

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Pediatría



ADMINISTRACIÓN DE CALOSTRO OROFARÍNGEO A
RECIÉN NACIDOS PREMATUROS DE MUY BAJO PESO.
CONSECUENCIAS INMUNOLÓGICAS

Tesis doctoral presentada por Estefanía Martín Álvarez para optar al Grado
de Doctor en Medicina

Dirigida por los Doctores José Maldonado Lozano y Julio José Ochoa
Herrera

Granada 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Estefanía Martín Álvarez

ISBN: 978-84-9125-742-4

URI: <http://hdl.handle.net/10481/43398>

D. JULIO JOSÉ OCHOA HERRERA, Profesor Titular de la Universidad de Granada,

CERTIFICA:

Que Dña. Estefanía Martín Álvarez, licenciada en Medicina y especialista en Pediatría y sus Áreas Específicas, ha realizado bajo mi dirección y supervisión el trabajo de Tesis Doctoral titulado: “Administración de calostro orofaríngeo a recién nacidos prematuros de muy bajo peso. Consecuencias Inmunológicas”. La aportación más relevante de dicho trabajo es su contribución al conocimiento de los efectos de la administración de calostro orofaríngeo en recién nacidos prematuros, altamente susceptibles a infecciones y que presentan una situación de inmunodepresión transitoria secundaria a su propia prematuridad. La administración de calostro por esta vía podría favorecer el desarrollo del sistema inmune de estos recién nacidos a través de un aumento en la producción de inmunoglobulinas, factores inmunomoduladores (lactoferrina) y cambios en la señalización inflamatoria.

Dado que la presente memoria reúne las condiciones para ser defendida como Tesis Doctoral ante tribunal y, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmo el presente certificado en Granada, noviembre de 2015.



Fdo.: Julio José Ochoa Herrera

D. JOSÉ MALDONADO LOZANO, Profesor Titular de la Universidad de Granada,

CERTIFICA:

Que Dña. Estefanía Martín Álvarez, licenciada en Medicina y especialista en Pediatría y sus Áreas Específicas, ha realizado bajo mi dirección y supervisión el trabajo de Tesis Doctoral titulado: “Administración de calostro orofaríngeo a recién nacidos prematuros de muy bajo peso. Consecuencias Inmunológicas”. La aportación más relevante de dicho trabajo es su contribución al conocimiento de los efectos de la administración de calostro orofaríngeo en recién nacidos prematuros, altamente susceptibles a infecciones y que presentan una situación de inmunodepresión transitoria secundaria a su propia prematuridad. La administración de calostro por esta vía podría favorecer el desarrollo del sistema inmune de estos recién nacidos a través de un aumento en la producción de inmunoglobulinas, factores inmunomoduladores (lactoferrina) y cambios en la señalización inflamatoria.

Dado que la presente memoria reúne las condiciones para ser defendida como Tesis Doctoral ante tribunal y, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firmo el presente certificado en Granada, noviembre de 2015.



Fdo.: José Maldonado Lozano

*Piensa en grande y tus hechos crecerán,
piensa en pequeño y quedarás atrás,
piensa que puedes y podrás;
todo está en el estado mental.*

Rudyard Kipling

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar quiero agradecerle a mis directores su apoyo porque sin ellos no hubiese sido posible realizar este proyecto:

Al Profesor Dr José Malodonado Lozano por su dedicación, su sabios consejos y por animarme a seguir con esta tarea, a pesar del tiempo.

Al Profesor Dr Julio José Ochoa Herrera por su importante trabajao en el laboratorio, ayudarme con los aspectos metodológicos de esta Tesis y por sus sugerencias a la hora de darle forma a este trabajo.

Agradecerle a D. José Antonio Hurtado Suazo y a la Dra Manuela Peña Caballero toda la confianza que han tenido desde el principio en mí, sus horas de dedicación a este proyecto y su ilusión para afrontar cada día nuevos retos que nos lleven a mejorar el cuidado de nuestros pacientes. Gracias por ser un modelo a seguir y por vuestros eternos consejos.

A M^a Belén Sánchez Martínez y M^a Victoria Jiménez Cabanillas por su iniciativa e inestimable colaboración para implantar y desarrollar este proyecto. A todos mis compañeros de la Unidad de Neonatología del hospital Virgen de las Nieves que contribuyen a la realización de este proyecto. Gracias a su ayuda y sus ánimos ha sido posible realizar esta Tesis.

A Manuela Expósito Ruíz, por su inestimable ayuda en el análisis estadístico de los datos de este trabajo.

A mis padres y mi hermana, por inculcarme los valores de la constancia, el esfuerzo y ser un ejemplo cada día de dedicación y amor por tu trabajo; por tener siempre una palabra de ánimo para mí y no dejar que los agobios me impidieran seguir hacia delante.

Al resto de mi familia y mis amigos, por apoyarme y acompañarme durante estos últimos meses en los que el tiempo ha corrido más rápido de lo que hubiera querido muchas veces.

Para terminar, gracias a todas las madres y padres de los niños que han participado en este trabajo, por su generosidad e implicación.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Prematuridad. Definición. Epidemiología. Clasificación	1
1.2 Particularidades inmunológicas del recién nacido prematuro	4
• 1.2.1 Inmunidad innata en el recién nacido prematuro	4
• 1.2.2 Inmunidad adaptativa en el recién nacido prematuro	5
1.3 Patología infecciosa en el recién nacido prematuro. Sepsis neonatal	10
• 1.3.1 Infecciones de transmisión vertical	11
○ 1.3.1.1 Etiología	11
○ 1.3.1.2 Factores de riesgo	13
○ 1.3.1.3 Mortalidad	13
○ 1.3.1.4 Prevención	13
• 1.3.2 Infecciones nosocomiales o asociadas a la asistencia sanitaria	14
○ 1.3.2.1 Etiología	14
○ 1.3.2.2 Factores de riesgo	15
○ 1.3.2.3 Morbi-mortalidad	16
○ 1.3.2.4 Prevención	17
• 1.3.3 Mediadores Inflamatorios en la sepsis neonatal	18
○ 1.3.3.1 Interleuquina-1	18
○ 1.3.3.2 Interleuquina 6	19
○ 1.3.3.3 Interleuquina-8	20
○ 1.3.3.4 Interleuquina-10 y Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)	20
○ 1.3.3.5 Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF- α)	21
○ 1.3.3.6 Interferón- γ (INF- γ)	21
○ 1.3.3.7 Resistina	22
1.4 Patología digestiva relacionada con la prematuridad. Enterocolitis necrosante ...	22
• 1.4.1 Enterocolitis necrosante	25
○ 1.4.1.1 Factores etiopatogénicos	26
○ 1.4.1.2 Pronóstico	28
○ 1.4.1.3 Medidas preventivas	28

1.5 Lactancia materna. beneficios inmunológicos y nutricionales en el recién nacido prematuro	29
• 1.5.1 Fisiología de la lactancia	29
• 1.5.2 Composición de la leche materna	30
○ 1.5.2.1 Inmunoglobulinas	32
○ 1.5.2.2 Citoquinas	32
○ 1.5.2.3 Factores de crecimiento	33
○ 1.5.2.4 Lactoferrina	34
○ 1.5.2.5 Microbiota de la leche materna	35
○ 1.5.2.6 Hormonas	36
▪ 1.5.2.6.1 Leptina	36
▪ 1.5.2.6.2 Resistina	37
▪ 1.5.2.6.3 Adiponectina	38
▪ 1.5.2.6.4 Grelina	39
• 1.5.3 Lactancia materna y prevención de enfermedades en el recién nacido prematuro	39
• 1.5.4 Impacto de la congelación y la pasteurización sobre la leche materna.	39
1.6 Administración de calostro orofaríngeo	42
2. JUSTIFICACIÓN	46
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	48
4. METODOLOGÍA	50
4.1 Pacientes del estudio	51
• 4.1.1. Población	51
○ 4.1.1.1. Criterios de inclusión	51
○ 4.1.1.2. Criterios de exclusión	52
4.2 Diseño de los grupos e intervención	52
• 4.2.1 Selección de sujetos e información a los padres/representantes legales	52
• 4.2.2 Intervención	56

4.3 Variables analizadas	59
• 4.3.1 Variables independientes	59
• 2.3.2 Variables dependientes	60
4.4 Obtención y análisis de muestras	62
• 4.4.1 Obtención de las muestras de sangre y calostro	62
• 4.4.2 Análisis y procesamiento de las muestras	63
○ 4.4.2.1 Determinación de citoquinas en suero	64
▪ 4.4.2.1.1. Preparación de los controles de calidad	64
▪ 4.4.2.1.2 Preparación de las curvas estándar de las citoquinas estudiadas	64
▪ 4.4.2.1.3 Procedimiento de inmunoensayo	65
○ 4.4.2.2 Determinación de lactoferrina y resistina	67
○ 4.4.2.3 Determinación de Inmunoglobulina M	68
▪ 4.4.2.3.1 Preparación de los controles de calidad y curva patrón para IgM	69
▪ 4.4.2.3.2 Procedimiento de inmunoensayo	70
○ 4.4.2.4. Determinación de Inmunoglobulina A	71
▪ 4.4.2.4.1 Preparación de los reactivos y estándares de trabajo .	71
▪ 4.4.2.4.2 Procedimiento de ensayo	72
4.5 Análisis estadístico	73
5. RESULTADOS	75
5.1 Características perinatales de los recién nacidos prematuros	76
5.2 Evolución del peso durante el estudio	78
5.3 Evolución y tipo de nutrición enteral recibida durante el estudio	78
• 5.3.1 Volumen de nutrición enteral	78
• 5.3.2 Tiempo hasta alcanzar nutrición enteral completa	79
• 5.3.3 Tipo de nutrición enteral recibida	79
5.4 Morbilidad durante el tiempo de estudio	82
5.5 Determinación de los niveles de inmunoglobulinas en suero	84
• 5.5.1 Inmunoglobulina A	84
• 5.5.2 Inmunoglobulina M	86

5.6 Determinación de los niveles de lactoferrina en suero	88
5.7 Determinación de los niveles de resistina en suero	90
5.8 Determinación de los niveles de interleuquinas en suero	93
• 5.8.1 Interleuquina 1-Ra	93
• 5.8.2 Interleuquina 6	95
• 5.8.3 Interleuquina 8	97
• 5.8.4 Interleuquina 10	99
5.9 Determinación de los niveles de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)	101
5.10 Determinación de los niveles de interferón-gamma (INF- γ) en suero	103
5.11 Determinación de la concentración de inmunomarcadores en calostro	106
5.12 Valoración de la repercusión clínica de la administración de calostro orofaríngeo	107
• 5.12.1 Enterocolitis necrosante	107
○ 5.12.1.1 Valoración de la relación de los inmunomarcadores con la enterocolitis necrosante	108
• 5.12.2 Infección nosocomial (IAAS)	111
○ 5.12.2.1 Valoración de la relación de los inmunomarcadores con las infecciones nosocomiales	112
5.13. Valoración de la seguridad de la administración de calostro orofaríngeo	121
6. DISCUSIÓN	122
6.1 Efecto de la administración de calostro orofaríngeo sobre los niveles de inmunoglobulina A y M	123
6.2. Efectos de la administración de calostro orofaríngeo sobre los niveles de lactoferrina	126
6.3 Efectos de la administración de calostro orofaríngeo sobre los niveles de resistina y citoquinas pro y anti-inflamatorias	127
• 6.3.1 Interleuquina-1Ra	127
• 6.3.2 Interleuquina 6	129
• 6.3.3 Interleuquina 8	130
• 6.3.4 Interleuquina 10	131

• 6.3.5 Factor de Necrosis Tumoral- α	131
• 6.3.6 Interferón- γ	132
• 6.3.7 Resistina	136
6.4 Valoración de la concentración de inmunomarcadores en el calostro	133
6.5 Repercusión clínica de la administración de calostro orofaríngeo	134
• 6.5.1 Patología gastrointestinal. Enterocolitis necrosante	134
• 6.5.2 Infección nosocomial	136
7. CONCLUSIONES	140
8. BIBLIOGRAFÍA	143
9 ANEXOS	163

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Función de las citoquinas dentro del sistema inmune	8
Tabla 2. Evolución de la incidencia de las infecciones de transmisión vertical	11
Tabla 3. Etiología de la sepsis vertical. Datos obtenidos del Estudio del Grupo de Hospitales Castrillo (1996-2011)	12
Tabla 4. Etiología de la sepsis nosocomial en recién nacidos de muy bajo peso. Datos obtenidos del Grupo Castrillo (2006-2012)	15
Tabla 5. Ventajas inmunológicas de la leche materna	36
Tabla 6. Clasificación ecográfica de la hemorragia cerebral en el recién nacido.....	60
Tabla 7. Clasificación de lesiones en sustancia blanca en ecografía cerebral en el recién nacido	60
Tabla 8. Clasificación de estadios por estadios de enterocolitis necrosante (NEC) ...	61
Tabla 9. Condiciones del equipo Luminex 200® para la determinación de citoquinas. 66	
Tabla 10. Condiciones del equipo Luminex 200® para la determinación de lactoferrina y resistina.....	68
Tabla 11. Tabla de concentraciones recogida dentro de las indicaciones de la casa comercial para el MILLIPLEX® MAP Human Immunoglobulin Isotyping Magnetic Bead Panel 96 Well Plate Assay	70
Tabla 12. Condiciones del equipo Luminex 200® para la determinación de IgM.....	71
Tabla 13. Antecedentes prenatales de los participantes en el estudio.....	77
Tabla 14. Características neonatales de los recién nacidos participantes en el estudio .	77
Tabla 15. Descripción de las principales comorbilidades registradas durante el estudio	83
Tabla 16. Valores de IgA sérica registrados durante el estudio.....	85
Tabla 17. Valores de IgM sérica registrados durante el estudio	86

Tabla 18. Valores de lactoferrina sérica registrados durante el estudio	89
Tabla 19. Valores de resistina sérica registrados durante el estudio	91
Tabla 20. Valores de IL-1Ra sérico registrados durante el estudio	94
Tabla 21. Valores de IL-6 sérica registrados durante el estudio	96
Tabla 22. Valores de IL-8 sérica registrados durante el estudio	98
Tabla 23. Valores de IL-10 sérica registrados durante el estudio	100
Tabla 24. Valores de TNF- α sérico registrados durante el estudio	102
Tabla 25. Valores de INF- γ sérico registrados durante el estudio	103
Tabla 26. Valores séricos de los inmunomarcadores analizados durante el estudio ..	105
Tabla 27. Valores de inmunomarcadores en calostro recogido en las primeras 72 horas postparto	106
Tabla 28. Incidencia de enterocolitis necrosante durante el estudio	107
Tabla 29. Valores séricos de citoquinas registrados al mes de vida en los pacientes que desarrollaron enterocolitis necrosante y en los que no presentaron enterocolitis necrosante	108
Tabla 30. Valores séricos de inmunoglobulinas, resistina y lactoferrina registrados al mes de vida en los pacientes que desarrollaron enterocolitis necrosante y en los que no presentaron enterocolitis necrosante	108
Tabla 31. Incidencia de infección nosocomial a los 15 días de vida	111
Tabla 32. Incidencia de infección nosocomial a los 30 días de vida	112
Tabla 33. Valores séricos de citoquinas registrados en el 15° de vida en los pacientes diagnosticados de IASS y sepsis por bacilo gram-negativo y en los que no presentaron IAAS	112
Tabla 34. Valores séricos de resistina, lactoferrina e inmunoglobulinas registrados en el 15° de vida en los pacientes diagnosticados de IASS y sepsis por bacilo gram-negativo y en los que no presentaron IAAS	113

Tabla 35. Valores séricos de citoquinas registrados en el 30° de vida en los pacientes diagnosticados de IASS y en los que no presentaron IAAS 118

Tabla 36. Valores séricos de resistina, lactoferrina e inmunoglobulinas registrados en el 30° de vida en los pacientes diagnosticados de IASS y en los que no presentaron IAAS 118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Instrucciones para realización de masaje del pecho para mejorar la salida de la leche	53
Figura 2. Instrucciones para extracción manual de calostro	54
Figura 3. Sistema de extracción eléctrico mediante bomba de recolección doble...	55
Figura 4. Diagrama de flujo donde se muestran los participantes en el estudio.....	56
Figura 5. Recipiente estéril que se le entrega a la madre para recogida de calostro ...	57
Figura 6. Jeringas estériles cargadas con calostro, correctamente identificadas y datadas	57
Figura 7. Administración de calostro orofaríngeo a recién nacido portador de sonda nasogástrica y sistema de ventilación no invasiva nasal	58
Fig 8. Plan de trabajo del estudio	63
Figura 9. Esquema de las diluciones seriadas en el kit comercial EMD Millipore's MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine (HCYTOMAG-60k).	65
Figura 10. Esquema de las diluciones seriadas y concentraciones obtenidas en el kit MILLIPLEX® MAP HUMAN SEPSIS PANEL 3 MAGNETIC BEAD panel Kit 96-Well Plate Assay (HSP3MAG-63K)	67
Figura 11. Esquema de diluciones seriadas en la preparación de la curva patrón para el kit MILLIPLEX® MAP Human Immunoglobulin Isotyping Magnetic Bead Panel 96 Well Plate Assay	69
Figura 12. Esquema de diluciones seriadas en el ELISA-kit para cuantificación de IgA	71
Figura 13. Comparativa de los niveles séricos de citoquinas en relación con diagnóstico de enterocolitis necrosante a los 30 días de vida	109
Figura 14. Comparativa de los niveles séricos de resistina, lactoferrina, Inmunoglobulinas e Interferón- γ en relación con enterocolitis necrosante a los 30 días de vida	110

Figura 15. Comparativa de los niveles séricos de citoquinas en relación con diagnóstico de sepsis nosocomial 15 días de vida	114
Figura 16. Comparativa de los niveles séricos de lactoferrina, resistina, Inmunoglobulinas e Interferón - γ en relación con diagnóstico de sepsis nosocomial a los 15 días de vida	115
Figura 17. Comparativa de los niveles séricos de citoquinas en relación con diagnóstico sepsis por bacilo gram-negativo 15 días de vida	116
Figura 18. Comparativa de los niveles séricos de lactoferrina, resistina, Inmunoglobulinas e Interferón- γ en relación con diagnóstico de sepsis por bacilo gram-negativo 15 días de vida	117
Figura 19. Comparativa de los niveles séricos de citoquinas en relación con diagnóstico de infección nosocomial 30 días de vida	119
Figura 20. Comparativa de los niveles séricos de lactoferrina, resistina, Inmunoglobulinas e Interferón- γ en relación con diagnóstico de infección nosocomial a los 30 días de vida	120

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Evolución del peso de los pacientes durante el estudio	78
Gráfica 2. Evolución del volumen de nutrición enteral recibida durante el estudio..	79
Gráfica 3. Tipo de nutrición enteral recibida por los pacientes del estudio en el tercer día de vida	80
Gráfica 4. Tipo de nutrición enteral recibida por los pacientes del estudio en el 15° día de vida	81
Gráfica 5. Tipo de nutrición enteral recibida por los pacientes del estudio en el 30° día de vida	82
Gráfica 6. Evolución de los niveles séricos de IgA durante el estudio. Comparativa entre grupos	85
Gráfica 7. Evolución de los niveles séricos de IgM durante el estudio. Comparativa entre grupos	87
Gráfica 8. Evolución de los niveles séricos de lactoferrina durante el estudio. Comparativa entre grupos	89
Gráfica 9. Evolución de los niveles séricos de resistina durante el estudio. Comparativa entre grupos	92
Gráfica 10. Evolución de los niveles séricos de IL-1Ra durante el estudio. Comparativa entre grupos	94
Gráfica 11. Evolución de los niveles séricos de IL-6 durante el estudio. Comparativa entre grupos	96
Gráfica 12. Evolución de los niveles séricos de IL-8 durante el estudio. Comparativa entre grupos	98
Gráfica 13. Evolución de los niveles séricos de IL-10 durante el estudio. Comparativa entre grupos	100
Gráfica 14. Evolución de los niveles séricos de TNF- α durante el estudio. Comparativa entre grupos	102

Gráfica 15. Evolución de los niveles séricos de INF- γ durante el estudio. Comparativa entre grupos	104
---	-----

LISTADO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

BGN: bacilo gram-negativo	MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos
CDC: Centro para el control y prevención de enfermedades	α -MSH: hormona estimulante de los α -melanocitos
Células NK: células Natural Killer	NEC: enterocolitis necrosante
CMV: Citomegalovirus	NPY: neuropéptido Y
CPAP: presión positiva continua de la vía aérea	OMS: Organización Mundial de la Salud
CRIB: Clinical Risk Index for Babies	PCR: Proteína-C- reactiva
ddv: días de vida	PGI: péptido gastro-intestinal
E. coli: Escherichia Coli	PMN: polimorfonucleares
EGF: factor de crecimiento epidérmico	RNMBP: recién nacido de muy bajo peso
FiO ₂ : concentración parcial de oxígeno en aire inspirado	RNPT: recién nacido pretérmino
FP: fórmula de prematuros	SEN: Sociedad Española de Neonatología
HLA-DR: antígeno de superficie de leucocitos humanos	SG: semanas de gestación
HIV: hemorragia intraventricular	SGB: estreptococo β -hemolítico del grupo B.
HMI: Hospital Materno Infantil	SRIF síndrome de respuesta inflamatoria fetal
HPP: High Pressure Processing, procesamiento a alta presión	SRIS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
HTLV: virus Linfotrófico de Células T Humana	Th1: linfocitos T helper
IAAS: infecciones asociadas a la asistencia sanitaria	TGF- α : factor de crecimiento transformante alfa
IL: interleuquina	TGF- β : factor de crecimiento transformante beta
IL-Ra: antagonista del receptor de IL-1	TLAM: tejido linfoide asociado a mucosas
IgA: inmunoglobulina A	TLR4: receptores transmembrana tipo Toll 4
IgAs: inmunoglobulina A secretora	TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa
IgE: inmunoglobulina E.	UCIN: unidad de cuidados intensivos neonatales
IgG: inmunoglobulina G	UNICEF: United Nations International Children's Emergency Fund (Fondo Internacional de Emergencia de las Naciones Unidas para la Infancia)
IgM: inmunoglobulina M	VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
INF- γ : interferón gamma	
iNOS: forma inducible de óxido nítrico sintetasa	
ITU: infección de tracto urinario	
LD: leche humana donada	
LM: leche materna	
lpm: latido por minuto	
LPS: lipopolisacárido	
LPV: leucomalacia periventricular	
L-SAPE9: solución de estreptavidina-ficoeritrina	

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 PREMATURIDAD. DEFINICIÓN. EPIDEMIOLOGÍA. CLASIFICACIÓN

Los recién nacidos prematuros son aquellos neonatos nacidos antes de la 37 semana de edad gestacional, siendo la gestación una variable fisiológica fijada en 280 días, más menos 15 días. El término pretérmino no implica valoración de madurez, como lo hace prematuro, aunque en la práctica ambos términos se usan indistintamente.

Según los datos de la OMS (1) cada año nacen en el mundo unos 15 millones de niños prematuros, es decir aproximadamente 1 de cada 10 nacimientos. Estos niños tienen un elevado riesgo de mortalidad y morbilidad, relacionada con el peso y la edad gestacional. Más de un millón de estos recién nacidos mueren cada año por complicaciones en el parto. La prematuridad es la principal causa de mortalidad neonatal en el mundo (durante las primeras cuatro semanas de vida) y la segunda causa de muerte en los niños menores de cinco años, después de la neumonía.

La tasa de nacimientos prematuros está aumentando en todos los países de los que se disponen de datos fiables. En los países desarrollados, este incremento refleja no sólo un aumento de la incidencia, sino también los cambios en la práctica asistencial a estos neonatos, con avances de los cuidados obstétricos y neonatales, lo que permite la supervivencia de recién nacidos cada vez más inmaduros (1).

La situación en los países en desarrollo es muy diferente, con tasas de prematuridad, bajos pesos al nacimiento y mortalidad neonatal elevada, en relación con la patología nutricional e infecciosa de la población (2).

Según los datos de Instituto Nacional de Estadística, la incidencia de prematuridad en España se sitúa en torno al 7,4% de los nacimientos y ha ido aumentando en los últimos 20 años, principalmente en las edades próximas al término (5,84%, 6,84% y 7,4% en los años 1996, 2006 y 2010) (3).

Las enfermedades que pueden presentarse en estos neonatos difieren, según el grado de prematuridad, tanto en incidencia como en gravedad. Por ello se ha establecido una clasificación de la misma en función de la edad gestacional (1,2,4):

- Recién nacido prematuro extremo: $\leq 27 + 6$ semanas de gestación.
- Recién nacido muy prematuro: $28 + 0 - 31 + 6$ semanas de gestación.
- Recién nacido moderadamente prematuro: $32 + 0 - 36 + 6$ semanas de gestación. Dentro de este grupo quedaría incluida la categoría de prematuro tardío, que comprende únicamente las semanas $34+0$ a $36+6$.

La dificultad de conocer inequívocamente la edad gestacional, justificó el uso del peso al nacimiento como parámetro de referencia, estableciéndose las siguientes subcategorías (2,4):

- Recién nacido bajo peso al nacimiento: peso inferior a 2500g
- Recién nacido muy bajo peso al nacimiento: peso inferior a 1500g
- Recién nacido extremado bajo peso al nacimiento: peso inferior a 1000 g.

Actualmente, los recién nacidos de muy bajo peso (RNMBP) son los grandes consumidores de los recursos económicos y humanos en las Unidades Neonatales, ya que necesitan con frecuencia ingreso en cuidados intensivos, con estancias prolongadas, y requieren más recursos materiales, farmacológicos y humanos que los prematuros de mayor peso. El grupo de RNMBP representa el 1,5-2% de todos los recién nacidos, pero es el responsable de la mayor morbilidad y mortalidad en el período neonatal.

Según la base de datos SEN1500 (5), en el año 2013 se registraron 2628 RNMBP, de los cuales 925 fueron ≤ 1000 g. Los datos introducidos en esta red demuestran un aumento significativo en la supervivencia global, desde 78,5% en 2006 al 82,6% en 2012. Estos resultados se observan también si se analiza por peso y edad gestacional, de forma que cuando el peso al nacimiento es menor de 750 g la supervivencia ha pasado de un 39,9% en 2006 a 47,4% en 2012, y en menores de 27 semanas de gestación de 67,2% a 75,3% (6). La causa de muerte más frecuente en este grupo de pacientes es la patología respiratoria, seguida de la sepsis, patología neurológica y malformaciones.

La supervivencia y el mejor pronóstico a largo plazo de los recién nacidos prematuros están íntimamente relacionados con el peso, edad gestacional y muy condicionado por los acontecimientos adversos perinatales (hipoxia perinatal, malformaciones graves,

severidad del distrés respiratorio o necesidades de oxigenoterapia inmediata tras el parto (4,7). A su vez, estas patologías pueden condicionar el riesgo de muerte, que puede ser valorado mediante el índice de CRIB (Clinical Risk Index for Babies) (8).

El índice CRIB fue diseñado con el análisis retrospectivo de los registros de 812 prematuros de menos de 1500 g y con edad gestacional inferior a 31 semanas, sin malformaciones congénitas letales, admitidos en cuatro centros de referencia de tercer nivel del Reino Unido. Se integraron las variables con mayor valor predictivo: peso al nacimiento (dividido en cuatro categorías), edad gestacional (mayor o menor a 24 semanas) y la presencia o ausencia de malformaciones congénitas; además de los índices precoces de severidad de enfermedad: FiO₂ “apropiada” máxima y mínima para conseguir unos rangos de saturación adecuados, y el máximo exceso o déficit de base, en ambos casos, los valores fueron tomados dentro de las primeras doce horas de vida. La utilidad del CRIB en los recién nacidos menores de 1500g para predecir muerte hospitalaria y hemorragia intraventricular es similar a la del peso (9).

1.2 PARTICULARIDADES INMUNOLÓGICAS DEL RECIÉN NACIDO PREMATURO

El recién nacido prematuro de muy bajo peso (RNMBP) es un neonato inmunológicamente inmaduro que además presenta una alteración de las barreras naturales de defensa frente a infecciones, tales como infecciones de la piel y el tracto intestinal (10). El sistema inmune proviene de las células derivadas de las células precursoras del sistema hematopoyético. Durante la vida intrauterina, estas células son sometidas al efecto de un microambiente especializado, tal como médula ósea y timo, respondiendo a las señales de estimulación, proliferación y diferenciación, permitiendo el desarrollo del sistema inmune innato y el adaptativo (11).

1.2.1 Inmunidad innata en el recién nacido prematuro

El sistema inmune innato está constituido por barreras físico-químicas, además de mecanismos inespecíficos como son fagocitosis, inflamación, proteínas de fase aguda, sistema del complemento, células Natural Killer (NK) y células dendríticas (12). En la 5-6^o semana de gestación la inmunidad innata está representada por macrófagos en el hígado y en la sangre. A partir de la 9-10 semanas, se inicia la síntesis de complemento y se encuentran células NK en hígado. Los monocitos son funcionales en las últimas semanas de gestación.

Los componentes del sistema complemento son detectables desde el inicio de la gestación, pero sus niveles permanecen bajos hasta el tercer trimestre de esta (13). Las proteínas del complemento no son transferidas a través de la placenta, por lo que el feto debe fabricarlas por sí mismo (14). En el último periodo de la gestación, se produce un rápido incremento en la concentración de C3, alcanzándose el 60-80% de los valores presentes en un adulto.

La inmunidad innata tiene un papel principal durante los primeros días de vida del recién nacido mientras el sistema inmune adaptativo se va desarrollando a través de la interacción del medio con la superficie de las mucosas (10). Este sistema inmunitario innato, en los recién nacidos prematuros, presenta un desarrollo inmaduro que se refleja en una inadecuada eliminación extracelular de la infección bacteriana y en un reclutamiento anormal de células inmunitarias en el lugar en el que se produce la infección o inflamación (15), llegando a producir un daño en el tejido del huésped. El recién nacido presenta una reserva de neutrófilos limitada, con menor capacidad para aumentar la producción durante los periodos de rápido consumo como son la infección o los procesos inflamatorios (13).

El sistema de complemento del recién nacido proporciona una actividad opsonica limitada debido a que la actividad y los niveles de la vía alternativa del complemento no alcanzan el 50% de los valores del adulto y son inferiores cuanto menor es la edad gestacional (16). Los recién nacidos prematuros tienen niveles más bajos de las fracciones C3, C4 y CH50.

Esta primera respuesta inmune no crea una memoria frente al agente de forma que las respuestas sean más eficientes.

1.2.2 Inmunidad adaptativa en el recién nacido prematuro

La inmunidad adaptativa o adquirida presenta una respuesta más lenta a las agresiones que la inmunidad innata. Sin embargo, ofrece dos ventajas de las que carece esta última, como son el reconocimiento específico del antígeno y la memoria, que permite una rápida recuperación de la respuesta original a la exposición de dicho antígeno (17).

Esta inmunidad adaptativa se sustenta en dos pilares: inmunidad humoral e inmunidad celular. La inmunidad celular y humoral en el recién nacido son deficitarias, dependiendo estrechamente de la transferencia y normal funcionamiento del sistema inmunitario materno (13).

En el feto, a partir de la 10 semanas de gestación se pueden encontrar precursores de células B en el hígado y de linfocitos T en el timo. En las siguientes semanas aumenta el número de células B en el bazo, sangre y médula ósea; los linfocitos T aparecen en la sangre y el tejido linfoide. Entre las 20-30 semanas los linfocitos B secretan anticuerpos y en la inmunidad celular hay un incremento gradual de linfocitos T secretores de citoquinas (11).

La inmunidad humoral depende de la producción de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B y las células plasmáticas. Los linfocitos B productores de inmunoglobulinas no son completamente funcionales al nacimiento, lo que conlleva un retraso en la activación de estos linfocitos y por tanto, un retraso en la maduración de la producción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas (10). Este hecho implica un déficit temporal de la producción de Inmunoglobulina A secretora (IgAs).

La absorción intestinal de la IgA se ha descrito como un hecho excepcional en el recién nacido prematuro, de forma que la mucosa intestinal en estos pacientes es altamente vulnerable a microorganismos patógenos (10). La IgA protege a la mucosa intestinal del recién nacido frente a microorganismos externos. Durante la infección, la IgA inhibe la adhesión del patógeno a la mucosa, interfiere en la movilidad bacteriana y neutraliza productos tóxicos. Otro de los mecanismos por los que actúa es la eliminación de antígenos y virus intracelulares (18,19).

La inmunoglobulina G (IgG) es importante en el recién nacido para los mecanismos de opsonización y aglutinación. Esta inmunoglobulina se produce de forma tardía en la respuesta primaria al antígeno, mientras que se sintetiza rápidamente en una segunda exposición al mismo antígeno (13). La IgG se trasfiere de la madre al feto a través de la placenta durante las últimas semanas del embarazo (a partir de la semana 17), de forma que proteja al neonato tras el parto. Al nacimiento, los niveles séricos de IgG del niño son similares o discretamente más elevados que los niveles maternos, como resultado de la combinación de inmunoglobulinas adquiridas y producidas (17,20). Los niños que nacen pretérmino no pueden beneficiarse completamente de esta protección inmunológica y presentan un déficit de IgG en comparación con los niños nacidos a término.

Ballow y cols (21) comprobaron que los recién nacidos menores de 32 semanas de gestación presentaban concentraciones inferiores a 400 mg/dl al nacimiento, en comparación con los 1000 mg/dl que tenían los recién nacidos a término.

Las IgG transferidas desde la madre permiten una opsonización estable y adecuada para la mayoría de bacterias gram-positivo, pero no para los gram-negativo, lo que podría explicar la mayor frecuencia de infecciones por este grupo de microorganismos en esta edad. En general, los recién nacidos prematuros, presentan una baja actividad opsonica para todos los tipos de microorganismos (22).

El sistema inmune del recién nacido prematuro sí es capaz de producir normalmente Inmunoglobulina M en respuesta a los patógenos, pero no genera memoria inmunológica (13). Esta inmunoglobulina juega un papel importante en la defensa frente a microorganismos gram-negativos. Los niveles de IgM en el feto aumentan principalmente a partir de la semana 20 hasta la semana 30 de gestación. Posteriormente este incremento se ralentiza hasta que se produce el parto (23). La concentración de IgM en el recién nacido pretérmino es inferior a la del recién nacido a término, de manera que aumenta la predisposición a la infección por estos microorganismos. En el periodo postnatal, la concentración de IgM aumenta de forma rápida como respuesta a los estímulos antigénicos (12,24).

La inmunidad celular comprende la interacción de los linfocitos T citotóxicos y T helper con las diferentes células diana. Esta inmunidad no se trasfiere de la madre al feto, a diferencia de la inmunidad humoral. Por tanto, el recién nacidos depende exclusivamente de sus propias células T, además de los elementos del sistema inmune innato, para defenderse de las infecciones causadas por patógenos intracelulares, responder a la vacunación y rechazar tejidos extraños (17).

Las células inmunes producen diferentes productos que permiten la comunicación entre ellas y así orquestar la respuesta inmune apropiada frente al agente patógeno. Entre estos mediadores, podemos destacar las citoquinas. Las citoquinas son glicoproteínas con las siguientes propiedades: actúan como señales entre células y coordinan la respuesta inmune; pueden ser liberadas por las células a la circulación sistémica y actuar sobre células ubicadas en sitios distantes, o permanecer a nivel local (actuación de modo endocrino o paracrino); unión a los receptores de superficie con alta afinidad; pueden ser producidas por células no inmunes (fibroblastos, células endoteliales) (25).

En la Tabla 1 se recoge el papel dentro del sistema inmune de las principales citoquinas (13,26)

Tabla 1. Función de las citoquinas dentro del sistema inmune.

Citoquina	Células productoras	Función dentro de la respuesta inmune
IL-1	Macrófagos Otras células	Fiebre, induce otras citoquinas, estimulación células T Induce metaloproteinasas y prostaglandinas Incrementa la expresión de moléculas de adhesión
IL-2	Células T	Incrementa la proliferación de células T Activa células B
IL-4	Células T	Estimula la producción de IgE, IgG1 Disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias Suprime la hipersensibilidad retardada (células Th1)
IL-6	Células T y B Fibroblastos Monocitos, macrófagos Leucocitos PMN Células endoteliales Otras células	Estimula diferenciación de células B y activación de linfocitos T Estimula la producción de reactantes de fase aguda, inducción de la respuesta inflamatoria Induce al inhibidor natural de proteasa Inhibe la síntesis de TNF α por los macrófagos estimulados
IL-8	Células T Monocitos y Leucocitos PMN Fibroblastos, células endoteliales	Potente agente quimiotáctico para neutrófilos
IL-10	Células B y células T	Potente citoquina anti-inflamatoria Inhibe la estimulación de lipopolisacaridasa de neutrófilos Inhibe la producción de citoquinas inflamatorias producidas por macrófagos: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8
IL-12	Macrófagos	Incrementa la producción de INF- γ Diferenciación de linfocitos Th1
TNF-α	Células T Macrófagos	Estimula células T e induce a otras citoquinas Induce metaloproteinasas y prostaglandinas Incrementa la expresión de las moléculas de adhesión
INF-γ	Células T Células NK	Moléculas de adhesión, expresión HLA-DR Activación de células T, NK y macrófagos

La familia de la IL-1 comprende hasta 11 citoquinas, 7 agonistas pro-inflamatorios (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ) y 4 antagonistas con función anti-inflamatoria (IL-1R antagonista (IL-1Ra), IL-36R antagonista (IL-36Ra), IL-37, IL-38). IL-1Ra está producida habitualmente por las mismas células que expresan IL-1 α o IL-1 β , en particular monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células epiteliales. La acción anti-inflamatoria de la IL-1Ra se basa en su actividad como antagonista competitivo a nivel del receptor de membrana celular IL-1R1 (27), es decir, se une a este receptor, pero no traduce la señal intracelular.

La concentración de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-1, la IL6, el TNF- α , INF- β e INF- γ es comparable al adulto y aumenta de forma similar durante la sepsis (28). Sin embargo, en el recién nacido prematuro la producción de citoquinas está reducida. Los niveles de IL-1 son normales, mientras que los de IL-2 e IL-6 están discretamente disminuidos y los niveles de IL-4, IL-8, IL-10, IL-12 e INF- γ son bajos (29).

Esta reducción de citoquinas tiene un efecto a diferentes niveles, provoca una alteración de la inmunidad celular y humoral, en la producción de inmunoglobulinas, así como en la respuesta innata. La IL-4 es necesaria para la diferenciación de las células B y producción de anticuerpos. El descenso de IL-6 se reflejaría en un descenso de IgAs (30) ya que esta interleucina es una de los principales estímulos para la diferenciación de células B y producción de inmunoglobulinas (incluida la IgAs). Los bajos niveles de IL-8 observados en los recién nacidos prematuros reducen su capacidad para localizar la infección, ya que la IL-8 tiene un papel importante en la movilización de los neutrófilos, en su activación y quimiotaxis (31).

El recién nacido prematuro precisa de numerosos procedimientos invasivos (cateterismos vasculares, intubación endotraqueal, alimentación parenteral, etc) asociados a la asistencia sanitaria, la posibilidad de adquirir una infección es alta, a lo que se añade una respuesta limitada que compromete su pronóstico (2,32). La sepsis nosocomial y la enterocolitis necrosante (NEC) son en la actualidad dos de las patologías que puede sufrir un neonato prematuro durante los primeros días de hospitalización postnatal. Están asociadas a una mayor morbilidad y mortalidad en este grupo de pacientes debido a la gravedad y complejidad de estos procesos (33,34).

La inmadurez del sistema inmunológico descrita explica la incapacidad de limitar la infección a un territorio orgánico de forma que la infección neonatal se considera sinónimo de sepsis, con focos secundarios que comprometen gravemente el pronóstico.

En la enterocolitis necrosante, la respuesta inflamatoria desproporcionada frente a una agresión se ha propuesto, también, como uno de los posibles factores etiopatogénicos (35).

1.3 PATOLOGÍA INFECCIOSA EN EL RECIÉN NACIDO PREMATURO. SEPSIS NEONATAL

Se define como sepsis neonatal aquella situación clínica derivada de la invasión y proliferación de bacterias, hongos o virus en el torrente sanguíneo del recién nacido. La activación del sistema inmunitario provoca la situación clínica conocida como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y consiste en la presencia de una serie de signos y síntomas clínicos de infección (distrés respiratorio, taquicardia, bradicardia, hipotensión, irritabilidad, hipotonía, mala tolerancia digestiva, distensión abdominal, alteraciones en la coloración, etc (36) junto con alteraciones analíticas (marcadores biológicos de infección: recuento leucocitario alterado según los criterios de Manroe et al (37), PCR > 12 mg/l). Por tanto, la sepsis se define como la presencia de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica con evidencia de infección (hemocultivo positivo) (34).

El concepto sepsis probable o sepsis clínica, hace referencia a la existencia de datos clínicos, parámetros biológicos y antecedentes compatibles con sepsis, pero con hemocultivo negativo.

En función del mecanismo de transmisión de los microorganismos, se diferencia entre:

- Sepsis de transmisión vertical, producidas por microorganismos del canal genital materno y contaminan al feto por vía ascendente (progresan por el canal del parto hasta alcanzar el líquido amniótico) o por contacto directo del feto con secreciones contaminadas al pasar por el canal del parto.
- Sepsis de transmisión nosocomial (también conocidas como sepsis relacionadas con la atención sanitaria), producidas por microorganismos presentes en el entorno hospitalario y que toman contacto con el niño a través de las manos del personal sanitario o a través del material que se usa en el diagnóstico o tratamiento (catéteres, sueros, sondas, electrodos, tubos endotraqueales, etc).
- Sepsis comunitarias, ocasionadas por microorganismos que contaminan al recién nacido en el ambiente extrahospitalario, suelen ser de origen urinario (38).

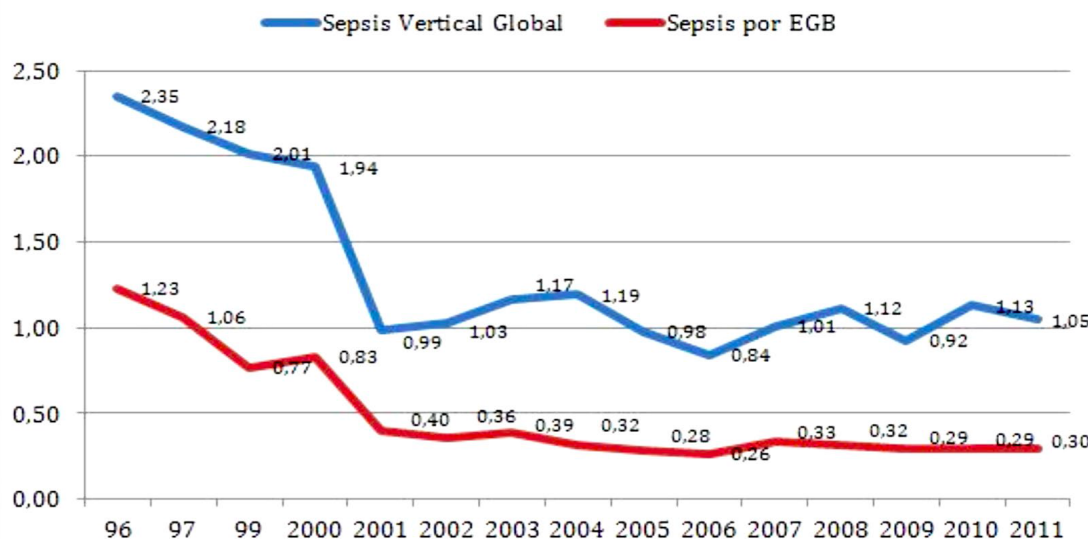
Siguiendo un criterio cronológico, se ha clasificado a las sepsis verticales como sepsis de inicio precoz, ya que suelen iniciarse en los primeros tres días de vida. No obstante, en algunas sepsis de transmisión vertical, los síntomas aparecen después de los tres primeros días. A su vez, hay sepsis nosocomiales que pueden iniciarse en los primeros días de vida y son erróneamente clasificadas como de transmisión vertical (39).

1.3.1 Infecciones de transmisión vertical

1.3.1.1 Etiología

En España la epidemiología de las sepsis de transmisión vertical es estudiada anualmente por el Grupo de hospitales Castrillo desde el año 1996, incluyendo a casi un millón y medio de recién nacidos. Durante estos años se ha producido una reducción significativa de la incidencia, pasando del 2,3% en el año 1996 al 1,13% en el año 2011. Este descenso se ha relacionado con la aplicación de las recomendaciones para la prevención de la infección perinatal del *Estreptococo* β -hemolítico del grupo B (SGB). Según el peso al nacimiento, este grupo de infecciones son más frecuentes dentro del grupo de menores de 1500g con respecto a los de peso superior (18% vs 1%) (40)

Tabla 2. Evolución de la incidencia de las infecciones de transmisión vertical



Evolución de la incidencia de sepsis de transmisión vertical global (línea azul) y sepsis vertical por SGB (línea roja) expresado como número de casos por 1000 recién nacidos vivos. Datos obtenidos con el permiso del Grupo Castrillo.

La etiología de las sepsis verticales es fundamentalmente bacteriana, ya que la infección por hongos y virus supone menos del 1% de los casos.

Dentro de las de origen bacteriano, los grupos más frecuentemente relacionados son el *Estreptococo agalactiae* de grupo B (SGB) y *Escherichia Coli* (*E. coli*). Según el peso al nacimiento, el SGB es más frecuente en niños con peso superior a 1500 g y *E.coli* en los menores de 1500g. Otras bacterias más infrecuentes son: *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Klesiella spp*, *Haemophilus influenzae* y *Enterobacter spp* (40).

Tabla 3. Etiología de la sepsis vertical. Datos obtenidos del Estudio del Grupo de Hospitales Castrillo (1996-2011)

GERMEN	RN ≤1500		RN > 1500		RN Totales	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Gram-Positivo	174	41,33	1011	72,53	1185	65,29
- <i>Estreptococo B agalactie</i>	72	17,34	590	42,32	663	36,53
- <i>Enterococo</i>	29	6,89	125	8,97	154	8,48
- <i>Estafilococo aureus</i>	8	1,90	44	3,16	52	2,87
- <i>Stafilococo coagulasa negativo</i>	12	2,85	65	4,66	77	4,24
- <i>Listeria Monocytogenes</i>	31	7,36	77	5,52	108	5,95
- Otros <i>Estreptococos</i>	11	2,61	65	4,66	76	4,19
Gram-Negativos	234	55,58	378	27,12	612	33,72
- <i>E. coli</i>	166	39,43	277	19,87	443	24,41
- <i>Klebsiella</i>	25	5,94	32	2,30	57	3,14
- <i>Enterobacter</i>	5	1,19	23	1,65	28	1,54
- <i>Haemophilus</i>	12	2,85	8	0,57	20	1,10
- <i>Morganella Morganii</i>	10	2,38	4	0,29	14	0,77
- <i>Pseudomonas</i>	6	1,43	6	0,43	12	0,66
- <i>Acinetobacter</i>	2	0,48	7	0,50	9	0,50
- <i>Proteus</i>	3	0,71	4	0,29	7	0,39
- <i>Serratia</i>	0	0,00	5	0,36	5	0,28
- Otros Gram-negativos	5	1,19	12	0,86	17	0,94
Cándida spp	12	2,85	5	0,36	17	0,94
Ureaplasma	1	0,24	0	0,00	1	0,06

1.3.1.2 Factores de riesgo

La clínica en ocasiones puede ser inespecífica, de forma que la sospecha diagnóstica debe establecerse en función de la presencia de una serie de factores de riesgo (41):

- Presencia de bacterias patógenas en canal genital materno: resultado del frotis vagino-rectal a la madre.
- Circunstancias relacionadas con presencia de estas bacterias:
 - Parto prematuro espontáneo.
 - Rotura prematura y/o prolongada de membranas (más de 18 horas antes del parto).
 - Corioamnionitis: según los datos del Grupo Castrillo, el 15,8% de la sepsis verticales presentaban este antecedente, 27,8% entre los prematuros, siendo los microorganismos más frecuentemente asociados *E. coli* (38,1%), SGB (18,2%) y *Listeria monocytogenes* (15,45%).
 - Antecedente de bacteriuria materna por SGB durante la gestación.
 - Diagnóstico previo de un hermano con sepsis por SGB

1.3.1.3 Mortalidad

La mortalidad por sepsis vertical oscila entre 8-11%, variando en función del peso al nacimiento (>30% en RNMBP) y etiología, siendo el 8% para SGB y 18% para *E. coli* (42)

1.3.1.4 Prevención

La única intervención que ha demostrado disminuir al incidencia de la sepsis de transmisión vertical es la administración intravenosa profiláctica de antibioterapia intraparto a la madre para la prevención de la infección perinatal por SGB.

