



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**EFFECTOS DE LA RESTRICCIÓN DEL CRECIMIENTO
INTRAUTERINO SOBRE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA
CEREBRAL ESPONTÁNEA Y EVOCADA EN NEONATOS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA**

LOURDES MARIA CUBERO REGO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. JOSEFINA RICARDO GARCELL

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA CORSI CABRERA

FACULTAD DE PSICOLOGIA, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

DR. ROBERTO PRADO ALCALA

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

QUERÉTARO, MÉXICO

ABRIL 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicada a:

Los recién nacidos con riesgo de daño cerebral y a sus familias

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo es parte del proyecto de la Unidad de Investigación en Neurodesarrollo. Se realizó y concluyó gracias a la asistencia financiera de la Fundación UNAM y de la Fundación Gonzalo Río-Arronte.

No hubiera sido posible sin el uso de las instalaciones del Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer de Querétaro y del equipamiento neurofisiológico ofrecido por Neuronic Mexicana, SA.

Deseamos reconocer especialmente el apoyo constante con la realización de los estudios de Ultrasonido Doppler Prenatal de alta resolución a las gestantes cuyos bebés se incluyeron en este estudio, por parte del Departamento de Cirugía y Medicina Fetal del Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer profundamente a aquellas personas a quienes también está dedicado este trabajo, que no existiría sin ellas:

A mis padres, Osiris y Estrella, a mis hermanos, Mariíta y David. Por la enseñanza nunca escrita y siempre vivida de lo que es el amor incondicional y la comprensión hacia los otros. A Rosita y a Barreto, por ser todos una familia de verdad.

A mis maestros, Osiris Cubero, Jorge Luis González Roig, Martha Sánchez, Gildo Torres, Gloria Otero, Jorge Mayor, Humberto Suárez Ramos. Algunos ya no están, todos me acompañan día a día en mi trabajo.

A la Unidad de Investigación en Neurodesarrollo “Dr. Augusto Fernández Guardiola” del Instituto de Neurobiología de la UNAM, Campus Juriquilla, especialmente a la Dra Thalía Harmony, por existir, por regalar esperanza a muchísimas personas y por demostrar cada día, las infinitas posibilidades de la plasticidad del sistema nervioso en los niños.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, en el Instituto de Neurobiología, por ofrecer esta oportunidad maravillosa y hacerlo con rigor y excelencia. A su cara siempre competente, amable y constructiva con los estudiantes y tutores, la M. en C. Leonor Casanova Rico así como a las demás compañeras del Dpto. de Postgrado del INB, especialmente a María del Carmen Mendoza López. A todos los compañeros del sistema de apoyo a las videoconferencias: Ma. de Lourdes Lara Ayala, Ramón Martínez y Sandra Hernández.

A los profesores del INB, de quienes recibí clases inolvidables en el Doctorado: Dr. Mauricio Díaz, Dra. Olivia Vázquez, Dra. Magda Giordano, Dr. Luis Concha, Dra. Gina Quirarte, Dr. Michael Jerzioski, Dr. Víctor de la Fuente. A los Profesores Velasco y Magaldi, por el R.

Al apoyo de las amigas y compañeras queridas en este camino, las Dras. Mónica Carlier y Cynthia Torres. A Thalíita Fernández H., María Elena Juárez Colín, Dinorah Ponce, Cristy Azanza Ricardo, a Delia Figueroa y Tonantzin Pineda. Al Dr. Rogelio Cruz y a la Unidad de Medicina Materno Fetal del Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer de Querétaro.

Muy especialmente a las Dras Josefina Ricardo Garcell, María Corsi Cabrera y al Dr. Roberto Prado Alcalá, tutores de este trabajo, por sus ideas y su paciencia conmigo. A la Dra. Mary Corsi, por su inestimable tiempo, su apoyo y sus enseñanzas, por ser un ejemplo de vida y de rigor científico, por sus amplios y siempre sorprendentes conocimientos, por enseñarme a ver que cada reto difícil es una excelente oportunidad de crecimiento. Con todo afecto y agradecimiento, a la Dra. Josefina Ricardo Garcell, por su capacidad científica y formadora, por su confianza y entusiasmo, por mostrarme que existía el mundo de la Neurofisiología, por apoyarme incondicionalmente durante mi llegada a México y en el empeño de iniciar y concluir un doctorado con más de 45 años.

A Andrés y Andrés Javier, por su apoyo incondicional, por toda su paciencia conmigo y por el tiempo juntos. Sin ustedes dos, nada tendría sentido...

MIL GRACIAS A TODOS,
LCR

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Actividad eléctrica cerebral evocada auditiva.....	14
1.2 Actividad eléctrica cerebral evocada visual.....	14
1.3 Actividad eléctrica cerebral espontánea.....	15
2. ANTECEDENTES.....	16
2.2 Causas de los efectos adversos sobre el desarrollo cognitivo.....	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
4. PREGUNTA PRINCIPAL DE INVESTIGACIÓN.....	23
4.1 Hipótesis de Investigación.....	23
5. OBJETIVOS.....	24
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
6. MÉTODOS.....	26
6.1 Diseño del estudio.....	26
6.2 Sujetos.....	26
6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	27
6.4 Procedimientos:.....	28
6.4.1 Registro de Potenciales Evocados.....	28
6.4.1.1 Registro de Potenciales Evocados Auditivos.....	29
6.4.1.2 Registro de Potenciales Evocados Visuales.....	29
6.4.2 Registro y Análisis del Electroencefalograma.....	30
6.4.2.1 Registros electroencefalográficos.....	30
6.4.3.2 Análisis cuantitativo del EEG.....	34
6.5 Análisis estadístico.....	35
7. RESULTADOS.....	39
7.1 Análisis de los datos antropométricos neonatales.....	39
7.2 Potenciales evocados Auditivos de Tronco encefálico.....	43
7.3 Potenciales Evocados Visuales.....	47
7.3.1 Replicabilidades.....	47
7.3.2 Análisis de los componentes del PEV.....	48
7.4 Electroencefalograma.....	51
7.4.1 Análisis cualitativo.....	51
7.4.2 Análisis cuantitativo del EEG.....	53
8. DISCUSIÓN.....	63
8.1 Consecuencias antropométricas de la restricción del crecimiento intrauterino.....	64
8.2 Consecuencias de la restricción del crecimiento intrauterino sobre la actividad eléctrica cerebral evocada por estímulo auditivo.....	65
8.3 Consecuencias de la restricción del crecimiento intrauterino sobre la actividad eléctrica cerebral evocada por estímulo visual (PEV).....	66
8.4 Consecuencias de la restricción del crecimiento intrauterino sobre la actividad eléctrica cerebral espontánea.....	68
8.4.1 Análisis cualitativo.....	68
8.4.2 Análisis cuantitativo del EEG.....	69
8.4.3 Limitaciones del estudio.....	72

9. CONCLUSIONES.....	73
10. PERSPECTIVAS	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS	87

Lista de abreviaturas utilizadas

ACM. Arteria cerebral media

ACP. Análisis de componentes principales

ANOVA. Análisis de varianza

EEG. Electroencefalograma

EG. Edad gestacional, expresada en semanas

EPC. Edad postconcepcional, expresada en semanas

FE. Frecuencia de estimulación en el Potencial Evocado Auditivo del Tronco Encefálico, expresada en clicks/seg.

H_{KW}. Estadístico H de Kruskal Wallis

LEDs. Diodos emisores de luz

N2. Onda N2 del Potencial Evocado Visual

N3. Onda N3 del Potencial Evocado Visual

P2. Onda P2 del Potencial Evocado Visual

PEATC. Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico

PEV. Potencial Evocado Visual

PFE. Peso fetal estimado

RCIU. Restricción del crecimiento intrauterino.

RNFR. Recién nacidos con factores de riesgo

RNS. Recién nacidos sanos.

SA. Sueño activo, precursor del sueño REM.

SQ. Sueño quieto, precursor del sueño NREM.

USDopp. Ultrasonido Doppler de alta resolución.

RESUMEN

La restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) es la segunda causa de morbilidad y mortalidad neonatal en todo el mundo. Definida como la incapacidad del feto para alcanzar su potencial genético de crecimiento, puede tener múltiples etiologías y dos cursos de evolución: temprano y severo, que generalmente produce nacimiento prematuro y complicaciones secundarias a este; o leve y tardío, en el cual el feto nace a término, pero puede presentar daño cognitivo y conductual a largo plazo. No quedan secuelas de daño neurológico focalizado cuando la RCIU cursa sin complicaciones como: el internamiento del neonato en cuidados intensivos, un bajo conteo de Apgar, hiperbilirrubinemias superiores a 10 mg/ml, hemorragia intraventricular, sepsis neonatal, ventilación mecánica, enterocolitis necrotizante y leucomalacia periventricular. Sin embargo, numerosos estudios demuestran que entre un 45 y un 50% de los niños con antecedentes de RCIU pueden presentar trastornos de conducta, menores índices de desarrollo, psicomotricidad y cociente intelectual más bajo al llegar a la edad escolar o en la adolescencia, que sus coetáneos que nacieron con peso normal. Es necesario iniciar terapias de neurohabilitación precozmente en estos pacientes, pues la detección temprana del daño neurológico y su tratamiento mejoran el pronóstico a largo plazo de estos niños. El estudio de la actividad eléctrica cerebral espontánea (EEG) y los Potenciales Evocados Visuales (PEV) y auditivos de tronco encefálico (PEATC), son pruebas objetivas, no invasivas y que no requieren cooperación del paciente, por lo que se utilizan frecuentemente en neonatos. Con la hipótesis de que los neonatos con RCIU presentarán más signos de daño neurofisiológico, se realizó este estudio transversal y prospectivo, en el cual se evaluaron neurofisiológicamente tres grupos independientes, constituidos por: i) 17 recién nacidos sanos con peso al nacer superior al 15 percentil para la edad; ii) 17 neonatos que cursaron con RCIU leve (solo disminución del peso por debajo del 10 percentil); iii) un grupo de 17 neonatos con restricción severa, que presentaron un peso inferior al 10 percentil y alteraciones sugestivas de redistribución hemodinámica fetal, como alteración de los índices de pulsatilidad de la arteria cerebral media y/o de la arteria umbilical. El grupo con RCIU severa nació con características antropométricas significativamente afectadas, como: peso al nacer ($H_{KW}=34.5$, $p<0.0001$); perímetro cefálico al nacer ($H_{KW}=13.2$, $p=0.001$); índice de Cefalización ($H_{KW}=11.5$, $p=0.003$) y perímetro cefálico en el momento del estudio ($H_{KW}=28.5$, $p<0.0001$). No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos en las latencias absolutas e interpicos del PEATC ($p>0.16$). Aunque el 40% de los neonatos con RCIU severa mostró ausencia de respuestas identificables en los PEV por estimulación del ojo derecho ($\chi^2=12.2$, $p=0.002$), las comparaciones de latencias y amplitudes de las ondas N2, P2 y N3 del PEV no mostraron diferencias entre los tres grupos ($p>0.13$). Una proporción significativamente mayor de neonatos con RCIU severa presentó alteraciones paroxísticas intercríticas en su EEG ($\chi^2=12.4$, $p=0.001$), así como discontinuidades más prolongadas en sus trazados ($H_{KW}=6.6$, $p=0.03$). Se realizó un

análisis cuantitativo de banda estrecha del EEG, que permitió obtener matrices de espectros por derivaciones por grupos, en fases de sueño activo (SA) y quieto (SQ). Un análisis de componentes principales (ACP), permitió identificar tres bandas anchas de frecuencia en el EEG neonatal, una banda lenta de 2 a 6 Hz; una banda intermedia, de 7 a 13 Hz y otra banda rápida, de 13 a 30 Hz. Un análisis de varianza de tres factores (grupo de RCIU x fase de sueño x derivaciones) mostró diferencias significativas entre fases de sueño ($F=9.85$, $p=0.003$) y derivaciones ($F=3.43$, $p=0.001$), no así entre los grupos ($p>0.17$). Se calcularon las diferencias de energía entre SA y SQ, para los tres grupos. Se encontró un cambio entre las fases significativamente mayor para la banda lenta en los neonatos sanos con respecto a aquellos con RCIU severa ($F=3.19$, $p=0.04$; comparaciones múltiples post-hoc, $p<0.05$).

CONCLUSIONES. La RCIU con compromiso hemodinámico de arteria cerebral media y/o arterias umbilicales afecta la maduración normal de la actividad lenta en el EEG neonatal durante el sueño tranquilo, incrementa la duración de los intervalos de discontinuidades electroencefalográficas y genera actividad paroxística anormal que no se encontró en los neonatos sanos. Es necesario realizar un estudio de seguimiento longitudinal de este grupo de niños para precisar las implicaciones en el pronóstico a largo plazo de estas alteraciones.

ABSTRACT

Fetal growth restriction (FGR) is the second cause of mortality and morbidity in newborns worldwide. Defined as the fetal incapability for achieve his/her genetic potential of growing, FGR has two clinical forms: one early-onset and severe, that produces preterm birth and early postnatal complications, and the second one, late-onset and mild, that may cause cognitive and behavioral damage in the long term. When FGR has no complications as respiratory distress, hyperbilirubinemia higher than 10 mg/ml, intraventricular bleeding, and leukomalacia, the child posteriorly has no neurological stigmas. However, several reports showed that 45 to 50 % of children with antecedents of FGR, presented inferior index of development and psychomotricity and intellectual quotient in their scholar years or in the adolescence. It is necessary to offer early neurohabilitation therapies to these patients, but an accurate detection of damage is difficult in the newborn age. For years, the spontaneous electrical cerebral activity (EEG), and evoked responses to auditory and visual stimuli (brainstem auditory evoked responses –BAER- and visual evoked potentials or VEPs, respectively) have been studied in newborns, because they are objective, noninvasive tests, and they do not require patient cooperation. With the hypothesis of FGR neonates will have signals of damage in their EEG, BAER or VEPs, we prospectively studied three independent groups of newborns: i) 17 Healthy neonates with normal prenatal Doppler ultrasound study and birth weight higher than 15 percentile for gestational age; ii) 17 newborns with Mild FGR (they only presented fetal estimated weight inferior to the 10 percentile for gestational age, without other alterations in their prenatal Doppler ultrasound examination, and iii) 17 newborns with Severe FGR, with fetal estimated weight inferior to the 10 percentile for gestational age and hemodynamic redistribution, as alterations of the pulsatility index of middle cerebral artery and/or the umbilical artery. RESULTS. Severe FGR group were born with significant decrease of their anthropometrical measures: birth weight (HKW=34.5, $p<0.0001$); head circumference at birth (HKW=13.2, $p=0.001$); Cephalization Index (HKW=11.5, $p=0.003$) and head circumference in the study (HKW=28.5, $p<0.0001$). No significant differences were found in BAER variables ($p>0.16$). Although 40% of severe FGR newborns showed non reproducible VEPs at the right eye stimulation ($\chi^2=12.2$, $p=0.002$), the latency and amplitude comparisons were non-significant ($p>0.13$). In the EEG, severe FGR newborns group showed subclinical paroxysmal activity ($\chi^2=12.4$, $p=0.001$), and longer flats episodes (HKW=6.6, $p=0.03$). Quantitative EEG analysis of narrow bands, in active sleep (AS) and quiet sleep (QS) showed, by a principal components analysis (PCA), three broad bands of frequencies, different of traditional EEG broad bands (δ , 05-3.9 Hz; θ , 4-6.9 Hz; α , 7-12.9 Hz, and β , 13-30 Hz). The new bands in the neonatal EEG were: slow, 2-6 Hz; intermediate, 7-13 Hz; rapid, 13-30 Hz. Repeated measures ANOVA of three factors (FGR group x sleep stage x EEG derivations) showed significant differences between sleep stages ($F=9.85$, $p=0.003$) and derivations ($F=3.43$, $p=0.001$), non-significant between FGR groups ($p>0.17$). Differences of EEG's absolute power between AS and QS were calculated, we found a

significant increased change in the healthy newborns in comparison with severe FGR neonates ($F=3.19$, $p=0.04$; post-hoc multiple planned comparisons, $p<0.05$). CONCLUSION. Altered maturation of slow EEG activity during QS was found in FGR newborns with alterations of middle cerebral artery and/or umbilical artery. Also, they have increased duration of flat intervals and presence of subclinical paroxysmal activity, which were not found in the healthy newborn group. Future longitudinal study of these newborn groups are necessary for to precise the implications of these neurophysiological alterations in the long term prognosis of FGR.

1. INTRODUCCIÓN

La restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) es la segunda causa de morbilidad y mortalidad neonatal en todo el mundo, precedida por la prematurez (Murray y cols., 2015). Considerada un problema de salud pública, la RCIU se ha definido como la incapacidad del feto para alcanzar su potencial genético de crecimiento (Philip y cols., 2009; Figueras y Gratacós, 2014). De acuerdo con estos autores, la definición de pequeñez fetal se basa en el cálculo del peso fetal estimado (PFE), realizado a partir de mediciones antropométricas, accesibles mediante el ultrasonido Doppler a color de alta resolución (USDopp). El diagnóstico prenatal de RCIU se realiza cuando el PFE se encuentra por debajo de un umbral arbitrariamente definido, en la actualidad es el 10º percentil de los valores esperados en una población de fetos en la edad gestacional (EG) correspondiente (Philip y cols., 2009, Baschat, 2011). No todos los neonatos pequeños deben ser considerados como restringidos en su crecimiento, pueden existir recién nacidos pequeños constitucionalmente, en los cuales se desarrolla con normalidad su potencial genético. La RCIU es una enfermedad secundaria a la insuficiencia del aporte sanguíneo placentario, que cursa con hipoxia crónica fetal, por lo que no es trivial la detección correcta de los neonatos afectados.

Una identificación temprana es importante porque la RCIU se asocia con una evolución perinatal adversa, caracterizada por un aumento de muertes intrauterinas fetales, daño cerebral perinatal y severo estrés fetal intraparto (Philip y cols., 2009; Figueras y Gratacós, 2014). Existe evidencia acumulada a lo largo de los últimos 20 años que demuestra que la RCIU y el nacer pequeño para edad gestacional (PEG), no sólo tienen implicaciones importantes para el neurodesarrollo, sino que pueden comprometer la salud en la etapa adulta ya que son factores de riesgo para hipertensión arterial esencial, diabetes mellitus y enfermedad coronaria (Baschat, 2011; van Wassenaer, 2005; Arcangeli y cols., 2012; Leitner y cols., 2007).

Factores tales como la causa, la duración y la severidad de la agresión al feto en desarrollo, la salud y el estado nutricional de la madre, determinan las características fenotípicas de la RCIU (Villar y cols., 2006; Mullis y Tonella, 2008). De ahí que las consecuencias a largo plazo sean también heterogéneas y que afecten de modo diferente elementos específicos del desarrollo. Fisiopatológicamente, esta enfermedad se presenta en dos fenotipos distintos, con diferentes causas y perfil de riesgos (Figueras y Gratacós, 2014; Baschat, 2011).

De acuerdo con la intensidad del trastorno y su patrón temporal de presentación se distinguen la RCIU severa y temprana, en contraste con la RCIU leve y tardía. Desde el punto de vista de la intensidad, pueden distinguirse aquellos fetos con disminución de su crecimiento, que solo tienen afectación del peso, que son diferentes de los que cursan con verdadera RCIU, los cuales tienen un riesgo mayor de deteriorarse intrauterinamente, de morir antes del nacimiento y de presentar complicaciones perinatales. En estos últimos fetos, además de existir una reducción del peso, también se observan signos vasculares en el ultrasonido Doppler a color de alta resolución, que sugieren redistribución hemodinámica. Esta redistribución ha dado lugar al concepto de 'brain sparing', o preservación cerebral, que es una respuesta adaptativa del feto a la insuficiencia placentaria, en la cual se modifica la circulación fetal para mantener el suministro adecuado de oxígeno y nutrientes al cerebro, en detrimento de otros órganos como el hígado, los riñones y las suprarrenales (Figueras y Gratacós, 2014; Baschat, 2011). Esta hemodinámica cerebral alterada no siempre logra ser beneficiosa, y puede persistir después del nacimiento (Cohen y cols., 2015; van Wassenaer, 2005; Arcangeli y cols., 2012).

Es de la mayor importancia distinguir los neonatos con RCIU que han tenido mayor daño cerebral, porque existe riesgo de secuelas a largo plazo. Una incorporación temprana a terapias de neurohabilitación es decisiva en la prevención y tratamiento de las lesiones que puedan ocurrir secundariamente a estas alteraciones (Fattal-Valevski y cols., 2009).

Actualmente, el método de diagnóstico por imagen con mayor sensibilidad para lesiones estructurales es la resonancia magnética cerebral. Sin embargo, esta no siempre es una opción factible en recién nacidos, pues requiere inmovilidad absoluta del sujeto en estudio.

El traslado y la necesaria sedación implican riesgos para la supervivencia en neonatos prematuros. Es necesario aplicar en estos casos evaluaciones diagnósticas del sistema nervioso central con elevada sensibilidad, funcionales, no invasivas y que no requieran cooperación del paciente, como el estudio de la actividad eléctrica cerebral espontánea o electroencefalograma (EEG) y los potenciales evocados sensoriales visuales (PEV) y auditivos de tronco encefálico (PEATC), los cuales se consideran métodos excelentes para evaluar la maduración cerebral en neonatos (Ozdemir y cols., 2009; Scher y cols., 2011; Jiang y cols., 2013).

1.1 Actividad eléctrica cerebral evocada auditiva

El estudio de potenciales evocados auditivos de tronco encefálico es un método confiable, objetivo y no invasivo de examinar la actividad neural auditiva, ampliamente usado en neonatos, lactantes y niños, ya que permite distinguir entre pérdidas auditivas sensorineurales y conductivas. Son considerados como la prueba de referencia en el tamizaje audiológico (Baldwin, 2014; Radeloff, 2014; Stipdonck 2016, Shi y cols., 2016). En los neonatos, los PEATC son claramente discernibles a partir de las 35 semanas de edad gestacional. Se generan por la activación neural sucesiva en varios niveles del tronco cerebral, que permite obtener en la superficie craneal un potencial evocado con aspecto típico, compuesto por las ondas I, III y V (Husain, 2011; Krumholtz, 2005). En los primeros estudios realizados, Todorovich y cols., 1987 y Saintonge y cols, 1985, reportaron aumentos de latencias para las ondas III y V, así como en la duración del intervalo I-V, que consideraron sugestivas de inmadurez funcional del tronco encefálico auditivo en neonatos pequeños para edad gestacional. Sin embargo, reportes más recientes no logran replicar estos hallazgos, y la baja sensibilidad de los PEATC realizados a frecuencias de estimulación convencionales pudiera ser una explicación para esto (Moreno Aguirre y cols., 2010; Angrisani y cols., 2012).

1.2 Actividad eléctrica cerebral evocada visual

En los recién nacidos, una respuesta evocada visual normal indica una maduración neural adecuada de la corteza cerebral, de acuerdo a la edad del neonato (Cruz y cols., 2015; Kato y Watanabe, 2006). Por lo tanto, los potenciales evocados visuales han sido frecuentemente

utilizados para identificar cualquier anomalía del desarrollo de esta vía sensorial (Cruz y cols., 2015; Kato y Watanabe, 2006; McGlone y cols., 2013), ya que no requieren cooperación del paciente, son objetivos y sensibles a daño estructural y funcional (Hrbek y cols., 1973; Vieira y cols., 2015).

Una temprana detección de las alteraciones provocadas por la RCIU es de gran interés, con el fin de iniciar precozmente tratamientos de apoyo en la educación, que permitan desarrollar en estos niños estrategias tempranas para disminuir en lo posible el daño conductual y cognitivo que aparecerá posteriormente (Harmony y cols., 2016; Spittle y Orton, 2015). Identificar qué neonatos con RCIU están en mayor riesgo de daño neurológico es esencial, pero no es sencillo encontrar biomarcadores tempranos de estas alteraciones.

En este trabajo se describen los hallazgos postnatales encontrados en los estudios de la actividad eléctrica cerebral espontánea (EEG), en los potenciales evocados visuales y auditivos, en relación con las alteraciones provocadas por la restricción del crecimiento intrauterino en neonatos explorados durante su primer mes de vida.

1.3 Actividad eléctrica cerebral espontánea

La electroencefalografía es el estudio de las señales registradas en la piel del cráneo, generadas continuamente por la actividad eléctrica cerebral, con origen en dipolos creados entre el soma y las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral (Steriade, 2004; Amzica, 2011). El EEG no debe verse como un fenómeno generado aisladamente en la corteza cerebral, sino como la actividad cambiante, continua y modulada por la interacción entre las neuronas de las columnas corticales y las conexiones tálamo-corticales (Steriade, 1984, 2003, 2004). Esta actividad cambia con los distintos niveles de vigilancia y alerta en la vigilia y durante las diferentes fases del sueño.

En estos momentos, sólo el EEG puede brindar un registro continuo y no invasivo de la función cerebral, durante períodos de tiempo prolongados. Esto lo hace único en la caracterización evolutiva de las estructuras cerebrales a lo largo del tiempo (Gloor, 1985).

Un adecuado conocimiento de las bases biológicas de los patrones observados, así como el uso de métodos automáticos y objetivos para caracterizarlos adecuadamente son esenciales para comprender el desarrollo electroencefalográfico en etapas tempranas de la vida y las desviaciones anormales de este (Scher, 2003; Vanhatalo, 2010, Otero y Ricardo, 2003, 2011; Bosch y Ricardo, 2012).

A partir de variables como la amplitud, reactividad y sincronía del EEG, la presencia de grafo-elementos apropiados para la edad concepcional, la ausencia de actividad epileptiforme, las características de los ciclos del sueño y de la respiración, puede caracterizarse la maduración neonatal del SNC, cuyas alteraciones tienen valor pronóstico (Watanabe y cols., 2009; Mizrahi, 2011).

En el neonato, el EEG puede documentar confiablemente el desarrollo y la maduración de los patrones electrofisiológicos regionales, intrahemisféricos, interhemisféricos y globales, así como los ritmos generados y cambiantes durante los diferentes estados del ciclo sueño-vigilia. Con un adecuado conocimiento de los patrones normales para cada edad, es posible identificar grafo-elementos y actividad de base típica y adecuada de cada estado conductual y de este modo aprovechar al máximo la capacidad diagnóstica del EEG neonatal (Scher, 2003, 2011). Se han descrito alteraciones electroencefalográficas durante el sueño en niños con antecedentes de RCIU y prematurez (Yiallourou y cols., 2018)

2. ANTECEDENTES

En todo el mundo, más de 20 millones de niños nacen con un peso inferior a los 2500 g. Entre un 30 y un 40% de ellos nacen a término y por tanto se encuentran en un nivel de peso por debajo del esperado para su edad (Ozdemir y cols, 2009). Varios estudios han demostrado que estos neonatos tienen riesgo incrementado de no alcanzar un neurodesarrollo normal. En estudios de seguimiento a largo plazo, los niños con RCIU, aunque no tienen defectos motrices o sensoriales evidentes, presentan disfunciones neurológicas menores, como trastornos de conducta y déficits en su desempeño escolar, que

algunos reportan en una proporción de un 45 a 50% del total de los casos (Roth y cols., 1999).

La restricción del crecimiento intrauterino es un fenómeno complejo, secundario a la interacción de múltiples factores, maternos y fetales, resumidos en la Figura 2.1.

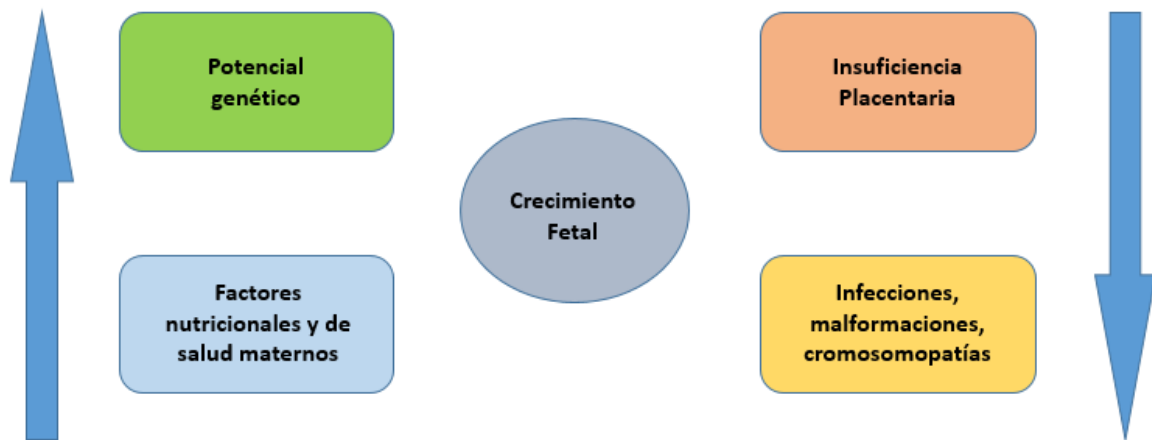


Figura 2.1. Se representa cómo la interacción entre diversos factores maternos, fetales y ambientales puede estimular o afectar el desarrollo del potencial esperado de crecimiento de un feto.

Por lo tanto, los neonatos con RCIU son un grupo heterogéneo con muchas causas probables para su escaso crecimiento (Kliegman y cols., 2006). En su pronóstico a largo plazo inciden no solo la severidad del proceso de restricción en sí, sino también la etiología del trastorno, que puede tener una marcada influencia adversa a largo plazo (Roth y cols., 1999; Kliegman y cols., 2006). En la Figura 2.2 se muestra la evolución natural de la enfermedad y como un trastorno en apariencia benigno puede tener consecuencias graves.

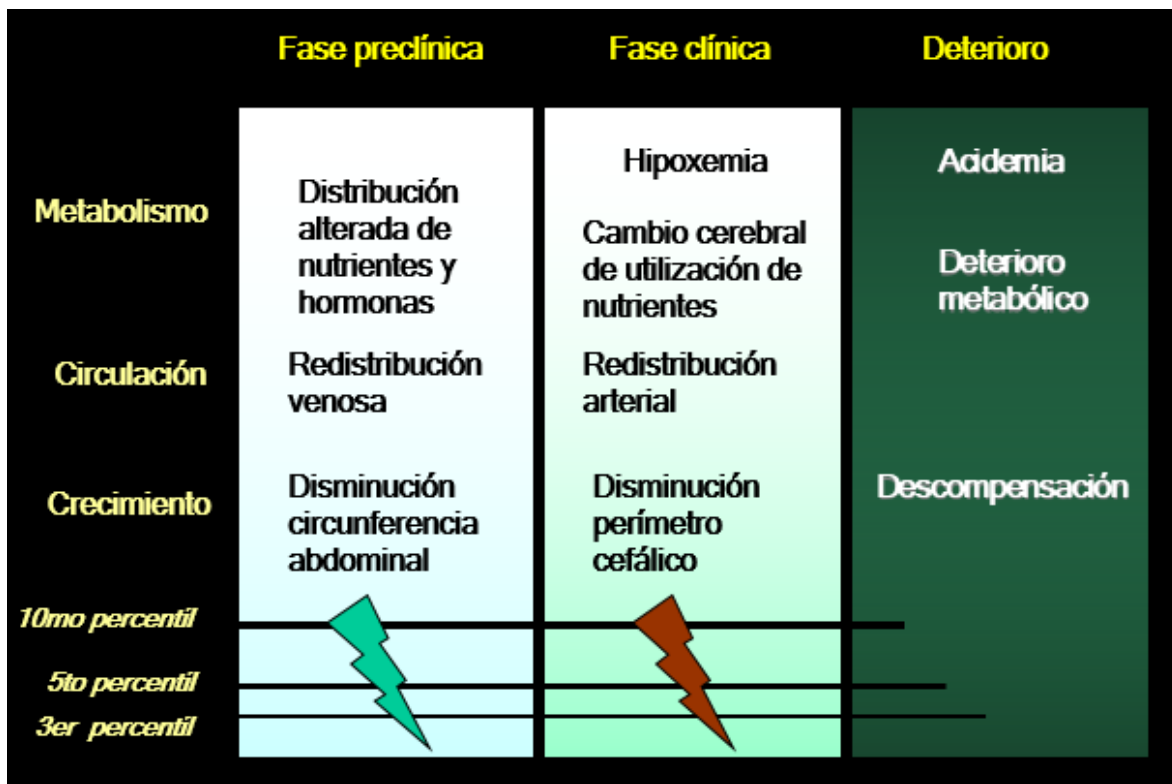


Figura 2.2. Evolución natural de la restricción del crecimiento intrauterino. Se muestran las tres etapas de la enfermedad y como a medida que esta avanza, disminuyen los percentiles del crecimiento fetal, hasta llegar la fase final de descompensación. Si esta no queda resuelta por un parto prematuro espontáneo o por una intervención cesárea de urgencia, puede llegar a la muerte fetal. (Imagen modificada de Baschat, 2011).

