



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

**Determinación de marcadores de daño intestinal e
inflamación en neonatos prematuros como
herramienta diagnóstica de enterocolitis necrosante**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A

RUTH GABRIEL RODRÍGUEZ

ASESORA: Dra. Gabriela González Pérez

COASESORA: M en C. Paola Edith Briseño Lugo

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Determinación de marcadores de daño intestinal e inflamación en neonatos prematuros como herramienta diagnóstica de enterocolitis necrosante.

Que presenta la pasante: **Ruth Gabriel Rodríguez**

Con número de cuenta: **311229019** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Marzo de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
VOCAL	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
SECRETARIO	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. María de Lourdes Galván Ruiz	
2do. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Gabriela González Pérez, suscrita al Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular del INPer-IER, y forma parte del proyecto: “Desenlaces clínicos en la etapa infantil asociados con cambios en el microbioma intestinal y la función inmune originados por la administración neonatal de antibióticos”, el cual fue aprobado por los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad de la Institución. El proyecto es financiado con recursos del INPer (2017-2-61) y del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT (289734).

Agradezco el apoyo económico recibido por parte de FOSISS-CONACYT (SALUD-17-02-289734-01-005) y la beca para la Titulación-Extemporáneos UNAM 2018-2019 para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA.

Sin lugar a dudas este trabajo está dedicado a mi maravillosa familia.

A mis queridos padres Ruth Rodríguez y Zenen Gabriel, me ha costado bastante plasmar estas palabras, mucho más que el desarrollo de este trabajo. No encuentro palabras para agradecer el esfuerzo constante que han hecho para brindarme esta oportunidad. Quiero que sepan que este logro no es solo mío, también es de ustedes. Gracias por día a día darme palabras de aliento, su comprensión, confianza, amistad y amor. Porque sin todo el apoyo que he recibido durante este tiempo no hubiera sido posible la conquista de esta meta.

A mi hermana Rebeca, por ser mi mejor amiga, arroparme en cada crisis emocional que he tenido, consolarme cuando he llorado, y cuidarme desde que tengo memoria. Por ayudarme a culminar este trabajo. Gracias, por día a día motivarme para ser mejor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme permitido llegar a este momento con mis seres queridos.

A la Dra. Gaby, por la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por todo su apoyo académico y fraternal, que hicieron de la estancia hospitalaria un gran ambiente para trabajar día a día y no declinar por las inclemencias de esta investigación (donde algunos días llegue a pensar que de verdad no saldría nada).

A la Dra. Claudine y mis compañeros que me acompañaron durante mi estancia en el INPer, a los laboratorios de los investigadores Dra. Verónica Zaga, y el Dr. Ismael Mancilla y todo su equipo de trabajo, así como a todo el personal de esta institución que en algún momento apoyaron la realización de este proyecto.

Agradezco a mis amigos que me acompañaron a lo largo de esta etapa, por su apoyo, solidaridad y todos los momentos compartidos. Especialmente a Jess, toda la carrera juntas y como si eso no bastara teníamos que hacer el servicio y la tesis en la misma institución, no olvidare algunas tonterías que llegamos a hacer durante la carrera. Y Carlos, gracias por día a día demostrarme que estabas ahí, nos separó la barrera física “distancia”, pero te encargaste de minimizar ésta a través de la tecnología o yendo a visitarme.

Agradezco a mis sinodales Lety, Lulú, Pao, Andrés y Erick, por sus observaciones y aportaciones para hacer de este un mejor trabajo.

Finalmente agradezco a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual me brindó la oportunidad de desarrollarme tanto académica, social, cultural y profesionalmente.

ÍNDICE

Índice	6
Resumen	8
Índice de tablas	9
Índice de figuras	9
Índice de abreviaturas	10
1. Marco teórico	12
1.1 El bebé prematuro.....	12
1.2 La enterocolitis necrosante.	12
1.3 Clasificación de Bell.	13
1.4 Factores de riesgo para ECN.....	15
1.5 Patogénesis de ECN.....	17
1.6 Marcadores para evaluar ECN.....	20
1.7 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).	23
1.8 Inmunoensayo multiplex basado en perlas citométricas (CBA)	25
2. Justificación	27
3. Hipótesis	28
4. Objetivos	28
4.1 Objetivo general.....	28
4.2 Objetivos particulares.....	28
5. Materiales y métodos	30
5.1 Grupos de estudio	30
5.2 Generación de una base de datos de los grupos de estudio	30
5.3 Recolección de muestras.....	30
5.4 Preparación de soluciones de laboratorio	31
5.4.1 PBS 10X (Buffer Salino de Fosfatos).....	31
5.4.2 Preparación de buffer de extracción para sobrenadante de heces.....	32
5.5 Determinación de I-FABP en orina.....	32
5.5.1 Selección de muestras de orina.....	32
5.5.2 Preparación de la muestra previo al análisis	32

5.5.3 ELISA de I-FABP	33
5.6 Determinación de citocinas en heces.....	36
5.6.1 Extracción de sobrenadante de heces.....	36
5.6.2 Determinación de citocinas mediante ensayo CBA.....	37
5.7 Análisis estadístico.....	38
6. Resultados	39
6.1 Características demográficas y clínicas de los grupos de estudio	39
6.2 Estandarización de la determinación de I-FABP urinaria	42
6.3 Determinación de I-FABP urinaria en neonatos prematuros	45
6.4 Niveles de citocinas en sobrenadantes de heces de neonatos prematuros.	47
7. Discusión.....	50
8. Conclusiones	57
9. Perspectivas.....	58
10. Referencias	59

RESUMEN

Introducción: La enterocolitis necrosante (ECN) es una devastadora, frecuente y multifactorial enfermedad gastrointestinal fuertemente vinculada a la prematuridad. Afecta principalmente a neonatos pretérmino de muy bajo peso al nacimiento (<1500 gramos) y baja edad gestacional (<32 SDG), con importantes cifras de mortalidad y morbilidad en los últimos años.

Objetivo: Medir I-FABP urinaria (marcador de daño intestinal), y citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, TNF α) y anti-inflamatorias (IL-10) fecales para determinar su utilidad como herramientas diagnósticas de ECN.

Materiales y Métodos: Se recolectaron muestras de orina y heces de neonatos prematuros \leq 32 SDG y se clasificaron en 4 grupos: sospecha de ECN, ECN, infección (sepsis y/o neumonía) y control (sin ECN y sin infección). Se recabaron datos clínicos y antropométricos neonatales, y antecedentes de infección materna. Se analizó la concentración de I-FABP urinaria cercana al nacimiento (1-3 días de vida) y alrededor de 10 días previos a la presentación de ECN mediante ELISA. Ocho días previos a la aparición de ECN, se determinaron las concentraciones fecales de las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-10 y TNF α mediante el inmunoensayo CBA. Los datos obtenidos fueron analizados con ANOVA de una vía con post-test de Tukey en el programa GraphPad Prism versión 5.

Resultados: Los neonatos con ECN mostraron niveles elevados de I-FABP urinaria al nacimiento con respecto a los bebés control, y una tendencia a presentar mayores concentraciones de la proteína 10 días previos a la presentación de la enfermedad con respecto a los bebés con infección, sospecha de ECN y los controles. Resultados preliminares sugieren que IL-8 fecal podría predecir de manera específica y con una semana de anticipación bebés que van a desarrollar ECN.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que I-FABP urinaria e IL-8 fecal podrían ser marcadores de utilidad para el diagnóstico oportuno no invasivo de ECN en neonatos prematuros.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características de las citocinas analizadas en este estudio..	22
Tabla 2. Información demográfica y clínica de la población de estudio.	40
Tabla 3. Signos clínicos de la clasificación de Bell modificada.	41
Tabla 4. Niveles de I-FABP urinaria en neonatos prematuros	46
Tabla 5. Niveles de citocinas en heces de neonatos prematuros	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de Bell modificada para el diagnóstico de ECN.....	14
Figura 2. Signos clínicos de enterocolitis necrosante.....	15
Figura 3. Fisiopatología de ECN.....	19
Figura 4. ELISA tipo sándwich.....	24
Figura 5. Ensayo de CBA	26
Figura 6. Concentraciones de la curva de calibración de I-FABP.....	34
Figura 7. Extracción de sobrenadante de heces.	36
Figura 8. Primera prueba piloto de I-FABP.....	42
Figura 9. Segunda prueba piloto de I-FABP.....	44
Figura 10. Tercera prueba piloto de I-FABP	45
Figura 11. Concentración de I-FABP urinaria.....	47
Figura 12. Niveles de citocinas en heces de neonatos prematuros.....	49

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

APCs	Células presentadoras de antígeno
CBA	Inmunoensayo múltiplex basado en perlas citométricas.
DCs	Células dendríticas
ECN	Enterocolitis necrosante
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
FABP	Proteína de unión de ácidos grasos
HB-EGF	Factor de crecimiento ligado a heparina
I-FABP	Proteína de unión de ácidos grasos intestinal
IFNγ	Interferón gamma
IL-1Rα	Receptor antagonista de interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
INPer-IER	Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes
FAP	Factor activador plaquetario
GI	Gastrointestinal
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
OMS	Organización Mundial de la Salud
RPM	Ruptura prematura de membranas
SDG	Semanas de gestación
TLRs	Receptores tipo toll
TLR4	Receptor tipo toll 4
TLR9	Receptor tipo toll 9
TGFβ1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TGFβ2	Factor de crecimiento transformante beta 2

TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores
UCIN	Unidad de cuidados intensivos neonatales
UCIREN	Unidad de cuidados intermedios al recién nacido

1. MARCO TEÓRICO

1.1 El bebé prematuro.

El bebé prematuro es aquel que nace vivo antes de cumplir 37 semanas de gestación (SDG). La Organización Mundial de la Salud (OMS) divide esta población en tres categorías:

- a) Prematuros extremos (<28 SDG)
- b) Muy prematuros (28 a <32 SDG)
- c) Prematuros moderados a tardíos (32 a <37 SDG)

Actualmente los partos prematuros representan el 75 % de la mortalidad perinatal, con una incidencia que oscila entre el 10 al 11% a nivel mundial. Aunque, aún se desconocen las causas de la prematuridad, se han descrito factores que incrementan el riesgo de parto prematuro, tales como: anteriores partos prematuros, embarazos múltiples, afecciones médicas crónicas (hipertensión, preeclampsia, diabetes, infecciones, etc.), embarazos precoces o a edad muy avanzada, situaciones de estrés constante y tener adicciones (alcoholismo, tabaquismo, drogas) (OMS, 2015, 2018).