En el año 1996 el Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) publicó las primeras recomendaciones para aplicar esta estrategia preventiva. En nuestro país se recomendó y se difundió a partir de 1998, realizándose posteriormente diversas actualizaciones (la última en 2012) (41).

La profilaxis estará indicada ante la presencia de: SGB en frotis vagino-rectal realizado hasta 5 semanas antes del parto; SGB en orina materna durante la gestación; antecedentes de un hijo anterior con infección por SGB; si se desconoce el estado de portadora pero se trata de un parto de riesgo (parto prematuro, fiebre intraparto o rotura prolongada de membranas).

1.3.2 Infecciones nosocomiales o asociadas a la asistencia sanitaria

1.3.2.1 Etiología

Las sepsis nosocomiales son una complicación frecuente en los recién nacidos de muy bajo peso, con una relación inversamente proporcional con la edad gestacional y el peso.

La incidencia, expresada en relación al número de niños ingresados, en los recién nacidos de muy bajo peso suele ser superior al 20%, situándose en torno al 1,16% (según datos del Grupo Castrillo) en los de mayores de 1500g. En los recién nacidos con peso inferior a 1500g se recoge una incidencia del 29,7% y del 40% en los menores de 1000g. La densidad de incidencia, según este registro, es de 12,2 episodios de sepsis por 1000 días de estancia en la unidad de cuidados intensivos neonatales, 5,1 por cada 1000 días de ingreso. Estos episodios son habitualmente episodios únicos que suelen ocurrir en la segunda o tercera semana de vida (43), pero hasta en un 20% de los casos, un mismo niño puede presentar dos o más episodios de sepsis nosocomial.

El grupo SEN1500, en su estudio de Sepsis Tardía/Sepsis Nosocomial durante los años 2002-2010, comunica una incidencia discretamente superior al Grupo de Hospitales Castrillo, con un incidencia global del 31,8% en el grupo de pacientes menor de 1500g (44).

En los RNMBP existe un predominio de los microorganismos gram-positivos (62,8%) y, entre ellos, destaca la participación de los estafilococos coagulasa negativos, especialmente el *S epidermidis* (53,2%). Las bacterias gram-negativas representan un 29%, principalmente *Klebsiella*. Los hongos, *Cándida* spp son el tercer microorganismo más frecuente (7,8%) Tabla 4.

Tabla 4. Etiología de la sepsis nosocomial en recién nacidos de muy bajo peso. Datos obtenidos del Grupo Castrillo (2006-2012)

MICROORGANISMO	AÑOS 2006-12 (N=4009)	
	Casos	Porcentaje
Gram-positivos	2518	62,8
- <i>S. epidermidis</i>	1884	47
- Otros estafilococos coagulasa negativos	249	6,2
- Enterococo	230	5,7
- <i>S. Aureus</i> *	121	3,0
- Otros Gram positivo	34	0,8
Gram-negativos	1177	29,3
- <i>Klebsiella</i> **	445	11,1
- <i>Enterobacter</i>	217	5,4
- <i>E. coli</i>	180	4,5
- <i>Serratia</i>	162	4,0
- <i>Pseudomonas</i>	104	2,6
- Otros gram negativo	69	1,7
Hongos	314	7,8
- <i>Cándida spp</i>	312	7,8
- <i>Malassezia furfur</i>	2	0,05

* 13 *S. aureus* metilicilin resistentes. ** 55 *K pneumoniae* BLEE

1.3.2.2 Factores de riesgo

Entre los factores de riesgo que favorecen su aparición encontramos (45):

- La deficiente higiene de manos es el factor de riesgo más importante en estos niños.
- Prematuridad y bajo peso al nacimiento.
- Utilización de antibióticos que favorece el desarrollo de bacterias multirresistentes y de hongos, sobre todo *Cándida spp*.
- El uso de tubos endotraqueales, válvulas de derivación, sondas vesicales.

- Estancia prolongada en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales, aumentado el tiempo de exposición.
- Personal sanitario insuficiente y altas tasas de ocupación, que dificultan seguir los protocolos de asepsia en el manejo y cuidado de estos recién nacidos.
- Uso de catéteres intravasculares. La falta de asepsia estricta en la colocación, mantenimiento y manejo de estos catéteres es uno de los principales factores de riesgo de sepsis nosocomial.
- Empleo de corticoides (inmunosupresores) y el uso de antagonistas H2 (relacionados con la pérdida de la barrera ácida gástrica y alteración de la microbiota gastrointestinal).
- La cirugía, sobre todo abdominal, es el factor de riesgo más frecuente en niños mayores de 1500 g de peso.

1.3.2.3 Morbi-mortalidad

La sepsis puede provocar complicaciones tanto a corto como a medio plazo en los recién nacidos prematuros:

- Corto plazo: la sepsis incrementa el riesgo de ductus arterioso persistente, ventilación prolongada, necesidad de acceso intravascular prolongado, displasia broncopulmonar, enterocolitis necrosante y mayor tiempo de estancia hospitalaria. Los microorganismos gram-negativos, comparados con los gram-positivos, se asocian a una mayor estancia hospitalaria y mayores costes sanitarios (46).
- Largo plazo: la sepsis es un factor de riesgo de déficit en el neurodesarrollo a largo plazo. Los niños con un episodio de sepsis neonatal tienen tasas mayores de parálisis cerebral, déficit visual y peores puntuaciones en los test de neurodesarrollo (Test Bayley) a los 18 y 22 meses de edad corregida (47).

La mortalidad global por sepsis nosocomial se sitúa en torno al 12,6% según los datos del Grupo Castrillo, siendo la responsable de más del 50% de los fallecimientos que tienen lugar a partir de la primera semana de vida. Estratificando según la etiología, en el grupo de gram-negativos la mortalidad asciende al 20,1%, seguida del 19,7% en los hongos, ocupando los gram positivos el tercer lugar con 3,7%. Los microorganismos gram-negativos fueron responsables del 60,2% de los éxitos por infección nosocomial (43).

1.3.2.4 Prevención

Las estrategias de prevención de la infección nosocomial están encaminadas a minimizar la incidencia de sepsis nosocomial en la Unidad de Cuidados Intensivos neonatales. A modo de resumen, podemos destacar (48,49):

- Medidas clásicas de control de la infección:
 - Nutrición enteral precoz.
 - Utilización de leche materna: cantidades superiores a 50 ml/kg/día.
 - Higiene rigurosa de manos: lavado de manos y uso de solución de base alcohólica.
 - Protocolos de seguimiento en la colocación y manejo de catéteres, procurando retirarlos lo antes posible.
 - Uso de filtros para perfusiones intravenosas.
 - Restringir el uso de la antibioterapia de amplio espectro. Evitar el uso empírico de cefalosporinas de 3ª generación.
 - Restringir el uso de antagonistas H2 y corticoides.
 - Adecuado ratio de personal-paciente.

- Nuevas estrategias preventivas:
 - Probióticos: pueden tener un efecto preventivo de la infección bacteriana y de la enterocolitis necrotizante.
 - Lactoferrina: glicoproteína con propiedades antiinfecciosa presente en la leche materna y en la leche bovina. Se ha asociado con la prevención de la infección fúngica y bacteriana (50).

- Profilaxis antifúngica:
 - Fluconazol: dosis de 3 mg/kg cada 2-3 días durante 4-6 semanas se ha demostrado eficaz para prevenir la colonización y la infección fúngica invasora en RNMBP (51,52)
 - Nistatina: puede ser una alternativa al fluconazol en la profilaxis antifúngica neonatal, pero son necesarios más estudios (53).

1.3.3 Mediadores Inflamatorios en la sepsis neonatal

Las citoquinas se elevan en el suero de pacientes con sepsis y sepsis grave comparado con pacientes no sépticos (54). En los últimos años diferentes trabajos han apoyado el uso de las citoquinas en el diagnóstico de la sepsis neonatal. En un principio se pensaba que la sepsis estaba asociada con una respuesta exacerbada de las citoquinas proinflamatorias, principalmente, como la IL-1 β , IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interferón- γ (INF- γ) (55). Sin embargo, recientes estudios han evidenciado que en los mecanismos que subyacen en la sepsis, participan tanto citoquinas pro-inflamatorias como anti-inflamatorias, entre las que se incluyen la IL-10, factor de crecimiento transformante β (TGF- β), IL-1Ra e IL-4, de forma que se consiga una respuesta inmunológica equilibrada (56,57).

1.3.3.1 Interleuquina-1

La IL-1 (IL-1 β e IL-1- α) es una citoquina pro-inflamatoria que aumenta tras la activación de los macrófagos, al igual que el TNF- α . En la cascada inflamatoria, estas dos citoquinas inducen la producción de IL-6 por parte de las células endoteliales. Agentes infecciosos (endotoxinas bacterianas, virus, hongos y antígenos de parásitos) y la fracción C5a del complemento pueden inducir su producción en una hora, alcanzando niveles pico en 5-10 horas (58). Durante la sepsis, la IL-1 parece que induce la fiebre, coagulación y hematopoyesis, favoreciendo la extravasación de células inflamatorias. Se ha descrito como un marcador de sepsis neonatal, aunque su eficacia es menor que la de la IL-6 y el TNF- α (59), probablemente debido a su corta vida media.

La IL-1Ra es el antagonista natural del receptor de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β . A nivel experimental se ha comprobado que alcanza su pico de concentración 2-4 h después de la administración de endotoxinas o IL-1 β y permanece elevado más de 24 h (60). Los niveles séricos de IL-1Ra se elevan drásticamente en diversas patologías como el síndrome de distrés respiratorio agudo grave, sepsis, poliartritis crónica o enfermedad de Crohn's (27). comportándose como un reactante de fase aguda en estos procesos inflamatorios. Diversas citoquinas, entre ellas la IL-1 β , IL-6 y el TNF- α , estimulan la producción de estos reactantes de fase aguda a nivel hepático (61).

En el periodo neonatal, los recién nacidos de diferentes edades gestacionales con sepsis o enfermedades neonatales graves (distrés respiratorio, asfixia) presentan niveles elevados de IL-Ra (62,63). En estudios en recién nacidos prematuros con sepsis provada, se ha encontrado un aumento de esta interleuquina con respecto a niños sanos,

con una mayor vida media que la IL-6, por lo que podría ser de utilidad en el diagnóstico precoz de la sepsis (64). La sepsis neonatal precoz se ha asociado en recién nacidos menores de 37 semanas de gestación con niveles elevados de IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF- α e IL-1 β en plasma de cordón umbilical (65).

1.3.3.2 Interleuquina 6

La IL-6 es la citoquina más estudiada en la población neonatal. Muestra una rápida respuesta a la infección, precediendo al incremento de la Proteína-C- reactiva (PCR). La IL-6 es un marcador temprano en el diagnóstico de la sepsis neonatal. Su medición, junto con la determinación de PCR puede alcanzar una sensibilidad del 100% en el diagnóstico precoz. No obstante, no se considera el marcador “gold standard” en el diagnóstico de la sepsis neonatal debido a su vida media muy corta, aproximadamente 100 min (66). Además los niveles circulantes descienden hasta cifras basales tras 24 horas de tratamiento adecuado de la infección. Diversos estudios han registrado un descenso de la sensibilidad en el diagnóstico cuando se utiliza este test a partir de las 24-48 horas del inicio de los síntomas (67,68).

La IL-6 se ha relacionado con corioamnionitis materna y el parto pretérmino, de forma que niveles elevados de IL-6 en el líquido amniótico durante el segundo y tercer trimestre de gestación se han asociado con un incremento del riesgo de parto prematuro espontáneo (antes de la 32 semanas), corioamnionitis aguda y funisitis (69). El síndrome de respuesta inflamatoria fetal (SRIF) consiste en la activación del sistema inmune innato del feto como complicación de la amenaza de parto prematuro, con o sin rotura prematura de membranas y se define como niveles de IL-6 $>6-11$ pg/ml en muestras de plasma fetal obtenido por cordocentesis. El SRIF supone un mayor riesgo morbilidad neonatal, una vez ajustada por edad gestacional, y supone un mayor riesgo de parto espontáneo en los casos de rotura prematura de membranas (70).

Recientemente, se ha publicado una revisión sobre la respuesta de IL-6 en el periodo fetal y neonatal precoz (71). En este trabajo se recogen otras causas no infecciosas de elevación de la IL-6 en cordón umbilical y en líquido cefalorraquídeo, como son la asfixia perinatal o el trabajo de parto prolongado.

1.3.3.3 Interleuquina-8

La IL-8 pertenece al grupo de citoquinas pro-inflamatorias y está producida por las células de la placenta y los monocitos/macrófagos fetales. A menudo se produce tras un proceso infeccioso originado en el útero (71).

Esta citoquina sigue un curso similar a la IL-6, por lo que podría ser útil en el diagnóstico precoz de la sepsis en neonatos, previa al tratamiento (72). Los niveles de IL-8 se incrementan aproximadamente a los 90 minutos de la infección y alcanzan su pico a las 2 horas en las sepsis neonatales, mientras que los niveles disminuyen progresivamente a las 48 horas (73).

La edad gestacional tiene un efecto limitado en la concentración de IL-8 en sangre de cordón, de forma que sólo los prematuros menores de 32 semanas de gestación presentan un incremento de IL-8 debido a su edad gestacional (74).

Los estudios publicados, como se ha mencionado previamente, demuestran la dificultad a la hora de realizar el diagnóstico o exclusión de la sepsis neonatal utilizando un solo biomarcador. Sin embargo, la combinación de varios de ellos sí se plantea como un buen test de diagnóstico precoz para la sepsis neonatal (PCR >10mg/l, TNF- α >30 pg/ml o IL-6 >30 pg/ml) (75). A su vez estos biomarcadores aportan información sobre el pronóstico de la enfermedad y podrían ayudar a la hora de decidir continuar o terminar un tratamiento antibiótico, ya que según el estudio publicado por Kurt y cols (76), los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α disminuyen significativamente en los recién nacidos después de 7 días de tratamiento antibiótico con respecto a los valores obtenidos en el momento del diagnóstico.

1.3.3.4 Interleuquina-10 y Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

La IL-10 y el TGF- β forman parte del grupo de citoquinas anti-inflamatorias que previenen una respuesta inflamatoria excesiva durante la sepsis. Estas citoquinas suprimen la producción de mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1, IL-6, INF- γ en las células del sistema inmune (77). Niveles altos de IL-10 y del cociente IL-10/TNF- α se han asociado con sepsis neonatal tardía grave (78), pero no necesariamente indican peor pronóstico. Estudios en pacientes adultos con sepsis grave sí se ha relacionado con un aumento de la mortalidad (79).

El TGF- β tiene un papel importante en el proceso de reparación tisular y fibrosis, además de en la inmunosupresión inducida por la sepsis. Diferentes estudios han evaluado el efecto protector del TGF- β en adultos, de forma que podría revertir la depresión de los miocitos cardiacos provocada por el TNF- α y la IL-1 en los pacientes con shock séptico (80).

1.3.3.5 Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF- α)

El aumento del TNF- α ocurre en torno a 30 minutos después de la toma de contacto con el antígeno, alcanzándose los niveles pico circulantes en 1 hora y media aproximadamente, con una vida media estimada de 70 minutos (81).

TNF- α es el principal mediador del shock séptico en neonatos y del daño tisular extendido. El aumento de este mediador causa vasodilatación y aumenta la permeabilidad vascular, facilitando la aparición de edema tisular, con descenso del volumen sanguíneo circulante e hipoproteinemia (82). Se ha relacionado también con el desarrollo de coagulación vascular diseminada y posterior fallo multiorgánico que conduciría a la muerte neonatal precoz (83).

El TNF- α , pertenece al grupo de las citoquinas pirogénicas. Sinérgicamente con la IL-1 amplifica la señal inflamatoria, activando la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6 y la IL-8, además de la estimular la producción de radicales libres, dando lugar a la disfunción orgánica secundaria a la sepsis.

Se ha propuesto su papel como marcador predictor de la sepsis neonatal precoz. Sin embargo existen discrepancias en cuanto a su uso, ya que hay estudios en los que no se ha demostrado una diferencia significativa entre neonatos sanos y enfermos, presentando una baja sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de sepsis en los recién nacidos infectados (84,85).

1.3.3.6 Interferón- γ (INF- γ)

Las células NK producen y a la vez son el objetivo del INF- γ durante la infección. Tiene una función importante tanto en la inmunidad innata como en la respuesta

adaptativa, ya que induce la producción de TNF- α e IL-12 por parte de los fagocitos monucleares (86).

El papel del INF- γ como marcador precoz de sepsis neonatal aún no ha sido ampliamente estudiado. Los recién nacidos prematuros presentan un descenso en la producción de INF- γ por parte de las células NK, debido en parte a la regulación epigenética de la expresión del gen INF- γ , así como a un descenso en la producción de IL-12 e IL-8 por parte de las células presentadoras de antígenos (87).

La terapia con INF- γ reduce la incidencia de infección grave en niños con enfermedad granulomatosa crónica. En recién nacidos prematuros, Tissières y cols (88) propusieron en 2012 trabajo el tratamiento ex vivo de leucocitos del prematuro con INF- γ para revertir el déficit de la respuesta inmune innata frente a bacterias.

1.3.3.7 Resistina

La resistina, es una hormona relacionada con el metabolismo energético, implicada en la adipogénesis y en el desarrollo de la resistencia a insulina. Estudios en adultos han documentado que la resistina es expresada y secretada por los macrófagos y neutrófilos en presencia de una infección bacteriana aguda (89,90). En recién nacidos prematuros con sepsis, los datos de resistina son limitados. Se sugiere que podría tener un valor similar al de la IL-6 en el diagnóstico precoz (91). La producción de resistina por las células mononucleares se ve incrementada por la acción de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- α y por el lipopolisacárido. A su vez, la resistina estimula la síntesis de IL-1, IL-6, IL-12.

1.4 PATOLOGÍA DIGESTIVA RELACIONADA CON LA PREMATURIDAD. ENTEROCOLITIS NECROSANTE

El nacimiento prematuro conlleva una insuficiente maduración de la succión y de la coordinación succión-deglución, que no se completa hasta la 33-34 semanas. Esto condiciona que estos niños tengan dificultad para alimentarse por boca, siendo necesario el uso de una sonda oro/nasogástrica para su correcta alimentación.

La mala tolerancia digestiva es uno de los problemas frecuentes del recién nacido prematuro, ya que presentan una capacidad gástrica pequeña (directamente relacionada con la edad gestacional), así como una evacuación gástrica e intestinal enlentecida. Sin embargo, es fundamental optimizar un correcto aporte nutricional que permita lograr una velocidad de crecimiento posnatal similar a la de los fetos de la misma edad gestacional.

En 1985 el Comité de Nutrición de la Academia Americana de Pediatría (92) estableció cuáles deberían ser los objetivos en la práctica nutricional del recién nacido prematuro:

- *Crecimiento y retención de nutrientes a corto plazo:* acercarse a las curvas de crecimiento intrauterino y a la composición fetal de referencia.
- *Morbilidad neonatal:* mejorar la tolerancia alimentaria, reducir la enterocolitis necrosante (NEC) y minimizar las infecciones nosocomiales.
- *Evolución a largo plazo:* lograr un desarrollo psicomotor óptimo, reducir los índices de atopia y alergia y reducir el posible impacto en las enfermedades del adulto como hipertensión, enfermedades cardíacas e hipercolesterolemia.

En resumen: La nutrición ideal del prematuro es la que consigue un crecimiento equiparable a los niveles intrauterinos sin someter a un estrés a sus inmaduras funciones metabólicas y excretoras.

El manejo nutricional del recién nacido pretérmino afecta a su morbilidad a corto, medio y largo plazo (93,94). Se han propuesto estrategias de nutrición precoz que pretenden evitar el estado catabólico que se produce en los primeros días de vida para minimizar así la interrupción de nutrientes que ocurre tras el parto y reducir la ralentización del crecimiento y desarrollo que tiene lugar después del parto prematuro. La ausencia de alimento en el tracto gastrointestinal produce la atrofia de la mucosa y vellosidades intestinales, reduciendo las enzimas necesarias para la digestión y absorción de nutrientes.

Cada vez existe menos controversia sobre el inicio de la nutrición enteral precoz en los recién nacidos de muy bajo peso al nacimiento. La nutrición enteral mínima o nutrición enteral trófica consiste en administrar pequeñas cantidades de leche (4-12 ml/kg/día desde el primer día de vida hasta un máximo de 24 ml/kg/día en los primeros 4 días), junto con la nutrición parenteral, con el fin de inducir la maduración intestinal (95).

La nutrición enteral trófica mejora la tolerancia digestiva en estos niños, disminuye el riesgo de hiperbilirrubinemia conjugada, aumenta los niveles de hormonas gastrointestinales (gastrina, PGI), mejora la absorción de calcio y fósforo y aumenta la actividad de lactasa, disminuye el riesgo de sepsis nosocomial y no aumenta el riesgo de enterocolitis necrosante o muerte.

Según las revisiones publicadas en los últimos años, no existe un consenso en cuanto a las ventajas de la introducción rápida de la nutrición enteral frente a la nutrición enteral trófica, ya que no se evidencia diferencias estadísticamente significativas en el tiempo necesario hasta alcanzar la nutrición enteral completa y el desarrollo de enterocolitis (96,97).

En cuanto al tipo de leche para iniciar esta alimentación enteral, existe suficiente evidencia científica para recomendar la leche materna como el alimento de elección, independientemente de la edad gestacional, ya que se asocia a una menor incidencia de enterocolitis con respecto a los neonatos que reciben fórmula de prematuros (98). La leche materna fresca ofrece numerosos beneficios a los bebés prematuros con respecto a la leche refrigerada a congelada, puesto que evita el descenso en la microbiota comensal, células y factores inmunológicos, así como en la actividad enzimática que ocurre con la congelación (99). Sin embargo, no siempre está disponible la leche de la propia madre y es, en estos casos, cuando está indicada la utilización de leche humana donada.

Las ventajas de la leche materna y su efecto a nivel inmunológico y digestivo en el recién nacido prematuro se desarrollará en el punto 5 de esta introducción.

La leche de la propia madre, especialmente el calostro, es el alimento de elección. Ésta debería ser preferiblemente leche fresca, aunque si no está disponible, se prefiere leche refrigerada y, en su defecto, congelada. Si la madre no dispone de leche, la segunda opción sería leche humana donada procedente de Banco de Leche Humana y, por último, si en las siguientes 24-48 h del parto, no se obtiene leche humana, se iniciará la nutrición enteral con fórmula de prematuros (97).

La nutrición enteral está contraindicada en los siguientes casos (100):

- Intolerancia digestiva franca: signos de distensión abdominal clínicamente importante, vómitos (contenido bilioso o sanguinolento).

- Íleo paralítico
- Obstrucción intestinal
- Inestabilidad hemodinámica, definida como shock o hipotensión que precisa administración de dopamina a dosis ≥ 10 mcg/kg/min (grave compromiso del flujo sanguíneo a nivel mesentérico)
- En caso de asfíxia perinatal grave o sepsis se recomienda iniciar la nutrición enteral a partir de las 48 horas o hasta comprobar estabilidad hemodinámica.

Según los datos recogidos por el grupo SEN1500, el 9% de los recién nacidos de adecuado peso para su edad gestacional y el 13% de los que presentaron una restricción del crecimiento intrauterino, precisaban nutrición parenteral a los 28 días de vida, aumentando la frecuencia a 69,2% en los ≤ 24 semanas de gestación y 40% para los de 25-27 semanas de gestación (101).

1.4.1 Enterocolitis necrosante

La enterocolitis necrosante es una patología intestinal característica del recién nacido pretérmino. La lesión histológica es una necrosis inflamatoria de las asas intestinales que abarca desde la capa mucosa hasta la necrosis coagulativa de toda la pared, pudiendo llevar a la perforación. Es la urgencia gastrointestinal más frecuente y grave de los recién nacidos prematuros. La incidencia se correlaciona fuertemente con el grado de prematuridad, estimándose en torno a 1-3 por 1000 recién nacidos vivos (90% niños prematuros) y 1 a 7,7% de los recién nacidos ingresados en las unidades de cuidados intensivos neonatales (102). La incidencia es variable entre las diferentes unidades neonatales en función de factores como las características de la población de prematuros, las tasas de lactancia materna, la flora bacteriana nosocomial, etc.

La Red SEN1500 recoge la incidencia de enterocolitis en los menores de 1500g desde el año 2002. La frecuencia ha ido disminuyendo durante el periodo de estudio desde un 7,6% en 2002 hasta 6,9% en 2012. En el grupo de menores de 1000g la incidencia es mayor (14,5% en 2002 y 12,7% en 2012).

Los RNMBP que precisan cirugía por enterocolitis necrotizante se sitúan en torno al 3,2%, sin cambios significativos durante el periodo del que se disponen registros en esta red. La mortalidad asociada a esta patología oscila entre el 20 y 30%, siendo mayor en los casos que requieren cirugía.

1.4.1.1 Factores etiopatogénicos

La enterocolitis necrosante es un proceso multifactorial en el que se implican factores inflamatorios e infecciosos (103). En el origen de la necrosis intestinal se encuentra una respuesta inmunitaria exagerada frente a una agresión. En primer lugar se produce una lesión de la mucosa intestinal, seguida de la ruptura de la barrera epitelial intestinal que favorece al traslocación bacteriana que dará lugar a la activación de la respuesta inflamatoria local. Esta respuesta inflamatoria desproporcionada contribuirá a incrementar el daño inicial de la mucosa, evolucionando hasta la necrosis (104). Existen por tanto tres factores fundamentales en la fisiopatología de la enterocolitis necrosante (105):

- Inmadurez del sistema gastrointestinal: el descenso en la motilidad intestinal del recién nacido prematuro junto con el déficit enzimático provocan una mayor exposición a toxinas y una menor degradación de residuos. Además la barrera intestinal presenta mayor permeabilidad entre sus células. El déficit de TGF- β , entre otros factores de crecimiento, o de la eritropoyetina, va a dificultar la reparación de la barrera una vez que se produce la lesión.
- Inmadurez inmunológica: ausencia o niveles bajos de IgAs, lisozima y péptidos antimicrobianos. La inmadurez de la respuesta innata, así como la mayor permeabilidad de la barrera, facilitan el acceso de las bacterias intestinales a los macrófagos y células dendríticas, con sobre-expresión de receptores transmembrana tipo Toll 4 (TLR4) para los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos. Esto desencadena una respuesta inflamatoria desproporcionada (35). Nanthakumar y cols (106) encontraron que, *in vitro*, los enterocitos fetales respondían a LPS bacterianos y a la IL-1 β con una mayor producción de IL-8 si lo comparaban con enterocitos maduros. Estos hallazgos indicarían que la respuesta inflamatoria del intestino neonatal inmaduro está alejada de la protección anti-inflamatoria, de forma que, más que una respuesta protectora, puede llegar a ser lesiva.

En un modelo de enterocolitis necrosante en ratas, Nadler y cols (107) encontraron un aumento significativo de la expresión de ARNm de iNOS (forma inducible de óxido nítrico sintetasa) en los animales expuestos a hipoxia y/o alimentación con fórmula artificial (modelo habitual de NEC neonatal) que en los alimentados con leche materna que no fueron expuestos a hipoxia.

Además del óxido nítrico hay otras citoquinas implicadas. En el estudio de Ren y cols (108) se obtuvieron muestras de sangre de niños con NEC grado III y se compararon con niños que presentaban atresia anal y con controles sanos. Se determinó la concentración del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en estos pacientes, obteniéndose niveles significativamente mayores en los pacientes con NEC con respecto a los otros dos grupos. El MIF es un importante productor de IL-6 e IL-8.

- Colonización bacteriana del tracto intestinal: se han realizado múltiples estudios en heces con el objetivo de identificar los agentes causales, pero no se han obtenido resultados concluyentes. La colonización temprana del intestino por enterobacterias y Clostridios se ha relacionado con el desarrollo de enterocolitis necrosante (109).
- Otros factores implicados:
 - Nutrición enteral e isquemia-reperusión. En el 90-95% de los casos se ha introducido la nutrición enteral antes del desarrollo de la enterocolitis. Se ha relacionado con una posible lesión de la mucosa por un mecanismo osmótico (uso de fórmulas hiperosmolares), sobrecrecimiento bacteriano o alteración del flujo esplácnico. La lactancia materna presenta un efecto protector (110). Las situaciones de hipoperfusión mesentérica parece que pueden tener también un papel en el origen de la enterocolitis (111).
 - Transfusión de hemoderivados y fármacos. Se ha descrito la relación entre la transfusión de hemoderivados y la aparición de enterocolitis, considerándose la transfusión de concentrado de hematíes un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enterocolitis en las siguientes 48 h del procedimiento (112). Se ha asociado con un posible alteración en la relación endotelina-1/óxido nítrico, que favorece la liberación de citoquinas. También se han relacionado con la administración de fármacos como la indometacina, la vitamina E, teofilina por posibles efectos vasoconstrictores (113).
 - Genética. La presencia de ciertos polimorfismos genéticos implicados en la producción de interleuquinas como IL-8, IL-10, IL-12 e IL-18 se asocian con una mayor gravedad (114).

1.4.1.2 Pronóstico

La tasa de mortalidad de la enterocolitis necrotizante se estima en torno al 15-30% y es inversamente proporcional al peso del recién nacido, de forma que en menores de 750g se sitúa cerca del 50%. Es la causa del 15% de las muertes después de la primera semana de vida y de un tercio de todas las muertes relacionadas con infección.

La supervivencia es mayor entre los pacientes que sólo precisaron tratamiento médico (65-90%) frente a los que necesitaron cirugía y resección de asas (50-75%) (115).

En cuanto a las complicaciones a largo plazo, destaca el síndrome de intestino corto, que se asocia a desnutrición y alteración del crecimiento. Afecta al 23-42% de los niños con resección intestinal tras enterocolitis necrotizante. La longitud y la localización del segmento resecado va a condicionar la gravedad del cuadro, de forma que es mejor tolerada la extirpación del intestino grueso que delgado y es importante mantener la válvula ileocecal. Los niños que han precisado una corrección quirúrgica después del desarrollo de enterocolitis necrotizante, tienen un mayor riesgo de hospitalización prolongada, complicaciones médicas y déficit en el neurodesarrollo (116).

1.4.1.3 Medidas preventivas

Neu y cols (105) llevaron a cabo una revisión de las medidas preventivas disponibles frente a la enterocolitis necrosante. Se diferencian diversas categorías en función de la evidencia en cuanto a seguridad y eficacia.

- Evidencia de seguridad y eficacia: leche materna y nutrición enteral no agresiva. La leche materna ejerce su efecto protector a partir de los elementos inmunoprotectores que contiene.
- Evidencia en eficacia, pero seguridad cuestionada: administración enteral de aminoglucósidos, glucocorticoides y arginina; uso de probióticos. La administración de probióticos favorece la proliferación intestinal mejorando la función de barrera, a la vez que disminuye los mecanismos de inflamación y apoptosis (117). Existen trabajos publicados que señalan una reducción de la incidencia de enterocolitis necrosante, así como una reducción de la gravedad y mortalidad asociada (118).

- Evidencia de eficacia en modelos animales, pero no en humanos: anticitoquinas, factores de crecimiento.
- Propuesta de eficacia, aunque con falta de evidencia: prebióticos (oligofructosa presente leche humana), glutamina, ácido graso n-3 , citoquinas recombinantes.

1.5 LACTANCIA MATERNA. BENEFICIOS INMUNOLÓGICOS Y NUTRICIONALES EN EL RECIÉN NACIDO PREMATURO.

En 1990 y 2002 la OMS/UNICEF (119) estableció que:

“.....la leche humana es el alimento de elección durante los 6 primeros meses de la vida para todos los niños, incluidos los prematuros, los gemelos y los niños enfermos salvo rarísimas excepciones y se debería prolongar al menos durante todo el primer año y más allá de dicha edad si lo desean tanto la madre como el niño...”

“.....cuando no se disponga de leche de la propia madre, la leche pasteurizada de madres donantes seleccionadas es la mejor opción para la alimentación de los niños, sobre todo si se trata de niños enfermos o de alto riesgo...”

Todos los recién nacidos deberían ser alimentados con leche de su propia madre, más en el caso de los prematuros de muy bajo peso o con factores de riesgo de enterocolitis. El comienzo de la alimentación enteral con calostro es la mejor opción posible, como quedó reflejado en el apartado de patología digestiva en el prematuro expuesto anteriormente. Sin embargo, exige iniciar el apoyo a la extracción de la leche de manera eficaz en las primeras horas tras el parto.

1.5.1 Fisiología de la lactancia

La lactogénesis hace referencia al desarrollo de la posibilidad de secretar leche y supone la activación de las células alveolares maduras de la glándula mamaria. Tiene lugar en dos pasos: iniciación de la secreción y activación de la secreción (120).

La primera etapa transcurre durante la segunda mitad de la gestación, coincidiendo con los niveles elevados de progesterona circulante producida a nivel de la placenta. Después de las 16 semanas de gestación, pueden ser secretadas pequeñas cantidades de leche que contienen lactosa y caseína. En la última etapa de la gestación, muchas mujeres pueden obtener calostro.

La activación de la secreción, segunda fase de la lactogénesis, está marcada por el comienzo de la rápida producción de leche después del parto. Esta fase se pone en marcha tras el rápido descenso de la progesterona que tiene lugar después del parto y requiere la presencia de niveles elevados de prolactina, cortisol e insulina. En la mayoría de las mujeres, esto ocurre a partir del segundo o tercer día después del parto y suele ir acompañado de la succión del pecho. Puede haber un retraso en la activación de la secreción en aquellas mujeres primíparas con respecto a multíparas, en el parto por cesárea, madres diabéticas o que han tenido un parto vaginal estresante (121,122).

El mantenimiento de la lactancia, también conocido como galactopoyesis, requiere la extracción regular de leche y la estimulación del pezón, que dispara el incremento de producción de prolactina (por la hipófisis anterior) y oxitocina (hipófisis posterior). La ausencia de la extracción de la leche provoca una elevada presión inflamatoria y acúmulo de la misma, que da lugar, por mecanismos de retroalimentación negativa, una disminución en la producción de leche y una involución de la mama.

1.5.2 Composición de la leche materna

La leche materna es un fluido complejo que comprende gran variedad de compuestos químicos y de células (123). Los principales macronutrientes de la leche materna son :

- Lactosa y oligosacáridos
- Grasas lácteas: triglicéridos, colesterol, fosfolípidos y hormonas esteroideas
- Proteínas, incluyendo diversas caseínas, alpha-lactoalbúmina, lactoferrina, IgAs y lisozima
- Minerales, incluyendo sodio, potasio, cloro, calcio, magnesio y fósforo.

Estos componentes de la leche materna tienen múltiples funciones, entre las que podemos destacar:

- Propiedades bacteriostáticas y moduladoras de la respuesta inmune

- Anti-inflamatoria
- Estimulan el crecimiento del intestino del recién nacido
- Ayudan en la digestión

La leche materna está compuesta no sólo por macronutrientes, sino que contiene además micronutrientes, factores bioactivos, como enzimas, citoquinas y factores de crecimiento que hacen que se adapte a las necesidades particulares del recién nacido.

Esta podría ser la razón, en parte, de porqué la leche materna tiene funciones únicas en el desarrollo de la mucosa intestinal y del sistema inmune de los recién nacidos (124).

La composición de la leche materna no sólo varía entre mujeres, sino que también se modifica durante el periodo de lactancia, de forma que la concentración de estos componentes es mayor en el calostro que en la leche de transición y madura (125). Además, el grado de prematuridad también puede jugar un papel en la composición de la leche, de forma que su contenido se adapta para compensar el retraso en el desarrollo de su sistema inmune. Diversos estudios han evidenciado (126,127) que el calostro de las madres de recién nacidos prematuros presenta mayor concentración de factores inmunológicos que el de madres de niños nacidos a término.

Los componentes celulares de la leche materna varían en número y tipo a lo largo del tiempo. La cantidad de células que contiene el calostro (leche secretada durante el embarazo y postparto inmediato) es aproximadamente 10^6 /ml, reduciéndose hasta 10^5 /ml a los 6 meses. Dentro del componente celular podemos encontrar macrófagos, linfocitos, neutrófilos y células epiteliales. El número de leucocitos disminuye después del segundo-tercer mes de lactancia, siendo entonces las células epiteliales las que representan un mayor porcentaje. Los macrófagos de la leche humana tienen capacidad de quimiotaxis, fagocitosis y de secretar componentes del complemento, lisozima y lactoferrina. Tanto los macrófagos, como los linfocitos de la leche humana, juegan un papel fundamental en la protección del tracto intestinal del recién nacido (123).

Para los recién nacidos prematuros, la exposición a los factores inmunes de la leche materna cobra mayor importancia, ya que no sólo proporciona defensas frente a enfermedades a corto plazo, sino que también ayuda a asegurar un correcto desarrollo del sistema inmune a largo plazo (10).

1.5.2.1 Inmunoglobulinas

El contenido de IgAs en el calostro de madres de niños prematuros es mayor que el de madres de niños a término (126). La concentración de IgA disminuye con el tiempo en la lactancia, siendo este descenso más lento y gradual en las madres de niños prematuros con respecto a los nacidos a término (128). En el recién nacido, los niveles protectores de IgA en el suero se alcanzan aproximadamente al mes de vida (129). La activación de la producción de IgAs a nivel de las células plasmáticas en el intestino del neonato depende de la colonización inicial a este nivel de Bifidobacterias y Lactobacilos, estimulados, a su vez, por la fermentación de los oligosacáridos no digeribles de la leche materna (130). Durante el periodo de déficit de IgAs, es cuando la concentración de IgAs en la leche materna es mayor.

Recientes estudios han comprobado, igualmente, que los niveles de IgG en el calostro de madres de niños nacidos antes de las 32 semanas, son mayores que los de niños a término (126,128). Además, se ha demostrado la presencia de receptores de Fc IgG en la luz del intestino del feto (131). Estos receptores podrían activarse tras el parto y, así, facilitar la absorción de esta inmunoglobulina de la leche materna.

La concentración de IgM en el calostro es baja y no varía en función de las semanas de gestación (128).

1.5.2.2 Citoquinas

La mayoría de estudios que han analizado el contenido de citoquinas en leche materna se han realizado utilizando muestras de leche de mujeres que tuvieron partos a término o casi a término. Sin embargo, las medidas realizadas en la madres de niños prematuros, mediante técnicas de inmunoanálisis, muestran importantes diferencias en el patrón de citoquinas a lo largo de la gestación (10).

El contenido de IL-6 es mayor en el calostro y disminuye progresivamente en la leche de transición y madura, independientemente de la edad gestacional del recién nacido. Cuando se mide la IL-6 en el calostro obtenido después del parto en diferentes semanas de gestación, se ha observado que la concentración mayor se alcanza en los partos ocurridos entre las 30 y las 37 semanas, con niveles significativamente inferiores en el calostro de niños menores de 30 semanas de gestación (126). No obstante, si se analiza

su contenido en la leche de transición (10º día post-parto), la concentración en el grupo de los muy prematuros (menores de 30 semanas) es significativamente mayor en comparación con los a término. Por el contrario, otros estudios no han podido demostrar una relación entre el contenido de IL-6 en la leche de transición o madura y la edad gestacional (132). La discrepancia entre los estudios publicados puede residir en la definición de leche madura, de transición y calostro, así como en el momento en el que se recoge cada una. En resumen, estos hallazgos sugieren que el recién nacido extremadamente prematuro presenta una mayor desventaja inmunológica, no sólo porque se tiene un sistema inmune más inmaduro, sino también porque la leche materna le proporciona menos soporte frente a las infecciones.

La IL-8 presente en la leche materna supone una gran ventaja para el recién nacido prematuro ya que está relacionada con la respuesta inmune innata. Los resultados de los estudios, en cuanto al contenido de IL-8 en la leche materna y su relación con la edad gestacional, son contradictorios. En los trabajos de Castellote y cols (126) y de Mehta y cols (132) los niveles de IL-8 en el calostro obtenido de madres de niños menores de 30 semanas fueron inferiores a los obtenidos en niños mayores (pretérmino y a término). No obstante, Ustundag y cols (133) no pudieron establecer esta relación. En ambos grupos, tanto prematuros como en a término, los niveles de IL-8 en el calostro fueron significativamente mayores que en la leche de transición, aunque en la leche madura, en los pretérmino la IL-8 se mantenía o aumentaba discretamente, mientras que en los a término continuaba descendiendo.

La IL-10 y el TNF- α siguen un patrón similar a la IL-6 e IL-8. La elevada concentración de citoquinas en el calostro comparado con la leche madura refuerza la importancia de una exposición temprana a la leche materna para obtener un adecuado desarrollo del sistema inmune para el recién nacido prematuro.

1.5.2.3 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento se encuentran dentro de los componentes con función bioactiva de la leche materna. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alpha y beta (TGF- α y TGF- β) promueven el desarrollo funcional de la mucosa gastrointestinal a partir del nacimiento. Su acción conjunta con la IL-10 permite al sistema inmune tolerar los antígenos de los alimentos a los que está expuesto el intestino además de a la microbiota intestinal. Estos factores de crecimiento han sido medidos también en los estudios a los que se ha hecho referencia anteriormente, de forma que, en el trabajo de Castellote y cols (126), el EGF fue el

único factor estudiado que se mostró significativamente mayor en la leche de transición, tanto en el grupo de los prematuros, como de los muy prematuros con respecto del grupo a término. La concentración de TGB- β medida en este estudio fue mayor en el grupo de 30-37 semanas de gestación, pero no en el calostro de niños muy prematuros.

La alta concentración de factores de crecimiento como el EGF, especialmente en la leche de mujeres con parto prematuro, sugiere que podrían jugar un papel importante en la protección frente a enfermedades como la enterocolitis necrosante (134). Diversos estudios in vivo o con modelos animales apoyan esta hipótesis. Dvorak y cols (135) examinaron el efecto de la suplementación con EGF en un modelo de NEC en ratas, y encontró que el EGF producía una disminución de la incidencia y gravedad de NEC. El mecanismo propuesto incluiría una modulación de la síntesis de TNF e IL-18.

1.5.2.4 Lactoferrina

La lactoferrina es una glicoproteína existente en la leche de los mamíferos que forma parte de la respuesta inmune innata y puede reducir la incidencia de sepsis nosocomial en el recién nacido de muy bajo peso y de enterocolitis necrosante en modelos animales. Es la principal proteína del suero en el calostro, lágrima y saliva (49,50). La isoforma bovina es casi homóloga a la humana. Se le han atribuido propiedades no sólo como prebiótico, sino también acción antiinfecciosa.

A nivel sistémico y local, la lactoferrina modula in vivo la función de componentes humorales y celulares de la respuesta innata (neutrófilos, células NK, linfocitos T γ/δ , interferón- α (IFN- α) e IFN- β , IL-18) y adaptativa a través de anticuerpos, interleuquinas, linfocitos Th1/Th2 y B. La acción moduladora de la lactoferrina le permite regular positiva o negativamente la inflamación de origen infeccioso (136-138).

El efecto bacteriostático relativo a la inhibición de la multiplicación bacteriana, está relacionado a su habilidad de captar Fe³⁺ (ion férrico) que es esencial para el crecimiento y expresión de virulencia de algunos microorganismos patógenos. El efecto bactericida radica en la capacidad de la lactoferrina de interactuar con cationes divalentes como el Ca²⁺ que contribuyen a estabilizar la superficie bacteriana y con componentes bacterianos con carga negativa como el lipopolisacárido (LPS). Dicha interacción desorganiza y desestabiliza la superficie celular causando la pérdida de la permeabilidad y finalmente la muerte celular (139).

Se ha demostrado que reduce la producción de citoquinas por parte de los monocitos y que, en presencia de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus GG*), aumenta las defensas frente a patógenos entéricos como *E.coli* en el intestino de niños prematuros (140). Manzoni y cols (50), administraron lactoferrina bovina y lactoferrina bovina más *Lactobacillus GG* o placebo a recién nacidos de muy bajo peso, comprobando que la incidencia de sepsis bacteriana o fúngica fue significativamente más baja cuando se administró la lactoferrina bovina (5,9%) o lactoferrina bovina más *Lactobacillus GG* (4,6%) que cuando se administró placebo (17,35%). En una reciente revisión realizada por Pammi y Abrams (141) se concluye que la profilaxis con lactoferrina oral, con o sin probióticos, reduce la sepsis tardía y la enterocolitis necrosante grado II o mayor en prematuros, sin presentar efectos adversos. La lactoferrina tiene una fuerte actividad frente a *Cándida* y puede ser efectiva en la prevención de la infección fúngica. En el análisis por subgrupos de peso, parece ser que la lactoferrina es más efectiva cuando se administra a neonatos con peso inferior a 1000 g, que cuando el peso está entre 1000-1500 g. Sin embargo, en esta revisión no se ha encontrado un descenso de la enfermedad crónica pulmonar ni de la estancia hospitalaria. Por tanto, son necesarios ensayos clínicos más amplios que confirmen estos hallazgos y que precisen la dosis y la duración del tratamiento antes de generalizar su uso en las unidades neonatales.

La concentración de lactoferrina en la leche materna, al igual que la de citoquinas e inmunoglobulinas, desciende durante la lactancia. En la comparación entre leche de mujeres con parto a término y pretérmino, se ha visto que los niveles son mayores en las madres de niños a término (142).

1.5.2.5 Microbiota de la leche materna

La introducción de técnicas de biología molecular en el estudio de los microorganismos presentes en la leche materna ha permitido identificar a un mayor número de bacterias que en los estudios basados en técnicas de cultivo tradicionales (143).

Entre los grupos más frecuentes se han identificado principalmente Proteobacterias, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Existe una amplia diversidad y variabilidad en la microbiota de la leche materna, probablemente influenciada por la propia microbiota intestinal de la madre. La presencia de estos microorganismos en la leche materna contribuye a la correcta colonización intestinal del recién nacido que tiene lugar tras el nacimiento. Sustancias prebióticos, como los oligosacáridos, tienen también un papel importante, ya que actúan como fuente de energía para grupos de

bacterias beneficiosas para la salud, como bifidobacterias y lactobacilos (144) (microbiota dominante en los niños alimentados de leche materna).

En la tabla 5 quedan recogidos los principales factores inmunológicos encontrados en la leche humana y la repercusión que podrían tener en el inmaduro sistema inmune del recién nacido prematuro (10).

