁸⁴⁾. También el pretratamiento con citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral alfa y la interleuquina-1, aumenta la capacidad defensiva antioxidante pulmonar^(85,86).

En lo referente a la aplicación clínica de estos hechos experimentales, se puede considerar que la administración de enzimas antioxidantes a recién nacidos prematuros, tal vez en asociación con el surfactante, pueda ser posible en el futuro para intentar disminuir la incidencia de la BDP.

Hemorragia intraventricular

La hemorragia intraventricular es una complicación que afecta hasta 45% de los recién nacidos a una edad gestacional menor de 34 semanas⁽⁸⁷⁾. Esta complicación se produce a consecuencia de la rotura de los pequeños y frágiles vasos sanguíneos de la matriz germinal del cerebro en desarrollo. Estos vasos son incapaces de autorregular su caudal sanguíneo, siendo el flujo pasivo y dependiente del flujo sanguíneo cerebral⁽⁸⁸⁾. Durante los primeros días de vida los recién nacidos pretermínos se ven expuestos a episodios de hipo o hipercapnia, alteraciones de la presión arterial o asfixia, que pueden alterar el flujo sanguíneo cerebral⁽⁸⁹⁾, lo que ha sido relacionado con la aparición de hemorragia intraventricular^(90,91).

Las prostaglandinas sintetizadas en la microvasculatura cerebral, estarían involucradas en el desarrollo de la hemorragia intraventricular. La PG_{I2} (prostaciclina), es considerada la prostaglandina predominante en el cerebro⁽⁹²⁾ donde provoca una vasodilatación e inhibe la agregación plaquetaria^(92,93).

Las prostaglandinas, al igual que los tromboxanos y leucotrienos, derivan del ácido araquídónico y algunos otros ácidos grasos poliinsaturados de 20 átomos de carbono. El ácido araquídónico forma parte de la estructura de los fosfolípidos de la membrana plasmática de donde es liberado por una fosfolipasa pudiendo seguir dos vías metabólicas: vía de la lipooxigenasa, que va dar lugar a la formación de leucotrienos, y, vía de la ciclooxygenasa, catalizada por el complejo enzimático prostaglandina endoperóxido sintetasa, en que se sintetizan los prostanoïdes (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) (figura 5).

La prostaglandina endoperóxido sintetasa presenta dos actividades enzimáticas: ciclooxygenasa y peroxidasa. Por esta vía metabólica el ácido araquídónico es convertido a un endoperóxido, formándose primero la PGG₂ y luego la PGH₂. En esta etapa de la síntesis de las prostaglandinas se forman radicales libres tales como el radical superóxido. En una etapa posterior la PGH₂ es convertida a distintas prostaglandinas, prostaciclina o tromboxanos.

Cada célula produce solamente un tipo de prostanoide, encontrándose en el sistema nervioso central la prostaciclina, prostaglandina E₂ y tromboxano A₂.

Ya hemos señalado que se acepta que la hemorragia intraventricular se produce como consecuencia de alteraciones del flujo sanguíneo en el cerebro en etapa de desarrollo. Muchos autores consideran que el flujo sanguíneo cerebral y los cambios en la morfología y permeabilidad capilar serían controlados por prostaglandinas. En este sentido Ment y col.⁽⁹⁴⁾ demostraron en un modelo animal, que la indometacina, inhibidor de la actividad enzimática de ciclooxygenasa en la etapa en que se genera superóxido, previene las alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral y los cambios en la permeabilidad y morfología capilar en los animales expuestos a cambios tensionales. La indometacina permitiría una mejor regulación del flujo sanguíneo cerebral, actuaría como un eliminador de radicales libres, inhibiría el transporte activo del calcio en el músculo liso vascular e impediría la ruptura de capilares de la matriz germinal⁽⁹⁵⁾. Por otra parte Bandstra y col.⁽⁹⁶⁾ hallaron una disminución significativa de las hemorragia intraventricular grados 1 y 2 en niños prematuros tratados con indometacina profiláctica. Recientemente Ment y col.⁽⁹⁵⁾ en un estudio prospectivo y randomizado encontraron una disminución significativa de la hemorragia intraventricular en el grupo de prematuros que recibió indometacina profiláctica en las primeras 6 a 12 horas de vida.