El neonato prematuro es propenso al desarrollo de diversas patologías y complicaciones debido a que su organismo todavía no está preparado para la vida extrauterina. Esta población tiene un mayor riesgo de presentar deficiencias del desarrollo neurológico y respiratorio, así como complicaciones gastrointestinales (OMS, 2018).

1.2 La enterocolitis necrosante.

La enterocolitis necrosante (ECN) es una devastadora, frecuente y multifactorial enfermedad gastrointestinal (GI) fuertemente vinculada a la prematuridad. Afecta principalmente a neonatos pretérmino de muy bajo peso al nacimiento (<1500 gramos) y baja edad gestacional (<32 SDG), siendo temida por las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN) debido a su asociación con importantes cifras de mortalidad y morbilidad en los últimos años (Cho, Berger, Nold-Petry, & Nold, 2016; Denning & Prince, 2018).

Se presenta regularmente entre los días 15 y 60 después del nacimiento (Cho et al., 2016) con una incidencia de 1 a 3 casos por cada 1000 bebés. Esta enfermedad desencadena una reacción inflamatoria severa en la pared del intestino, pudiendo incluso culminar en necrosis y perforación intestinal. Aproximadamente entre el 20 al 50% requieren cirugía la cual incrementa hasta en un 65% la probabilidad de muerte (Cho et al., 2016; Gasque-Góngora, 2015).

En México, se ha reportado una incidencia de 7.7% de partos prematuros, que corresponde a poco más de 120 mil prematuros al año. En 2013, se reportaron cerca de 114 prematuros extremos, 225 muy prematuros, y aproximadamente 700 prematuros tardíos en el Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" (INPer-IER). Se calcula que anualmente se presentan aproximadamente 40 casos de ECN en la UCIN y la unidad de cuidados intermedios al recién nacido (UCIREN) en esta institución (INPer, 2017).

1.3 Clasificación de Bell.

La ECN fue descrita por primera vez en 1841 por el eslovaco Genersich en un bebé prematuro de 45 horas de vida que presentaba un cuadro clínico y anatomopatológico característico de la enfermedad. Posteriormente, en 1945 Rudnew, describe el caso de un prematuro nacido muerto cuyos antecedentes maternos eran amnionitis y fiebre, y el cual presentó ulceraciones en el íleon terminal como único hallazgo anormal en la autopsia. Eventualmente aparecieron más publicaciones de enfermedades abdominales que por signos y síntomas clínicos sugirieron ECN, y surgieron diferentes clasificaciones (Rabl, 1957). La más aceptada es la propuesta por Bell en 1978, organizada en tres etapas según la gravedad de la presentación clínica y las estrategias de tratamiento. En 1981, Walsh y Kliegman propusieron una modificación a la clasificación de Bell, subdividiendo cada etapa en A y B (Choi, 2014; Fernández Jiménez & De las Cuevas Terán, 2009).

Estadios de Bell	Signos Clínicos	Signos Radiológicos
I Sospecha de ECN	Apnea, letargia, vómito, leve distensión abdominal , sangre en heces.	Normal o leve dilatación del íleon
II ECN confirmada	Signos de estadio I más: acidosis metabólica, trombocitopenia, ausencia de sonidos intestinales y/o sensibilidad abdominal.	Dilatación del íleon, pneumatosis intestinal, gas venoso portal.
III ECN avanzada	Signos del estadio II más: apnea severa, hipotensión, CID, neutropenia, peritonitis generalizada , distensión abdominal	Signos del estadio II más: ascitis , neumoperitoneo.

Figura 1. Clasificación de Bell modificada para el diagnóstico de ECN. Signos clínicos y radiológicos presentes en los estadios I (sospecha de ECN), II (ECN confirmada) y III (ECN avanzada). Imagen modificada de: Cho et al., 2016.

Cada estadio de la clasificación de Bell modificada consiste de una colección de signos y síntomas clínicos, así como pruebas de imagenología y parámetros de laboratorio característicos (Figura 1) que permiten dar el diagnóstico y situar cada caso donde sea conveniente para dar el tratamiento más adecuado (Han & Wei, 2017). Los signos más característicos de ECN son la distensión abdominal, intolerancia alimentaria, presencia de sangre en heces, inestabilidad hemodinámica, pneumatosis intestinal, ascitis y presencia de gas venoso portal (Cho et al., 2016).

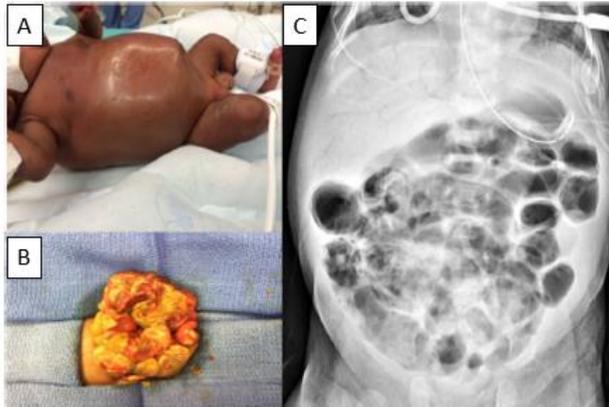


Figura 2. Signos clínicos de enterocolitis necrosante. A) Distensión abdominal y eritema. B) Intestino necrótico encontrado en exploración quirúrgica, C) Radiografía abdominal donde se observa gas venoso portal y neumatosis intestinal. Imagen tomada de: Denning & Prince, 2018.

Frente al diagnóstico de ECN, el tratamiento inicial consiste en iniciar ayuno y nutrición parenteral, administrar antibióticos vía intravenosa y dar soporte cardiopulmonar (Estadios I y II). Cuando la enfermedad alcanza el tercer estadio, el último procedimiento de elección consiste en la resección del intestino (laparotomía) en caso de perforación, así como un drenaje peritoneal (Moschopoulos et al., 2018; Reisinger et al., 2014).

1.4 Factores de riesgo para ECN

La etiología de ECN todavía es desconocida, sin embargo, es muy aceptada la teoría multifactorial que incluye factores maternos, gestacionales, fetales y perinatales los cuales están íntimamente vinculados (Ahle, Drott, Elfvin, & Andersson, 2018).

La prematuridad junto con un bajo peso al nacimiento y una baja edad gestacional, son factores de riesgo que se han mantenido consistentes en los diferentes estudios realizados sobre esta patología. Asimismo, el uso de antibióticos, la hipoxia, la falta de lactancia materna exclusiva y la alimentación con fórmulas enterales son eventos que diversos estudios han demostrado que favorecen la enfermedad.

Algunos autores sugieren que los neonatos nacidos de madres con antecedentes infecciosos (corioamnionitis, ruptura prematura de membranas (RPM), infecciones urinarias o fiebre durante el parto) presentan un mayor riesgo de desarrollar ECN (Been, Lievense, Zimmermann, Kramer, & Wolfs, 2013; Rodrigo, Henríquez, Aloy, & Pérez, 2014). No obstante, otros estudios no han encontrado esta asociación (Ahle et al., 2018). Probablemente, lo anterior se deba a que los bebés de madres con antecedentes infecciosos tienen una justificación médica para iniciar una terapia antibiótica empírica, misma que se ha demostrado altera la microbiota intestinal e incrementa el riesgo de desarrollar ECN y sepsis (Alexander, Northrup, & Bizzarro, 2011; Cotten et al., 2009; Rutten et al., 2015). La ubicación geográfica, el sexo y la época de año son factores inconsistentes en las diferentes poblaciones de estudio. No obstante, se ha reportado que la raza afroamericana y los países de Estados Unidos y Canadá son los que presentan mayor incidencia, (Haque, 2016; Holman, Stoll, Clarke, & Glass, 1997), y que la ECN es más común en varones (Ahle et al., 2018) y ocurre frecuentemente durante el invierno (Haque, 2016).

Además, se han descrito condiciones clínicas que favorecen el desarrollo de ésta patología: eventos de hipotensión, presencia de anemia e ictericia, transfusión de paquetes eritrocitarios, malformaciones cardíacas e intestinales, persistencia del conducto arterioso y hemorragias intraventriculares, inmadurez del sistema inmune y sistema digestivo, predisposición genética por la disminución o supresión de genes (por ejemplo, el gen *HB-EGF* esencial para una buena función de la barrera intestinal) (Ahle et al., 2018; Alexander et al., 2011; Choi, 2014; Cotten et al., 2009; Rutten et al., 2015).

Aunque no se ha atribuido un agente causal a la ECN, se ha encontrado un desbalance en las poblaciones microbianas del intestino (disbiosis) que se ha sugerido induce un estado proinflamatorio (Choi, 2014; Denning & Prince, 2018; Moschopoulos et al., 2018).

1.5 Patogénesis de ECN

La patogénesis de ECN no se conoce con claridad pero se sabe que el sistema inmune está profundamente desregulado (Cho et al., 2016), y que la inmadurez de algunas funciones clave del sistema gastrointestinal (motilidad, capacidad de digestión y regulación circulatoria) propias del neonato prematuro en conjunto con otros factores de riesgo promueven un ambiente adecuado para el desarrollo de la enfermedad (Choi, 2014; Fernández Jiménez & De las Cuevas Terán, 2009; Haque, 2016).

El sistema inmunológico y la microbiota intestinal se desarrollan en conjunto, aprendiendo a tolerarse mutuamente para asegurar la homeostasis. No obstante, cuando se produce una alteración en este equilibrio y se instala una disbiosis y/o se daña la barrera epitelial intestinal, se promueve un ambiente de inflamación debido a la translocación de la microbiota a la mucosa (Cho et al., 2016; Maranduba et al., 2015).

El ingreso de bacterias a la mucosa intestinal promueve la activación del receptor tipo Toll 4 (TLR4) expresado en el epitelio intestinal (Denning & Prince, 2018). Los incrementos inapropiados en receptores de reconocimiento de patrones, entre los cuales se encuentran los TLRs, inducen respuestas inflamatorias, proapoptóticas y antiapoptóticas creando un complejo panorama.

La activación de cascadas de señalización para el procesamiento de antígenos por células presentadoras de antígeno (APCs) mediadas por células dendríticas (DCs) y la activación de otras células inmunes como linfocitos T, monocitos, macrófagos y linfocitos T reguladores (Tregs), conducen a un aumento excesivo de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-18, IFN γ , IL-1 β , TNF α), factor activador de plaquetas (PAF) y factores de transcripción (NF- κ B). A su vez, la deficiencia de mecanismos de regulación (IL-1R α , TLR9, TGF β 1 y 2, IL-10), contribuye a que el entorno proinflamatorio se autoperpetúe y se salga de control, provocando un círculo vicioso, aumentado por la necrosis del epitelio intestinal, que agrava más la

lesión e inflamación del tejido (Cho et al., 2016; Denning & Prince, 2018; Maranduba et al., 2015; Moschopoulos et al., 2018).