Tabla 5. Ventajas inmunológicas de la leche materna

Características del Sistema Inmune Innato del recién nacido prematuro	Factores inmunológicos protectores encontrados en la leche materna
Falta de transferencia de anticuerpos maternos a través de la placenta durante el final del embarazo	Inmunoglobulinas: IgAs, IgG
Inadecuada eliminación extracelular de las infecciones bacterianas	Citoquinas: IL-6, TGF- α , TGF- β
Respuesta inflamatoria inapropiada por errores en los patrones de reconocimiento	Factores de crecimiento: EGF, TGF- α y TGF- β
Colonización intestinal aberrante	Factores microbiológicos: Lactoferrina, Oligosacáridos, Bacterias probióticas

1.5.2.6 Hormonas

La reciente identificación en la leche materna de hormonas relacionadas con la regulación del balance energético, como la leptina, adiponectina, resistina y grelina, sugiere que la leche materna podría ser la fuente de componentes cruciales en el desarrollo metabólico del niño. Estas hormonas pueden estar implicadas en la regulación del crecimiento y desarrollo del niño durante el periodo neonatal y la infancia, y podrían tener efectos a largo plazo en la programación metabólica (124).

1.5.2.6.1 Leptina

La leptina es una adipoquina producida por los adipocitos de la masa grasa. Interviene en el balance energético actuando de forma específica a nivel de las neuronas

hipotalámicas, a través de la producción de neuropéptidos anorexígenos (hormona estimulante de los α -melanocitos, α -MSH) y descenso de los neuropéptidos orexígenos (neuropéptido Y, NPY). Los niveles séricos de la leptina son un reflejo del balance energético y varían en función de la dieta y del gasto de energía. Durante el tercer trimestre de la gestación se deposita más del 90% de la grasa corporal del feto. Los niveles circulantes de leptina aumentan significativamente después de la 34 semana de gestación y esto se ha relacionado con la acumulación rápida de grasa que tiene lugar al final de la gestación (145). Además se ha visto que podría tener una relación con el peso del recién nacido, de forma que los neonatos pequeños para su edad gestacional tienen niveles más bajos de leptina al nacimiento que los de peso adecuado a su edad o grandes para su edad gestacional (124). Se ha asociado también con la duración de la gestación, de forma que los niveles séricos de leptina en los niños prematuros son inferiores que en los a término, probablemente influenciado por la acción de hormonas metabólicas como la insulina y los corticosteroides (145).

Estudios experimentales en modelos animales han sugerido que la leptina de la leche materna puede pasar a la sangre circulante del neonato a través de receptores en la mucosa gástrica y en el intestino delgado (146).

Los niveles de leptina en el calostro son mayores que en la leche de transición. Los estudios realizados en leches de madres de niños prematuros con respecto de niños a término han demostrado niveles más bajos en las primeras (147).

1.5.2.6.2 Resistina

La resistina es una proteína rica en cisteína secretada principalmente por el adipocito, aunque recientes trabajos han demostrado que puede ser secretada por células del sistema inmune y que podría tener un papel como agente proinflamatorio (148). Está relacionada con el metabolismo de la glucosa y tiene una acción antagonista de la insulina a nivel de tejidos periféricos.

La resistina se produce en la placenta y puede estar implicada en la regulación del metabolismo energético durante el embarazo. Los niveles séricos de resistina en el cordón umbilical se han correlacionado positivamente con los niveles séricos en la madre y negativamente con el peso al nacimiento (149).

La concentración de resistina en el suero del recién nacido ha mostrado diferencias también en función de la edad gestacional, de forma que se obtienen niveles mayores en el neonato a término que en el prematuro (145). Esta mayor concentración de resistina en el a término podría prevenir la hipoglucemia al nacimiento, facilitando la gluconeogénesis hepática.

Los niveles de resistina en la leche materna descienden durante la lactancia. Su concentración en sangre materna y en la leche está relacionados positivamente con el estradiol, progesterona, prolactina, tiroxina y triyodotiroxina, cortisol, leptina y proteína-C-reactiva en la madre (124).

1.5.2.6.3 Adiponectina

La adiponectina es una proteína secretada por los adipocitos. Es la proteína específica de adipocitos más abundante. Su función exacta no se conoce, aunque en estudios experimentales y observaciones clínicas han mostrado una reducción de la actividad de la adiponectina en condiciones de resistencia a la insulina. En humanos, los niveles de adiponectina se han relacionado positivamente con la sensibilidad a la insulina y negativamente con el grado de adiposidad (124).

En niños a término, durante los primeros días de vida, los niveles de adiponectina se han correlacionado positivamente con el peso al nacimiento, la longitud, los depósitos de grasa y con los niveles de leptina circulantes (150). En recién nacidos prematuros, de igual forma que otras adipoquinas, los niveles son más bajos que en los recién nacidos a término, no obstante, parece ser que la influencia de la edad gestacional no es tan significativa una vez que se ajusta por el peso al nacimiento (151). Los niveles de adiponectina se incrementan rápidamente durante la vida postnatal, posiblemente como adaptación metabólica del prematuro a la vida extrauterina.

La presencia de adiponectina en la leche humana fue descrita por Martin y cols, encontrando niveles más altos que de leptina y que, como en ésta, se produce un descenso progresivo durante la lactancia (152).

Los niveles séricos de adiponectina, leptina y resistina en los niños durante el primer mes de vida se relacionan significativamente con su capacidad antioxidante (153). Se ha demostrado que los niveles de adiponectina protegen frente al estrés oxidativo en

humanos. No obstante, la leptina circulante presenta una relación significativamente positiva con los marcadores de estrés e inversa con los que tienen capacidad antioxidante. Por su parte, la resistina sérica se relaciona positivamente con enzimas antioxidantes y negativamente con marcadores de estrés oxidativo.

1.5.2.6.4 Grelina

La grelina es un péptido producido principalmente en el intestino y está relacionado con la regulación de la alimentación a corto plazo y con el metabolismo energético a largo plazo. La grelina estimula la ingesta de comida, tiene actividad adipogénica y está relacionada con el control del peso corporal a largo plazo (154).

Se detectan niveles circulantes de grelina en el feto a partir de la 23 semanas de gestación. Estos niveles permanecen relativamente constantes a lo largo de la gestación y al nacimiento, independientemente de la edad gestacional (145). Los resultados de los estudios sobre la relación entre los parámetros antropométricos y los niveles de grelina del recién nacido no muestran datos concluyentes (155,156).

En los últimos años se ha descrito la presencia de grelina en la leche materna de niños prematuros y a término, sin diferencias significativas en su concentración. La concentración de grelina en la leche materna es mayor que en el plasma, lo que sugiere que pudiera ser sintetizada y secretada en el pecho (157,158).

1.5.3 Lactancia materna y prevención de enfermedades en el recién nacido prematuro

La leche materna proporciona, como se ha detallado en los puntos anteriores, una mezcla única de factores bioactivos que posibilitan una mejora en la respuesta inmune inmadura del recién nacido prematuro, previene de enfermedades inflamatorias como la enterocolitis necrosante, a corto plazo, y permite un crecimiento y neurodesarrollo óptimo posteriores.

Entre los factores protectores de la enterocolitis necrosante, la lactancia materna es el que se ha mostrado más efectivo. Los recién nacidos prematuros que son alimentados con leche materna muestran una incidencia menor de enterocolitis cuando son

comparados con los niños alimentados con fórmula (159). Estas diferencias se mantienen si el estudio se hace entre recién nacidos que reciben fórmula artificial y se compara frente a aquellos que son alimentados con leche materna donada procedente de Banco de Leche Humana (110,160).

La leche materna ejerce su acción protectora a través de los factores inmunoprotectores que contiene, que contribuyen a aumentar la resistencia de la barrera intestinal y a regular la respuesta inmune. La presencia de sustancias probióticas y prebióticas, como los lactobacilos y oligosacáridos (no se encuentran en la leche de vaca) ha demostrado poseer un gran número de funciones beneficiosas: mejoran el desarrollo de la pared intestinal; modulan la respuesta inmune; favorecen el desarrollo de un patrón de colonización intestinal saludable; son un sustrato primordial en el crecimiento cerebral (161,162).

Diferentes estudios han demostrado que la alimentación con leche materna reduce la incidencia y/o riesgo de sepsis en prematuros extremos y recién nacidos de muy bajo peso al nacimiento (163,164). Patel y cols (65) propusieron que una nutrición enteral con al menos 25 ml/kg/día de leche materna, durante los primeros 28 días de vida, se asociaba a un descenso significativo de sepsis, lo cual mejoraba los resultados a largo plazo en los recién nacidos de muy bajo peso y disminuía los costes derivados de su asistencia.

1.5.4 Impacto de la congelación y la pasteurización sobre la leche materna

El método de conservación de la leche materna a largo plazo utilizado en la mayoría de las Unidades Neonatales es la congelación a una temperatura entre -18°C y -20°C . La evidencia del impacto de la congelación en este rango de temperatura es escasa, ya que la metodología de los estudios publicados es muy diversa y estudia periodos variables de congelación. El tipo y duración del almacenamiento tiene un efecto sobre algunos de los componentes de la leche y este efecto, a su vez, depende de la contaminación bacteriana de la leche. La refrigeración tiene un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano (166). Además, el proceso de congelación y descongelación destruye partículas de algunos virus que podrían estar presentes en la leche materna: Citomegalovirus (CMV), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el virus Linfotrófico de Células T Humana (HTLV) tipo I y II (167,168).

La congelación también puede tener efectos negativos sobre la capacidad defensiva de la leche materna, ya que se ha descrito un descenso en el número de linfocitos después de cuatro semanas de congelación, sin afectarse de forma significativa el contenido de IgAs (169). El contenido de lactoferrina tampoco se ve afectado significativamente por la congelación -18°C y -20°C (170). No obstante, mantener la leche materna a estas temperaturas sí disminuye la capacidad antioxidante de la leche materna. Esta pérdida se incrementa conforme se prolonga el tiempo de almacenamiento y difiere también en función de la temperatura a la que se mantenga (171).

La pasteurización se realiza mediante el método Holder, tratamiento térmico en el que se mantiene la leche a $62,5^{\circ}\text{C}$ durante 30 min y posteriormente se realiza un enfriamiento rápido a 5°C . Con la pasteurización se asegura la eliminación de los agentes infecciosos potencialmente transmisibles a través de la leche humana, pero se pierden algunas de las propiedades biológicas de la leche materna. Destruye los virus VIH, HTLV, virus herpes simple y rubeola. Con la pasteurización se inactiva completamente el CMV (172,173).

Desde un punto de vista nutricional, la pasteurización Holder disminuye el contenido de grasa y calorías de la leche materna (174). Sin embargo el contenido de proteínas y lactosa no se ve afectado. Otros componentes de alto valor biológico y nutricional, como oligosacáridos, vitaminas A, D, E, y factor de crecimiento epidérmico, también se conservan.

Este procedimiento provoca además pérdida de parte de componentes biológicamente activos como inmunoglobulinas (IgAs, IgM, IgG) lactoferrina, lisozima, linfocitos, lipasa, citoquinas y algunos factores de crecimiento. Según Sousa y cols (175), el contenido de IgA, IgM, IgG en el calostro desciende en un 20%, 51% y 23% respectivamente tras la pasteurización Holder, al igual que la actividad de la lisozima (desciende un 44%).

Se están desarrollando nuevas técnicas de procesamiento como el tratamiento a alta-presión (HPP), aplicado en la industria alimentaria, con los que se pretende minimizar los efectos deletéreos sobre los componentes inactivo de la leche materna que provoca la pasteurización Holder, a la vez que se mantiene la seguridad microbiológica (176,177).

1.6 ADMINISTRACIÓN DE CALOSTRO OROFARÍNGEO

La leche materna, según lo expuesto anteriormente, es la más adecuada para la alimentación del recién nacido prematuro. El recién nacido prematuro de muy bajo peso es un neonato inmunológicamente inmaduro que presenta además una alteración de las barreras naturales de defensa frente a infecciones (infecciones de la piel o el tracto gastrointestinal).

La leche materna, principalmente el calostro, contiene nutrientes funcionales que ayudan a crear un microambiente propicio para la maduración y protección intestinal. Una de las principales ventajas de la lactancia materna precoz es su efecto anti-inflamatorio, ya que diversos componentes de la leche materna (IL-10, lactoferrina, TGF- β) pueden reducir la respuesta inflamatoria del recién nacido actuando directamente a nivel intestinal (178). Por ello, para el recién nacido prematuro, la exposición a los factores inmunes de la leche materna cobra mayor importancia, puesto que no sólo le proporcionaría defensas frente a enfermedades a corto plazo, sino que también ayudaría a asegurar un correcto desarrollo del sistema inmune a largo plazo (10).

El calostro juega un importante papel en la transición de la nutrición intrauterina a extrauterina. Se produce cuando las uniones del epitelio de la glándula mamaria aún están abiertas, de forma que se permite el transporte paracelular de sustancias inmunológicamente activas desde la circulación materna hasta la leche. Este hecho se traduce en la presencia de altos niveles de proteínas inmunes (IgAs, lactoferrina, citoquinas pro y anti-inflamatorias y factores de crecimiento) que proporcionan a los recién nacidos protección inmunológica. Estas uniones se cierran progresivamente durante los primeros días después del nacimiento, por ello la composición del calostro es tan diferente de la leche madura (179).

Los primeros días de vida de un recién nacido prematuro representan un período crítico para iniciar la alimentación enteral con calostro debido a la presencia en muchas ocasiones de inestabilidad clínica asociada. En los últimos años se ha postulado la administración de calostro por vía orofaríngea (absorción del mismo a través de la mucosa oral) como potencial “terapia inmune” en el grupo de pacientes prematuros que no pueden ser alimentados por vía oral, mediante succión directa, debido a su inmadurez neurológica (ausencia de mecanismo de succión-deglución coordinado) o por el riesgo de comorbilidades asociadas (enterocolitis necrosante).

Recientemente se han publicado varios trabajos (180-183) en los que se ha sugerido que la absorción del calostro a nivel orofaríngeo durante los primeros días de vida podría mejorar la función del sistema inmune de estos recién nacidos enfermos, a través del estímulo del tejido linfoide asociado a mucosas, proporcionando una barrera de protección local y cambiando los niveles de los factores inmunológicos derivados, como IgAs y la lactoferrina, en los fluidos corporales.

Rodríguez y cols (180) describieron como la administración de calostro por vía orofaríngea supondría un estímulo del tejido linfoide a nivel local (anillo linfático de Waldeyer, principalmente amígdala palatina y adenoides), dando lugar a factores con carácter defensivo (IL-10 e IgA). Las citoquinas exógenas presentes en el calostro materno interactúan con los linfocitos del tejido linfoide asociado a mucosas. Estas citoquinas pueden estimular o inhibir la función celular in situ o en células vecinas a través de la síntesis de nuevas citoquinas. Los linfocitos TH1 secretarán INF- γ , TNF- β e IL-2, que promoverían la respuesta inmune celular. Por otro lado, los linfocitos TH2 producirían IL-4, IL-5 e IL-13, las cuales están implicadas en la respuesta humoral (184). De esta forma, estímulos a nivel del tejido linfoide asociado a mucosas (TLAM) podría activar la respuesta inmune en órganos distales o poner en marcha cascadas anti-inflamatorias.

Durante la lactancia, con la succión directa del recién nacido al pecho, las citoquinas presentes en la leche materna estimulan el TLAM a nivel orofaríngeo y a nivel intestinal. Este doble estímulo provocaría una respuesta mayor que si el estímulo ocurre en un solo lugar. Los niños a término alimentados al pecho se benefician de este efecto combinado, sin embargo, los recién nacidos de muy bajo peso, ingresados en UCIN, que reciben la nutrición enteral a través de una sonda nasogástrica, pierden el contacto de la leche materna con el tejido linfoide orofaríngeo. Este déficit podría ser corregido con la administración del calostro orofaríngeo, como un complemento, no como un sustitutivo de la nutrición enteral trófica. El hecho de que la concentración de la mayoría de las citoquinas, como la IL-6, sea mayor en el calostro que en la leche de transición y madura, sugiere la importancia que podría tener para el recién nacido prematuro la toma de contacto con la leche materna, especialmente durante los primeros días de vida.

En el año 2010 Rodríguez y cols (181) publicaron el primer estudio, cuasiexperimental, en el que se administraba el calostro orofaríngeo a los recién nacidos prematuros. Se trató de un estudio piloto en el que sólo fueron incluidos finalmente 5 pacientes, de forma que no se pudieron obtener resultados estadísticamente significativos. En este estudio se demostró que era un procedimiento seguro y fiable, aunque no se midieron resultados clínicos.

Posteriormente, en 2011, Rodríguez y cols (182) publicaron el primer estudio prospectivo randomizado con doble ciego en el que se valoró el impacto a nivel inmunológico que tendría la administración de calostro orofaríngeo. La intervención consistía en administrar 0,2ml de calostro 12 veces al día, durante 48 horas a neonatos menores de 28 semanas de gestación y menores de 1000g. Participaron 15 pacientes (9 en grupo calostro y 6 en grupo placebo). Se analizaron los niveles de IgAs, IL-10 y lactoferrina en orina y en aspirado traqueal, observándose un aumento de IgAs y lactoferrina al final de la intervención en el grupo que había recibido durante 48 horas el calostro orofaríngeo frente al grupo placebo. En este estudio se vio también que el grupo que recibía el calostro orofaríngeo alcanzaba antes el volumen de nutrición enteral completa.

En los últimos tres años se han seguido publicando estudios en los que se ha valorado el efecto de la administración del calostro orofaríngeo sobre el número de días en alcanzar la nutrición enteral completa, días de catéter central, necesidad de transfusiones sanguíneas o datos de crecimiento al alta (185,186). En todos ellos se ha demostrado que es un procedimiento seguro y que reducía el número de días de nutrición parenteral, de catéter central y mejora el peso al alta. Sin embargo no se ha podido demostrar un efecto preventivo en el riesgo de sepsis o enterocolitis necrosante.

Gephart y cols (187) realizaron una revisión de seis trabajos acerca de la repercusión de la administración del calostro orofaríngeo. Se incluyeron tanto estudios prospectivos como retrospectivos. En todos ellos, la intervención se iniciaba en las primeras 48 horas de vida del recién nacido y se mantenía durante un periodo que oscilaba entre dos y siete días consecutivos. La población de referencia también era heterogénea, ya que no todos los estudios incluían al mismo grupo de recién nacidos prematuros. Los autores llegaron a las siguientes conclusiones:

- Evidencia demostrada:
 - Volumen de nutrición enteral es importante para reducir la morbilidad neonatal.
 - El calostro contiene factores estimulantes del sistema inmune que son deficitarios en el recién nacido prematuro.
 - Cuando el calostro se administra por vía orofaríngea se reduce también el tiempo hasta alcanzar la nutrición enteral completa.

- Evidencia poco clara:
 - Impacto de la administración de calostro orofaríngeo sobre los resultados de enterocolitis necrotizante, sepsis, retinopatía de la prematuridad o enfermedad pulmonar.
 - Dosis y duración de la administración de calostro ofaríngeo.
 - El impacto que podría tener en niños críticamente enfermos mayores de 1500g.
 - Cambios en la respuesta inflamatoria después de la administración del calostro.

El impacto que esta intervención tendría sobre el sistema inmunológico y si su efecto se mantiene una vez que se ha suspendido la administración de calostro orofaríngeo, no están claros. En esta dirección, recientemente, Lee y cols (183) han desarrollado un estudio en el cual se administraba calostro por vía orofaríngea a recién nacidos menores de 28 semanas de gestación, durante 3 días, empezando la intervención dentro de los primeros 2-4 días de vida. Estos autores realizaron mediciones en orina y saliva de los niveles de IgAs, lactoferrina y diferentes componentes del sistema inmune (interleuquinas, INF- γ , TNF- α y factores de crecimiento) antes y después de la intervención y además a los 15 días de vida. Observaron que el incremento de la IgAs en el grupo que había recibido el calostro se mantenía a las 2 semanas de vida, a la vez que el contenido de IL-1 e IL-8 eran significativamente más bajo.

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

La finalidad de este trabajo es realizar un estudio sobre el valor inmunológico que tendría la administración de calostro orofaríngeo en recién nacidos prematuros de muy bajo peso. Se pretende aportar información sobre la utilización del calostro como una potencial terapia inmune y no simplemente como un alimento en este grupo de pacientes, constituyendo una alternativa a la dieta enteral absoluta y/o un complemento de alimentación trófica de los primeros días de la vida de estos niños.

Es importante destacar que los resultados obtenidos en este estudio pueden apoyar el conocimiento disponible sobre el valor del calostro como producto biológicamente fundamental para el recién nacido en general y el prematuro en particular, con objeto de conseguir una menor incidencia de patologías graves de la etapa neonatal del recién nacido prematuro como son el la sepsis nosocomial y la enterocolitis necrosante.

Los resultados esperados se incluirán en la practica diaria y protocolos de atención a recién nacidos prematuros y enfermos ingresados en unidades de cuidados intensivos. Todos ellos elementos básicos y retos en la asistencia diaria al recién nacido prematuro.

Por último, este estudio supondrá también la promoción de la lactancia materna entre las madres de niños prematuros ingresados en las Unidades de Neonatología una de las principales medidas recomendadas por los expertos para un correcto crecimiento y desarrollo del neonato.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

La administración de calostro orofaríngeo en recién nacidos prematuros, que son pacientes inmunológicamente comprometidos, puede ser una terapia autoinmune eficaz al aumentar los marcadores inmunológicos (IgA, IgM lactoferrina, resistina y citoquinas pro y antiinflamatorias) y en consecuencia podría reducir el riesgo de enterocolitis necrosante, sepsis nosocomial y/o muerte en recién nacidos prematuros de muy bajo peso.

3.2 OBJETIVOS

El objetivo **principal** del estudio es evaluar los efectos que pueda tener la administración de calostro orofaríngeo sobre los inmunomarcadores relacionados con la defensa (lactoferrina, resistina, citoquinas pro-antiinflamatorias e inmunoglobulina A y M) en recién nacidos prematuros de muy bajo peso.

Como objetivos **secundarios** se plantean:

- Estudiar la repercusión clínica de la administración de calostro orofaríngeo a nivel de patología digestiva e infecciosa.
- Estudiar la posible relación de los inmunomarcadores con la enterocolitis necrosante e infecciones nosocomiales.
- Valorar la seguridad de la administración de calostro orofaríngeo en recién nacidos de muy bajo peso, en términos de estabilidad clínica durante el procedimiento.
- Establecer sistema que permita la extracción de calostro en las madres que han tenido un hijo prematuro desde las primeras horas postparto y de esta manera establecer un elemento de promoción de la lactancia materna en esta población.

METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

4.1 PACIENTES DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio de intervención no aleatorizado con grupo control desarrollado en Unidad de Neonatología del Hospital Universitario Virgen de Las Nieves de Granada, desde Abril 2014 hasta Abril de 2015.

Ha sido valorado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, el cual ha dado su aprobación para llevarlo a cabo.

El estudio se ha desarrollado siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (WMA).

4.1.1. Población

La población de referencia la constituyen los recién nacidos prematuros menores de 32+6 semanas de edad gestacional y/o menores de 1500 gramos de peso que ingresarán en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del HMI Virgen de las Nieves de Granada.

4.1.1.1. Criterios de inclusión

- Recién nacido prematuro con una edad gestacional inferior a 32+6 semanas ingresado en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales.
- Recién nacido prematuro con un peso al nacimiento inferior a 1500 gramos ingresado en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales.
- Aceptación libremente de los padres/tutores legales para participar en el estudio, una vez leído y firmado el consentimiento informado para la participación de su recién nacido en el estudio (Anexo 1).

4.1.1.2. Criterios de exclusión

- Recién nacidos con cromosomopatías o malformaciones congénitas mayores.
- Recibir drogas vasopresoras superiores a 10 mcg/kg/min.
- No aceptación de consentimiento informado para participar en el estudio por parte de los padres o tutores legales del recién nacido.

4.2 DISEÑO DE LOS GRUPOS E INTERVENCIÓN

4.2.1 Selección de sujetos e información a los padres/representantes legales

La selección de sujetos y su seguimiento se llevó a cabo en el Hospital Materno-Infantil Virgen de las Nieves de Granada por parte del personal de la Unidad de Neonatología (neonatólogos y enfermeras participantes en el proyecto).

En caso de amenazas de partos prematuros ingresados en la Unidad de Ginecología, la enfermera responsable del protocolo de atención prenatal realizó la primera visita informativa. En esta primera entrevista, a la madre que expresó su deseo de dar lactancia materna a su bebé, se le explicó el procedimiento de alimentación orofaríngea y la necesidad de un estímulo precoz para la recolección de calostro lo antes posible.

Una vez producido el parto prematuro, en las 24 horas después del parto, se informó a la madre nuevamente sobre esta intervención, los beneficios y el sistema para la extracción de la leche (Figura 1 y Figura 2).

Se animó a las madres a la utilización de la bomba de recolección doble, cada dos o tres horas para un total de ocho veces cada 24 horas, hasta una vez se hubiera instaurado la producción de leche (Figura 3). Al menos una extracción debería producirse por la noche cuando los niveles de prolactina son más altos.

Figura 1. Instrucciones para realización de masaje del pecho para mejorar la salida de la leche.

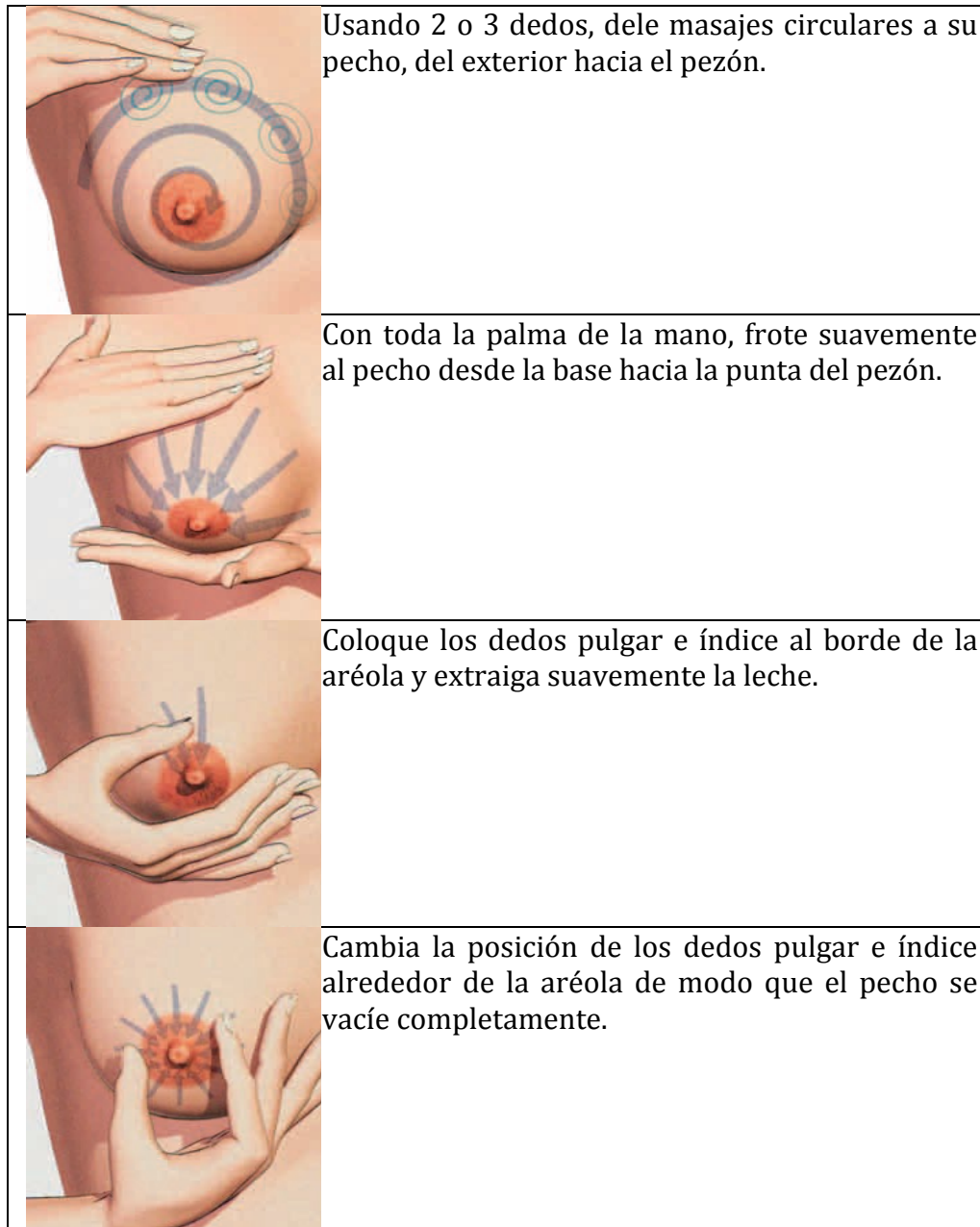
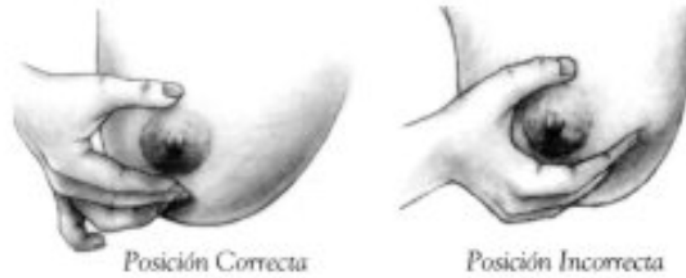


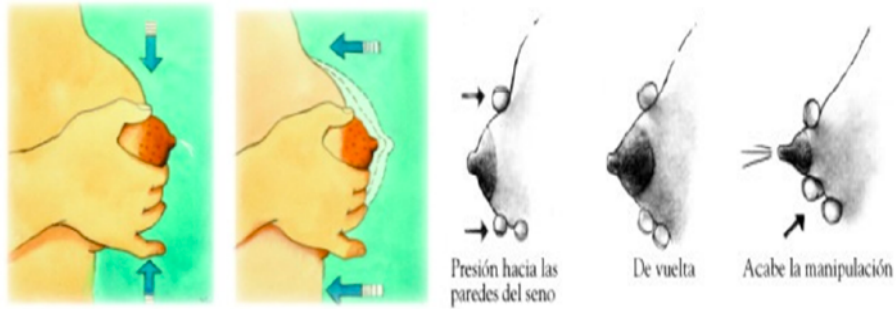
Figura 2. Instrucciones para extracción manual de calostro.

1. Pulgar y dedo índice y medio en forma de "C", unos 3 - 4 cm por detrás del pezón.



2. Empujar los dedos hacia atrás (hacia las costillas), sin separarlos.

3. Rodar los dedos y el pulgar hacia el pezón, sin deslizar.



4. Ir rodando la posición de los dedos para vaciar otras partes del pecho. Utilizar ambas manos en cada pecho.



Figura 3. Sistema de extracción eléctrico mediante bomba de recolección doble.



Las madres recibieron estas instrucciones verbalmente y por escrito (documento completo en Anexo 2).

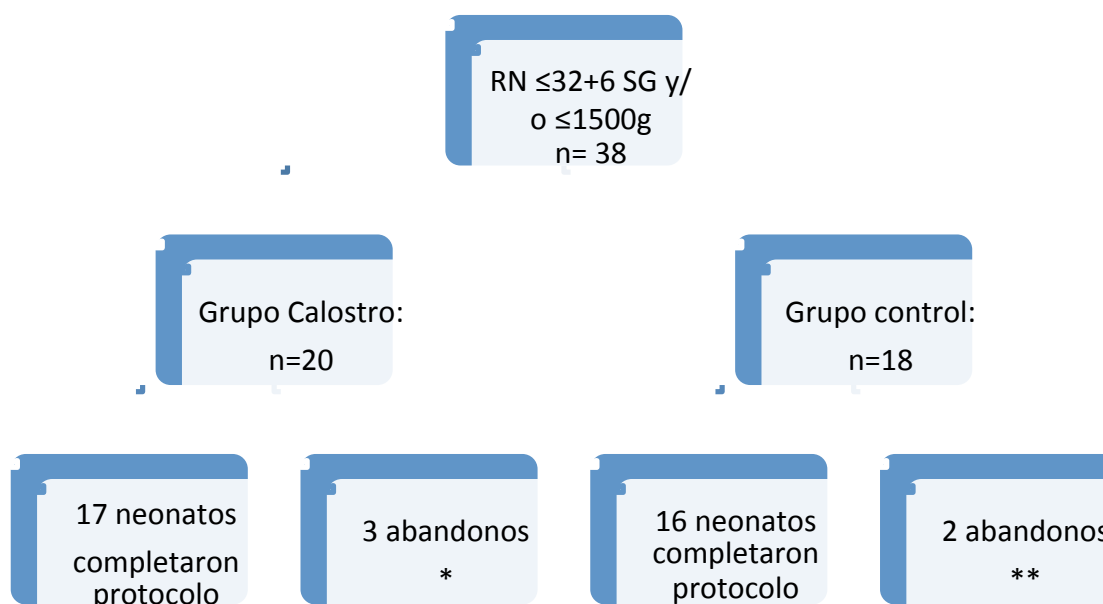
Una vez que los padres o tutores legales de los recién nacidos fueron informados y aceptaron el consentimiento informado, los sujetos fueron asignados al grupo que recibiría calostro materno (grupo calostro) si se disponía del mismo en las primeras 24 horas de vida. Por otro lado, si se evidencia imposibilidad materna de lactar o no disponibilidad de calostro en las primeras 24 horas de vida, los recién nacidos fueron incluidos en el grupo control (no administración orofaríngea de calostro materno).

La figura 4 muestra el diagrama de participación y abandono del estudio. Durante el periodo de estudio, 38 neonatos fueron incluidos en el protocolo de administración de calostro orofaríngeo. Las características de cada grupo se describen a continuación:

- Grupo calostro (N= 20): reciben 0,2 ml de calostro orofaríngeo cada 4 horas desde las primeras 24 horas de vida hasta el 15° día de vida.
- Grupo control (N=18): no reciben calostro orofaríngeo.

Hubo 5 abandonos (3 entre el grupo intervención y 2 entre controles) por fallecimiento o limitación del esfuerzo terapéutico durante los primeros 15 días de vida, de forma que no se cumplió el tiempo de seguimiento y los datos obtenidos de las muestras de sangre recogidas no se han incluido en el análisis.

Figura 4. Diagrama de flujo donde se muestran los participantes en el estudio.



* 3 pacientes fallecieron durante la primera semana de vida. Se trataba de RNPT extremos (25-26 SG) con peso < 750 g

** Hubo un fallecimiento a las 72 h de vida de RNPT de 23+5 SG y se realizó una limitación del esfuerzo terapéutico por alto riesgo de secuelas neurológicas el 5º día en un RNPT de 25 SG.

La nutrición enteral de cada paciente, independientemente del grupo asignado, fue decidida por el equipo médico responsable de su cuidado. Se inició la nutrición enteral trófica en las primeras 24-48 horas, tan pronto como fue posible, siempre que no existieran contraindicaciones para la misma.

4.2.2 Intervención

Los sujetos del grupo de intervención recibieron un total de 0,2 ml de calostro por sesión de tratamiento. Este procedimiento se llevó a cabo cada 4 horas durante los primeros 15 días de vida. En el grupo control no se administró calostro orofaríngeo durante el periodo de intervención.

El calostro era recogido por las madres en un recipiente estéril que posteriormente se entregaba directamente en la Unidad de Neonatología (Figura 5). Las jeringas se preparaban diariamente y se mantenían refrigeradas a 4°C, correctamente etiquetadas, en un frigorífico exclusivamente de leche materna en la Unidad de Neonatología (Figura 6).

Figura 5. Recipiente estéril que se le entrega a la madre para recogida de calostro.

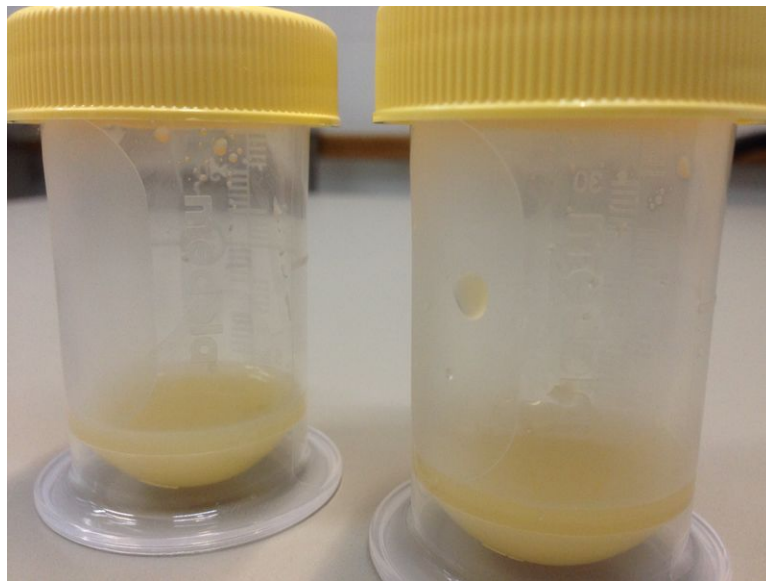


Figura 6. Jeringas estériles cargadas con calostro, correctamente identificadas y datadas.



En el caso de que se iniciara la succión nutritiva eficaz directa del pecho, el paciente del grupo control sería excluido del estudio. No hubo exclusiones por este motivo durante el período de tiempo del estudio. Si durante los primeros 3 días de intervención, se interrumpía la administración de calostro durante un plazo superior a 24 horas, el paciente era excluido del estudio, aunque la madre dispusiera de calostro posteriormente.

La enfermera responsable del cuidado del paciente administró el calostro. El procedimiento consistía en colocar la jeringa en la boca del bebé, dirigiendo hacia la orofaringe y administrar 0,1 ml (aproximadamente siete gotas) del calostro durante un período de al menos dos minutos en un lateral. Sin retirar la jeringa dentro de la boca del bebé, se redirigía la jeringa hacia lado contralateral de la mucosa bucal y se administró el 0,1 ml restante (Fig 7).

Figura 7. Administración de calostro orofaríngeo a recién nacido portador de sonda nasogástrica y sistema de ventilación no invasiva nasal.



Durante el procedimiento se vigiló la frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, saturación cutánea de oxígeno y la presión arterial, en caso de estar monitorizada de forma invasiva a través de catéter en arteria umbilical. En caso de percibirse una disminución significativa mantenida de la saturación cutánea de oxígeno inferior al 88%, bradicardia menor a 100 lpm o presentar señales de agitación o discomfort, el procedimiento se interrumpiría.

El personal de enfermería de UCIN disponía de las instrucciones para realizar la técnica a través de un documento que se mantenía en la carpeta de tratamiento de cada paciente (Anexo 3).

Cada paciente disponía de una hoja de registro en la que se recogieron variables perinatales (factores de riesgo infeccioso, utilización de antibioterapia pre-intraparto, corticoides prenatales, vía de parto, edad gestacional, parámetros antropométricos al nacimiento, uso de catéteres centrales) (Anexo 4).

4.3 VARIABLES ANALIZADAS

4.3.1 Variables independientes

- Variables Maternas: factores de riesgo infeccioso (corioamnionitis materna, cultivo Estreptococo grupo B, tiempo de amniorrexis hasta el parto); uso de antibiótico prenatal/intraparto por riesgo infeccioso; tipo de antibiótico utilizado; tipo de parto (vaginal, cesárea), corticoides prenatales.

- Variables recién nacido:
 - Al nacimiento: edad gestacional, puntuación Apgar 1/5; parámetros antropométricos al nacimiento (peso, talla, perímetro cefálico), CRIB, tipo de terapia antibiótica inicial recibida y duración de la misma.

 - Durante el tiempo de estudio: tipo de alimentación y volumen de nutrición de enteral, necesidad y tipo de soporte respiratorio, alteración en ecografía cerebral y desarrollo de retinopatía de la prematuridad al mes de vida. Para la clasificación de los hallazgos patológicos en la ecografía cerebral se ha utilizado las clasificaciones que aparecen en la tabla 6 y 7

Tabla 6. Clasificación ecográfica de la hemorragia cerebral en el recién nacido.

Grado HIV	Hallazgo ecográfico
I	Hemorragia localizada únicamente en la matriz germinal subependimaria
II	La sangre intraventricular ocupara menos del 50% del área ventricular
IIIa	La sangre ocupa un área mayor del 50% distendiendo al ventrículo
IIIb	Todos los ventrículos y cisterna magna están ocupados y dilatados
IV	Lesión en sustancia blanca secundario a infarto hemorrágico periventricular

Clasificación de Papile en 1978 modificada por Volpe (188)

Tabla 7. Clasificación de lesiones en sustancia blanca en ecografía cerebral en el recién nacido.

Grado LPV	Hallazgo ecográfico
I	Hiperecogenicidad periventricular transitoria que dura más de 7 días
II	Quistes localizados en el ángulo externo del ventrículo lateral
III	Quistes que se extienden desde el área frontoparietal hasta el área occipital
IV	Quistes que se extienden hasta la sustancia blanca subcortical

Clasificación de De Vries 1993 (189)

4.3.2 Variables dependientes:

- Clínicas:
 - Enterocolitis necrotizante: sí (Grado \geq Clasificación Bell). Los criterios de clasificación de Bell aparecen en la Tabla 8.
 - Sepsis nosocomial: sí/no
 - Sepsis comprobada: síntomas o signos clínicos de infección, marcadores biológicos de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) (recuento leucocitario alterado, PCR > 12 mg/l) y hemocultivo positivo (34).
 - Éxito: sí/no

- Analíticas:
 - Muestra de sangre: determinación IgA, IgM, lactoferrina, resistina y perfil inflamatorio (IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , INF- γ).
 - Muestra de calostro materno: determinación IgA, IgM, lactoferrina, resistina y perfil inflamatorio (IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , INF- γ).

Tabla 8. Clasificación de estadios por estadios de enterocolitis necrosante (NEC)

Estadio	Clasificación	Signos sistémicos	Signos intestinales	Signos radiológicos
IA	Sospecha NEC	Termolabilidad, apnea, bradicardia, letargia	Aumento restos gástricos, distensión abdominal, sangre oculta en heces	Normal o discreta dilatación de asas, íleo leve
IB	Sospecha NEC	Ídem IA	ídem IA + heces con sangre	Ídem IA
IIA	Demostrada, afectación leve	Ídem IA	ídem I + ausencia de ruidos intestinales con(sin abdomen tenso y doloroso	Dilatación de asas, íleo, neumatosis intestinal
IIB	Demostrada,, afectación moderada	Ídem I + acidosis y trombocitopenia leves	Ídem IIA + clara tensión abdominal, con/sin celulitis abdominal o masa en cuadrante derecho inferior	Ídem IIA + gas en vena porta, con/sin ascitis
IIIA	Avanzada, grave. No perforación visceral	Ídem IIB + hipotensión, bradicardia, apnea grave, acidosis mixta, CID, neutropenia	Ídem IIB + signos de peritonitis generalizada	Ídem IIB + ascitis franca
IIIB	Avanzada, grave, con perforación	Ídem IIIA	Ídem IIIA	Ídem IIB + neumoperitoneo

Clasificación de Bell 1978, modificada por Walsh MC y Kliegman RM en 1986 (33)

4.4 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS

4.4.1 Obtención de las muestras de sangre y calostro

En la figura 8 aparece resumido el plan de trabajo seguido en este estudio. Para valorar los efectos inmunológicos de la administración del calostro orofaríngeo se recogieron 4 muestras de sangre a lo largo del primer mes de vida: M1 (al ingreso, y siempre antes de las 24 h vida), M2 (3° día de vida), M3 (15° día de vida) y M4 (30° día de vida). Estas extracciones se hicieron coincidir con los controles analíticos habituales que se realizan por protocolo al ingreso, con el despistaje de metabolopatías y seguimiento en los pacientes prematuros ingresados en UCIN).

La muestra de calostro del grupo intervención se recogió en los primeros 3 días postparto.

Las muestras fueron identificadas con el nombre del paciente y número de historia clínica por el personal de enfermería encargado del cuidado del paciente.

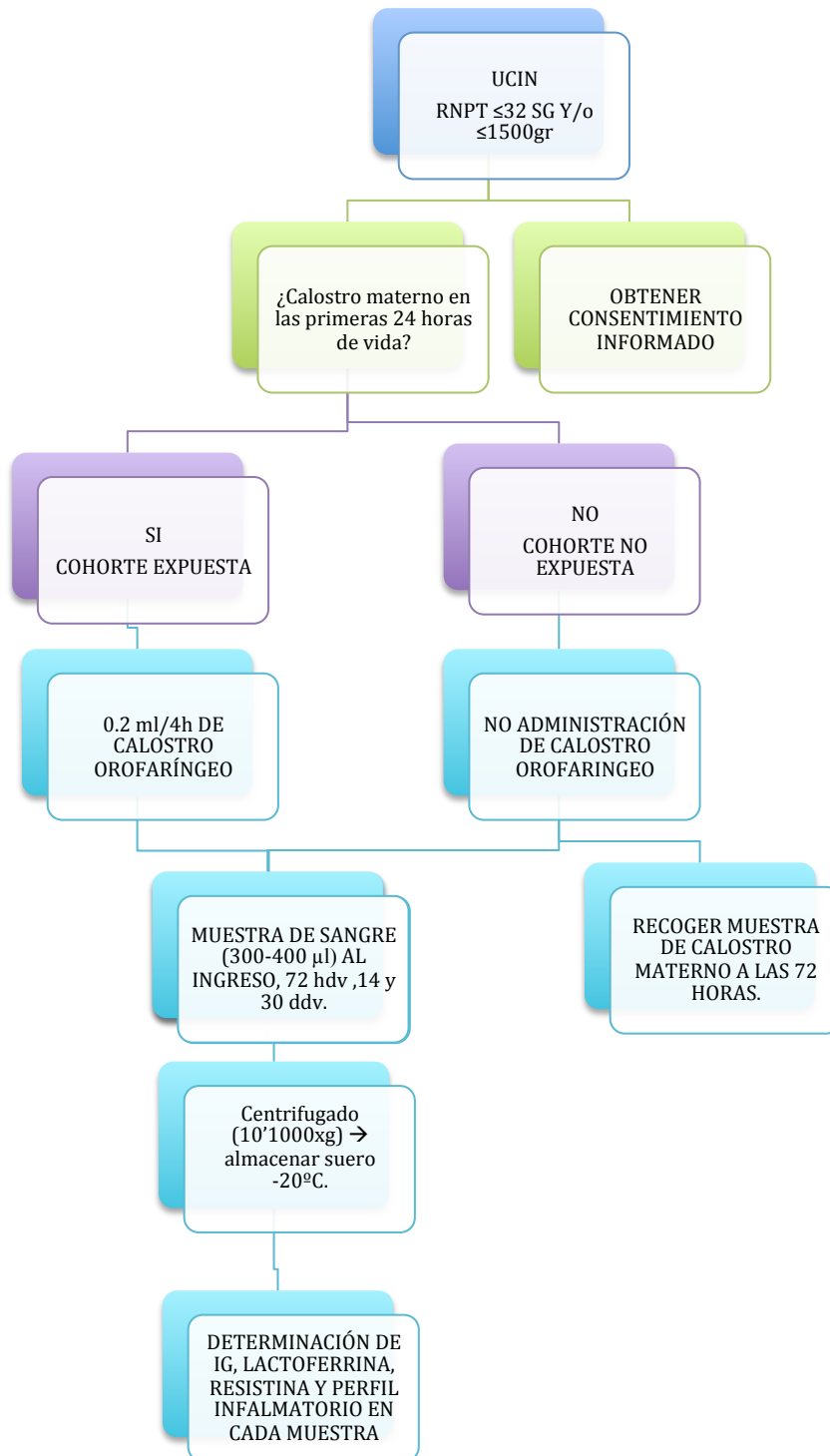
Las muestras de sangre se recogieron en tubos de micrométodo (0,6 ml), se dejaron coagular durante 30 minutos y posteriormente se centrifugaron durante 10 min a 1000xg. El suero obtenido se alicuotó y fue almacenado a -20° C hasta ser analizado.