El desarrollo actual de la medicina materno-fetal ha permitido clasificar diferentes grados de alteraciones hemodinámicas fetales mediante el ultrasonido Doppler a color de alta resolución (USDopp). En la Tabla 2.1 se muestra la clasificación en etapas más reciente de la RCIU (Figueras y Gratacós, 2014).

Tabla 2.1. Clasificación de los tipos de restricción del crecimiento intrauterino, determinados por ultrasonido Doppler de alta resolución.

Etapas	Correlato fisiopatológico	Criterios
I	Pequeñez severa o insuficiencia placentaria ligera	Peso fetal estimado inferior al 3er percentil IP ACM o Ratio cerebroplacentario inferior al 5 percentil. IP Arterias uterinas o umbilicales superior al 95 percentil
II	Insuficiencia placentaria severa	UA AEDV , flujo reverso en el istmo aórtico

III	Baja sospecha de acidosis fetal	UA REDV, IP del ducto venoso mayor al 95 percentil
IV	Sospecha elevada de acidosis fetal	Flujo reverso en el ducto venoso, cCTG < 3 ms Desaceleraciones de la FHR.

Modificado de: Figueras F, Gratacós E. Stage-based approach to the management of fetal growth restriction. *Prenat Diagn.* 2014. Abreviaturas utilizadas: IPAcM: Índice de pulsatilidad de la arteria cerebral media, Aut: Índice de pulsatilidad de las arterias uterinas.

Entre las consecuencias a corto plazo de la RCIU se encuentran la muerte fetal y las complicaciones peri y postnatales. A largo plazo, se describen en la enfermedad tres tipos de consecuencias.

Consecuencias de la RCIU

1. Neurológicas
2. Metabólicas
3. Cardiovasculares

En particular, la afectación del neurodesarrollo puede tener un profundo impacto en la calidad de vida y en el potencial del individuo. Como el encéfalo en desarrollo muestra notable plasticidad, así como una capacidad limitada para la regeneración después del daño, es importante detectar tempranamente la posibilidad de un neurodesarrollo anormal, para garantizar una adecuada prevención y tratamiento de la futura disfunción cognitiva (Arcangeli y cols., 2012; Leitner y cols., 2007).

Las consecuencias cognitivas adversas de la RCIU se manifiestan en la niñez y la adolescencia (Murray y cols., 2015; Leitner y cols., 2007), cuando los requerimientos escolares y sociales comienzan a sobrepasar la capacidad de rendimiento del niño, neurológicamente sin alteraciones, pero con antecedentes pre y perinatales positivos. Los niños que presentaron RCIU muestran disminución del rendimiento cognitivo y alteraciones en su conducta (Arcangeli y cols., 2012). En aquellos RCIU que nacieron prematuramente antes de las 35 semanas de gestación, el nivel de afectación es mayor (Murray y cols., 2015; Arcangeli y cols., 2012)

2.2 Causas de los efectos adversos sobre el desarrollo cognitivo

Considerada como una respuesta adaptativa fetal a la hipoxia crónica, la RCIU trata de preservar el suministro de oxígeno hacia el cerebro y el corazón, con desventaja para otros órganos como el hígado (Figueras y Gratacós, 2014; Hernández-Andrade y cols., 2008; Baschat, 2011). La perfusión preferencial al cerebro puede mantener su adecuada oxigenación, es favorable para la supervivencia del feto y la preservación de su función motora. Sin embargo, esta perfusión no es homogénea en todo el sistema circulatorio cerebral (Murray y cols., 2015; Hernández-Andrade y cols., 2008). En efecto, el flujo sanguíneo cerebral es dirigido desde los lóbulos frontales hacia los ganglios basales, en detrimento del desarrollo normal de las estructuras corticales anteriores, lo cual explicaría las asociaciones descritas entre RCIU y futuras alteraciones cognitivas, de conducta y de lenguaje (Arcangeli y cols., 2012; Leitner y cols., 2007).

La afectación prenatal pudiera comprometer el crecimiento de la arquitectura neural en los lóbulos frontales, necesaria para el posterior desarrollo de las funciones ejecutivas complejas (Murray y cols., 2015; Benavides-Serralde y cols., 2009; Tolsá y cols., 2009). Se ha comprobado una reducción en el volumen frontal, mediante resonancia magnética y ultrasonografía transcraneal, no solo en términos absolutos, sino también con respecto al volumen intracraneal total, lo cual sugiere un trastorno específico en el crecimiento de los lóbulos frontales (Tolsá y cols., 2009; Makhoul y cols. 2004). Esta restricción del crecimiento frontal podría conducir al desarrollo insuficiente de los sustratos neuronales de las funciones ejecutivas y a incapacidades en las conductas relacionadas con la atención, lo cual podría explicar el patrón de alteraciones cognitivas ya descrito (Makhoul y cols. 2004; Shue y cols., 1992).

Otra región preferencialmente afectada por un medio prenatal adverso es el hipocampo (Isaacs y cols., 2003). Se ha demostrado que un bajo peso al nacer se asocia con una disminución del volumen hipocampal (Isaacs y cols., 2000; Mallard y cols., 2000). Estudios en animales han demostrado que la reducción del flujo sanguíneo placentario en la segunda mitad de la gestación reduce en un 30% el número de las neuronas hipocampales y retrasa

su arborización (Mallard y cols., 2000; Dieni y cols., 2003). Además, se afecta el desarrollo normal del circuito septo-hipocampal y sus proyecciones hacia la corteza frontal (Isaacs y cols., 2000, 2003). La lesión de estas vías pudiera ser responsable de la alteración en conductas relacionadas con el hipocampo, tales como la memoria y el aprendizaje, lo cual afectará desde sus inicios el futuro desarrollo cognitivo de estos neonatos (Tolsá y cols., 2009; Shue y cols., 1992).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Entre un 45 y un 50% de los neonatos que cursaron con RCIU presentarán dificultades escolares, trastornos de conducta en la niñez y en la adolescencia. La restricción del crecimiento intrauterino es un trastorno frecuente, multicausal y, en segundo lugar después de la prematuridad, origina trastornos perinatales y muerte intrauterina de origen insospechado. Es factor de riesgo para el estrés respiratorio neonatal, la enterocolitis necrotizante y otras complicaciones, cuyo pronóstico es peor a medida que es menor el peso de neonato. Se debe establecer en estos casos la severidad y la localización del daño, para poder decidir el inicio temprano de terapias de neurohabilitación y ofrecer un pronóstico.

Las alteraciones electrodiagnósticas neonatales, que comenzaron a estudiarse a partir de 1960, fueron descritas antes de que el ultrasonido Doppler de alta resolución permitiera definir alteraciones fetales con mayor precisión.

No existen investigaciones acerca de la actividad eléctrica cerebral espontánea y evocada en neonatos, con conocimiento prenatal del tipo de restricción del crecimiento intrauterino.

Las pruebas neurofisiológicas, al ser objetivas, no invasivas y no requerir cooperación del paciente, resultan ideales para ser aplicadas en neonatos y pueden identificar tempranamente aquellos que necesiten atención especializada para mejorar su pronóstico de neurodesarrollo.

4. PREGUNTA PRINCIPAL DE INVESTIGACIÓN

¿Existe relación entre la severidad de la restricción del crecimiento intrauterino y la presencia de signos de deterioro neurofisiológico en la actividad eléctrica cerebral espontánea y evocada?

4.1 Hipótesis de Investigación

Dado que la restricción del crecimiento intrauterino implica redistribución del flujo sanguíneo cerebral y que, al ser sobrepasados estos mecanismos de adaptación aparece disminución tanto del peso fetal y neonatal como del perímetro cefálico, la función cerebral al nacer estará afectada y los neonatos con RCIU leve y/o severa mostrarán diferencias con respecto a un grupo de neonatos sanos en su actividad eléctrica cerebral espontánea, evaluada mediante el EEG y en las respuestas evocadas a estímulo auditivo en el tronco encefálico (PEATC) y a estímulo visual en la corteza cerebral (Potenciales Evocados Visuales).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar si los neonatos con restricción leve y severa del crecimiento intrauterino muestran diferencias neurofisiológicas con respecto al grupo control de neonatos sanos.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

En los grupos de neonatos estudiados:

- 1) Describir las características antropométricas observadas en cuanto a peso y perímetro cefálico al nacer, edades gestacional y postconcepcional, e Índice de Cefalización.
- 2) Identificar la existencia de diferencias antropométricas entre los grupos.
- 3) Comparar las latencias de las ondas I, III y V y los intervalos interpicos del PEATC en los grupos de neonatos estudiados.
- 4) Analizar y comparar la reproducibilidad, las latencias absolutas, los intervalos interpicos y amplitudes de los componentes N2, P2 y N3 del PEV.
- 5) Comparar los aspectos cualitativos del EEG neonatal en los tres grupos, en cuanto a presencia de actividad paroxística, inmadurez del trazado acorde la duración de las discontinuidades, presencia de apneas, alertamientos, proporción de vigilia, sueño activo, sueño quieto, trazado discontinuo, alternante e indeterminado.
- 6) Analizar las bandas de frecuencias propias del neonato en el análisis de banda estrecha en el EEG.
- 7) Comparar a los grupos de neonatos en las energías absolutas de las bandas anchas, para sueño quieto, activo y las diferencias entre ambas etapas.

Para poder contestar estos objetivos fue necesario realizar previamente dos experimentos, los cuales se muestran en detalle en los Anexos I y II, respectivamente, y que se resumen en los párrafos siguientes:

Experimento 1

Los PEATC realizados con frecuencias de estimulación de 10 a 20 clicks/seg muestran valores de especificidad de 95%, pero su sensibilidad puede ser de 35% (Moreno-Aguirre y cols., 2010). Para elevar la capacidad de detección de una lesión funcional de vías auditivas en neonatos, se realizó un primer experimento con el fin de mejorar la sensibilidad del PEATC, comparando la frecuencia convencionalmente utilizada de 10 clicks/seg, con respecto a una frecuencia de estimulación más elevada, de 60 clicks/seg. Dicho estudio se llevó a cabo prospectivamente con dos grupos independientes de neonatos, 30 sanos y 30 con factores de riesgo de daño auditivo. Se demostró que los PEATC registrados a 60 clicks/seg muestran una mayor precisión diagnóstica y se realizan en un tiempo mucho menor que los registrados con frecuencia de 10 clicks/seg (Cubero-Rego y cols., 2017; ver Anexo IV).

Experimento 2

Los PEV muestran una gran variabilidad en neonatos, debido a que no se ha considerado la fase del ciclo sueño-vigilia en que se registran, lo cual puede afectar su capacidad de detectar alteraciones sutiles en la vía visual. Por lo tanto, se realizó un segundo experimento con el fin de caracterizar los PEV durante el sueño quieto (SQ, precursor del NREM o lento) y durante el sueño activo (SA, precursor del REM o paradójico). Este estudio incluyó a 20 neonatos sanos y sin factores de riesgo, a los cuales se les registraron los PEV durante el sueño quieto y el activo, controlados polisomnográficamente. Este estudio mostró que los PEV muestran menos variabilidad y son más fáciles de obtener durante el sueño activo en los neonatos (en revisión para publicación, ver Anexo III).

6. MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio transversal, prospectivo, de tres muestras independientes, constituidas por neonatos sanos y por dos grupos de recién nacidos con restricción del crecimiento intrauterino, leve (sólo con disminución del peso) y severa (adicionalmente con cambios hemodinámicos).

6.2 Sujetos

Se evaluó prospectivamente una muestra no aleatoria, consecutiva de neonatos sanos y con RCIU, durante su primer mes de vida, procedente del Hospital de Especialidades del Niño y la Mujer “Dr. Felipe Núñez Lara”, de Querétaro. Las madres de estos neonatos fueron examinadas al menos una vez durante la gestación mediante Ultrasonido Doppler de alta Resolución para evaluar RCIU. Se tomaron los datos correspondientes a la última clasificación por USDopp a la que fueron asignados los neonatos antes del parto. En este reporte se incluyen los resultados de los estudios realizados a 51 recién nacidos, divididos en tres grupos de 17 neonatos cada uno, que fueron emparejados entre sí de acuerdo a la edad postconcepcional (EPC) que tenían en el momento del estudio. La composición de estos grupos es la siguiente: 17 neonatos SANOS; 17 con restricción del crecimiento intrauterino, o sea, con peso inferior al 10º percentil sin cambios hemodinámicos (RCIU LEVE); y 17 recién nacidos con peso inferior al 10º percentil y con alteraciones del índice de pulsatilidad de la arteria cerebral media y/o de la arteria umbilical (RCIU SEVERA). Los criterios para evaluar la severidad de la RCIU están basados en los de Figueras y Gratacós, 2014, resumidos en la Tabla 2.1. No fue posible incluir pacientes con insuficiencia placentaria severa por el alto índice de mortalidad y de complicaciones postnatales que se observaron en estos grupos.

6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de Inclusión: Neonatos con EG \geq 26 semanas y edad concepcional menor o igual a 44 semanas, cuyas madres expresaron su consentimiento informado para participar en el estudio (Ver Anexo III).

Grupo control de Neonatos Sanos: Que presentaran resultados normales en el USDopp prenatal, sin complicaciones pre, peri o postnatales, con peso fetal y al nacer superior al 15° percentil para la edad.

Grupo con RCIU leve: Peso fetal estimado inferior al 10° percentil, que se confirmara con un peso al nacer inferior al 10° percentil. Ausencia de cambios hemodinámicos en las arterias cerebral media, uterinas y umbilicales en los ultrasonidos prenatales realizados. Ausencia de complicaciones peri o postnatales.

Grupo con RCIU severa: Peso fetal estimado inferior al 10° percentil, que se confirmara con un peso al nacer inferior al 10° percentil. Presencia en al menos un ultrasonido prenatal de alteraciones en el índice de pulsatilidad (IP) de la arteria cerebral media y/o de la arteria umbilical o en su medida común, la razón entre ambos o índice cerebro-placentario. Ausencia de complicaciones peri o postnatales.

Criterios de exclusión: Neonatos que cumplieran los criterios de inclusión pero que presentaron cromosomopatías o malformaciones, identificadas en el ultrasonido prenatal o en el examen clínico postnatal, así como aquellos cuyas madres no desearon participar en el estudio.

Criterios de eliminación: Neonatos con diagnóstico prenatal de RCIU en los cuales se detectó en el examen clínico que nacieron con un peso superior al 15 percentil para su edad gestacional, por lo que la RCIU no quedó confirmada al nacer, o aquellos que presentaron

antecedentes significativos pre, peri o postnatales, tales como cifras de hiperbilirrubinemia superiores a los 15 mg/dl, ventilación mecánica durante cinco días o más, conteo de Apgar al nacer inferior a 4 en el primer minuto y de 0 a 6 en el segundo minuto, sepsis neonatal que requirió el uso de tres o más antibióticos, encefalopatía hipóxico-isquémica, hemorragia intraventricular de cualquier grado y leucomalacia periventricular.

También fueron excluidos aquellos que no cooperaron al estudio, o los que se tornaron inestables durante el mismo, por dificultad respiratoria, regurgitación o irritabilidad marcada durante las pruebas.

6.4 Procedimientos:

Mediante la revisión de los expedientes clínicos del hospital se registraron los siguientes datos de los recién nacidos: peso, talla, perímetro cefálico al nacer y el día del estudio, sexo, edad gestacional al nacer, complicaciones perinatales, postnatales, el grado y tiempo de restricción del crecimiento al que estuvieron expuestos los enfermos. En el Anexo IV se muestra la Hoja de Registro de Datos utilizada. Los estudios neurofisiológicos se realizaron siempre en el mismo orden, primero los PEATC, luego ya con el paciente dormido, se inició el registro del EEG, durante el cual se obtuvieron los PEV, mientras el neonato se encontraba en fase de sueño activo. Como medidas de preparación para el estudio se les solicitó a todas las madres o acompañantes que mantuvieran ayuno y desvelo en los neonatos durante las dos horas previas al estudio. Todas las pruebas se analizaron en un momento varios días posteriores al registro, a ciegas de la clasificación prenatal de los neonatos.

6.4.1 Registro de Potenciales Evocados

En ambos tipos de potenciales evocados se realizó estimulación monoaural y monocular, respectivamente. Se utilizaron electrodos superficiales de disco, dispuestos en derivaciones ubicadas de acuerdo al Sistema Internacional 10-20, luego de limpiar adecuadamente la piel, con el fin de garantizar valores de impedancias similares e inferiores a los 5 k Ω . Los estudios de potenciales evocados auditivos y visuales se realizaron en un Sistema Digital

para Potenciales Evocados y Electromiografía Neurónica 05, de Neuronica Mexicana, SA, 1998.

6.4.1.1 Registro de Potenciales Evocados Auditivos

Fue el primer estudio que se realizó, generalmente con el neonato en brazos de su madre o acompañante, después de ser alimentado. Para los PEATC se colocó el electrodo de referencia en vértex (Cz), el activo en la apófisis mastoides ipsilateral a la estimulación y el electrodo de tierra en la apófisis mastoides contralateral. La señal se amplificó con un nivel de ganancia de 100000x, con filtraje de 10 Hz a 3 kHz, con el filtro notch activado. Se promediaron hasta 1000 ensayos para obtener cada curva o promedio, con al menos dos repeticiones para confirmar la reproducibilidad de los registros, según métodos ya descritos (Husain, 2011, Krumholz, 2005). Se aplicaron monoauralmente mediante audífonos, estímulos auditivos de tipo chasquidos (“clicks” en inglés), con intensidad de 70 dB. Se utilizó una frecuencia de estimulación (FE) de 60 clicks/seg, ya que, como se demostró en el Experimento 1, la precisión diagnóstica de la prueba es mayor si se estimula a esta frecuencia (Cubero-Rego y cols., 2017, ver Anexo I). Se identificaron visualmente las ondas I, III y V del PEATC, se calcularon sus latencias absolutas, midiendo desde el punto 0 o estímulo hasta la latencia del pico máximo. Se calcularon los intervalos interpicos I-III, III-V y I-V, como las diferencias de latencias entre las ondas respectivas (American Clinical Neurophysiology Society, 2006).

6.4.1.2 Registro de Potenciales Evocados Visuales

El estudio de los PEV a LEDs, se realizó con registro simultáneo del EEG, de manera que fuera posible determinar la fase del sueño en que se encontraba el neonato durante los PEV. Todos los PEV de los bebés sanos y con RCIU se realizaron durante el sueño activo (SA), ya que, como se demostró en el Experimento 2, en este estado los PEV son más reproducibles, confiables y se puede lograr una mayor cooperación de los recién nacidos (artículo enviado a revisión, ver Anexo II). Se excluyeron del análisis los PEVs obtenidos durante cambios de fase de sueño.

Para los registros se utilizaron dos derivaciones: Cz-Oz y A1-Oz, considerando como activo Oz y como referencia el otro electrodo. El electrodo de tierra siempre estuvo ubicado en la apófisis mastoides derecha, según recomendaciones publicadas (American Clinical Neurophysiology Society, 2006; Odom y cols., 2016). Para obtener cada curva de los PEV se promediaron hasta 20 ensayos, realizando un mínimo de dos repeticiones al estimular cada ojo, para asegurar una adecuada reproducibilidad. Se identificaron los componentes N2, P2 y N3 del potencial evocado visual a LEDs y se midieron sus latencias absolutas, intervalos interpicos N2-N3, N2-P2 y P2-N3, así como la amplitud N2-P2 y P2-N3. La reproducibilidad de la señal se evaluó mediante la apreciación visual de la similitud entre las curvas obtenidas. Se cuantificó el número de ensayos necesarios para obtener un PEV reproducible.

6.4.2 Registro y Análisis del Electroencefalograma

6.4.2.1 Registros electroencefalográficos

A todos los neonatos se les realizó un estudio de EEG de sueño diurno, espontáneo, con una duración igual o mayor a 45 minutos, en un horario entre las 10 a.m. y las 12 p.m., o entre la 1:00 y las 3:00 p.m., aprovechando el patrón polifásico del sueño fisiológico neonatal, con el fin de evaluar la madurez del EEG del sueño para la edad concepcional (EPC). Para ello se realizó registro polisomnográfico digital, que comprendió las derivaciones de EEG establecidas para neonatos: Fp3, Fp4, C3, C4, O1, O2, T3 y T4, dos para registro de movimientos oculares, (ROG para el electrodo ubicado 1 cm por debajo del ángulo externo del ojo derecho, y LOG para el electrodo colocado 1 cm por encima del ángulo externo del ojo izquierdo), como se muestra en la Figura 6.1. Cada una de estas derivaciones fue referenciada a las orejas cortocircuitadas (A1-A2). No se utilizaron las gorras convencionales de EEG para el registro, dado que, por el pequeño tamaño de las cabezas de los neonatos, resulta frecuente la formación de puentes salinos con el gel, aumentando así las probabilidades de crear una comunicación indeseada entre electrodos contiguos. Los electrodos superficiales de registro fueron colocados uno a uno, utilizando pasta conductora Ten-20 y se fijaron en sus ubicaciones con una venda de malla elástica tubular Le Roy de tamaño 4, de manera que se ajustaran al perímetro cefálico del neonato (Figura 6.1).

También se registraron el electromiograma de superficie submentoniano, el esfuerzo respiratorio torácico y el electrocardiograma, de acuerdo a los estándares publicados (Grigg-Damberger, 2016). Se utilizó un electroencefalógrafo digital Medicid 3E, distribuido por Neuronic Mexicana S.A..



Figura 6.1. Montaje de electrodos utilizado para el registro polisomnográfico diurno neonatal.

Tabla 6.4.1. Resumen de los criterios para la detección de los patrones electroencefalográficos propios del neonato

Patrón en el EEG	Definición	Fase del sueño	Comentarios
Ondas lentas de gran amplitud	Salvas de ondas lentas (1 a 30 Hz), continuas, simétricas, sincrónicas, con amplitud de 50 a 150 μ V, con predominio frontal u occipital.	Sueño quieto (precursor del NREM), rara vez en sueño REM o activo.	Es el patrón más maduro en el neonato a término. Se pueden distinguir husos de sueño de bajo voltaje de 12 a 14Hz a partir de las 43 semanas.
Trazado alternante	Tres o más alternancias entre salvas de ondas lentas de gran amplitud de 5 a 6 segundos y periodos	Sueño quieto (precursor del NREM)	Aparece desde las 37 semanas EPC, es prominente a las 40 semanas y desa-parece

	de actividad theta con amplitud menor (25 a 50 μ V).		después de las 44 semanas. Los intervalos intersalvas duran 4-6 seg a las 35-36 semanas; 2-4 seg a las 37-44 sem.
Irregular de baja amplitud	Actividad continua de frecuencias mixtas (4-7 Hz) y baja amplitud (25-50 μ V), con predominio de actividad theta.	Sueño activo (precursor del REM)	Se observa durante el sueño activo, típicamente después de un período de NREM.

Las fases de sueño neonatal activo (SA) y quieto (SQ), trazado discontinuo, indeterminado y alternante fueron identificadas visualmente, luego de varios días de realizado el estudio, por una neurofisióloga clínica (LCR), a ciegas de la identidad y características clínicas de los pacientes. Para identificar las fases se visualizaron segmentos de EEG digital de 30 segundos de duración y se aplicaron los criterios de Anders, 1971 y de Grigg-Damberger, 2016, resumidos en las Tablas 6.4.1 y 6.4.2. En la edición de los registros se utilizó el software para análisis de EEG disponible en el sistema TrackWalker, versión 5.10.0, de Neuronic. Mexicana S.A., Ciudad de México, 2005.

Tabla 6.4.2. Resumen de los criterios aplicados para la detección visual de las fases del sueño neonatal

Fase del ciclo sueño-vigilia	Patrón predominante en el EEG	Movimientos oculares	EMG del mentón
Vigilia	Irregular de baja amplitud.	Ojos abiertos, parpadeo, cierre transitorio al llorar.	Presente, frecuentes artefactos por movimientos.
Sueño activo o REM, (SA)	Irregular de baja amplitud	Ojos cerrados con movimientos oculares rápidos	Ausente o en su nivel menos amplio en todo el registro.
Sueño quieto o NREM, (SQ)	Ondas lentas de gran amplitud y Tracé alternant	Ojos cerrados, sin movimientos.	Tono muscular presente, menor que en vigilia.
Sueño Indeterminado	Presentes en una misma época de 30 segundos 3 rasgos de NREM y 2 de REM o		

	viceversa.		
--	------------	--	--

En el análisis cualitativo del EEG se identificó la presencia o no de actividad paroxística, de alertamientos y de apneas, de acuerdo a los criterios mostrados en la Tabla 6.4.3. Se estimó la edad electroencefalográfica del neonato, en el momento del estudio, como semanas de edad postconcepcional y se calculó la diferencia entre esta edad y la real. Se calcularon los porcentajes de las distintas fases, con respecto al tiempo total en sueño, a excepción del porcentaje de vigilia, que se calculó sobre el tiempo total de registro.

Tabla 6.4.3. Resumen de los criterios para la detección de eventos aislados en el EEG

Eventos	Rasgos típicos
Actividad paroxística	Existen frecuentes transientes agudos fisiológicos en el neonato que pueden ser confundidos con actividad paroxística epileptiforme, por ejemplo, las ondas agudas frontales que, simétricas, amplias y limitadas a estas regiones son fáciles de diferenciar de los transientes anormales. Estos últimos, amplios y agudos, se caracterizan por ser, además, persistentemente asimétricos, muy frecuentes y si se mantienen durante las discontinuidades del trazado alternante y en el REM.
Apneas durante el sueño	Son comunes en neonatos y lactantes entre 0 y dos meses. En su mayoría de tipo central (70-80%), duran más de 3 y menos de 10 seg. Se ha propuesto como normal un límite superior de 45 apneas centrales por hora de sueño en el menor de un mes. Los eventos obstructivos y mixtos son muy raros en estas edades y se considera anormal un índice mayor a 1 evento/hora.
Discontinuidades	Son segmentos del trazado con amplitud inferior a los 25 μ V, que se mantienen durante dos segundos o más. Son fisiológicos, con duración de 10 a 20 segundos en el prematuro menor de 32 semanas. Su duración se acorta paulatinamente con la maduración del trazado alternante.
Alertamientos o Arousals	Cambios bruscos en la actividad de base del EEG, que puede acompañarse o no de movimientos corporales, oculares, aumento transitorio del tono muscular o activación autonómica. Típicamente su duración es inferior a los 30 segundos.

6.4.3.2 Análisis cuantitativo del EEG

Para realizar el análisis cuantitativo del EEG neonatal se seleccionaron manualmente al menos diez segmentos estacionarios del trazado digital, para cada una de las fases SA y SQ, con una duración mínima de 2.8 segundos cada uno. Se denominan estacionarios porque se excluyeron de estos segmentos variaciones bruscas de la señal, o sea, los eventos que interrumpieran la estabilidad del EEG, tales como movimientos oculares o corporales, cambios bruscos de la línea de base, transientes con aspecto paroxístico o contaminación por

movimientos oculares rápidos y electromiograma. Esta selección fue realizada por un neurofisióloga clínica con experiencia en la visualización de estudios de EEG neonatal (LCR), y fue revisada posteriormente por otra neurofisióloga (J.R.G.), ambas a ciegas de las características clínicas de los pacientes y de los sujetos sanos examinados. Los segmentos electroencefalográficos seleccionados incluyeron las derivaciones Fp3, Fp4, C3, C4, O1, O2, T3 y T4. Los segmentos seleccionados para cada sujeto entraron al análisis de frecuencia del EEG digital que ofrece el sistema TrackWalker, de Neuronic Mexicana, S.A., el cual realiza un análisis espectral, que consiste en aplicar a las ondas del EEG la Transformada Rápida de Fourier en cada una de las derivaciones. Este análisis permite obtener el espectro de potencia de la señal electroencefalográfica en cada derivación, o sea, la cantidad de energía en μV^2 , aportada por cada Hz de frecuencia, en un rango entre 1 a 30 Hz. De esta forma se generaron matrices de valores de energía por Hz, para cada derivación, fase del sueño y sujeto. Estos archivos entraron a un análisis de componentes principales, con el fin de determinar las bandas de frecuencia que aportaran una variabilidad común en el espectro del EEG entre 1 a 30 Hz.

6.5 Análisis estadístico

En la Tabla 6.5 se muestran las variables medidas en este estudio. Se tomó como variable independiente el grado de RCIU (Sanos, RCIU leve y RCIU severa). Se analizó la normalidad de las variables cuantitativas utilizando la prueba de Shapiro-Wilks. No todas las variables se distribuyeron en forma normal, por lo que en las comparaciones entre los tres grupos para las variables antropométricas se utilizó el análisis de varianza por rangos no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Las variables de latencias e intervalos interpicos del PEATC mostraron una distribución normal, por lo que fueron comparadas aplicando las pruebas t-Student para muestras dependientes (con el fin de comparar resultados entre oídos derecho e izquierdo) Para comparar los tres grupos de sanos y RCIU se utilizó el análisis de varianza paramétrico (ANOVA), considerando como dependientes las variables del PEATC y como independientes la pertenencia a los grupos de RCIU y la prematurez.