Aunque el daño comienza de forma local en el intestino se presenta una extensión sistémica con compromiso multiorgánico, que puede llevar a sepsis, falla multiorgánica, afectación del sistema nervioso central y muerte (Cho et al., 2016; Denning & Prince, 2018; Moschopoulos et al., 2018). Un bebé que se recupera de ECN tiene 25 % de probabilidad de sufrir microcefalia; la gran mayoría sufre retraso en el desarrollo neurológico, y además en caso de tratamiento quirúrgico esta patología suele ser la primer causa del síndrome del intestino corto en pacientes pediátricos, insuficiencia intestinal, y dependencia de nutrición parenteral por al menos 90 días (Hong, Han, & Jaksic, 2018; Neu & Pammi, 2017).

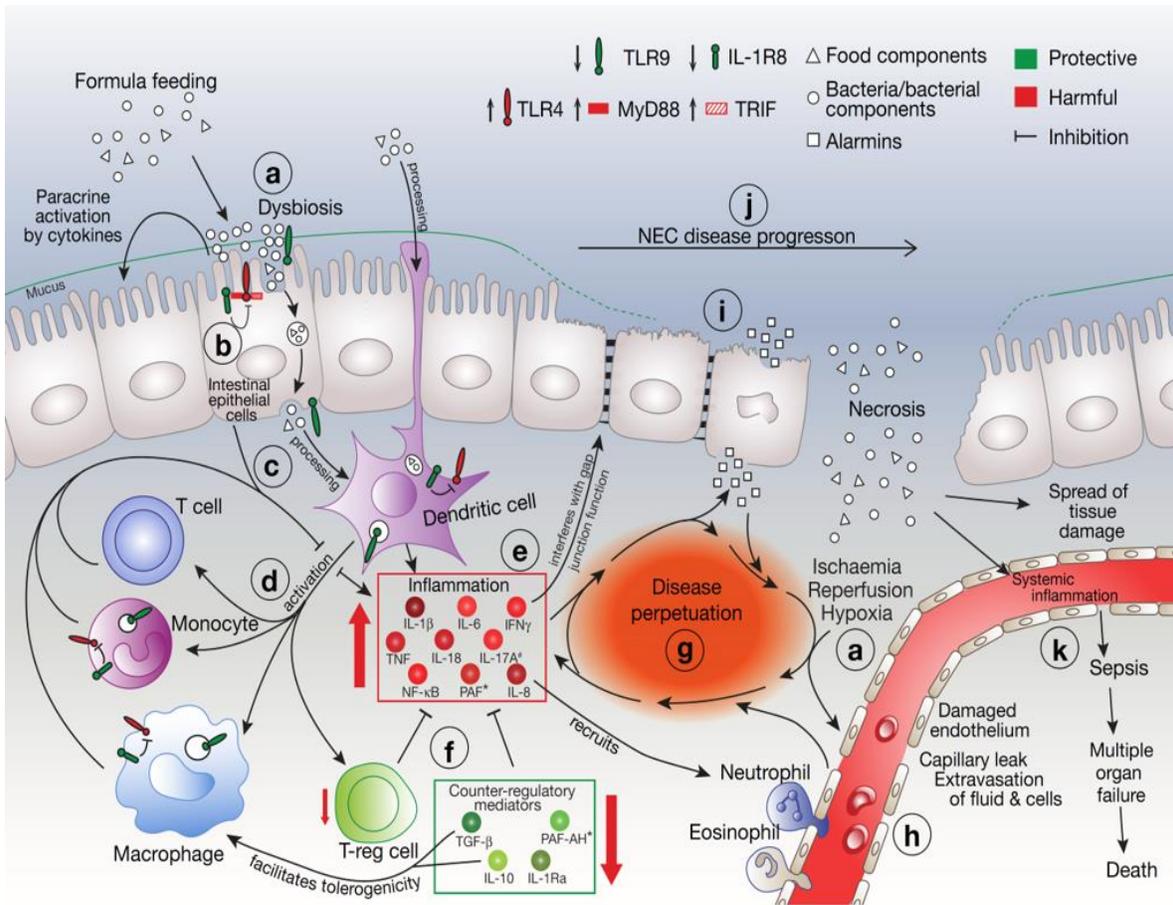


Figura 3. Fisiopatología de ECN. Diversos factores de riesgo incitan al desarrollo de ECN y se produce una lesión en la mucosa intestinal que conduce a una respuesta inflamatoria excesiva mediada por receptores de reconocimiento de patrón proinflamatorios como el TLR4. Así, se inicia una cascada de procesamiento de antígeno por parte de células dendríticas y la activación de linfocitos T, monocitos y macrófagos, quienes promueven el aumento excesivo de citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IFN γ), quimiocinas y factores de transcripción (NF- κ B). Los mecanismos reguladores encargados de limitar la inflamación como los linfocitos reguladores (Treg) y los mediadores contrarreguladores (TGF β , IL-10) están reducidos y no logran controlar el proceso inflamatorio perpetuando la inflamación e incitando la muerte celular exagerada, conduciendo a un círculo vicioso. El deterioro del epitelio intestinal compromete sus funciones de barrera y se produce la traslocación de bacterias a nivel sistémico que conduce a sepsis, falla multiorgánica, e incluso la muerte. Imagen tomada de: Cho et al., 2016.

1.6 Marcadores para evaluar ECN

El comienzo de ECN es insidioso e inespecífico, para cuando se detecta la enfermedad el daño infligido en el intestino del bebé ya es desastroso (Cho et al., 2016) comprometiéndolo incluso hasta la muerte. Debido a esto, en los últimos años se han evaluado biomarcadores que, en conjunto con signos y síntomas clínicos permitan establecer el diagnóstico temprano de esta patología (E. W. Y. Ng et al., 2013), para ello se han evaluado las diferentes moléculas y eventos involucrados en la fisiopatología de la enfermedad.

Un biomarcador excelente para ECN es aquel que no es sensible a la inflamación asociada a sepsis, pero cuya concentración en el torrente sanguíneo aumenta sustancialmente desde su inicio. Además, la magnitud del aumento debe ser proporcional a la gravedad del daño en el tejido intestinal (E. W. Y. Ng et al., 2013). Actualmente no se conoce un marcador biológico capaz de diagnosticar ECN con un alto grado de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, se ha observado que se puede establecer un diagnóstico de ECN al evaluar de forma conjunta varios biomarcadores, ya que se aumenta el porcentaje de acierto en la determinación de la patología y se disminuye el error a la hora del diagnóstico.

Idealmente, los marcadores deberían ser analizados en muestras obtenidas de manera no invasiva para evitar afectar la salud neonatal. Algunos autores reportan un elevado porcentaje de anemias en bebés debido a la constante extracción de muestras sanguíneas para análisis de laboratorio de rutina (biometría hemática, química sanguínea, gasometría) o especiales (pruebas de coagulación, hemocultivo). Por tanto, las muestras biológicas ideales para el diagnóstico y monitoreo de la evolución de una patología son heces, orina y saliva (P. C. Ng, 2014).

De igual modo, se investigan marcadores que sean factibles de utilizar en clínica, por lo que se buscan moléculas capaces de ser medidas en equipos de análisis de rutina o cuya medición pueda ser automatizada. Para esto, deben cumplir con

ciertos requerimientos: ser sustentables (costo económico no tan elevado), con alto grado de especificidad y sensibilidad, y de preferencia capaces de medirse en muestras biológicas obtenidas de manera no invasiva.

Las proteínas de la familia FABP podrían usarse como marcador de daño específico de tejido con base en las siguientes características: son proteínas solubles en el citoplasma, tienen alta especificidad tisular, son abundantes en el tejido y además cuentan con un bajo peso molecular (Funaoka, Kanda, & Fujii, 2010). Dentro de esta familia, la proteína de unión a ácidos grasos intestinal (I-FABP) está restringida a la mucosa intestinal (Evennett, Hall, Pierro, & Eaton, 2010), y es sintetizada únicamente por enterocitos maduros (E. W. Y. Ng et al., 2013).

La I-FABP es una proteína intracelular pequeña de 14-15 kD que desempeña un papel importante en el transporte y el metabolismo de los ácidos grasos (Evennett et al., 2010; E. W. Y. Ng et al., 2013). Tras la muerte de los enterocitos, ésta es liberada pasando al torrente sanguíneo (Evennett et al., 2010). Se estima que I-FABP tiene una vida media plasmática corta de aproximadamente 11 minutos (E. W. Y. Ng et al., 2013). Sin embargo, debido a su tamaño pequeño puede pasar por el glomérulo excretándose fácilmente en orina y se ha considerado como marcador de ECN (Derikx et al., 2007; Evennett et al., 2010).

Las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70 y TNF α fungen como marcadores de inflamación, conducta clave de la enfermedad, y se ha propuesto su medición en heces como marcadores de inflamación y respuesta inmune local del intestino del bebé pretérmino.

Las citocinas se encuentran en concentraciones de nano o picomoles y ejercen su actividad biológica a través de interacciones específicas con sus receptores. Estas se encargan de modular la actividad de diversas células y controlar funciones fisiológicas de gran importancia: diferenciación y maduración celular, reparación

tisular, hematopoyesis, apoptosis, inflamación local y sistémica, entre otras (Filella, Molina, & Ballesta, 2002).

Tabla 1. Principales características de las citocinas analizadas en este estudio				
Citocina	Tamaño	Naturaleza	Producida por	Función
IL-8	8-9 kD	Inflamatoria	Macrófagos y células endoteliales	Potente factor quimiotáctico de neutrófilos, en los que induce la expresión de integrinas, favoreciendo su adhesión a células endoteliales.
IL-1β	17 kD	Inflamatoria	Monocitos, macrófagos, Células endoteliales, Células epiteliales	Vasculatura (inflamación); hipotálamo (fiebre); hígado (inducción de proteínas de fase aguda)
IL-6	22-27 kD	Inflamatoria Anti-inflamatoria	Macrófagos, Células endoteliales, Monocitos	Hígado (inducción de proteínas de fase aguda); inmunidad (proliferación y secreción de anticuerpos del linaje de células B)
TNFα	17 kD	Inflamatoria	Macrófagos	Vasculatura (inflamación); hígado (inducción de proteínas de fase aguda); pérdida de músculo, grasa corporal (caquexia); inducción de muerte en varios tipos celulares; activación de neutrófilos
IL-10	17-21 kD	Anti-inflamatoria	Macrófagos, linfocitos T (sobre todo, Treg)	Disminución de inflamación mediada por macrófagos y linfocitos T; supresión de células Th1; inhibición de la expresión de IL-12, moléculas de coestimulación y moléculas del MHC clase II
IL-12p70	70 kD	Inflamatoria	Macrófagos, células dendríticas	Aumento de la actividad citotóxica de células NK; promoción de las respuestas Th1

(Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S., 2004; Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. y Kuby, 2004)

En el presente trabajo se propone determinar si I-FABP (marcador específico de daño intestinal), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF α (marcadores de inflamación/anti-inflamación) de manera conjunta con signos y síntomas clásicos de ECN pueden ser buenos marcadores biológicos como herramienta en el diagnóstico de esta enfermedad en neonatos prematuros.