La muestra de calostro se alicuotó y congeló a -20°C. La muestra de calostro del grupo intervención se recogió en los primeros 3 días postparto y se congeló igualmente a -20° C. Para evitar la interferencia del contenido graso de la leche en el inmunoanálisis, se centrifugó la muestra a 800xg durante 10 min a 4°C. La fase acuosa-proteica se separó y las alicuotas obtenidas se congelaron a -80°C hasta ser analizadas.

En cada muestra se determinó:

- Muestra de sangre: determinación IgA, IgM, lactoferrina, resistina y perfil inflamatorio (IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , INF- γ).
- Muestra de calostro materno: determinación IgA, IgM, lactoferrina, resistina y perfil inflamatorio (IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , INF- γ).

Figura 8. Plan de trabajo del estudio.



4.4.2 Análisis y procesamiento de las muestras

4.4.2.1 Determinación de citoquinas en suero

Los niveles de citoquinas se midieron mediante el kit comercial de EMD Millipore's MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine (HCYTOMAG-60k), usando el Citómetro de placas Luminex 200, Luminex Corporation (Austin, Estados Unidos) y el software xPONENT (un software para la adquisición y análisis de datos con equipos Luminex). Este kit permite la cuantificación simultánea de las siguientes 41 citoquinas y quimioquinas humanas. Entre ellas, hemos utilizado las siguientes: IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ .

4.4.2.1.1. Preparación de los controles de calidad.

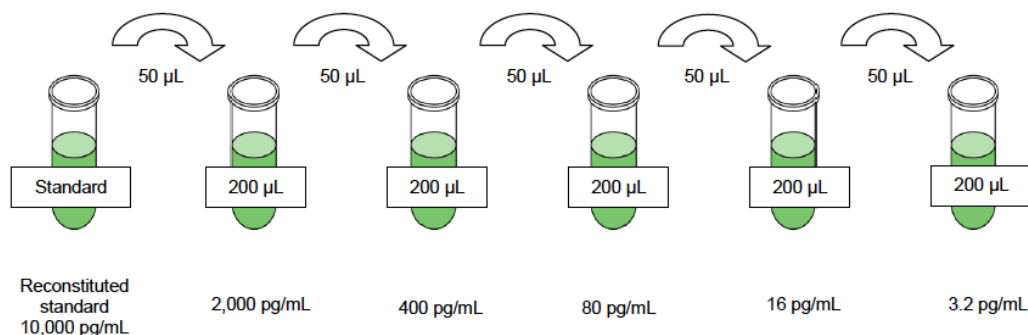
Se prepararon dos controles de calidad uno para valores altos de concentración y otro para valores bajos de concentración. Se reconstituyeron con 250 μ l de agua bidestilada, se mezclaron por inversión y se dejaron reposar 5-10 minutos.

4.4.2.1.2 Preparación de las curvas estándar de las citoquinas estudiadas

En primer lugar se realizó un estándar madre de 10000 pg/mL. Para ello se reconstituyó el estándar de la casa comercial en 250 μ l de agua bidestilada, se mezcló bien y se dejó reposar 5-10 minutos.

La curva estándar a utilizar se realizó mediante diluciones sucesivas de esta "madre". Se etiquetaron cinco tubos de microcentrífuga de polipropileno, de 2000, 400, 80, 16 y 3,2 pg/mL. Añadimos 200 μ L de tampón en cada uno de ellos. A continuación se preparan diluciones seriadas añadiendo 50 μ L del estándar reconstituido de 10.000 pg/mL al tubo de 2000 pg/mL. Se mezcla bien y se transfieren 50 μ L al tubo de 400 pg/mL. Volver a mezclar bien y transferir 50 μ L de esta dilución al tubo de 80 pg/mL, mezclar bien y transferir 50 μ L del estándar de 80 pg/mL al tubo de 16 pg/mL. Finalmente volver a mezclar y transferir 50 μ L de éste al tubo de 3,2 pg/mL. El estándar de 0 pg/mL será tampón de ensayo. Figura 9.

Figura 9. Esquema de las diluciones seriadas en el kit comercial EMD Millipore's MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine (HCYTOMAG-60k)



4.4.2.1.3 Procedimiento de inmunoensayo.

En primer lugar se preparó la placa siguiendo las indicaciones de la casa comercial. A continuación se añadieron 25 µL de la solución matriz a los pocillos del estándar y control y 25 µL del tampón ensayo a los pocillos de las muestras. Posteriormente se adicionaron 25 µL de muestra dentro del pocillo correspondiente a las muestras y 25 µL de estándar y control. A continuación se añadieron 25 µL de microesferas, que contenían los anticuerpos, a cada pocillo.

La placa se incubó toda la noche a 4°C y con una ligera agitación. A la mañana siguiente se retiró el contenido con suavidad y se realizaron dos lavados con 200 µL de buffer de lavado siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Se adicionaron a cada pocillo 25 µL de microesferas con el anticuerpo de detección (MXH1060-1) y se incubó la placa a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos. Esto resulta en la formación de un sándwich de anticuerpos alrededor de la citoquina, quimioquina y factores de crecimiento diana. Tras 3 lavados, se adicionó la solución de estreptavidina-ficoeritrina (L-SAPE9) a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos. La SAPE se unió al anticuerpo de detección biotinilado en la superficie de la microesfera. Posteriormente, se realizaron una serie de lavados antes de la detección.

Los datos de la reacción se adquieren usando el sistema Luminex 200® (Austin, TX, EEUU) que es un instrumento basado en citometría de flujo que permite cuantificar la intensidad de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en la superficie de las microesferas. Además, incluye un sistema informático de captura, procesamiento y transformación de la señal fluorescente en señal digital, permitiendo así el análisis de los resultados. Uno de los láseres emite una radiación con una longitud de onda capaz de excitar las moléculas de fluorocromo contenidas en las microesferas. La intensidad de la fluorescencia emitida por éstas permite diferenciar el analito que se mide en cada caso (fluorescencia interna de las microesferas). El otro láser excita las moléculas de ficoeritrina (PE) que se añaden al final del ensayo (fluorescencia en la superficie de las microesferas). El sistema óptico de detección del Luminex® permite revelar la intensidad de la reacción que tiene lugar en la superficie de las microesferas y el software del Luminex® (xPONENT) calcula automáticamente la concentración de cada citoquina en la muestra problema, empleando una curva estándar derivada de una suspensión de citoquinas estándar, de concentración conocida y de la que se hacen diluciones seriadas.

Las condiciones del equipo Luminex 200® se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones del equipo Luminex 200® para la determinación de citoquinas.

Events:	50, per bead
Sample Size:	100 µL
Gate Settings:	8,000 to 15,000
Reporter Gain:	Default (low PMT)
Time Out:	60 seconds
Bead Set:	Customizable 41-Plex Beads
IFNγ	25
IL-10	27
IL-1RA	42
IL-6	57
IL-8	63
TNFα	75

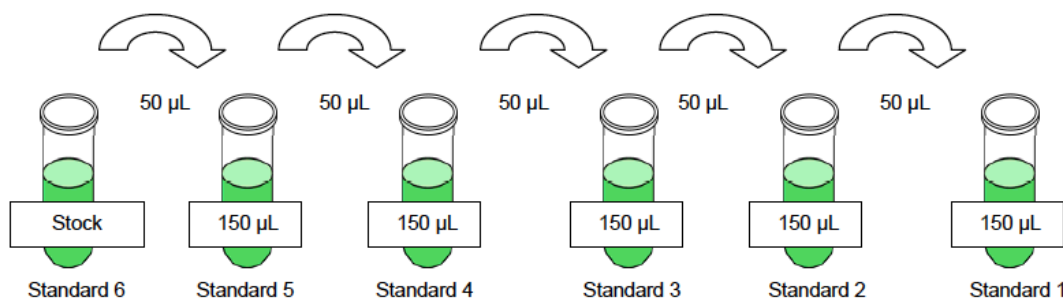
4.4.2.2 Determinación de lactoferrina y resistina

Las concentraciones de Lactoferrina y Resistina en suero se realizaron mediante el Kit comercial MILLIPLEX® MAP HUMAN SEPSIS PANEL 3 MAGNETIC BEAD panel kit 96-Well Plate Assay HSP3MAG-63K. Este kit se utiliza para la determinación simultánea de los siguientes analitos implicados en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica: Lactoferrina, Elastasa 2, Resistina, Trombospondina-1, NGAL. En nuestro estudio, siguiendo las instrucciones de la casa comercial, se midieron lactoferrina y resistina.

Los procedimientos de preparación los controles de calidad, microesferas con anticuerpos dirigidos frente a los analitos, en este caso lactoferrina y resistina, el tampón de lavado y el estándar del Panel de Sepsis Humano fueron similares a los descritos en el apartado anterior para la determinación de citoquinas.

En la preparación de la curva patrón se utilizaron seis estándares. Se etiquetaron seis tubos de microcentrífuga de polipropileno, pero con concentraciones diferentes al panel anterior, según se puede ver en la figura 10.

Figura 10. Esquema de las diluciones seriadas y concentraciones obtenidas en el kit MILLIPLEX® MAP HUMAN SEPSIS PANEL 3 MAGNETIC BEAD panel Kit 96-Well Plate Assay (HSP3MAG-63K)



Standard Dilution	Elastase 2 (pg/mL)	Lactoferrin & Thrombospondin-1 (pg/mL)	NGAL (pg/mL)	Resistin (pg/mL)
Standard 6	20,000	200,000	30,000	10,000
Standard 5	5,000	50,000	7,500	2,500
Standard 4	1,250	12,500	1,875	625
Standard 3	313	3,125	469	156
Standard 2	78	781	117	39
Standard 1	20	195	29	10

En el procedimiento de inmunoensayo se siguen los mismos pasos que en el panel HCYTOMAG-60k.

Las condiciones del equipo Luminex 200® que se utilizaron se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Condiciones del equipo Luminex 200® para la determinación de lactoferrina y resistina.

Events	50, per bead
Sample Size:	50 µL
Gate Settings	8,000 to 15,000
Reporter Gain	Default (low PMT)
Time Out	60 seconds
Bead Set	Customizable 41-Plex Beads
Lactoferrin	51
Resistin	64

4.4.2.3 Determinación de Inmunoglobulina M

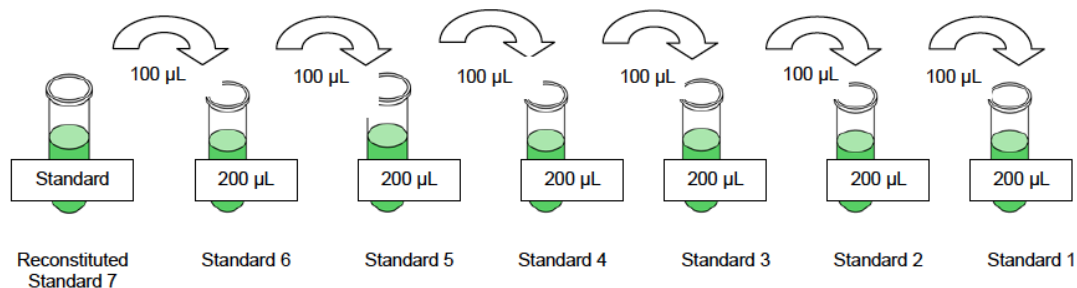
Las determinaciones de Ig M en suero se hicieron con MILLIPLEX® MAP Human Immunoglobulin Isotyping Magnetic Bead Panel 96 Well Plate Assay. Este panel se utiliza para la cuantificación de los siguientes seis analitos: IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, and IgA.

4.4.2.3.1 Preparación de los controles de calidad y curva patrón para IgM.

Este panel tiene una serie de particularidades en la preparación de los estándares con respecto a los anteriores.

Se reconstituyó el estándar MILLIPLEX MAP Human Multi-Inmunoglobulin en 0,5 ml de agua desionizada. Se mezcló a alta velocidad durante 15 segundos. A continuación se dejó en hielo durante 15 minutos. Este estándar fue el estándar 7. La curva estándar a utilizar se realizó mediante diluciones sucesivas de esta “madre”. Se etiquetaron nuevamente 6 tubos de microcentrífuga de polipropileno y se añadieron 200 μ L del tampón de ensayo en cada uno de los tubos. A continuación se realizaron diluciones seriadas de 100 μ L del estándar 7 al 6, de la mezcla resultante 100 μ L al estándar 5 y así sucesivamente. El estándar 0 fue el tampón ensayo. Figura 11.

Figura 11. Esquema de diluciones seriadas en la preparación de la curva patrón para el kit MILLIPLEX® MAP Human Immunoglobulin Isotyping Magnetic Bead Panel 96 Well Plate Assay.



Después de las diluciones seriadas, los tubos obtenidos tendrían las concentraciones que aparecen en la tabla 11.

Tabla 11. Tabla de concentraciones recogida dentro de las indicaciones de la casa comercial para el MILLIPLEX® MAP Human Immunoglobulin Isotyping Magnetic Bead Panel 96 Well Plate Assay

Standard Tube #	IgG1 (ng/mL)	IgG2 (ng/mL)	IgG3 (ng/mL)	IgG4 (ng/mL)	IgA (ng/mL)	IgM (ng/mL)
1	14	41	0.2	0.4	2.1	3.4
2	41	124	0.6	1.2	6.2	10.3
3	124	370	1.9	3.7	18.5	30.9
4	370	1111	5.6	11.1	55.6	92.6
5	1111	3333	16.7	33.3	166.7	278
6	3333	10000	50	100	500	833
7	10000	30000	150	300	1500	2500

4.4.2.3.2 Procedimiento de inmunoensayo

En primer lugar se preparó la placa siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Se añadieron 50 µL del control, el estándar o la muestra diluida en cada pocillo. A continuación se adicionaron las microesferas de MILLIPLEX MAP Anti-Human Multi-Immunoglobulin. Se cubrió con una placa opaca y se incubó durante 1 hora en un agitador de placa a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la placa dos veces con el tampón de lavado, retirándolo después de cada lavado mediante un sistema de aspiración.

Una vez realizado el lavado, se añadieron 25 µL por pocillo de la dilución de anticuerpos frente a las cadenas ligeras κ y λ de los anticuerpos (Anti-human κ and λ light Chain, PE). Se cubrió de nuevo con una placa opaca y se incubó durante 1 hora sobre un agitador de placas a temperatura ambiente. Por último se realizaron una serie de lavados mediante aspirado de fluido y resuspensión final, antes de pasar a la detección de la reacción mediante el sistema Luminex 200® (Austin, TX, EEUU).

Las condiciones del equipo Luminex 200® para la determinación de IgM se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Condiciones del equipo Luminex 200® para la determinación de IgM.

Events:	50, per bead
Sample Size	100 µL
Gate Settings	8,000 to 15,000
Reporter Gain	Default (low PMT)
Time Out	60 seconds
Bead Set	Customizable 41-Plex Beads
IgM	18

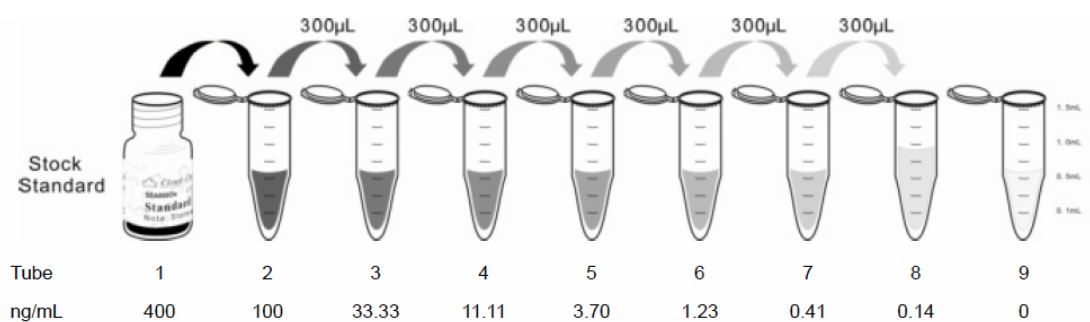
4.4.2.4. Determinación de Inmunoglobulina A

Las determinaciones de IgA en suero y en leche materna se realizaron utilizando ELISA-Kit para cuantificación de IgA en suero, plasma y otros líquidos biológicos (SEA546Hu 96 Tests Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Immunoglobulin A, Clud-Clone Corp, Houston, USA).

4.4.2.4.1 Preparación de los reactivos y estándares de trabajo

Para la preparación del estándar, se reconstituyó con 1 ml de diluyente estándar, disponible en el Kit, y se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente agitando suavemente. La solución estándar tenía una concentración de 100 ng/ml. Se prepararon 7 tubos con 0,6 ml del diluyente estándar y a continuación se realizó una triple dilución seriada tal y como aparece en la siguiente figura 12.

Figura 12. Esquema de diluciones seriadas en el ELISA-kit para cuantificación de IgA



El estándar 9 fue la dilución en blanco.

Los reactivos de detección A y B se diluyeron también en diluyente de ensayo hasta una concentración 1:100.

Las muestras de suero requirieron una dilución con una concentración 1:50000.

4.4.2.4.2 Procedimiento de ensayo

Se prepararon 7 pocillos para los estándares y 1 para la solución en blanco. Se añadieron 100 μL de cada uno de las diluciones de estándares, en blanco y muestras en los correspondientes pocillos. A continuación se incubó durante 2 horas a 37°C.

Posteriormente se eliminó el líquido de cada pocillo, pero sin lavar y se adicionaron 100 μL de la solución de trabajo del reactivo A en cada pocillo. Después de realizar el sellado con una placa se volvió a incubar durante 1 h a 37°C. A continuación se llevaron a cabo un total de tres lavados y posteriormente se retiraron todos los restos de líquido mediante aspirado o decantación. Se adicionó el reactivo de Detección B y se incubó durante 30 minutos a la misma temperatura. A continuación se realizaron lavados seriados, cinco, y se añadieron 90 μL de la Solución Substrato en cada pocillo. El líquido tomó un color azul. Esta nueva mezcla se incubó durante 15-25 minutos a 37°C, protegida de la luz. A continuación se añadieron 50 μL de la solución Stop en cada pocillo y el líquido cambió a un color amarillo. Se retiró cualquier gota de agua. La muestra de esta forma está preparada para el análisis con el lector de microplaca.

El promedio de la lectura de cada estándar, control y muestra se utilizó para construir una curva estándar, en la cual en el eje de abscisas aparecería la densidad óptica y en el de ordenadas la concentración en ng/ml

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron introducidos, de forma anónima, en la base de datos general del estudio, (sistema informático IBM SPSS Statistics 19).

Se realizó un análisis descriptivo de las variables de interés, calculando medidas de tendencia central y dispersión para las numéricas, y frecuencias absolutas y relativas para las cualitativas. Se comprobó la normalidad de las variables con el test de Shapiro - Wilks.

Para comparar las características basales entre los grupos caso y control se llevo a cabo un análisis bivalente. Para las variables numéricas se utilizó el test t de Student para muestras independientes o Mann-Whitney en caso de no normalidad. En el caso de las variables cualitativas, se empleó el test chi-cuadrado de Pearson o Fisher en los casos en los que no se cumplieron las condiciones de aplicabilidad.

Para analizar la evolución de los inmunomarcadores en los distintos momentos medidos entre casos y controles, se ha realizado un Modelo Lineal General de medidas repetidas, considerando como factor intra-sujetos los 4 momentos de tiempo estudiados (primeras 24 horas de vida, día 3, día 15 y día 30) y como factor inter-sujetos el grupo (calostro y control). La hipótesis de esfericidad se contrastó con el test de Mauchy, y en los casos en los que no se cumplió se utilizó el contraste de Greenhouse-Geisser.

Adicionalmente, para contrastar posibles diferencias en los valores de IgA, IgM, lactoferrina, resistina, IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e INF- γ recogidos en sangre entre los grupos intervención y control, se utilizó el test de comparación de medias para muestras independientes t de Student y Mann-Whitney para los casos no normales.

Para analizar la evolución de los niveles de IgA, IgM, Lactoferrina, Resistina, IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e INF- γ en los distintos momentos estudiados se utilizó el test t-Student para datos pareados y Wilcoxon en los casos que no se cumpliera la hipótesis de normalidad.

Dentro de los objetivos secundarios en los que se valora la repercusión clínica de la administración de calostro, para analizar la relación entre los distintos inmunomarcadores y la presencia de sepsis o NEC en los momentos M3 y M4 y retinopatía, se ha contrastado con el test no paramétrico de Mann-Whitney, debido a que el reducido número de eventos no permitió la realización de los correspondientes test paramétricos.

Para todos los contrastes se consideró un nivel de significación de 0.05.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS PERINATALES DE LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS

Analizamos los antecedentes prenatales de ambos grupos, como se muestra en la Tabla 13. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia de factores de riesgo infeccioso, la administración de corticoides a la madre, la presencia de factores de riesgo infeccioso en el momento del parto (madre portadora de SGB, diagnóstico de corioamnionitis, fiebre intraparto y rotura prolongada de membranas mayor a 18 horas), así como en la vía de finalización del parto ni administración de antibioterapia intraparto.

Las características neonatales de nuestros pacientes aparecen recogidas en la Tabla 14. Los 33 recién nacidos que participaron en el estudio tenían una edad gestacional media de 29,85 semanas de gestación (EEM $\pm 0,47$) y un peso medio fue de 1301,82 g (EEM $\pm 59,10$). No se han obtenido diferencias estadísticamente significativas en la comparativa por grupos en las variables edad gestacional y datos antropométricos (peso, longitud y perímetro cefálico al nacimiento). La puntuación de test Apgar al minuto de vida es significativamente menor en los niños del grupo Calostro frente al del grupo control ($p=0,03$). No obstante en la puntuación final a los 5 min, así como en el índice de gravedad CRIB, no se han encontrado diferencias.

Estos análisis demuestran que nuestros grupos son grupos homogéneos al comienzo del estudio.

Tabla 13. Antecedentes prenatales de los participantes en el estudio

	Calostro (N=17)	Control (N=16)	<i>p</i>
Vía de parto:			
• Vaginal	7	5	0,81
• Cesárea	10	11	
Corticoides prenatales			
• Sí	13	12	1
• No	4	4	
Riesgo infección amniótica: Si/No:			
• SGB materno	2/14	4/13	0,65
• Corioamnionitis			
• Fiebre materna intraparto			
• Rotura prematura de membranas			
Antibióterapia intraparto			
• Sí	12	16	0,10
• No	3	0	

Valor representado: número total de pacientes

Tabla 14. Características neonatales de los recién nacidos participantes en el estudio.

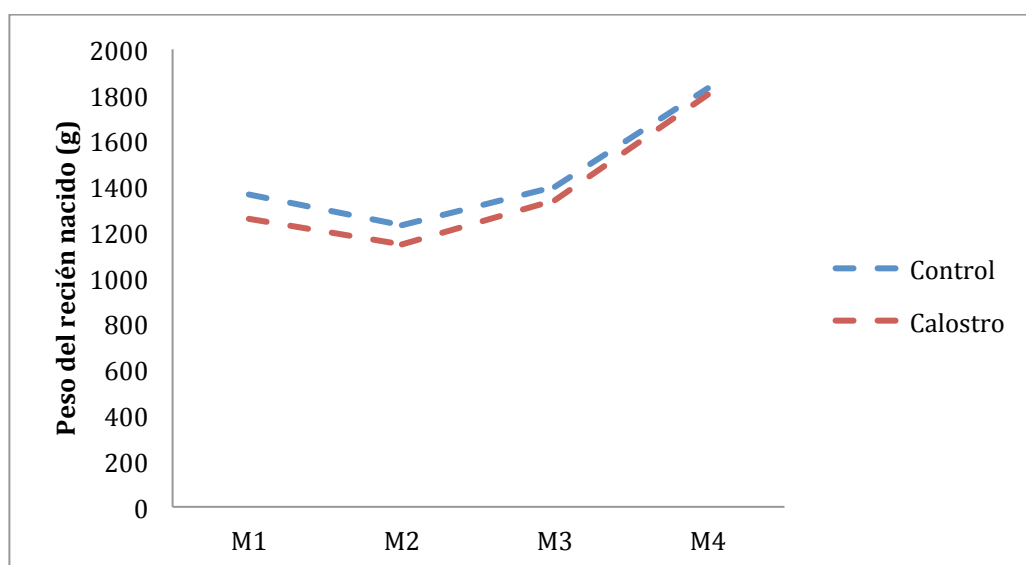
	Calostro (N=17)	Control (N=17)	<i>p</i>
Edad gestacional (SG)	29,82 (±0,71)	29,88 (±0,44)	0,95
Peso al nacimiento (g)	1259,41 (±87,07)	1346,87 (±80,72)	0,47
Longitud al nacimiento (cm)	38,62 (±0,85)	39,75 (±0,84)	0,34
Perímetro cefálico nacimiento (cm)	26,93 (±0,67)	27,59 (±0,56)	0,45
Sexo: M/F	11/6	11/5	1
Apgar 1 min	5,88 (±0,51)	7,31 (±0,51)	0,03
Apgar 5 min	7,94 (±0,26)	8,38 (0,25)	0,12
Puntuación CRIB al ingreso	2,63 (±0,81)	1,94 (±0,50)	0,84

Valores medios (±EEM)

5.2 EVOLUCIÓN DEL PESO DURANTE EL ESTUDIO

La gráfica 1 muestra que la ganancia ponderal de los pacientes a lo largo del primer mes de vida no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo calostro: 1363,85 g ($\pm 98,12$) vs 1257,86g ($\pm 101,99$) ($p = 0,46$) para M1; 1230,31g ($\pm 79,24$) vs 1145,71g ($\pm 79,24$) ($p = 0,48$) para M2; 1400,00g ($\pm 98,29$) vs 1338,93g ($\pm 99,16$) ($p = 0,67$) para M3; 1830,00g ($\pm 161,03$) vs 1802,50g ($\pm 113,80$) ($p = 0,89$) para M4.

Gráfica 1. Evolución del peso de los pacientes durante el estudio



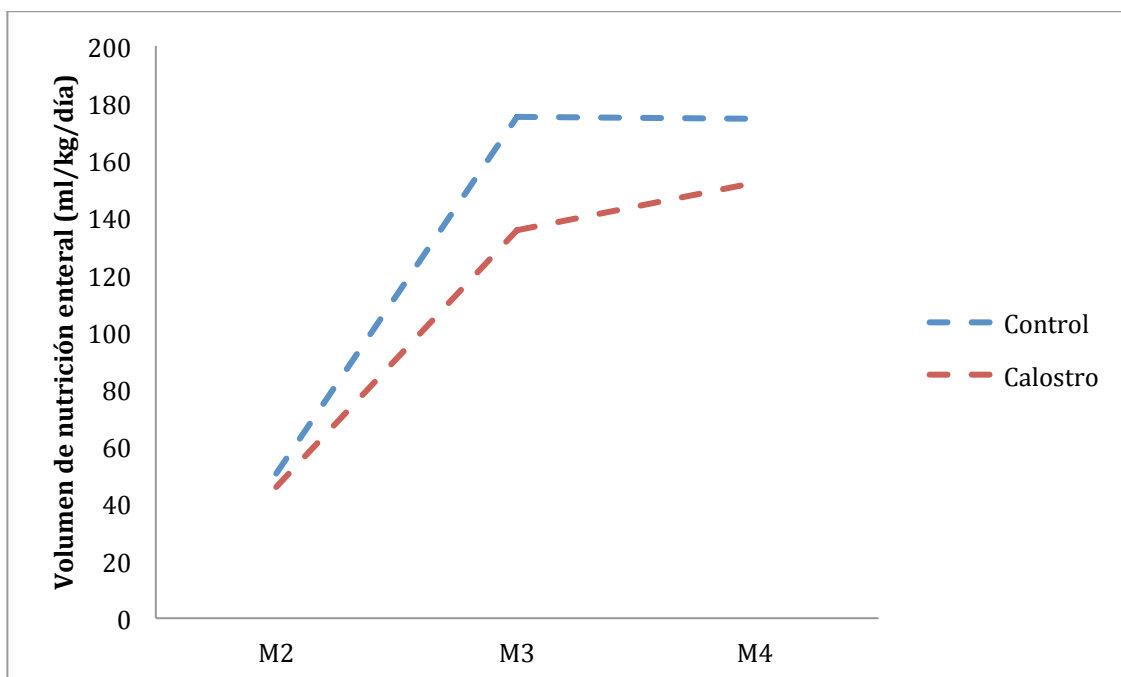
Descripción de la ganancia ponderal de los pacientes durante el estudio. M1: nacimiento; M2: 3º día de vida; M3: 15º día de vida; M4: 30º día de vida. Valores representados: media

5.3 EVOLUCIÓN Y TIPO DE NUTRICIÓN ENTERAL RECIBIDA DURANTE EL ESTUDIO

5.3.1 Volumen de nutrición enteral

En la gráfica 2 se puede observar la evolución del volumen de nutrición enteral de cada grupo de pacientes durante el periodo de estudio. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los valores registrados en cada momento del estudio: M2 50,56 ml/kg/día ($\pm 7,34$) vs 45,86 ml/kg/día ($\pm 8,01$) $p = 0,637$; M3 175,13 ml/kg/día ($\pm 2,04$) vs 135,5 ml/kg/día ($\pm 18,56$) $p = 0,34$; M4 174,64 ml/kg/día ($\pm 2,05$) vs 152,29 ml/kg/día ($\pm 15,83$) $p = 0,35$.

Gráfica 2. Evolución del volumen de nutrición enteral recibida durante el estudio.



Descripción del volumen de nutrición enteral de los pacientes durante el estudio.; M2: 3º día de vida; M3: 15º día de vida; M4: 30º día de vida. Valores representados: media

5.3.2 Tiempo hasta alcanzar nutrición enteral completa

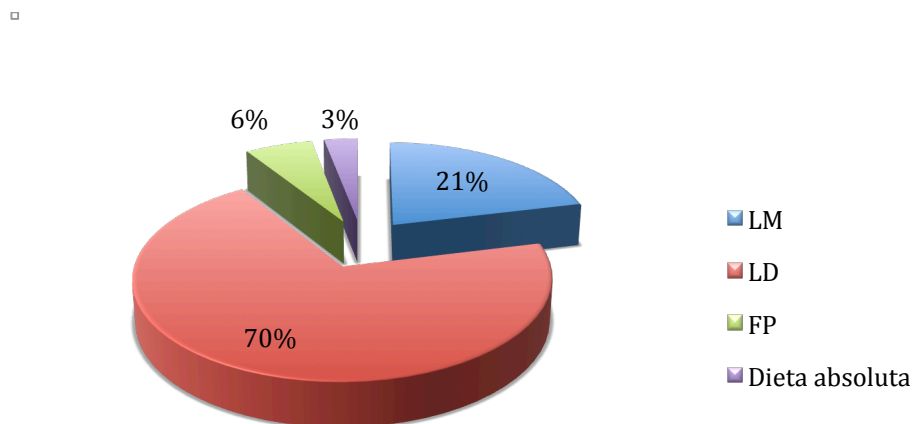
El tiempo requerido hasta alcanzar la nutrición enteral completa ha sido inferior en 1,5 días en el grupo calostro (6,64 vs 8,10 días de media), aunque esta diferencia no ha sido estadísticamente significativa ($p = 0,56$).

5.3.3 Tipo de nutrición enteral recibida

Durante el periodo de intervención, primeros quince días de vida, dos pacientes no han cumplido criterios para recibir nutrición enteral o han precisado interrumpir la nutrición enteral trófica que se había iniciado.

El gráfico 3 muestra el tipo de nutrición enteral a las 72 horas de vida (M2). En este momento del estudio el 93% de los pacientes reciben nutrición enteral con leche humana. De estos, el 23,3% lo hacen exclusivamente con leche materna de su propia madre y el 76,7% precisan la administración de leche humana procedente del Banco de Leche Humana del Hospital Virgen de las Nieves de Granada.

Gráfica 3. Tipo de nutrición enteral recibida por los pacientes del estudio en el tercer día de vida.

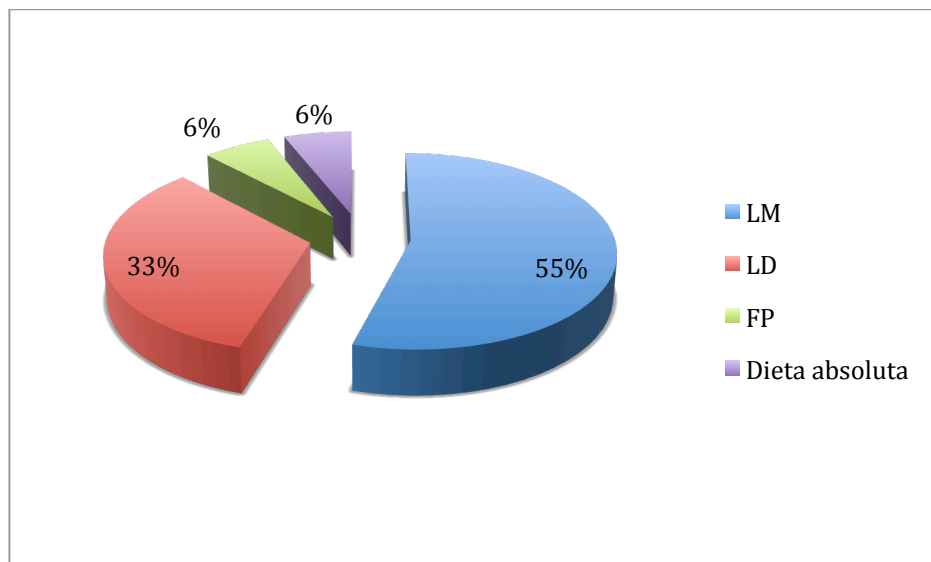


Descripción del tipo de alimento recibido por los pacientes del estudio a las 72 horas de vida. Valores representados: porcentaje LM: leche materna. LD: leche humana donada procedente de Banco de Leche Humana. FP: fórmula de prematuros

En el análisis por grupos, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de niños que recibían leche humana procedente de Banco de Leche Humana entre el grupo calostro y el grupo control ($p = 0,20$).

El gráfico 4 muestra el tipo de nutrición enteral a los 15 días de vida (M3). El porcentaje de pacientes que reciben leche humana se mantiene en el 87,90%. En este momento del estudio dos pacientes se mantienen a dieta absoluta y dos reciben alimentación mediante fórmula de prematuros. El porcentaje de lactancia materna exclusiva asciende al 63,3%, mientras que el 36,7% de los niños precisan aún leche humana donada procedente de Banco de Leche Humana.

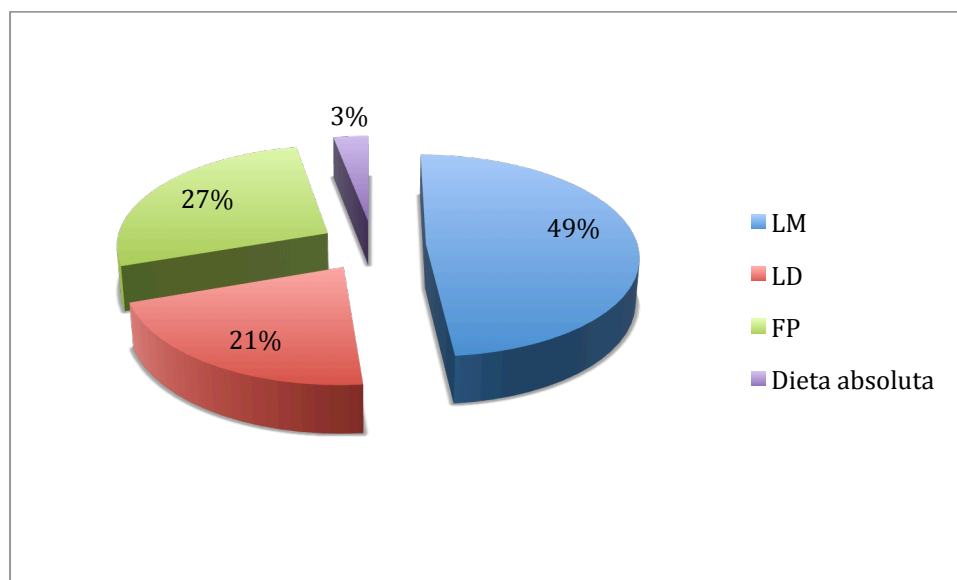
Gráfica 4. Tipo de nutrición enteral recibida por los pacientes del estudio en el 15° día de vida.



Descripción del tipo de alimento recibido por los pacientes del estudio a los 15 días de vida. Valores representados: porcentaje LM: leche materna. LD: leche humana donada procedente de Banco de Leche Humana. FP: fórmula de prematuros

Al mes de vida (M4), como se puede ver en el gráfico 5 el 70% de los neonatos reciben leche humana. El número de pacientes en el que en este momento se administra leche humana procedente de Banco de Leche Humana se descende una tercera parte con respecto al momento anterior (21%). El aumento del consumo de fórmula de prematuros, en el 30° día de vida, se produce principalmente en el grupo control. En el análisis recepción de leche humana frente a fórmula de prematuros se obtiene un resultado estadísticamente significativo $p = 0,046$

Gráfico 5. Tipo de nutrición enteral recibida por los pacientes del estudio en el 30° día de vida.



Descripción del tipo de alimento recibido por los pacientes del estudio a los 30 días de vida. Valores representados: porcentaje LM: leche materna. LD: leche humana donada procedente de Banco de Leche Humana. FP: fórmula de prematuros

5.4 MORBILIDAD DURANTE EL TIEMPO DE ESTUDIO

La tabla 15 recoge las principales comorbilidades presentadas durante el tiempo de estudio, sin tener en cuenta las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria ni el desarrollo de enterocolitis necrotizante, ya que estas dos últimos se analizarán detalladamente dentro del punto 12 de este capítulo de resultados.

El 24% de los pacientes han precisado ventilación mecánica durante el primer mes de vida, tres del grupo calostro y cinco del grupo control. No obstante el número de pacientes que han recibido ventilación no invasiva, en su mayoría modalidad CPAP nasal, alcanza el 85%. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en entre grupos con respecto a la necesidad y tipo de soporte respiratorio.

A nivel neurológico, el 48,5% de los pacientes de nuestro estudio presentan un hallazgo patológico en la ecografía cerebral del 1º mes de vida. En el análisis por grupos, se ha visto que el porcentaje es mayor dentro del grupo calostro, aunque no se ha demostrado una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,12$). Las lesiones predominantes, en ambos grupos, son lesiones de sustancia blanca (leucomalacia periventricular grado I) y hemorragia intraventricular grado I-II.

La valoración oftalmológica al mes de vida ha evidenciado el desarrollo de retinopatía de la prematuridad en el 15% de los pacientes del estudio. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Tabla 15. Descripción de las principales comorbilidades registradas durante el estudio.

	Calostro (N=17)	Control (N=16)	<i>p</i>
Ventilación mecánica			<i>0,44</i>
• Sí	3	5	
• No	14	11	
Ventilación no invasiva			<i>0,66</i>
• Sí	15	13	
• No	2	3	
Alteración en ecografía cerebral 1º mes de vida			<i>0,12</i>
• Sí	11	5	
• No	6	11	
Tipo de lesión en ecografía cerebral			<i>1</i>
• Lesión sustancia blanca	3	2	
• HIV I-II	7	3	
• HIV III-IV	1	0	
• Mixta	0	0	
Retinopatía de la prematuridad 1º mes de vida	3	2	<i>1</i>

Valor representado: número de pacientes

5.5 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS EN SUERO

5.5.1 Inmunoglobulina A

La evolución de los niveles de inmunoglobulina A en suero a lo largo del tiempo de estudio se muestran en la gráfica 6 y los datos de IgA para cada momento y grupo se resumen en la tabla 16.

En el momento basal del estudio (M1), no se encuentran diferencias en la concentración sérica de IgA entre ambos grupos.

Durante el tiempo de estudio se produce un incremento estadísticamente significativo de los niveles medios de IgA sérica, tanto en el grupo calostro como en el grupo control. Según el modelo lineal de medias repetidas MLG (Anova de medidas repetidas), existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de IgA en el tiempo ($p < 0.001$) en el grupo de pacientes estudiados.

En la comparativa entre grupos durante la intervención, encontramos niveles más altos de IgA en el suero del grupo calostro que en el control, aunque no se han podido demostrar diferencias estadísticamente significativas. Al finalizar la intervención (M3), sí existe una tendencia a la significación en la comparación.

No obstante, al mes de vida, aunque se produce un aumento en los dos grupos, la concentración media de IgA en el grupo de niños que han recibido calostro orofaríngeo durante los primeros quince días de vida es significativamente mayor ($p = 0,026$).

Tabla 16. Valores de IgA sérica registrados durante el estudio.

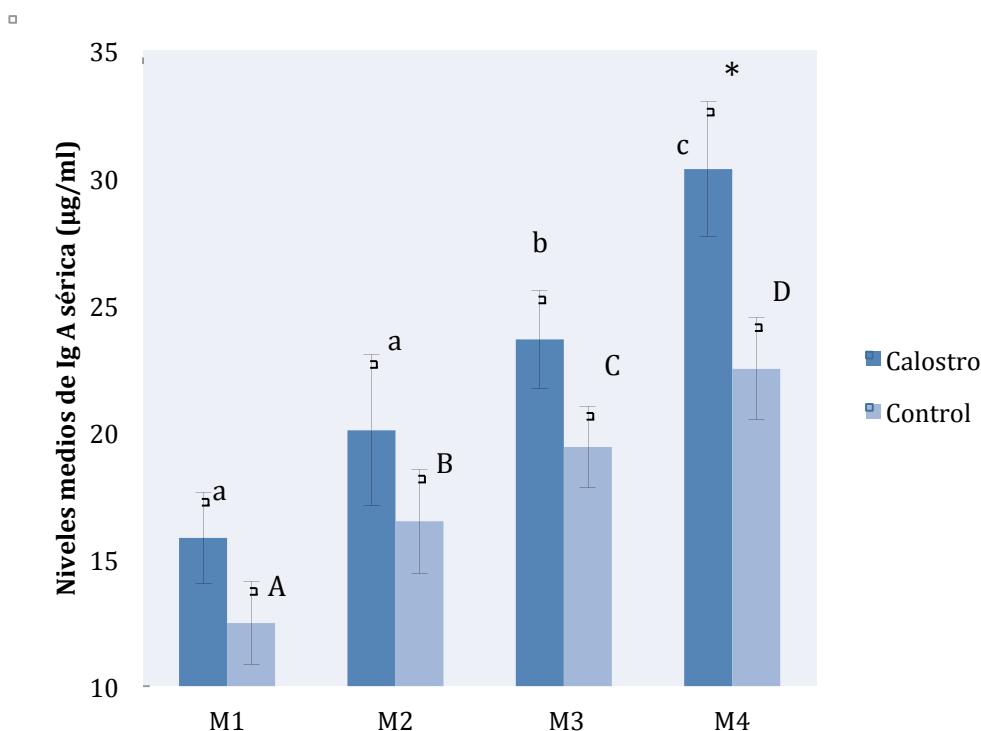
	M1	M2	M3	M4
IgA $\mu\text{g/ml}$				
<i>Calostro</i>	15,96 ($\pm 1,84$)	20,08 ($\pm 2,98$)	23,59 ($\pm 1,57$)	30,34 ($\pm 2,65$)
<i>Control</i>	12,72 ($\pm 1,56$)	16,95 ($\pm 2,10$)	19,45 ($\pm 1,50$)	22,64 ($\pm 1,89$)
<i>p</i>	0,18	0,31	0,09	0,026

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (EEM)

T-Student: nivel significación $p < 0,05$

Gráfica 6. Evolución de los niveles séricos de IgA durante el estudio. Comparativa entre grupos.



Comparativa entre grupos de los valores medios de nivel de Inmunoglobulina A en sangre en los diferentes momentos del estudio. Cada barra de error representa el error típico de la media calculado.

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

T-Student (calostro/control): *Diferencia estadísticamente significativa $p < 0,05$ al mes de vida.

T-Student (muestras relacionadas en cada grupo) la aparición de letras no coincidentes en cada grupo indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Grupo calostro: a,b,c,d; Grupo control: A,B,C,D): incremento significativo durante el tiempo de estudio en ambos grupos

5.5.2 Inmunoglobulina M

La evolución de los niveles de inmunoglobulina M en suero a lo largo del tiempo de estudio se muestran en la gráfica 7 y los datos de IgM para cada momento y grupo se resumen en la tabla 17.

En el momento basal del estudio (M1), no se encuentran diferencias en la concentración sérica de IgM entre ambos grupos.

En los pacientes de nuestro estudio se observa un un incremento progresivo en los niveles séricos medios de IgM durante el primer mes de vida. Según el modelo lineal de medias repetidas, este aumento es estadísticamente significativo ($p < 0.001$)

En la comparativa entre grupos, podemos comprobar que no existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles medios de IgM entre el grupo control y el grupo calostro durante el periodo de intervención ni tras finalizar el periodo de seguimiento al mes de vida.

Tabla 17. Valores de IgM sérica registrados durante el estudio.

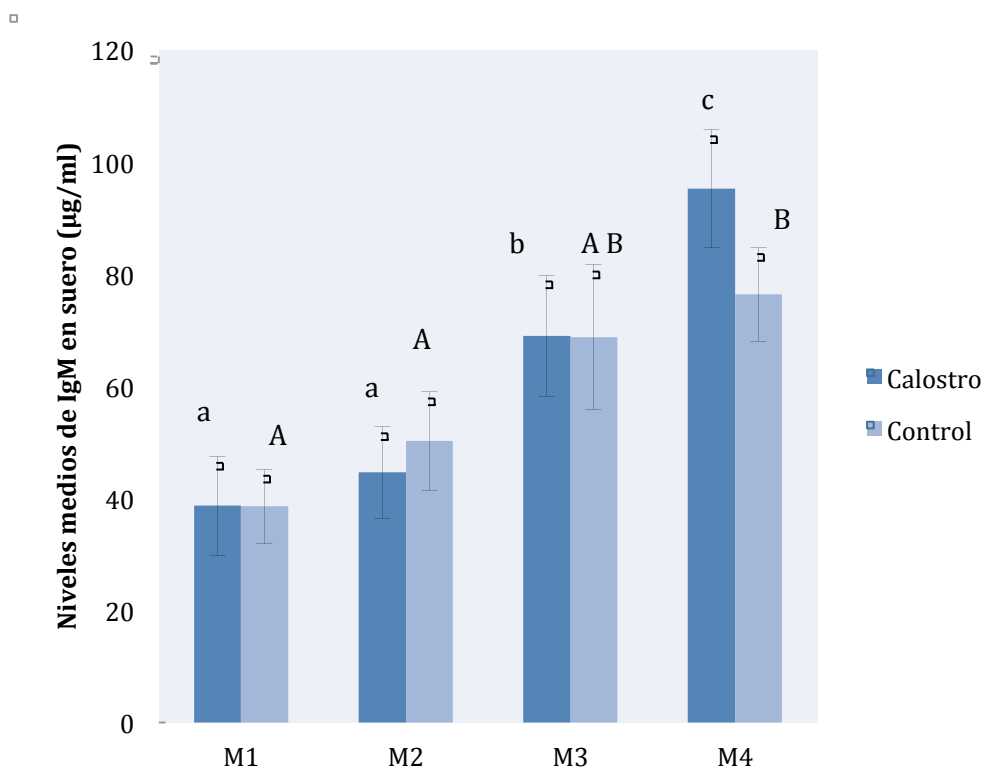
	M1	M2	M3	M4
IgM $\mu\text{g/ml}$				
<i>Calostro</i>	38,67 ($\pm 8,84$)	44,59 ($\pm 8,19$)	68,99 ($\pm 10,88$)	95,23 ($\pm 10,53$)
<i>Control</i>	38,56 ($\pm 6,65$)	50,18 ($\pm 8,82$)	68,72 ($\pm 12,91$)	76,36 ($\pm 8,39$)
<i>p</i>	0,96	0,57	0,80	0,23

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media ($\pm EEM$)

T-Student: nivel significación $p < 0,05$

Gráfica 7. Evolución de los niveles séricos de IgM durante el estudio. Comparativa entre grupos.