También fue estudiado el efecto de la administración de la enzima superóxido dismutasa en un modelo animal, comprobándose que si bien disminuyó significativamente la incidencia de hemorragia intraventricular, no produjo modificaciones en el flujo sanguíneo cerebral o en los niveles de prostaglandinas⁽⁹⁷⁾.

Administración intravenosa de emulsión de lípidos

Los recién nacidos prematuros, durante las primeras semanas de vida, requieren frecuentemente una nutrición parenteral. La principal fuente de lípidos para los neonatos alimentados por esta vía son los aceites de soja (Intralipid, IL: KabiVitrum, Estocolmo, Suecia ; Cutter Laboratories, Berkeley, California, Estados Unidos) o de cártamo (Liposyn: Abbott Laboratories, North Chicago, Estados Unidos), con los triglicéricos estabilizados por fosfolípidos⁽⁹⁸⁾. Estas emulsiones contienen un porcentaje muy elevado de ácidos grasos poliinsaturados, siendo por ejemplo, la siguiente la composición de IL al 10%: ácido linoleico 54%, ácido oleico 26%, ácido palmitíco 9%, ácido alfa-linolénico 8%.

La peroxidación de los lípidos endógenos ha sido propuesta como uno de los mecanismos de la agresión oxidante del recién nacido, especialmente cuando está aso-

ciada a la hiperoxia⁽⁹⁹⁾. El aumento brusco de la tensión de oxígeno en los tejidos que ocurre al nacimiento, representa un estado de hiperoxia relativa que puede aumentar la lipoperoxidación. Esta también puede ser secundaria a una menor actividad antioxidante celular como ocurre en los recién nacidos pretérmino⁽⁸⁰⁾. Si bien la peroxidación forma parte, hasta cierto punto, del metabolismo normal, una lipoperoxidación importante está asociada a un daño tisular⁽¹⁰⁰⁾.

Una de las pruebas importantes en el estudio de la lipo-peroxidación *in vivo* es la determinación del etano y del pentano en el aire espirado. El etano se origina a partir de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (familia del ácido alfa-linolénico) y el pentano a partir de los omega-6 (familia de los ácidos linoleico, gamma-linolénico y araquidónico). Ha sido señalado que la cuantificación en el aire espirado de hidrocarburos volátiles es un método que refleja específicamente la peroxidación lipídica tanto *in vivo* como *in vitro*^(101,102). Wispe y col.⁽¹⁰³⁾ encontraron que la cantidad de etano y pentano excretados es superior en niños que en adultos, sugiriendo una mayor peroxidación en niños lo que está de acuerdo con lo señalado por McCarthy y col.⁽¹⁰⁴⁾ que utilizaron otros procedimientos.

Pitkänen y col.⁽¹⁰⁵⁾ utilizando diversos procedimientos, señalaron que la emulsión lipídica IL utilizada en la nutrición parenteral, puede sufrir una peroxidación con formación de radicales libres que ocasionan un daño celular. La infusión intravenosa de IL en niños prematuros produjo una eliminación de pentano en el aire espirado 3 a 28 veces mayor. Este aumento se debió parcialmente al pentano disuelto en el IL como resultado de la lipoperoxidación durante el almacenamiento. El resto fue generado por peroxidación *in vivo* luego de su administración al paciente⁽¹⁰⁵⁾. En la investigación realizada por Pitkänen y col.⁽¹⁰⁵⁾ con la administración de IL a ocho niños pretérmino de muy bajo peso, solamente uno falleció, y ninguno de los otros desarrolló secuelas severas tales como broncodisplasia pulmonar, retinopatía del prematuro o parálisis cerebral. Sin embargo, Hammerman y Aramburo⁽¹⁰⁶⁾ encontraron que el uso de emulsiones lipídicas estaba asociado a un aumento de la incidencia de broncodisplasia pulmonar y retinopatía del prematuro. En un estudio más reciente realizado con prematuros de 600 a 1000 g, Sosenko y col.⁽¹⁰⁷⁾ concluyen que la administración de IL antes de las 12 horas del nacimiento no ha protegido de una enfermedad pulmonar crónica a los prematuros de muy bajo peso. Los resultados obtenidos señalan la posibilidad de efectos deletéreos de la administración de IL si se administra en la primera semana de vida. La concentración de hidroperóxidos en las diferentes emulsiones de lípidos que se administran