Se cuantificará I-FABP en orina mediante ELISA tipo sándwich, mientras que las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF α , serán analizadas en heces mediante el inmunoensayo multiplex basado en perlas (CBA), técnicas que se describen a continuación.

1.7 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

La técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), es un ensayo *in vitro* de reacción antígeno-anticuerpo, con diferentes aplicaciones tales como: diagnóstico médico (estudios serológicos, endocrinológicos, oncológicos, etc.), medicina forense, industria de alimentos, control del medio ambiente, entre otros.

Una ELISA tipo sándwich consiste en evaluar el antígeno entre dos capas de anticuerpos (anticuerpo de captura y anticuerpo de detección). El antígeno diana debe contener al menos dos sitios antigénicos capaces de unirse a los anticuerpos. Esencialmente consiste en recubrir los pocillos con el anticuerpo de captura y lavar el exceso de este. Posteriormente se agrega la muestra problema donde los antígenos presentes son retenidos por el anticuerpo de captura. Después, se realizan lavados y se agrega el anticuerpo de detección acoplado a la enzima, creando de esta forma el sándwich. Finalmente, se agrega el sustrato específico de la enzima que se utiliza para producir la señal que será determinada en un lector de placas de ELISA donde se medirá la absorbancia para cuantificar la reacción colorimétrica de acuerdo a la ley de Lambert-Beer (Aydin, 2015; Gan & Patel, 2013).

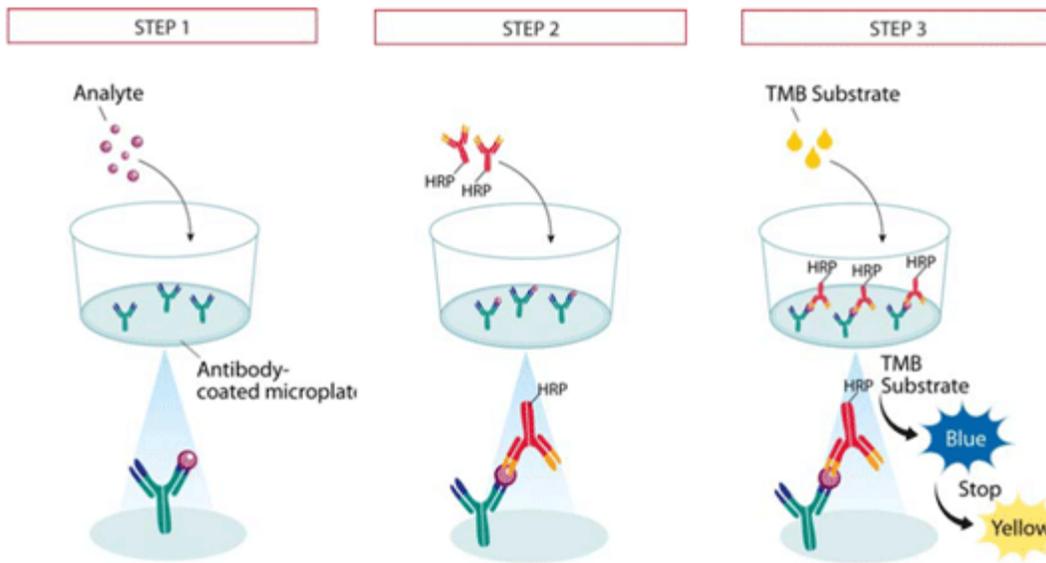


Figura 4. ELISA tipo sándwich. Los pocillos están recubiertos con anticuerpos de captura para el analito de interés. Las muestras son incubadas en los pocillos. En presencia del antígeno se forma un complejo con el anticuerpo unido a la placa. Los lavados siguientes retiran las sustancias no unidas al anticuerpo de captura. En el siguiente paso se agrega el anticuerpo de detección conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP), que se unirá con los complejos anticuerpo-antígeno formados previamente. Nuevamente, el conjugado no unido se remueve por lavados. Posteriormente se agrega la solución sustrato para la enzima HRP que resulta de la mezcla de tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno. En presencia del antígeno los pocillos desarrollarán un color azul celeste proporcional a la cantidad del analito que virará a amarillo al detener la reacción con ácido sulfúrico. Nota de aplicación R&D Systems a Biotechne Brand.

1.8 Inmunoensayo multiplex basado en perlas (CBA)

El ensayo de CBA (Cytometric Bead Array) es una aplicación de citometría de flujo que permite evaluar simultáneamente múltiples proteínas (citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, proteínas de señalización celular fosforiladas) en una muestra. El ensayo consiste en utilizar perlas cubiertas con anticuerpos de captura y anticuerpos de detección marcados con fluorocromos, compartiendo casi el mismo principio de una ELISA tipo sándwich. Las principales ventajas de esta técnica son: evaluar simultáneamente múltiples analitos en un volumen mínimo de muestra comparado a inmunoensayos tradicionales, lo que a su vez ayuda a ahorrar tiempo y el uso de otros recursos. Habitualmente se utiliza como muestra del ensayo: suero, plasma, y sobrenadantes celulares pero se han reportado ensayos con respuesta en otros fluidos corporales (Elshal & McCoy, 2006; Morgan et al., 2004).

El principio de la técnica consiste en capturar de forma soluble los analitos o un conjunto de analitos con perlas citométricas en suspensión acopladas a anticuerpos monoclonales de captura específicos para un antígeno. Las perlas se marcan internamente con una combinación única de componentes fluorescentes y un tamaño determinado. Las perlas específicas para los antígenos de interés se incuban con la muestra a analizar. Posteriormente se lavan para remover la proteína que no ha se unido, los anticuerpos de detección (de nuevo específicos para cada antígeno de interés) se añaden aportando una señal fluorescente proporcional a la cantidad de analito unido. Se crea una curva estándar con concentraciones conocidas de cada analito de interés para poder llevar acabo la cuantificación (Elshal & McCoy, 2006; Morgan et al., 2004).

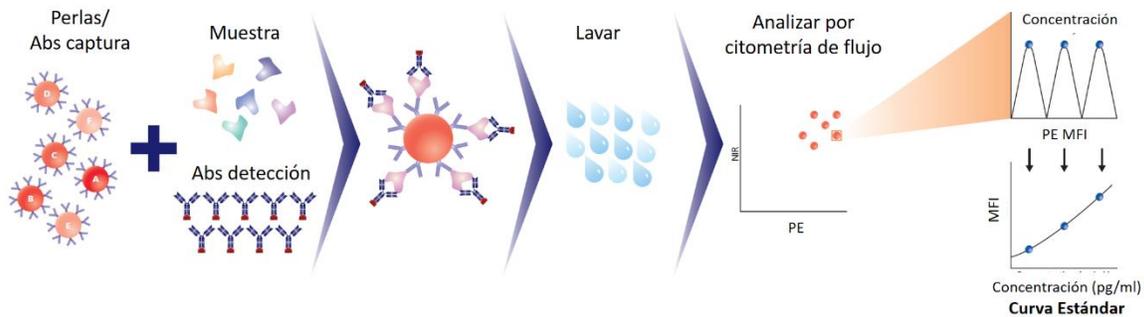


Figura 5. Ensayo de CBA. En el ensayo hay diferentes tipos de perlas, cada perla tiene una intensidad de fluorescencia única y está cubierta con anticuerpos (Abs) de captura específicos para una proteína en particular. Las perlas son mezcladas con la muestra o el estándar y a continuación con una mezcla de Abs de detección conjugados a un fluorocromo (por ejemplo: PE). Se lava el exceso de reactivos y las muestras son analizadas en el citómetro de flujo donde se determina la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada analito y se genera una curva estándar para conocer la concentración de las proteínas de interés. Adaptada de Reynolds S, y otros, 2012, Nota de aplicación de BD Biosciences.

2 JUSTIFICACIÓN

La enterocolitis necrosante es una enfermedad gastrointestinal con prevalencia en el prematuro con altas cifras de morbilidad y mortalidad. El diagnóstico es difícil, ya que el inicio de la enfermedad es insidioso e inespecífico (Cho et al., 2016; Denning & Prince, 2018), la importancia de un diagnóstico temprano radica en evitar un desenlace fatal y reducir el daño neurológico que pudieran sufrir los bebés que sobreviven a la enfermedad para mejorar su calidad de vida, así como para reducir los gastos en materia de salud (Hong et al., 2018; Moschopoulos et al., 2018; Neu & Pammi, 2017) .

Conociendo la fisiopatología de la enfermedad, se buscan biomarcadores confiables en la predicción, progresión y grado de la enfermedad. Las muestras idóneas para tales fines son aquellas que no son invasivas (orina, heces, saliva, etc.) debido a que, en general, los prematuros se encuentran en un estado delicado de salud, mismo que aumenta ante la sospecha de enterocolitis (P. C. Ng, 2014). Otra ventaja que ofrecen este tipo de muestras es la facilidad de un monitoreo constante durante la evolución de la enfermedad.

En el trabajo se medirán I-FABP como marcador de daño intestinal específico en orina y citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70 y TNF α) y anti-inflamatorias (IL-10) en heces como moléculas candidatas a ser herramientas de utilidad en el diagnóstico no invasivo de ECN en neonatos prematuros de bajo peso y edad gestacional al nacimiento, población más afectada por esta patología.

3 HIPÓTESIS

Los bebés prematuros que desarrollarán enterocolitis necrosante presentarán altas concentraciones de I-FABP y de las citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70 y TNF α , y bajas concentraciones de IL-10 en comparación con los neonatos que presentarán sospecha de ECN, infección (sepsis y/o neumonía) o que no desarrollarán ni ECN ni infección (grupo control) por lo que podrán ser usados como marcadores tempranos de esta patología.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar si los neonatos prematuros diagnosticados con enterocolitis necrosante (ECN) presentan altas concentraciones del marcador de daño intestinal I-FABP y de las citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70 y TNF α , así como bajas concentraciones de la citocina anti-inflamatoria IL-10 previo a la presentación de la enfermedad con respecto a neonatos con sospecha de ECN, infección (sepsis y/o neumonía) o que no presentan ni ECN ni infección (grupo control) para determinar si estos marcadores podrían ser utilizados como marcadores tempranos de ECN.