Comparativa entre grupos de los valores medios de nivel de Inmunoglobulina M en sangre en los diferentes momentos del estudio. Cada barra de error representa el error típico de la media calculado.

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

T-Student (calostro/control): no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas

T-Student (muestras relacionadas en cada grupo) la aparición de letras no coincidentes en cada grupo indica la existencia de diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Grupo calostro: a, b, c, d; Grupo control: A, B, C, D): aumento significativo en M3 y M4 para el grupo calostro. En grupo control, sólo variación significativa en M4

5.6 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE LACTOFERRINA EN SUERO

La evolución de los niveles de lactoferrina en suero a lo largo del tiempo de estudio se muestran en la gráfica 8 y los datos de lactoferrina para cada momento y grupo se resumen en la tabla 18.

En el momento basal del estudio (M1), no se encuentran diferencias en la concentración sérica de lactoferrina entre ambos grupos. Según el análisis del modelo lineal de medias repetidas MLG (Anova de medidas repetidas) existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de lactoferrina en el tiempo ($p < 0.001$), aunque no entre grupos.

Durante los primeros quince días de vida, se produce un incremento significativo de los niveles séricos de lactoferrina tanto el grupo control como en el grupo calostro: M1 vs M3 $p = 0,01$; M1 vs M3 $p < 0,01$.

Sin embargo, a partir de la tercera semana de vida, se observa una disminución de los niveles de lactoferrina, siendo la diferencia entre la medición del 15º día y la del mes estadísticamente significativa en el grupo control ($p < 0,01$). En el grupo calostro se produce también este descenso, éste no llega a ser estadísticamente significativo ($p = 0,07$).

En cuanto a la comparación de los niveles medios para cada una de las fases del estudio, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos durante la intervención (M2) ni al finalizar ésta (M3). La diferencia entre grupo control y calostro al mes de vida, sí es significativa, obteniéndose niveles séricos de lactoferrina mayores en aquellos pacientes que recibieron calostro durante los primeros quince días de vida.

Tabla 18. Valores de lactoferrina sérica registrados durante el estudio.

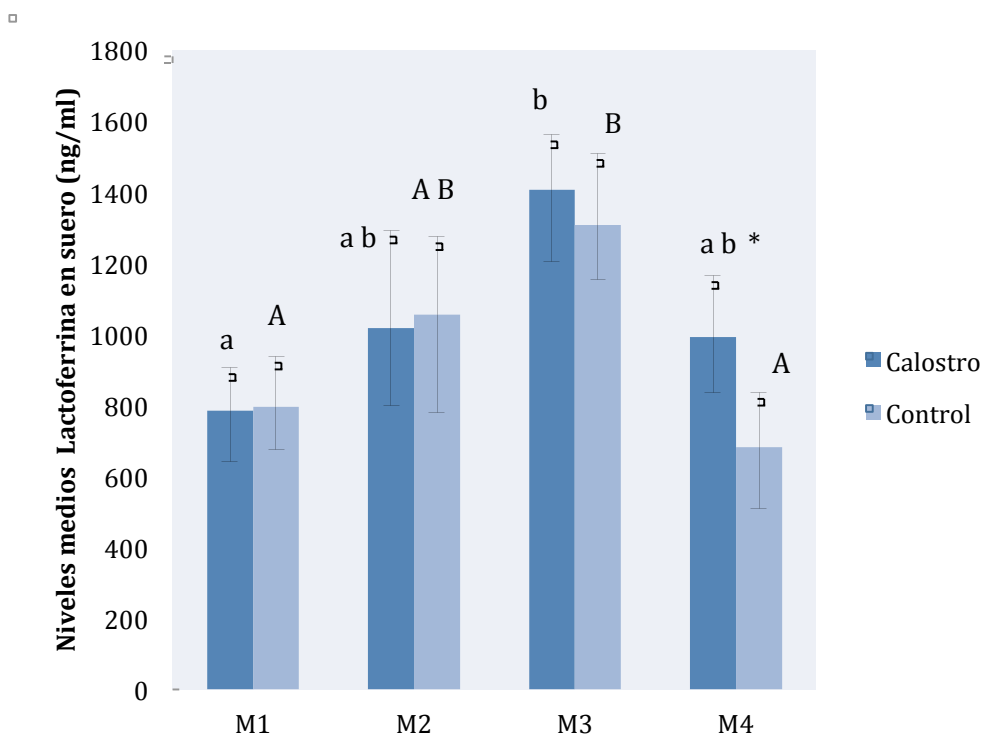
	M1	M2	M3	M4
Lactoferrina (ng/ml)				
<i>Calostro</i>	784,58 (±142,66)	1016,59 (±218,49)	1406,33 (±201,99)	991,13 (±154,26)
<i>Control</i>	795,33 (±121,57)	1055,38 (±276,11)	1306,39 (±154,25)	682,02 (±173,65)
<i>p</i>	0,74	1	0,63	0,014

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (±EEM)

T-Student: nivel significación $p < 0,05$

Gráfica 8. Evolución de los niveles séricos de lactoferrina durante el estudio. Comparativa entre grupos.



Comparativa entre grupos de los valores medios de nivel de lactoferrina en sangre en los diferentes momentos del estudio. Cada barra de error representa el error típico de la media calculado.

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

T-Student (calostro/control): * Diferencia estadísticamente significativa $p < 0,014$ entre grupo calostro y grupo control

T-Student (muestras relacionadas en cada grupo) la aparición de letras no coincidentes en cada grupo indica la existencia de diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Grupo calostro: a,b,c,d; Grupo control: A,B,C,D): diferencias estadísticamente significativas entre M1 y M3 en cada grupo.

5.7 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE RESISTINA EN SUERO

La evolución de los niveles de resistina en suero a lo largo del tiempo de estudio se muestran en la gráfica 9 y los datos de resistina para cada momento y grupo se resumen en la tabla 19.

En el momento basal del estudio (M1) no se encuentran diferencias significativas en los niveles séricos de resistina entre el grupo calostro y el grupo control. Según el análisis del modelo lineal de medias repetidas MLG (Anova de medidas repetidas) existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de resistina en el tiempo ($p < 0.001$), aunque no entre grupos.

Al tercer día (M3) la concentración media de resistina aumenta en ambos grupos, estableciéndose una diferencia estadísticamente significativa en el grupo calostro M1 vs M2 $p < 0,01$. En el grupo control, aunque los niveles son también superiores al tercer día con respecto al nacimiento, tan sólo se ha podido demostrar una tendencia a la significación en esta diferencia: M1 vs M2 $p = 0,06$.

Tras completar la intervención (M3), se comprueba un descenso en los niveles de resistina en el grupo de pacientes control, hasta situarse en un rango similar al nacimiento. Este descenso no llega a ser significativo, pero sí muestra una importante tendencia a la significación (M2 vs M3 $p = 0,06$).

Por otro lado, en el grupo calostro, el aumento registrado el tercer día, se mantiene al finalizar la intervención. No existen diferencias estadísticamente significativas entre estos dos momentos de estudio (M2 vs M3 $p = 0,51$) en este grupo.

Al mes de vida se objetiva un descenso en los niveles de resistina en los dos grupos. En el grupo calostro la disminución es mayor, estableciéndose una diferencia estadísticamente significativa (M3 vs M4 $p = 0,02$). De igual forma, en el grupo control se mantiene la tendencia y se obtienen valores inferiores que a los 15 días, pero sin encontrarse una diferencia estadísticamente significativa en este caso (M3 vs M4 $p = 0,07$).

En la comparativa entre grupos, a pesar de mostrar un patrón diferente en su evolución a lo largo de la intervención, no se han podido demostrar diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios obtenidos en cada fase del estudio.

Tabla 19. Valores de resistina sérica registrados durante el estudio.

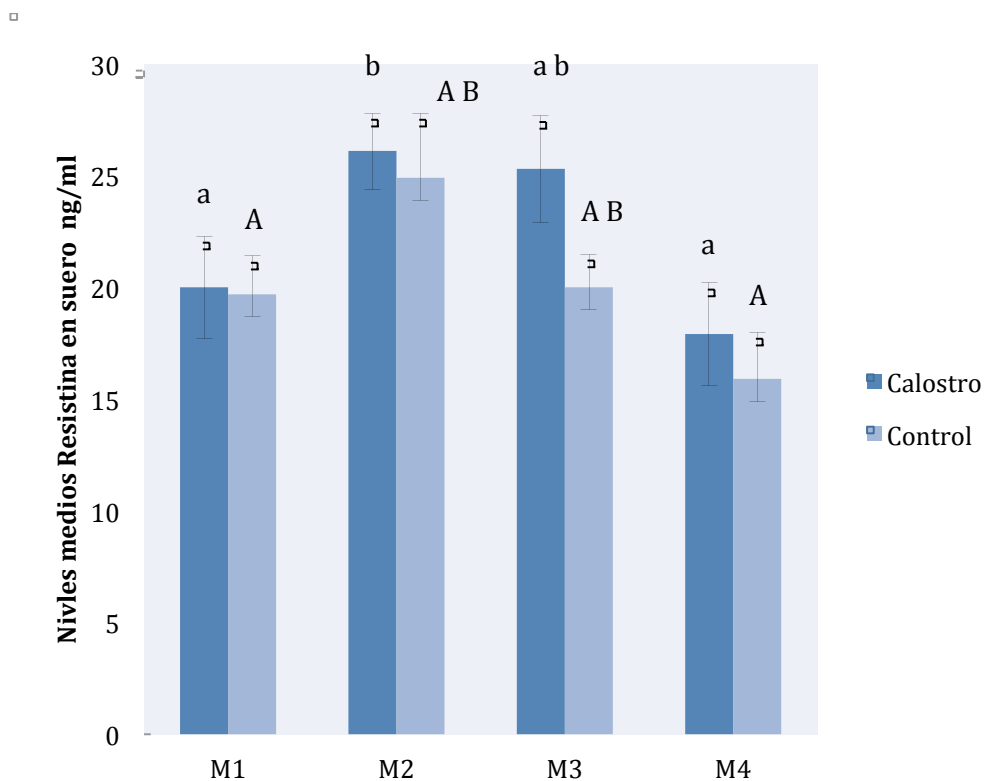
	M1	M2	M3	M4
Resisitina (ng/ml)				
<i>Calostro</i>	20,0 (\pm 2,3)	26,1 (\pm 1,7)	25,3 (\pm 2,4)	17,9 (\pm 2,3)
<i>Control</i>	19,7 (\pm 1,7)	24,9 (\pm 2,9)	20,0 (\pm 2,1)	15,9 (\pm 2,1)
<i>p</i>	0,84	0,90	0,17	0,71

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (\pm EEM)

T-Student: nivel significación $p < 0,05$

Gráfica 9. Evolución de los niveles séricos de resistina durante el estudio. Comparativa entre grupos.



Comparativa entre grupos de los valores medios de nivel de resistina en sangre en los diferentes momentos del estudio. Cada barra de error representa el error típico de la media calculado.

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

T-Student (caso/control): no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas

T-Student (muestras relacionadas en cada grupo) la aparición de letras no coincidentes en cada grupo indica la existencia de diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Grupo calostro: a,b,c,d; Grupo control: A,B,C,D): aumento estadísticamente significativo en M2 con respecto a M1 y M4 en los dos grupos.

5.8. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INTERLEUQUINAS EN SUERO

5.8.1 Interleuquina 1-Ra

La evolución de los niveles de IL-1Ra en suero a lo largo del tiempo de estudio se muestran en la gráfica 10 y los datos de IL-1Ra para cada momento y grupo se resumen en la tabla 20.

En el momento basal del estudio (M1) no se encuentran diferencias significativas en los niveles séricos de IL-1Ra entre el grupo calostro y el grupo control. Según el análisis del modelo lineal de medias repetidas MLG (Anova de medidas repetidas) existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de IL-1Ra en el tiempo ($p < 0.001$) aunque no entre grupos. En ambos grupos se produce una disminución de los niveles de IL-1 durante el primer mes de vida.

En el grupo calostro, los niveles de IL-1Ra descienden durante el periodo de intervención, obteniéndose concentraciones significativamente menores al finalizar la administración del calostro orofaríngeo con respecto al comienzo del estudio (M1 vs M3 $p = 0,04$). Al mes de vida, se mantiene esta tendencia y los niveles de IL-1Ra sérica continúan bajando (M3 vs M4 $p = 0,05$).

En el grupo control, los niveles de IL-1Ra descienden durante el periodo de estudio, aunque las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas hasta el mes de vida (M1 vs M4 $p = 0,01$; M1 vs M3 $p = 0,07$)

Durante el periodo de intervención los niveles de IL-1Ra han sido superiores en el grupo calostro con respecto al grupo control, aunque no se han podido demostrar diferencias estadísticamente significativas. Cabe destacar que en el tercer día de vida, la superioridad es más llamativa, con una tendencia a la significación en el análisis estadístico (233,6 pg/ml vs 170,4 pg/ml; $p = 0,08$).

Al mes de vida, los niveles de IL-1Ra obtenidos en ambos grupos son similares y no se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo calostro.

Tabla 20. Valores de IL-1Ra sérica registrados durante el estudio.

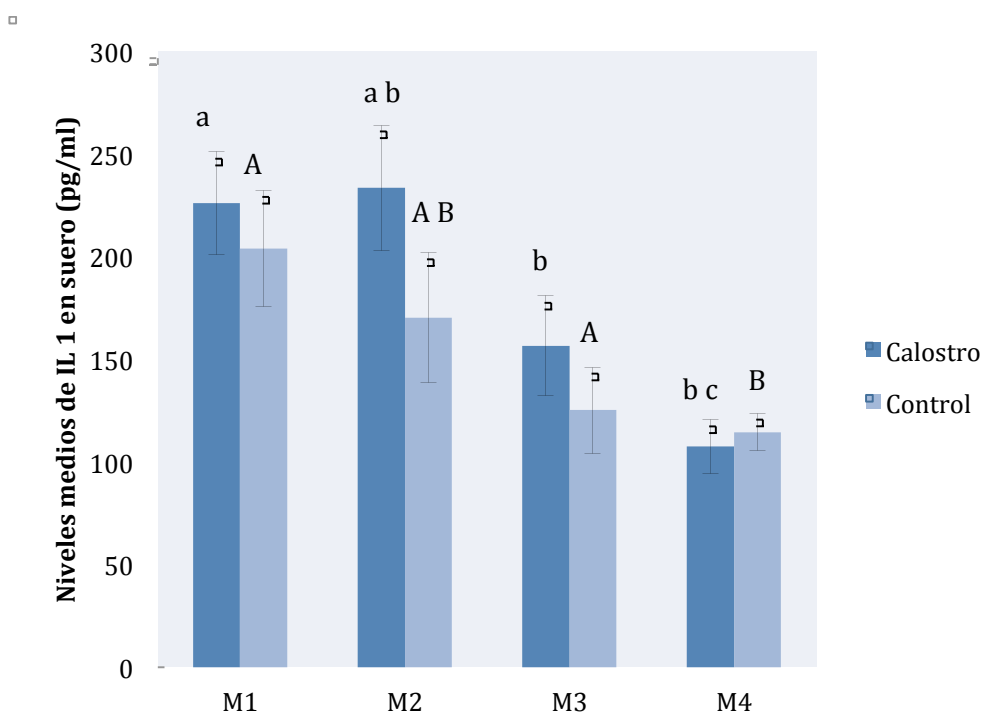
	M1	M2	M3	M4
IL-1Ra pg/ml				
<i>Calostro</i>	226,0 (\pm 25,0)	233,6 (\pm 30,7)	156,5 (\pm 24,3)	107,6 (\pm 13)
<i>Control</i>	204,1 (\pm 28,3)	170,4 (\pm 31,6)	125,3 (\pm 21,0)	114,6 (\pm 9,3)
<i>p</i>	0,46	0,08	0,49	0,42

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (\pm EEM)

T-Student: nivel significación $p < 0,05$

Gráfica 10. Evolución de los niveles séricos de IL-1Ra durante el estudio. Comparativa entre grupos.



Comparativa entre grupos de los valores medios de nivel de IL-1Ra en sangre en los diferentes momentos del estudio. Cada barra de error representa el error típico de la media calculado.

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

T-Student (calostro/control): No Diferencias estadísticamente significativas entre grupo calostro y grupo control

T-Student (muestras relacionadas en cada grupo) la aparición de letras no coincidentes en cada grupo indica la existencia de diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Grupo calostro: a,b,c,d; Grupo control: A,B,C,D): en grupo calostro descenso estadísticamente significativo entre M1 y M3. Descenso progresivo en grupo control, sólo significativo al mes de vida.

5.8.2 Interleuquina 6

La evolución de los niveles de IL-6 en suero a lo largo del tiempo de estudio se muestran en la gráfica 11 y los datos de IL-6 para cada momento y grupo se resumen en la tabla 21.

En el momento basal del estudio (M1) no se encuentran diferencias significativas en los niveles séricos de IL-6 entre el grupo calostro y el grupo control.

Según el análisis del modelo lineal de medias repetidas MLG (Anova de medidas repetidas) existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de IL-6 en el tiempo ($p < 0.001$) aunque no entre grupos, de forma que sus valores disminuyen desde el nacimiento (M1) hasta los quince días de vida (M3).

En el tercer día del estudio (M2) se produce un descenso en los niveles séricos de IL-6 en ambos grupos, discretamente mayor en el grupo calostro, con una diferencia estadísticamente significativa, como se muestra en la gráfica... (M1 vs M2 $p = 0,003$ para el grupo calostro y $p = 0,02$ para el grupo control). Este comportamiento se mantiene a los 15 días de vida, de forma que la concentración IL-6 en el grupo calostro es un 78% inferior al valor obtenido al nacimiento (M1 vs M3 $p < 0,001$). En el grupo control los niveles se reducen con respecto al nacimiento en un 63,5% (M1 vs M3 $p = 0,004$).

Al mes de vida los niveles de IL-6 en el grupo control se mantienen constantes (M3 vs M4 $p = 0,572$), mientras que en el grupo calostro tienden a seguir descendiendo, aunque no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas (M3 vs M4 $p = 0,10$).

Si nos centramos en las diferencias entre cada grupo en los distintos momentos del estudio, podemos comprobar que, a pesar de obtenerse niveles de IL-6 mayores en el grupo control que en el grupo calostro durante la intervención, no se han podido demostrar unas diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, al mes de vida, la concentración de IL-6 sí es significativamente inferior en el grupo calostro ($p = 0,01$).

Tabla 21. Valores de IL-6 sérica registrados durante el estudio.

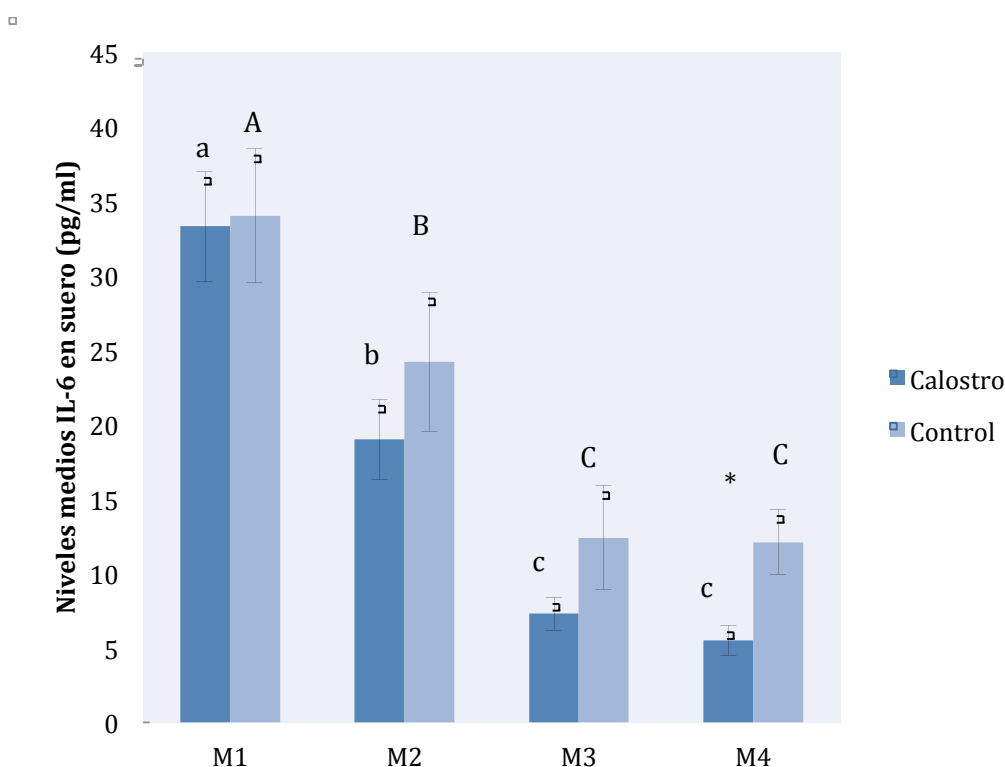
	M1	M2	M3	M4
IL-6 pg/ml				
<i>Calostro</i>	33,3 ($\pm 3,7$)	19,0 ($\pm 2,7$)	7,3 ($\pm 1,1$)	5,5 ($\pm 1,0$)
<i>Control</i>	34,0 ($\pm 4,5$)	24,2 ($\pm 4,7$)	12,4 ($\pm 3,5$)	12,1 ($\pm 2,2$)
<i>p</i>	0,97	0,63	0,56	0,01

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (\pm EEM)

T-Student: nivel significación $p < 0,05$

Gráfica 11. Evolución de los niveles séricos de IL-6 durante el estudio. Comparativa entre grupos.



Comparativa entre grupos de los valores medios de nivel de IL-6 en sangre en los diferentes momentos del estudio. Cada barra de error representa el error típico de la media calculado.

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

T-Student (calostro/control): * Diferencias estadísticamente significativas entre grupo calostro y grupo control.

T-Student (muestras relacionadas en cada grupo) la aparición de letras no coincidentes en cada grupo indica la existencia de diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Grupo calostro: a,b,c,d; Grupo control: A,B,C,D): en ambos grupos se produce un descenso estadísticamente significativo durante los primeros 15 días de vida.

5.8.3 Interleuquina 8

La evolución de los niveles de IL-8 en suero a lo largo del tiempo de estudio se muestran en la gráfica 12 y los datos de IL-8 para cada momento y grupo se resumen en la tabla 22.

En el momento basal del estudio (M1) no se encuentran diferencias significativas en los niveles séricos de IL-8 entre el grupo calostro y el grupo control.

A diferencia de las interleuquinas analizadas hasta ahora, la IL-8 no muestra un claro patrón de descenso en los dos grupos durante el estudio. Según el modelo de modelo lineal de medias repetidas MLG (Anova de medidas repetidas), no existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de IL8 en el tiempo ($p=0.144$) en nuestro grupo de pacientes.

En el grupo control, la concentración de IL-8 desciende de forma estadísticamente significativa al tercer día de vida (M1 vs M2 $p = 0,04$) a diferencia del grupo calostro, en el que se mantiene constante (M2 vs M2 $p = 0,55$). Al finalizar la intervención, 15 días (M3), los niveles de IL-8 se elevan nuevamente en el grupo control y comienzan a descender en el grupo calostro, sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores obtenidos en el momento basal (M1 vs M3 $p = 0,29$ para el grupo calostro y M1 vs M3 $p = 0,47$ en el grupo control).

Al mes de vida (M4), aunque los niveles de IL-8 descienden en ambos grupos con respecto a las determinaciones previas del estudio, sólo se ha encontrado una reducción estadísticamente significativa en el grupo calostro (M1 vs M4 $p = 0,03$) del 39%. En el grupo control la disminución es menos acusada, 20%, y no ha demostrado ser estadísticamente significativa (M1 vs M4 $p = 0,15$).

En la comparativa entre grupos, durante el periodo de intervención no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que han recibido el calostro y los del grupo control. No obstante, a los 15 días del fin de la

intervención (M4), sí se observa que los niveles séricos de IL-8 son significativamente más bajos en el grupo calostro que en el grupo control ($p = 0,017$)

Tabla 22. Valores de IL-8 sérica registrados durante el estudio.

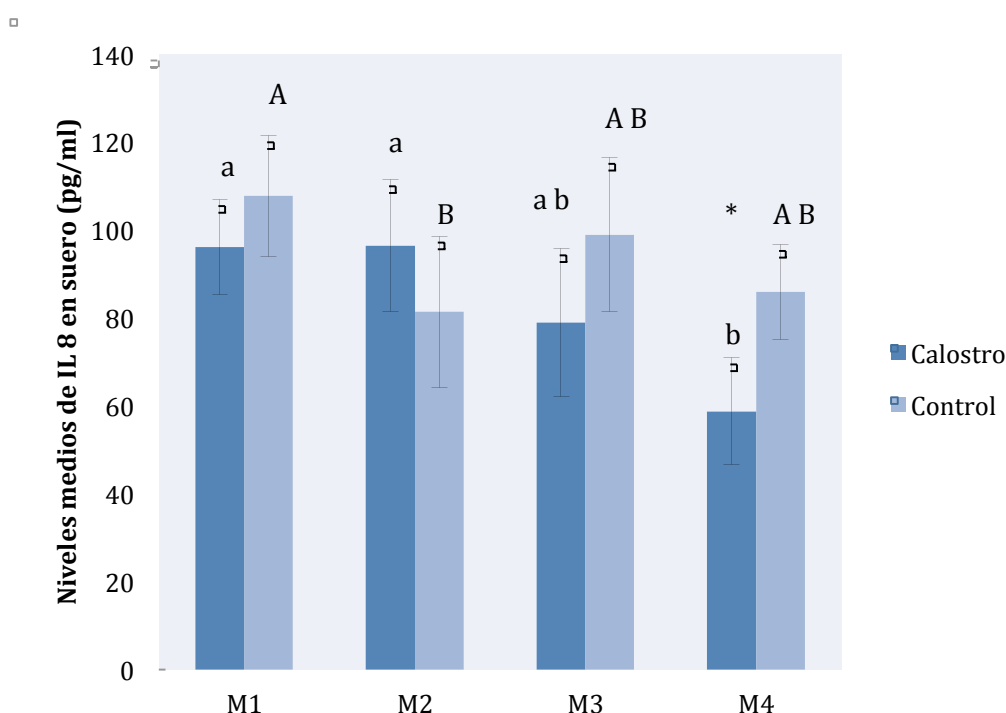
	M1	M2	M3	M4
IL-8 pg/ml				
<i>Calostro</i>	96,1 ($\pm 10,8$)	96,4 ($\pm 15,0$)	78,9 ($\pm 16,8$)	58,7 ($\pm 12,2$)
<i>Control</i>	107,7 ($\pm 13,7$)	81,4 ($\pm 17,2$)	98,9 ($\pm 17,6$)	85,9 ($\pm 10,8$)
<i>p</i>	0,33	0,42	0,44	0,02

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (\pm EEM)

T-Student: nivel significación $p < 0,05$

Gráfica 12. Evolución de los niveles séricos de IL-8 durante el estudio. Comparativa entre grupos.



Comparativa entre grupos de los valores medios de nivel de IL-8 en sangre en los diferentes momentos del estudio. Cada barra de error representa el error típico de la media calculado.

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

T-Student (calostro/control) *Diferencia estadísticamente significativa $p < 0,05$ entre grupo calostro y grupo control

T-Student (muestras relacionadas en cada grupo) la aparición de letras no coincidentes en cada grupo indica la existencia de diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Grupo calostro: a,b,c,d; Grupo control: A,B,C,D): Descenso estadísticamente significativo de los niveles IL-8 al mes de vida en el grupo calostro, no en el grupo de control.

5.8.4 Interleuquina 10

La evolución de los niveles de IL-10 en suero a lo largo del tiempo de estudio se muestran en la gráfica 13 y los datos de IL-10 para cada momento y grupo se resumen en la tabla 23.

En el momento basal del estudio (M1) no se encuentran diferencias significativas en los niveles séricos de IL-10 entre el grupo calostro y el grupo control. En nuestros pacientes, se produce una disminución de los niveles séricos de IL-10 durante el periodo de estudio. Según el modelo lineal de medias repetidas MLG (Anova de medidas repetidas), existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de IL10 en el tiempo ($p < 0.001$).

La concentración de IL-10 desciende prácticamente un 50 % a las 72 horas de vida (M2) en ambos grupos. Esta diferencia es estadísticamente significativa tanto en el grupo calostro (M1 vs M2 $p = 0,002$) como en el grupo control (M1 vs M2 $p = 0,004$). A partir de este momento, durante el resto del tiempo de estudio no se producen variaciones significativas en los niveles de IL-10 dentro de cada uno de los grupos: M2 vs M3 $p = 0,98$ y M2 vs M4 $p = 0,80$ en el grupo calostro; M2 vs M3 $p = 0,68$ y M2 vs M4 $p = 0,38$ en el grupo control.

En el análisis para cada uno de los momentos del estudio, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los niveles medios de IL-10 del grupo calostro y el grupo control.

Tabla 23. Valores de IL-10 sérica registrados durante el estudio.

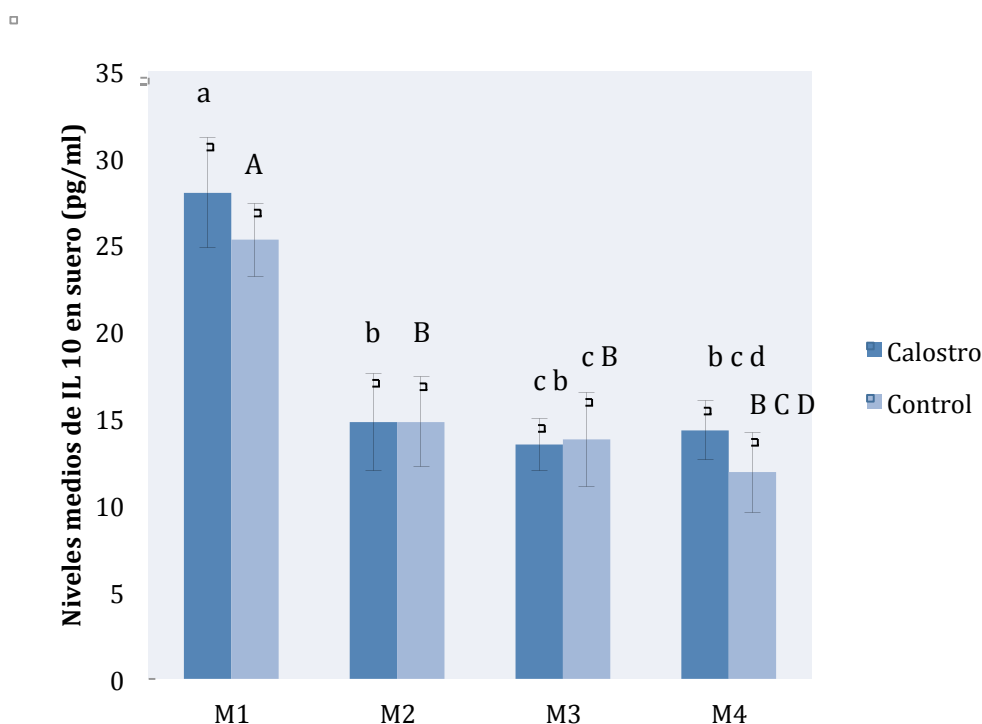
	M1	M2	M3	M4
IL-10 pg/ml				
<i>Calostro</i>	28,0 (\pm 3,2)	14,8 (\pm 2,8)	13,5 (\pm 1,5)	14,3 (\pm 1,7)
<i>Control</i>	25,3 (\pm 2,1)	14,8 (\pm 2,8)	13,8 (\pm 2,7)	11,9 (\pm 2,3)
<i>p</i>	0,63	0,87	0,58	0,21

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (\pm EEM)

T-Student: nivel significación $p < 0,05$

Gráfica 13. Evolución de los niveles séricos de IL-10 durante el estudio. Comparativa entre grupos.



Comparativa entre grupos de los valores medios de nivel de IL-10 en sangre en los diferentes momentos del estudio. Cada barra de error representa el error típico de la media calculado.

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

T-Student (calostro/control): No Diferencias estadísticamente significativas entre grupo calostro y grupo control

T-Student (muestras relacionadas en cada grupo) la aparición de letras no coincidentes en cada grupo indica la existencia de diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Grupo calostro: a,b,c,d; Grupo control: A,B,C,D): Descenso estadísticamente significativo de los niveles IL-10 tras el nacimiento en ambos grupos. A partir del 3° día de vida la concentración de IL-10 se mantiene tanto en el grupo de intervención como en el control.

5.9 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α)

La evolución de los niveles de TNF- α en suero a lo largo del tiempo de estudio se muestran en la gráfica 14 y los datos de TNF- α para cada momento y grupo se resumen en la tabla 24.

En el momento basal del estudio (M1) no se encuentran diferencias significativas en los niveles séricos de TNF- α entre el grupo calostro y el grupo control. Según los resultados del modelo lineal de medias repetidas MLG (Anova de medidas repetidas) existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de TNF- α en el tiempo ($p = 0.014$), aunque estas diferencias, como refleja la gráfica 14 se producen principalmente en el grupo control.

Los niveles de TNF- α se mantienen constantes durante el primer mes de vida con respecto al nacimiento en el grupo de pacientes que reciben calostro durante los primeros quince días de vida. No se han podido demostrar diferencias estadísticamente significativas en el análisis estadístico realizado.

No obstante, en el grupo control, se aprecia un aumento en los niveles de TNF- α al tercer día (M2) y en la segunda semana de vida (M3) con respecto al nacimiento. Esta diferencia no alcanza significación estadística, aunque sí una tendencia, en el tercer día (M1 vs M3 $p = 0,07$). Sin embargo a los quince días de vida, los niveles de TNF- α sí son significativamente mayores que al nacimiento (M1 vs M3 $p = 0,002$). En el momento final del estudio (M4), las concentraciones de TNF- α obtenidas en el suero de los pacientes del grupo control descienden con respecto a la determinación previa (M3 vs M4 $p = 0,02$) y alcanzan niveles similares al nacimiento (M1 vs M4 $p = 0,57$)

En la comparativa entre grupos para cada momento del estudio, se puede observar que los niveles de TNF- α en suero son inferiores durante el periodo de intervención en el grupo calostro, con respecto al grupo control. Esta diferencia se ha demostrado estadísticamente significativa sólo en el tercer día de vida ($p = 0,03$). Al concluir el tiempo de seguimiento del estudio, no se encuentran diferencias significativas entre ambos grupos.

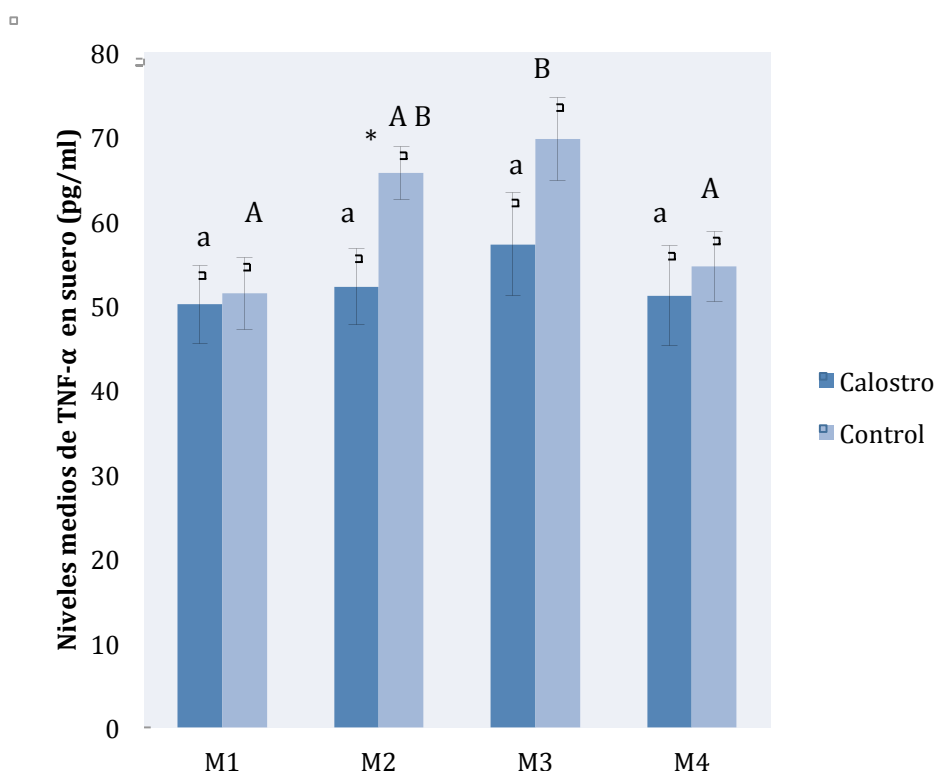
Tabla 24. Valores de TNF- α sérico registrados durante el estudio.

	M1	M2	M3	M4
TNF-α pg/ml				
<i>Calostro</i>	50,1 (\pm 4,8)	52,2 (\pm 4,5)	57,2 (\pm 6,1)	51,1 (\pm 5,9)
<i>Control</i>	51,4 (\pm 4,3)	65,7 (\pm 3,2)	69,7 (\pm 4,9)	54,6 (\pm 4,2)
<i>p</i>	0,71	0,03	0,18	0,42

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (\pm EEM)

T-Student: nivel significación $p < 0,05$

Gráfica 14. Evolución de los niveles séricos de TNF- α durante el estudio. Comparativa entre grupos

Comparativa entre grupos de los valores medios de nivel de TNF- α en sangre en los diferentes momentos del estudio. Cada barra de error representa el error típico de la media calculado.

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

T-Student (Calostro/Control): * Diferencias estadísticamente significativas entre grupo calostro y grupo control. Niveles mayores de TNF- α en M2 en el grupo control.

T-Student (muestras relacionadas en cada grupo) la aparición de letras no coincidentes en cada grupo indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Grupo calostro: a,b,c,d; Grupo Control : A,B,C,D):

- Calostro: no diferencias estadísticamente significativas durante el periodo de estudio.
- Control: incremento estadísticamente significativo en M3

5.10 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE INTERFERÓN-GANMA (INF- γ) EN SUERO.

La evolución de los niveles de INF- γ en suero a lo largo del tiempo de estudio se muestran en la gráfica 15 y los datos de INF- γ para cada momento y grupo se resumen en la tabla 25.

En el momento basal del estudio (M1) no se encuentran diferencias significativas en los niveles séricos de INF- γ entre el grupo calostro y el grupo control. Según el análisis del modelo lineal de medias repetidas MLG (Anova de medidas repetidas) no existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de INF- γ en el tiempo ($p = 0.324$) en nuestro grupo de pacientes.

Como se puede observar en la gráfica 15, los valores de INF- γ aumentan discretamente durante los primeros quince días de vida en ambos grupos. No obstante, no se han podido demostrar diferencias estadísticamente significativas entre el nacimiento y el fin de la intervención en cada uno de los grupos: M1 vs M3 $p = 0,67$ en el grupo calostro y M1 vs M3 $p = 0,12$ en el grupo control.

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de INF- γ en cada fase del estudio entre el grupo calostro y el grupo control.

Tabla 25. Valores de INF- γ sérico registrados durante el estudio.

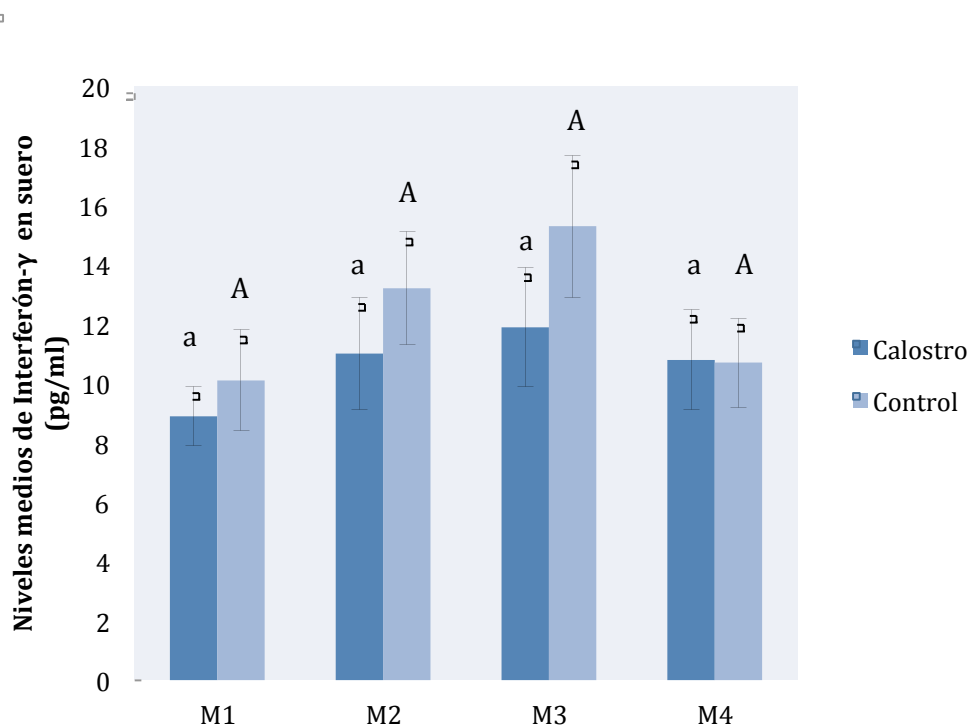
	M1	M2	M3	M4
INF-γ pg/ml				
<i>Calostro</i>	8,9 ($\pm 1,0$)	11,0 ($\pm 1,9$)	11,9 ($\pm 2,0$)	10,8 ($\pm 1,7$)
<i>Control</i>	10,1 ($\pm 1,7$)	13,2 ($\pm 1,9$)	15,3 ($\pm 2,4$)	10,7 ($\pm 1,5$)
<i>p</i>	0,58	0,49	0,34	0,99

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (\pm EEM)

T-Student: nivel significación $p < 0,05$

Gráfica 15. Evolución de los niveles séricos de INF- γ durante el estudio. Comparativa entre grupos.



Comparativa entre grupos de los valores medios de nivel de INF- γ en sangre en los diferentes momentos del estudio. Cada barra de error representa el error típico de la media calculado.

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

T-Student (calostro/control): no diferencias estadísticamente significativas.

T-Student (muestras relacionadas en cada grupo) la aparición de letras no coincidentes en cada grupo indica la existencia de diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) (Grupo calostro: a,b,c,d; Grupo Control : A,B,C,D).

En la tabla 26 quedan reflejados los valores de los mediadores analizados durante el estudio:

Tabla 26. Valores séricos de los inmunomarcadores analizados durante el estudio.

	M1	M2	M3	M4
IgA µg/ml				
<i>Calostro</i>	15,96 (±1,84)	20,08 (±2,98)	23,59 (±1,57)	30,34 (±2,65)
<i>Control</i>	12,72 (±1,56)	16,95 (±2,10)	19,45 (±1,50)	22,64 (±1,89)
IgM µg/ml				
<i>Calostro</i>	38,67 (±8,84)	44,59 (±8,19)	68,99 (±10,88)	95,23 (±10,53)
<i>Control</i>	38,56 (±6,65)	50,18 (±8,82)	68,72 (±12,91)	76,36 (±8,39)
Lactoferrina (ng/ml)				
<i>Calostro</i>	784,58 (±142,66)	1016,59 (±218,49)	1406,33 (±201,99)	991,13 (±154,26)
<i>Control</i>	795,33 (±121,57)	1055,38 (±276,11)	1306,39 (±154,25)	682,02 (±173,65)
Resisitina (ng/ml)				
<i>Calostro</i>	20,0 (±2,3)	26,1 (±1,7)	25,3 (±2,4)	17,9 (±2,3)
<i>Control</i>	19,7 (±1,7)	24,9 (±2,9)	20,0 (±2,1)	15,9 (±2,1)
IL-1 (pg/ml)				
<i>Calostro</i>	226,0 (±25,0)	233,6 (±30,7)	156,5 (±24,3)	107,6 (±13)
<i>Control</i>	204,1 (±28,3)	170,4 (±31,6)	125,3 (±21,0)	114,6 (±9,3)
IL-6 (pg/ml)				
<i>Calostro</i>	33,3 (±3,7)	19,0 (±2,7)	7,3 (±1,1)	5,5 (±1,0)
<i>Control</i>	34,0 (±4,5)	24,2 (±4,7)	12,4 (±3,5)	12,1 (±2,2)
IL-8 (pg/ml)				
<i>Calostro</i>	96,1 (±10,8)	96,4 (±15,0)	78,9 (±16,8)	58,7 (±12,2)
<i>Control</i>	107,7 (±13,7)	81,4 (±17,2)	98,9 (±17,6)	85,9 (±10,8)
IL-10 (pg/ml)				
<i>Calostro</i>	28,0 (±3,2)	14,8 (±2,8)	13,5 (±1,5)	14,3 (±1,7)
<i>Control</i>	25,3 (±2,1)	14,8 (±2,8)	13,8 (±2,7)	11,9 (±2,3)
TNF-α (pg/ml)				
<i>Calostro</i>	50,1 (±4,8)	52,2 (±4,5)	57,2 (±6,1)	51,1 (±5,9)
<i>Control</i>	51,4 (±4,3)	65,7 (±3,2)	69,7 (±4,9)	54,6 (±4,2)
INF-γ (pg/ml)				
<i>Calostro</i>	8,9 (±1,0)	11,0 (±1,9)	11,9 (±2,0)	10,8 (±1,7)
<i>Control</i>	10,1 (±1,7)	13,2 (±1,9)	15,3 (±2,4)	10,7 (±1,5)

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (±EEM)

5.11 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INMUNOMARCADORES EN CALOSTRO

En la Tabla 27 se muestran los valores medios de los inmunomarcadores analizados en el calostro de las madres de los niños del grupo calostro, obtenido en las primeras 72 horas postparto.

Tabla 27. Valores de inmunomarcadores en calostro recogido en las primeras 72 horas postparto.

Immunomarcador	Concentración en suero lácteo
Inmunoglobulina A (g/dl)	7,10 (\pm 1,28)
Inmunoglobulina M (μg/ml)	625,17 (\pm 11,16)
Lactoferrina (μg/ml)	7017,70 (\pm 968,48)
Resistina (ng/ml)	57,00 (\pm 9,95)
IL-1 (pg/ml)	232,08 (\pm 38,59)
IL-6 (pg/ml)	59,98 (\pm 8,75)
IL-8 (pg/ml)	767,24 (\pm 114,43)
IL-10 (pg/ml)	7,35 (\pm 1,60)
TNF-α (pg/ml)	40,78 (\pm 4,97)
INF-γ (pg/ml)	8,96 (\pm 1,47)

Valores representados: media (\pm EEM)

5.12 VALORACIÓN DE LA REPERCUSIÓN CLÍNICA DE LA ADMINISTRACIÓN DE CALOSTRO OROFARÍNGEO.

5.12.1 Enterocolitis necrosante

La tabla 28 recoge la incidencia de enterocolitis necrosante entre los pacientes de nuestro estudio. Durante el periodo de estudio, en nuestra muestra, se producen 2 casos de enterocolitis necrosante grado \geq II B. La incidencia, por tanto, es del 6,06% durante este periodo. Este valor se encuentra dentro de los datos a nivel nacional (incidencia 6,9% en menores de 1500g según los datos de la red SEN 1500).