Tabla 6.5. Descripción de las variables estudiadas

Aspectos clínicos y antropométricos					
Variables		Tipo	Variables		Tipo
Edad gestacional (semanas cumplidas)		Cuantitativa discreta	Tiempo de evolución de la RCIU (en semanas)		Cuantitativa discreta
Edad postconcepcional (semanas cumplidas)		Cuantitativa discreta	Peso al nacer (gramos)		Cuantitativa continua
Edad postnatal (días)		Cuantitativa discreta	Perímetro cefálico al nacer (cm)		Cuantitativa continua
Sexo		Cualitativa (M o F)	Perímetro cefálico en el momento del estudio (cm)		Cuantitativa continua
Tipo de la restricción del crecimiento intrauterino		Cualitativa (Sanos, RCIU Leve, RCIU Severa)	Índice de Cefalización		Cuantitativa continua
Variables del PEATC					
Latencia al inicio de la onda I, por estimulación auditiva (ms).		Cuantitativa continua	Intervalo interpico entre las ondas I y III (ms).		Cuantitativa continua
Latencia al inicio de la onda III, por estimulación auditiva (ms).		Cuantitativa continua	Intervalo interpico entre las ondas III y V (ms).		Cuantitativa continua
Latencia al inicio de la onda V, por estimulación auditiva (ms).		Cuantitativa continua	Intervalo interpico entre las ondas I y V (ms).		Cuantitativa continua
Variables del PEV					
Latencia al inicio de la onda N2, por estimulación visual (ms).		Cuantitativa continua	Intervalo interpico entre las ondas N2 y N3 (ms).		Cuantitativa continua
Latencia al inicio de la onda P2, por estimulación visual (ms).		Cuantitativa continua	Intervalo interpico entre las ondas N2 y P2 (ms).		Cuantitativa continua
Latencia al inicio de la onda N3, por estimulación visual (ms).		Cuantitativa continua	Intervalo interpico entre las ondas P2 y N3 (ms).		Cuantitativa continua
Amplitud de pico a pico entre las ondas N2 y P2, por estimulación visual (μ V).		Cuantitativa continua	Amplitud de pico a pico entre las ondas N2 y P2, por estimulación visual (μ V).		Cuantitativa continua

Aspectos del EEG cualitativo			
Variables	Tipo	Variables	Tipo
Edad postconcepcional estimada por e EEG (EC-EEG, en semanas)	Cuantitativa discreta	Porcentaje en tracé Alternant durante el tiempo total de sueño % TAlternante	Cuantitativa continua
Diferencias entre la edad estimada po EEG y la real (Diff EC-EdadEEG, semanas)	Cuantitativa discreta	Porcentaje en sueño indeterminado durante el tiempo total de sueño % S.Indeterm	Cuantitativa continua
Porcentaje en vigilia durante el tiempo total de registro (% Vigilia)	Cuantitativa continua	Duración máxima de la discontinuidades (Max Disc, en segundos)	Cuantitativa continua
Porcentaje en sueño quieto durante e tiempo total de sueño (% Sueño Quiet)	Cuantitativa continua	Cantidad de Alertamientos (N Alertamientos)	Cuantitativa discreta
Porcentaje en sueño activo durante e tiempo total de sueño (% Sueño Activo)	Cuantitativa continua	Cantidad de Apneas	Cuantitativa discreta
Porcentaje en tracé Discontinuo durante el tiempo total de sueño (% TDiscontin)	Cuantitativa continua	Presencia de actividad paroxística en el EEG	Binaria
Aspectos del EEG cuantitativo			
Energía por bandas en el EEG: Banda lenta de 2-6 Hz ($\mu V^2/Hz$)	Cuantitativa continua	Diferencias de energía entre sueño quieto y activo: Banda lenta de 2-6 Hz ($\mu V^2/Hz$)	Cuantitativa continua
Banda intermedia de 7-13 Hz ($\mu V^2/Hz$)	Cuantitativa continua	Banda intermedia de 7-13 Hz ($\mu V^2/Hz$)	Cuantitativa continua
Banda rápida de 13-30 Hz ($\mu V^2/Hz$)	Cuantitativa continua	Banda rápida de 13-30 Hz ($\mu V^2/Hz$)	Cuantitativa continua

Como se describe en el Anexo I, para calcular la precisión diagnóstica de las dos frecuencias de estimulación (10 y 60 clicks/seg), se calcularon curvas ROC (de “receiver operating characteristic”), estimadas a partir de los hallazgos en una población independiente de 30 RNS y 30 RNFR con dos o más factores de riesgo para daño auditivo peri o postnatal, utilizando la metodología descrita por Hanley y McNeil, 1987. Con el fin de detectar diferencias en la capacidad diagnóstica del PEATC a las dos frecuencias de estimulación, se calcularon las áreas bajo la curva ROC y sus valores de error estándar. Las

áreas se compararon usando el estadístico de Wilcoxon, con un nivel de confianza de 95% ($\alpha < 0.05$). Para la comparación de los resultados de los PEV en fases del sueño en el grupo de niños sanos se compararon las latencias de los componentes N2, P2, N3, intervalos y amplitudes, mediante la prueba de comparación de rangos de Wilcoxon, para muestras dependientes, ver Anexo II.

Se describen los hallazgos observados en variables electroencefalográficas tales como edad conceptual estimada por EEG (EC-EEG); tiempo total de registro electroencefalográfico (TTR); tiempo total de sueño (TTS); porcentaje del TTS en vigilia (% Vigilia); porcentaje del TTS en sueño lento o tranquilo (% NREM); porcentaje del TTS en sueño de movimientos oculares rápidos (% REM); porcentaje del TTS en trazado discontinuo (% Disc); cantidad de apneas (Cant apn); duración máxima de las apneas (Apn Mx). Se consideró como variable binaria la presencia o no de actividad paroxística en los trazados.

Todas las variables de latencias absolutas e interpicos de los potenciales evocados auditivos y visuales se distribuyeron en forma normal. Para la evaluación de los potenciales izquierdos y derechos, así como para los realizados en neonatos a término y pretérmino, se compararon las latencias de los componentes mediante la prueba t de Student, para muestras dependientes.

Para comparar las latencias de los PEATC y los PEV en los tres grupos de neonatos, se realizaron análisis de varianza (ANOVA). Se tomó como *variable independiente* el grado de RCIU (Sano, RCIU leve y RCIU severa) y como variables dependientes, los valores de latencias absolutas e interpicos de las ondas del PEATC y el PEV. Para examinar asociación entre variables de intervalo se utilizó el coeficiente de correlación r de Pearson. Cuando se analizaron variables categóricas se aplicó la prueba de chi cuadrado (χ^2). En todas las pruebas se consideraron significativas aquellas diferencias con valores de $p \leq 0.05$. Los análisis se realizaron utilizando el sistema R, versión 3.2.5 (Fundación R, Austria, 2013)

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de los datos antropométricos neonatales

En la Tabla 7.1 se muestran las características generales en cuanto a edades y variables antropométricas de los grupos de neonatos estudiados. La edad postconcepcional se mantuvo constante en los tres grupos alrededor de las 40 semanas, como puede apreciarse en la Tabla 7.2, ($H_{KW}=4.5$, $p=0.10$). Dado que, por su evolución natural, la severidad de la RCIU se caracteriza por una mayor incidencia de nacimientos prematuros, resultó imposible en la práctica igualar los grupos en cuanto a edad gestacional ($H_{KW}=12.3$, $p=0.002$), por lo cual quedó una mayor cantidad de neonatos prematuros en el grupo de los severos. El peso y el perímetro cefálico al nacer y su razón derivada, el Índice de Cefalización, así como el perímetro cefálico en el estudio y el tiempo con RCIU mostraron el empeoramiento esperado en los grupos de neonatos ($H_{KW}=34.5$, $p=0.0001$, $H_{KW}=13.2$, $p=0.001$, $H_{KW}=11.5$, $p=0.003$, $H_{KW}=28.4$, $p<0.0001$, $H_{KW}=36.5$, $p=0.0001$, respectivamente). Estas diferencias se ilustran en las Figuras 7.1 a 7.6.

Tabla 7.1. Valores centrales y de dispersión de las edades y variables antropométricas en los grupos estudiados

Características antropométricas	Sanos n=17		RCIU leve n=17		RCIU severa n=17	
	Mediana	IQT	Mediana	IQT	Mediana	IQT
EPC (semanas)	40.6	40-41.3	40.5	39.5-41	40	39-40.5
Edad Gestacional	37.5	37-39	38.	37.5-39	36	34.2-37.6
Peso al nacer (g)	3000	2800- 3060	2420	2210- 2600	1950	1420- 2130
PC al Nacer (cm)	33	32-35	32	31.5-33	30	5.5-30
Índice Cefalización	1.1	1-1.2	1.31	1.23-1.44	1.89	1.2-2.04
PC Est (cm)	36	35.3-36	34.3	33.8-35	33.5	31-34.5
Tiempo en RCIU (semanas)	0	0	5	3-6	7	5-8

EPC, edad postconcepcional; PC al Nacer, perímetro cefálico al nacer; PC.Est, perímetro cefálico en el estudio; IQT, intervalo inter cuartiles, RCIU, restricción del crecimiento intrauterino.

Tabla 7.2. Resultados de la comparación de las variables antropométricas mediante la prueba de Kruskal Wallis

Características antropométricas	Sanos-Leves-Severos	
	H _{KW}	p
Edad PostC (semanas)	4.5	0.10
Edad Gestacional	12.3	0.002
Peso al nacer (g)	34.5	<0.0001
PC al Nacer (cm)	13.2	0.001
Índice Cefalización	11.5	0.003
PC. Est (cm)	24.8	<0.0001
Tiempo en RCIU (semanas)	36.5	<0.0001

Edad PostC, edad postconcepcional; PC al Nacer, perímetro cefálico al nacer; PC.Est, perímetro cefálico en el estudio; H_{KW}, estadístico H de Kruskal Wallis.

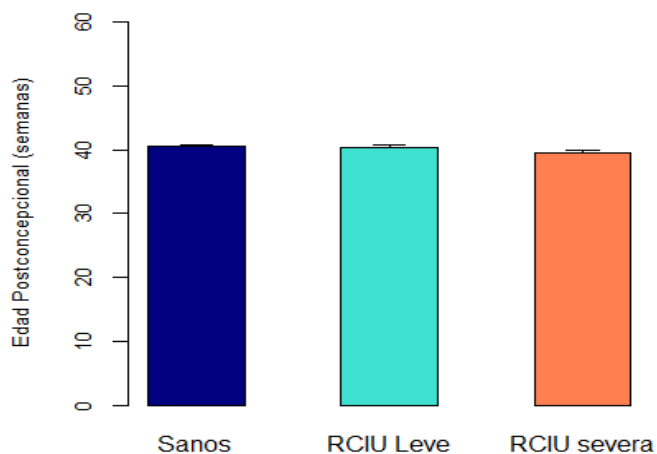


Figura 7.1. Comparación de las edades postconcepcionales. Se muestran los valores medios y el error estándar de la Edad Postconcepcional en semanas en los grupos examinados: sanos o controles, restricción del crecimiento intrauterino leve, restricción del crecimiento intrauterino severa.

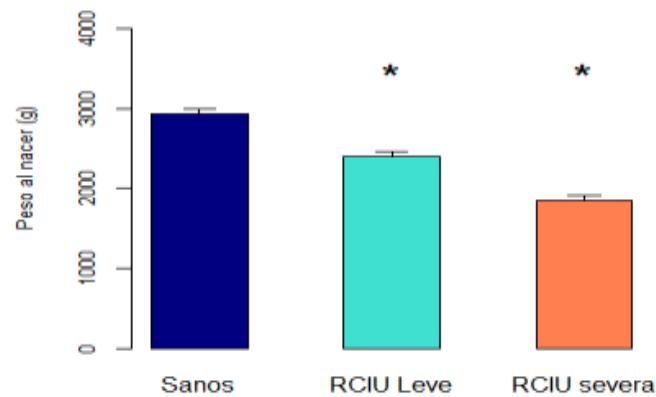


Figura 7.2. Comparación de las variables antropométricas: Diferencias en el peso al nacer ($\chi^2=34.5$, $df=3$, $p<0.0001$). Se muestran los valores medios y el error estándar del Peso al nacer expresado en gramos en los grupos examinados: sanos o controles, restricción del crecimiento intrauterino leve, restricción del crecimiento intrauterino severa.

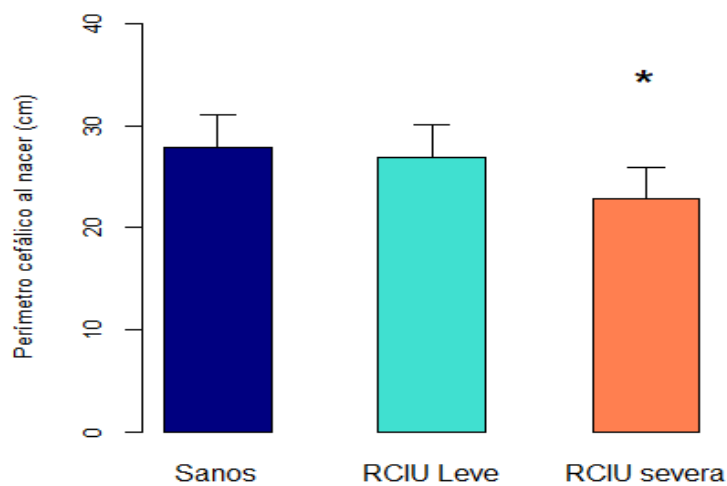


Figura 7.3. Comparación de las variables antropométricas: Diferencias en el Perímetro cefálico al nacer (HKW=13.2, $p=0.001$). Se muestran los valores medios y el error estándar del Perímetro cefálico al nacer expresado en cm en los grupos examinados: sanos o controles, restricción del crecimiento intrauterino leve, restricción del crecimiento intrauterino severa.

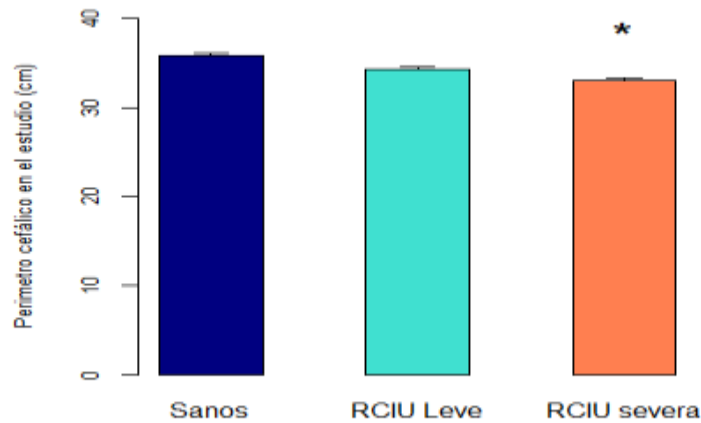


Figura 7.4. Comparación de las variables antropométricas: Diferencias en el Perímetro cefálico en el estudio (HKW=24.8, $p < 0.0001$). Se muestran los valores medios y el error estándar del Perímetro cefálico en el estudio, expresado en cm en los grupos examinados: sanos o controles, restricción del crecimiento intrauterino leve, restricción del crecimiento intrauterino severa.

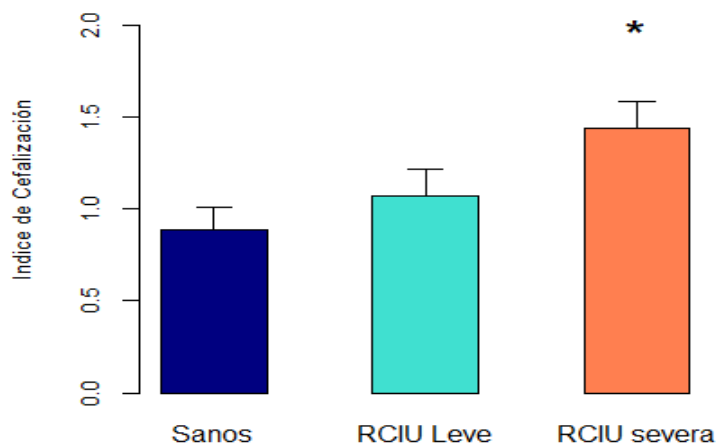


Figura 7.5. Comparación de las variables antropométricas. Se muestran los valores medios y el error estándar del Índice de Cefalización, calculado como el cociente entre peso y perímetro cefálico al nacer en los grupos examinados: sanos o controles, restricción del crecimiento intrauterino leve, restricción del crecimiento intrauterino severa. Se observaron diferencias significativas entre los grupos (HKW=11.5, $p = 0.003$).

En particular, la Figura 7.5 muestra la comparación entre los distintos grupos en cuanto al Índice de Cefalización, o sea, la correspondencia existente entre el peso del bebé y su perímetro cefálico, en el momento del nacimiento. Sus valores normales oscilan alrededor de 1, mientras más elevado el índice, más probable es que exista asimetría del crecimiento y una desproporción anormal entre ambas medidas. Un cuerpo pequeño, con un peso demasiado bajo con respecto al PC indica un efecto marcado y probable del fenómeno de ‘brain sparing’ durante el embarazo, que se observa más acentuado en el grupo con RCIU severa.

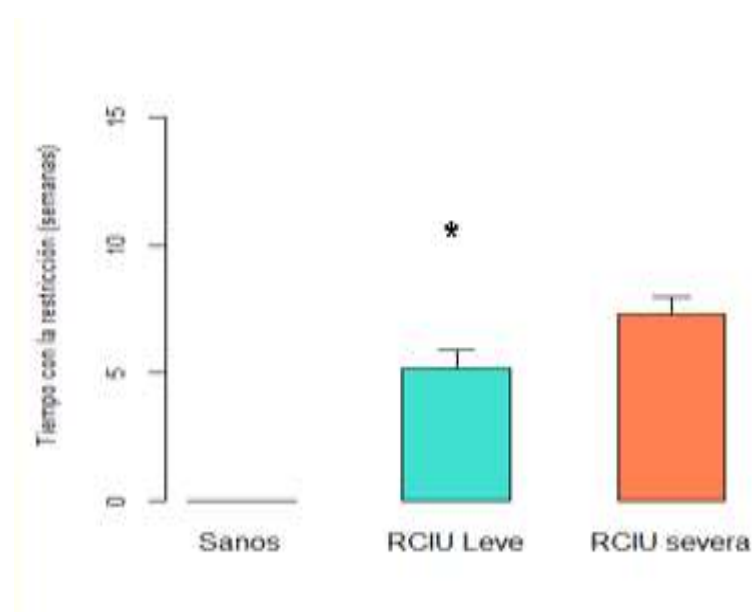


Figura 7.6. Se muestran los valores medios y el error estándar del Tiempo en restricción del crecimiento intrauterino, en semanas, en los grupos examinados: sanos, restricción del crecimiento intrauterino leve, restricción del crecimiento intrauterino severa. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos RCIU leve y severa (HKW=36.5, $p=0.0001$)

7.2 Potenciales evocados Auditivos de Tronco encefálico

La Figura 7.7 ilustra los grandes promedios de los PEATC obtenidos en neonatos sanos de edades similares a las del grupo de bebés presentados en este estudio.

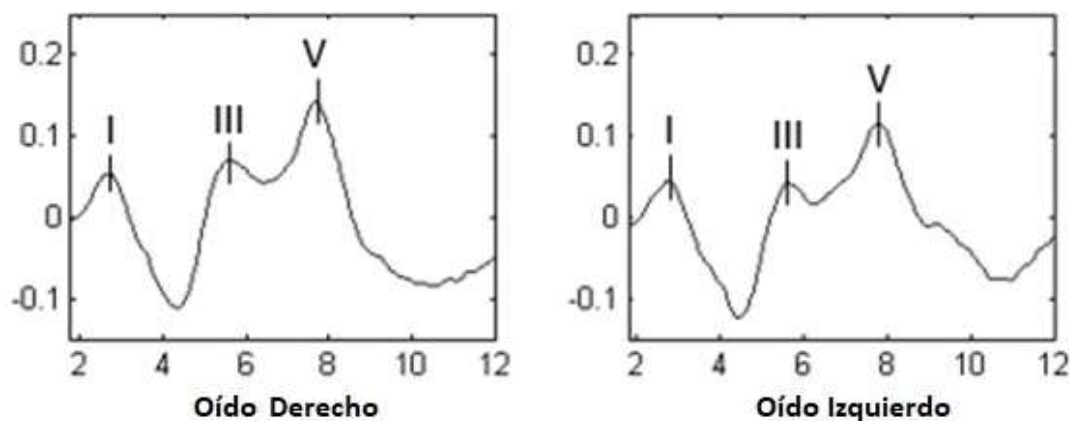


Figura 7.7. Curvas de gran promedio de los Potenciales Evocados Auditivos de Tronco Encefálico, obtenidas en neonatos sanos. I. Onda I del PEATC; III. Onda III; V. Onda V.

La comparación de las variables del PEATC entre ambos oídos no mostró diferencias significativas ($p < 0.09$), por lo que en los análisis se utilizaron los valores medios entre oídos izquierdo y derecho en cada neonato.

En la Tabla 7.3 se pueden observar los resultados de la comparación de las variables del PEATC de neonatos a término y pretérmino mediante la t-Student, que no muestra diferencias significativas entre ambos grupos ($t > 1.54$, $p > 0.12$), por lo que los neonatos pueden considerarse como un solo grupo.

Tabla 7.3 Resultados de la comparación de las variables del Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico entre neonatos de término y pretérmino

Latencias Absolutas	Comparación	
	t (gl=46)	p
Onda I	1.26	0.21
Onda III	0.39	0.69
Onda V	1.20	0.23
Intervalos Interpicos		
Interv I-III	0.46	0.64
Interv III-V	1.54	0.12
Interv I-V	0.92	0.36

En la Tabla 7.4 se observan las características de las ondas del PEATC en los grupos estudiados. La Tabla 7.5 muestra los resultados del análisis de varianza de un factor con tres niveles (neonatos sanos, con RCIU leve y con RCIU severa), que no mostró diferencias significativas entre los tres grupos ($F_{(2,48)} < 1.85$, $p > 0.16$), tanto para las latencias absolutas, como para los intervalos interpicos, como se ilustra en las Figuras 7.8 y 7.9.

Tabla 7.4. Valores medios y dispersión de las variables del Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico

PEATC	Sanos		RCIU leve		RCIU severa	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Latencias Absolutas						
Onda I	2.73	0.20	2.79	0.16	2.85	0.23
Onda III	5.57	0.28	5.59	0.33	5.70	0.37
Onda V	7.95	0.38	8	0.41	8.22	0.48
Intervalos interpicos						
Intervalo I-III	2.83	0.27	2.80	0.26	2.85	0.27
Intervalo III-V	2.40	0.31	2.42	0.27	2.53	0.34
Intervalo I-V	5.23	0.41	5.23	0.33	5.38	0.39

Tabla 7.5. Resultados del Análisis de Varianza de un factor (grupos), por tres niveles (Sanos, RCIU leve, RCIU severa)

Latencias Absolutas	Sanos-Leves-Severos	
	F _(gl=2,48)	p
Onda I	1.47	0.23
Onda III	0.81	0.54
Onda V	1.85	0.16
Intervalos Interpicos		
Intervalo I-III	0.14	0.86
Intervalo III-V	0.91	0.58
Intervalo I-V	0.94	0.59

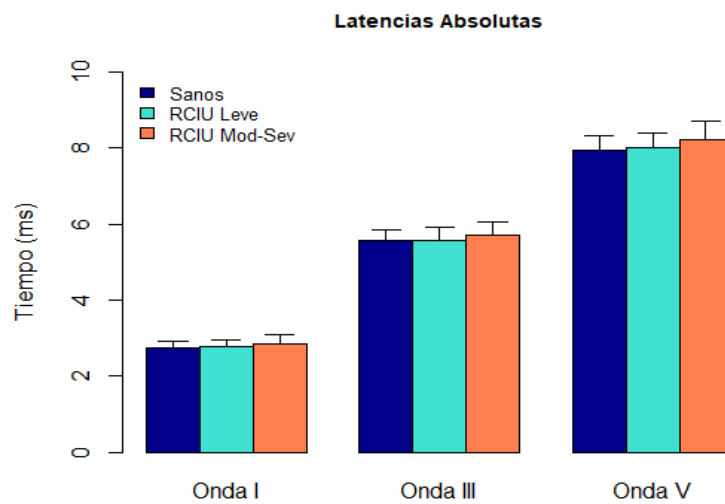


Figura 7.8. Se muestran los valores medios y el error estándar de las latencias absolutas del Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico en los neonatos y la ausencia de diferencias entre los sanos y con restricción del crecimiento intrauterino.

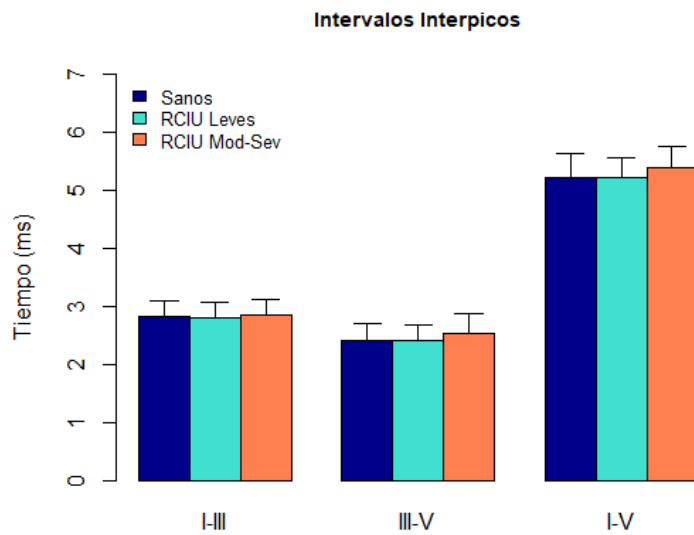


Figura 7.9. Se muestran los valores medios y el error estándar de los intervalos interpicos del Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico en los tres grupos de neonatos estudiados.

7.3 Potenciales Evocados Visuales

7.3.1 Replicabilidades

A la inspección se observaron respuestas reproducibles en ambos ojos en el 87.5% de los recién nacidos sanos, pues uno de ellos mostró respuesta no reproducible unilateral derecha. Como se muestra en la Figura 7.10, todos los RCIU del grupo leves presentaron respuestas reproducibles en ambos ojos, mientras que en el grupo con afectación severa, un neonato presentó bilateralmente respuesta no identificable y 4 mostraron ausencia de respuesta al estimular el ojo derecho, ($\chi^2=12.2$, $p=0.002$).

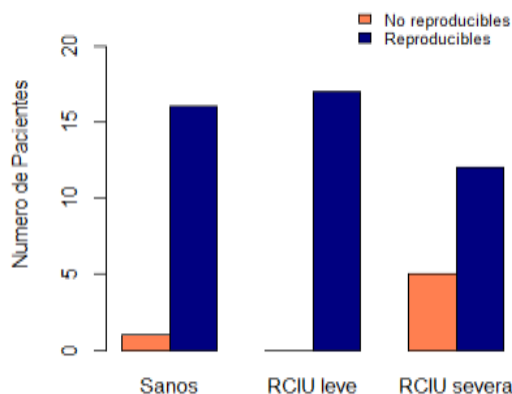


Figura 7.10. Diferente grado de reproducibilidad de los Potenciales Evocados Visuales entre los grupos de neonatos con restricción del crecimiento intrauterino (RCIU). El 87.5% de los neonatos sanos mostró respuesta visual identificable, a igual que el 100% de los que presentaron restricción leve. Una proporción significativamente mayor de neonatos con RCIU severa mostró ausencia de respuestas visuales evocadas reproducibles ($\chi^2=12.2$, $p=0.002$).

Como un bebé sano y varios con RCIU mostraron ausencia de respuestas reproducibles al estimular el ojo derecho, todos los análisis estadísticos de latencias, amplitudes y latencias interpicos fueron realizados considerando solamente los valores obtenidos al estimular el ojo izquierdo en todos los neonatos evaluados.

7.3.2 Análisis de los componentes del PEV

En la Tabla 7.6 se resumen los valores medios y de dispersión de las latencias de las ondas del PEV. Se observó cierta tendencia al incremento en latencias y disminución de amplitudes para las ondas N2 y P2 en el grupo con restricción severa con respecto a los neonatos sanos, sin embargo, estas diferencias no llegan a alcanzar significación estadística en el análisis de varianza de un factor con tres grupos (sanos, restricción leve y restricción severa) como se muestra en la Tabla 7.7 y las Figuras 7.11 a 7.13.

Tabla 7.6. Valores medios y Desviación Estándar de las variables del Potencial Evocado Visual

PEV	Sanos		RCIU leve		RCIU severa	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Latencias Absolutas						
Onda N2	143.9	29.6	159.7	24.1	155.8	30.5
Onda P2	212.4	19.7	217.02	25.6	221.6	31.9
Onda N3	309.9	50.6	295.8	36.5	309.9	50.6
Intervalos interpicos						
Interv N2-N3	159.3	33.7	140.05	40.2	168.5	48.7
Interv N2-P2	68.4	20.7	57.3	17.6	65.7	26.4
Interv P2-N3	90.8	25.7	85.8	32.05	97.7	32.9
Amplitudes						
Ampl N2-P2	10.05	5.5	7.08	3.9	7.5	2.7
Ampl P2-N3	15.6	11.2	12.7	6.1	10.6	4.8

Tabla 7.7. Resultados del Análisis de Varianza de un factor (grupos) por tres niveles (Sanos, RCIU Leve, RCIU Severa)

Latencias Absolutas	Sanos-Leves-Severos	
	F (gl=2,48)	p
Onda N2	1.44	0.23
Onda P2	0.52	0.60
Onda N3	0.45	0.64
Intervalos Interpicos		
Interv N2-N3	2.10	0.13
Interv N2-P2	0.14	0.30
Interv P2-N3	0.65	0.53
Amplitudes		
Ampl N2-P2	H _{KW} 3.60	p 0.16
Ampl P2-N3	2.17	0.33

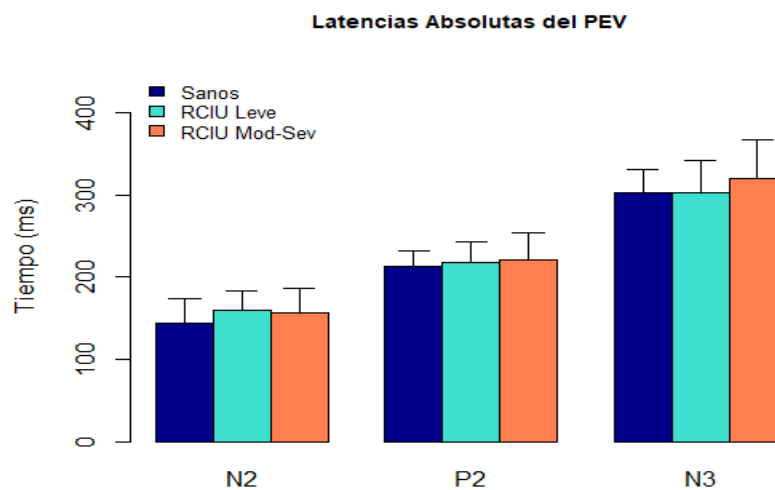


Figura 7.11. Se muestran los valores medios y el error estándar de las latencias absolutas de las ondas N2, P2 y N3 del Potencial Evocado Visual en los neonatos con Restricción del crecimiento intrauterino.

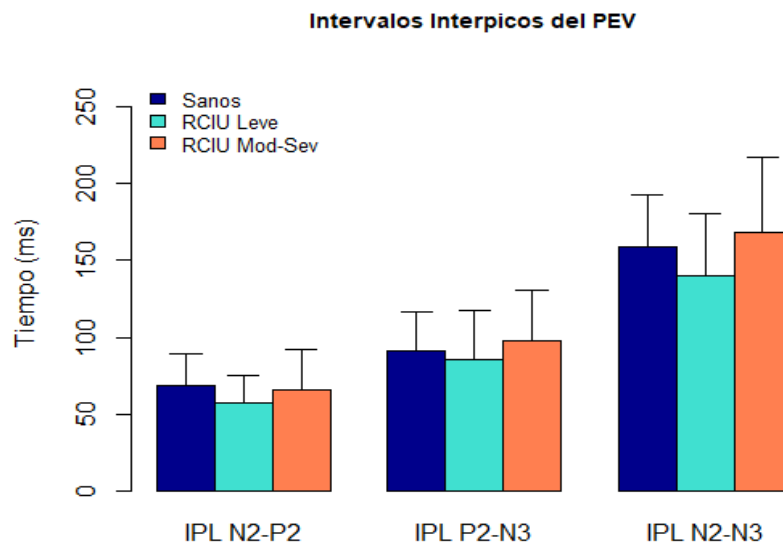


Figura 7.12. Ausencia de diferencias entre grupos para los intervalos interpicos del Potencial Evocado Visual en los neonatos con restricción del crecimiento intrauterino. Se muestran los valores medios y el error estándar de los intervalos interpicos (IPL).