4.2 Objetivos particulares

Aplicar criterios de exclusión e inclusión para seleccionar neonatos prematuros candidatos para la recolección de muestras de orina y heces durante la estancia hospitalaria.

Generar una base de datos con datos maternos y neonatales para identificar los diferentes grupos de estudio: casos de ECN, sospecha de ECN, infección (sepsis temprana o tardía, neumonía), y neonatos que no presentaron ni ECN ni infección (grupo control).

Determinar la concentración de I-FABP como biomarcador específico de daño a la mucosa intestinal en muestras de orina de neonatos prematuros de los diferentes grupos de estudio mediante ensayos de ELISA tipo sándwich.

Analizar la concentración de las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF α en heces como marcadores de la respuesta inmune del intestino de los diferentes grupos de estudio mediante inmunoensayos CBA.

Evaluar si las concentraciones de I-FABP y de las citocinas en conjunto con signos y síntomas clínicos de ECN son marcadores útiles en el diagnóstico de la enfermedad.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Grupos de estudio

Estudio prospectivo tipo cohorte que incluyó neonatos prematuros iguales o menores de 32 semanas de gestación (SDG) hijos de madres mayores de edad y residentes de CDMX y Área Metropolitana nacidos en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes, previo consentimiento informado de los padres. Se excluyeron bebés con anomalías congénitas, cromosomopatías, alteraciones hematológicas y metabólicas

5.2 Generación de una base de datos de los grupos de estudio

Se realizó una recopilación de diferentes variables: antecedentes maternos (corioamnionitis, RPM, infección de vías urinarias o vaginal), datos de nacimiento (SDG, sexo, peso, talla, perímetro cefálico, Apgar minutos 1 y 5), días de vida al diagnóstico de ECN, sospecha de ECN e infección (sepsis y/o neumonía) durante la estancia hospitalaria, pruebas de laboratorio (biometría hemática y gasometría), tipo de alimentación (leche humana, leche pasteurizada, fórmula), uso de medicamentos (antibióticos e inhibidores de bomba de protones) número de transfusiones previo al diagnóstico de ECN, y días de estancia hospitalaria.

5.3 Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de orina y heces los primeros siete días de vida extrauterina, y posteriormente una cada semana durante la estancia hospitalaria. Las muestras recolectadas fueron inmediatamente almacenadas a 4°C, procesadas en condiciones de asepsia (uso de bata, guantes y cubrebocas, desinfección del área de trabajo y uso de material nuevo y estéril), alicuotadas en crioviales y almacenadas dentro de las primeras 24-48 horas a -70°C hasta su análisis. Se realizó un registro de las muestras en la bitácora de laboratorio, así como una relación de muestras de orina y heces por paciente donde se registró la fecha de recolección, el día de vida y su ubicación en el congelador.

5.4 Preparación de soluciones de laboratorio

5.4.1 PBS 10X (Buffer Salino de Fosfatos). El buffer salino de fosfatos es una solución ampliamente utilizada porque su composición y concentración de iones cloruro (Cl^-), sodio (Na^+) y potasio (K^+), pH y osmolaridad asemeja al líquido extracelular de los mamíferos, promoviendo su empleo para lavado y vehículo de células, debido a que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal.

Cálculos para la preparación de 500 mL de PBS 10X

$$\text{NaCl } 1.37 \text{ M } 500 \text{ mL} \times \frac{1.37 \text{ mol}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{58.44 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 40.03 \text{ g}$$

$$\text{KCl } 27 \text{ mM } 500 \text{ mL} \times \frac{27 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} \times \frac{74.55 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 1.0064 \text{ g}$$

$$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ } 100 \text{ mM } 500 \text{ mL} \times \frac{100 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} \times \frac{141.96 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 7.098 \text{ g}$$

$$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ } 18 \text{ mM} = 500 \text{ mL} \times \frac{18 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}} \times \frac{136.09 \text{ g}}{1 \text{ mol}} = 1.2240 \text{ g}$$

Se agregaron aproximadamente 400 mL de agua miliQ en un matraz, posteriormente se añadieron 40.03 g de cloruro de sodio (NaCl), 1.0064 g de cloruro de potasio (KCl), 7.098 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4) y 1.2240 g de fosfato monopotásico (KH_2PO_4). Una vez disueltas las sales se ajustó el pH entre 7.2-7.4 con ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N. Finalmente se aforo el matraz a un volumen final de 500 mL, se filtró la solución a través de membrana de acetato de celulosa de 0.2 micrómetros y se conservó a 4°C. Para preparar 500 mL de PBS 1X se diluyeron 50 mL PBS 10X en 450 mL de agua miliQ.

5.4.2 Preparación de buffer de extracción para sobrenadante de heces. Se diluyó una pastilla de inhibidor de proteasas (Pierce Protease Inhibitor Mini Tablets, EDTA-free ThermoFisher A32955) en 10 mL de PBS 1X filtrado previamente con membrana de 0.45 μ m. El buffer se conservó y trabajo en todo momento a 4°C.

Cada pastilla contiene inhibidores de proteasas de amplio espectro que protegen a las proteínas de la degradación proteolítica cuya composición se cita a continuación:

Inhibidor	Proteasa/ Fosfatasa que protege
Aprotinina	Serina proteasas
Bestatina	Aminopeptidasas
E-64	Cisteína proteasas
Leupeptina	Serina y cisteína proteasas
AEBSF	Serina proteasas
Pepstatin A	Proteasas asparticas

5.5 Determinación de I-FABP en orina

5.5.1 Selección de muestras de orina

Se determinó el intervalo de tiempo promedio de presentación de ECN en los neonatos prematuros que desarrollaron la enfermedad, definiendo así dos intervalos: cercana al nacimiento (2 a 3 días después de nacimiento), y cercano al día del desarrollo a la patología (diez días previos al desarrollo de ECN), Se seleccionaron muestras de orina de neonatos con: i) diagnóstico de ECN, ii) sospecha de ECN, iii) infección (presentaron sepsis o neumonía) y iv) que no presentaron ECN ni cuadros de infección (sepsis, neumonía o picos febriles) clasificado como grupo control, dentro de estos periodos de tiempo.

5.5.2 Preparación de la muestra previo al análisis

Se hicieron alícuotas de 1 mL de orina en tubos Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm 10 min a 4°C, se transfirieron los sobrenadantes a tubos limpios y se desecharon los residuos sólidos.

5.5.3 ELISA de I-FABP

Siguiendo las especificaciones e instrucciones del fabricante, se realizó la determinación de I-FABP en orina mediante una ELISA tipo sándwich (*Human FABP2/I-FABP Quantikine R&D Systems DFBP20*).

1. **Preparación de la curva estándar.** Se reconstituyó el estándar liofilizado de *Human FABP2* con 1 mL de agua miliQ para producir un stock de 10,000 pg/mL. Se mezcló el estándar para asegurar una completa reconstitución, evitando la formación de burbujas y espuma, y se dejó reposar por un mínimo de 15 minutos antes de realizar las diluciones para la curva estándar. Se preparó la curva estándar realizando una dilución 1:10 del stock con el diluyente RD5-5 (base proteica tamponada con conservantes incluida en el kit) para generar el punto más concentrado de la curva (1000 pg/mL), y a partir de este se realizaron diluciones seriadas 1:2 para generar las concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.3 y 15.6 pg/mL (Figura 6), mezclando con vortex cada tubo previo a la preparación de la siguiente dilución. El diluyente RD5-5 fungió como blanco.
2. **Adición de estándar, control o muestra.** Se utilizó una placa de 96 pozos sensibilizada con anticuerpo monoclonal específico para FABP2 (I-FABP) humano que venía en formato de tiras removibles. Las tiras fueron almacenadas a 4°C dentro del empaque que las protegía de la luz y humedad, y usadas dentro de un periodo de 30 días a partir de que se abrió el empaque. Se añadió a cada pocillo de la placa 50 uL del diluyente *RD1-63* (base proteica tamponada con conservantes incluida en el kit). A continuación, se agregaron por duplicado 50 uL de estándar, control o muestra en cada pozo según correspondiera. Los controles del ensayo consistieron en controles de concentración alta, media y baja de FABP2 (*ELISA Kit Controls Quantikine R&D Systems control set 884 QC213*) los cuales fueron reconstituidos en 1 mL de agua miliQ.

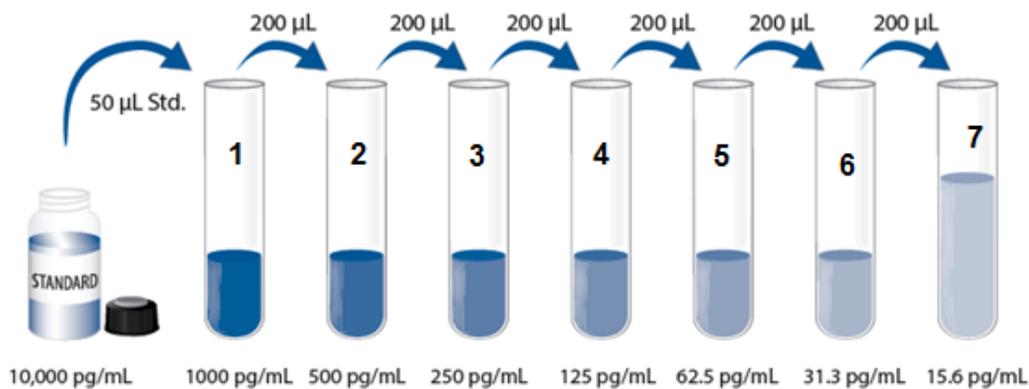


Figura 6. Concentraciones de la curva de calibración de I-FABP. Concentraciones que forman parte de la curva estándar para la determinación de I-FABP. Primera dilución del estándar 1:10 y posteriormente diluciones seriadas 1:2.

Con respecto a las muestras de orina neonatales, realizamos una dilución 1:80 con la solución Calibrator Diluent RD5-5. Una vez agregados los estándares, controles y muestras, las placas fueron cubiertas con tiras adhesivas provistas en el kit, e incubadas por 2 horas a T ambiente en un agitador de microplacas a 500 ± 50 rpm.