en la clínica es de aproximadamente 10 pmol/L. La exposición a la luz ambiente y a la luminoterapia pueden aumentar más de 10 veces^(108,109). Debido a esto los mismos autores aconsejan que cuando se administren lípidos a neonatos en fototerapia se proteja el frasco y la tubuladura con papel de aluminio. En este sentido Andersson y col.⁽¹¹⁰⁾ insisten que las ventajas de la infusión parenteral de lípidos deben ser analizadas en función del daño potencial que pueden ocasionar.

Résumé

Les radicaux libres de l'oxygène, se forment sans cesse à l'organisme par le métabolisme normal, et sont éliminés par les défenses antioxydantes. Lorsqu'ils sont produits en trop, ils peuvent produire une lésion tissulaire, raison pour laquelle ils sont impliqués en beaucoup de maladies. On donne ici quelques notions sur la chimie de ces éléments, on résume le mécanisme de leur production et le rôle joué par les ions de ces métaux de transition. On insiste aussi sur l'importance de la défense antioxydante, dont la fonction est celle de prévenir l'oxydation, soit éliminant les espèces réactives de l'oxygène telles que le radical superoxyde, le radical hydroxyle ou le peroxyde de l'hydrogène, soit prévenant leur formation.

Les effets délétères de ces composés peuvent s'observer à plusieurs pathologies chez l'adulte ou l'enfant. Le nouveau-né est spécialement vulnérable, car il naît avec une protection insuffisante contre les radicaux libres de l'oxygène. On analyse le rôle que jouent les radicaux libres aux maladies suivantes: encéphalopathie hypo-ischémique, entéro-colite nécrotique, broncho-dysplasie pulmonaire, rétinopathie du prématuré et hémorragie intraventriculaire.

On analyse aussi l'importance de la lipoperoxydation dans l'administration intraveineuse d'une émulsion des lipides.

Summary

Oxygen free radicals are continuously produced during normal metabolism, while their elimination is carried out by antioxidant defenses. Excessive production of these compounds may lead to tissue injury and this mechanism has been implicated in the pathogenesis of several disease processes. The present revision offers some basic concepts on the chemistry of oxygen-derived free radicals, the mechanism of their production, and deals with the role of the transition metal ions. The importance of antioxidant defenses, capable of avoiding oxidation through the elimination of reactive oxygen species such as superoxide, hydroxyl radical and hydrogen peroxide, is also emphasized.

The deleterious effects of these compounds can be observed in several adult and pediatric pathologies. A defi-

ciency of antioxidant defenses renders the newborn infant, specially the premature, particularly vulnerable to the effects of these radicals.

In this conjunction, the role of the oxygen free radicals in the pathogenesis of hypoxic ischemic encephalopathy, necrotizing enterocolitis, bronchopulmonary dysplasia, retinopathy of prematurity and intraventricular hemorrhage, is analyzed. Also pointed out is the significance of lipid peroxidation during the intravenous administration of fat emulsions.