El primer caso tiene lugar en un sujeto del grupo calostro. Presenta cuadro de NEC con perforación intestinal al 10º día de vida. Esta paciente, prematura de 25 semanas de gestación, precisó en su tratamiento resección intestinal e ileostomía.

El segundo caso de enterocolitis necrosante tuvo lugar, de igual forma, en una recién nacida prematura extrema de 23 semanas de gestación, perteneciente al grupo calostro. El cuadro se desarrolló en la tercera semana de vida, en el contexto de cuadro séptico por bacilo gram-negativo. Esta paciente también presentó enterocolitis necrosante grado III-b.

Debido a la baja incidencia de en cada fase del estudio, en M3 1/33 (3,03%) y M4 2/33 (6,06%) sólo se ha analizado la relación entre los inmunomarcadores analizados en este estudio y el desarrollo de enterocolitis en M4 (30º día de vida).

Tabla 28. Incidencia de enterocolitis necrosante durante el estudio.

	Calostro (N=17)	Control (N=16)	<i>P</i>
NEC en 15º día de vida	1	0	1
NEC en 30º día de vida	2	0	0,49

5.12.1.1 Valoración de la relación de los inmunomarcadores con la enterocolitis necrosante

En las tablas 29 y 30 se muestran los datos de valores medios de las principales citoquinas e inmunoglobulinas analizadas en nuestros pacientes a los 30 días (M4) en relación al diagnóstico de enterocolitis necrosante. En el análisis estadístico realizado, a pesar del reducido número de casos de enterocolitis, se ha encontrado que los niveles de TNF- α en el suero de los pacientes con diagnóstico de enterocolitis necrosante \geq IIb, son significativamente mayores que en el resto de pacientes estudiados ($p = 0,017$). A su vez, como se puede observar en la figura 14 los niveles de resistina e Inmunoglobulina A también son más altos en los pacientes con enterocolitis, aunque no se ha podido demostrar que exista una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 29. Valores séricos de citoquinas registrados al mes de vida en los pacientes que desarrollaron enterocolitis necrosante y en los que no presentaron enterocolitis necrosante.

	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- α	INF- γ
NEC M4						
Sí	91,45 ($\pm 35,25$)	10,85 ($\pm 3,45$)	56,60 ($\pm 7,60$)	18,35 ($\pm 8,95$)	95,15 ($\pm 15,85$)	6,60 ($\pm 3,10$)
No	111,35 ($\pm 8,83$)	7,92 ($\pm 1,39$)	71,45 ($\pm 9,49$)	12,87 ($\pm 1,45$)	49,11 ($\pm 3,25$)	10,98 ($\pm 1,23$)
p	0,52	0,24	0,90	0,39	0,017	0,43

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (\pm EEM)

Mann-Whitney: nivel significación $p < 0,05$

Tabla 30. Valores séricos de inmunoglobulinas, resistina y lactoferrina registrados al mes de vida en los pacientes que desarrollaron enterocolitis necrosante y en los que no presentaron enterocolitis necrosante.

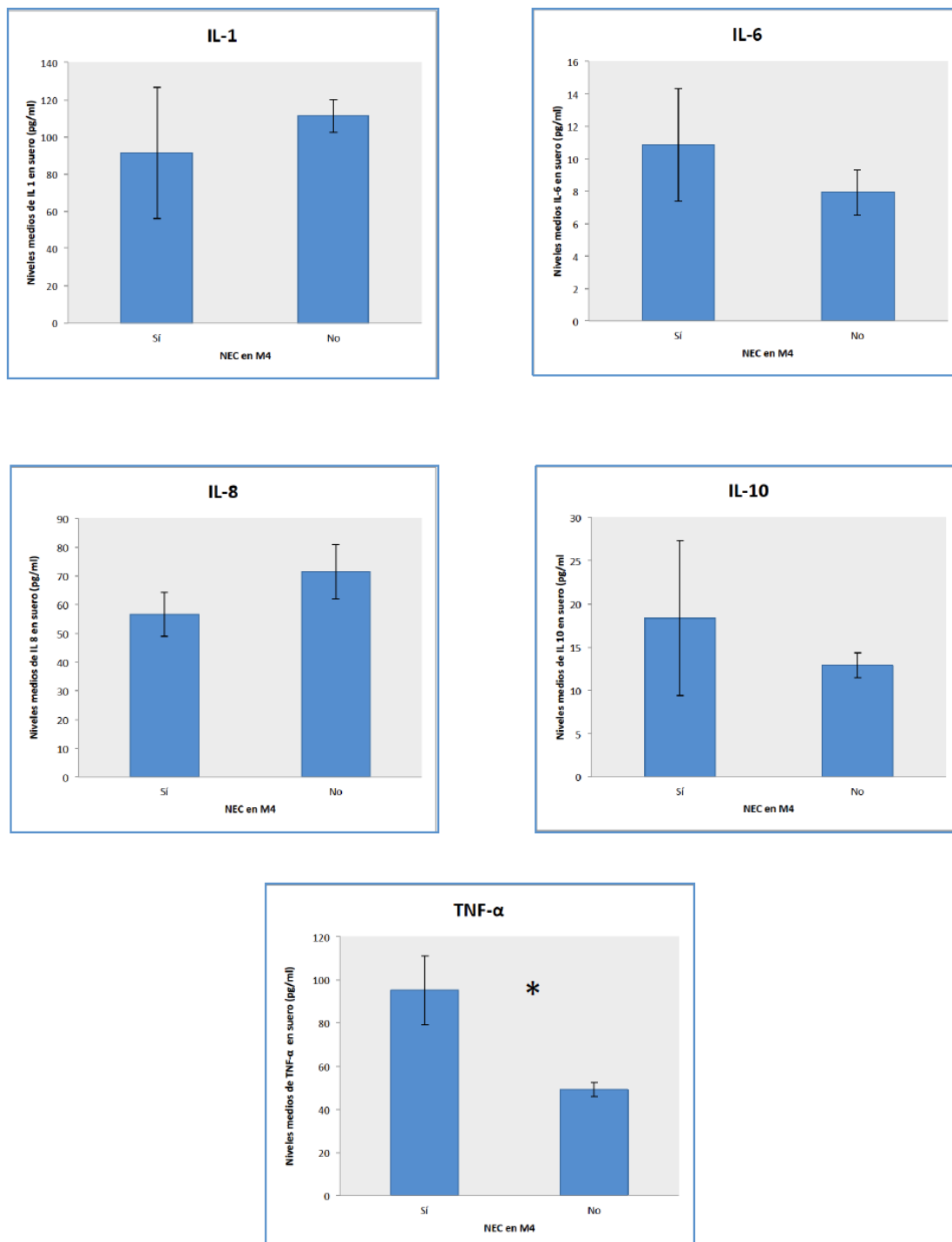
	Resistina	Lactoferrina	IgA	IgM
NEC M4				
Sí	24,95 ($\pm 5,45$)	741,10 ($\pm 202,2$)	37,14 ($\pm 4,77$)	121,80 ($\pm 1,18$)
No	16,21 ($\pm 1,66$)	806,26 ($\pm 127,67$)	25,46 ($\pm 1,85$)	85,34 ($\pm 7,88$)
p	0,18	0,67	0,11	0,43

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (\pm EEM)

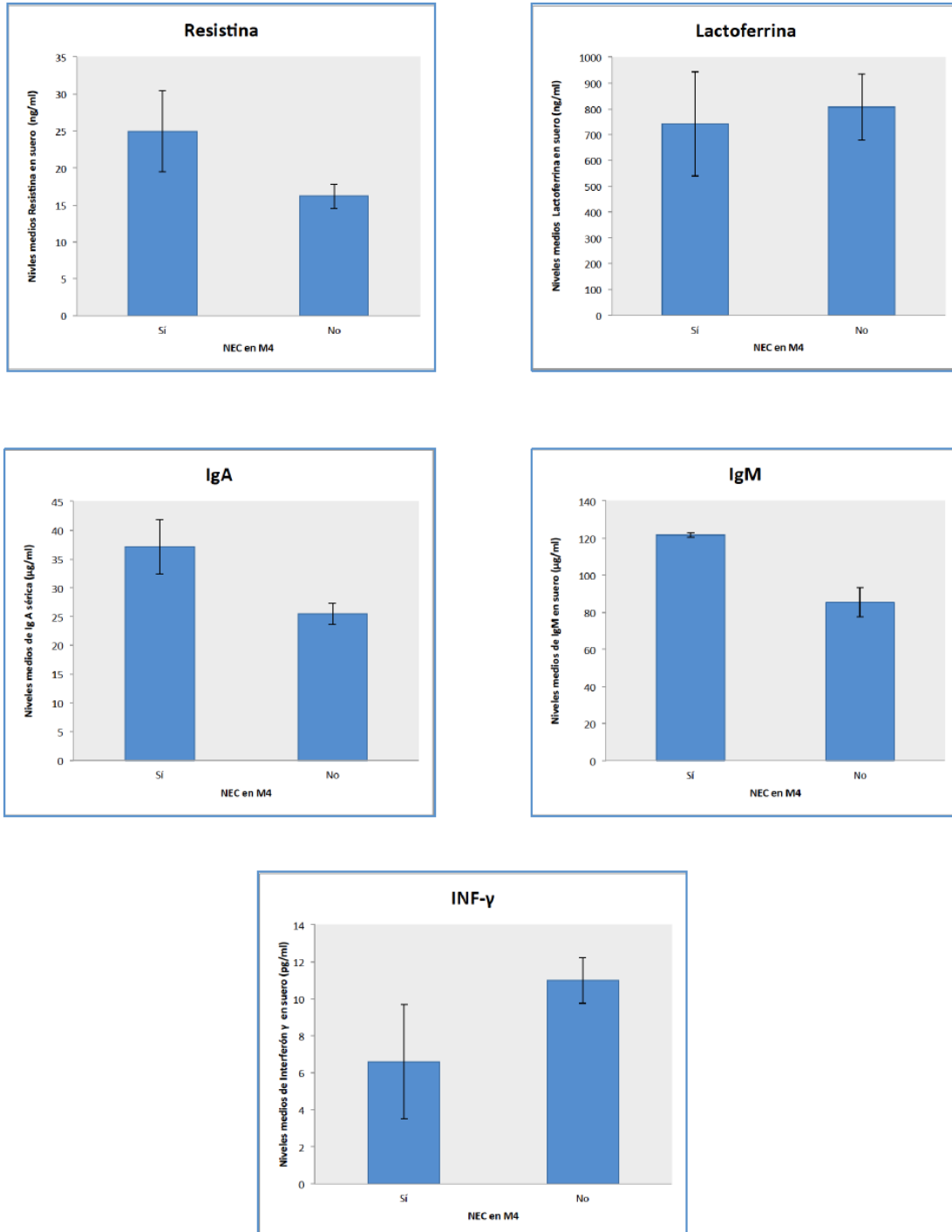
Mann-Whitney: nivel significación $p < 0,05$

Figura 13. Comparativa de los niveles séricos de citoquinas en relación con diagnóstico de enterocolitis necrosante a los 30 días de vida.



* Mann-Whitney: nivel significación $p < 0,05$

Figura 14. Comparativa de los niveles séricos de resistina, lactoferrina, Inmunoglobulinas e Interferón- γ en relación con enterocolitis necrosante a los 30 días de vida.



* Mann-Whitney: nivel significación $p < 0,05$

5.12.2 Infección nosocomial (IAAS)

Durante el tiempo de estudio se registran 7 episodios de infección nosocomial o infección asociada a la asistencia sanitaria en nuestra población (incidencia 21,21%). En las tablas 31 y 32 queda reflejada la distribución de los episodios en cada grupo a los 15 y a los 30 días de vida.

A los 15 días de vida (M3), se registran 4 casos de IAAS en el grupo calostro y 1 caso en el grupo control. Según aparece en la Tabla 30 no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la incidencia de IAAS entre ambos grupos. En el grupo calostro, las cuatro IAAS se comportan como sepsis nosocomial con hemocultivo positivo (75% por Bacilos Gram-negativo, dos *E.coli* y uno *Citrobacter Koseri*; 25% *S epidermidis*). Dentro del grupo control se registra un episodio de sepsis nosocomial con hemocultivo positivo por *S epidermidis*.

Tabla 31. Incidencia de infección nosocomial a los 15 días de vida

15 días (M3)	Calostro (N=17)	Control (N=16)	<i>p</i>
Infección asociada a asistencia sanitaria	4	1	0,17
Sepsis nosocomial Hemocultivo +	4	1	0,17
Sepsis Bacilo gram-negativo	3	0	0,23
ITU	0	0	

A los 30 días de vida (M4), como se puede observar en la Tabla 32 hay tres pacientes con diagnóstico de IAAS. De ellos, sólo se registra un caso de sepsis con hemocultivo positivo (infección por *S epidermidis* en paciente portadora de catéter venoso central por precisar nutrición parenteral prolongada). Los casos restantes fueron una infección del tracto urinario (hemocultivo negativo) y una meningitis en evolución, que había debutado a los 15 días de vida (infección por *Citrobacter Koseri*, con hemocultivo negativo en este momento).

Tabla 32. Incidencia de infección nosocomial a los 30 días de vida.

30 días (M4)	Calostro (N=17)	Control (N=16)	<i>p</i>
Infección asociada a asistencia sanitaria	3	0	0,23
Sepsis nosocomial Hemocultivo +	1	0	1
Sepsis Bacilo gram-negativo	0	0	
ITU	1	0	1

5.12.2.1 Valoración de la relación de los inmunomarcadores con las infecciones nosocomiales.

En las tablas 33 y 34 se muestran los datos de valores medios de las principales citoquinas e inmunoglobulinas analizadas en nuestros pacientes a los 15 días (M3) en relación al diagnóstico de IAAS, y sepsis por bacilos gram-negativos. La variable sepsis nosocomial con hemocultivo positivo, en este momento del estudio, coincide con IAAS, por lo que no aparecen los datos reflejados en estas tablas.

Tabla 33. Valores séricos de citoquinas registrados en el 15° de vida en los pacientes diagnosticados de IAAS y sepsis por bacilo gram-negativo y en los que no presentaron IAAS.

	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- α	INF- γ
IAAS						
Sí	162,00 (\pm 58,63)	7,42 (\pm 0,64)	70,12 (\pm 13,46)	16,34 (\pm 2,01)	68,92 (\pm 11,69)	16,58 (\pm 5,98)
No	137,70 (\pm 16,36)	10,17 (\pm 2,12)	91,85 (\pm 14,03)	13,14 (\pm 1,69)	62,25 (\pm 4,31)	12,85 (\pm 1,51)
<i>p</i>	0,94	0,54	0,94	0,08	0,54	0,81
Sepsis Bacilo gram-negativo						
Sí	221,73 (\pm 83,38)	7,43 (\pm 0,86)	59,20 (\pm 10,15)	18,80 (\pm 1,97)	67,60 (\pm 19,53)	7,30 (\pm 2,53)
No	133,35 (\pm 15,55)	9,99 (\pm 1,98)	91,43 (\pm 13,17)	13,10 (\pm 1,58)	62,83 (\pm 4,09)	14,11 (\pm 1,66)
<i>p</i>	0,32	0,57	0,93	0,045	0,66	0,16

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (\pm EEM)

Mann-Whitney: nivel significación $p < 0,05$

Tabla 34. Valores séricos de resistina, lactoferrina e inmunoglobulinas registrados en el 15° de vida en los pacientes diagnosticados de IAAS y sepsis por bacilo gram-negativo y en los que no presentaron IAAS.

	Resistina	Lactoferrina	IgA	IgM
IAAS				
Sí	27,38 (±3,59)	1817,90 (±129,51)	25,71 (±6,63)	45,20 (±5,52)
No	21,87 (±1,57)	1242,41 (±129,51)	20,88 (±0,98)	74,30 (±9,38)
p	0,17	0,13	0,29	0,24
Sepsis Bacilo gram-negativo				
Sí	29,27 (±6,11)	1410 (±198,25)	30,41 (±7,12)	50,55 (±2,35)
No	22,05 (±1,49)	1321,56 (±134,82)	20,73 (±1,15)	71,46 (±9,14)
p	0,19	0,79	0,17	0,70

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

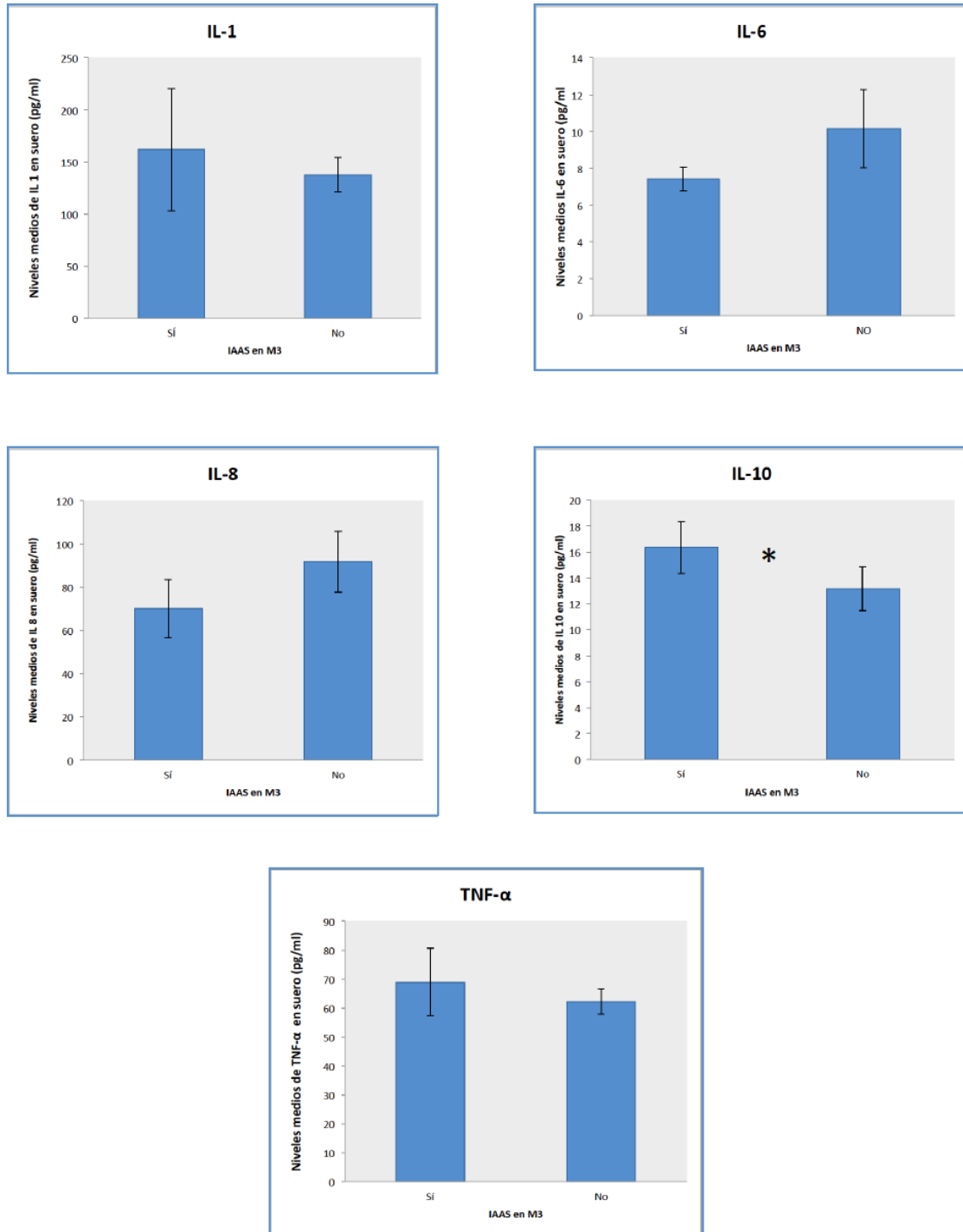
Valores representados: media (±EEM)

Mann-Whitney: nivel significación $p < 0,05$

En los pacientes que presentan a los 15 días de vida una IAAS, la concentración de resistina, lactoferrina son superiores a los valores medidos en el resto de pacientes, aunque no se ha podido demostrar una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,17$; $p = 0,13$). A su vez, los valores de IL-10 igualmente son superiores en este grupo de pacientes, con una tendencia a significación a tener en cuenta dado el reducido número de casos ($p = 0,08$).

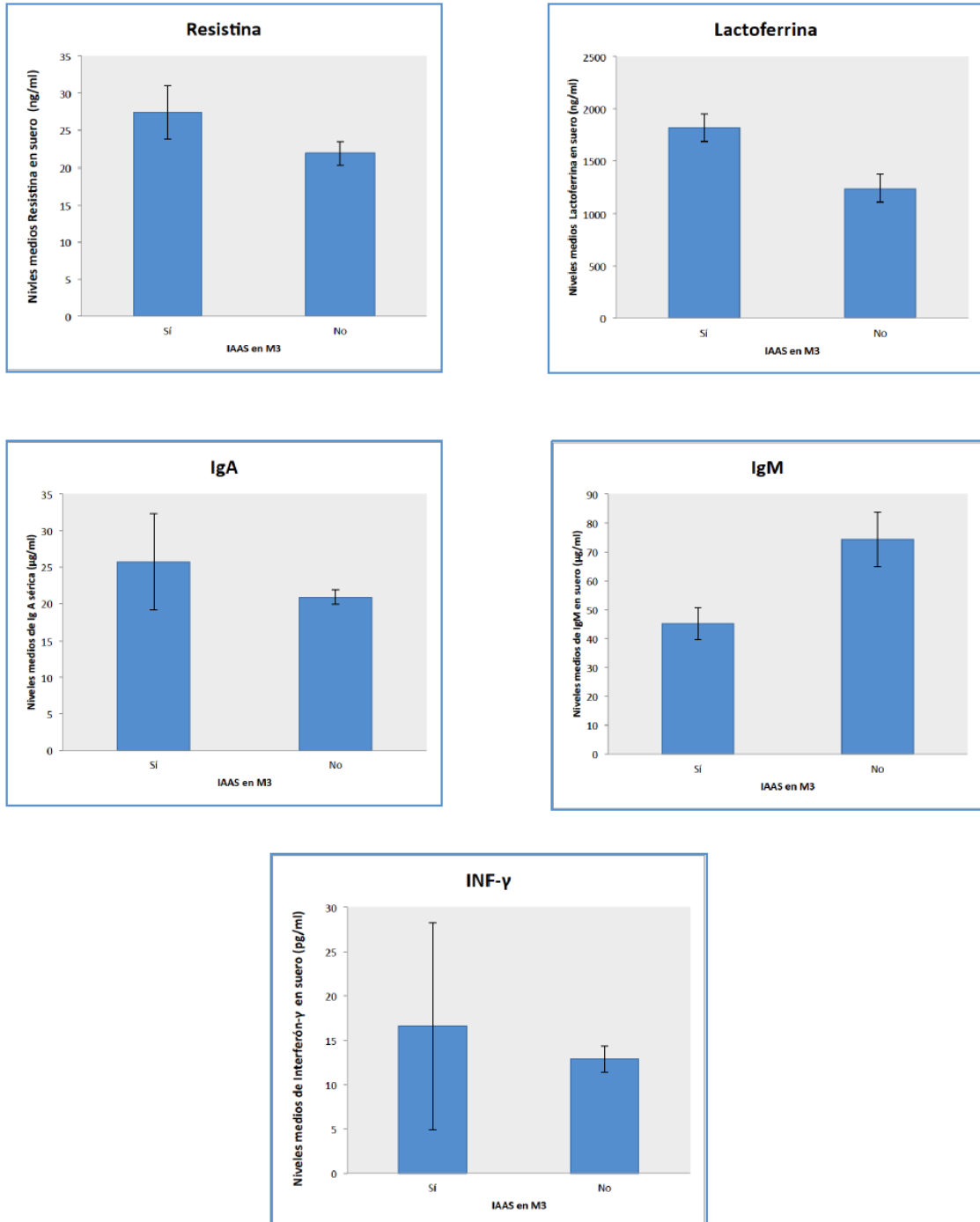
En el grupo de pacientes con sepsis nosocomial causada por Bacilos gram-negativos, los niveles de IL-10 sí son significativamente superiores que los obtenidos en el resto de pacientes. Aunque las concentraciones de IgA y resistina parecen ser también mayores en estos neonatos, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas.

Figura 15. Comparativa de los niveles séricos de citoquinas en relación con diagnóstico de sepsis nosocomial 15 días de vida.



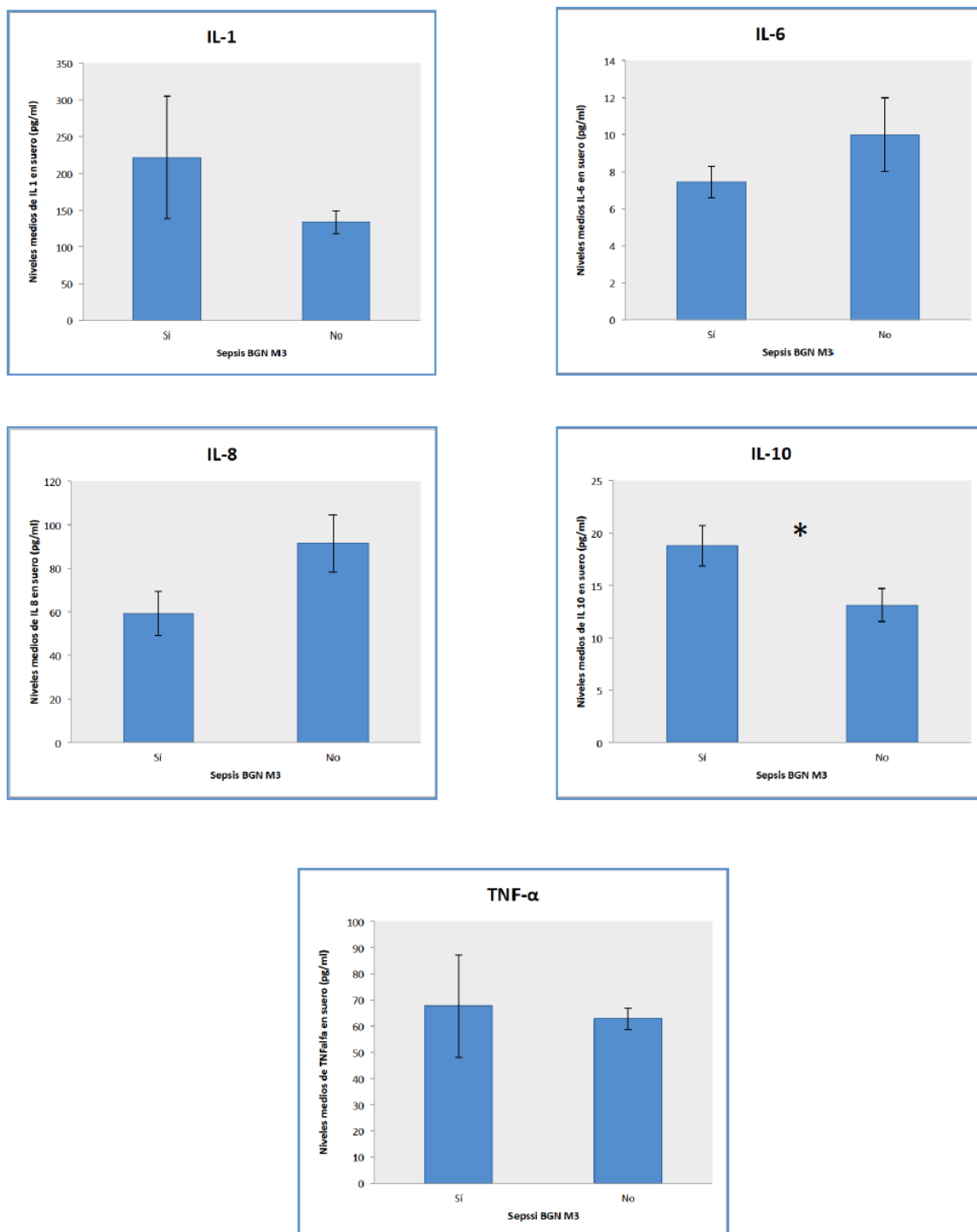
* *Mann-Whitney*: nivel significación $p < 0,05$

Figura 16. Comparativa de los niveles séricos de lactoferrina, resistina, Inmunoglobulinas e Interferón- γ en relación con diagnóstico de sepsis nosocomial 15 días de vida.



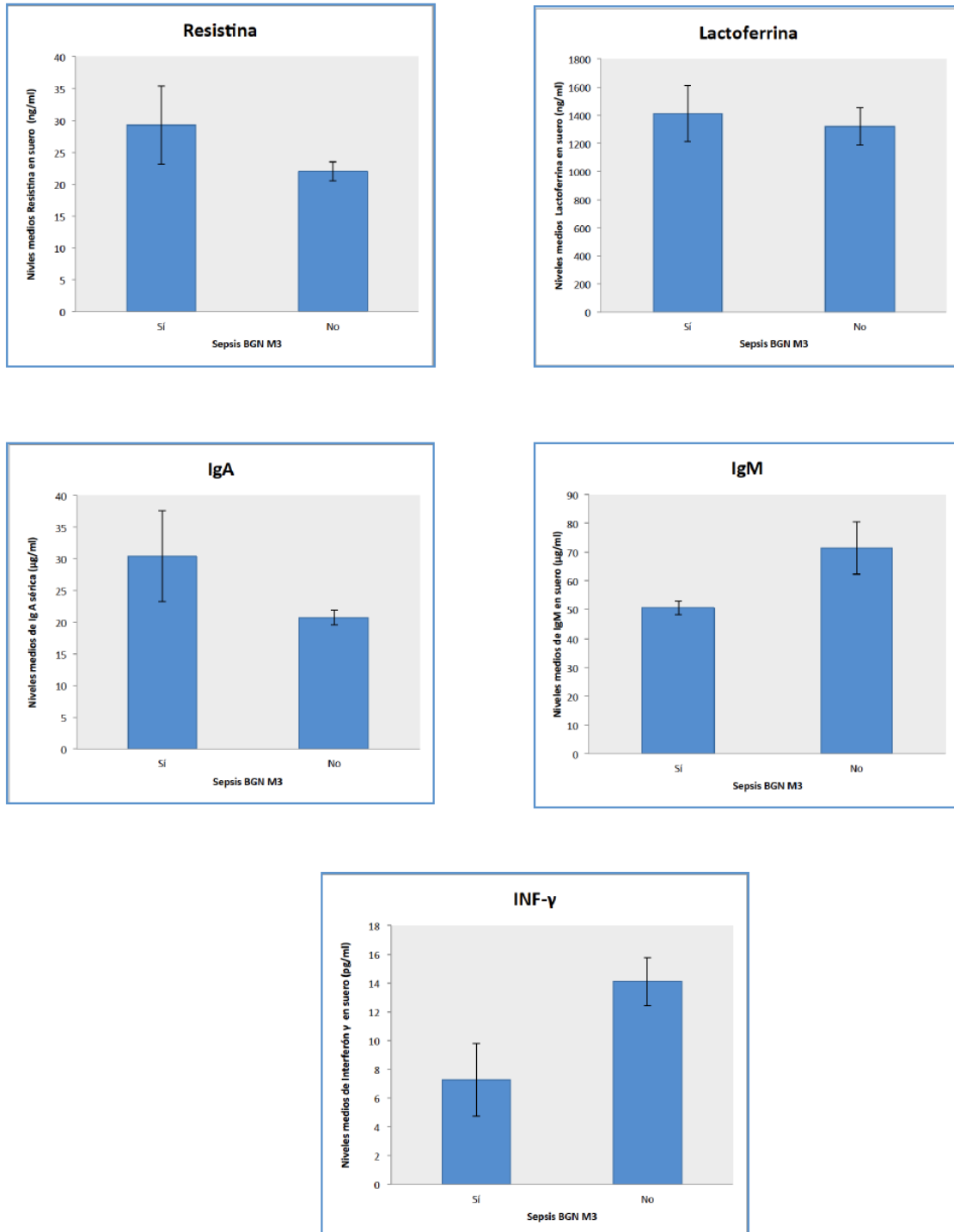
* Mann-Whitney: nivel significación $p < 0,05$

Figura 17. Comparativa de los niveles séricos de citoquinas en relación con diagnóstico sepsis por bacilo gram-negativo 15 días de vida.



* Mann-Whitney: nivel significación $p < 0,05$

Figura 18. Comparativa de los niveles séricos de lactoferrina, resistina, Inmunoglobulinas e Interferón- γ en relación con diagnóstico de sepsis por bacilo gram-negativo 15 días de vida.



* Mann-Whitney: nivel significación $p < 0,05$

En las tablas 35 y 36 se muestran los datos de valores medios de las principales citoquinas e inmunoglobulinas analizadas en nuestros pacientes a los 30 días de vida (M4) en relación al diagnóstico de IAAS.

Tabla 35. Valores séricos de citoquinas registrados en el 30° de vida en los pacientes diagnosticados de IAAS y en los que no presentaron IAAS.

	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- α	INF- γ
IAAS						
Sí	104,33 (24,10)	9,03 (2,69)	42,93 (9,61)	14,43 (6,48)	75,30 (21,86)	6,97 (1,83)
No	110,25 (9,47)	8,02 (1,49)	73,10 (9,97)	13,02 (1,54)	49,58 (3,34)	11,10 (6,59)
p	0,83	0,42	0,35	0,87	0,83	0,20

M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (\pm EEM)

Mann-Whitney: nivel significación $p < 0,05$

Tabla 36. Valores séricos de resistina, lactoferrina e inmunoglobulinas registrados en el 30° de vida en los pacientes diagnosticados de IAAS y en los que no presentaron IAAS.

	Resistina	Lactoferrina	IgA	IgM
IAAS				
Sí	21,60 (4,59)	991,93 (276,67)	39,85 (3,86)	124,15 (15,47)
No	16,21 (1,75)	781,73 (129,85)	24,75 (1,77)	81,91 (7,71)
p	0,32	0,25	0,01	0,09

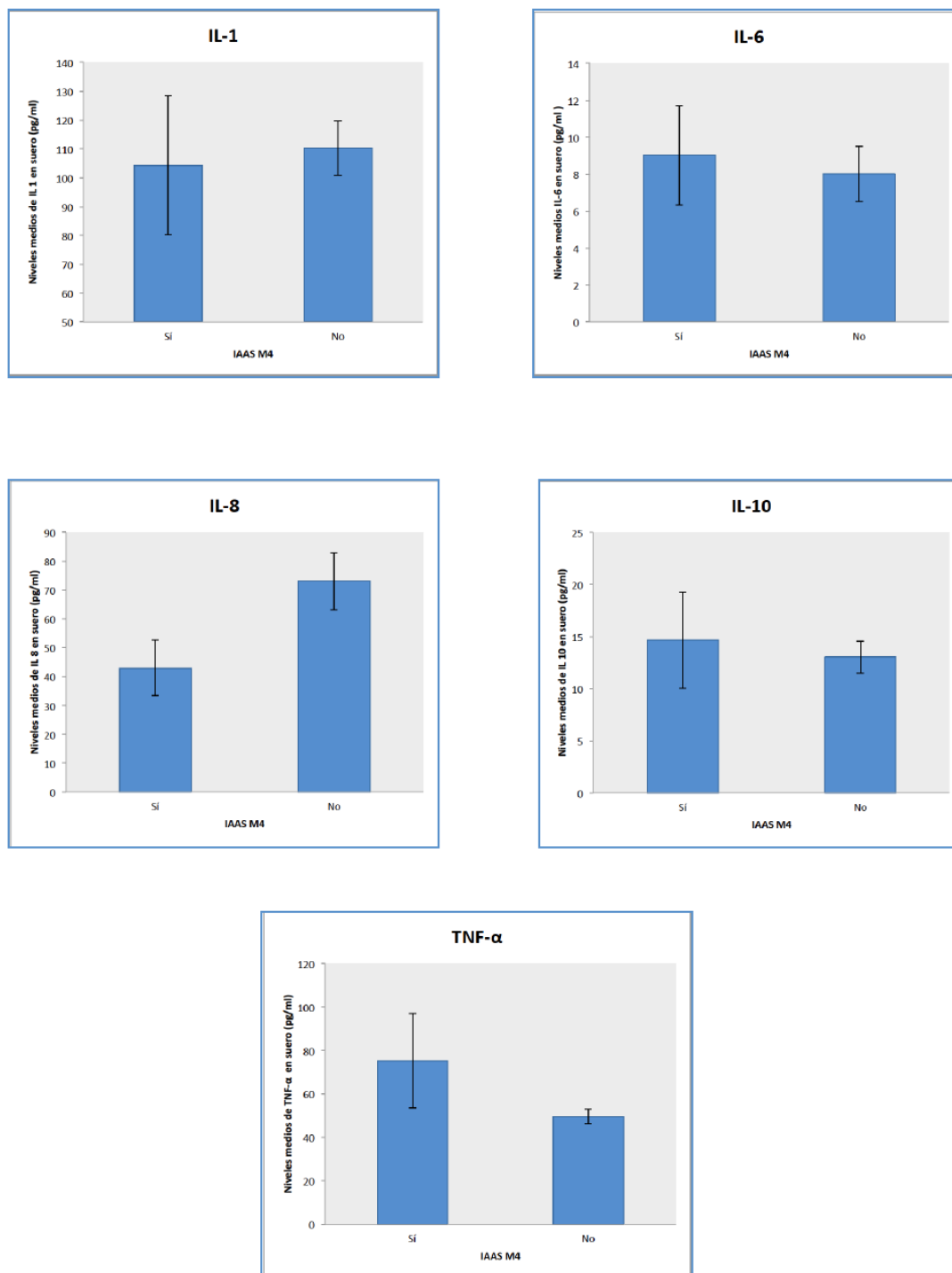
M1: nacimiento; M2: 3° día de vida; M3: 15° día de vida; M4: 30° día de vida.

Valores representados: media (\pm EEM)

Mann-Whitney: nivel significación $p < 0,05$

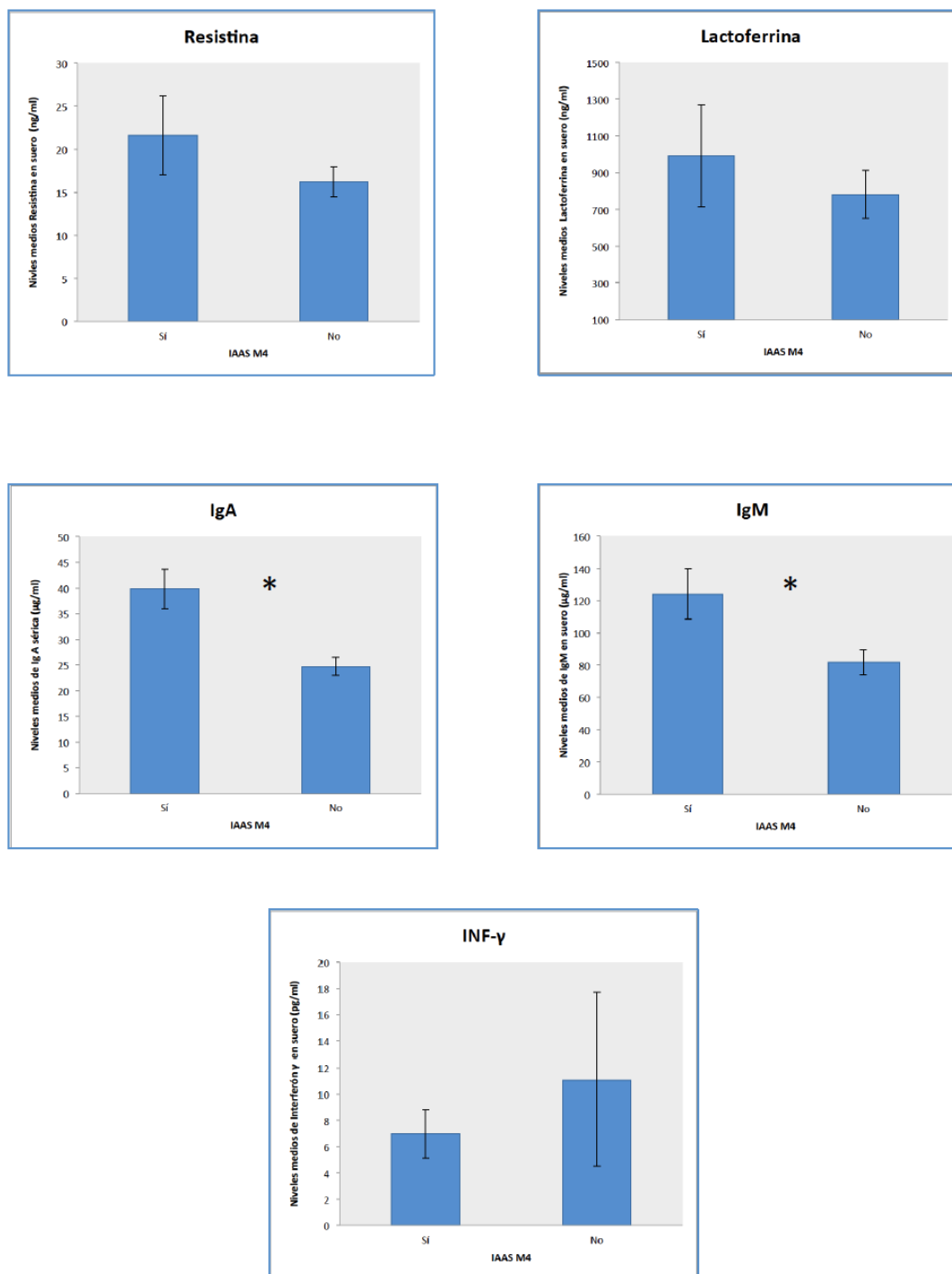
Al mes de vida, los pacientes que presentan una IAAS tienen niveles de IgA significativamente mayores ($p = 0,01$) que el resto. Esta tendencia se observa también en la IgM, aunque no llega a ser estadísticamente significativa ($p = 0,09$). Con respecto a las citoquinas y el resto de los inmunomarcadores analizados, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en este momento del estudio.

Figura 19. Comparativa de los niveles séricos de citoquinas en relación con diagnóstico de infección nosocomial a los 30 días de vida.



* *Mann-Whitney*: nivel significación $p < 0,05$

Figura 20. Comparativa de niveles séricos de lactoferrina, resistina, Inmunoglobulinas e Interferón- γ en relación con diagnóstico de infección nosocomial a los 30 días de vida.



* Mann-Whitney: nivel significación $p < 0,05$

5.13. VALORACIÓN DE LA SEGURIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN DE CALOSTRO OROFARÍNGEO.

Durante el procedimiento se registró frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, saturación cutánea de oxígeno y tensión arterial si se disponía de monitorización invasiva de la misma.

Los 33 pacientes que completaron el estudio recibieron una media de 84 dosis de calostro orofaríngeo, durante las cuales no presentaron alteración en constantes hemodinámicas ni constantes respiratorias. No fue preciso interrumpir el procedimiento en ningún paciente.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Este estudio ha pretendido evaluar los efectos que puede tener la administración de calostro orofaríngeo sobre los inmunomarcadores relacionados con la defensa (lactoferrina, resistina, citoquinas pro y antiinflamatorias e inmunoglobulinas A y M) en recién nacidos prematuros de muy bajo peso. Se ha valorado el uso del calostro como una potencial terapia inmune y no simplemente como un alimento en este grupo de pacientes, de forma que pudiera constituir una alternativa a la dieta enteral absoluta y/o un complemento de la nutrición enteral trófica de los primeros días de la vida de estos niños.

El alto contenido de factores inmunoprotectores presentes en el calostro, convierte al calostro en prioritario durante las primeras semanas de vida, cuando el recién nacido prematuro de muy bajo peso está más inestable y presenta un mayor riesgo de infección. Sin embargo, pueden existir comorbilidades en estos pacientes que contraindiquen la nutrición enteral. En estos casos, sería conveniente identificar un método seguro y eficaz para administrar calostro durante los primeros días de vida. La administración orofaríngea sería una posible alternativa.

Este trabajo, según la revisión realizada (Pubmed, Biblioteca Cochrane Plus), es el primer estudio prospectivo de intervención no aleatorizado, con grupo control, en el que la intervención se prolonga durante las primeras 2 semanas de vida y se valora el efecto inmunológico de la misma a lo largo del 1º mes de vida. Hasta ahora, en los estudios publicados (187), la intervención se iniciaba en las primeras 48 horas de vida y se mantenía durante un periodo que oscilaba entre 48 horas y un máximo de 7 días consecutivos.

6.1 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE CALOSTRO OROFARÍNCEO SOBRE LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINA A Y M

El recién nacido, más aún el recién nacido prematuro, presenta un déficit transitorio de IgA al nacimiento. Se ha descrito que los niveles protectores de IgA en el suero del neonato se alcanzan aproximadamente al mes de vida (129). La absorción intestinal de la IgA se ha observado como un hecho excepcional en el recién nacido prematuro. A este hecho se suma que la producción de IgAs a nivel de las células plasmáticas en el

intestino del recién nacido no es óptima, ya que estos linfocitos no son completamente funcionales al nacimiento. Todos estos factores conllevan que el recién nacido prematuro presente una alteración a nivel de su sistema inmune innato, con una mucosa intestinal altamente vulnerable a microorganismos patógenos (10).

La administración de calostro orofaríngeo en el período neonatal inmediato ha demostrado tener un impacto sobre los niveles de IgA. Rodríguez y cols (182), en el primer estudio prospectivo randomizado y doble ciego del que se dispone, obtuvieron un aumento de los niveles de IgA sérica tras la intervención. En esta misma línea, recientemente Lee y cols (183) han observado que, el incremento de la IgAs en el grupo que había recibido el calostro, se mantenía a las 2 semanas de vida.

En ambos estudios la intervención se iniciaba dentro de las primeras 48 horas (182) o entre las 48 y 96 horas post-parto (183). En cuanto a la cantidad de calostro administrada, estos trabajos coincidieron en utilizar 0,2 ml. No obstante, en el estudio de Rodríguez y cols se administró cada 2 h y en el de Lee y cols (183) cada 3 horas. Finalmente, el número de dosis recibidas por cada paciente fue de 24 en los dos trabajos.

En nuestro trabajo se optó por iniciar la intervención en las primeras 24 horas de vida, incorporando la administración del calostro orofaríngeo a la práctica habitual del cuidado de los recién nacidos de muy bajo peso en nuestra UCIN. Por ello, se ajustó la administración de 0,2ml de calostro con el protocolo de manipulación mínima de estos pacientes que se realiza cada 4 horas. Cada sujeto del grupo calostro de nuestro estudio recibió 84 dosis durante el tiempo de intervención.

Los resultados de nuestro trabajo siguen la línea de los estudios publicados, objetivándose un aumento progresivo en los niveles de IgA sérica durante el primer mes de vida en ambos grupos, con un mayor contenido de IgA en sangre en el grupo que ha recibido calostro orofaríngeo desde las primeras 24 horas de vida hasta el 15º día. Además esta diferencia se mantiene, de hecho se acentúa, hasta el final del periodo de seguimiento (1º mes), a pesar del cese de la intervención. Este hecho podría reflejar que la administración del calostro por vía orofaríngea influiría sobre la producción endógena de IgA. Las citoquinas exógenas de la leche materna, como la IL-6, estimularían la activación de linfocitos T y B, favoreciendo la producción de inmunoglobulinas, incluyendo la IgAs (180).