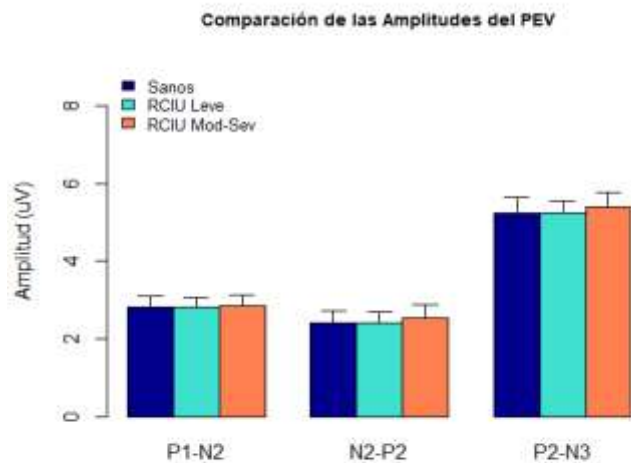


Figura 7.13. Valores medios y errores estándar de las amplitudes del Potencial Evocado Visual en los neonatos en los neonatos con restricción del crecimiento intrauterino. Se demuestra la ausencia de diferencias entre grupos.

7.4 Electroencefalograma

7.4.1 Análisis cualitativo

Los estudios de EEG se realizaron con una duración promedio de 67.8 minutos, con un máximo de 94 y mínimo de 45 minutos. El 95% de los estudios tuvo una duración de 60 minutos o superior. Los grupos fueron comparados en cuanto a las características del EEG y los porcentajes de las distintas fases, como se muestra en la Tabla 7.8. Se observó que la duración de las discontinuidades fue aumentando significativamente en los grupos a medida que se empeora la RCIU ($K_w=6.63$ $p=0.03$). En el grupo de neonatos sanos se apreció una diferencia significativamente menor en la edad estimada por EEG con respecto a la real ($F=5.05$, $p=0.02$). Los porcentajes de vigilia, sueño quieto, sueño activo, trazados discontinuo, alternante e indeterminado, así como el número de alertamientos, de apneas y la duración máxima de estas no mostraron diferencias entre los grupos ($p>0.08$).

Tabla 7.8. Valores medios, Desviación Estándar y Comparación de las variables cualitativas del EEG en los tres grupos estudiados

EEG Cualitativo	Sanos	RCIU Leve	RCIU Severa	Comparación
n	17	17	17	
EC-EEG (semanas)	38.8 ± 1.52	37.5 ± 0.96	37.6 ± 1.97	F=0.36 p=0.54
Diff EC-EdadEEG	1.87 ± 9.84	3.16 ± 1.33	2.21 ± 1.74	F=5.05 p=0.02 *
% Vigilia	16 ± 12.3	17.2 ± 12.7	15.02 ± 7.2	Kw=0.22 p=0.89
% Sueño Quietos	13.4 ± 6.8	10.03 ± 6.7	8.85 ± 4.2	Kw=5.01 p=0.08
% Sueño Activo	36.1 ± 9.7	35.9 ± 13.1	32.2 ± 12.9	F=0.92 p=0.34
% T.Discontinuo	4.16 ± 2.8	4.9 ± 3.4	9.13 ± 11.6	Kw=0.55 p=0.75
% T.Alternante	46.5 ± 7.5	32.1 ± 9.9	32.7 ± 12.3	Kw=1.9 p=0.38
% S.Indeterm	11.2 ± 5.8	11.5 ± 4.8	11.4 ± 5.8	F=0.009 p=0.92
Max Disc	4.5 ± 1.7	5.7 ± 1.46	8.1 ± 5.5	Kw=6.63 p=0.03 *
N Alertamientos	13.2 ± 7.2	12.8 ± 7.2	11.4 ± 6.8	Kw=5.01 p=0.08
N Apneas	44.6 [21-59]	50.6 [19-77]	45.5 [11-92]	Kw=0.91 p=0.63
Duración máx. Apn.	7.6 ± 2.15	7.7 ± 2.06	7.1 ± 2.4	Kw=0.33 p=0.84

Abreviaturas utilizadas: EC-EEG, edad estimada por el electroencefalograma; Diff EC-Edad EEG, diferencia entre la edad estimada por EEG y la edad neonatal real; T.Discontinuo, trazado discontinuo; T.Alternante, trazado alternante; S.Indeterm, sueño indeterminado; Max Disc, duración máxima de las discontinuidades; N Alertamientos, cantidad de alertamientos; N Apneas, número de apneas; Duración max.Apn. Duración máxima de las apneas registradas.

En las Figuras 7.14 y 7.15 se muestran ejemplos de trazados con actividad paroxística anormal. Aunque ninguno de los neonatos registrados mostró manifestaciones clínicas epileptiformes, el 58% de los pacientes con restricción leve y el 64% con restricción severa presentaron descargas paroxísticas intercríticas en el EEG, lo cual constituyó una proporción significativamente superior a lo observado en los neonatos controles, que no presentaron descargas paroxísticas anormales ($\chi^2=12.4$, $p=0.001$).

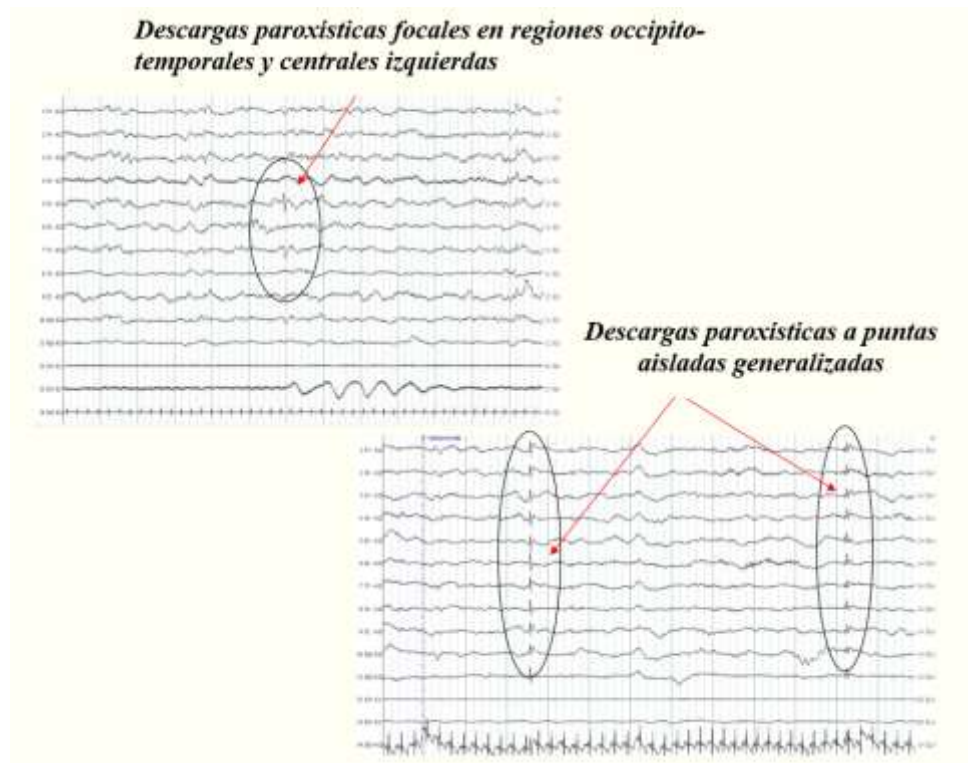


Figura 7.14. Ejemplos de trazados electroencefalográficos con descargas paroxísticas intercríticas neonatales, observadas en un 58 a 64% de los neonatos con restricción del crecimiento intrauterino.

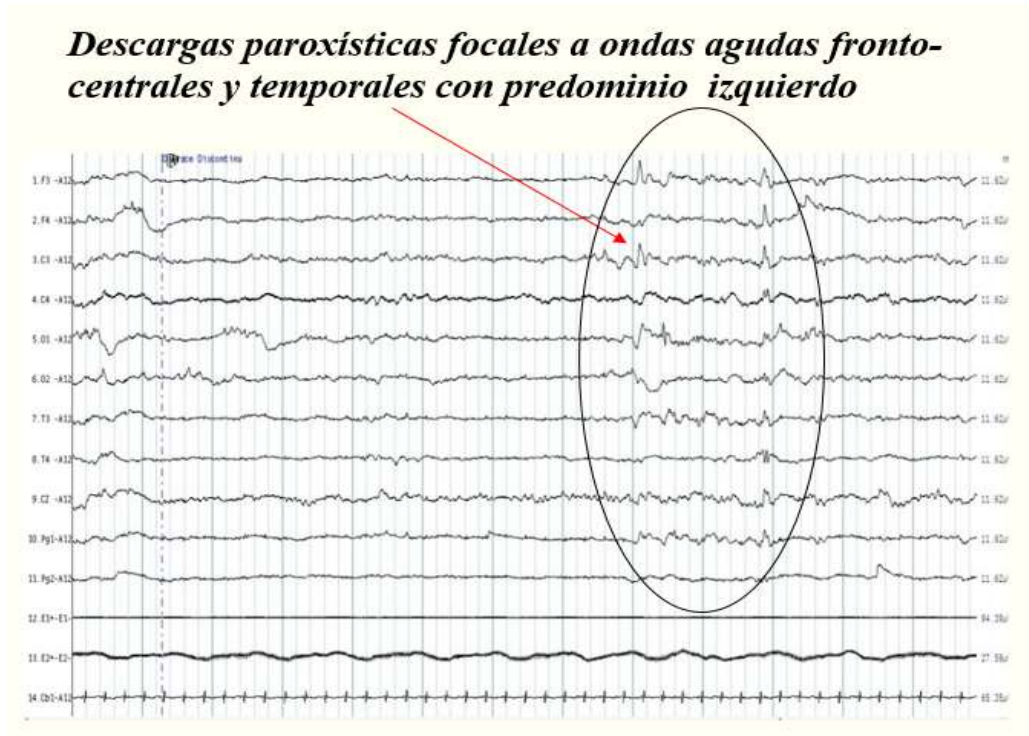


Figura 7.15. Ejemplos de trazados electroencefalográficos con descargas paroxísticas intercríticas focales, frecuentes en un 58 a 64% de los neonatos con restricción del crecimiento intrauterino.

7.4.2 Análisis cuantitativo del EEG

En las Figuras 7.16 y 7.17 se muestran dos ejemplos de los espectros de energía, expresada en $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$, aportada por las oscilaciones del EEG obtenidos en bebés sanos en sueño quieto y activo, en las frecuencias de 1 a 30 Hz para cada derivación, que fueron generados mediante la Transformada Rápida de Fourier en el análisis cuantitativo de banda estrecha.

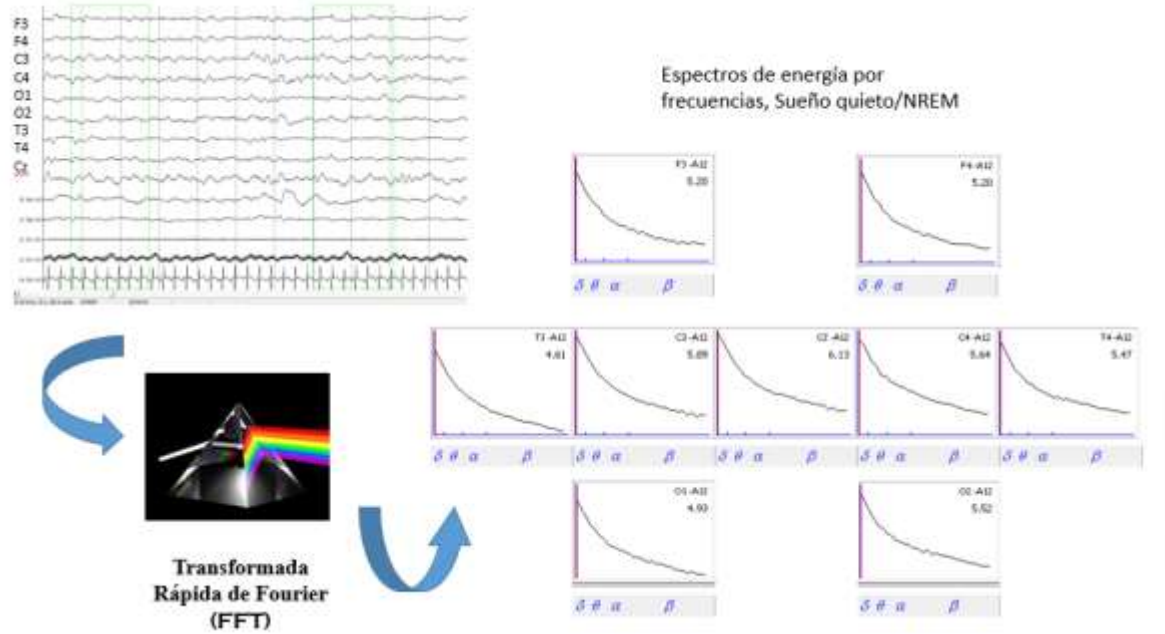


Figura 7.16. Ejemplo de los resultados del análisis espectral de banda estrecha en las derivaciones de EEG registradas en un neonato sano durante sueño quieto, precursor del NREM.

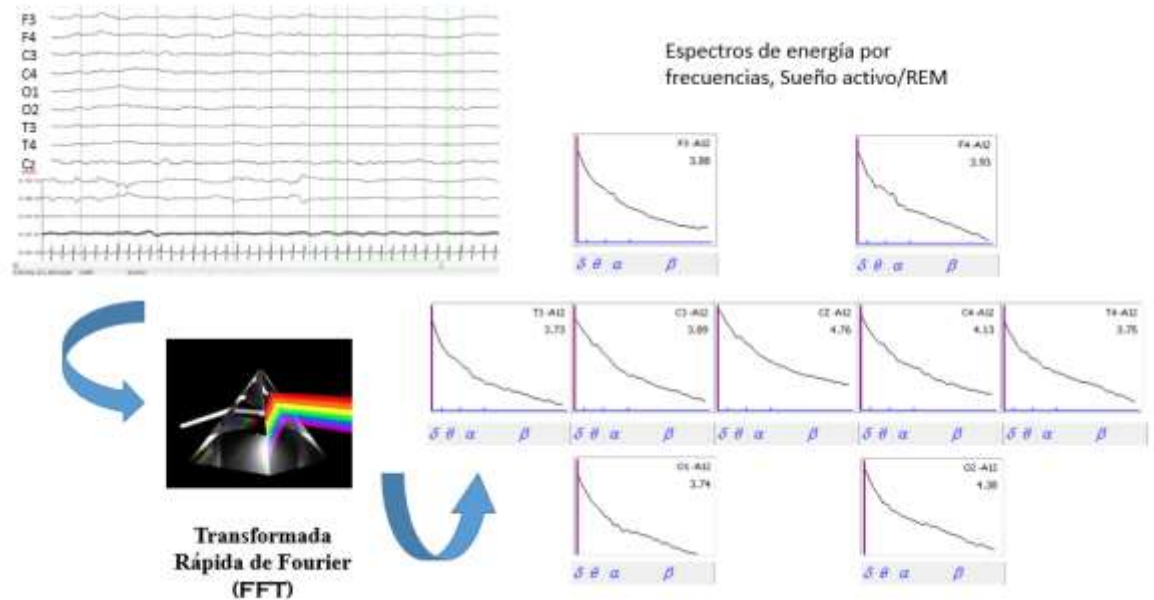


Figura 7.17. Ejemplo de los resultados del análisis espectral de banda estrecha en las derivaciones de EEG registradas en un neonato sano durante sueño activo.

Con el fin de identificar las bandas de frecuencias con aporte de variabilidad común en el EEG neonatal y así reducir el número de frecuencias a considerar, se realizaron análisis de componentes principales, sobre las matrices de valores de energía por frecuencia del EEG. En la Figura 7.18 se muestra la salida final de los componentes principales, que permitió identificar tres bandas de frecuencias consistentes, con características similares en neonatos a término y pretérmino.

	Eigenval	%	de	Varianza
	1	14.8149	49.38	49.38
	2	4.8627	16.21	65.59
	3	5.3327	17.78	83.37
	Vectores	Rotados:		
1	0.023	0.224	0.089	
2	0.048	0.926	0.058	
3	0.035	0.941	0.132	
4	0.04	0.901	0.266	
5	0.073	0.825	0.393	
6	0.01	0.708	0.54	
7	0.187	0.538	0.68	
8	0.111	0.477	0.733	
9	0.206	0.313	0.785	
10	0.466	0.313	0.695	
11	0.392	0.297	0.776	
12	0.575	0.221	0.637	
13	0.592	0.27	0.598	
14	0.664	0.208	0.565	
15	0.74	0.17	0.46	
16	0.771	0.146	0.455	
17	0.866	0.092	0.332	
18	0.862	0.141	0.333	
19	0.907	0.062	0.294	
20	0.908	0.097	0.202	
21	0.909	0.044	0.237	
22	0.933	0.066	0.134	
23	0.956	0.054	0.178	
24	0.962	0.048	0.145	
25	0.955	0.055	0.109	
26	0.932	0.017	0.164	
27	0.962	0.041	0.095	
28	0.942	0.005	0.184	
29	0.95	0.03	0.101	
30	0.954	0.027	0.137	

Figura 7.18. Resultados del análisis de componentes principales con rotación VARIMAX de las potencias absolutas de cada frecuencia de 1 a 30 Hz. Dicho análisis permitió identificar las bandas de frecuencias con variación común en el EEG neonatal. El componente 1, sombreado en rosa, muestra varianza común para las frecuencias de 13 a 30 Hz, que explica el 49.38%. El segundo componente incluye las frecuencias lentas, de 2 a 6 Hz, y explica el 16.2% de la varianza de los datos, mientras que tercer componente, sombreado en la columna extrema derecha, muestra variación conjunta para las frecuencias de 7 a 13 Hz, y explica el 17.7% de la varianza. Eigenval, peso de cada componente.

Estas bandas incluyeron el componente 1. Frecuencias rápidas, de 13 a 30 Hz, que explicaron el 49.4 % de la variabilidad; Componente 2. Frecuencias lentas, de 2 a 6 Hz, que explicaron el 16.2 % de la varianza y Componente 3. Frecuencias intermedias, de 7 a 13 Hz, que explicaron una proporción de varianza similar a la anterior, un 17.8 %. En la Figura 7.19 se observa el espectro promedio para las fases de sueño activo y quieto, en todos los neonatos estudiados, así como la diferenciación entre las tres bandas anchas de frecuencia identificadas.

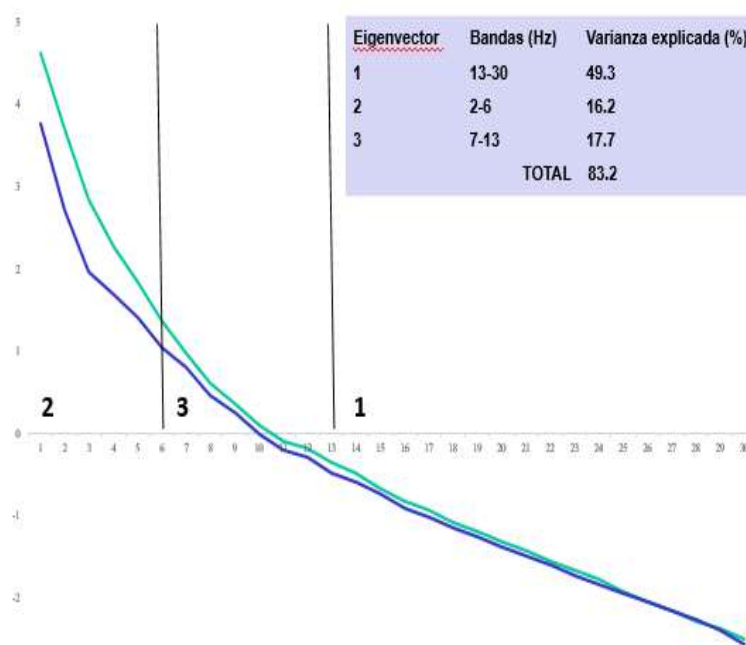


Figura 7.19. Representación del espectro promedio de las potencias absolutas de cada frecuencia de 1 a 30 Hz, luego de realizárseles una transformación logarítmica. La línea azul oscura representa el espectro para el sueño activo, la azul más claro, para el sueño quieto. El cuadro superior a la derecha muestra las tres bandas de frecuencias identificadas con el análisis de componentes principales.

Teniendo en cuenta los límites definidos por las bandas anteriores, se calcularon los valores medios de energía para cada una, obtenidos en las ocho derivaciones del EEG, en los tres grupos de neonatos, durante los estados de sueño activo y quieto. Como se muestra en las Tablas 7.9 y 7.10, los valores de energía en las tres bandas de frecuencia son mayores en el sueño quieto que en el sueño activo, en todos los grupos. Las Figuras 7.20 a 7.22 muestran estos resultados en forma gráfica, solo en la banda lenta se observan diferencias entre sueño

quieto y sueño activo. En esta banda, el grupo de neonatos sanos muestra una cantidad mayor de energía en el sueño quieto que los grupos de RCIU, que muestran valores similares. En la Tabla 7.11 se pueden observar los resultados de la comparación mediante el ANOVA de los tres grupos de recién nacidos con respecto al estado de sueño, que muestra un efecto significativo de este último en los tres grupos ($F > 9.85$, $p < 0.003$), pero sin que se demuestren diferencias entre los grupos de neonatos ($F < 0.45$, $p > 0.66$).

Tabla 7.9. Valores medios y desviación estándar de las energías absolutas totales por bandas por grupos de restricción, durante el sueño quieto

EEG cuantitativo Valores en μV	Sanos		RCIU leve		RCIU severa	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Banda de 2-6 Hz	19.7	9.85	17.1	7.63	16.5	7.4
Banda de 7-13 Hz	1.41	0.50	1.47	0.55	1.58	0.65
Banda de 13-30 Hz	0.30	0.11	0.31	0.21	0.34	0.30
Valores en Log						
Banda de 2-6 Hz	2.86	0.51	2.73	0.47	2.69	0.48
Banda de 7-13 Hz	0.27	0.39	0.31	0.39	0.38	0.39
Banda de 13-30 Hz	-1.26	0.37	-1.25	0.44	-1.19	0.47

Abreviaturas utilizadas: RCIU, restricción del crecimiento intrauterino; DS, desviación estándar; Log, valores transformados a logaritmos.

Tabla 7.10. Valores medios y desviación estándar de las energías absolutas totales por bandas, por grupos de restricción, durante el sueño activo

EEG cuantitativo Valores en μV	Sanos		RCIU leve		RCIU severa	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Banda de 2-6 Hz	7.60	3.04	7.80	2.96	7.68	3.39
Banda de 7-13 Hz	1.16	0.43	1.32	0.50	1.43	0.63
Banda de 13-30 Hz	0.27	0.09	0.30	0.31	0.33	0.32
Valores en Log						
Banda de 2-6 Hz	1.94	0.42	1.98	0.38	1.93	0.46
Banda de 7-13 Hz	0.08	0.36	0.22	0.35	0.27	0.42
Banda de 13-30 Hz	-1.37	0.37	-1.31	0.45	-1.25	0.47

Abreviaturas utilizadas: RCIU, restricción del crecimiento intrauterino; DS, desviación estándar; Log, valores transformados a logaritmos

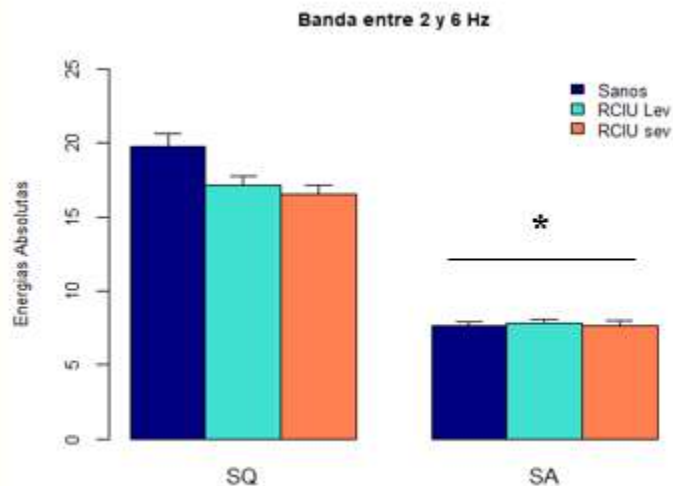


Figura 7.20. Se muestran la media y el error estándar de la banda lenta, de 2 a 6 Hz, en sueño quieto (SQ) y sueño activo (SA), en los tres grupos comparados: neonatos sanos, con restricción leve (RCIU lev) y con restricción del crecimiento severa (RCIU sev). Se observaron diferencias significativas entre SA y SQ en los tres grupos de neonatos ($F > 9.85$, $p < 0.003$).

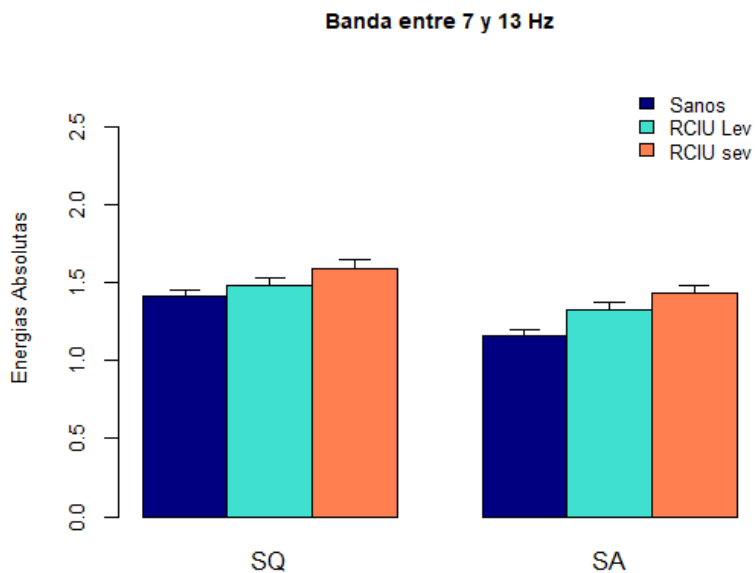


Figura 7.21. Se muestran la media y el error estándar de la banda intermedia de 7 a 13 Hz, en sueño quieto (SQ) y sueño activo (SA), en los tres grupos comparados: neonatos sanos, con restricción leve (RCIU lev) y con restricción del crecimiento severa (RCIU sev).

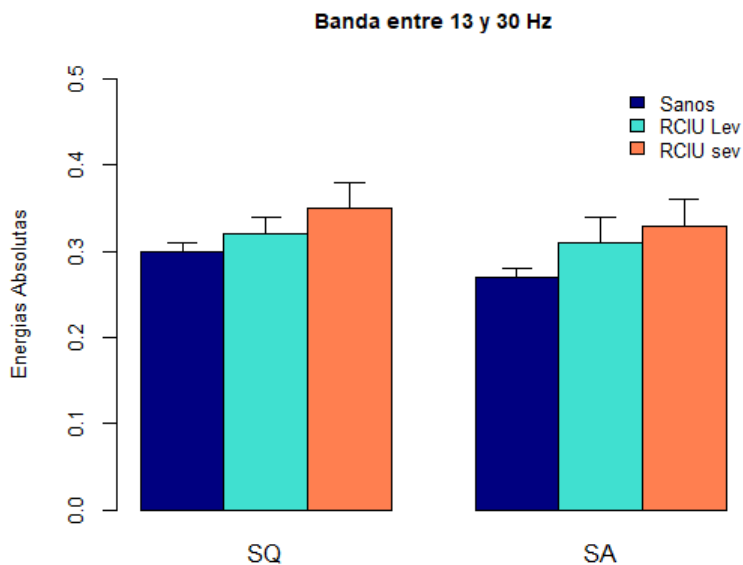


Figura 7.22. Se muestran la media y el error estándar de la banda rápida de 13 a 30 Hz, en sueño quieto (SQ) y sueño activo (SA), en los tres grupos comparados: neonatos sanos, con restricción leve (RCIU lev) y con restricción del crecimiento severa (RCIU sev).

Tabla 7.11. Resultados del Análisis de Varianza mixto (grupos de restricción por estados de sueño) para la potencia absoluta de las tres bandas anchas.

EEG	Sanos-Leves- Severos		Fases del sueño		AxB	
	A		B		F	p
	F	p	F	p		
Banda de 2-6 Hz	0.52	0.60	46	0.0000	1.94	0.15
Banda de 7-13 Hz	1.80	0.17	22.5	0.0001	1.02	0.36
Banda de 13-30 Hz	0.69	0.51	9.85	0.003	0.43	0.66

Con el fin de evaluar el efecto de la restricción del crecimiento intrauterino sobre las modificaciones electroencefalográficas fisiológicas relacionadas con los cambios entre las fases de sueño quieto a sueño activo, se calcularon las diferencias en los valores de energía

entre ambas etapas, sueño quieto y sueño activo (SQ-SA), para las tres bandas: lenta, intermedia y rápida. Como se puede observar en la Tabla 7.12, los valores diferencia SQ-SA,

sólo muestran una tendencia consistente a la disminución gradual en la banda lenta (2 a 6 Hz) entre los neonatos sanos ($12.18 \mu V^2$), con RCIU leve ($9.34 \mu V^2$) y aquellos con RCIU severa, en los que descendió a $8.82 \mu V^2$.

Tabla 7.12. Valores medios y desviación estándar de las diferencias de energías absolutas entre ambos tipos de sueño, por bandas del EEG neonatal

EEG cuantitativo Valores en μV	Sanos		RCIU leve		RCIU severa	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Banda de 2-6 Hz	12.18	8	9.34	6.12	8.82	6.14
Banda de 7-13 Hz	0.24	0.37	0.14	0.43	0.15	0.39
Banda de 13-30 Hz	0.030	0.08	0.007	0.14	0.01	0.08
Valores en Log						
Banda de 2-6 Hz	2.29	0.73	2.02	0.77	1.89	1
Banda de 7-13 Hz	0.51	0.98	0.25	0.78	0.33	0.93
Banda de 13-30 Hz	0.06	0.16	0.03	0.18	0.02	0.18

Abreviaturas utilizadas: RCIU, restricción del crecimiento intrauterino; DS, desviación estándar; Log, valores transformados a logaritmos.

Como se muestra en la Tabla 7.13, estas diferencias resultaron significativas ($F=3.19$, $p=0.04$) en el ANOVA de dos factores, un factor A con tres niveles, dados por los grupos control, restricción leve y severa, y un factor B, constituido por las ocho derivaciones registradas, que mostró una variación significativa para las tres bandas de frecuencia ($F>3.43$, $p<0.001$).