3. **Lavados y adición del conjugado de FABP2.** Una vez transcurrido el tiempo de incubación se decantaron las muestras de los pozos por inversión y se realizaron cuatro lavados con el buffer de lavado (tampón tensoactivo con conservantes) el cual fue preparado a 1X con agua miliQ a partir del stock 25X provisto en el kit. Cada lavado se realizó agregando 300 uL de buffer de lavado a los pozos con ayuda de una micropipeta de 12 canales. Entre cada lavado se eliminó el exceso de buffer invirtiendo la placa y secándola sobre toallas de papel absorbente limpias. La eliminación completa del líquido en cada paso fue esencial para un buen desempeño. Posteriormente se agregaron 200 uL de *conjugado FABP2* (anticuerpo policlonal específico para FABP2 asociado con la enzima peroxidasa de rábano HRP) en cada pozo. A continuación, las placas fueron cubiertas con tiras adhesivas provistas en el kit, e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente en un agitador de microplacas a 500 ± 50 rpm.

4. **Lavados y adición de sustrato para la enzima HRP.** Quince minutos previos a que concluyera el tiempo de incubación con el conjugado de FABP2 se procedió a preparar el sustrato para la enzima HRP. Para ello se mezclaron en partes iguales los reactivos A (peróxido de hidrogeno H_2O_2 estabilizado) y B (tetrametilbencidina = TMB, un cromógeno estabilizado), y la mezcla se protegió de la luz. Se preparó el volumen necesario para agregar 200 uL de la mezcla por pozo.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se decantaron las muestras de los pozos por inversión y se realizaron cuatro lavados con el buffer de lavado 1X como se describió en el punto 3. Enseguida, se adicionaron a cada pozo 200 uL de solución de sustrato y se incubó 30 min a temperatura ambiente en una superficie sin movimiento protegiendo la placa de la luz. Finalmente se añadieron 50 uL de *solución de paro* (ácido sulfúrico 2N) en cada pozo, observándose el cambio de color de los pozos de azul a amarillo. Cuando el color de los pozos fue verde o el cambió de color no apareció uniforme, se golpeó suavemente la placa para asegurar una mezcla completa.

5. **Lectura de la absorbancia y determinación de la concentración de I-FABP.**

Para terminar el procedimiento se determinó la absorbancia de las muestras en el lector de ELISA *xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer de BioRad* dentro de los primeros 30 min transcurridos una vez agregada la solución de paro. Se realizó la medición de la absorbancia a 450 nm, con una corrección de longitud de onda de 540 nm. La concentración real de I-FABP en las muestras de orina fue obtenida al multiplicar la concentración obtenida en el lector de ELISA por el factor de dilución de la muestra. Para considerar las fluctuaciones en la excreción de orina, la I-FABP urinaria se normalizo con la creatinina urinaria y se reporta como picogramos de I-FABP por nanomoles de creatinina. Las concentraciones de creatinina urinaria fueron determinadas en el laboratorio central del INPer-IER.

$$\frac{pg\ IFABP}{nmol\ creatinina} = \frac{\left(\frac{pg\ IFABP}{mL\ orina}\right) \left(\frac{10\ mL}{1\ dL}\right)}{\left(\frac{mg\ creatinina}{dL\ orina}\right) \left(\frac{1\ g}{1000\ mg}\right) \left(\frac{1\ mol\ creatinina}{113\ g\ creatinina}\right) \left(\frac{10^9\ nmol}{1\ mol}\right)}$$

5.6 Determinación de citocinas en heces

5.6.1 Extracción de sobrenadante de heces

Se descongelaron las heces en hielo, se pesaron entre 150-200 mg de muestra, y se diluyeron en buffer de extracción en una relación peso (mg)/volumen (uL) 1:1. Las muestras fueron mezcladas en vórtex hasta homogenizarlas por completo y se incubaron por 30 min en hielo mezclándolas cada 5 minutos en vórtex. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 12,500 rpm por 15 min a 4 °C y los sobrenadantes fueron extraídos con jeringas de insulina con aguja de 27G x 13 mm. Se realizaron de 2 a 4 pasos de centrifugación/extracción dependiendo de las características de la muestra, recuperando en cada paso la fase líquida y descartando la fase sólida (Figura 7). Finalmente, los sobrenadantes fueron transferidos a tubos Eppendorf de 1.5 mL y almacenados a -70 °C hasta su análisis.

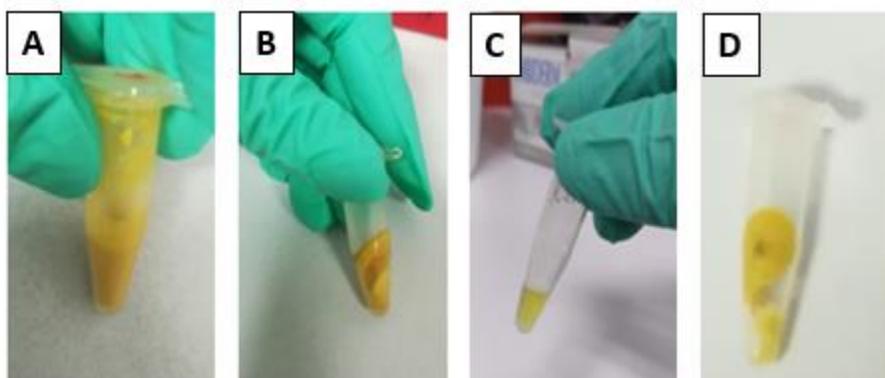


Figura 7. Extracción de sobrenadante de heces. A) Muestra homogenizada en proporción 1:1 peso/volumen (mg heces/uL de buffer de extracción), B) muestra centrifugada donde se aprecian dos fases: líquida y sólida, C) fase líquida utilizada para analizar las citocinas, D) fase sólida desechada.

5.6.2 Determinación de citocinas mediante ensayo CBA.

Para la determinación de las citocinas 1L-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL12p70 y TNF α se utilizó el kit comercial BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines 551811, siguiendo un protocolo optimizado y validado por el laboratorio del Dr. Ismael Mancilla Herrera del Departamento de Infectología e Inmunología del INPer- IER.

1. **Preparación de la curva estándar.** Se reconstituyó el vial liofilizado Human Inflammatory Cytokine Standards con 2 mL del diluyente incluido en el kit. Se homogenizó suavemente, evitando la formación de burbujas y espuma y se dejó reposar 15 min antes de su uso. Se rotularon 10 tubos eppendorf como C1, C2... hasta C10. Se adicionaron 300 μ L de diluyente (base proteica tamponada incluida en el kit) a cada tubo. Se tomaron 300 μ L del standard y se realizaron diluciones seriadas 1:2. La concentración más alta de la curva fue 5000 pg/mL y como blanco se utilizó diluyente (0 pg/mL)
2. **Cuantificación de citocinas.** Se reconstituyó cada vial de perlas citométricas con el diluyente y volumen indicado en la etiqueta de cada vial. Se preparó una mezcla en la que se incorporaron 6 perlas diferentes para medir las citocinas IL-8, 1L-1 β , IL-6, IL-10, TNF α e IL-12p70. Por cada muestra se adicionaron 2.5 μ L de cada perla y 12.5 μ L del agente de detección incluido en el kit. La mezcla se homogenizó en vórtex por 30 s y se centrifugó durante 15 s en una microcentrífuga. A 12.5 μ L de estándar o sobrenadante de heces se agregaron 25 μ L de la mezcla de perlas citométricas/agente de detección, se agitaron las muestras en el vórtex 30 s y se incubaron protegidas de la luz durante 3 horas a T ambiente. Transcurrido este tiempo, se adicionan 300 μ L de buffer de lavado y se centrifugaron a 400 g por 10 min a T ambiente. Se retiró la mayor cantidad de sobrenadante y se resuspendió el botón en 50 μ L de buffer de lavado. La curva estándar y las muestras fueron analizadas en el citómetro FASC Aria III Cell Sorter (BD Biosciences) y el análisis de los datos para determinar las concentraciones se realizó con el programa FCAP Array software (BD Biosciences).

5.7 Análisis estadístico

Los datos son mostrados como la media \pm el error estándar (SEM). Los resultados de I-FABP, citocinas y datos paramétricos (por ejemplo: SDG, peso, talla) de los grupos de estudio fueron analizados con análisis de varianza (ANOVA) de una vía con post-test de Tukey con el programa GraphPad Prism versión 5. Los datos no paramétricos (por ejemplo: sexo masculino, vía de nacimiento, uso de antibióticos) fueron analizados con distribución de Pearson con el programa SigmaStat versión 2.03. Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

6. RESULTADOS

6.1 Características demográficas y clínicas de los grupos de estudio

El objetivo de este estudio fue determinar la utilidad de la cuantificación de I-FABP en orina y citocinas en heces, como herramientas de laboratorio para el diagnóstico oportuno y no invasivo de enterocolitis necrosante en neonatos prematuros. Para ello se procedió a recolectar muestras de orina y heces de neonatos ≤ 32 SDG durante 10 meses, y se clasificaron en cuatro grupos de estudio según los diagnósticos clínicos que presentaron durante su estancia hospitalaria: 1) controles (que no presentaron ni infección ni ECN), 2) infección (que presentaron sepsis neonatal temprana o tardía y/o neumonía), 3) sospechas de ECN, y 4) casos confirmados de ECN según la clasificación de Bell modificada. Se consideró relevante incluir un grupo de neonatos con infección, ya que los cuadros de infección y ECN, en su inicio pueden presentar signos y síntomas clínicos similares, y requeríamos identificar marcadores específicos de ECN. Durante el estudio, se logró recolectar muestras de orina y heces de 10 controles, 9 bebés que cursaron con infección, 5 bebés que presentaron sospecha de ECN y 7 neonatos que desarrollaron ECN. En la Tabla 2, se presentan las características demográficas, datos clínicos y antecedentes infecciosos maternos de los cuatro grupos de estudio. No se encontraron diferencias significativas en las SDG, datos antropométricos (peso, talla, perímetro cefálico), sexo, días de estancia hospitalaria, ni factores de riesgo previamente asociados a ECN entre los grupos de estudio. Las sospechas de ECN se presentaron en promedio al día 23 de vida extrauterina, mientras que los casos se presentaron alrededor del día 50. En la Tabla 3, se describen los signos clínicos correspondientes a la clasificación de Bell modificada, que presentaron los neonatos que cursaron con sospecha de ECN o diagnóstico confirmado de ECN. Entre los casos de ECN, los signos clínicos más frecuentes fueron: distensión abdominal (7/7), disminución de peristalsis (5/7), dilatación de asas (7/7 casos) y neumatosis intestinal (5/7), mientras que las sospechas de ECN presentaron signos clínicos aislados.