Bibliografía

1. Gerschman R, Gilbert DL, Nyl SW. Oxygen poisoning and X-ray irradiation; a mechanism in common. *Science* 1954; 119: 624-6.
2. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.
3. Korc I. Radicales libres. Su importancia en patología humana. *Rev Dir Nac Sanidad Policial* (2^a época) 1992; 9: 7-19.
4. Martell M, Belizán JM, Nieto F, Schwarcz R. Blood acid-base balance at birth in neonates from labors with early and late rupture of membranes. *J Pediatr* 1976; 89: 963-9.
5. Modanlov H, Yeh S, Hon EH. Fetal and neonatal acid-base balance in normal and high risk pregnancies. *Obstet Gynecol* 1974; 43: 347-53.
6. Phylactos AC, Ghebremeskel K, Costeloe AA, Leaf AA, Harbige LS, Crawford MA. Polyunsaturated fatty acids and antioxidants in early development. Possible prevention of oxygen-induced disorders. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48 (Suppl. 2): S17-S23.
7. McCord JM. Oxygen derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-63.
8. Saugstad OD. Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta Pediatr Scand* 1990; 79: 881-92.
9. Dormandy TL. Free-radical pathology and medicine. A review. *J Roy Coll Phys Lond* 1993; 23: 221-7.
10. Srivastava SK, Lal AK, Ansari NH. Defense system of red blood cells against oxidative damage. In: Srivastava, SK (editor). Red blood cell and lens metabolism. Developments in Biochemistry. New York: Elsevier/North Holland, 1980: 123-37 (vol. 9).
11. Fridovich I. A free radical pathology: superoxide radical and superoxide dismutases. In: Heinzelman, R.V. (editor); Annual Reports in Medical Chemistry. New York: Academic Press, 1975: 257-64 (vol. 10).
12. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *An. Rev. Pharmacol. Toxicol* 1983; 23: 239-57.
13. Turrens JF, Freeman BA, Crapo JD. Hiperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1982; 217: 411-21.
14. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987; 1: 358-4.
15. Spector A, Garner WH. Hydrogen peroxide and human cataracts. *Exp Eye Res* 1981; 33: 673-81.
16. Spector A. The search for a solution to senile cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25: 130-46.
17. Youngman RJ. Oxygen activation. Is the hydroxyl radical always biologically relevant? *Trends Biochem Sci* 1984; 2: 280.
18. Aisen P, Listowsky I. Iron transport and storage proteins. *Ann Rev Biochem* 1980; 49: 357-93.
19. Snyder JW. Mechanisms of toxic cell injury. *Clin Lab Med* 1990; 10: 311-21.
20. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91 (Suppl. 3C): 14S-22S.
21. Bankson DD, Kestin M, Rifai N. Role of free radicals in cancer and atherosclerosis. *Clin Lab Med* 1993; 13: 463-80.
22. Palmer C, Vannucci RC. Potential new therapies for perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Clin Perinatol* 1993; 20: 411-32.
23. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Radical Biol Med* 1990; 8: 583-99.
24. Mulholland CW, Strain JJ. Serum total free radical trapping ability in acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 1991; 24: 437-41.
25. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine; some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-14.
26. McCay PB. Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Ann Rev Nutr* 1985; 5: 323-40.
27. Weffers H, Sies H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation independent on vitamin E. *Eur J Biochem* 1988; 174: 353-7.
28. Gey KF, Brubacher GB, Stahelin HB. Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *Am J Clin Nutr* 1987; 45: 1368-77.
29. Peluffo E. Patología y clínica de la eritroblastosis del feto y del recién nacido. *Pediatría. XIV Curso de Perfeccionamiento*. Montevideo: LIGU, 1945: 44.
30. Ramón Guerra AU, Surraco G, Korc I, Fogel de Korc E, Urtazún J, País D. Bilirubinas, espectrofotometría y transaminasas séricas en la enfermedad hemolítica fetal. *Arch Pediat Uruguay* 1960; 31: 201-13, 285-92, 334-44.
31. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Aines BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; 235: 1043-6.
32. Benaron DA, Bowen FW. Variation of initial serum bilirubin rise in newborn infants with type of illness. *Lancet* 1991; 338: 78-81.
33. Lindeman JHN, Lentjes EGWM, Houdkamp E, Van Zoeren-Grobben D, Schrijver J, Berger HM. Effect of an exchange transfusion on plasma antioxidants in the newborn. *Pediatrics* 1992; 90: 200-3.
34. Hegyi T, Goldie E, Hiatt M. The protective role of bilirubin in oxygen-radical diseases of the preterm infant. *J Perinatol* 1994; 14: 296-300.
35. Sugano T, Oshino N, Chance B. Mitochondrial functions under hypoxic conditions: the steady state of cytochrome c reduction and energy metabolism. *Biochem Biophys Acta* 1974; 347: 340-58.