Tabla 7.13. Resultados del análisis de varianza (grupos por derivaciones) de las diferencias de energías absolutas, entre ambos tipos de sueño por cada banda del EEG

EEG Valores en Log	Sanos-Leves- Severos A		Derivaciones del EEG B		Interacción de AxB	
	F	p	F	p	F	p
Banda de 2-6 Hz	3.19	0.04*	20.6	<0.0001	0.65	0.82
Banda de 7-13 Hz	1.27	0.28	3.43	0.001	0.98	0.52
Banda de 13-30 Hz	0.54	0.58	4.03	0.0005	1.18	0.28

Tabla 7.14. Resultados de la comparación post-hoc entre los tres grupos de las diferencias entre SQ y SA, para la banda de 2 a 6 Hz en el EEG

Sanos vs leves	p>0.05, NS
RCIU leve	p>0.05, NS
versus severa	
Sanos versus RCIU severa	p<0.05 *

Abreviaturas utilizadas: SA, sueño activo, SQ, sueño quieto, RCIU, restricción del crecimiento intrauterino; NS, diferencias no significativas.

La Tabla 7.14 muestra los resultados de las comparaciones múltiples entre los grupos de RCIU, para las diferencias entre SQ y SA en la banda lenta de 2 a 6 Hz. Las diferencias encontradas fueron significativas entre el grupo de neonatos sanos con respecto al grupo con restricción severa ($p<0.05$). En la Figura 7.23, A, B y C se muestran gráficamente los valores diferencias en los grupos estudiados, para las tres bandas de frecuencias.

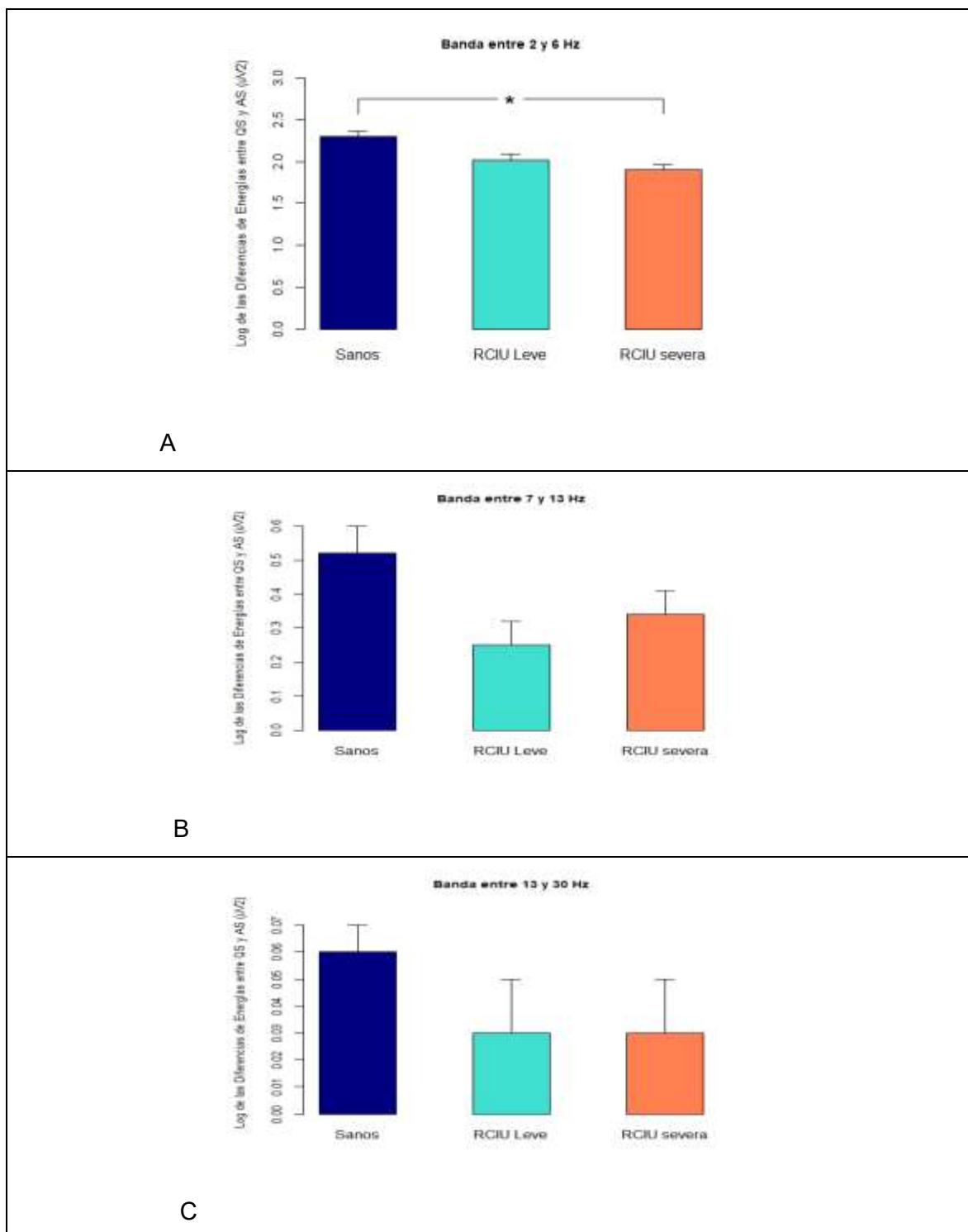


Figura 7.23. Se muestran los valores medios y el error estándar de las diferencias entre sueño quieto y sueño activo (SQ-SA) en los valores de energías absolutas para las bandas del EEG: A. Banda lenta: de 2 a 6 Hz; B. Banda intermedia: de 7 a 13 Hz; C. Banda rápida: de 13 a 30 Hz. Observe señaladas con asterisco en A, las diferencias significativas entre el grupo de neonatos sanos y con RCIU severa ($p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se compararon las características antropométricas y de la actividad eléctrica cerebral espontánea y evocada en tres grupos de neonatos: sanos, con restricción del crecimiento intrauterino leve y con restricción severa. Los neonatos fueron evaluados con las pruebas neurofisiológicas más usadas en esta edad, como son los PEATC, los PEV, el EEG clínico cualitativo y el EEG cuantitativo. Se confirmó la hipótesis de investigación en cuanto a los efectos de la RCIU en la actividad eléctrica cerebral espontánea, ya que el análisis cualitativo del EEG mostró alteraciones cualitativas dadas por aumento de la actividad paroxística intercrítica y en la duración de los intervalos de discontinuidades. El EEG cuantitativo mostró mayores diferencias electroencefalográficas entre sueño activo y sueño quieto en el grupo de sanos, con respecto a aquellos con restricción severa, que pueden interpretarse como signos de inmadurez acentuada en este último grupo. También fue confirmada la hipótesis relacionada con los fuertes efectos antropométricos de la restricción. Sin embargo, contrario a la hipótesis inicial, no se encontraron alteraciones en la actividad eléctrica cerebral evocada por estímulo auditivo ni en las características de los Potenciales Evocados Visuales.

Es conocido que la RCIU tiene consecuencias a largo plazo sobre el funcionamiento cognitivo y conductual. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados en estos neonatos definen la RCIU a partir del peso del neonato al nacer e ignoran las características hemodinámicas prenatales, que solo pueden identificarse adecuadamente con un Ultrasonido Doppler realizado al feto. Por otra parte, los estudios incluyen sin distinción neonatos con RCIU con complicaciones severas, tales como ventilación mecánica asistida, hemorragias intraventriculares, hiperbilirrubinemias multifactoriales, etc. (Yiallourou y cols., 2018; Ozdemir y cols., 2009) De tal forma que no ha sido posible establecer con certeza, si las alteraciones encontradas en estos infantes se deben a comorbilidades o solamente a la RCIU.

8.1 Consecuencias antropométricas de la restricción del crecimiento intrauterino

La presencia de un alto Índice de Cefalización al nacer, así como de un bajo perímetro cefálico en el momento del estudio fueron rasgos presentes en los neonatos con restricción del crecimiento, más acentuados en aquellos con compromiso severo.

La desproporción anormalmente grande en el crecimiento cefálico con respecto al corporal y el interés del Índice de Cefalización como expresión de esta anomalía, fueron descritas por Harel en 1985. Ha sido utilizado por varios grupos para evaluar el efecto de las cardiopatías congénitas o del síndrome alcohólico fetal sobre el crecimiento cefálico y el desarrollo cognitivo futuro de los bebés (Jansen y cols., 2016; Carter y cols., 2016). Los resultados mostrados en este estudio coinciden con lo reportado por estos autores y alertan sobre la necesidad de aplicar la medición temprana del crecimiento cefálico como un signo de alarma precoz, que en nuestra muestra fue ya evidente en el primer mes de vida, en el momento de decidir qué neonatos son tributarios de un tratamiento de neurohabilitación temprana.

Un elemento que sería interesante analizar en el futuro en estos pacientes es el fenómeno de “catch up” o recuperación de los valores de crecimiento cefálico adecuados para la edad, el cual requiere de un seguimiento evolutivo durante al menos 6 meses, un tiempo mayor que el considerado en este estudio transversal en el primer mes de vida. Según Brandt, Sticker y Lentze, 2003, la recuperación del perímetro cefálico ocurrió en un 59% de los neonatos con RCIU hacia el año de edad, y se correlacionó con los índices de desarrollo e inteligencia desde los 18 meses hasta los seis años. Jensen y cols en el 2015 no encontraron diferencias en el coeficiente intelectual entre adolescentes que nacieron pequeños para edad gestacional con respecto a otros que nacieron normales, sin embargo, entre los pequeños para edad gestacional y RCIU, un adecuado alcance de los valores antropométricos normales se relacionó con mayor estatura, incremento en el perímetro cefálico y en el coeficiente intelectual total, en comparación con aquellos que no lograron un adecuado “catch-up”.

Las características antropométricas encontradas confirman que se realizó una adecuada clasificación prenatal en la muestra evaluada y sugieren que un temprano seguimiento evolutivo del crecimiento cefálico postnatal de los neonatos con antecedentes de RCIU puede ser de gran interés en su evaluación, pronóstico y tratamiento.

8.2 Consecuencias de la restricción del crecimiento intrauterino sobre la actividad eléctrica cerebral evocada por estímulo auditivo

Los PEATC se registraron con una frecuencia de 60 clicks para obtener una mejor sensibilidad, como se demostró en el estudio previo, que comparó la efectividad de la frecuencia de estimulación a 10 clicks/s con respecto a 60 clicks/s (Cubero-Rego y cols., 2017).

A pesar de esto, no se confirmó la hipótesis de que existan diferencias entre los grupos normal y con restricción del crecimiento intrauterino, en ninguna de las ondas e intervalos del PEATC. Esto constituye evidencia de que, en estas edades, a esta frecuencia de estimulación y en ausencia de otros factores de riesgo de daño neurológico, no se detectan alteraciones en la conducción nerviosa por la vía auditiva en el tronco encefálico, en los neonatos con RCIU.

Estos hallazgos son similares a los reportados por Jiang y cols, quienes en estudios sucesivos sólo encontraron diferencias muy leves en el intervalo III-V, estimulando a 91 clicks/seg, que atribuyeron a un grado sutil de disfunción neural central, asociada con el pequeño perímetro cefálico secundario a la RCIU. De modo semejante, Kohelet en 2000, tampoco encuentra diferencias entre neonatos pretérmino con y sin restricción del crecimiento intrauterino, para ninguna de las ondas e intervalos del PEATC. Angrisani y cols., 2012, compararon neonatos a término sanos y pequeños para edad gestacional, sin lograr identificar diferencias en las ondas del PEATC entre ambos grupos.

Por otra parte, los neonatos con RCIU estudiados solo se expusieron a niveles moderados de deterioro por la restricción. De acuerdo a los criterios de Figueras y Gratacós, sólo

presentaron una insuficiencia placentaria ligera, sin llegar a niveles extremos de acidosis fetal, como puede llegar a ocurrir en la RCIU de grados II o III.

Estos resultados en los PEATC son diferentes a lo descrito en otras enfermedades como la asfixia perinatal, en la cual la hipoxia, intensa y brusca, genera alteraciones detectables en el PEATC, con aumento de los intervalos centrales de conducción (entre las ondas III y V), o como disminución de amplitudes de las ondas III y V, a tasas altas de estimulación (Jiang y cols, 2008, 2009). A diferencia de la asfixia, en los fetos con RCIU, la hipoxia es de instauración lenta, no se acompaña de isquemia y, como trastorno crónico, permite una adaptación gradual a las alteraciones, lo cual consigue evitar que se comprometan estructuras básicas para la supervivencia como el tronco encefálico (O'Dwyer y cols., 2014).

8.3 Consecuencias de la restricción del crecimiento intrauterino sobre la actividad eléctrica cerebral evocada por estímulo visual (PEV)

Para la obtención de los PEV, se tomó en cuenta el estado del ciclo sueño-vigilia del neonato y la fase del sueño en que éste se encontraba. Todos los PEV descritos en este estudio se registraron durante SA confirmado polisomnográficamente, dado que en el estudio previo (Cubero-Rego y cols., en revisión), se demostró que el PEV es más confiable y se obtiene con mayor facilidad en esta fase, que durante el SQ.

Una cantidad significativamente mayor de neonatos con RCIU severa mostró respuestas visuales no reproducibles a la estimulación del ojo derecho. Aunque sería tentador atribuir este hecho a determinado grado de asimetría en la mielinización de las vías visuales en la RCIU severa, consideramos que este resultado debe analizarse con cautela, dada la ausencia de hallazgos consistentes en los estudios del EEG y el hecho de que un neonato del grupo de sanos también presentó ausencia de respuestas visuales reproducibles al estimular el ojo derecho. Estudios de PEV y EEG en un grupo mayor de neonatos sanos permitirán llegar a conclusiones definitivas acerca de la validez de estos hallazgos en la muestra de RCIU.

En el resto de los neonatos que mostraron respuestas reproducibles, no se observaron diferencias entre los bebés sanos y aquellos con restricción del crecimiento intrauterino, en cuanto a latencias, intervalos y amplitudes de las ondas N2, P2 y N3 del Potencial Evocado Visual. La consistencia de las latencias, intervalos interpicos y amplitudes del complejo N2-P2-N3, tanto en los neonatos sanos como en aquellos con restricción, sugiere que en ausencia de complicaciones severas, la integridad de la vía visual está respetada. Estos resultados apoyan la confiabilidad de los PEV para evaluar la integridad de la vía sensorial y sugieren robustez del sistema neural para lograr una función aparentemente normal, a pesar de existir una disminución en el volumen talámico y cortical, demostrado en estudios de imagen con resonancia magnética en los pacientes con RCIU (Tolsá y cols, 2004).

Estos resultados son consistentes con estudios que han comparado mediante métodos clínicos la agudeza visual en neonatos sanos y con RCIU, que no muestran diferencias entre grupos (Rutstein y cols, 1989; Stanley y cols., 1986). Asimismo, se ha descrito ausencia de alteraciones en los potenciales evocados somato-sensoriales y auditivos de tronco encefálico en casos con alteraciones incompletas que no comprometan la mayoría de la vía sensorial, como fue demostrado por Horn y Tjepkema-Cloostermans en 2017.

La ausencia de diferencias en el PEV en este estudio contrasta con Feng y cols. en el 2013, quienes reportan haber encontrado diferencias en los PEV a flash entre bebés sanos y con RCIU, pero estas solo fueron evidentes para niños con un peso al nacer extremadamente bajo (inferior a los 1000 g). Si consideramos que en esta muestra solo hay un bebé con peso por debajo de dicho umbral, no es sorprendente que no se hayan encontrado diferencias.

Los hallazgos del presente estudio apoyan una conservación funcional de ambos lóbulos occipitales en neonatos con RCIU sin complicaciones graves y cuando son estudiados en edades postnatales inferiores a los dos meses. La ausencia de diferencias con los neonatos sanos, podría atribuirse a la integridad funcional de la vía sensorial visual, pero no puede descartarse que haya alteraciones que se manifiestan en edades más avanzadas y que la misma prueba PEV encuentre diferencias relevantes en edades más avanzadas como lo han hecho Stanley y cols. en 1991, quienes describen haber encontrado aumento de latencias y

disminución de amplitudes en el PEV a flash en el seguimiento evolutivo de niños de 18 meses que presentaron restricción del crecimiento intrauterino en comparación con un grupo de niños sanos sin antecedentes.

Si consideramos reportes recientes que sugieren que la mayor afectación en la RCIU ocurre a nivel de los lóbulos frontales, los PEV están demostrando no ser la medida más adecuada para evaluar este trastorno, al menos en el neonato. Estudios futuros deberán hacer énfasis en el examen de la función frontal, que puede ser explorada electrofisiológicamente sin la cooperación del sujeto mediante el uso de paradigmas odd-ball, los cuales pudieran resultar de mayor interés que los PEV en los neonatos con RCIU.

8.4 Consecuencias de la restricción del crecimiento intrauterino sobre la actividad eléctrica cerebral espontánea

8.4.1 Análisis cualitativo

La diferencia entre la edad por EEG (EC-EEG) y la edad postconcepcional real resultó significativamente mayor en los grupos con restricción, leve y severa. Esto puede interpretarse como una mejor expresión electroencefalográfica de las fases del sueño en los niños sanos con respecto a aquellos con RCIU, que permitió identificar con mayor precisión la edad por EEG de los neonatos sanos.

El resto de las variables electroencefalográficas cualitativas no mostraron diferencias significativas entre los neonatos sanos y los de restricción, excepto en la máxima duración de las discontinuidades, que fue significativamente mayor en el grupo con RCIU severa ($Kw=6.63$ $p=0.03$). Este hallazgo sugiere una mayor inmadurez electroencefalográfica en este grupo de neonatos (Scher y cols, 2011). Aunque este resultado pudiera atribuirse a la mayor cantidad de nacimientos prematuros en este grupo, sus edades postconcepcionales fueron similares. El hecho de que las edades estimadas por EEG sean semejantes en los grupos con RCIU hace poco probable el efecto de la prematurez, ya que el grupo con RCIU leve está constituido por una mayoría de neonatos a término y muestra una edad EEG estimada y valores diferencia que son similares a los neonatos con RCIU severa.

La presencia de actividad paroxística fue significativamente mayor en el grupo con restricción. Las características de los grafoelementos observados difieren de los transientes agudos fisiológicos y normales en cuanto a su asimetría interhemisférica, su carácter repetitivo y estereotipado, su generalización y lo abrupto de las pendientes, como se puede observar en las Figuras 15 y 16. Los grafoelementos observados en los neonatos con RCIU cumplen con los criterios definidos para considerar estas actividades como anormales y distintas de otros transientes fisiológicos como las ondas agudas frontales, cuyo aspecto es simétrico, bilateral y limitado a dichas regiones (Grigg-Damberger, 2016). Las descargas paroxísticas anormales identificadas en los neonatos con RCIU probablemente guarden relación con la hipoxia crónica a que han estado expuestos estos neonatos (Lamblin y cols, 2013; Awal y cols., 2014). Como varios autores reportan una mejoría rápida de las alteraciones electroencefalográficas neonatales con el desarrollo (Watanabe y cols, 2013; Dwyer y cols, 2014), sería interesante evaluar el verdadero valor pronóstico de estos cambios, realizando seguimiento a largo plazo de los pacientes con descargas paroxísticas intercricas anormales en su EEG, sin manifestaciones clínicas durante el período de registro, ya que el pronóstico se considera más ominoso cuando existen crisis epileptiformes (Garfinkle y Shevell, 2011; Painter y cols., 2012). No se puede ignorar una posible relación futura con los cambios cognitivos en edades escolares y en la adolescencia que se han descrito en estos pacientes y la presencia de actividad paroxística subclínica en el EEG.

8.4.2 Análisis cuantitativo del EEG

El análisis de componentes principales permitió reducir la información de 30 bandas estrechas de 1 Hz e identificar 3 bandas anchas en los neonatos al mes de nacidos: una banda lenta de 2 a 6 Hz, otra intermedia de 7 a 13 Hz y una banda rápida de 13 a 30 Hz, con la frecuencia de 13 Hz compartida entre dos bandas. Este análisis permitió simplificar la caracterización cuantitativa del EEG, y obtener bandas de frecuencia apropiadas al neonato. Estudios cuantitativos previos de EEG en el recién nacido (Ozdemir y cols, 2009; Scher y cols., 2012) han utilizado la división convencional de las bandas anchas del EEG, clasificadas como delta, theta, alfa, sigma, beta y gamma, que se originó con la inspección visual del EEG

en el adulto y que por lo tanto no necesariamente corresponden a etapas de desarrollo de la actividad eléctrica cerebral ni a la actividad espontánea del sueño (Corsi-Cabrera y cols., 2000; 2001).

Las bandas detectadas por el análisis de componentes principales, sorprendentemente son semejantes a las encontradas para el EEG del sueño de adultos normales (Corsi-Cabrera y cols., 2001):

- a) Una banda que comprende lo que comúnmente se describe como delta y theta (2 a 7 Hz), que por estudios realizados en gatos (Steriade y cols., 2001), obedece a la hiperpolarización de las neuronas de relevo Tálamo-Corticales debido a la inhibición GABAérgica proveniente de las neuronas de los núcleos reticulares del tálamo, aunado a una defacilitación proveniente de la vía córtico-talámica y de los sistemas activadores del tallo cerebral que convergen sobre la neurona tálamo-cortical.
- b) Una banda intermedia de 7 a 13 Hz, que es semejante a la banda de Sigma o de husos del sueño pero más lenta que en el adulto, en el que llega hasta 16 Hz, tanto en humanos (Corsi-Cabrera y cols., 2001) como en gatos (Steriade y cols., 2001), y que se genera mediante los mismos mecanismos descritos para la banda lenta pero con niveles menores de hiperpolarización.
- c) Una banda rápida de 13 a 30 Hz que se ha descrito en estudios electrofisiológicos como de origen prominentemente cortical (McCormick y cols, 2005) y debida a influencias activadoras del tallo cerebral y de los núcleos intralaminares del tálamo (Llinás, 2005; Steriade y cols., 2001).

La potencia absoluta de las 3 bandas fue significativamente mayor en el SQ que en el SA y no mostró diferencias significativas entre los niños sanos y aquellos con RCIU.

El EEG espontáneo en diferentes derivaciones ofrece información acerca de la sincronía de las oscilaciones de la población neuronal. Los cambios en la actividad eléctrica en el SQ y el

SA en neonatos han sido ampliamente descritos (Grigg-Damberger, 2016; Lamblin y cols., 2012) y la diferenciación entre estas dos etapas del sueño, con mayor energía en las bandas lentas en el SQ y mayor energía de las frecuencias rápidas en el SA, junto con la reducción de los intervalos de discontinuidades, se consideran indicadores de una maduración cerebral adecuada (Ozdemir y cols., 2009; Scher, 2011). Fisiológicamente, las diferencias entre SQ y SA aumentan, a medida que van madurando las conexiones cortico-corticales y tálamo-corticales y se hace más amplia, continua y sincronizada la actividad lenta del SQ, (Steriade y cols.; 2004, Meeren y cols., 2009) por lo tanto, las diferencias entre las dos fases del sueño puede considerarse un indicador de la maduración electrofisiológica cerebral. Estos resultados son consistentes con los de Ozdemir y cols., 2009 y muestran que, en los neonatos sanos, la maduración alcanzada en esta edad se manifiesta en la banda de frecuencias lentas de 2 a 6 Hz.

El hecho de que la diferencia entre SQ y SA en la banda lenta de 2 a 6 Hz haya sido menor en los neonatos con RCIU severa, con edades postconcepcionales similares, sugiere que estos no han alcanzado el mismo nivel de maduración que los recién nacidos sanos y es consistente con un probable retraso difuso en la maduración de toda la corteza cerebral.

En todas las edades de la vida, los cambios electroencefalográficos generados por la apertura y cierre de los ojos son claves en la determinación de la normalidad de un trazado. La ausencia de cambios entre estados, o su asimetría topográfica, son hallazgos sugestivos de anormalidad en la electrogénesis cerebral (Mizrahi, 2011). En los recién nacidos no se observan aún cambios electroencefalográficos a la apertura y cierre de los ojos, pero las modificaciones del trazado secundarias a los cambios de fases del sueño y la clara diferenciación entre las mismas son considerados elementos sugestivos de una adecuada maduración de la actividad eléctrica cerebral espontánea (Grigg-Damberger, 2016; Mizrahi, 2011, Scher, 2011).

El hecho de que las diferencias entre fases sean menores podría ser atribuido a la mayor cantidad de neonatos prematuros en el grupo con RCIU severa, sin embargo, el grupo con restricción leve, con un número de neonatos a término mayor que el grupo control, también

muestra las diferencias reducidas, aunque con menor intensidad que el grupo con restricción severa. Esta disminución en las modificaciones electroencefalográficas con los cambios de fase del sueño podría estar en relación con las alteraciones observadas en la resonancia magnética craneal de estos neonatos, en los cuales se describe disminución del volumen talámico, de los ganglios basales y de la sustancia blanca frontal (Bruno y cols., 2017; Arthurs y cols., 2017).

8.4.3 Limitaciones del estudio

El alcance del presente estudio se encuentra limitado por el número reducido de pacientes y por la desigual distribución de los grupos de neonatos a término y pretérmino en los tres grupos. Profundizar en el análisis del EEG en un grupo mayor de neonatos sanos, donde se encuentren igualmente representados neonatos a término y prematuros permitiría generalizar su aplicación en poblaciones de riesgo.

Aunque podría considerarse como limitación la no inclusión de neonatos con RCIU de tipos II y III en este estudio, las altas probabilidades de mortalidad temprana y la frecuente susceptibilidad a complicaciones en estos neonatos, hicieron imposible incluirlos en esta investigación.

9. CONCLUSIONES

1. La medición, precoz y seriada, del perímetro cefálico en los neonatos y lactantes con antecedentes de restricción del crecimiento intrauterino puede constituir un biomarcador temprano relacionado con el pronóstico y la necesidad de un seguimiento a largo plazo de estos pacientes.
2. Los neonatos con RCIU severa no mostraron alteraciones en las latencias absolutas de las ondas I III y V del PEATC y en sus intervalos interpicos. Estos hallazgos sugieren integridad relativa en la función auditiva periférica y central, hasta nivel de tronco encefálico, aunque se debe considerar la necesidad de un seguimiento a mayor edad en estos pacientes.
3. Existe una mayor correlación entre los ensayos del PEV realizados durante el sueño activo, por lo tanto, es recomendable hacer el registro preferentemente en esta fase, ya que el estudio obtenido durante el sueño quieto es poco reproducible.
4. Los potenciales evocados visuales no mostraron diferencias entre neonatos con RCIU y sanos, lo cual sugiere integridad de la vía visual en estos casos. El uso de paradigmas de exploración de la función frontal puede resultar de mayor interés que los PEV en la evaluación de los pacientes con RCIU sin otras complicaciones.
5. Los neonatos con restricción del crecimiento severa mostraron una mayor inmadurez electroencefalográfica (dada por intervalos de discontinuidad mayores), así como descargas multifocales de actividad paroxística intercítica y, menos frecuentemente, generalizadas, que no estuvieron presentes en el grupo de neonatos sanos.

6. La realización de un análisis de componentes principales de las bandas estrechas del EEG neonatal permitió identificar tres bandas anchas en este estudio: una banda lenta, de 2 a 6 Hz; una intermedia, de 7 a 13 Hz y una banda rápida, de 13 a 30 Hz. Esta clasificación es más adecuada para el momento del desarrollo en que se encuentran estos neonatos y es semejante a las del adulto normal en sueño.

7. Existe una menor diferencia en el EEG del sueño quieto con respecto al activo en los neonatos con restricción severa. Esta disminución en las modificaciones por estado del sueño podría estar expresando funcionalmente un retraso en la maduración y probablemente la afectación de estructuras anatómicas, detectada por alteraciones en la resonancia magnética craneal.