Tabla 2. Información demográfica y clínica de la población de estudio.					
	Control	Infección	Sospecha ECN	ECN	p
N	10	9	5	7	NA
SDG (media ± SEM)	31 ± 0.46	29 ± 0.61	29 ± 0.69	30 ± 0.80	>0.05
Peso (media ± SEM)	1317 ± 84	1113 ± 97	1222 ± 88	1090 ± 121	>0.05
Talla (media ± SEM)	38.75 ± 0.71	37.56 ± 1	39.00 ± 0.83	37.14 ± 0.98	>0.05
Sexo masculino (%)	40	33.3	40	71.4	>0.05
Perímetro cefálico (media ± SEM)	28 ± 0.47	26 ± 0.72	27 ± 0.73	26 ± 0.88	>0.05
Embarazo único (%)	70	77.8	60	85.7	>0.05
Vía de nacimiento cesárea (%)	90	66.6	80	85.7	>0.05
Apgar 1 min (media ± SEM)	6.1 ± 0.74	3.9 ± 0.73	5.4 ± 0.81	5.1 ± 0.63	>0.05
Apgar 5 min (media ± SEM)	6.1 ± 0.61	8.4 ± 0.27	8.0 ± 0.32	8.0 ± 0.53	0.005 ^a
Días de vida al diagnóstico de sospecha/caso ECN (media ± SEM)	NA	NA	23 ± 6	50 ± 9.8	NA
Defunciones (%)	0	0	0	28.57	NA
Días estancia hospitalaria (media ± SEM)	43 ± 5.6	70 ± 11	62 ± 4.8	50 ± 9.8	>0.05
Uso de antibióticos (%)	60	100	100	100	0.022
Alimentación con fórmula (%)	30	33.3	40	14.3	>0.05
Transfusiones (%)	50	55.5	20	42.8	>0.05
Inhibidor de bomba de protones (%)	30	44.4	16.7	14.3	>0.05
ANTECEDENTES MATERNOS.					
Corioamnionitis (%)	0	22	0	28	>0.05
RPM (%)	20	33.3	40	14.3	>0.05
Infección cervicovaginal (%)	20	0	20	14.3	>0.05
Infección vías urinarias (%)	30	44.4	20	14.3	>0.05

^aControl vs infección, control vs ECN

Tabla 3 Signos clínicos de la clasificación de Bell modificada presentes en los neonatos incluidos en el estudio.

Estadio de Bell	Signos clínicos	Sospechas de ECN					ECN confirmados							
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7	
I	Apnea				X		X	X					X	
	Inestabilidad térmica								X					
	Residuos gástricos	X					X							
	Distensión abdominal	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Hematoquecia		X		X		X	X	X				X	
II	Disminución de peristalsis						X	X		X	X		X	
	Dilatación de asas	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
	Neumatosis intestinal					X	X	X		X	X	X		
	Acidosis metabólica						X		X					
	Gas en vena porta													
III	Hipotensión								X					
	Acidosis respiratoria	X												
	CID*									X				
	Ascitis													
	Neumoperitoneo													
	Compromiso del intestino						X							

*CID: Coagulación Intravascular Diseminada

6.2 Estandarización de la determinación de I-FABP urinaria en neonatos prematuros

Se revisaron reportes en la literatura donde se determinó la concentración de I-FABP en la orina de bebés control, con sepsis, y con ECN, y se encontró que utilizaron el kit de ELISA de I-FABP de la compañía Hycult Biotech, donde siguiendo las instrucciones del fabricante diluyeron las muestras 1:2 (Coufal et al., 2016; Derikx et al., 2007; Evennett et al., 2010). Con estos antecedentes, se procedió a realizar una prueba piloto de determinación de I-FABP con la prueba de ELISA Quantikine FABP2/I-FAPB humano (DFBP20) de R&D Systems analizando dos muestras de orina neonatales diluidas 1:2, 1:4 y 1:10. Como controles del experimento, se incluyeron el punto más alto de la curva de calibración (1000 pg/mL) y el blanco (0 pg/ml) (Figura 8). No obstante, las muestras neonatales probadas mostraron una absorbancia superior al punto más alto de la curva de calibración e incluso algunas presentaron precipitado (Figura 8).

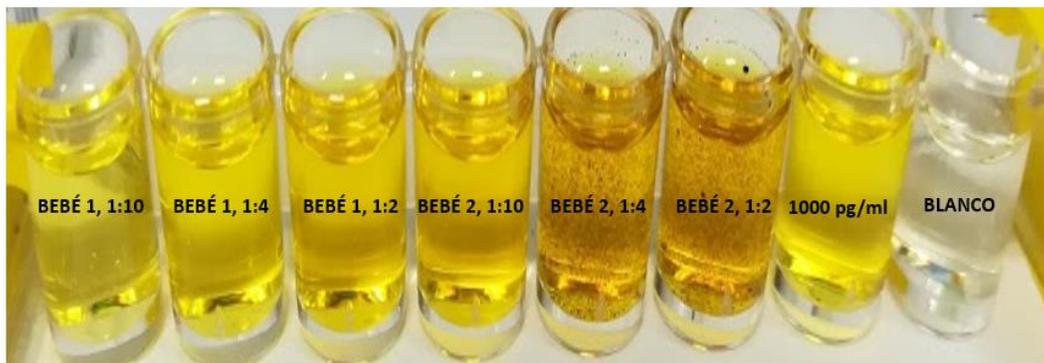


Figura 8. Primera prueba piloto de I-FABP con muestras de orina neonatales diluidas. Se probaron dos muestras de orina neonatales (Bebé 1 y Bebé 2) diluidas 1:2, 1:4 ó 1:10, y se incluyó el punto más alto de la curva de calibración (1000 pg/mL) y el blanco (0 pg/mL). Las diluciones utilizadas fueron insuficientes para cuantificar I-FABP.

Indagando en el manual de la prueba de ELISA de I-FABP humano de R&D Systems, se encontró el reporte de estandarización de la prueba en muestras de orina sin diluir de adultos sanos. Debido a esto, se amplió la búsqueda bibliográfica para averiguar los niveles de I-FABP urinaria en adultos y en neonatos y se encontró que un adulto presenta una concentración de 0.131 microgramos (ug) de I-FABP por gramo (g) de creatinina, mientras que un bebé presenta alrededor de 1 a 5 picogramos (pg) de I-FABP por nanomol (nm) de creatinina. Considerando que el peso molecular de creatinina es de 113.12 g/mol, se estimó que un bebé presenta cientos de veces más I-FABP que un adulto: 8.8-44.2 ug I-FABP/g creatinina.

$$\frac{1 \text{ pg IFABP}}{1 \text{ nmol creatinina}} \times \frac{10^{-6} \text{ ug}}{1 \text{ pg}} \times \frac{10^9 \text{ nmol}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ mol creatinina}}{113.12 \text{ g creatinina}} = 8.8 \frac{\text{ug IFABP}}{\text{g creatinina}}$$

$$\frac{5 \text{ pg IFABP}}{1 \text{ nmol creatinina}} \times \frac{10^{-6} \text{ ug}}{1 \text{ pg}} \times \frac{10^9 \text{ nmol}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1 \text{ mol creatinina}}{113.12 \text{ g creatinina}} = 44.2 \frac{\text{ug IFABP}}{\text{g creatinina}}$$

Por lo que, se decidió realizar una prueba piloto analizando un par de muestras de orina neonatales diluidas 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 y muestras de adulto sin diluir. Además, se incluyó en la prueba, una muestra de orina de un niño de 5 años, y para probar la estabilidad de I-FABP se analizó una muestra de adulto con y sin un ciclo de congelación/descongelación. Como se muestra en la Figura 9, se logró cuantificar I-FABP en muestras de orina neonatales al diluirlas al menos 40 veces, no se detectó I-FABP en la muestra infantil diluida, y se identificaron niveles variables de la proteína en las muestras de adulto sin diluir. Analizando la densidad óptica de las muestras de orina neonatales diluidas, se observó que diluciones superiores a 1:80 mostraban valores muy similares a los del punto más bajo de la curva de calibración (15.6 pg/ml), por lo que para poder garantizar que los valores de las muestras estuvieran dentro de la curva estándar, se emplearon diluciones 1:40 o 1:80, y únicamente se emplearían mayores diluciones cuando las muestras salieran de la curva estándar.

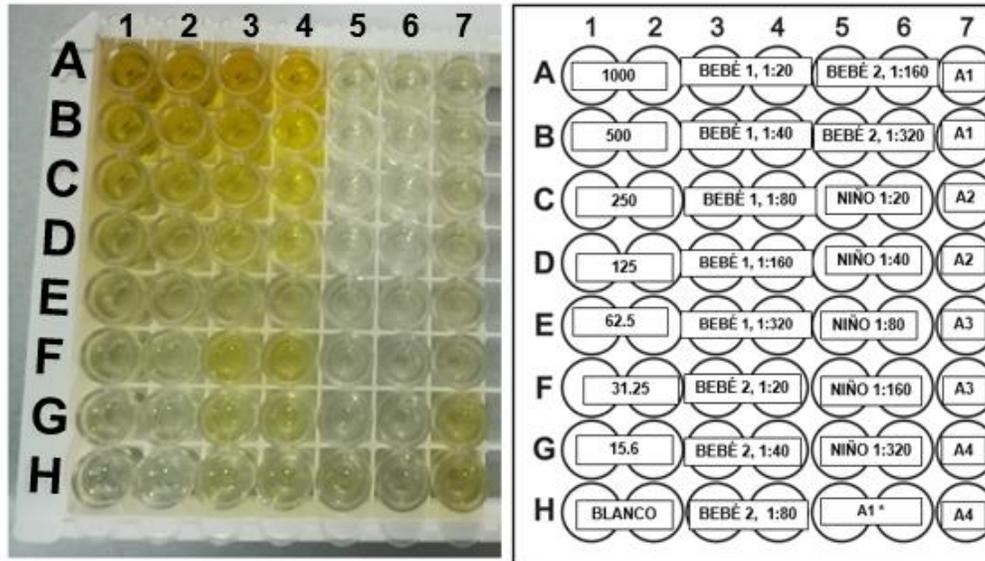


Figura 9. Segunda prueba piloto de I-FABP con muestras de orina neonatales diluidas. Se analizó la concentración de I-FABP en dos muestras de orina neonatales (Bebé 1 y Bebé 2) y una muestra infantil (Niño) diluidas 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320, y en cuatro muestras de orina de adulto sin diluir (A1-A4). La muestra A1* corresponde a la muestra A1 que fue congelada y analizada después de un ciclo de descongelación. La curva de calibración y las muestras fueron probadas por duplicado.