36. Kleihues P, Kobayashi K, Hossmann A. Purine nucleotide metabolism in the cat brain after one hour of complete ischemia. *J Neurochem* 1974; 23: 417-25.
37. Vannucci RC. Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 1990; 27: 317-26.
38. McCord JM. Oxygen-derived radicals and reperfusion injury. In: Cross, C.E. moderator; Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 533-5.
39. Guarneri C, Flamigni F, Calderara CM. Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart. *J Mol Cell Cardiol* 1980; 12: 797-808.
40. Palmer C, Vannucci RC. Potential new therapies for perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Clin Perinatol* 1993; 20: 411-32.
41. Betz AL. Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries. *J Neurochem* 1985; 44: 574-9.
42. Armstead WM, Mirro R, Busija DW, Leffler CW. Postischemic generation of superoxide anion by newborn pig brain. *Am J Physiol* 1988; 225: H401-3.
43. Rosenberg AA, Murdaugh E, White CW. The role of oxygen free radicals in post asphyxia cerebral hypoperfusion in newborn lambs. *Pediatr Res* 1989; 26: 215-9.
44. Vetteranta K, Raivio KO. Xanthine oxidase during human fetal development. *Pediatr Res* 1990; 27: 286-8.
45. Palmer C, Vannucci RC, Towfighi J. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res* 1990; 27: 332-6.
46. Kellogg EW, Fridovich I. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J Biol Chem* 1975; 250: 8812-7.
47. Moorhouse PC, Grootveld M, Hallivell B, Quinlan JG, Gutteridge JM. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett* 1987; 213: 23-8.
48. Uany R, Fanaroff AA, Korones SB, Phillips EA, Phillips JB, Wright LL. Necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. Biodemographic and clinical correlates. *J Pediatr* 1991; 119: 630-8.
49. MacKendrick W, Caplan M. Necrotizing enterocolitis. New thoughts about pathogenesis and potential treatments. *Pediatr Clin North Am* 1993; 40: 1047-59.
50. Crissinger KD, Granger DN. Mucosal injury induced by ischemia and reperfusion in the piglet intestine: influences of age and feeding. *Gastroenterology* 1989; 97: 920-6.
51. Crissinger KD, Granger DN. Characterization of intestinal collateral blood flow in the developing piglet. *Pediatr Res* 1988; 24: 473-6.
52. Weaver LT, Laker MF, Nelson R. Intestinal permeability in the newborn. *Arch Dis Child* 1984; 59: 236-41.
53. Crissinger KD, Crisham MB, Granger DN. Developmental biology of oxidant producing enzymes and antioxidants in the piglet intestine. *Pediatr Res* 1989; 25: 612-6.
54. Crissinger KD, Kviety PR, Granger DN. Pathophysiology of gastrointestinal mucosal permeability. *J Int Med* 1990; 228 (Suppl. 1): 145-54.
55. Miller MJS, McNeill H, Mullane KM, Caravella SJ, Clark DA. SOD prevents damage and attenuates eicosanoide release in a rabbit model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol* 1988; 255: G556-65.
56. Warner BB, Wispe JR. Free radicals-mediated diseases in pediatrics. *Semin Perinatol* 1992; 16: 47-57.
57. Lucas A, Cole T J. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* 1990; 336: 1519-23.
58. Buescher ES, McIlheran SM. Antioxidant properties of human colostrum. *Pediatr Res* 1988; 24: 14-9.
59. Terry TL. Extreme prematurity and fibroblastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. *Am J Ophthalmol* 1942; 25: 203-4.
60. Kinsey VE. Retrolental fibroplasia: cooperative study of retrolental fibroplasia and the use of oxygen. *Arch Ophthalmol* 1956; 56: 481-543.
61. Phelps DL. Retinopathy of prematurity. *Pediatr Clin North Am* 1993; 40: 705-14.
62. Saugstad OD, Rognum TO. High postmortem levels of hypoxanthine in the vitreous humor of premature babies with respiratory distress syndrome. *Pediatrics* 1988; 81: 395-8.
63. Sullivan JL, Newton RB. Serum antioxidant activity in neonates. *Arch Dis Child* 1988; 63: 748-50.
64. Hittner HM, Godio LB, Rudolph AJ, Adams JM, García Prats JA, Friedman Z et al. Retrolental fibroplasia: Efficacy of Vitamin E in a double-blind clinical study of preterm infants. *N Engl J Med* 1981; 305: 1365-71.
65. Kretzer FL, Mehta RS, Johnson AT, Hunter DG, Brown ES, Hittner HM. Vitamin E protects against retinopathy of prematurity through action on spindle cells. *Nature (Lond)* 1984; 309: 793-5.
66. Phelps DL, Rosenbaum AL, Isenberg SJ, Dorey FJ. Tocopherol efficacy and safety for preventing retinopathy of prematurity: a randomized controlled double mask trial. *Pediatrics* 1987; 79: 489-500.
67. Lockitch G. Perinatal and pediatric nutrition. *Clin Lab Med* 1993; 13: 387-406.
68. Cross CE. The spectrum of diseases. In: Cross, C.E., moderator. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 530-3.
69. Sosenko IRS, Frank L. Nutritional influences on lung development and protection against chronic lung disease. *Semin Perinatol* 1991; 15: 462-8.
70. Freeman BA, Tanswell AK. Biochemical and cellular aspects of pulmonary oxygen toxicity. *Adv Free Radical Biol Med* 1986; 1: 133-64.
71. Crapo JD. Morphologic changes in pulmonary oxygen toxicity. *Ann Rev Physiol* 1986; 48: 721-5.
72. Margraf LR, Tomashefski JF Jr, Bruce MC. Morphometric analysis of the lung in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 391-400.
73. Frank L. Hyperoxic inhibition of newborn rat lung development protection by deferoxamine. *Free Radical Biol Med* 1991; 11: 341-8.
74. Frank L, McLaughlin GE. Protection against acute and chronic hyperoxic inhibition of neonatal rat lung development with 21-aminosteroid drug U74389F. *Pediatr Res* 1993; 33: 632-8.
75. Saugstad OD, Becher G, Grossmann M, Merker G, Oddoy A, Lachmann B. Acute and chronic lung damage