10. PERSPECTIVAS

1. Es necesario dar seguimiento evolutivo a largo plazo a este grupo de niños sanos y con restricción del crecimiento intrauterino, para estudiar aspectos antropométricos como el fenómeno de “catch-up” o recuperación. Esto permitiría definir el verdadero valor pronóstico del perímetro cefálico en la identificación temprana de alteraciones del neurodesarrollo.
2. Los potenciales evocados auditivos de tronco encefálico y los PEV resultan de interés en los neonatos con RCIU más severa o complicada por factores adicionales de riesgo como la asfixia perinatal, las hiperbilirrubinemias severas, el peso extremadamente bajo o la retinopatía del prematuro. En los casos no afectados severamente, es muy probable que se obtengan respuestas normales en ambas modalidades de estimulación.
3. Una adecuada interpretación de las verdaderas implicaciones de los patrones inmaduros y paroxísticos observados en el EEG de los neonatos con restricción severa requiere de un seguimiento evolutivo a largo plazo de los pacientes examinados en este estudio.
4. Es necesario profundizar en el estudio en los aspectos cuantitativos del EEG neonatal relacionados con las tres bandas anchas de frecuencia y la ausencia de modificaciones con los cambios de fases del sueño en la RCIU complicada, así como con otras encefalopatías neonatales bien definidas, para poder evaluar sus posibilidades diagnósticas y su valor pronóstico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldrete-Cortez V, Schnaas L, Poblano A, Carrillo-Mora P, Olivas-Peña E, Bello-Muñoz JC, Guzmán-Huerta M, Mansilla-Olivares A. 2015. Effect of late-onset fetal growth restriction on organization of behavioral state in infants. *Pediatr Int.* 57: 902-8. doi: 10.1111/ped.12628.
- American Clinical Neurophysiology Society, 2006. Guidelines on short-latency auditory evoked potentials. *J Clin Neurophysiol*; 23:157-67.
- American Clinical Neurophysiology Society, 2006. Guidelines on Visual Evoked Potentials. *J Clin Neurophysiol.* 23:138-156.
- Amzica F, Lopes da Silva FH. 2011. Cellular Substrates of Brain Rhythms, in: Niedermeyer E., Lopes da Silva F.H. (Eds), *Niedermeyer's Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields.* Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp 33-63.
- Anders T., Emde R., Parmelee A. 1971. A manual of standardized terminology, techniques and criteria for scoring states of sleep and wakefulness in newborn infants. UCLA Brain Information Service, NINDS Neurological Information Network, Los Angeles.
- Arcangeli T, Thilaganathan B, Hooper R, Khan KS, Bhide A. 2012. Neurodevelopmental delay in small babies at term: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 40: 267–275. doi: 10.1002/uog.11112.
- Angrisani RM, Azevedo MF, Carvalho RM, Diniz EM, Matas CG. 2012. Electrophysiological study of hearing in full-term small-for-gestational-age newborns. *J Soc Bras Fonoaudiol.* 24: 162-7.
- Arthurs OJ, Rega A, Guimiot F, Belarbi N, Rosenblatt J, Biran V, Elmaleh M, Sebag G, Alison M. 2017. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging of the fetal brain in intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 50:79-87. doi: 10.1002/uog.17318.
- Atkinson J, Anker S, Rae S, Weeks F, Braddick O, Rennie J. 2002. Cortical visual evoked potentials in very low birthweight premature infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 86: 28-31.
- Awal MA, Lai M, Azemi A, Boashash M, Colditz P. 2016. EEG background features that predict outcome in term neonates with hypoxic ischaemic encephalopathy: A structured review. *Clin Neurophysiol.* 127: 285-96. doi: 10.1016/j.clinph.2015.05.018

- Baldwin M, Watkin P. 2014. Predicting the type of hearing loss using click auditory brainstem response in babies referred from newborn hearing screening. *Ear Hear.* 35:1-9. doi: 10.1097/AUD.0b013e31829e0718.
- Baschat AA. 2011. Neurodevelopment following fetal growth restriction and its relationship with antepartum parameters of placental dysfunction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 37: 501-14. doi: 10.1002/uog.9008
- Benavides-Serralde A, Hernandez-Andrade E, Fernandez-Delgado J, Plasencia W, Scheier M, Crispi F. 2009. Three-dimensional sonographic calculation of the volume of intracranial structures in growth-restricted and appropriate-for-gestational age fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 33:530–7. doi: 10.1002/uog.6343
- Bosch-Bayard J, Valdés-Sosa PA, Fernandez T, Otero G, Pliego Rivero B, Ricardo-Garcell J, González-Frankenberger B, Galán-García L, Fernandez-Bouzas A, Aubert-Vazquez E, Lage-Castellanos A, Rodríguez-Valdés R, Harmony T. 2012. 3D statistical parametric mapping of quiet sleep EEG in the first year of life. *Neuroimage.* 59: 3297-308. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.11.001
- Brandt I, Sticker EJ, Lentze MJ. 2003. Catch-up growth of head circumference of very low birth weight, small for gestational age preterm infants and mental development to adulthood. *J Pediatr.* 142: 463-8. doi: 10.1067/mpd.2003.149.
- Bruno CJ, Bengani S, Gomes WA, Brewer M, Vega M, Xie X, Kim M, Fuloria M. 2017. MRI Differences Associated with Intrauterine Growth Restriction in Preterm Infants. *Neonatology.* 111: 317-323. doi: 10.1159/000453576.
- Burkard RF, Sims D. 2001. The Human Auditory Brainstem Response to High Click Rates. *Aging Effects. American Journal of Audiology;* 10: 53-61.
- Carter RC, Jacobson JL, Molteno CD, Dodge NC, Meintjes EM, Jacobson SW. 2016. Fetal Alcohol Growth Restriction and Cognitive Impairment. *Pediatrics.* 138: 125-32. doi: 10.1542/peds.2016-0775.
- Celesia GG. 2011. Brainstem Auditory Evoked Potentials and Other Auditory Evoked Potentials. *Niedermeyer's Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*, Schomer, DL, Lopes da Silva FH. (eds) Lippincott Williams & Wilkins.
- Chayasirisobhon S, Gurbani S, Chai EE, Spurgeon B, Yu L, Bosu S, Gurbani S. 2012. Evaluation of maturation and function of visual pathways in neonates: role of flash visual-evoked potentials revisited. *Clin EEG Neurosci.* 43: 18-22. doi: 10.1177/1550059411429529

- Chiappa KH. 1997. Brainstem auditory evoked potentials: Methodology. In: Chiappa KH, ed. *Evoked potentials in clinical medicine*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; p. 182-3.
- Cohen E, Baerts W, van Bel F. 2015. Brain-Sparing in Intrauterine Growth Restriction: Considerations for the Neonatologist. *Neonatology*. 108: 269–276. doi: 10.1159/000438451
- Corsi-Cabrera M, Pérez-Garci, E, Del Río-Portilla Y, Ugalde E, Guevara MA. 2000. EEG Bands During Wakefulness, Slow-Wave, and Paradoxical Sleep As a Result of Principal Component Analysis in man *SLEEP* 23: 1-7.
- Corsi-Cabrera M, Pérez-Garci, E, Del Río-Portilla Y, Ugalde E, Guevara MA. 2001. EEG Bands During Wakefulness, Slow-Wave, and Paradoxical Sleep As a Result of Principal Component Analysis in the Rat *SLEEP* 24(4): 374-80.
- Corsi-Cabrera. 1995. Organización funcional de la corteza durante el sueño y después de la privación total de sueño. En *Temas Selectos de Neurociencias*, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, pp 189-202.
- Cruz S., Crego A., Ribeiro E., Goncalves O., Sampaio A., 2013. A VEP study in sleeping and awake one-month-old infants and its relation with social behavior. *Int. J. Devl. Neuroscience*. 41: 37-43. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.12.006.
- Cubero-Rego L, Ricardo-Garcell J, Corsi-Cabrera M, Cruz-Martínez R, Rebolledo-Fernández C, Otero-Ojeda G, Harmony T. 2017. Improving the efficiency of Auditory Brainstem Responses in newborns, using a 60 clicks/s stimulation rate. *Journal of Clinical Neuroscience*. 45: 295-304.
- Dieni S, Rees S. 2003. Dendritic morphology is altered in hippocampal neurons following prenatal compromise. *J Neurobiol*; 55:41–52. doi: 10.1002/neu.10194.
- Drucker Colin R, Spanis CW, Cotman CW, McGaugh JL. 1975. Changes in protein in perfusates of freely moving cats: relation to behavioural state. *Science*, 187: 963-965.
- Fattal-Valevski A, Toledano-Alhadeh H, Leitner Y, Geva R, Eshel R, Harel S. 2009. Growth patterns in children with intrauterine growth retardation and their correlation to neurocognitive development. *J Child Neurol* 24: 846-51. doi: 10.1177/0883073808331082
- Feng JJ, Wang TX, Yang CH, Wang WP, Xu X. 2010. Flash visual evoked potentials at 2-year-old infants with different birth weights. *World J Pediatr*. 6:163-8. doi: 10.1007/s12519-010-0032-3.

- Feng JJ, Wang WP, Guo SJ, Liu ZW, Xu X. 2013. Flash visual evoked potentials in preterm infants. *Ophthalmology*. 120:489-94. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.08.025.
- Figueras F, Gratacós, E. 2014. Stage-based approach to the management of fetal growth restriction. *Prenat Diagn*. May 16. doi: 10.1159/000357592.
- Figueras F, Gratacós E. 2017. An integrated approach to fetal growth restriction. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology*. 38: 48-58. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.10.006.
- Foundation for Statistical Computing, Austria, 2013. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.
- Garfinkle J, Shevell MI. 2011. Prognostic factors and development of a scoring system for outcome of neonatal seizures in term infants. *Eur J Paediatr Neurol*;15: 222-9. doi: 10.1016/j.ejpn.2010.11.002.
- Glass H.C., Berman J.I., Norcia A.M., Rogers E.E., Henry R.G., Hou C., Barkovich A.J., Good W.V. 2010. Quantitative fiber tracking of the optic radiation is correlated with visual-evoked potential amplitude in preterm infants. *AJNR Am J Neuroradiol*. 31: 1424-9. doi: 10.3174/ajnr.A2110.
- Gloor P. 1985 Long-term monitoring in epilepsy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 37: 13-20.
- Guellec I, Marret S, Baud O, Cambonie G, Lapillonne A, Roze JC, Fresson J, Flamant C, Charkaluk ML, Arnaud C, Ancel PY. 2015. Intrauterine Growth Restriction, Head Size at Birth, and Outcome in Very Preterm Infants. *J Pediatr*. 167: 975-81. doi: 10.1016/j.jpeds.2015.08.025.
- Harel S, Tomer A, Barak Y, Binderman I, Yavin E. 1985. The cephalization index: a screening device for brain maturity and vulnerability in normal and intrauterine growth retarded newborns. *Brain Dev*. 7(6): 580-4.
- Harmony T., Barrera-Reséndiz J., Juárez-Colín M.E., Carrillo-Prado C., Pedraza-Aguilar M.C., Asprón Ramírez A., Hinojosa-Rodríguez M., Fernández T., Ricardo-Garcell J. 2016. Longitudinal study of children with perinatal brain damage in whom early neurohabilitation was applied: Preliminary report. *Neurosci Lett*. 12: 59-67. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.013.
- Hernandez-Andrade E, Figueroa-Diesel H, Jansson T, Rangel-Nava H, Gratacos E. 2008. Changes in regional fetal cerebral blood flow perfusion in relation to hemodynamic deterioration in severely growth-restricted fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol*; 32:71–6. doi: 10.1002/uog.5377.
- Hendelman WJ. 2006. Atlas of Functional Neuroanatomy. 2da Edición. Taylor & Francis Group.

- Hrbek A., Karlberg P., Olsson T. 1973. Development of visual and somatosensory evoked responses in pre-term newborn infants. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 34: 225-232.
- Husain AM. 2011. Evoked Potentials in Children and Infants. En *Niedermeyer's Electroencephalography, Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*, Schomer, DL, Lopes da Silva FH. (eds) Lippincott Williams & Wilkins.
- Horn J, Tjepkema-Cloostermans MC. 2017. Somatosensory Evoked Potentials in Patients with Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Semin Neurol*; 37: 60-65. doi: 10.1055/s-0036-1594252.
- Isaacs E, Vargha-Khadem F, Watkins K, Lucas A, Mishkin M, Gadian D. 2003. Developmental amnesia and its relationship to degree of hippocampal atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100:13060-3.
- Isaacs EB, Lucas A, Chong WK, Wood SJ, Johnson CL, Marshall C. 2000. Hippocampal volume and everyday memory in children of very low birth weight. *Pediatr Res*; 47:713–20.
- Jansen FA, van Zwet EW, Rijlaarsdam ME, Pajkrt E, van Velzen CL, Zuurveen HR, Kragt A, Bax CL, Clur SA, van Lith JM, Blom NA, Haak MC. 2016. Head growth in fetuses with isolated congenital heart defects: lack of influence of aortic arch flow and ascending aorta oxygen saturation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 48: 357-64. doi: 10.1002/uog.15980.
- Jensen RB, Juul A, Larsen T, Mortensen EL, Greisen G. 2015. Cognitive ability in adolescents born small for gestational age: Associations with fetal growth velocity, head circumference and postnatal growth. *Early Hum Dev*. 91: 755-60. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2015.08.014.
- Jewett DL, Caplovitz G, Baird B. 2004. The use of QSD (q-sequence deconvolution) to recover superposed, transient evoked-responses. *Clin Neurophysiol*; 115: 2754-2775. doi: 10.1016/j.clinph.2004.06.014.
- Jiang ZD, Brosi DM, Wang J, Wilkinson AR. 2004. Brainstem auditory-evoked responses to different rates of clicks in small-for-gestational age preterm infants at term. *Acta Paediatr*. 93: 76-81.
- Jiang ZD, Brosi DM, Chen C. 2009. Impairment of perinatal hypoxia-ischemia to the preterm brainstem. *J Neurol Sci*. 287: 172-177. doi: 10.1016/j.jns.2009.07.029.
- Jiang ZD, Liu XY, Shi BP, Lin L, Bu CF, Wilkinson AR. 2008. Brainstem auditory outcomes and correlation with neurodevelopment after perinatal asphyxia. *Pediatr Neurol*. 39: 189-195. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2008.06.013.

- Jiang ZD, Wilkinson AR. 2013. Impaired function of the auditory brainstem in term neonates with hyperbilirubinemia. *Brain Dev*; 36:212-8. doi: 10.1016/j.braindev.2013.03.003.
- Jiang ZD, Ping LL, Wilkinson AR. 2012. Functional abnormality of the auditory brainstem in high-risk late preterm infants. *Clin Neurophysiol*; 123: 993-1001. doi: 10.1016/j.clinph.2011.08.032.
- Kato T., Watanabe K. 2006. Visual evoked potential in the newborn: Does it have predictive value?. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 11: 459-463. doi: 10.1016/j.siny.2006.08.003
- Kohelet D, Arbel E, Goldberg M, Arlazzoroff A. 2000. Intrauterine growth retardation and brainstem auditory-evoked response in preterm infants. *Acta Paediatr*. 89(1): 73-76.
- Kooijman MN, Gaillard R, Reiss I, Hofman A, Steegers E, Jaddoe V. 2016. Influence of fetal blood flow redistribution on fetal and childhood growth and fat distribution: the Generation R Study. *BJOG*. 123: 2104-2112. doi: 10.1111/1471-0528.13933.
- Kraemer M., Abrahamsson M., Sjostrom A. 1999. The neonatal development of the light flash visual evoked potential. *Documenta Ophthalmologica*. 99: 21-39.
- Krumholz A. 2005. Evoked Potentials in Infancy and Childhood, in: Niedermeyer E., Lopes da Silva F.H. (Eds), *Niedermeyer's Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*. Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp. 1121-1135.
- Lamblin MD, Walls Esquivel E, André M. 2013. The electroencephalogram of the full-term newborn: review of normal features and hypoxic-ischemic encephalopathy patterns. *Neurophysiol Clin*. 43:267-87. doi: 10.1016/j.neucli.2013.07.001.
- Leite JN, Silva VS, Buzo BC. 2016. Otoacoustic emissions in newborns with mild and moderate perinatal hypoxia. *Codas*. 28: 93-8. doi: 10.1590/2317-1782/20162015086.
- Leitner Y, Fattal-Valevski A, Geva R, Eshel R, Toledano-Alhadeif H, Rotstein M. 2007. Neurodevelopmental Outcome of Children With Intrauterine Growth Retardation: A Longitudinal, 10-Year Prospective Study. *Journal of Child Neurology*. 5: 580-587. doi: 10.1177/0883073807302605

- Levit Y, Himmelfarb M, Dollberg S. 2015. Sensitivity of the Automated Auditory Brainstem Response in Neonatal Hearing Screening. *Pediatrics*; 136: 23-7. doi: 10.1542/peds.2014-3784
- Madan A, Norcia AM, Hou C, Pettet MW, Good WV. 2012. Effect of Grade I and II intraventricular hemorrhage on visuocortical function in very low birth weight infants. *Seeing Perceiving*. 25: 143-54. doi: 10.1163/187847612X626381.
- Makhoul IR, Soudack M, Goldstein I, Smolkin T, Tamir A, Sujov P. 2004. Sonographic biometry of the frontal lobe in normal and growth restricted neonates. *Pediatr Res*. 55: 877-83. doi: 10.1203/01.PDR.0000119369.21770.7A
- Mallard C, Loeliger M, Copolov D, Rees S. 2000. Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea-pig following intrauterine growth-restriction. *Neuroscience*. 100: 327-33.
- Majnemer A, Rosenblatt B. 1996. Evoked potentials as predictors of outcome in neonatal intensive care unit survivors: review of the literature. *Pediatr Neurol*. 14: 189-95.
- McGlone L., Hamilton R., McCulloch D.L., Boulton R., Bradnam M.S., Weaver L.T., Mactier H. 2013. Neonatal Visual Evoked Potentials in Infants Born to Mothers Prescribed Methadone. *Pediatrics*. 131: 857-63. doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-303967.
- Meeren HKM, Van Luijtelaar ELJM, Coenen AML. 1998. Cortical and thalamic visual evoked potentials during sleep-wake states and spike-wave discharges in the rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 108: 306-319
- Meher S, Hernandez-Andrade E, Basheer SN, Lees C. 2015. Impact of cerebral redistribution on neurodevelopmental outcome in small-for-gestational-age or growth-restricted babies: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 46: 398-404. doi: 10.1002/uog.14818.
- Mercuri E., Siebenthal K., Tutuncuoglu S., Guzzetta E., Casaer P. 1995. The Effect of Behavioural States on Visual Evoked Responses in Preterm and Full-Term Newborns. *Neuropediatrics*. 26: 211-213.
- Mizrahi E.M., Moshé S.L, Hrachovy R.A. 2011. Normal EEG and Sleep: Preterm and Term Neonates, in: Niedermeyer E., Lopes da Silva F.H. (Eds), *Niedermeyer's Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*. Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp 154-163.
- Moreno-Aguirre AJ, Santiago-Rodríguez E, Harmony T. 2010. Analysis of auditory function using brainstem auditory evoked potentials and auditory steady state

- responses in infants with perinatal brain injury. *Int J Audiol*; 49: 110-15. doi: 10.3109/14992020903311370.
- Mullis P-E, Tonella P. 2008. Regulation of fetal growth: consequences and impact of being born small. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*; 22:173–90. doi: 10.1016/j.beem.2007.07.010.
- Murray E, Fernandes M, Fazel M, Kennedy SH, Villar J, Steina A. 2015. Differential effect of intrauterine growth restriction on childhood neurodevelopment: a systematic review. *BJOG*. 122: 1062–1072. doi: 10.1111/1471-0528.13435. Epub 2015 May 19.
- Odom J.V., Bach M., Brigell M., Holder G.E., McCulloch D.L., Mizota A. 2016. ISCEV standard for clinical visual evoked potentials: (2016 update). *Doc Ophthalmol*. 133: 1-11. doi: 10.1007/s10633-016-9554-x.
- O'Dwyer V, Burke G, Unterscheider J, Daly S, Geary MP, Kennelly MM, McAuliffe FM, O'Donoghue K, Hunter A, Morrison JJ, Dicker P, Tully EC, Malone FD. 2014. Defining the residual risk of adverse perinatal outcome in growth-restricted fetuses with normal umbilical artery blood flow. *Am J Obstet Gynecol*. 211: 420. doi: 10.1016/j.ajog.2014.07.033.
- Otero GA, Pliego-Rivero FB, Fernández T, Ricardo J. 2003. EEG development in children with sociocultural disadvantages: a follow-up study. *Clin Neurophysiol*. 114: 1918-25.
- Otero GA, Harmony T, Pliego-Rivero FB, Ricardo-Garcell J, Bosch-Bayard J, Porcayo-Mercado R, Fernández-Bouzas A, Díaz-Comas L, Galán L, Vieyra-Reyes P, Fernández T. 2011. QEEG norms for the first year of life. *Early Hum Dev*. 87: 691-703. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2011.05.010.
- Özdamar Ö, Bohórquez J. 2006. Signal-to-noise ratio and frequency analysis of continuous loop averaging deconvolution (CLAD) of overlapping evoked potentials. *J Acoust Soc Am*; 119: 429-438.
- Ozdemir OM, Ergin H, Sahiner T. 2009. Electrophysiological assessment of the brain function in term SGA infants. *Brain Res*. 13; 1270:33-8. doi: 10.1016/j.brainres.2009.03.008.
- Painter MJ, Sun Q, Scher MS, Janosky J, Alvin J. 2012. Neonates with seizures: what predicts development?. *J Child Neurol*. 27: 1022-6. doi: 10.1177/0883073811433845.
- Pasman JW, Rotteveel JJ, Maassen B. 1998. Neonatal risk factors and risk scores including auditory evoked responses. *Eur J Pediatr*. 157: 230-5.

- Peng X, Chen Y, Wang T. 2017. Noise Attenuation Estimation for Maximum Length Sequences in Deconvolution Process of Auditory Evoked Potentials. *Comput Math Methods Med.* 3927486. doi: 10.1155/2017/3927486.
- Philip AGS, Stevenson DK, Hay WW. 2009. Intrauterine growth restriction. En *Fetal and Neonatal Brain Injury*, 4th edition, ed. Stevenson DK, Benitz WE, Sunshine P et al. Cambridge University Press.
- Radeloff A, Cebulla M, Shehata-Dieler W. 2014. Auditory evoked potentials: basic and clinical applications. *Laryngorhinootologie*; 93:625-37. doi: 10.1055/s-0034-1385868.
- Saintonge, J, Lavoie A, Lachapelle J, Coté R, 1985. Brain maturity in regard to the auditory brainstem response in small for date neonates. *Brain Dev.* 8: 1-5
- Salín-Pascual RJ, Jiménez Anguiano A. 1995. Mecanismos colinérgicos involucrados en la privación del SMOR. En *Temas Selectos de Neurociencias*, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, pp 475-486.
- Scher MS, Jones BL, Steppe DA, Cork DL, Seltman HJ, Banks DL. 2003. Functional brain maturation in neonates as measured by EEG-sleep analyses. *Clin Neurophysiol.* 114: 875-82.
- Scher MS, Johnson MW, Ludington SM, Loparo K. 2011. Physiologic brain dysmaturity in late preterm infants. *Pediatr Res.* 70: 524-528. doi: 10.1203/PDR.0b013e31822f24af.
- Shellhaas RA, Burns JW, Barks JD, Chervin RD. 2014. Quantitative sleep stage analyses as a window to neonatal neurologic function. *Neurology.* 82: 390-5. doi: 10.1212/WNL.0000000000000085.
- Sheth T, Glantz JC. 2016. Third-Trimester Fetal Biometry and Neonatal Outcomes in Term and Preterm Deliveries. *J Ultrasound Med.* 35: 103-10. doi: 10.7863/ultra.15.02040.
- Shi B, Yang LZ, Liu Y, 2016. Early-onset hearing loss reorganizes the visual and auditory network in children without cochlear implantation. *Neuroreport.* 27:197-202. doi: 10.1097/WNR.0000000000000524.
- Shue KL, Douglas VI. 1992. Attention deficit hyperactivity disorder and the frontal lobe syndrome. *Brain Cogn;* 20:104–24.
- Skoe E, Brody L, Theodore RM. Reading ability reflects individual differences in auditory brainstem function, even into adulthood. *Brain Lang* 2017; 164:25-31. doi: 10.1016/j.bandl.2016.09.003.

- Speckmann, EJ, Elger CE, Gorji A. 2011. Neurophysiologic Basis of EEG and DC Potentials, in: Niedermeyer E., Lopes da Silva F.H. (Eds), Niedermeyer's Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields. Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp 17-31.
- Spittle A., Orton J., Anderson P.J., Boyd R., Doyle L.W. 2015. Early developmental intervention programs provided post hospital discharge to prevent motor and cognitive impairment in preterm infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* 24; (11): CD005495. doi: 10.1002/14651858.CD005495.pub4.
- Stanley OH, Fleming PJ, Morgan MH. 1989. Abnormal development of visual function following intrauterine growth retardation. *Early Hum Dev.* 19(2):87-101.
- Stanley OH, Fleming PJ, Morgan MH. 1991 Development of visual evoked potentials following intrauterine growth retardation. *Early Hum Dev*; 27(1-2):79-91.
- Steriade M, Deschênes M. 1984. The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain Res.* 320:1-63.
- Steriade M., Timofeev I. 2003. Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. *Neuron.* 37: 563-76.
- Steriade M. 2004. Cellular substrates of brain rhythms. In: Niedermeyer E, Lopes da Silva FH, eds. *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications and Related Fields.* Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 31-84.
- Stevens J, & NHSP Clinical Group. 2011. Guidelines for the early audiological assessment and management of babies referred from the newborn hearing screening program. NHSP Early Assessment Guideline vers 2.5.
- Stipdonk LW, Weisglas-Kuperus N, Franken MC. 2016. Auditory brainstem maturation in normal-hearing infants born preterm: a meta-analysis. *Dev Med Child Neurol*; 58:1009-15. doi: 10.1111/dmcn.13151. Epub 2016 May 11.
- Stockard JE, Stockard JJ, Westmoreland BF, Corfits JL. 1979. Brainstem auditory-evoked responses. Normal variation as a function of stimulus and subject characteristics. *Arch Neurol*; 36: 823-31.
- Taylor M.J., Menzies R., MacMillan L.J., Whyte H.E. 1987. VEPs in normal full-term and premature neonates: longitudinal versus cross-sectional data. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology.* 68: 20-27.
- Taylor MJ, Saliba E, Laugier J. 1996. Use of evoked potentials in preterm neonates. *Archives of Disease in Childhood*; 74: F70-F76.

- Thordstein CM, Sultan BL, Wennergren MM, 2004. Visual evoked potentials in disproportionately growth-retarded human neonates. *Pediatr Neurol.* 30: 262-70. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2003.10.002
- Todorovich RD, Crowell DH, Kapuniai L, 1987. Auditory responsivity and intrauterine growth retardation in small for gestational age human newborns. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology.* 67: 204-212.
- Tolsa CB, Zimine S, Warfield SK, Freschi M, Rossignol AS, Lazeyras F, 2004. Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction. *Pediatr Res;* 56:132–8. doi: 10.1203/01.PDR.0000128983.54614.7E
- Yiallourou SR, Arena BC, Wallace EM, Odoi A, Hollis S, Weichard A, Horne RSC., 2018. Being Born Too Small and Too Early May Alter Sleep in Childhood. *SleepJ.* 41: 1-11. doi: 10.1093/sleep/zsx193
- van Wassenaer A. 2005. Neuro-developmental consequences of being born SGA. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2:372-7.
- Vanhatalo S., Kaila K. 2010. Emergence of spontaneous and evoked electroencephalo-graphic activity in the human brain, in Lagercrantz H., Hanson L.R., Peebles D.M. (Eds.), *The Newborn Brain: Neuroscience and Clinical Applications.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 229-243.
- Villar J, Carroli G, Wojdyla D, Abalos E, Giordano D, Ba'aqueel H, 2006. Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions? *Am J Obstet Gynecol.* 194:921–31. doi: 10.1016/j.ajog.2005.10.813
- Vieira M.A., Cavalcanti M.A., Costa D.L., Eulálio K.D., Vale O.C., Vieira C.P., Costa C.H. 2015. Visual evoked potentials show strong positive association with intracranial pressure in patients with cryptococcal meningitis. *Arq Neuropsiquiatr.* 73: 309-313. doi: 10.1590/0004-282X20150002.

ANEXOS

ANEXO I. Carta de Consentimiento Informado**CONSENTIMIENTO INFORMADO A LOS SUJETOS QUE PARTICIPAN EN EL
ESTUDIO "EFECTO DE LAS ALTERACIONES HEMODINAMICAS FETALES SOBRE
LA ACTIVIDAD ELECTRICA CEREBRAL ESPONTANEA Y EVOCADA EN
NEONATOS"**

Yo _____ he sido informado acerca del actual estudio que se va a realizar a mi bebé, comprendo cuáles son sus objetivos y estoy de acuerdo en realizarle los estudios de Electroencefalograma, Potenciales Evocados Visuales y Potenciales Evocados Auditivos. Comprendo que los resultados de dichos estudios no revelarán información privada alguna, y que serán utilizados con fines investigativos, así como que los resultados parciales o finales del estudio, en parte o en su totalidad, podrán ser publicados en revistas científicas nacionales y extranjeras, sin revelar la identidad de los sujetos.

Fecha: _____

Lugar: _____

Hora: _____

Firma del participante: _____

Firma del responsable de la investigación: _____

ANEXO III. Artículo enviado a publicación. Experimento 2.

A continuación se incluye el manuscrito enviado a revisión, donde se describen los resultados del Experimento 2. Se anexa porque a partir de sus resultados se tomaron decisiones metodológicas acerca de la realización del PEV en los recién nacidos estudiados. Enviada a consideración del International Journal of Clinical Neurosciences.

NEONATAL VISUAL EVOKED POTENTIALS ARE MORE RELIABLE DURING ACTIVE SLEEP

Cubero-Rego L, Corsi-Cabrera M, Ricardo-Garcell J, Cruz-Martínez R, Harmony. T.

Corresponding author

María Corsi-Cabrera

Faculty of Psychology

National Autonomous University of Mexico, 04510, Mexico City.

Research Unit in Neurodevelopment, Institute of Neurobiology,

National Autonomous University of Mexico, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro 76230, México.

Tel: 52 442 1926101, 52 442 1926102

e-mail address: corsi@unam.mx

Acknowledgements

We thank MC. Leonor Casanova Rico and Lic. Teresita de Jesús Pérez Cruz for their constant support. Also, Eng. Héctor Belmont Tamayo and Dr. María Elena Juárez Colín collaborated in data collection. We thank Paul Kersey for revising English language use.

Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

ABSTRACT

Because of their high prognostic value, Visual Evoked Potentials (VEPs) have often been studied in newborns to identify abnormal development of visual pathways; however, large variability has been reported. While it is well-known that the morphology and late components of evoked potentials change depending on wake-sleep stages in adults, there is uncertainty as to the effect of sleep stages on VEPs in neonates. **OBJECTIVE.** To describe the characteristics of VEPs in healthy full-term newborns during active sleep (AS) and quiet sleep (QS), determined by polysomnography (PSG). **METHODS.** VEPs were obtained by monocular LEDs stimulation during AS and QS, identified by simultaneous PSG recording, in 20 healthy full-term newborns (gestational age 37-40 weeks) with normal birth weights and normal prenatal Doppler ultrasound indices. The replicability of VEPs and the latencies and amplitudes of N2, P2 and N3 components in AS and QS were compared. **RESULTS.** Typical, symmetrical waveforms were obtained in all newborns in AS. In contrast, no VEPs could be identified clearly in 15% of the babies in QS (McNemar $\chi^2=15$, $p\leq 0.0001$). There were no significant differences in VEP latencies and amplitudes between sleep stages. Replicability was significantly lower in QS, where higher averaging was required; correlation was significantly lower between the VEP blocks ($F_{(1,76)}=4.72$, $p=0.03$); and a higher number of babies needed more than two blocks ($\chi^2=7.5$, $df=1$, $p=0.006$). **CONCLUSIONS.** Recording neonatal VEPs is more reproducible and easier to obtain during AS. Systematic VEP recording during AS, and polysomnographic control to identify this stage, are highly recommended as methods that can increase the reliability of neonatal VEPs.

Keywords: visual evoked potentials, active sleep, quiet sleep, newborns

1. INTRODUCTION

The early detection of abnormal development of the central nervous system of at-risk newborns is crucial for successful early intervention (Harmony et al., 2016; Spittle and Orton, 2015). In newborns, a normal visual evoked response indicates adequate neural maturation of the cerebral cortex, according to the neonate's age (Cruz et al., 2015; Kato and Watanabe, 2006). Therefore, neonatal Visual Evoked Potentials (VEPs) have often been studied to assess neurodevelopment and identify any abnormal development of the visual pathways (Cruz et al., 2015; Kato and Watanabe, 2006; McGlone et al., 2013) because they are objective, sensitive to structural and functional brain damage, and do not require patient cooperation (Huang et al., 2016; Vieira et al., 2015). However, considerable variability has been observed in newborns (Benavente et al., 2005; Kraemer et al., 1999; Roy et al., 2004). This has been related to several causes: 1) lack of definition of the behavioral state of the babies during recording (awake *vs.* asleep); 2) the rapid developmental changes characteristic of the first weeks of life; 3) the small

number of full-term babies of the same age in previous studies; and 4) the source of stimulation, usually either stroboscopic flash or light-emitting diodes (LEDs).

Not all studies in newborns have taken into account the behavioral state of the infants when recording VEPs (Kraemer et al., 1999; McGlone et al., 2013). Some have performed recordings only during wakefulness (Kraemer et al., 1999; Roy et al., 2004), others distinguished between wakefulness and sleep but did not analyze AS and QS separately (Benavente et al., 2005; Cruz et al., 2015; Tsuneishi et al., 1995). Some of those distinguishing between wakefulness and sleep have found significant differences in amplitude and latencies between the two stages (Hrbek et al., 1973; White et al., 1987). Studies that distinguished between AS and QS have not found amplitude differences, though latency variability was found to be higher during AS than QS and W (Apkarian et al., 1991). Other research found no differences between AS and QS, but in those cases the distinction between the two sleep states was based on behavioral observation only (Mercuri et al., 1995; Shepherd et al., 2000). In several studies, the number of full-term newborns of the same age was

below seven (Apkarian et al., 1991; Mercuri et al.; Shepherd et al., 2000). In light of these results, it is hardly surprising that large variability in the characteristics of VEPs has been reported. Another source of variability is the type of stimulus used to elicit the VEPs. Some studies employed flashes of white light (Apkarian et al., 1991; Benavente et al., 2005; Hrbek et al., 1973; Kraemer et al., 1999), but this is less consistent than light emitting diodes, which can be used easily in neonatal intensive care units (Kato and Watanabe, 2006; Taylor et al., 1987). Reversal pattern stimulation is the most consistent approach, but it requires patient cooperation, so is not optimal for neonates (Benavente et al., 2005; Roy et al., 2004). Mercuri et al. (1995) employed LEDs, but their distinction between AS and QS was based only on behavioral criteria and their sample of six newborns was very small.