Estudios previos en adultos han demostrado que vía orofaríngea puede ser útil y segura para la administración de INF- α en aquellos pacientes que no toleren la administración parenteral (190,191). La vía orofaríngea se ha utilizado también para la administración de benzodiazepinas, midazolam, en las crisis convulsivas. El midazolam oromucoso ha demostrado ser igual de efectivo que la administración de diazepam intravenoso o rectal en el control del episodio convulsivo. De hecho, se postula como una opción prometedora en la primera línea de tratamiento de los niños con crisis convulsivas, particularmente en aquellos en los que no haya posibilidad de acceso intravascular (192).

El aumento en la IgA sérica, durante los primeros 30 días de vida, demostrado en nuestro estudio está acorde con los datos publicados en el trabajo de Maldonado y cols (193). En este estudio, realizado en una población de recién nacido prematuros de nuestro medio, se objetivó igualmente un incremento en los niveles de IgA sérica durante el primer mes de vida, desde valores prácticamente indetectables en sangre en la primera semana de vida hasta alcanzar niveles detectables en el 50%-60% de los recién nacidos estudiados al mes.

La principal limitación de nuestro estudio es el tamaño muestral. El número de pacientes que han completado el protocolo de tratamiento en este trabajo ha sido inferior al del estudio publicado por Lee y cols (183) (33 sujetos frente a 42). Esta podría ser una de las razones por las que no se han obtenido unas diferencias estadísticamente significativas durante el periodo de intervención. El porcentaje de pérdida de pacientes durante el desarrollo de ambos trabajos ha sido similar, 13,16% frente a 12,5%.

Hay que destacar además que nuestro estudio es el primero en el que las determinaciones de IgA se han realizado en sangre, no en secreciones (saliva, aspirado traqueal u orina), de forma que no ha sido posible realizar una comparación en términos absolutos con otros estudios. La determinación de IgAs en saliva durante la intervención puede verse influenciada por la presencia de IgAs en el calostro que se esté administrando y no ser un reflejo del aumento de producción de IgAs por parte del recién nacido.

La Inmunoglobulina M no ha sido valorada en los trabajos descritos previamente. El sistema inmune del recién nacido prematuro sí es capaz de producir normalmente IgM en respuesta a los patógenos. Los resultados de nuestro estudio coinciden con los datos publicados (12) que apuntan a un aumento de los niveles de IgM en el periodo postnatal

inmediato. En el grupo de pacientes que ha recibido calostro orofaríngeo el incremento tiene lugar de forma significativa durante la 3 y 4ª semana de vida de forma que al mes de vida muestran unos niveles más elevados de IgM que el grupo control, aunque la diferencia no ha sido estadísticamente significativa. Este aumento en la concentración de IgM supondría una mayor capacidad en la respuesta inmune frente a microorganismos como bacilos gram-negativo (12,24).

6.2. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CALOSTRO OROFARÍNCEO SOBRE LOS NIVELES DE LACTOFERRINA

La lactoferrina tiene propiedades antiinfecciosas, aumentando las defensas frente a patógenos entéricos como *E.coli*. Forma parte de la respuesta inmune innata y puede reducir la incidencia de sepsis nosocomial en el recién nacido de muy bajo peso y de enterocolitis necrosante en modelos animales. Es la principal proteína del suero en el calostro, lágrima y saliva (49,50). La isoforma bovina es casi homóloga a la humana. En una reciente revisión realizada por Pammi y cols (141) se concluye que la profilaxis con lactoferrina oral, con o sin probióticos, reduce la sepsis tardía y la enterocolitis necrosante grado II o mayor en prematuros, sin presentar efectos adversos. El trabajo de Manzoni y cols sigue esta misma línea (50).

Los estudios que valoran la administración de calostro orofaríngeo reflejan un aumento de la concentración de lactoferrina en orina al finalizar la administración del calostro en el grupo de intervención con respecto al grupo control. En el estudio de Rodríguez y cols (182), con un tamaño de muestra pequeño (n=15), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos antes y después del tratamiento. Sin embargo, en el estudio de Lee y cols (183) (n=40) sí se constató un aumento progresivo de los niveles de lactoferrina durante los primeros 15 días de vida en ambos grupos, con diferencias estadísticamente significativas después de administrar el calostro orofaríngeo, pero no a las dos semanas de vida.

En nuestro estudio, siguiendo la línea de Lee y cols (183), se observa un aumento de los niveles séricos de lactoferrina en los dos grupos durante los primeros quince días de vida, siendo el aumento estadísticamente significativo en ambos grupos con respecto al nacimiento. Sin embargo, al igual que Rodríguez y cols (182), no hemos podido demostrar que la administración de calostro orofaríngeo produzca un mayor incremento en los niveles de lactoferrina que el presentado en el grupo control durante ese tiempo.

La lactoferrina del recién nacido tiene origen materno principalmente en los niños alimentados con leche materna. La lactoferrina de la leche materna se absorbe a nivel del intestino y es transportada a sangre a nivel del sistema circulatorio (194) desde donde pasaría a órganos linfoides secundarios. Durante el primer mes de la lactancia, se produce una disminución en la concentración de lactoferrina en la leche materna. Petrova y cols (142) observaron como existía un pico en la concentración de lactoferrina en la leche materna a los 6-8 días y posteriormente ésta iba disminuyendo progresivamente.

El descenso de la concentración de lactoferrina en la leche materna se traduce en una disminución de los niveles de lactoferrina en sangre al mes de vida en los recién nacidos prematuros de nuestro estudio. Sin embargo, es llamativo que el descenso que se produce en el grupo control es más acusado que el grupo calostro, obteniéndose niveles séricos de lactoferrina significativamente mayores en aquellos pacientes que recibieron calostro durante los primeros quince días de vida. Este dato apunta a que la absorción del calostro a nivel orofaríngeo, no sólo intestinal, modularía la función del sistema inmune a través de la interacción a nivel local con el tejido linfóide asociado a mucosas.

6.3 EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CALOSTRO SOBRE LOS NIVELES DE RESISTINA Y CITOQUINAS PRO Y ANTI-INFLAMATORIAS.

La producción de citoquinas está reducida en el recién nacido. Según los estudios, Los niveles de IL-1 son normales, mientras que los de IL-2 e IL-6 están discretamente disminuidos y los niveles de IL-4, IL-8, IL-10, IL-12 e INF- γ son bajos (14). La producción de resistina por las células mononucleares se ve incrementada por la acción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 (IL-1 β), IL-6, TNF- α (195).

6.3.1 Interleuquina-1Ra

La producción de IL-1 está aumentada con respecto al resto de citoquinas, relacionándose con respuesta una inflamatoria excesiva a nivel sistémico e intestinal (104).

En nuestros pacientes, dentro de la familia de la IL-1, se ha medio la IL-Ra. Durante el periodo neonatal, los niveles de IL-Ra están fisiológicamente elevados al nacimiento y posteriormente descienden paulatinamente (196).

Los niveles de IL-1Ra obtenidos en las primeras 24 horas de vida son superiores al del resto de interleuquinas y citoquinas analizadas y esta superioridad se mantiene durante el primer mes de vida en ambos grupos. Al tercer día de vida la concentración de IL-1Ra obtenida en los neonatos que reciben el calostro orofaríngeo es superior a la del grupo control. Si tenemos en cuenta que la IL-1Ra es el antagonista natural del receptor de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β , esta diferencia podría suponer una mejora en la respuesta anti-inflamatorio de estos pacientes.

El balance entre IL-1 e IL-1Ra ha sido estudiado en gran variedad de modelos experimentales de enfermedades como artritis, enfermedad inflamatoria intestinal o desarrollo de displasia broncopulmonar. En estas enfermedades se ha visto que el aumento en la producción de IL-1 y/o el descenso en la producción de IL-1Ra, predispone al desarrollo de la enfermedad y que la administración terapéutica de IL-1Ra es eficaz para la prevención del daño tisular (197). Kakkerá y cols (198) observaron que los recién nacidos prematuros con síndrome de distrés respiratorio, conectados a ventilación mecánica durante la primera semana de vida y que desarrollaban displasia broncopulmonar posteriormente, presentaban niveles superiores de IL-Ra e IL-1 β en aspirado traqueal. La alteración en el balance IL-1 antagonistas/agonistas favorecía el efecto pro-inflamatorio en el grupo de pacientes con displasia broncopulmonar. A su vez, polimorfismos en el gen de IL-Ra se han relacionado estrechamente en los recién nacidos prematuros con una mayor riesgo de sepsis neonatal y displasia broncopulmonar (199).

En nuestro estudio, tal y como aparece reflejado en la literatura, se produce un descenso progresivo en los niveles de IL-1Ra durante el tiempo de seguimiento en el que no se administra el calostro por vía orofaríngea. Lee y cols determinaron IL-1 β en saliva y en orina y encontraron que la concentración de IL-1 β en orina 7 días después de finalizar la intervención era significativamente menor en el grupo que había recibido el calostro durante los primeros días de vida. Este resultado podría ser comparable con el mayor contenido de IL-1Ra en sangre, que se ha demostrado en nuestro estudio durante los primeros días en los pacientes del grupo calostro. Ambas situaciones reflejarían una modificación del patrón inflamatorio, bien sea por la disminución de la citoquina pro-inflamatoria, bien por el aumento de su antagonista natural.

6.3.2 Interleuquina 6

La IL-6 es uno de los principales mediadores inflamatorios, de forma que durante el proceso inflamatorio los niveles de IL-6 en suero se eleva drásticamente desde su rango basal de 1-5 pg/ml (66,75). Los niveles de IL-6 registrados al nacimiento en nuestro grupo de pacientes se encuentran dentro los rangos publicados en otros estudios (71,200-202).

En nuestro trabajo se ha obtenido una concentración sérica de IL-6 más elevada durante los tres primeros días de vida de los sujetos que en otros momentos del estudio. Este dato estaría en consonancia con los datos publicados acerca del contenido de IL-6 en el calostro de las madres de los recién nacidos prematuros frente a la leche madura (126), que apuntan hacia una posible función biológica, como la estimulación de las células del sistema inmune, produciendo como consecuencia un aumento de la liberación de IgAs (180).

A diferencia de la tendencia descrita para la IL-1Ra, la concentración de IL-6 en los pacientes que reciben calostro orofaríngeo desciende desde el nacimiento, de igual forma que en el grupo control. Lee y cols (183) describieron también este descenso, tanto en las muestras de saliva como en las de orina, sin poder demostrar una influencia de la administración del calostro sobre estos valores.

No obstante, nuestros resultados sí reflejan una modificación de esta citoquina pro-inflamatoria. Los niveles de IL-6 obtenidos al mes de vida son significativamente inferiores en los prematuros que recibieron el calostro orofaríngeo durante los primeros quince días postnatales. Un descenso de los niveles séricos de IL-6 durante las primeras semanas de vida, asociado a un reducido estado inflamatorio, se ha mostrado beneficioso en el desarrollo óseo del recién nacido prematuro (203). Los efectos de la modificación del estado inflamatorio en el periodo perinatal podría tener también efectos a largo plazo. O'Shea y cols concluyeron en su estudio realizado en menores de 28 semanas de gestación, que los niños que habían presentado de forma mantenida o recurrente niveles elevados de proteínas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α entre otras) durante las primeras semanas de vida, presentaban un mayor riesgo de déficit cognitivo y alteraciones en el comportamiento (déficit de atención e hiperactividad) (204).

6.3.3 Interleuquina 8

La IL-8 pertenece al grupo de citoquinas pro-inflamatorias y es un potente agente quimiotáctico para los neutrófilos. Se dispone de estudios que han relacionado los niveles elevados de IL-6 e IL-8 en cordón umbilical con diferentes patologías propias del prematuro como la displasia broncopulmonar (205) o el riesgo de sepsis durante la primera semana de vida (201). El aumento de IL-1 β al nacimiento sería un potente inductor de la expresión de IL-8 (104).

Lee y cols no (183) detectaron variaciones significativas en la excreción de IL-8 en orina durante su ensayo, manteniéndose los valores medios entre 1 y 2 ng/g creatinina. Sin embargo, en las determinaciones que realizaron en saliva sí observaron que, el grupo que había recibido el calostro orofaríngeo durante la primera semana de vida, tenía valores significativamente más bajos que el grupo control. Los resultados de nuestro estudio concuerdan con estos hallazgos. No hemos obtenido diferencias entre los dos grupos durante el tiempo de intervención, pero en el seguimiento posterior, al mes de vida, sí se demuestra que la concentración de IL-8 es significativamente menor en los pacientes que recibieron el calostro orofaríngeo, mientras que en el grupo control los niveles IL-8 se mantienen estables desde el nacimiento. La mayor concentración de IL-1Ra detectada durante los primeros días en este grupo de pacientes podría estar relacionada con el descenso en los niveles de IL-8, ya que actuaría como antagonista de la IL-1 β a nivel celular, disminuyendo su expresión.

El descenso de las concentraciones de IL-6 e IL-8 observado al mes de vida en los pacientes que recibieron calostro orofaríngeo, podría estar relacionado también con la acción inmunomoduladora de la lactoferrina. Legrand y cols (206) sugirieron que la lactoferrina, a través de la unión a receptores de membrana de diversas células inmunocompetentes, modularía la expresión de genes involucrados en diferentes funciones como la activación celular y la producción de citoquinas.

6.3.4 Interleuquina 10

La IL-10 forma parte del grupo de citoquinas anti-inflamatorias que previene una respuesta inflamatoria excesiva durante la sepsis. Las concentraciones elevadas de IL-10 en suero se relacionan con mayor gravedad en las patologías, como distrés respiratorio (207) o sepsis (78). No obstante, niveles bajos de IL-10 se han relacionado con mayor riesgo de desarrollar displasia broncopulmonar (205).

Al nacimiento, los niveles medios de IL-10 en suero de los pacientes de nuestro trabajo están dentro de los rangos de concentración de IL-10 en cordón umbilical descritos en otros trabajos (205). Sin embargo, estos valores, en el momento basal del estudio, son inferiores a los obtenidos en el trabajo de Rodríguez y cols (182): 108 pg/ml (63-247) en grupo calostro y 79,8 pg/ml (65,3-1913) en control, frente a los 28,0 pg/ml ($\pm 3,2$) y 25,3 pg/ml ($\pm 2,1$). En este estudio observaron una disminución en los niveles de IL-10 una vez finalizado el tratamiento, que no se produjo en el grupo control, aunque no pudieron encontrar diferencias estadísticamente significativas.

En nuestro trabajo se evidencia una disminución significativa de la concentración media de IL-10 a los tres días de vida. Sin embargo, a diferencia del trabajo de Rodríguez y cols (182), ésta se produce tanto en el grupo calostro como en el grupo control. Posiblemente este hecho se deba a una menor gravedad de la patología del recién nacido durante los primeros días, con mejoría del cuadro de distrés respiratorio.

Lee y cols (183) no describieron variaciones en la excreción urinaria de IL-10 ni en los niveles en saliva durante el periodo de estudio de su grupo de pacientes. Nuestros resultados siguen esta línea después de la significativa reducción que tiene lugar en las primeras 72 horas de vida, de forma que a los 15 y 30 días de vida los niveles séricos de IL-10 se mantienen constantes, sin diferencias entre grupos.

6.3.5 Factor de Necrosis Tumoral- α

Rocha y cols (205) publican en su trabajo rangos amplios en la concentración de TNF- α en sangre venosa de cordón umbilical. Los niveles séricos medios de los pacientes de nuestro estudio al nacimiento se encuentran dentro de ese rango y se asemejan a los valores obtenidos en la saliva de los sujetos al inicio del trabajo de Lee y cols. El TNF- α amplifica la señal inflamatoria, activando la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6 y la IL-8, además de la estimular la producción de radicales libres.

Los resultados de nuestro trabajo reflejan que durante el tiempo de administración del calostro orofaríngeo, los niveles de TNF- α son inferiores en el grupo calostro, frente al grupo control, con diferencias estadísticamente significativas el tercer día de vida. El aumento de la concentración sérica de TNF- α , que se registra a los 15 días de vida en el grupo control, podría ser otra de las causas de la presencia de niveles superiores de interleuquinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL-8) detectada al mes de vida en el grupo control.

6.3.6 Interferón- γ

El interferón- γ tiene una función importante tanto en la inmunidad innata como en la respuesta adaptativa, ya que induce la producción de TNF- α e IL-12.

Lee y cols (183) valoran esta citoquina también en su trabajo, sin obtener diferencias estadísticamente significativas tras la intervención ni en el seguimiento posterior. Los resultados de nuestro trabajo siguen la línea de estos autores, obteniendo unos valores similares en suero a los que ellos refieren en saliva. La administración de calostro orofaríngeo no ha demostrado una influencia en los niveles de INF- γ durante el primer mes de vida en los pacientes de nuestro estudio.

6.3.7 Resistina

Hasta ahora, los trabajos que han valorado las consecuencias inmunológicas de la administración de calostro orofaríngeo en los recién nacidos prematuros, no han determinado los niveles de resistina en suero. Las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-6 estimulan la producción de resistina por parte de los macrófagos y células mononucleares.

La IL-1Ra, como reactante de fase aguda, también se ha relacionado con los niveles de resistina sérica. Forsblad d'Elia y cols (208) realizaron un estudio en mujeres postmenopáusicas con artritis reumatoide. En este trabajo encontraron que la resistina estaba relacionada con los marcadores de inflamación, particularmente con el aumento de IL-1Ra, aunque no pudieron dilucidar la conexión exacta entre resistina y el cociente IL-1 β /IL-1Ra.

En nuestro trabajo, los niveles superiores de IL-1Ra registrados durante los primeros días de vida en el grupo de pacientes que reciben calostro, podrían ser una de las razones por la que la concentración de resistina en este grupo de pacientes no desciende a los 15 días de vida. En el grupo control, la elevación de TNF- α , no se ha traducido en un aumento de los niveles de resistina. Esta mayor concentración de resistina sérica podría suponer una ventaja para el recién nacido prematuro, ya que interviene en la homeostasis de la glucosa, relacionándose con un aumento de la expresión de las enzimas de la ruta de la neoglucogénesis hepática (145,154).

Los niveles de resistina obtenidos en nuestro trabajo son comparables a los obtenidos en otros estudios en recién nacidos prematuros (209-211).

6.4 VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE INMUNOMARCADORES EN EL CALOSTRO

Los estudios de Castellote y cols (126), Araujo y cols(127) y Mehta y cols (142) demostraron que el calostro de las madres de niños prematuros presentaba una mayor concentración de factores inmunológicos que el calostro de las madres de niños nacidos a término.

La concentración de IgAs medida en las muestras de calostro de las madres de los pacientes de nuestro estudio se asemeja a los valores publicados en el estudio de Castellote y cols (126). En concreto, IgAs sería comparable con los valores del calostro de niños prematuros entre 30 y 37 semanas y niños a término, pero superior a los valores que describen para los niños menores de 30 semanas. Nuestros valores de IgAs sí son semejantes a los valores que se registran en el estudio de Mehta y cols (142) para madres de recién nacidos con $28\pm 2,2$ semanas de gestación.

El contenido de IgM en la leche materna es más bajo que el de IgAs. El calostro de las madres participantes en nuestro trabajo presenta una mayor concentración de IgM que medida en valores publicados en el trabajo de Koenig y cols (128) para las madres de recién nacidos prematuros menores de 32 semanas de gestación ($625,17 \mu\text{g/ml}$ frente a $17 \mu\text{g/ml}$).

Los valores de lactoferrina en el calostro de nuestro estudio son más altos que los que aparecen en el estudio de Mehta y cols (142). No obstante el tiempo de obtención de la muestra en ese estudio fue entre el 6-8º día post-parto y la técnica utilizada para la determinación fue diferente a la de nuestro estudio, por lo que los valores podrían no ser comparables en términos absolutos.

En cuanto al contenido de citoquinas en el calostro, los valores de IL-6, y 8 son comparables con los obtenidos en las madres de niños muy prematuros (menores de 30 semanas de gestación) en el estudio de Castellote y cols (126), en el que las muestras de calostro se recogieron en los primeros días post-parto (3 días ± 2). La concentración de

IL-10 del calostro de nuestros pacientes es superior al obtenido en las madres de este estudio para ese grupo de edad y se asemeja más a las cifras del calostro de las madres de prematuros nacidos entre la 30 y la 37 semanas de gestación. Los resultados de los niveles de TNF- α en el calostro de las madres de nuestro trabajo son más elevados que los medidos, para cualquier rango de edad gestacional, en el estudio de Castellote y cols (126). No obstante, Ustundag y cols (133) publicaron niveles mayores de TNF- α en la leche materna durante la primera semana postparto que los obtenidos en el calostro de nuestro estudio.

El INF- γ se encuentra en muy baja concentración en la leche. En nuestro trabajo sólo se ha podido determinar en el 55% de las muestras de calostro de las madres del estudio.

Los trabajos de Rodríguez y cols (181,182) y Lee y cols (183) no describen la concentración de factores inmunológicos del calostro de las madres participantes en sus estudios.

6.5 REPERCUSIÓN CLÍNICA DE LA ADMINISTRACIÓN DE CALOSTRO OROFARÍNGEO

6.5.1 Patología gastrointestinal. Enterocolitis necrosante.

Los estudios publicados en los últimos cinco años que han valorado las posibles repercusiones clínicas de la administración de calostro orofaríngeo han mostrado resultados diversos en los beneficios a nivel digestivo. Sin embargo, hasta ahora, ninguno ha podido demostrar una disminución en la incidencia de enterocolitis necrosante.

En el trabajo presentado por Rodríguez y cols (182) los pacientes del grupo calostro alcanzaron antes la nutrición enteral completa (fijada en su estudio como volumen de nutrición enteral de 150 ml/kg/día). En esta línea, Caprio y cols (185) presentaron en 2013 un estudio en el Congreso Anual de la Academia Americana de Pediatría. Se trataba de un estudio descriptivo en el que evaluaban el impacto de la implantación del protocolo de administración de calostro orofaríngeo, respecto a una cohorte retrospectiva de pacientes de su hospital. Incluyeron 58 pacientes menores de 1250 g.

Estos autores concluyeron que se había producido una reducción significativa en los días de nutrición parenteral y de catéter central, sin poder demostrar una disminución en la incidencia de enterocolitis o sepsis tardía. Ese mismo año, con un diseño experimental similar, Seigel y cols (186) publicaron un estudio de cohortes retrospectivo en el que pretendían comprobar la viabilidad y seguridad de la implantación de un protocolo de administración de calostro orofaríngeo en su UCIN. Administraron 0,2 ml de calostro cada 4 h durante 5 días a partir de las primeras 48 horas de vida a una cohorte de 89 recién nacidos prematuros menores de 28 semanas de gestación. Se compararon datos demográficos, de alimentación y morbi-mortalidad con una cohorte retrospectiva (n= 280) de su propio hospital. En este estudio la incidencia de NEC fue del 6%, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos periodos. Tampoco pudieron demostrar una disminución en el tiempo hasta alcanzar la nutrición enteral completa.

Lee y cols (183) no pudieron demostrar que la administración de calostro orofaríngeo redujera la incidencia de NEC \geq IIb de la clasificación de Bell ni el tiempo hasta alcanzar la nutrición enteral completa.

En nuestro trabajo, al igual que en estudios previos, no se ha obtenido una reducción en el tiempo hasta alcanzar nutrición enteral completa (valorada como días de nutrición parenteral) ni de la incidencia de enterocolitis tras la administración de calostro orofaríngeo.

La baja incidencia de esta patología, junto con el reducido tamaño de nuestra muestra, dificulta la posibilidad de obtener una relación estadísticamente significativa. La incidencia de enterocolitis durante el tiempo del estudio (6%) es comparable con los datos de incidencia de enterocolitis necrosante de la red SEN 1500 durante los años 2009-2013 (7,14%).

Los estudios realizados en modelos animales, humanos y *in vitro* han relacionado la producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias con el desarrollo de NEC, como por ejemplo la IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α o la mayor producción óxido nítrico y radicales libres (35). Edelson y cols (212) evaluaron los niveles de citoquinas en recién nacidos afectados de NEC y encontraron que, no sólo los niveles de IL-8 estaban elevados en los que presentaban NEC grado III comparado con los de menor gravedad, sino que también presentaban una mayor concentración de citoquinas contra-reguladoras (IL-10).

McElroy y cols (213) valoraron el efecto de TNF- α sobre el intestino inmaduro. Para ello utilizaron muestras de modelos animales con NEC (ratón), muestras de resecciones intestinales de prematuros con NEC grado III, muestras de intestino de recién nacidos prematuros sin NEC pero que habían presentado perforación intestinal espontánea y, además, muestras de intestino de recién nacidos casi a término sin patología inflamatoria (atresias o estenosis intestinales, enfermedad de Hirschprung). Estos autores concluyeron que los niveles intraepiteliales de mucina estaban disminuidos en los pacientes que habían desarrollado NEC. El TNF- α induciría una alteración en la producción de mucina de las células caliciformes del intestino inmaduro de los recién nacidos prematuros, facilitando el desarrollo de NEC.

En consonancia con los trabajos publicados, en nuestro estudio, a pesar del reducido número de casos de NEC al mes de vida (2 casos: recién nacida prematura, gemela, de 25 semanas de gestación y recién nacida de 23 semanas de gestación en contexto de sepsis por *E. coli*) también se ha demostrado una relación estadísticamente significativa con los niveles de TNF- α en ese momento del estudio. Estas dos pacientes presentaron una concentración media de TNF- α superior al resto de pacientes del estudio en ese momento (M4, $p = 0,017$). No obstante, no se ha podido establecer la relación apuntada en los trabajos previos con otras citoquinas como IL-6, IL-8 o IL-10.

En base a lo expuesto hasta ahora, el calostro administrado por vía orofaríngea podría tener un efecto protector frente al riesgo desarrollo de NEC, ya que, según nuestros resultados, produce una reducción de los niveles de TNF- α , durante los primeros días de vida, además de otras citoquinas pro-inflamatorias (IL-8 e IL-10)

6.5.2 Infección nosocomial

La repercusión de la administración de calostro orofaríngeo a nivel de una posible reducción en la tasa de infección nosocomial ha sido valorada por otros trabajos previamente. Rodríguez y cols (182) observaron una mayor incidencia de bacteriemia y neumonía en los pacientes del grupo calostro frente al grupo control, aunque no demostró que esta diferencia fuera estadísticamente significativa.

Lee y cols (183) comprobaron en su trabajo una reducción en la incidencia de sepsis clínica (signos y síntomas de SRIS con hemocultivo negativo) en el grupo calostro, pero no en la sepsis nosocomial con hemocultivo positivo.

Los episodios de infección nosocomial o infección asociada a la asistencia sanitaria son habitualmente episodios únicos que suelen ocurrir en la segunda o tercera semana de vida. Según los registros de infección nosocomial del Grupo de Hospitales Castrillo, ésta es superior al 20% en los neonatos menores de 1500g. Nuestros resultados se enmarcan dentro de estos valores, ya que la tasa de infección nosocomial ha sido del 21,21%. De los 7 episodios de IAAS registrados, 2 de ellos tuvieron lugar en la misma paciente, con un intervalo de 10 días.

Semejante a lo descrito para la enterocolitis necrosante, nuestro trabajo sigue la tendencia de los estudios publicados y no ha podido demostrar un efecto de la administración de calostro orofaríngeo sobre la reducción de la infección nosocomial.

A pesar de no poder demostrar esta repercusión clínica, son muchos los estudios publicados que relacionan los factores inmunomoduladores del calostro con la capacidad de disminuir la infección causada por bacterias, virus y hongos (163,164,178,187). Durante la fase inicial de la infección se produce una hiperrespuesta inflamatoria, donde el sistema inmune innato eleva la producción de citoquinas pro-inflamatorias para combatir la infección, mientras que los componentes del sistema inmune adaptativos se movilizan. Esta respuesta inicial es seguida de una respuesta anti-inflamatoria compensadora hasta alcanzar la homeostasis del estado inflamatorio (214).

Las citoquinas se elevan en el suero de pacientes con sepsis y sepsis grave comparado con pacientes no sépticos (54). Los estudios en neonatos han concluido que los niveles elevados de IL-6 e IL-8 podrían tener valor en el diagnóstico precoz de la sepsis (82,215). Sin embargo, a pesar de que son buenos indicadores de infección, también se producen en procesos inflamatorios estériles como la cirugía, alteraciones autoinmunes, lo que reduce su especificidad (216). Estas citoquinas poseen una vida media muy corta, lo que reduce su sensibilidad diagnóstica cuando han transcurrido 24-48 horas del inicio de la infección (62,68).

Dentro de la cascada de respuesta compensadora que sigue al estado pro-inflamatorio, se produce una elevación de las citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10. Esta respuesta es más lenta y se prolonga más en el tiempo, tras el comienzo de la infección, hasta alcanzar la homeostasis en la respuesta

inflamatoria. En los pacientes con sepsis grave los niveles de IL-10 se encuentran significativamente incrementados.

En nuestro trabajo hemos analizado la relación de la concentración sérica de diversas citoquinas con el diagnóstico de infección nosocomial y dentro de éstas, las infecciones causadas por bacilos gram-negativos (asociadas a mayor mortalidad dentro de los recién nacidos menores de 1500g).

A los 15 días de vida (M3), los cinco pacientes que presentaban una infección nosocomial, sepsis nosocomial, tenían una concentración de IL-10 significativamente superior al resto de pacientes en ese momento del estudio. Esta diferencia se observaba también dentro del grupo de tres pacientes con sepsis nosocomial por Bacilos Gram negativo. No obstante, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IL-6 e IL-8. Posiblemente este hecho se deba a lo referido anteriormente, es decir, tienen una vida media muy corta y descienden rápidamente a las 24-48 h del inicio de la infección. Además, la antibioterapia ha demostrado descender los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α (76)

Al mes de vida, de los 3 pacientes diagnosticados de IAAS, sólo 1 de ellos presentaba una infección nosocomial con hemocultivo positivo, pero no por Bacilo Gram negativo. En el caso de la ITU, el hemocultivo fue negativo. El paciente restante se mantenía en tratamiento antibiótico desde hacía 15 días. Estas circunstancias explicarían la ausencia de significación en el análisis de la relación de los niveles de citoquinas con el diagnóstico de sepsis en este momento del estudio. La concentración de IgA e IgM sí se ha demostrado ser significativamente mayor en este grupo reducido de pacientes al mes de vida. Este aumento refleja la respuesta inmune adaptativa, específica, del neonato frente a la infección.

Aliefendioglu y cols (91) sugirieron que los niveles de resistina estaban más elevados en los recién nacidos prematuros con sepsis y que estos valores se correlacionaban con la IL-6. Según nuestros resultados, en los pacientes con sepsis nosocomial la concentración de resistina era discretamente superior, aunque no se ha podido demostrar una diferencia estadísticamente significativa.

Se ha analizado la relación del calostro con otras comorbilidades del periodo neonatal inmediato, como las lesiones en ecografía cerebral o la presencia de retinopatía de la prematuridad. La administración de calostro orofaríngeo no ha demostrado tener un efecto en la incidencia de dichos procesos

El limitado tamaño de muestra, así como la etiología multifactorial de las patologías analizadas, pueden ser la principal explicación de estos resultados. Por tanto, sería necesario realizar nuevos estudios en los que el número de participantes fuera mayor y en los que hubiera una uniformidad en la descripción de las variables clínicas (definición de sepsis nosocomial y enterocolitis necrosante), así como en el diseño de la intervención (tiempo de inicio, periodicidad y días de duración).

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA

La administración de calostro orofaríngeo a los recién nacidos prematuros de muy bajo peso durante los primeros quince días de vida puede influir sobre el desarrollo del sistema inmunitario del recién nacido. Se observa un aumento de la producción de inmunoglobulinas A y M, lactoferrina, resistina y en un cambio del perfil inflamatorio con disminución de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- α) y aumento de la citoquina anti-inflamatoria (IL-1 Ra) durante el primer mes de vida.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

La administración de calostro orofaríngeo durante los primeros quince días de vida no ha demostrado tener una repercusión clínica en términos de reducción de patología digestiva, principalmente enterocolitis necrosante, ni infecciosa, infección nosocomial, a lo largo del primer mes de vida.

CONCLUSIÓN TERCERA

La presentación de una infección nosocomial o enterocolitis necrosante supone una alteración en los niveles de inmunomarcadores analizados. Los pacientes diagnosticados de enterocolitis necrosante grado \geq IIb de clasificación de Bell presentan concentraciones séricas mayores de TNF- α que el resto de recién nacidos prematuros del estudio y los recién nacidos prematuros con un episodio de infección nosocomial presentan niveles séricos de Inmunoglobulinas (A y M) e IL-10 superiores al resto de pacientes del estudio.

CONCLUSIÓN CUARTA

La administración de calostro por vía orofaríngea se ha demostrado un procedimiento seguro durante la realización del procedimiento, lo cual ha permitido instaurar el protocolo de extracción de calostro en las primeras horas tras un parto prematuro dentro de la práctica asistencial de la Unidad de Neonatología, convirtiéndose así en un elemento de promoción de la lactancia materna

CONCLUSIÓN GENERAL

La administración de calostro orofaríngeo durante los primeros 15 días de vida se ha traducido en un aumento de inmunoglobulinas y una modulación de la señalización inflamatoria favoreciendo la vía anti-inflamatoria, lo que indicaría una mayor capacidad defensiva. Por tanto, esta práctica podría estimular y favorecer el desarrollo del sistema inmunológico de estos pacientes altamente susceptibles y aunque se precisan de futuros estudios con un número superior, nuestros resultados muestran una vía de gran interés para recién nacidos prematuros y también neonatos a término, enfermos, en los que la nutrición enteral completa esté contraindicada y que podrían beneficiarse de esta intervención.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Nacimientos prematuros. Nota descriptiva nº 363. Noviembre de 2013.
2. Rellán Rodríguez S, García de Ribera C, Aragón García MP. El recién nacido prematuro. Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Neonatología. 2008;8:68-77 Disponible en: www.aeped.es/protocolos/
3. www.ine.es
4. Mandy GT. Short-term complications of the premature infant. www.uptodate.com ©2015 UpToDate®
5. Análisis de los datos de Morbimortalidad 2013. Grupo SEN 1500. Sociedad Española de Neonatología. Diciembre 2014
6. Estudio de Mortalidad predicha. Grupo SEN 1500. Sociedad Española de Neonatología.
7. Vohr BR, Wright LL, Poole WK, McDonald SA. Neurodevelopmental outcomes of extremely low birth weight infants <32 weeks' gestation between 1993 and 1998. *Pediatrics*. 2005;116:635.
8. The CRIB (clinical risk index for babies) score: a tool for assessing initial neonatal risk and comparing performance of neonatal intensive care units. The International Neonatal Network. *Lancet*. 1993;342:193-8.
9. Rivas Ruiz R, Guzmán Cabañas JM, Párraga Quiles MJ, Ruiz González MD, Huertas Muñoz MD, R Álvarez Marcos R, Zapatero Martínez M. Utilidad del CRIB para predecir la muerte hospitalaria y la HIV en los RNMBP y extremado bajo peso al nacer. *An Pediatr*. 2007;66:140-5 doi:10.1157/13098931
10. Gregory KE, Walker WA. Immunologic Factors in Human Milk and Disease Prevention in the Preterm Infant. *Curr Pediatr Rep*. 2013;1:1-11 doi:10.1007/s40124-013-0028-2.
11. Álvarez MD. Inmunidad en el período neonatal. Ciudad Habana. [Accedido en septiembre 2013]. Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/pediatrica/inmunidad en el periodo neonatal.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/pediatrica/inmunidad%20en%20el%20periodo%20neonatal.pdf)

12. Abbas AK, Pober JS, Lichtman AH. Propiedades y consideraciones de la Respuesta Inmune. In: Inmunología celular y molecular. Elsevier Saunders Edit. 7° ed; 2011; p1-14.
13. Schelonka RL, Infante AJ. Neonatal Immunology. *Semin Perinatol.* 1998;22:2-14
14. Lewis DB, Gern JE, Hill HR, Friedlander SL, La pine TR, Lemanske RF, et al. Inmunología neonatal: Relevancia para el clínico. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2006; 36:189-204.
15. Nussbaum C, Sperandio M. Innate immune cell recruitment in the fetus and neonate. *J Reprod Immunol.* 2011;90:74–81.
16. Torres LS, Gamboa DA Inmunología perinatal. *FEMINA* 2014;42:185-92.
17. Dalal I, Roifman CM. Immunity of the newborn. www.uptodate.com ©2015 UpToDate®
18. Russel M.W., Mestecky J. Humoral immune responses to microbial infections in the genital tract. *Microbes Infect* 2002;4:667-77
19. Egmond MV, Damen CA, Spriel A.B.V et al. IgA and IgA Fc receptor. *Trends Immunol* 2001;22:205-11.
20. Landor M. Maternal-fetal transfer of immunoglobulins. *Ann Immunol* 1995;74:279-283
21. Ballow M, Cates KL, Rowe JC, Goetz C, Desbonnet C. Development of the immune system in very low birth weight (less than 1500 g) premature infants: concentrations of plasma immunoglobulins and patterns of infections. *Pediatr Res.* 1986;20:899-904.
22. Buckley RH. The immunologic system and disorders. En: *Nelson's textbook of pediatrics*, Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (Eds), WB Saunders, Philadelphia 2004. p.681.
23. Vick DJ, Hogge WA, Normansell DE, Burkett BJ, Harbert GM. Determination of Normal Human Fetal Immunoglobulin M Levels. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995;2: 115–7.
24. Sharma S, Lal H, Saigal RK. Immunoglobulins IgG, IgM and IgA levels in preterm and small for date newborns. *Indian Pediatr.* 1991;28:741-4.

25. McInnes IB. Role of cytokines in the immune system. www.uptodate.com ©2015 UpToDate®
26. García Tamayo F. Fundamentos de Inmunobiología. Universidad Nacional Autónoma de México. 1º Ed 1997: pag 364-373.
27. Palomo J, Dietrich D, Martin P, Palmer G, Gabay C. The interleukin (IL)-1 cytokine family- Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015;76:25-37
28. Sautois B, Fillet G, Beguin Y. Comparative cytokine production by in vitro stimulated mononucleated cells from cord blood and adult blood. *Exp Hematol* 1997; 25:103-8.
29. Lewis DB, Yu CC, Meyer J, English BK, Kahn SJ, Wilson CB. Cellular and molecular mechanisms for reduced interleukin 4 and interferon-gamma production by neonatal T cells. *J Clin Invest*. 1991;87:194–202
30. Garofolo RP, Goldman AS. Cytokines, chemokines and colony-stimulating factors in human milk: The 1997 update. *Biol Neonate* 1998;74:134–42.
31. Blackburn S. Cytokines in the Perinatal and Neonatal Periods. *J Perinat Neonatal Nurs*. 2008;22:187-190
32. Jiménez R, Figueras-Aloy J. Prematuridad. En *Tratado de Pediatría*. M.Cruz.. Editorial Ergon Madrid. 9ª Ed 2006;1:69-77.
33. Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am*. 1986;33:179-201.
34. López Sastre JB, Pérez Solís D. Definiciones de sepsis neonatal un largo camino por recorrer. *An Pediatr (Barc)*. 2006;65:525-8
35. Frost BL, Jilling T, Caplan MS. The importance of pro-inflammatory signaling in neonatal NEC. *Semin Perinatol*. 2008;32:100-6
36. García del Río M, Lastra G, Medina A, Sánchez-Tamayo. Protocolo diagnóstico de infección. *Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Neonatología*. 2008;23:219-23 Disponible en: www.aeped.es/protocolos/
37. Manroe BL, Weinberg AG, Rosenfeld CR, Browne R. The neonatal blood count in health and disease. I. Reference values for neutrophilic cells. *J Pediatr*. 1979;95:89-98

38. López Sastre JB, Coto Cotallo GD, Fernández Colomer B. Neonatal sepsis of nosocomial origin: an epidemiological study from the “Grupo de Hospitales Castrillo”. *J Perinat Med* 2002; 30:149-57.
39. Hornik CP, Fort P, Clark RH, et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev* 2012;88:S69-S74.
40. Fernández Colomer B, Coto Cotallo GD. Seguimiento de las sepsis verticales 1995-2012. XIX Reunión Anual del Grupo de Hospitales Castrillo. Astorga 13,14 de Septiembre de 2013.
41. Alós Cortés JI, Andreu Domingo A, Arribas Mir L, et al. Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas revisadas 2012. *Rev Esp Quimioter* 2012; 25:79-88.
42. López Sastre JB, Coto Cotallo GD, Fernández Colomer B. Neonatal sepsis of vertical transmission: an epidemiological study from the “Grupo de Hospitales Castrillo”. *J Perinat Med* 2000; 28:309-15.
43. Coto Cotallo GD, Fernández Colomer B. Sepsis nosocomial en RN<1500 g. Situación actual en España. XIX Reunión Anual del Grupo de Hospitales Castrillo. Astorga 13,14 de Septiembre de 2013.
44. Grupo SEN 1500 de la Sociedad Española de Neonatología. Estudio de Sepsis Tardía/Sepsis Nosocomial años 2002-2010.
45. Coto Cotallo GD, Fernández Colomer B. Máster de Neonatología de la SENEo 2015. Bloque 1. Asistencia al recién nacido prematuro. Módulo 5. Morbilidad precoz inherente a la prematuridad. Sepsis . Medidas de control. Profilaxis antifúngica. Editorial Panamericana. 1º Ed:16-18
46. Stone PW, Gupta A, Loughrey M, et al. Attributable costs and length of stay of an extended-spectrum betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24:601.
47. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA* 2004; 292:2357.
48. Manzoni P, De Luca D, Stronati M, et al. Prevention of nosocomial infections in neonatal intensive care units. *Am. J. Perinatol* 2013;30:81-8.

49. Weisman LE, Pammi M. Treatment and prevention of bacterial sepsis in the preterm infant. www.uptodate.com ©2015 UpToDate®
50. Manzoni P, Rinaldi M, Catani S, et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low birth weight neonates: a randomized trial. *JAMA* 2009;302:1421-8.
51. Kaufman D, Boyle R, Hazen KC, et al. Fluconazole prophylaxis against fungal colonization and infection in preterm infants. *N Engl J Med* 2001;345:1660-6.
52. Manzoni P, Stolfi I, Pugni L, et al. A multicenter, randomized trial of prophylactic fluconazole in preterm neonates. *N Eng J Med* 2007;356:2483-95.
53. Aydemir C, Oguz SS, Dizdar EA, et al. Randomised controlled trial of prophylactic fluconazole versus nystatin for the prevention of fungal colonisation and invasive fungal infection in very low birth weight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2010;96:164-8.
54. Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care*. 2010;14:R15.
55. de Jong HK, van der Poll T, Wiersinga WJ. The systemic pro-inflammatory response in sepsis *J Innate Immun*. 2010; 2:422–430
56. Srinivasan L, Harris MC. New technologies for the rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr*. 2012;24:165–71
57. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:1-16
58. Matsukawa A, Yoshimura T, Miyamoto K, Ohkawara S, Yoshinaga M. Analysis of the inflammatory cytokine network among TNF α , IL-1 β , IL-1 receptor antagonist, and IL-8 in LPS-induced rabbit arthritis. *Lab Invest*. 1997;76:629-38
59. Meadow W, Rudinsky B. Inflammatory mediators and neonatal sepsis: rarely has so little been known by so many about so much. *Clin Perinatol*. 1995;22:519-36
60. Granowitz EV, Santos AA, Poutsika DD, et al. Production of interleukin-1-receptor antagonist during experimental endotoxaemia. *Lancet* 1991;338:1423–24.
61. Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *J Clin Invest*. 1997;99:2930–40.

62. de Bont ES, de Leij LH, Okken A, Baarsma R, Kimpen JL. Increased plasma concentrations of interleukin-1 receptor antagonist in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 1995; 37:626–9.
63. Geiger R, Ellemunter H, Fink FM, Falk M, Tilg H. Circulating interleukin-1 receptor antagonist levels in neonates. *Eur J Pediatr* 1996;155:811–4
64. Küster H, Weiss M, Willeitner AE, Detlefsen S, Jeremias I, Zbojan J et al. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet*. 1998;352:1271-7
65. Dollner H, Vatten L, Linnebo I, Zanussi GF, Laerdal A, Austgulen R. Inflammatory Mediators in Umbilical Plasma from Neonates who develop early-onset sepsis. *Biol Neonate* 2001;80:41–7
66. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med*. 1989;169:333-8
67. De Bont ESJM, Martens A, Van Raan J et al. Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin-6 (IL-6) in newborns with sepsis. *Acta Paediatr*. 1994;83:696-9
68. Silveira RC, Procianoy RS. Evaluation of interleukin-6, tumour necrosis factor- α and interleukin- 1β for early diagnosis of neonatal sepsis. *Acta Paediatr*. 1999;88:647–50
69. Gervasi MT, Romero R, Bracalente G, Erez O, Dong Z, Hassan SS, et al. Midtrimester amniotic fluid concentrations of interleukin-6 and interferongamma-inducible protein-10: evidence for heterogeneity of intra-amniotic inflammation and associations with spontaneous early (<32 weeks) and late (>32 weeks) preterm delivery. *J Perinat Med* 2012;40:329–43.
70. Gomez R, Romero R, Ghezzi F, Yoon BH, Mazor M, Berry SM. The fetalinflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:194–202.
71. Chiesa C, Pacifico L, Natale F, Hofer N, Osborn JF, Resch B. Fetal and early neonatal interleukin-6 response. *Cytokine*. 2015;76:1-12
72. Orlikowsky TW, Neunhoeffler F, Goelz R et al. Evaluation of IL-8-concentrations in plasma and lysed EDTA-blood in healthy neonates and those with suspected early onset bacterial infection. *Pediatr Res*. 2004;56:804-9

73. Berner R, Niemeyer CM, Leititis JU et al. Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesionmolecule-1 in neonatal early onset sepsis. *Pediatr Res*. 1998;44:469-77
74. Matoba N, Yu N, Mestan K et al. Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics*. 2009;123:1320-8
75. Hotoura E, Giapros V, Kostoula A, Spyrou P, Andronikou S. Pre-inflammatory Mediators and Lymphocyte Subpopulations in Preterm Neonates with Sepsis. *Inflammation*. 2012;35:1094-101 DOI: 10.1007/s10753-011-9416-3
76. Kurt ANC, Aygu AD, Godekmerdan A, Kurt A, Dogan Y and Yilmaz E. Serum IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α levels in Early Diagnosis and Managemente of Neonatal Sepsis. *Mediators Inflamm*. 2007;2007:1-5 Article ID 31397 doi:10.1155/2007/31397
77. de Waal Malefyt, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE, Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by humanmonocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991;174:1209-20
78. Ng PC, Li K, Wong RPO et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine responses in preterm infants with systemic infections. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88:209-13
79. Wu HP, Chen CK, Chung K, et al. Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. *Inflamm Res*. 2009;58:385–93.
80. Kumar A, Paladugu B, Mensing J, Parrillo JE. Transforming growth factor- β 1 blocks in vitro cardiac myocyte depression induced by tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and human septic shock serum. *Crit Care Med*. 2007;35:358-64
81. Shannon E, Noveck R, Sandoval F, Kamath B, Kearney M. Thalidomide suppressed interleukin-6 but not tumor necrosis factor-alpha in volunteers with experimental endotoxemia. *Transl Res*. 2007;150:275-80
82. Machado JR, Soave DF, da Silva MV, Borges de Menezes L, Etchebehere RM. Neonatal Sepsis and Inflammatory Mediatros. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:1-10 Article ID 269681
83. Prashant A, Vishwanath P, Kulkarni P et al. Comparative assessment of cytokines and other inflammatory markers for the early diagnosis of neonatal sepsis—a case control study. *PLoS ONE*. 2013;8 Article ID e68426

84. Santana C, Guindeo MC, González G, Oz FGM, Saavedra P, Doménech E. Cord blood levels of cytokines as predictors of early neonatal sepsis. *Acta Paediat*. 2001;90:1176-81
85. Pickler R, Brown L, McGrath J et al. Integrated review of cytokines in maternal, cord, and newborn blood: part II—associations with early infection and increased risk of neurologic damage in preterm infants . *Biol Res Nurs*. 2010;11:377-86
86. Schoenborn, JR, Wilson CB. 2007. Regulation of interferón-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007;96:41–101
87. Marodi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol* 2006;118:137–44.
88. Tissières P, Ochoda A, Dunn-Siegrist I, Drifte G, Morales M et al. Innate Immune Deficiency of Extremely Premature Noenates can be reversed by Interferon- γ . *PloS ONE* 2012;7:e32863. doi:10.1371/journal.pone.0032863
89. Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Romero R, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Kim SK, et al. Hyperresistinemia novel feature in systemic infection during human pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:358e69
90. Johansson L, Linnér A, Sundén-Cullberg J, Haggar A, Herwald H, Loré K, et al. Neutrophil-derived hyperresistinemia in severe acute streptococcal infections. *J Immunol* 2009;183:4047-54.
91. Aliefendioglu D, Gürsoy, Çaglayan O, Aktas A, Ovali F. Can resistin be a new indicator of neonatal sepsis? *Pediatr Neonatol*. 2014;55:53-7
92. American Academy of Pediatrics. Comitee on Nutrition. Nutritional needs of low birth weight infants. *Pediatrics* 1985;75:976-86
93. Gianni ML, Roggero P, Piemontese P, Orsi A, Amato O, Taroni F, Liotto N, Morlacchi L, Mosca F. Body composition in newborn infants: 5-year experience in an Italian neonatal intensive care unit. *Early Hum Dev*. 2012;88(Suppl 1):S13-S17.
94. Klingenberg C, Embleton ND, Jacobs SE, O'Connell LA, Kuschel CA. Enteral feeding practices in very preterm infants: an international survey. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2012;97:F56-F61.
95. Bombell S1, McGuire W. Early trophic feeding for very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;8:CD000504. doi: 10.1002/

96. Morgan J, Young L, McGuire W. Delayed introduction of progressive enteral feeds to prevent necrotising enterocolitis in very low birth weight infants Cochrane Database Syst Rev. 2013 May 31;5:CD001970. doi: 10.1002/14651858.CD001970.pub4.