- in guinea pigs induced by xanthine oxidase. *Intens Care Med* 1987; 13: 30-2.
76. **Saugstad OD, Hallman M, Becher G, Oddoy A, Liim B, Lachmann B.** Respiratory failure caused by intratracheal saline: additive effect of xanthine oxidase. *Biol Neonate* 1988; 54: 61-7.
77. **Saugstad OD, Hallman M, Abraham J, Epstein B, Cochrane C, Gluck L.** Hypoxanthine and oxygen induced lung injury: a possible basic mechanism of tissue damage? *Pediatr Res* 1984; 18: 501-4.
78. **Pitkänen OM, Hallman M, Andersson SM.** Correlation of free radical-influenced lipid peroxidation with outcome in very low birth weight infants. *J Pediatr* 1990; 116: 760-4.
79. **Frank L, Sosenko IRS.** Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species. *J Pediatr* 1987; 110: 106-10.
80. **Autor A, Frank L, Roberts R.** Developmental characteristics of pulmonary superoxide dismutase: relationship of idiopathic respiratory distress syndrome. *Pediatr Res* 1976; 10: 154-8.
81. **Frank L, Lewis PL, Sosenko IRS.** Dexamethasone stimulation of fetal rat lung antioxidant enzymes activity in parallel with surfactant stimulation. *Pediatrics* 1985; 75: 569-74.
82. **Padmanabhan RV, Gudapathy R, Liener IE.** Protection against oxygen toxicity in rats by the intratracheal administration of liposome encapsulated superoxide dismutase or catalase. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 164-7.
83. **Kimball RE, Reddy K, Pierce T.** Oxygen toxicity: augmentation of antioxidant defense in rat lung. *Am J Physiol* 1976; 230: L425-32.
84. **Frank L, Yam J, Roberts RJ.** The role of endotoxin in protection of adult rats from oxygen induced lung toxicity. *J Clin Invest* 1978; 61: 269-75.
85. **White CW, Glezz P, McMahon S.** Cytokines increase rat lung antioxidant enzymes during exposure to hyperoxia. *J Appl Physiol* 1989; 66: 1003-9.
86. **Warner BB, Burhans MS, Clark JC.** Tumor necrosis factor alfa increases Mn-SOD expression: protection against oxidant injury. *Am J Physiol* 1991; 260: L296-L301.
87. **Shankaran S, Bauer C, Bandstra E.** Intracranial hemorrhage (ICH) in 2928 <1500 g neonates (Abstract). *Pediatr Res* 1991; 29: 266A.
88. **Volpe JJ.** Intraventricular hemorrhage in the premature infant. Current concepts. Part I. *Ann Neurol* 1989; 25: 3-11.
89. **Ment LR, Ehrenkranz RA, Lange RC, Rothstein PT, Duncan ChC.** Alterations in cerebral flow in preterm infants with intraventricular hemorrhage. *Pediatrics* 1981; 68: 763-9.
90. **Fujimura M, Salisbury DM, Robinson RO, Howat P, Emerson PM, Keeling JW et al.** Clinical events relating to intraventricular hemorrhage in the newborn. *Arch Dis Child* 1979; 54: 409-14.
91. **Dykes FD, Lazzara A, Ahmann P, Blumenstein B, Schwartz J, Brann AW.** Intraventricular hemorrhage: a prospective evaluation of etiopathogenesis. *Pediatrics* 1980; 66: 42-9.
92. **Hagen AA, White RP, Robertson JT.** Synthesis of prostaglandins and thromboxane B₂ by cerebral arteries. *Stroke* 1976; 10: 651-9.