In the case of adult humans, it is well-known that morphology and late components of evoked potentials change depending on the level of arousal and states of vigilance (Corsi Cabrera et al., 1999; Hoedlmoser et al., 2011). While early and mid-latency components like those of Brainstem Auditory Evoked

Potentials are unaffected by sleep stage (Husain, 2011), late components associated with complex processing – likely of cortical origin – do vary in relation to this state (Coenen et al., 2008; Näätänen and Michie, 1979).

Although sleep is not yet fully developed in neonates, it is possible to distinguish at least four stages, both behaviorally and using polysomnography (PSG): wakefulness (W), quiet sleep (QS), active sleep (AS), and an indeterminate state (Anders et al., 1971; Grigg-Damberger et al., 2016; Mizrahi, 2011; Prechtel, 1974). Wakefulness is characterized by strong diffuse motor activity, open eyes and irregular breathing. Quiet sleep shows high-voltage slow or tracé alternant activity with no rapid eye movements, while behaviorally it can be identified by quiescence, closed eyes and regularity of breathing. Active sleep is manifested in low-voltage irregular activity in EEG, with rapid eye movements, irregular breathing, and frequent facial movements. Though it is widely recognized that VEP recording should be performed in well-defined behavioral states (Apkarian et al., 1990; Cruz et al., 2015; Mercuri et al., 1995; Whyte et al., 1987), uncertainty

persists regarding the effect of sleep stages on VEPs in neonates.

Given the importance of the early verification of the functioning of the visual system, it is necessary to obtain better, more reliable, characterizations of VEPs in normal, full-term newborns that consider the different maturation rates of AS and QS. In this initial approach, we describe the characteristics of monocular VEPs recorded from both eyes using LEDs goggles in 20 full-term babies during the first month of life in sleep stages AS and QS, as determined by polysomnography.

2. METHOD

2.1 Participants

Twenty healthy full-term newborns between 37 and 40 weeks of gestational age at birth (12 girls, 8 boys; 55% spontaneous vertex delivery) participated in this study. All were born at the Children's and Women's Specialty Hospital of Querétaro, Mexico, between December 2012 and November 2015. They were referred as normal control babies and were deemed eligible after

applying the following inclusion criteria: 1) singleton newborns with gestational age at birth of 37-40 weeks determined by a first trimester prenatal Doppler ultrasound study; 2) normal birth weight (between the 10th and 90th percentile according to local standards); 3) normal prenatal Doppler ultrasound pulsatility indices in the umbilical artery, middle cerebral artery and uterine arteries; and 4) absence of neonatal morbidity. Special care was taken to include only babies of similar postnatal age within narrow limits (Table 1).

The exclusion criteria applied were: congenital malformations, chromosomal abnormalities, and prenatal infections such as cytomegalovirus. The experimental protocol was approved by the Hospital's Ethics Committee and follows the principles of the World Medical Association's Helsinki Declaration. Written consent for participation was obtained from all parents involved. All babies were asymptomatic at the time of the VEPs studies.

Table 1. Neonatal and anthropometrical data of the group

	Mean	Standard Deviation	Range
Gestational age at birth (weeks)	39.02	1.03	37 - 40

Postnatal age (days)	24.5	10.7	8 - 47
Birth weight (g)	3117	378	2530 - 4065
5-minutes Apgar	9	0	

2.2 Procedure

In all 20 newborns, VEPs and spontaneous diurnal polysomnography were recorded simultaneously. Polysomnographic studies lasted 60 to 90 minutes to allow sufficient observation of both AS and QS. VEPs were recorded during both sleep stages, polysomnographically identified. VEPs recording was suspended if the newborn cried, or if transition to another stage occurred.

2.3 Sleep recording

Sleep recording included electroencephalography (EEG), ocular movements (EOG), and sub-mental electromyography (EMG), in accordance with the published standards for neonates (Grigg-Damberger, 2016). With the baby resting in a hospital crib, gold cup electrodes were placed at F3, F4, C3, C4, T3, T4, O1 and O2 of the International 10-20 System and referred to linked mastoids. EOG were recorded in two channels from two electrodes, one placed 1 cm above the external canthus of the left eye, the other 1 cm below the external

canthus of the right eye, also referred to linked mastoids. Filters were set between 1-30 Hz for EEG and EOG, and between 10-100 Hz for EMG. Polygraphic signals were digitized at a sampling rate of 256 Hz in a Medicid 3E EEG system (Neuronic Mexicana S.A., Mexico City).

2.4 VEP recording

Visual stimulation was monocularly presented by goggles equipped with an LEDs matrix that was held by hand 2 cm directly above each newborn's eyes. Duration of the stimuli was 10 ms with an intensity of 102 cd.s/m², at a 1-Hz stimulation frequency. Two or more blocks of 20 trials each were obtained to ensure replicability during both AS and QS.

After gently cleaning the babies' skin, surface electrode disks were placed at Cz and Oz of the 10-20 International System. The ground electrode was placed on the right mastoid. Electrode impedances were below 5 kOhm. VEPs were recorded bipolarly from Cz-Oz. The Cz derivation was chosen to minimize rapid eye movement artifacts during active sleep.

VEPs were recorded with filters set between 1-100 Hz and the notch filter activated. The amplification gain was 100000. VEPs were recorded using an evoked potential system (Neuronica 05, Neuronic S.A., Mexico City). Recordings of several blocks of averaged responses were made for each eye until at least two replicable blocks clearly showed the VEP potential. To this end, P2 was recognized visually, since this component has been considered the hallmark of VEPs at full-term age (McGlone et al., 2013; Odom et al., 2016).

Successful studies using this technique depend on obtaining reproducible waveforms; thus, achieving replicability of the VEPs is indispensable. An evoked potential is deemed replicable when the recording of a repeat response can be superimposed over the first response with only minimal differences between them. Replicability was assessed for all 20 babies using three methods: 1) visual inspection of the VEP morphology by two independent clinical neurophysiologists (L.C.R. and J.R.G.), who were blind to the babies' behavioral state; 2) Pearson correlation coefficients between the two best blocks; and 3) differences larger than one standard error

in the amplitude of N2-P2 and P2-N3 and P2 latency for AS and QS.

2.5 PSG analysis

Behavioral states were classified as wakefulness, active, quiet and indeterminate sleep (Grigg-Damberger, 2016). Quiet sleep was characterized by high-voltage slow activity or tracé alternant in EEG with no rapid eye movements observed in EOG, accompanied by behavioral quiescence, closed eyes and regularity of breathing. Active sleep was identified by low-voltage irregular activity at frequencies between 5-8 Hz and, occasionally, 1-5 Hz, with amplitudes of 20-35 μV ; rapid eye movements were present at EOG, either singly or in bursts; large amounts of activity intermingled with periods of quiescence, together with frequent facial movements, such as smiles and grimaces; respiration was typically irregular, and very low-voltage EMG was present. Wakefulness was identified when the PSG was dominated by the presence of artifacts with diffuse low-voltage, as well as strong diffuse, motor activity, open eyes, irregular breathing, and high-amplitude tonic and phasic EMG. Indeterminate sleep was considered to occur in epochs that did not meet the AS

or QS criteria. Offline inspection was used to eliminate EEG and VEP recordings during indeterminate sleep and tracé discontinu before final analysis.

2.6 VEP analysis

Based on visual inspection, VEPs were judged to be present and replicable, or absent. For recognition, the maximal positive component between 126 and 300 ms was defined as P2, preceding a maximal negative wave between 200 and 400 ms, or N3. The negative wave before P2 was defined as N2 (McGlone et al., 2013).

N2, P2, N3 latencies and interpeak latencies (IPL) between N2-N3, N2-P2 and P2-N3 were measured by the time that elapsed, in ms, between the stimulus and the maximal or minimal peak. Peak-to-peak amplitudes in μV were assessed for N2-P2 and P2-N3.

2.7 Statistical analysis

The number of blocks needed to achieve adequate replicability, and the number of newborns that required three or more blocks in AS and QS, were compared

3. RESULTS

Since AS and QS were clearly identified by PSG recording, VEP averaging could be initiated and finalized reliably during

using McNemar chi-square test in a 2×2 contingency table. Between-block correlations were compared by a two-factor analysis of variance (ANOVA) for repeated measures using as factor variables (1) type of sleep, and (2) laterality (i.e., right or left eye stimulation). The original correlation values were previously normalized using Fisher's Z transformation.

The normality of VEP latencies, interpeak intervals, and amplitudes were all assessed using the Shapiro Wilk's test. VEP measurements from the right and left eyes were compared, as were AS and QS, using Student's t-tests or the Wilcoxon test for paired samples. The confidence level was 95% ($\alpha \leq 0.05$). For all statistical analyses, the R program, 3.2.5 version, was used (R Core Team, 2013).

both stages. Averaging during wakefulness and indeterminate sleep was not considered in the analysis.

3.1 Replicabilities

Visual inspection of the VEPs showed reproducible waveforms in AS in both eyes for all newborns, but during QS no VEPs could be clearly identified in three babies (15% of the sample, McNemar $\chi^2=15.06$, $p\leq 0.0001$).

As Figure 1 shows, correlation between the two best blocks of averaged responses showed a significant sleep stage factor ($F_{(1,76)}=4.72$, $p=0.03$) with lower correlation values for QS ($r = 0.52$; $SD = 0.26$) than AS ($r = 0.71$; $SD = 0.18$). No differences were found for the laterality factor ($F_{(1,76)}=2.76$, $p=0.10$) or the interaction between sleep stage and laterality ($F_{(1,76)}=1.53$, $p=0.21$). Correlation values between blocks were non-significant ($p > 0.05$) for three babies in QS.

Amplitude/latency deviations of 1 SE from the group showed deviations in 3 newborns in AS and QS. These babies were the same ones who had non-identifiable VEPs and non-significant correlation values between the two blocks corroborated by visual inspection. Two other newborns deviated from SEs, one in AS and one in QS; however, they had reproducible waveforms and significant correlation values between the two blocks. Thus, 3 babies fulfilled the three non-replicability criteria; i.e., no clear VEP waveforms in either eye during QS; non-significant correlation values between the two blocks; and consistent amplitude/latency deviations. For this reason, they were excluded from further statistical analyses.

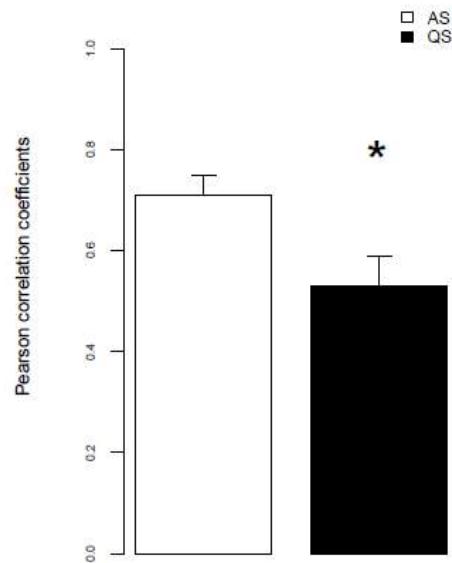


Figure 1. Differences in Mean and Standard Error between the two VEP blocks in AS and QS. The asterisk indicates significant differences between AS and QS, ($p=0.03$).

3.2 Differences between AS and QS

As Figure 2A shows, the number of babies that required more than two blocks to obtain an identifiable VEP was significantly higher for QS than AS. A total of 16 newborns needed three or more blocks in QS (80%), while only

eight needed three or more in AS (40%).

This difference was statistically significant ($\chi^2=7.5$, $df=1$, $p=0.006$).

The number of blocks (Figure 2B) needed to obtain at least two replicable blocks was also significantly higher in QS than AS ($\chi^2=3.56$, $df=1$, $p=0.05$).

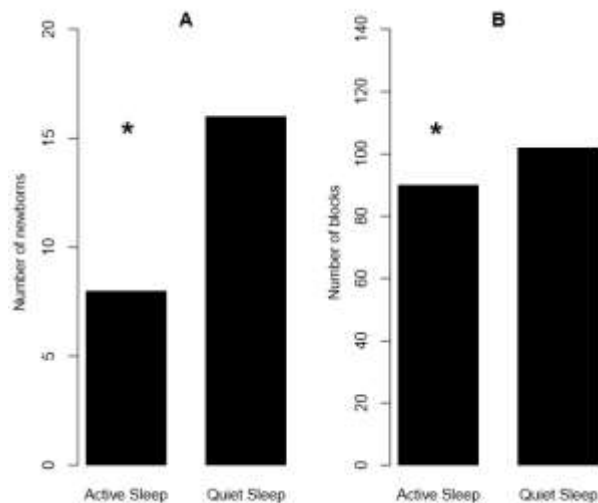


Figure 2. Comparison of AS and QS. A: the number of newborns that needed three or more blocks to obtain a reproducible VEP; B: the number of blocks recorded in the two eyes that were needed to obtain at least two replicable potentials was also higher in QS than AS ($\chi^2=3.56$; p 0.05). Asterisks indicate significant differences.

3.3 VEP analysis

First, symmetry between left and right eye PEV latencies and amplitudes were compared for each sleep stage. Since there were no significant differences between the two eyes, as was expected for normal babies ($p>0.07$), VEPs were averaged for both eyes to permit additional statistical comparisons between QS and AS.

Figure 3 illustrates the grand average of the VEPs for the 17 babies, showing a replicable waveform in AS and QS. A

clear positivity around 200 ms can be appreciated, which is compatible with the P2 component. A preceding negative small potential (N2) was evident at about 130 ms. The large P2 component was followed by a negativity of approximately 310 ms or N3, which corresponds to the morphology reported for newborns of this age.

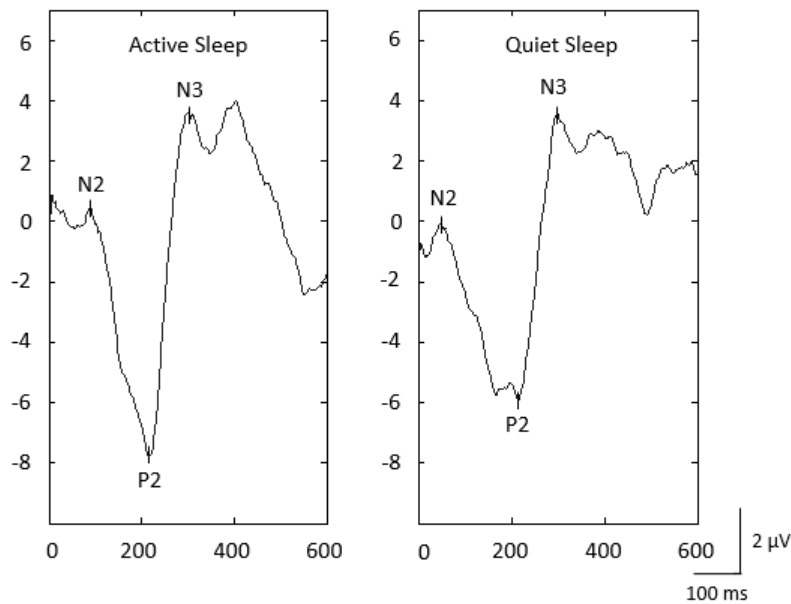


Figure 3. Grand average of the VEPs in full-term newborns obtained during polysomnographically-confirmed AS and QS.

Table 2 shows the absolute latencies for waves N2, P2 and N3, N2-P2, P2-N3 and N2-N3 interpeak latencies, and N2-P2 and P2-N3 peak-to-peak amplitudes. According to our statistical results, there were no significant differences between

AS and QS. A comparison of variance using the Bartlett test, showed no differences in VEP latencies, interpeak latencies or amplitudes between sleep stages.

Table 2. Comparison of VEP variables in AS and QS

Latencies (ms)	Active Sleep		Quiet Sleep		Comparison	
	Mean	SD	Mean	SD	$t_{(df=16)}$	p
Lat N2	133.9	33.8	138.7	38.4	0.72	0.47
Lat P2	213.6	34.1	216.5	32.2	0.36	0.71
Lat N3	308.6	41.2	310.5	30.6	0.16	0.86
IPL (ms)						
IPL N2-N3	174.6	33.4	183.3	39.01	0.85	0.40
IPL P2-N3	94.9	21.9	94.04	34.9	0.09	0.92
IPL N2-P2	79.7	22.8	77.8	27	0.24	0.80
Amplitudes (μV)						
Ampl N2-P2	10.2	3.6	9.6	3.6	0.45	0.65
Ampl P2-N3	13.2	4.5	11.5	5.6	0.08	0.93

Table 2. Comparisons of means and standard deviations for absolute latencies and interpeak latencies of VEPs. Abbreviations: SD, standard deviation; df, degree freedom; ms, milliseconds; Lat, absolute latency; IPL, interpeak latency; Ampl, amplitude; μ V, microvolts.

4. DISCUSSION

Simultaneous recording of VEPs with polysomnography made it possible to obtain visual evoked responses in 20 healthy newborns during active and quiet sleep stages. In AS, all infants showed reproducible evoked potentials, and the number of blocks of averaged responses required was significantly lower than in QS. In QS, in contrast, no reproducible

responses were obtained in 15% of the newborns and the number of infants that needed three or more blocks to obtain a reproducible VEP doubled. Thus, recording in this stage was less reliable and required additional testing.

According to the criteria described by McGlone et al. (2013) and Taylor et al. (1987) for neonates, VEP waveforms with replicable N2, P2 and N3

components were identified in all 20 newborns in AS, but only in 17 in QS. The morphology and characteristics of the VEPs corroborated descriptions obtained with fewer infants of this age in previous studies (Apkarian et al., 1991; Benavente et al., 2005).

The use of monocular stimulation with LEDs allowed better focus in the application of the luminous stimulus and the analysis of the bilateral symmetry of the normal characteristics of the VEPs (Taylor et al., 1987; Watanabe et al., 2005). Symmetric VEPs were obtained in both eyes as expected for healthy newborns which, together with the reproducible VEPs and typical morphologies in AS, suggests normal development of the visual pathways (Benavente et al., 2005; Cruz et al., 2015), and integrity of the thalamic-cortical connections (Coenen, 1995; Vanhatalo, 2010) in this group of healthy full-term newborns.

The greater reliability of VEP characteristics in AS, compared to QS, might be due to differences in the development of the electroencephalographic patterns during these two sleep stages. While AS can be identified electroencephalographically

from 35 weeks of post-conception age and maintains a similar, stable appearance throughout the first month of life (Mizrahi., 2011), QS shows a rapid electrophysiological evolution between 30 and 45 weeks with persistence of alternating tracing until 43-44 weeks of post-conception age (Grigg-Damberger, 2016; Mizrahi, 2011). This may have contributed to the lower replicability found for this sleep stage.

Although differences in the electroencephalographic evolution of neonatal sleep stages could lead researchers to expect differences in VEP characteristics obtained during AS and QS, contrary to our expectations there were no significant differences in VEP latencies and amplitudes between AS and QS. This is consistent with findings obtained with smaller groups of neonates (Mercury et al., 1994; Shepherd et al. 1999). One explanation for the absence of differences between AS and QS could be the disparity in the maturation rate of brainstem REM sleep mechanisms, which mature faster than the inhibitory GABAergic influences from the thalamic reticular nucleus, the neural generator of NREM spontaneous activity, sleep spindles, and the attenuation of thalamo-

cortical transmission of sensory information to the cortex during mature NREM sleep (Steriade and Timofeev, 2003). During the first month of life, immature GABAergic synapses may continue to provoke an excitatory action because of the immaturity in the chloride-extruding K(+)-Cl(-) cotransporter KCC2. As up-regulation and increased expression of KCC2 occurs, the proportion of extracellular Cl⁻ also increases, and the function of GABAergic receptors becomes inhibitory (Jovanovic and Thomson, 2011; Rivera and Kaila, 2005; Salmaso et al., 2014). Accordingly, the sensory blockade that occurs later during NREM sleep would not appear during immature QS (Clawson et al., 2016). Thus, the similar cortical responses in the two types of neonatal sleep may be attributable to the absence of physiological reticular-thalamic inhibition during QS in newborns and the predominance of brainstem activating mechanisms. It is not until 2-3 months of postnatal age that sleep spindles, an electrophysiological expression of the inhibitory action of the thalamic reticular nucleus, begin to become visible in EEGs (Grigg-Damberger, 2016), so differences in VEPs recorded during the REM and

NREM stages might be expected. Further studies are needed to ascertain whether there is an association between the degree of maturity of the spontaneous electrical activity recorded and the characteristics of EEGs and VEPs during neonatal sleep. Another explanation for the absence of differences between AS and QS VEPs may be cortical immaturity. Classic works by Coenen (1995) and Creutzfeldt (1973) showed the occipital cortical origin of VEPs in several species of animals during wakefulness and sleep. VEPs in response to luminous stimuli depend on synchronized neuronal activation in the primary visual cortex in newborns (Ceschin et al., 2015). Hence, it may be that the lack of maturation of the visual cortex, together with the immature thalamo-cortical network, induce a similar synchronized response of cortical neurons to luminous stimulation, regardless of sleep stage.

Our findings are limited to full-term infants because of the exclusion of preterm newborns from the study to avoid variability due to differences in neurodevelopment. It was not possible to completely control for postnatal age because our evaluations had to be performed at the moment when the

newborns were close to being discharged and decisions had to be taken as to whether they required neuro-rehabilitative care. An important source of VEP variation is the postnatal age of the newborn at the time of recording (Benavente et al., 2005; Kato and Watanabe, 2006). The evaluation of neonates of distinct postnatal age (8 and 45 days) may have contributed to the variability of the latency and amplitude values described. For future studies, we would propose characterizing VEPs in a larger group of term and preterm newborns in several conceptional and postnatal ages during the first 45 days of life.

In this study, unlike other authors, we deliberately decided not to record VEPs during wakefulness. Though there is some evidence that VEPs obtained during this state have larger amplitudes and lower latencies than during sleep (Benavente et al., 2005; Shepherd et al., 2000), most of those studies did not apply polysomnographic criteria, but relied only on behavioral criteria. Also, it is especially difficult to distinguish the transition from wakefulness to AS in neonates (Grigg-Damberger, 2016). Thus, the possibility that what may be

considered wakefulness might include AS cannot be ruled out, because AS is the stage in which neonatal sleep begins, and thus induced high variability. Also, cephalic movements to avoid the luminous stimuli, blinking, and electromyographic interference of the EEG due to the newborns' muscular contractions may compromise recording quality and increased duration excessively. For these reasons, similar to Benavente et al. (2005) and Kraemer et al. (1999), we judged that it would be difficult and unreliable to achieve a continuous state of active vigilance and immobility in the newborns during several minutes.

The lack of differences between AS and QS in the characteristics of the VEPs could make the distinction between the two types of neonatal sleep irrelevant; however, the fact that up to 15% of healthy infants do not present an identifiable visual response in QS makes VEP recording in this stage less reliable. Given that abnormal VEPs in newborns are associated with poor neurological prognosis and long-term disabilities, and the importance of early intervention (Kato and Watanabe, 2005; McGlone et al., 2013; Shepherd et al., 1999), it is crucial

to obtain reliable VEPs. Our results show that recording VEPs during AS may help avoid false positives in diagnoses.

From a practical point of view, muscular atony during AS guarantees maximum relaxation in the newborn, thus minimizing technical artifacts caused by movements. AS is the stage in which neonatal sleep begins physiologically (Grigg-Damberger, 2016), so it is not necessary to wait a long time for it to appear.

4.1 Conclusions

According to this study, the recording of neonatal VEPs is more reproducible

during AS and may contribute to improving diagnostic accuracy. Active sleep is easy to identify, allows maximum cooperation by neonates, and shows typical VEP waveforms, key factors that make this type of study more reliable and achievable in relatively short time periods. Using polysomnographic control to identify AS is highly recommended, although behavioral observation can be used when electroencephalographic recording simultaneously with VEPs is not feasible.

REFERENCES

1. American Clinical Neurophysiology Society, 2006. Guidelines on Visual Evoked Potentials. *J Clin Neurophysiol.* 23(2):157-67.
2. Anders T., Emde R., Parmelee A., 1971. A manual of standardized terminology, techniques and criteria for scoring states of sleep and wakefulness in newborn infants. UCLA Brain Information Service, NINDS Neurological Information Network, Los Angeles.
3. Apkarian P., Mirmiran M., Tijssen R., 1991. Effects of Behavioral State on Visual Processing in Neonates. *Neuropediatrics.* 22: 85-91.
4. Benavente I., Tamargo P., Tajada N., Yuste V., Oliva M.J., 2005. Flash visually evoked potentials in the newborn and their maturation during the first six months of life. *Documenta Ophthalmologica.* 110: 255–263.
5. Ceschin R., Lee V.K., Schmithorst V., Panigrahy A., 2015. Regional vulnerability of longitudinal cortical association connectivity: Associated with structural network topology alterations in preterm children with

- cerebral palsy. *Neuroimage Clin.* 9: 322-37.
6. Clawson B.C., Durkin J., Aton S.J., 2016. Form and Function of Sleep Spindles across the Lifespan. *Neural Plasticity.* 16: 1-16.
 7. Coenen A.M., 1995. Neuronal activities underlying the electroencephalogram and evoked potentials of sleeping and waking: implications for information processing. *Neurosci Biobehav Rev.* 19(3): 447-63.
 8. Corsi-Cabrera M., Arce C., Del Río-Portilla I.Y., Pérez-Garci E., Guevara M.A., 1999. Amplitude reduction in visual event-related potentials as a function of sleep deprivation. *Sleep.* 22(2): 181-9.
 9. Creutzfeldt O.D., Kuhnt U., 1973. Electrophysiology and topographical distribution of visual evoked potentials in animals. *Handbook of Sensory Physiology.* 7(3b): 595-646.
 10. Cruz S., Crego A., Ribeiro E., Goncalves O., Sampaio A., 2013. A VEP study in sleeping and awake one-month-old infants and its relation with social behavior. *Int. J. Devl. Neuroscience.* 41: 37-43.
 11. Foundation for Statistical Computing, Austria, 2013. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>.
 12. Glass H.C., Berman J.I., Norcia A.M., Rogers E.E., Henry R.G., Hou C., Barkovich A.J., Good W.V., 2010. Quantitative fiber tracking of the optic radiation is correlated with visual-evoked potential amplitude in preterm infants. *AJNR Am J Neuroradiol.* 31(8): 1424-9.
 13. Griffen T.C., Wang L., Fontanini A., Maffei A., 2013. Developmental regulation of spatio-temporal patterns of cortical circuit activation. *Front Cell Neurosci.* 6(65): 1-12.
 14. Grigg-Damberger M., 2016. The Visual Scoring of Sleep in Infants 0 to 2 Months of Age. *Journal of Clinical Sleep Medicine.* 12(3): 429-45.
 15. Harmony T., Barrera-Reséndiz J., Juárez-Colín M.E., Carrillo-Prado C., Pedraza-Aguilar M.C., Asprón Ramírez A., Hinojosa-Rodríguez M., Fernández T., Ricardo-Garcell J., 2016. Longitudinal study of children with perinatal brain damage in whom early neurohabilitation was applied: Preliminary report. *Neurosci Lett.* 12 (611): 59-67.
 16. Hoedlmoser K., Griessenberger H., Fellingner R., Freunberger R., Klimesch W., Gruber W., Schabus M., 2011. Event-related activity and phase locking during a psychomotor vigilance task over the course of sleep deprivation. *J Sleep Res.* 20(3): 377-85.
 17. Hrbek A., Karlberg P., Olsson T., 1973. Development of visual and somatosensory evoked responses in pre-term newborn infants. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology.* 34: 225-232.
 18. Huang X., Zhang Q., Hu P.H., Zhong Y.L., Zhang Y., Wei R., Xu T.T., Shao Y., 2016. White and Gray Matter Volume Changes and Correlation with Visual Evoked Potential in Patients with Optic Neuritis: A Voxel-Based Morphometry Study. *Med Sci Monit.* 22: 1115-23.

19. Husain A.M., 2011. Evoked Potentials in Children and Infants, in: Niedermeyer E., Lopes da Silva F.H. (Eds), Niedermeyer's Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields. Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp. 1057-1082.
20. Jovanovic J.N., Thompson A.M., 2011. Development of cortical GABAergic innervation. *Front Cell Neurosci.* 5(14): 1-11.
21. Kato T., Watanabe K., 2006. Visual evoked potential in the newborn: Does it have predictive value?. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine.* 11: 459-463.
22. Kraemer M., Abrahamsson M., Sjoström A., 1999. The neonatal development of the light flash visual evoked potential. *Documenta Ophthalmologica.* 99: 21-39.
23. Krumholz A., 2005. Evoked Potentials in Infancy and Childhood, in: Niedermeyer E., Lopes da Silva F.H. (Eds), Niedermeyer's Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields. Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp. 1121-1135.
24. McGlone L., Hamilton R., McCulloch D.L., Boulton R., Bradnam M.S., Weaver L.T., Mactier H., 2013. Neonatal Visual Evoked Potentials in Infants Born to Mothers Prescribed Methadone. *Pediatrics.* 131(3): 857-63.
25. Mercuri E., Siebenthal K., Tutuncuoglu S., Guzzetta E., Casaer P., 1995. The Effect of Behavioural States on Visual Evoked Responses in Preterm and Full-Term Newborns. *Neuropediatrics.* 26: 211-213.
26. Mizrahi E.M., Moshé S.L, Hrachovy R.A., 2011. Normal EEG and Sleep: Preterm and Term Neonates, in: Niedermeyer E., Lopes da Silva F.H. (Eds), Niedermeyer's Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields. Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp 154-163.
27. Näätänen R., Michie P.T., 1979. Early selective-attention effects on the evoked potential: a critical review and reinterpretation. *Biol Psychol.* 8(2): 81-136.
28. Odom J.V., Bach M., Brigell M., Holder G.E., McCulloch D.L., Mizota A., 2016. ISCEV standard for clinical visual evoked potentials: (2016 update). *Doc Ophthalmol.* 133(1): 1-11.
29. Prechtl, H.F., 1974. The behavioral states of the newborn infant (a review). *Brain Res.* 76(2): 185-212.
30. Rivera C., Voipio J., Kaila K., 2005. Two developmental switches in GABAergic signalling: the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J Physiol.* 562: 27-36.
31. Roy M.S., Gosselin J., Hanna N., Orquin J., Chemtob S., 2004. Influence of the state of alertness on the pattern visual evoked potentials (PVEP) in very young infant. *Brain & Development.* 26: 197-202.
32. Salmaso N., Tomasi S., Vaccarino F.M., 2014. Neurogenesis and maturation in neonatal brain injury. *Clin Perinatol.* 41(1): 229-239.
33. Shepherd A., Saunders K.J., McCulloch D.L., Dutton G.N., 1999. Prognostic value of flash visual evoked potentials in preterm infants.