97. Singh B, Chessell L, Wilson J, Janes M, McDonald K et al. Guidelines for Feeding Very Low Birth Weight Infants Sourabh Duttal. Fusch Nutrients 2015;7:423-42. doi:10.3390/nu7010423

98. Edmond K, Bahl R. Optimal feeding of low-birth-weight infants. WHO, 2006.

99. Schanler, R.J. Outcomes of human milk-fed premature infants. Semin. Perinatol. 2011, 35, 29–33.

100. Nutrición enteral y parenteral en recién nacidos prematuros de muy bajo peso. Grupo de Nutrición de la SENEo. Editorial Ergon. 1º Ed. 2013. pag 21

101. Estudio de la Red SEN 1500 años 2006-2010. Sociedad Española de Neonatología

102. Guzmán Cabañas JM, Párraga Quiles. Master Neonatología de La Sociedad Española de Neonatología 2015. Módulo 1. Prematuridad. Conceptos. Factores maternos, sociales y familiares. Frecuencia-incidencia y riesgo de morbimortalidad del niño prematuro. Editorial Panamericana. 1º Ed 2015:22.

103. Berman L, Moss RL. Necrotizing enterocolitis: an update. Semin Fetal Neonatal Med. 2011;16:145-50.

104. Nanthakumar N, Meng D, Goldstein AM, Zhu W, Lu L, Uauy R, et al. The mechanism of excessive intestinal inflammation in necrotizing enterocolitis: an immature innate immune response. PLoS ONE. 2011;6:e17776.

105. Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. N Engl J Med. 2011; 364:255-64.

106. Nanthakumar NN, Fusunyan RD, Sanderson I, Walker WA. Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:6043–8.

107. Nadler EP, Dickinson E, Knisely A, Zhang XR, Boyle P, Beer-Stolz D, Watkins SC, Ford HR. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis. J Surg Res 2000;92:71–7.

108. Ren Y. Up-regulation of macrophage inhibitory factor in infants with acute neonatal necrotizing enterocolitis. Histopathology. 2006;48:773.

109. Hoy CM, Wood CM, Hawkey PM, Puntis JW. Duodenal microflora in very-low-birth-weight neonates and relation to necrotizing enterocolitis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:4539-47.
110. Quigley M, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; 4:CD002971.
111. Nowicki PT, Nankervis CA. The role of the circulation in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 1994;21:219-34.
112. Wan-Huen P, Bateman D, Shapiro DM, Parravicini E. Packed red blood cell transfusion is an independent risk factor for necrotizing enterocolitis in premature infants. *J Perinatol.* 2013;33:786-90.
113. Cooke LJ, Steer P, Woodgate P. Indomethacin for asymptomatic patent ductus arteriosus in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;2:CD003745.
114. Henderson G, Craig S, Baier RJ, Helps N, Brocklehurst P, McGuire W. Cytokine gene polymorphisms in preterm infants with necrotising enterocolitis: genetic association study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2009;94:F124-8.
115. Fernández Lorenzo JM, Concheiro Guisán A. *Master Neonatología de la Sociedad Española de Neonatología. Módulo 5. Morbilidad precoz inherente a la prematuridad. Enterocolitis necrosante.* Editorial Panamericana. 1º Ed. 2015: 27.
116. Murthy K, Yanowitz TD, DiGeronimo R, Dykes FD, KM Reber et al. Short-term outcomes for preterm infants with surgical necrotizing enterocolitis. *J Perinatol.* 2014;34:736-740
117. Deshpande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics* 2010;125(5):921–30. [DOI: 10.1542/ peds.2009-1301]
118. Tarnow-Mordi WO, Wilkinson D, Trivedi A, Brok J. Probiotics reduce all-cause mortality and necrotizing enterocolitis: it is time to change practice. *Pediatrics* 2010;125:1068–70.
119. WHO/UNICEF. Declaración de Innocenti. Florencia, Italia, 1990 (resolución WHA 45.34). Informe 55ª Asamblea WHO .Global strategy for infant and young child feeding. Ginebra, 2002 (WHA A55/15).
120. Schanler RJ, Potak DC. *Physiology of lactation.* www.uptodate.com ©2015 UpToDate®
121. Dewey KG, Nommsen-Rivers LA, Heinig MJ, Cohen RJ. Risk factors for suboptimal infant breastfeeding behavior, delayed onset of lactation, and excess neonatal weight loss. *Pediatrics* 2003;112:607-19

122. Neville MC, Morton J, Umemura S. Lactogenesis. The transition from pregnancy to lactation. *Pediatr Clin North Am* 2001;48:35-52
123. Neville MC. Anatomy and physiology of lactation. *Pediatr Clin North Am* 2001;48:13-34
124. Savino F, Liguori SA, Lupica MA. Adipokines in breast milk and preterm infants. *Early Hum Dev.* 2010;86:77–80
125. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr.* 2005;135:1–4.
126. Castellote C, Casillas R, Ramírez-Santana C, Pérez-Cano FJ, Franch A et al. Premature Delivery Influences the Immunological Composition of Colostrum and Transitional and Mature Human Milk. *J Nutr.* 2011;141:1181-7. doi: 10.3945/jn.110.133652. Epub 2011 Apr 20.
127. Araujo ED, Goncalves AK, Cornetta M, et al. Evaluation of the secretory immunoglobulin A levels in the colostrum and milk of mothers of term and preterm infants. *Braz J Infect Dis.* 2005;9:357-362
128. Koenig A, de Albuquerque Diniz EM, Barbosa SF, Vaz FA. Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization. *J Hum Lact.* 2005; 21:439–443.
129. Xanthou M, Bines J, Walker WA. Human milk and intestinal host defense in newborns: an update. *Adv Pediatr* 1995;42:171-208.
130. Hyslop NE, Kern KC, Walker WA. Lysozyme in human colostrum and breast milk. In: Osserman EF, Canfield RE, Boyshok S, editors. *Lysozyme*. New York: Academic Press; 1974. p. 449-462.
131. Shah U, Dickinson BL, Blumberg RS, et al. Distribution of the IgG Fc receptor, FcRn, in the human fetal intestine. *Pediatr Res.* 2003;53:295–301.
132. Mehta R, Petrova A. Very preterm gestation and breastmilk cytokine content during the first month of lactation. *Breastfeed Med* 2010;6:21-4 DOI: 10.1089/bfm.2010.0024
133. Ustundag B, Yilmaz E, Dogan Y, et al. Levels of cytokines (IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants. *Mediators Inflamm.* 2005; 2005(6):331–6.
134. Nair RR, Warner BB, Warner BW. Role of epidermal growth factor and other growth factors in the prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol.* 2008 ;32:107-13. doi: 10.1053

135. Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Williams CS, McWilliam DL, Dominguez JA, Stepankova R, Payne CM, McCuskey RS. Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282:156-64.
136. Debbabi H, Dubarry M, Rautureau M, Tome D. Bovine lactoferrin induces both mucosal and systemic responses in mice. *J Dairy Res.* 1998;65:283-93.
137. Fisher R, Debbabi H, Dubarry M, Boyaka P, Tomé D. Regulation of physiological and pathological Th1 and Th2 responses by lactoferrin. *Biochem Cell Biol.* 2006;84:303-11.
138. Takakura N, Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. Influences of orally administered lactoferrin on IFN- γ and IL-10 production by intestinal intraepithelial lymphocytes and mesenteric lymph-node cells. *Biochem Cell Biol.* 2006;84:363-8.
139. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *Biometals.* 2004;17:189-96.
140. Sherman MP, Bennett SH, Hwang FF, Yu C. Neonatal small bowel epithelia: enhancing antibacterial defense with lactoferrin and lactobacillus GG. *Biometals.* 2004;17:285-89.
141. Pammi M, Abrams SA. Oral lactoferrin for the prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 2:CD007137.
142. Mehta R, Petrova A. Biologically active breast milk proteins in association with very preterm delivery and stage of lactation. *J Perinatol.* 2011;31:58–62.
143. Ward TL, Hosid S, Ioshikhes I, Altosaar I. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC Microbiol.* 2013;13:116.
144. Vael C, Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21:794–800.
145. Ng PC, Lam CW, Lee CH, Wong GW, Fok TF, Chan IH, et al. Leptin and metabolic hormones in preterm newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 2000;83:198–202.
146. Barrenetxe J, Villaro AC, Guembe L, Pascual I, Munoz-Navas M, Barber A, et al. Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. *Gut* 2002;50:797–802.

147. Bielicki J, Huch R, von Mandach U. Time-course of leptin levels in term and preterm human milk. *Eur J Endocrinol* 2004;151:271–6.
148. Singer G, Granger DN. Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance. *Microcirculation* 2007;14:375e87
149. Cho GJ, Yoo SW, Hing SC, Oh MJ, Kim HJ, Lee KW, et al. Correlations between umbilical and maternal serum resistin levels and neonatal birth weight. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2006;85:1051–6.
150. Inami I, Okada T, Fujita H, Makimoto M, Hosono S, Minato M, et al. Impact of serum adiponectin concentration on birth size and early postnatal growth. *Pediatr Res* 2007;61:604–6.
151. Siahianidou T, Mandyla H, Papassotiriou GP, Papassotiriou I, Chrousos G. Circulating levels of adiponectin in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2007;92:286–90.
152. Martin LJ, Woo JG, Geraghty SR, Altaye M, Davidson BS, Banach W, et al. Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1106–11.
153. Ozarda Y, Tuncer GO, Gunes Y, Eroz E. Serum levels of leptin, adiponectin and resistin are interrelated and related to total antioxidant capacity, free fatty acids and phospholipids in early neonatal life. *Clin Biochem*. 2012;45:298–302
154. Ng PC, Lee CH, Lam CWK, Chan HIS, Wong E, Fok TF. Ghrelin in preterm and term newborns: relation to anthropometry, leptin and insulin. *Clin Endocrinol* 2005;63:217–22.
155. Onal EE, Cinaz P, Atalay Y, Turkyilmaz C, Bideci A, Akturk A, et al. Umbilical cord ghrelin concentrations in small- and appropriate-for-gestational age newborn infants: relationship to anthropometric markers. *J Endocrinol* 2004;180:267–71.
156. Yokota I, Kitamura S, Hosoda H, Kotani Y, Kangawa K. Concentration of the octanoylated active form of ghrelin in fetal and neonatal circulation. *Endocr J* 2005;52:271–6.
157. Aydin S, Aydin S, Ozkan Y, Kumru S. Ghrelin is present in human colostrum, transitional and mature milk. *Peptides* 2006;27:878–82.

158. Kierson JA, Dimatteo DM, Locke RG, Mackley AB, Spear ML. Ghrelin and cholecystokinin in term and preterm human breast milk. *Acta Paediatr* 2006;95:991–5.
159. Sisk PM, Lovelady CA, Dillard RG, Gruber KJ, O’Shea TM. Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Perinatol*. 2007; 27:428–33.
160. McGuire W, Anthony MY. Donor human milk versus formula for preventing necrotising enterocolitis in preterm infants: systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88:11-4.
161. Musilova S, Rada V, Vikova E, Bunesova V. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Benef Microbes*. 2014;3:273-83
162. Jantscher-Drenn E, Bode L. Human milk oligosaccharides and their potential benefits for the breast-fed neonate. *Minerva Pediatr*. 2012;64:83-99
163. Furman L, Taylor G, Minich N, Hack M. The effect of maternal milk on neonatal morbidity of very low-birth-weight infants. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2003;157:66–71.
164. Hylander MA, Strobino DM, Dhanireddy R. Human milk feedings and infection among very low birth weight infants. *Pediatrics*. 1998;102:E38.
165. Patel AL, Johnson TJ, Engstrom JL, Fogg LF, Jegier BJ, Bigger HR, Meier PP. Impact of early human milk on sepsis and health care costs in very low birth weight infants. *J Perinatol*. 2013; 33:514–9. doi:10.1038
166. Pardou A, Serruys E, Mascart-Lemone F, Dramaix M, Vis HL. Human milk banking: influence of storage processes and of bacterial contamination on some milk constituents. *Biol Neonate*. 1994;65:302-9
167. Hamprecht K, Goelz R, Jahn G, Poets CF, Maschamann J 2008 Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation *J Clin Virol* 41:198-205.
168. Ando Y, Ekuni Y, Matsumoto Y, Nakano S, Saito K, Kakimoto K, Tanigawa T, Kawa M, Toyama T. Long-term serological outcome of infants who received frozen-thawed milk from human T-lymphotropic virus type-I positive mothers. *J Obstet Gynaecol Res*. 2004;30:436-8
169. Liebhaber M, Lewiston NJ, Asquith MT, Olds-Arroyo L, Sunshine P. Alterations of lymphocytes and of antibody content of human milk after processing. *J Pediatr*. 1977;91:897-900.

170. Rollo DE, Radmacher PG, Turcu RM, Myers SR, Adamkin DH. Stability of lactoferrin in stored human milk. *J Perinatol* 2014;34:284-6 | doi:10.1038/jp.2014.3
171. Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Romero FJ. Frozen breast milk at -20 degrees C and -80 degrees C: a longitudinal study of glutathione peroxidase activity and malondialdehyde concentration. *J Hum Lact.* 2010;26:35-41. doi: 10.1177/0890334409342987.
172. Hamprecht K, Goelz R, Jahn G, Poets CF, Maschamann J Cytomegalovirus transmission to preterm infants during lactation *J Clin Virol* 2008;41:198-205.
173. Peña Caballero M, Hurtado Suazo JA. Master de Neonatología de la Sociedad Española de Neonatología 2015. Bloque 1. Asistencia al recién nacido prematuro. Módulo 4. Alimentación y nutrición del prematuro. Bancos de leche humana. Fortificación de la leche materna. Editorial Panamericana. 2015. pag 13,19.
174. García-Lara NR, Escuder-Vieco D, García-Algar O, De la Cruz J, Lora D, Pallás-Alonso C Effect of freezing time on macronutrients and energy content of breastmilk. *Breastfeed Med* 2012;7:295-301.
175. Sousa SG. Delgadillo I, Saraiva JA. Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. *Food Chemistry.* 2014;151:79-85
176. Permanyer M, Castellote C, Ramirez-Santana, C, Audi, C, Pérez-Cano, FJ, Castell M, et al. Maintenance of breast milk Immunoglobulin A after highpressure processing. *J Dairy Sci.* 2010;93:877-83.
177. Viazis, S., Farkas, B. E., & Allen, J. C. Effects of high-pressure processing on immunoglobulin A and lysozyme activity in human milk. *J Hum Lact.* 2007;23:253-61.
178. Walker A. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr.* 2010;156:S3-S7
179. Montagne P, Cuilliere ML, Mole C, Bene MC, Faure G. Immunological and nutritional composition of human milk in relation to prematurity and mother's parity during the first 2 weeks of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999;29:75-80.
180. Rodríguez, NA; PP Meier, PP. Oropharyngeal Administration of Colostrum to Extremely Low Birth Weight Infants: theoretical perspectives. *J Perinatol.*2009;29:1-7

181. Rodríguez, NA. A Pilot Study to Determine the Safety and Feasibility of Oropharyngeal Administration of own Mother's Colostrum to Extremely Low-Birth-Weight Infants. *Adv Neonatal Care*, 2010;10:206-12.
182. Rodríguez NA. A Randomized Controlled Trial of the Oropharyngeal Administration of Mother's Colostrum to Extremely Low Birth Weight Infants in the First Days of Life. *Neonatal Intensive Care*. 2011;24:31-35
183. Lee J, Kim HS, Jung YH, Choi KY, Shin SH, Kim EK, Choi JH. Oropharyngeal Colostrum Administration in Extremely Premature Infants: An RCT. *Pediatrics*. 2015;135;357-366
184. Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D. *Immunology*. Vol. 6th edn. St. Louis: Mosby; 2001
185. Caprio M, Barr PA, Kim Y, Cruz H. Effects of establishing a feeding protocol to improve nutrition in premature neonates. Paper presented at: Pediatric Academic Societies; May 6, 2013; Washington, DC.
186. Seigel JK, Smith PB, Ashley PL, et al. Early administration of oropharyngeal colostrum to extremely low birth weight infants. *Breastfeed Med*. 2013;8:491-5 doi: 10.1089
187. Gephart SM, Weller M. Colostrum as oral Immune Therapy to Promote Neonatal Health. *Adv Neonatal Care*. 2014;14:44-51
188. Volpe JJ. Intracranial hemorrhage: Germinal matrix-intraventricular hemorrhage of the premature infant. In: *Neurology of the Newborn*, 5th ed, Saunders, Philadelphia 2008.
189. De Vries LS, Eken P, Groenendaal F, van Jaaster IC, Meiners LC: Correlation between the degree of periventricular leukomalacia diagnosed using cranial ultrasound and MRI later in infancy in children with cerebral palsy. *Neuropediatrics* 1993;24:263-8.
190. Koech DK, Obel AO, Minowada J, Hutchinson VA, Cummins JM. Low dose oral alpha interferon therapy for patients seropositive for human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Mol Biother* 1990;2:91-5.
191. Caban J, Mossor-Ostrowska J, Zyrkowska-Bieda T, Zejc M, Janas-Skulina U, Ciesla A et al. Treatment of chronic viral hepatitis B with oral mucosal administration of natural human interferon alpha lozenges. *Arch Immunol Ther Exp* 1993;41:229-35.
192. Granock-Jones KP. Oromucosal Midazolam. A review of its use in pediatric patients with prolonged acute convulsive seizures. *Pediatr Drugs*. 2012;14:251-61

193. Maldonado J, Navarro J, Narbona E, Gil A. The influence of dietary nucleotides on humoral and cell immunity in the neonate and lactating infant. *Early Hum Dev.* 2001;65:S69-S74
194. Knapp RD, Hutchens TW. Maternal lactoferrin in the urine of preterm infants. Evidence for retention of structure and function. *Adv Exp Med Biol.* 1994;357:177-81.
195. Pang S, Le Y. Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cell Mol Immunol* 2006;3:29–34.
196. Geiger R, Ellemunter H, Fink FM, Falk M, Tilg H. Circulating interleukin-1 receptor antagonist levels in neonates. *Eur J Pediatr* 1996;155:811–4
197. Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13:323-40.
198. Kakkerla Dk, Siddig MM, Parton LA. Interleukin-1 balance in the lungs of preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Biol Neonate.* 2005;87:82-90
199. Cakmak BC, Calkavur S, Ozkinay F, Koroglu OA, Onay H, Itirli G et al. Association between bronchopulmonary dysplasia and MBL2 and IL1-RN polymorphisms. *Pediatr Int.* 2012;54:863-8.
200. Chiesa C, Signore F, Assumma M, Buffone E, Tramontozzi P, Osborn JF, et al. Serial measurements of C-reactive protein and interleukin-6 in the immediate postnatal period: reference intervals and analysis of maternal and perinatal confounders. *Clin Chem* 2001;47:1016–22
201. M Azizia, J Lloyd, M Allen, N Klein, D Peebles, Immune Status in Very Preterm Neonates. *Pediatrics.* 2012;129:967-74
202. Martínez Nadal S, Elizari Saco MJ, Fernández Delclos D, Demestre Guasch X, Sala Castellví P, Vila Ceren C, Raspall Torrent F. Determinación de interleucina 6 en sangre de cordón en prematuros, como indicador precoz de morbilidad neonatal. *An Pediatr (Barc).* 2008;68:218-23
203. Eliakim A, Nemet D, Ahmad I, Zaldivar F, Koppel R, Grochow D, Waffarn F, Cooper DM. Growth factors, inflammatory cytokines and postnatal bone strength in preterm infants. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2009;22:733-40.
204. O'Shea TM, Joseph RM, Kuban KC, Allred EN, Ware J, Coster T et al. Elevated blood levels of inflammation-related proteins are associated with an attention problem at age 24 months in extremely preterm infants *Pediatr Res.* 2014;75:781–7. doi:10.1038/pr.2014.41.

205. Rocha G, Proenc E, Guedes A, Carvalho C, Areias A, Ramos JP, Rodrigues T, Guimaraes H. Cord blood levels of IL-6, IL-8 and IL-10 may be early predictors of bronchopulmonary dysplasia in preterm newborns small for gestational age. *Disease Markers* 2012;32:51–60
206. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochem Cell Biol.* 2006;84:282-90
207. Blanco-Quiros A, Arranz E, Solis G, Villar A, Ramos A, Coto D. Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns. *Eur J Pediatr* 2000; 159:420-3
208. Forsblad d'Elia H, Pullerits R, Carlsten H, Bokarewa M. Resistin in serum is associated with higher levels of IL-1Ra in post-menopausal women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47:1082-7
209. Gursoy T, Aliefendioglu D, Caglayan O, Aktas A, Ovali F. Resistin levels in preterms: are they influenced by fetal inflammatory course? *Journal of Perinatology* 2011;31:171-5
210. Kusanovic JP, Romero R, Mazaki-Tovi S, Chaiworapongsa T, Mittal P, Gotsch F et al. Resistin in amniotic fluid and its association with intra-amniotic infection and inflammation. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008;21:902–16.
211. Ng PC, Lee CH, Lam CW, Chan IH, Wong E, Fok TF. Resistin in preterm and term newborns: relation to anthropometry, leptin, and insulin. *Pediatr Res.* 2005;58:725-30.
212. Edelson MB, Bagwell CE, Rozycki HJ. Circulating pro- and counterinflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 1999;103:766–71.
213. McElroy SJ, Prince LS, Weitkamp JH, Reese J, Slaughter JC, Polk DB. Tumor necrosis factor receptor 1- dependent depletion of mucus in immature small intestine: a potential role in neonatal necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;301:656–66
214. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med.* 2008;29:617–25.
215. Lusyati S, Hulzebos CV, Zandvoort J, Sukandar H, Sauer PJJ. Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis. *J Neonatal Perinatal Med.* 2013;6:153–63

216. Biron BM, Ayala A, Lomas-Neira J. Biomarkers for Sepsis: What is and what might be? *Biomark Insights* 2015;10:7–17 doi: 10.4137/BMI.S29519.

ANEXOS

ANEXO 1

HOJA INFORMATIVA A PADRES.

Título del proyecto:

“ADMINISTRACIÓN DE CALOSTRO OROFARÍNGEO A RECIÉN NACIDOS PREMATUROS DE MUY BAJO PESO”.

Objetivo: es evaluar los efectos que pueda tener la administración de calostro orofaríngeo sobre los marcadores relacionados con la defensa en recién nacidos prematuros de muy bajo peso, así como estudiar la posible relación con la enterocolitis necrosante e infecciones oportunistas. De forma secundaria se plantea estimular desde las primeras horas tras el nacimiento la extracción de calostro en las madres que han tenido un hijo prematuro.

Metodología: se realizará el análisis de muestras de sangre y orina del niño recogidas en el momento del ingreso a los tres días (coincidiendo con la prueba del talón) a los 7 días, a los 14 días (coincidiendo con la segunda extracción de la prueba del talón) y al mes de vida (coincidiendo con el control analítico del mes de edad que se realiza por protocolo a todos los recién nacidos con peso inferior a 1500gr). Se recogerán las variables del estudio para cada niño incluido en la ficha correspondiente. El diseño del estudio, no contempla la realización de ninguna exploración complementaria y/o análisis diferente al referido previamente.

Incomodidades y riesgos derivados del estudio: No se espera ningún riesgo o incomodidad para el sujeto de estudio, ni para su familia.

Posibles efectos adversos: no se esperan.

Carácter voluntario de su participación: la participación es voluntaria así como la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación Participante/investigador, ni su atención médica en caso de necesitarla.

Personas que tendrán acceso a los datos: los datos serán tratados según establece la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Los Investigadores de este estudio garantizan la confidencialidad de los datos. Todos mantendrán una confidencialidad absoluta. Los resultados del estudio podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias y, eventualmente, a la comunidad científica a través de congresos y/o publicaciones. Los datos serán utilizados para los fines específicos de este estudio y en todo caso, si fuese necesario, podrán ser también utilizados con otros fines de tipo docente o de carácter científico. Tiene usted derecho al acceso de sus datos personales. Si así lo desea, deberá solicitarlo al médico que le atiende en este estudio.

Modo de compensación: Cualquier hallazgo de la investigación, relevante para la salud del paciente en estudio, será comunicado y se ofrecerá el apoyo necesario.

Cualquier aspecto que establezca dudas y preguntas para el participante, podrá consultarse antes, durante y después del estudio a los organizadores del mismo (teléfonos 958020083; 958020195 y 679710671).

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto:

“ADMINISTRACIÓN DE CALOSTRO OROFARÍNGEO A RECIÉN NACIDOS PREMATUROS DE MUY BAJO PESO”.

Yo,.....
.....
(Nombre y apellidos del padre/madre/tutor del niño en estudio)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio, siendo la participación en este estudio **voluntaria** así como la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación participante/investigador, ni su atención médica en caso de necesitarla.

Los datos serán tratados según establece la **Ley Orgánica 15/1999**, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

Los investigadores de este estudio garantizan la **confidencialidad** de los datos. He hablado con los responsables sobre el estudio. Comprendo que la participación de mi hijo es voluntaria.

Comprendo que lo puedo retirar del estudio:

1. Cuando quiera.
2. Sin tener que dar explicaciones.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Firmado: (Padre/madre/tutor):

Firma Investigador principal:

DNI:

CNP:

Fecha:

Fecha:

ANEXO 2



Hospital Universitario Virgen de las Nieves
Servicio de Pediatría
 UNIDAD NEONATAL



PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LECHE MATERNA EN CASO DE PARTOS PREMATUROS O RECIÉN NACIDOS INGRESADOS EN LA UCIN NEONATAL

INTRODUCCIÓN

El inicio inmediato después del parto, o lo más precoz posible, de estimulación y extracción de leche materna es uno de los pilares fundamentales para conseguir una lactancia materna exitosa. En los casos de bebés prematuros existe una tasa mayor de abandono de la lactancia que va unida a una baja producción de leche, ocasionada por el estado de salud del bebe, el mantenimiento de la lactancia con extractor mecánico en ocasiones durante meses y una baja producción de leche.

Para conseguir un aumento de la producción de leche en estas situaciones difíciles, se establece el protocolo para la información y formación específica de estas madres en extracción precoz de leche materna.

DEFINICIÓN

Intervención destinada a la información y formación de las madres, para la estimulación y extracción precoz de leche materna en caso de partos prematuros como base para conseguir un buen establecimiento de la lactancia materna.

OBJETIVOS

Informar y formar a las madres de recién nacidos prematuros o enfermos, ingresados en la UCIN para iniciar y mantener una buena extracción de leche materna.

Conseguir una producción láctea adecuada como base de una lactancia materna exitosa.

PERSONAL QUE REALIZA LA ACCIÓN

Personal de enfermería asignado al niño.

MATERIAL NECESARIO

- ✓ Diario de extracción.
- ✓ Extractor eléctrico.
- ✓ Sistema de extracción doble
- ✓ Jeringa de 1 ml.
- ✓ Folletos informativos.

Procedimiento


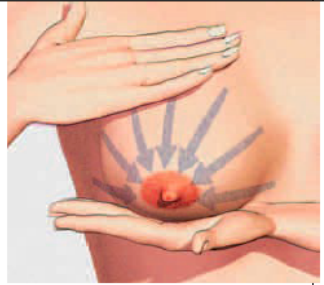


1.-En caso de madre embarazada con factor de riesgo de parto prematuro ingresada en la unidad prenatal se realizará una valoración de la madre, así como la viabilidad del bebe. Si procede, se realizará una visita prenatal informándole de la importancia y las ventajas de la alimentación de su hijo con su propia leche desde las primeras horas de vida y más en especial ante su prematuridad.

1 | Protocolo de estimulación y extracción de leche materna en caso de partos prematuros o recién nacidos ingresados en la UCIN neonatal

El momento ideal para un buen comienzo de la lactancia en caso de bebés prematuros es antes del parto.

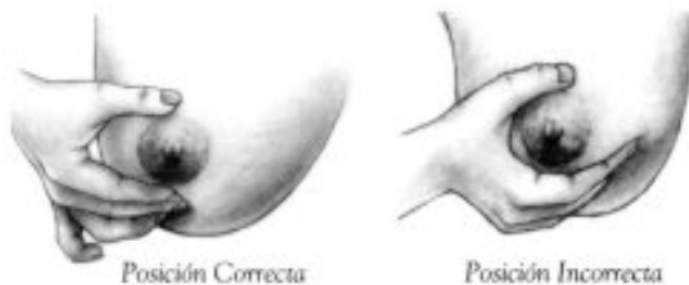
- 2.- En los ingresos que se produzcan en la UCIN se informará a la madre en cuanto sea posible, bien en su habitación, sala de reanimación o en la unidad neonatal.
- I. Preguntar sobre la intención de alimentar a su bebe con leche materna.
 - II. Informar de las ventajas de la lactancia en caso de bebes prematuros y/o enfermos.
 - III. Informar sobre la necesidad de comenzar con la primera extracción manual, inmediatamente después del parto y antes de las seis horas posteriores al parto, siempre que sea posible. Anexo 2
 - IV. Enseñar el modo de estimulación mediante masaje y extracción de leche, tanto manual como con extractor mecánico doble. Anexo 1,2 ,3 y 4.
 - V. Enseñar la cantidad de leche normal que se consigue con las primeras extracciones y la recomendación de llevar un diario de extracción para ver su progreso y detectar los posibles errores que podemos solucionar.
 - VI. Informar de cómo será utilizado su calostro de forma inmediata para la inmunización de su hijo.
 - VII. La informaremos sobre la frecuencia de las extracciones, mínimo 8 veces al día durante las dos primeras semanas hasta conseguir una producción de leche superior a 600 ml al día, a los 14 días posteriores al parto, que se considera que se ha producido un buen establecimiento de la lactancia. Explicar a la madre la ley de oferta y demanda que es el principio de producción de la lactancia es un mecanismo de producción que garantiza la cantidad de leche adecuada.
 - VIII. No debe pasar más de 6 horas sin extraerse leche durante la noche.
 - IX. En el comienzo de las extracciones el personal de enfermería responsable del niño debe asumir también la responsabilidad de esta intervención hasta que la madre y su familia alcancen un nivel de competencia.
 - X. En los dos días primeros postparto se recomienda las extracciones de forma manual, un mínimo de 8 veces al día, aunque algunas madres prefieren el extractor mecánico.
 - XI. La duración de las extracciones oscilará entre 15-30 minutos.
 - XII. Estos primeros días se aconseja asociar el programa de estimulación para partos prematuros que disponen los extractores Symphony que hay en la unidad. Anexo 3
 - XIII. Explicaremos el correcto funcionamiento de los extractores de leche.
 - XIV. Informaremos sobre el tamaño de copa adecuado para la extracción.
 - XV. A partir del tercer día se aconseja iniciar la extracción combinada. Anexo 4
 - XVI. Recomendar e informar la importancia del vaciado completo de las mamas en cada extracción.
 - XVII. Comenzar con el método madre canguro enseguida que el estado del niño y madre lo hagan posible. Mientras tanto fomentar el contacto todo lo que sea posible con su hijo.
 - XVIII. Informar a las madres de la importancia de protegerse de interrupciones innecesarias e invertir sus energía, estos primeros días, en la construcción de la producción de leche y evitar o minimizar la separación madre hijo.
 - XIX. La recuperación emocional de la madre se ve reforzada por su contribución a la recuperación de su hijo. El bombeo y extracción producen estímulos hormonales que contribuyen a la recuperación física materna.
 - XX. Enseñar la utilidad del diario de extracción si lo quieren utilizar.

Anexo 1: El masaje del pecho mejora la salida de la leche.

	Usando 2 o 3 dedos, de masajes circulares a su pecho, del exterior hacia el pezón.
	Con toda la palma de la mano, frote suavemente al pecho desde la base hacia la punta del pezón.
	Coloque los dedos pulgar e índice al borde de la aréola y extraiga suavemente la leche.
	Cambia la posición de los dedos pulgar e índice alrededor de la aréola de modo que el pecho se vacíe completamente.

Anexo 2: Método de extracción manual de leche.

1. Dedo pulgar, índice y medio en forma de “C”, unos 3 - 4 cm por detrás del pezón.

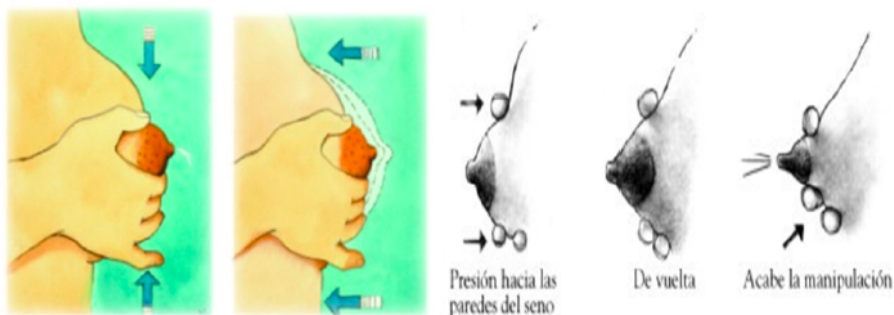


Posición Correcta

Posición Incorrecta

2. Empujar los dedos hacia atrás (hacia las costillas), sin separarlos.

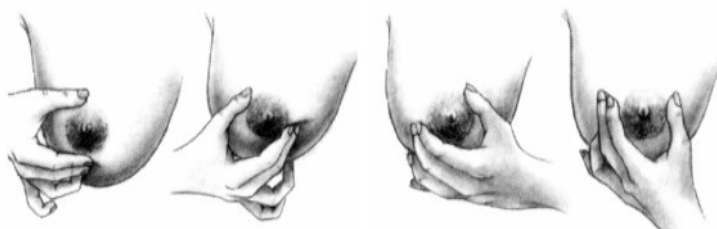
3. Rodar los dedos y el pulgar hacia el pezón, sin deslizar.



4. Ir rodando la posición de los dedos para vaciar otras partes del pecho. Utilizar ambas manos en cada pecho.

Mano Derecha

Mano Izquierda



Todo el proceso debería de llevar aproximadamente 20-30 minutos cuando la extracción manual reemplaza una toma.

Anexo 3: Extracción con sacaleches eléctrico doble:**Preparación para la extracción:**

- Entorno íntimo y relajado.
- Lavado de manos con agua y jabón.
- Estimulantes de la eyección de leche (oxitocina): cerca del bebe, fotos del niño, ropa del niño, música, masaje en la espalda de la madre.
- Prepare líquidos para beber, para aliviar la sed.
- Caliente sus pechos.
- Estimule sus pezones.

Tamaño de la copa adecuado para cada madre.

Ajuste adecuado



Necesita un tamaño mayor

Consideraciones a tener en cuenta:

- Inicio precoz de la extracción-estimulación, antes de las seis horas postparto.
- Extracciones frecuentes, mínimo 8-12 veces al día hasta establecer la producción.
- Al menos una extracción por la noche.
- Recordar que la extracción requiere aprendizaje y paciencia, para evitar frustración.
- Comenzar con el programa específico de extracción para partos prematuros.
- Comenzar con un nivel de vacío en el extractor que resulte cómodo para la madre. Nunca debe producir dolor, ni lesionar la piel del pezón.
- Aumentar el contacto piel con piel, siempre que sea posible.
- Apoyo psicológico, personal y familia.
- Felicitarla por sus avances para aumentar su confianza.
- Tratar de disminuir cualquier fuente de ansiedad o dolor.
- Importancia del estrés y preocupaciones, enseñarle a relajarse.
- Procurar ambiente relajado y agradable
- Apoyo de otras madres
- Extracción cerca del bebé, fotos, recuerdos..
- Recomendar el vaciado completo de las mamas en cada extracción.
- Los recipientes deben de ser de uso alimentario, lavados con agua y jabón (en casa) ó estériles (hospital)
- Rotular los recipientes con la fecha y hora de extracción (para uso cronológico)

5 | Protocolo de estimulación y extracción de leche materna en caso de partos prematuros o recién nacidos ingresados en la UCIN neonatal

Limpieza de los elementos del sacaleches:

- Lavado de todas las piezas del sacaleches: 1º en agua fría (elimina leche residual sin coagular las proteínas), luego agua caliente y jabón
- Enjuagar y secar con un paño limpio.
- Guardar bien seco hasta la siguiente extracción.
- Suficiente esterilizar una vez al día.

Anexo 4: Extracción combinada (Hands on pumping)

Esta técnica se recomienda, sobre todo, en caso de madres que no pueden iniciar la lactancia con normalidad debido a la separación de su hijo (ingreso en neonatos, prematuros, etc.) y debe combinarse con un contacto lo más frecuente posible con el niño (MMCC) y unas extracciones frecuentes (al menos ocho al día).

El método de la doctora J. Morton para maximizar la extracción de leche materna, se basa en el uso combinado de una bomba de extracción doble, con el masaje y/o extracción manual para maximizar la cantidad de leche extraída y mejorar así el estímulo de la producción. Combinar esta extracción con una segunda tanda de extracción (manual o con bomba pero de manera individualizada en cada pecho), con lo que se consigue extraer una gran cantidad de leche adicional (incluso doblando la cantidad que se hubiera conseguido con una extracción simple).

Los pasos para seguir serían:

- ✓ Masaje de estimulación de ambas mamas.
- ✓ Aplicar el extractor doble.
- ✓ Iniciar masaje-compresión de ambas mamas (o de una tras otra) mientras se realiza la extracción con bomba, insistiendo en las zonas de mayor consistencia.
- ✓ Cuando cesa el flujo de leche, se detiene la extracción y se masajea y estimula el pecho nuevamente uno o dos minutos.
- ✓ Continuar con extracción manual o extracción de un solo pecho, alternando entre uno y otro y combinando con compresión manual.

**Bibliografía:**

ABCs of Breastfeeding booklet and companion video “Breastfeeding, A Guide to Getting Started” written and produced by Jane Morton, MD

- 6 | Protocolo de estimulación y extracción de leche materna en caso de partos prematuros o recién nacidos ingresados en la UCIN neonatal

Combining hand techniques with electric pumping increases milk production in mothers of preterm infants J Morton, JY Hall, RJ Wong, L Thairu, WE Benitz and WD Rhine

Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA Journal of Perinatology (2009) 29, 757–764 2009 Nature Publishing Group All rights reserved. 0743-8346/09 \$32

Is use of breast pumps out of hand? Mothers who use ‘hands-on’ technique see increase in milk production by Jane A. Morton, M.D., FAAP Volume 30 • Number 6 June 200 www.aapnews.org

The Importance of Hands Jane Morton, MD, FABM1 Journal of Human Lactation © The Author(s) 2012 Reprints and permission: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

DOI: 10.1177/0890334412444930 <http://jhl.sagepub.com>

ANEXO 3

UNIDAD NEONATAL
HOSPITAL VIRGEN DE LAS NIEVES
PROTOCOLO DE ESTUDIO
HOJAS SE SEGUIMIENTO

(Pegar etiqueta identificativa en el plástico)



CASO

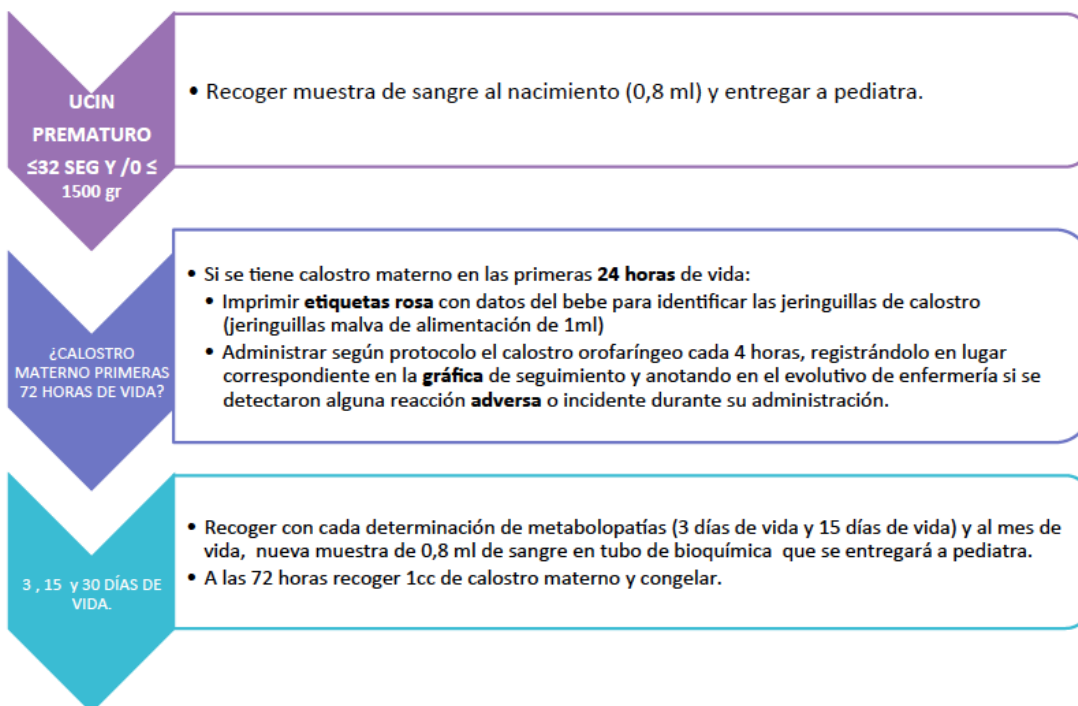
UNIDAD NEONATAL
HOSPITAL VIRGEN DE LAS NIEVES
PROTOCOLO DE ESTUDIO
HOJAS SE SEGUIMIENTO

*(Pegar etiqueta identificativa en el
plástico)*



CONTROL

PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN DE CALOSTRO OROARÍNGEO EN PREMATUROS ≤ 32 SG Y/O ≤ 1500 G



MÉTODO DE ADMINISTRACION DE CALOSTRO POR VIA OROFARINGEA

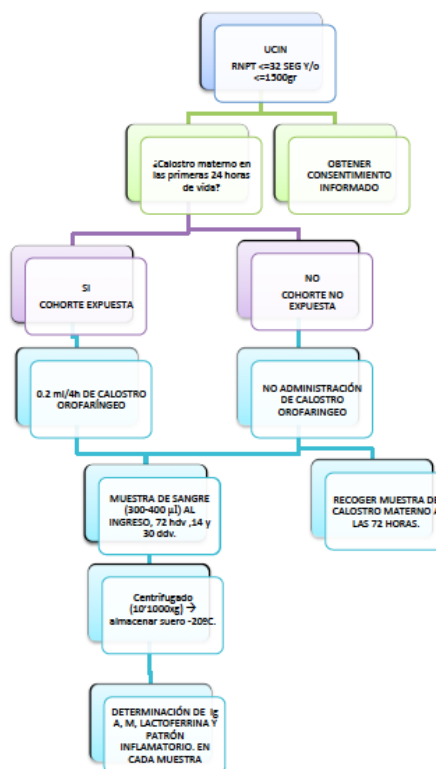
Una vez que las primeras jeringas están preparadas, la enfermera/TCAE del bebé comprobará el nombre del bebé en la etiqueta de la jeringa precargada, antes de su administración. La jeringa se coloca fuera del refrigerador durante cinco minutos para que el calostro esté a temperatura ambiente.

Para la administración, se coloca al bebé decúbito lateral, en caso de supino lateralizar la cabeza ligeramente, colocar la punta de la jeringa en la boca del bebé, en la mejilla derecha dirigida hacia la orofaringe. Se administrará **0,1 ml** del calostro durante un periodo de al menos **un minuto**. A continuación se redirige la jeringa hacia la mejilla izquierda, se administra lentamente **0,1 ml** de calostro durante un periodo de al menos **un minuto**.

Se administrará, un total de 0,2 ml por sesión de tratamiento. Este procedimiento se llevará a cabo cada 4 horas hasta alcanzar la nutrición enteral exclusiva y un mínimo de 2 semanas (es decir, por ejemplo si el RN alcanza la enteral a los 10 días de vida continuaremos 4 días más).

Durante el procedimiento se vigilará la frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, saturación de oxígeno, y la presión arterial en caso de estar monitorizada.

Se detendrá el procedimiento si el niño muestra señales de agitación, disminución significativa de la saturación de oxígeno mantenida inferior al 88%, o un cambio desfavorable en los signos vitales.



ANEXO 4

SEXO	EG	PESO	Talla	PC	P/C	APGAR	CRIB	CTC PRENATALES		ATB INTRAP		DIA						
								NO	COMPL	PARCIAL	SI	NO	NO	SGB	FIP	CORIA	RPM	
NH	-																	

AU/VU/PV	H/D DE VIDA	PISO	ALIMENTACION					CATERER CENTRAL S/N	ADMION CALOSTRO S/N	ATB S/N	IAAS S/N	SEPSIS /BN/ITU	NEC	ABANDONO CAUSA				
			NE cc/kg/día	LMF (%)	LD S/N	LD (%)	NPT cc/kg/d											
M 1																		
M 2																		
M 3 (3)																		
M 4 (15)																		
M 4 (30)																		

Horas/ días de inicio de calostro: Último día de vida que recibe calostro: Días hasta alcanzar nutrición enteral completa:

Asistencia respiratoria durante 1º mes de vida:	VMC:	VNI:
Evaluación ecografía cerebral 1º mes de vida:	Lesión en sustancia blanca:	HIV, grado:
Evaluación oftalmológica 1º mes de vida:	Desarrollo de ROP:	