93. **Moncada S, Vane JR.** Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1978; 30: 293-331.
94. **Ment LR, Stewart WB, Duncan CC, Scott DT, Lambrecht R.** Beagle puppy model of intraventricular hemorrhage. Effect of indomethacin on cerebral blood flow. *J Neurosurg* 1983; 58: 857-62.
95. **Ment LR, Oh W, Ehrenkranz RA, Philip A, Vohr B, Allan W et al.** Low-dose indomethacin and prevention of intraventricular hemorrhage: a multicenter randomized trial. *Pediatrics* 1994; 93: 543-50.
96. **Bandstra ES, Montalvo BM, Goldberg RN, Pacheco I, Ferrer PL, Flynn J.** Prophylactic indomethacin for prevention of intraventricular hemorrhage in premature infants. *Pediatrics* 1988; 82: 533-40.
97. **Ment LR, Stewart WB, Duncan CC.** Beagle puppy model of intraventricular hemorrhage: effect of superoxide dismutase on cerebral blood flow and prostaglandins. *J Neurosurg* 1985; 62: 563-9.
98. **Zlotkin SH, Stallings VA.** Total parenteral nutrition in the newborn: An update. *Adv Nutr Res* 1985; 7: 251-69.
99. **Freeman BA, Topolsky MK, Crapo JD.** Hyperoxia increased oxygen radical production in rat lung homogenates. *Arch Biochem Biophys* 1982; 216: 477-84.
100. **Dormandy TL.** In praise of lipid peroxidation. *Lancet* 1988; 2: 1126-8.
101. **Demelin EE, Tappel AL.** Hydrocarbon gases produced during *in vitro* peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides. *Lipids* 1977; 12: 894-900.
102. **Riely CA, Cohen G, Lieberman M.** Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation. *Science* 1974; 183: 208.
103. **Wispe JR, Bell EF, Roberts RJ.** Assessment of lipid peroxidation in newborn infants and rabbits by measurements of expired ethane and pentane: influence of parenteral lipid infusion. *Pediatr Res* 1985; 19: 374-9.
104. **McCarthy K, Bhogal M, Naudi M, Hait D.** Pathogenic factors in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 1984; 18: 483-8.
105. **Pitkänen O, Hallman M, Andersson S.** Generation of free radicals in lipid emulsion used in parenteral nutrition. *Pediatr Res* 1991; 29: 56-9.
106. **Hammerman C, Aramburo MJ.** Decreased lipid intake reduces morbidity in sick premature neonates. *J Pediatr* 1988; 113: 1083-8.
107. **Sosenko IRS, Rodríguez-Pierce M, Bancalari E.** Effect of early initiation of intravenous lipid administration on the incidence and severity of chronic lung disease in premature infants. *J Pediatr* 1993; 123: 975-82.
108. **Neuzil J, Darlow B, Inder TE, Sluis KB, Winterbourne CC, Stocker R.** Oxidation of parenteral lipid emulsion by ambient and phototherapy lights: potential toxicity of routine parenteral feedings. *J Pediatr* 1995; 126: 785-90.
109. **Helbok HJ, Ames BN.** Use of intravenous lipids in neonates. *J Pediatr* 1995; 126: 747-8.
110. **Andersson S, Pitkänen O, Hallman M.** Parenteral lipids and free radicals in preterm infants (Letter). *Arch Dis Child* 1992; 67: 152.