- Developmental Medicine & Child Neurology. 41: 9-15.
34. Shepherd A., Saunders K., McCulloch D., 2000. Effect of sleep state on the flash visual evoked potential. A case study. *Documenta Ophthalmologica*. 98: 247-256.
 35. Spittle A., Orton J., Anderson P.J., Boyd R., Doyle L.W., 2015. Early developmental intervention programs provided post hospital discharge to prevent motor and cognitive impairment in preterm infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* 24; (11): CD005495.
 36. Steriade M., Timofeev I., 2003. Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations. *Neuron*. 37(4): 563-76.
 37. Taylor M.J., Menzies R., MacMillan L.J., Whyte H.E., 1987. VEPs in normal full-term and premature neonates: longitudinal versus cross-sectional data. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*. 68: 20-27.
 38. Tsuneishi S., Casaer P., Fock J.M., Hirano S., 1995. Establishment of normal values for flash visual evoked potentials (VEPs) in preterm infants: a longitudinal study with special reference to two components of the N1 wave. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*. 96: 291-299.
 39. Vanhatalo S., Kaila K., 2010. Emergence of spontaneous and evoked electroencephalo-graphic activity in the human brain, in Lagercrantz H., Hanson L.R., Peebles D.M. (Eds.), *The Newborn Brain: Neuroscience and Clinical Applications*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 229-243.
 40. Vieira M.A., Cavalcanti M.A., Costa D.L., Eulálio K.D., Vale O.C., Vieira C.P., Costa C.H., 2015. Visual evoked potentials show strong positive association with intracranial pressure in patients with cryptococcal meningitis. *Arq Neuropsiquiatr*. 73(4): 309-313.
 41. Whyte H.E., Pearce J.M., Taylor M.A., 1987. Changes in the VEP in preterm neonates with arousal states, as assessed by EEG monitoring. *Electroencephalography and clinical Neuro-physiology*. 68: 223-225.
 42. Wronka E., Kaiser J., Coenen A.M., 2008. The auditory P3 from passive and active three-stimulus oddball paradigm. *Acta Neurobiol Exp*. 68(3): 362-72.

ANEXO IV. Artículo Publicado. Experimento 1.

Cubero-Rego L, Ricardo-Garcell J, Corsi-Cabrera M, Cruz-Martínez R, Rebolledo-Fernández C, Otero-Ojeda G, Harmony T. 2017. Improving the efficiency of Auditory Brainstem Responses in newborns, using a 60 clicks/s stimulation rate. *Journal of Clinical Neuroscience*. 45: 295-304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2017.08.044>



Lab resource

Improving the efficiency of Auditory Brainstem Responses in newborns, using a 60 clicks/s stimulation rate



Lourdes Cubero-Rego^a, Josefina Ricardo-Garcell^{a,*}, María Corsi-Cabrera^{a,b}, Rogelio Cruz-Martínez^{a,c}, Carlos Rebolledo-Fernández^c, Gloria Otero-Ojeda^d, Thalía Harmony^a

^a Research Unit in Neurodevelopment, Institute of Neurobiology, Autonomous University of Mexico, Querétaro 76230, Mexico

^b Sleep Laboratory, Faculty of Psychology, National Autonomous University of Mexico, 04510 Mexico City, Mexico

^c Department of Fetal Medicine and Surgery, Children's and Women's Specialty Hospital of Querétaro, 76090, Mexico

^d Faculty of Medicine, Autonomous Mexico State University, 50170, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2017

Accepted 14 August 2017

Keywords:

Neonates
ABR
Risk factors
ROC curves
Sensitivity

ABSTRACT

Recent evidence suggests that Auditory Brainstem Responses (ABR), in neonates with risk factors for neurological damage, may show auditory brainstem abnormalities, even in patients with normal hearing. To compare the recording and diagnostic accuracy of neonatal Auditory Brainstem Responses (ABR), using 10 and 60 clicks/s stimulation rates, two groups of neonates were prospectively studied: 30 healthy full-term neonates, with no peri- or postnatal complications; and 30 high-risk newborns with two or more of the following conditions: hyperbilirubinemia, use of ototoxic drugs, birth weight inferior to 1500 g, perinatal sepsis, intraventricular hemorrhage, and/or mechanical ventilation. Correlation between ABR trials, recording duration, and the absolute and interpeak latencies of ABR waves I, III and V, were measured. ROC-curve analysis assessed the diagnostic accuracy of both stimulation rates. The correlations between ABRs trials were significantly higher at 60 clicks/s than at 10 clicks/s ($F_{(1,116)} = 14.5$, $p < 0.0002$). Recording duration at 60 clicks/s was significantly lower ($t = 20.9$, $p < 0.0001$). ROC-curve comparisons showed increased diagnostic accuracy at the stimulation rate of 60 clicks/s, for waves I ($D = 2.04$, $p = 0.04$), V ($D = 2.02$, $p = 0.04$), interpeak latencies III-V ($D = 2.2$, $p = 0.02$), and I-V ($D = 2.86$, $p = 0.004$). In neonates, the use of 60 clicks/s stimulation rate permits a substantial shortening of the ABR recording, with greater diagnostic accuracy and replicability.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Auditory Brainstem Responses (ABRs) are reliable, objective, non-invasive tests of the auditory neural activity, that are widely-used in newborns, infants and children [1–3]. ABRs allow early detection of damage to the auditory neural pathway, in peripheral and brainstem levels [3,4]. Several studies have described functional abnormalities of the auditory brainstem in neonates with hyperbilirubinemia, chronic lung disease and perinatal asphyxia [5–7]. ABRs have shown to improve the validity

and predictive value of clinical scales as the Neonatal Neurological Inventory and the Neurobiological Risk Score [8].

In newborns, a typical evoked waveform, composed of waves I, III and V, is generated when successive brainstem structures are activated. Wave I is abnormal if the inner-middle ear and auditory nerve are not functioning normally. The integrity of the caudal protuberance is determined by the characteristics of wave III, while wave V shows the mesencephalic function at the level of the inferior colliculus [9].

However, ABR recording is time-consuming and requires specialized interpretation [10]. Aguirre et al. have found that the sensitivity of ABRs, recorded at 10 clicks/s stimulation rates, is reduced in certain neonatal groups [11].

Given the importance of early detection of auditory compromise for a normal development of language [12,13], it is necessary to find paradigms that increase the diagnostic accuracy of ABRs, while also reducing test duration. To this end, techniques as maximum length sequences (MLS), continuous loop averaging deconvolution (CLAD), quasiperiodic sequence deconvolution (QSD),

* Corresponding author at: Research Unit in Neurodevelopment, Institute of Neurobiology, Autonomous University of Mexico, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro 76230, Mexico.

E-mail addresses: lourdes.cubero@gmail.com (L. Cubero-Rego), oojrg@yahoo.com (J. Ricardo-Garcell), corsi@unam.mx (M. Corsi-Cabrera), cruzmartinez@fetalmex.com (R. Cruz-Martínez), refc1907@hotmail.com (C. Rebolledo-Fernández), oeog45@gmail.com (G. Otero-Ojeda), thaliah@unam.mx, thaliah@servidor.unam.mx (T. Harmony).

least-squares deconvolution (LSD), and randomized stimulation and averaging (RSA) have been developed [14–16]. Although their results are promising, they have not yet reached wide clinical application [3,17].

Since the first studies with ABRs, the use of different stimulation rates (SR) has been evaluated in adult and child populations [18]. Effects of high stimulation rates on ABRs include increased latencies and decreased amplitudes of all waves, with increases in the SR [19,20]. It was suggested that the decrease in wave's amplitudes, observed at 50–70 clicks/s, could compromise their identification when compared to the amplitude obtained at a stimulation of just 10 clicks/s [9]. Currently, for neurological applications, trains of auditory stimuli at rates of 10–39.1 clicks per second (click/s) are considered the best stimulus for the ABRs recording [3,17].

The purpose of this study was to assess whether stimulation at 60 clicks/s increases the diagnostic accuracy of ABR, in newborns. We choose 60 clicks/s stimulation rate because this value triplicate the conventional SR, and it is well below the maximum allowable rate, using a 15 ms analysis window. Our specific aims were to describe, in newborns: (1) the replicability of ABR waveforms at 60 clicks/s; (2) the changes in latencies of ABR waves with this stimulation rate; (3) the diagnostic accuracy at 10 and 60 clicks/s stimulation rates.

2. Material and methods

2.1. Subjects

As part of a study for early detection of brain injury in neonates with risk factors for neurological damage, 60 consecutive singleton newborns were included in a prospective cohort. Two groups, paired by chronological age, were formed, according to the babies' health condition and the presence of risk factors. All babies had been referred to the laboratory at 32–44 weeks of postmenstrual age (PMA), as normal control newborns, or for early detection of neonatal brain damage. The first group included 30 healthy newborns (HNb), 16 girls and 14 boys, after applying the following inclusion criteria: 1) singleton newborns at 37–44 weeks of PMA; 2) normal birth weight; 3) normal prenatal Doppler ultrasound studies; and, 4) no peri- or postnatal morbidity.

The group with risk factors (RFNb) included 30 neonates, 14 girls and 16 boys, with two or more of the following conditions: [6–8] hyperbilirubinemia (unconjugated blood bilirubin > 15 mg/dl), $n = 23$ (76.6%); use of two or more ototoxic drugs, as Amikacin, Vancomycin, Furosemide or Gentamicin, $n = 20$ (66.6%); birth weight inferior to 1500 g, $n = 15$ (50%); neonatal sepsis, $n = 23$ (43.3%); mechanical ventilation, $n = 23$ (26.6%); and/or intraventricular hemorrhage, $n = 23$ (30%). Table 1 shows the general characteristics of both groups.

All babies were born at the Specialized Hospital for Women and Children in Querétaro, Mexico, between December 2012 and November 2015. The exclusion criteria for both groups were: congenital malformations, chromosomal abnormalities, and prenatal infections as cytomegalovirus. The experimental protocol was

approved by the Hospital's Ethics Committee and follows the principles of the World Medical Association's Declaration of Helsinki. Written consent for participation was obtained from all parents involved. All neonates were asymptomatic at the time of the ABR studies.

2.2. ABR recording

ABRs were recorded during spontaneous sleep with the baby resting in his/her mother's lap. After gently cleaning the skin, surface disk electrodes were placed at cranial and mastoid locations [3,17]. The active electrode, Cz (+), was located at the vertex, with the reference in the mastoid apophysis, ipsilateral to the stimulated side. The ground electrode was placed on the contralateral mastoid. Electrode impedances were less than 5 kOhm [3,9].

ABRs were obtained by monaural stimulation using rarefaction clicks at 70 dB NHL, with masking of white noise at 30 dB NHL in the contralateral ear, at stimulation rates of 10 and 60 clicks/s. We used an evoked potentials equipment (Neuronic 05, Neuronic S.A., Mexico City), with NA942 headphones. The amplification gain was 100,000, and filters were set between 10 Hz and 3 kHz. The notch filter was activated. Two or more trials of 1000 averages each were obtained to ensure replicability at both the 10 and 60 clicks/s SR.

Reliability of the studies using this technique depend on obtaining reproducible and consistent waveforms; thus, the replicability of the ABRs recorded is indispensable. An evoked potential is deemed replicable when the recording of a repeat trial can be superimposed on that of the first trial with only minimal differences between them [9].

2.3. Measurements

We assessed replicability using the Pearson's correlation coefficient (CCR), calculated between the two trials obtained, in each ear of patients, for 10 and 60 clicks/s. Using MATLAB software, the digitalized ABRs signals were segmented, including for the analysis the time between one standard deviation below the wave I latency for each newborn, and one standard deviation above the wave V latency. The standard deviation values used were calculated for each ear, SR and group.

Absolute latencies for waves I, III and V were measured between stimulus application and the maximum peaks of the waves. Then, we calculated interpeak latencies (IPL), between waves: I-III, III-V and I-V. All measurements were reviewed by two clinical neurophysiologists (L.C.R. and G.O.O.), who were blind to the patients' antecedents. A consensus was reached between the two evaluators to define the measurements of the potentials. The recording duration was timed.

2.4. Statistical analysis

Inter-trial correlations, waves latencies and interpeak latencies were compared with an analysis of variance (ANOVA), using as independent variables the SR, the group of newborns and the

Table 1
General characteristics of neonates groups.

Characteristics	Healthy newborns			Risk Factor newborns		
	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range
Gestational age (weeks)	37	1.8	37–42	35.2	2.9	31.3–39.6
Postmenstrual age (weeks)	42.4	1.7	39–44	40.1	2.55	38–44
Postnatal age (days)	34.2	15.5	3–45	35.6	20.3	4–62
Birth weight (g)	2899	463	2355–3900	2150	709	1125–3600

SD, standard deviation.

laterality (right or left ear). The original correlation values were previously normalized, using the Z transformation of Fisher. Normality of variables was confirmed using Shapiro Wilk's test. The homogeneity of variances was assessed with Bartlett's test. The number of trials and recording duration were compared in each group, using the Student's *t*-test. The confidence level used was 95% ($\alpha \leq 0.05$).

The Receiver Operating Characteristic (ROC) curves allow a comprehensive assessment of diagnostic tests accuracy. It has the advantage of calculate sensitivity and specificity at different cutoff values, rendering the area under the curve (AUC), as a measure of diagnostic accuracy.

We assessed the diagnostic accuracy of ABRs by ROC curves, calculated for the 10 and 60 clicks/s stimulation rates (AUC10 and AUC60), using the pROC library of the R program [21]. Several cut-off levels were automatically applied to calculate the different values of sensitivity and specificity, for the HNb and RFNb groups. ROC curves for each wave latency and IPL were built with multiple iterations, and automatically smoothed. The areas under ROC curves were compared for specificity values superior to 75%. Data processing and analyses were performed using Matlab (MATLAB with Statistics and PLS Toolbox Release 2014, The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA), and R, version 3.2.5 [21,22].

3. Results

All newborns presented I, III and V waves with a typical aspect, at 10 and 60 clicks/s. Fig. 1 illustrates the grand average waveforms for each ear, at the two SR, in both groups of neonates.

As Fig. 2 shows, correlations between trials were similar in both ears, but differences were found between SR of 10 and 60 clicks/s. There was a significantly lower correlation in the group of neonates with risk factors (Table 2).

The test duration and the number of trials required to obtain the ABRs were compared for the stimulation rates. The number of trials did not differ between the two rates ($\text{mean}_{10\text{clicks/s}} = 11.7 \pm 2.8$ trials; $\text{mean}_{60\text{clicks/s}} = 11.8 \pm 2.8$ trials; $t = 0.55$, $p = 0.58$). Recording duration at 60 clicks/s was less than half that at 10 clicks/s, ($\text{mean}_{10\text{clicks/s}} = 8.83 \pm 2.4$ minutes; $\text{mean}_{60\text{clicks/s}} = 3.47 \pm 0.91$ minutes; $t = 20.9$, $p < 0.0001$).

Fig. 3 shows the absolute latencies of ABR waves I, III and V, with their IPL, for each group of newborns. As Table 1 shows, significant differences between the 10 and 60 clicks/s stimulation rates were found for all absolute latencies and the I-III, I-V interpeak latencies in both groups. The IPL III-V showed no differences between the two SR. Differences between groups were present for all latencies and IPL.

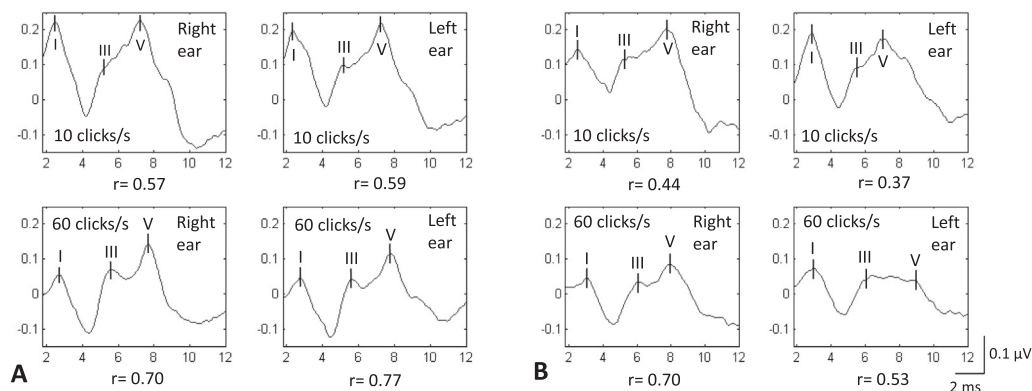


Fig. 1. Grand average waveforms, obtained at 10 and 60 clicks/s rates in (A) healthy and (B) risk factors newborns. r, correlation coefficient of Pearson.

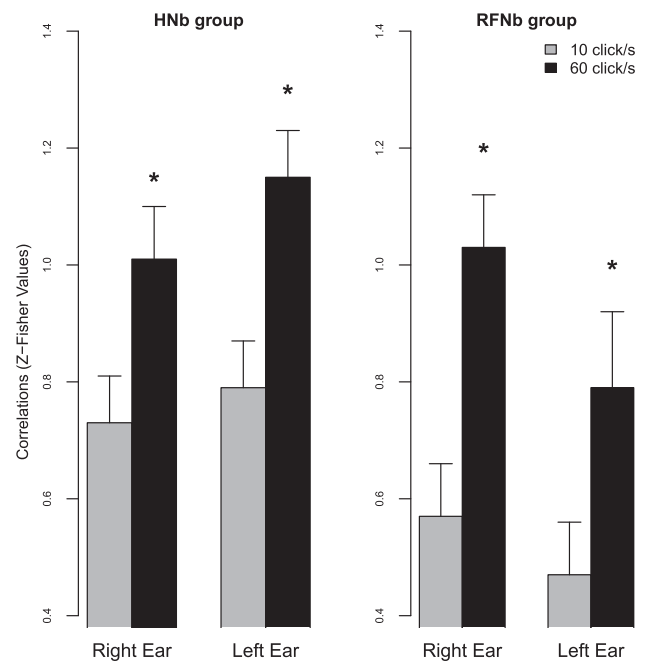


Fig. 2. The correlation between ABR trials differed for the 10 and 60 clicks/s stimulation rates, with increased replicability at 60 clicks/s. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.002$). HNb, healthy newborns; RFNb, risk factors newborns.

Fig. 4 shows the ROC curves, for both stimulation rates, for ABR absolute latencies and IPL. Diagnostic accuracies were compared for specificity values of 100 to 75%. For this values, there was differences between AUC10 and AUC60, for latencies I ($D = 2.04$, $p = 0.04$), V ($D = 2.02$, $p = 0.04$), and interpeak latencies III-V ($D = 2.2$, $p = 0.02$), and I-V ($D = 2.86$, $p = 0.004$).

4. Discussion

As hypothesized, ABR waves I, III and V were identifiable in both groups of neonates, at 60 clicks/s stimulation rate. Test duration was shorter; replicability and –more importantly– diagnostic potential, were higher than at 10 clicks/s.

The advantages of stimulation rates of 55 clicks/s were suggested by Stockard, when ABRs were first used in clinical applications [18]. Rates higher than 60 clicks/s, as 75, 91–900 clicks/s, have been studied [19,20]. Stimulation rates superior to 100 clicks/s require the use of MLS, that is not always available

Table 2
Statistical results of ANOVA for ABRs measurements, by factors.

	10 vs 60 clicks/s rate		Laterality		Neonates group	
	F _(1,232)	p value	F _(1,232)	p value	F _(1,232)	p value
CCR	28.06	0.0001	0.28	0.59	9.73	0.002
Waves' latencies (ms)						
I	12.7	0.0004	0.01	0.97	52.6	0.0001
III	28.1	0.0001	0.36	0.54	63.07	0.0001
V	26.3	0.0001	1.27	0.26	70.05	0.0001
Interpeak latencies (ms)						
I-III	14.7	0.0001	0.67	0.41	14.4	0.0001
III-V	2.8	0.09	1	0.31	12.2	0.0005
I-V	13.3	0.0003	1.62	0.20	25.2	0.0001

ABR, Auditory Brainstem Responses; CCR, correlation between trials of ABR.

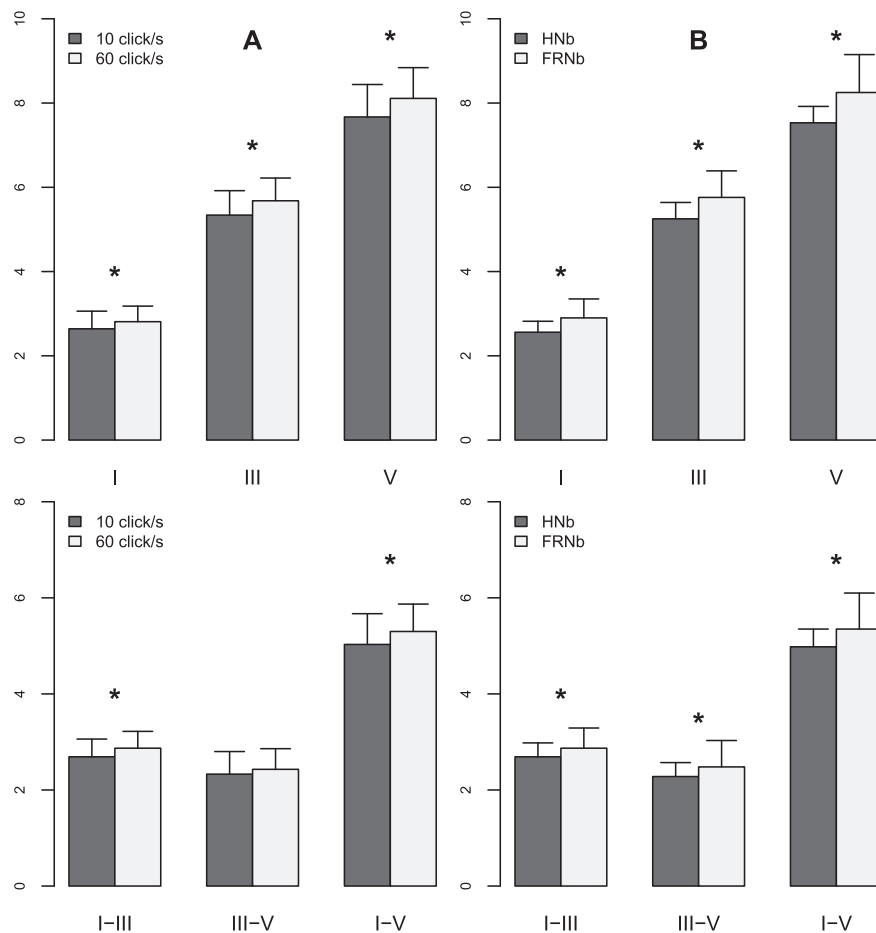


Fig. 3. Absolute and interpeaks latencies of ABR's waves: A, compared by stimulation rate; B, compared by group. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.0003$). HNb, healthy newborns; FRNb, risk factors newborns.

in all evoked potentials equipment. Thus, 60 clicks/s stimulation is a valid and reliable option, when there is no easy access to MLS, CLAD or other techniques.

Similar to Jiang and Burkard, [19,20] we found differences between 10 and 60 clicks/s, for all absolute latencies and IPLs, except for the III-V interval. The increased latencies at 60 clicks/s, compared to 10 clicks/s has been attributed to the different efficacy of synaptic transmission in the two stimulation conditions [23]. These changes could be explained by an adaptation mechanism; *i.e.*, a larger number of neurons remain in refractory period when the presentation of the stimulus is faster. This produces neuronal desynchronization, with increased duration of ABR waves, decreased amplitude and increased interpeak latencies [19]. The

system's vulnerability would be increased for immaturity or neuronal damage, so an increase in SR would make evident these disorders [24].

Supporting this, changes at 60 clicks/s stimulation rates were more pronounced in the FRNb group. These results are similar to those of Santos et al., who found that increasing the stimulus rate to 51–71 clicks/s detected ABR abnormalities in multiple sclerosis patients, with normal magnetic resonance images [25].

The main limitation of this study is the uncertainty about the future repercussion of this mild alterations of the neural auditory pathway. While we know that the FRNb group were exposed to auditory risk factors, the lack of subsequent monitoring prevents us from knowing the consequences of this exposition over their

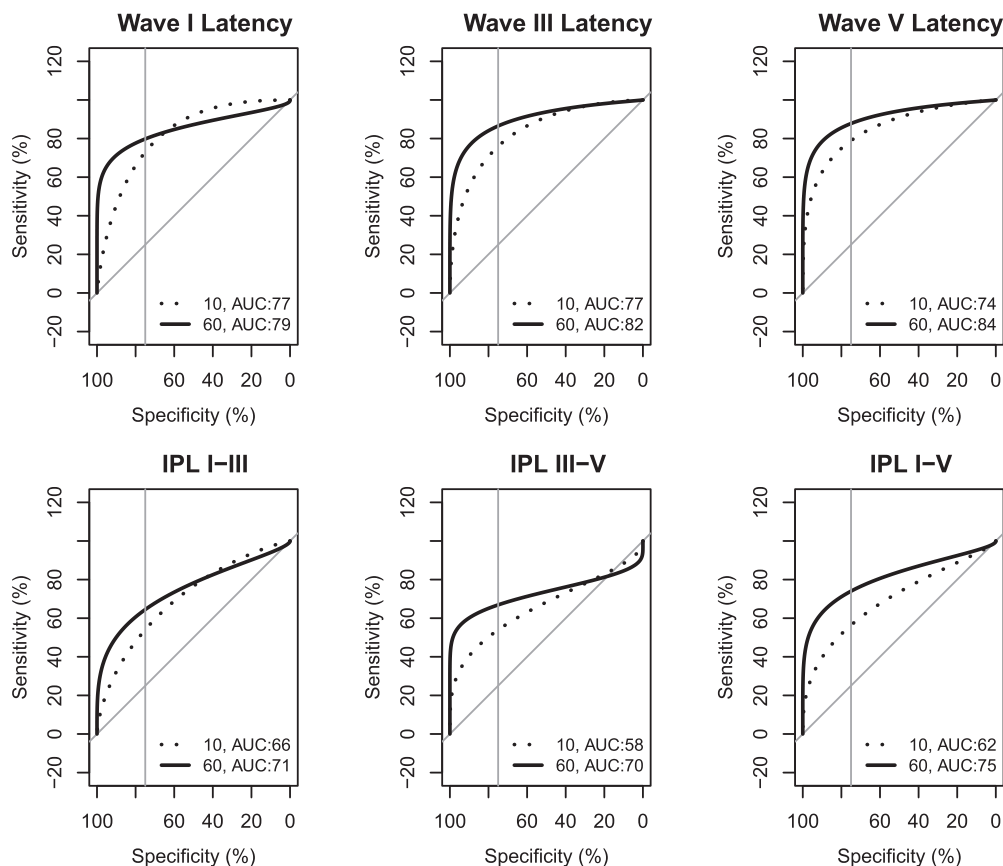


Fig. 4. ROC curves for absolute latencies and IPLs of ABR, at stimulation rates of 10 and 60 clicks/s. Vertical gray lines show the specificity limits of 100 to 75%. Diagonal lines represent diagnostic accuracy of 0.5. IPL, interpeak latencies.

linguistic and auditory function. Despite this, the study demonstrates the possibility of achieving greater reliability and efficiency of ABRs in neonates, using a 60 clicks/s stimulation rate.

Funding/support

Lourdes Cubero-Rego is a Ph.D. student in the Doctoral Program in Biomedical Sciences at the *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM). The project was partially funded by CONACYT grants 218556, 166772 and UNAM DGAPA PAPIIT IN200917.

Acknowledgements

We thank Dr. Michael Jerzierski for his helpful comments on this paper. Engineer Héctor Belmont and Dr. María Elena Juárez collaborated in data collection. We thank Paul Kersey for revising English language use.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- [1] Radeloff A, Cebulla M, Shehata-Dieler W. Auditory evoked potentials: basic and clinical applications. *Laryngorhinootologie* 2014;93:625–37.
- [2] Stipdonk LW, Weisglas-Kuperus N, Franken MC, et al. Auditory brainstem maturation in normal-hearing infants born preterm: a meta-analysis. *Dev Med Child Neurol* 2016;58(10):1009–15.
- [3] American Clinical Neurophysiology Society. Guidelines on short-latency auditory evoked potentials. *J Clin Neurophysiol* 2006;23(2):157–67.
- [4] Baldwin M, Watkin P. Predicting the type of hearing loss using click auditory brainstem response in babies referred from newborn hearing screening. *Ear Hear* 2014;35:1–9.
- [5] Jiang ZD, Brosi DM, Chen C, et al. Brainstem response amplitudes in neonatal chronic lung disease and differences from perinatal asphyxia. *Clin Neurophysiol* 2009;120:967–73.
- [6] Jiang ZD, Wilkinson AR. Impaired function of the auditory brainstem in term neonates with hyperbilirubinemia. *Brain Dev* 2013;12:129–34.
- [7] Jiang ZD, Ping LL, Wilkinson AR. Functional abnormality of the auditory brainstem in high-risk late preterm infants. *Clin Neurophysiol* 2012;123:993–1001.
- [8] Pasman JW, Rotteveel JJ, Maassen B, et al. Neonatal risk factors and risk scores including auditory evoked responses. *Eur J Pediatr* 1998;157(3):230–5.
- [9] Chiappa KH. Brainstem auditory evoked potentials: methodology. In: Chiappa KH, editor. *Evoked potentials in clinical medicine*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p. 182–3.
- [10] Levit Y, Himmelfarb M, Dollberg S. Sensitivity of the automated auditory brainstem response in neonatal hearing screening. *Pediatrics* 2015;136:23–7.
- [11] Moreno-Aguirre AJ, Santiago-Rodríguez E, Harmony T, et al. Analysis of auditory function using brainstem auditory evoked potentials and auditory steady state responses in infants with perinatal brain injury. *Int J Audiol* 2010;49:110–5.
- [12] Shi B, Yang LZ, Liu Y, et al. Early-onset hearing loss reorganizes the visual and auditory network in children without cochlear implantation. *Neuroreport* 2016;27(3):197–202.
- [13] Skoe E, Brody L, Theodore RM. Reading ability reflects individual differences in auditory brainstem function, even into adulthood. *Brain Lang* 2017;164:25–31.
- [14] Peng X, Chen Y, Wang T, et al. Noise attenuation estimation for maximum length sequences in deconvolution process of auditory evoked potentials. *Comput Math Methods Med* 2017:1–9.
- [15] Özdamar Ö, Bohórquez J. Signal-to-noise ratio and frequency analysis of continuous loop averaging deconvolution (CLAD) of overlapping evoked potentials. *J Acoust Soc Am* 2006;119:429–38.
- [16] Jewett DL, Caplovitz G, Baird B, et al. The use of QSD (q-sequence deconvolution) to recover superposed, transient evoked-responses. *Clin Neurophysiol* 2004;115:2754–75.

- [17] Stevens J. NHSP Clinical Group. Guidelines for the early audiological assessment and management of babies referred from the newborn hearing screening program. NHSP Early Assessment Guideline vers 2.5; 2011.
- [18] Stockard JE, Stockard JJ, Westmoreland BF, Corfits JL. Brainstem auditory-evoked responses. Normal variation as a function of stimulus and subject characteristics. *Arch Neurol* 1979;36:823–31.
- [19] Burkard RF, Sims D. The human Auditory Brainstem Response to high click rates. Aging effects. *Am J Audiol* 2001;10:53–61.
- [20] Jiang ZD, Wu YY, Wilkinson AR. Age-related changes in BAER at different click rates from neonates to adults. *Acta Paediatr* 2009;98:1284–7.
- [21] Foundation for Statistical Computing, Austria: R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing; 2013. Available from: <https://www.R-project.org/>.
- [22] Robin X, Turck N, Hainard A, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinf* 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-12-77>.
- [23] Kim SE, Turkington K, Kushmerick C, Kim JH. Central dysmyelination reduces the temporal fidelity of synaptic transmission and the reliability of postsynaptic firing during high-frequency stimulation. *J Neurophysiol* 2013;110:1621–30.
- [24] Jiang ZD. Neural conduction abnormality in the brainstem and prevalence of the abnormality in late preterm infants with perinatal problems. *Eur J Pediatr* 2013;172:1033–8.
- [25] Santos MA, Munhoz MS, Peixoto MA, Silva CS. High click stimulus repetition rate in the auditory evoked potentials in multiple sclerosis patients with normal MRI. Does it improve diagnosis? *Rev Laryngol Otol Rhinol* 2004;125:151–5.