Para confirmar la dilución adecuada para analizar I-FABP en muestras de orina neonatales, se realizó una última prueba piloto donde se probaron 4 muestras de orina de bebés prematuros, elegidas al azar y diluidas 1:40 y 1:80. Los resultados mostraron que la dilución ideal (que asegura la linealidad del método) para cuantificar I-FABP en orina de neonatos con la prueba de ELISA Quantikine I-FABP humano (DFBP20) de R&D Systems era 1:80, aunque en algunos casos sería necesario emplear mayores diluciones (Figura 10).

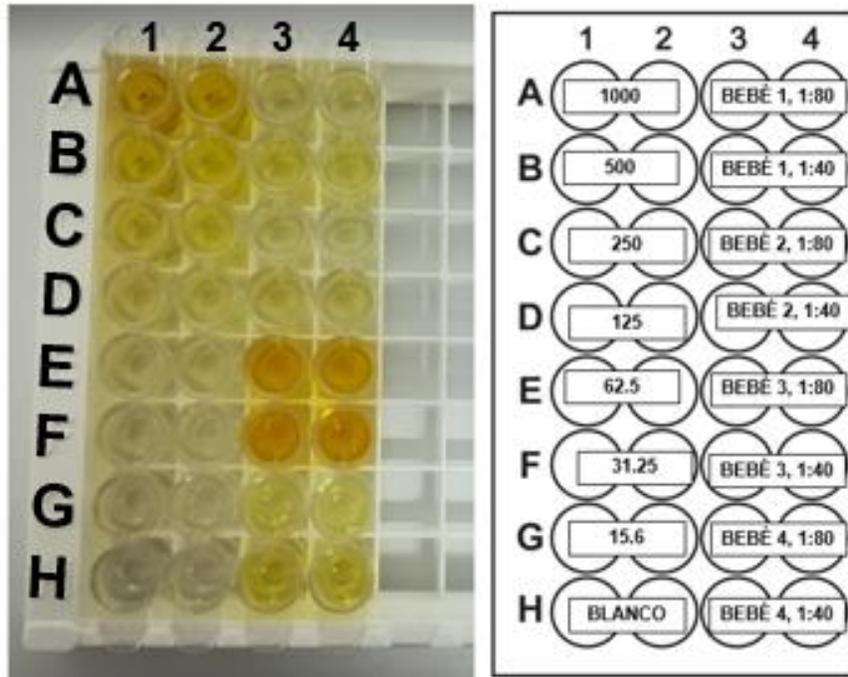


Figura 10. Tercera prueba piloto de I-FABP con muestras de orina neonatales diluidas. Se analizó la concentración de I-FABP en cuatro muestras de orina neonatales elegidas al azar (Bebé 1-Bebé 4) diluidas 1:40 y 1:80. La curva de calibración y las muestras fueron probadas por duplicado. Los valores de I-FABP del bebé 3 salieron de la curva de calibración.

6.3 Determinación de I-FABP urinaria en neonatos prematuros

Una vez estandarizada la prueba de I-FABP urinaria, se procedió a analizar las concentraciones de la proteína en las muestras de orina diluidas 1:80 de nuestros individuos de estudio. Se analizaron dos periodos de tiempo, los días cercanos al nacimiento (entre los días de vida extrauterina 1 y 3), y días previos a la presentación de la enfermedad (en promedio 10 días). Los casos de infección probados se eligieron de acuerdo con las enfermedades que comúnmente afectan a los neonatos en los días de vida extrauterina que analizamos. Así, para las determinaciones al nacimiento se eligieron casos de sepsis temprana, mientras que para el análisis previo al desarrollo de ECN, se seleccionaron casos de sepsis tardía y neumonía. Cabe mencionar que 2 sospechas de ECN y 3 casos de ECN ocurrieron en un periodo de 2 semanas hacia el final del estudio, cuando ya no se

contaba con pruebas de ELISA para determinar I-FABP, por lo que únicamente se pudo analizar en estos neonatos la concentración de citocinas en heces.

Los bebés que desarrollaron ECN presentaron mayor concentración de I-FABP urinaria entre los días 1 y 3 de vida extrauterina con respecto a los controles, y mostraron tendencia a valores superiores de I-FABP en comparación con los neonatos con sepsis temprana y los que presentaron sospecha de ECN (Figura 11A y Tabla 4). Siguiendo este comportamiento, los bebés con ECN confirmada presentaron una tendencia a mostrar mayores niveles de I-FABP urinaria diez días antes del diagnóstico de la enfermedad, con respecto a los controles, y los neonatos que desarrollaron sepsis tardía y/o neumonía (Figura 11B y Tabla 4). Cabe resaltar que, fue necesario analizar varias veces algunas muestras de neonatos con ECN, empleando diluciones 1:160, 1:400 y 1:800. Incluso, una muestra de orina neonatal tomada el día que presentó perforación intestinal asociada a ECN, salió de la curva de calibración aún empleando una dilución 1:800. De manera que, como se ha descrito en la literatura, la concentración urinaria de I-FABP es un marcador específico de ECN y sus niveles correlacionan con la severidad de la enfermedad. De manera importante, este trabajo sugiere que durante la primera semana de vida extrauterina es posible predecir aquellos neonatos en riesgo de desarrollar ECN.

Tabla 4. Niveles de I-FABP urinaria en neonatos prematuros					
	Concentración en pg I-FABP/picomoles creatinina (media±SEM)				
Periodo	Ctrl	Inf	Sosp	ECN	P
Nacimiento	0.57 ± 0.15	1.2 ± 0.33	1.1 ± 0.82	3.4 ± 1.4	0.046*
Previo a ECN	1.0 ± 0.35	1.5 ± 0.56	3.3 ± 2.4	5.2 ± 4.5	>0.05

*Control vs ECN

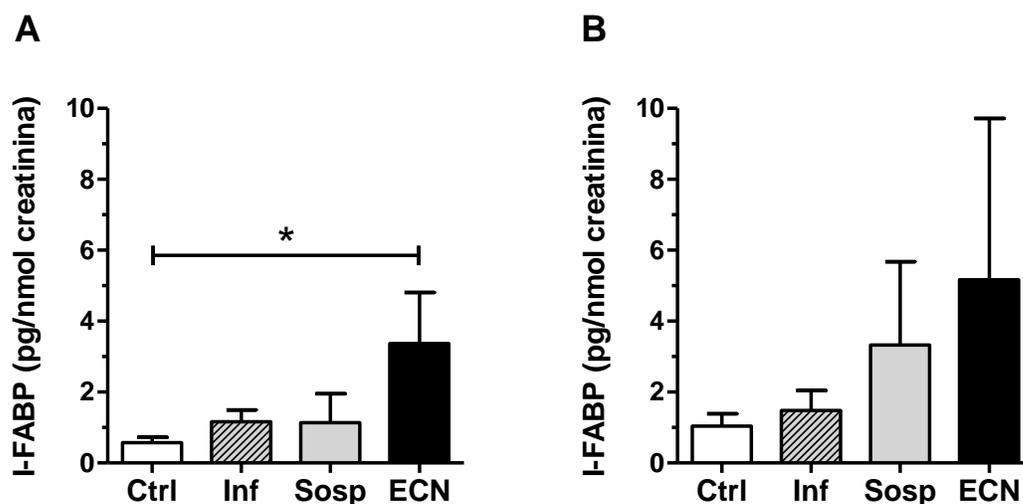


Figura 11. Concentración de I-FABP urinaria en neonatos prematuros como herramienta diagnóstica de enterocolitis necrosante. Se analizó la concentración de I-FABP mediante ELISA en muestras de orina recolectadas entre los días de vida extrauterina 1 y 3 (A) y 10 días previos a la presentación de ECN (B) en neonatos sin infección y sin ECN (Ctrl, n=5-8), con sepsis/neumonía (Inf, n=4), con sospecha de ECN (Sosp, n=3), y con ECN (ECN, n=4). Se presenta la media \pm SEM. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía con post-test de Tukey. * $p < 0.05$. Donde se observa que I-FABP puede ser un potencial marcador temprano no invasivo de ECN desde los primeros días de vida extrauterina, y sugiere que los bebés propensos a desarrollar la patología mantendrán una tendencia a una elevación de esta proteína. La advertencia al personal de salud de que un bebé predisponga al desarrollo de la enfermedad supondría un gigantesco paso para erradicar factores de riesgo que favorezcan el desarrollo de la misma o la redirección mediante medidas terapéuticas para un mejor desenlace del prematuro.

6.4 Niveles de citocinas en sobrenadantes de heces de neonatos prematuros

En la búsqueda de marcadores adicionales de daño al intestino específicos de ECN, se evaluaron las concentraciones de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en los sobrenadantes de heces de neonatos prematuros mediante el inmunoensayo de CBA (Tabla 5 y Figura 12). Las muestras de heces recolectadas correspondieron a: 1) ocho días previos a los diagnósticos de sospecha de ECN y ECN confirmada, 2) doce días previos al diagnóstico de sepsis tardía o neumonía, y que alrededor de 3 días antes presentaban picos febriles, y 3) alrededor de los 30 días de vida

extrauterina para los controles. Los casos de infección y sospecha de ECN mostraron tendencia a presentar niveles elevados de IL-1 β en comparación con los casos de ECN y los controles quienes mostraron niveles comparables entre si (Figura 12A). La citocina inflamatoria IL-8 fue la única que mostró un patrón que sugiere que podría distinguir los casos de ECN, ya que los bebés que desarrollaron la enfermedad presentaron niveles elevados de la citocina con respecto a las sospechas de ECN, los casos de infección y los controles (Figura 12B). En cuanto al resto de las citocinas probadas, se observó una tendencia a mayores niveles de TNF α , IL-12p70, IL-6 e IL-10 en los neonatos con sospecha de ECN y casos confirmados de ECN con respecto a los controles y los neonatos con infección (Figura 12C-F).

Tabla 5 Niveles de citocinas en heces de neonatos prematuros					
Concentración en pg/ml (media \pm SEM)					
Citocina	Ctrl	Inf	Sosp	ECN	P
IL-1 β	31.56 \pm 4.3	136 \pm 117.2	259.6 \pm 190	33.49 \pm 11.62	>0.05
IL-8	8.4 \pm 1.3	8.6 \pm 0.3	21.6 \pm 4	66.07 \pm 42.78	>0.05
IL-12p70	8.5 \pm 1.9	7.7 \pm 0.6	12.3 \pm 2.4	14.65 \pm 2.05	>0.05
TNF	7.5 \pm 1.4	8.8 \pm 2.4	16 \pm 2.7	12 \pm 1.6	>0.05
IL-10	6.5 \pm 0	6.5 \pm 0	9.2 \pm 1.6	10 \pm 1.5	>0.05
IL-6	9.2 \pm 1.7	8 \pm 0.5	13.5 \pm 2.6	13.3 \pm 1.7	>0.05

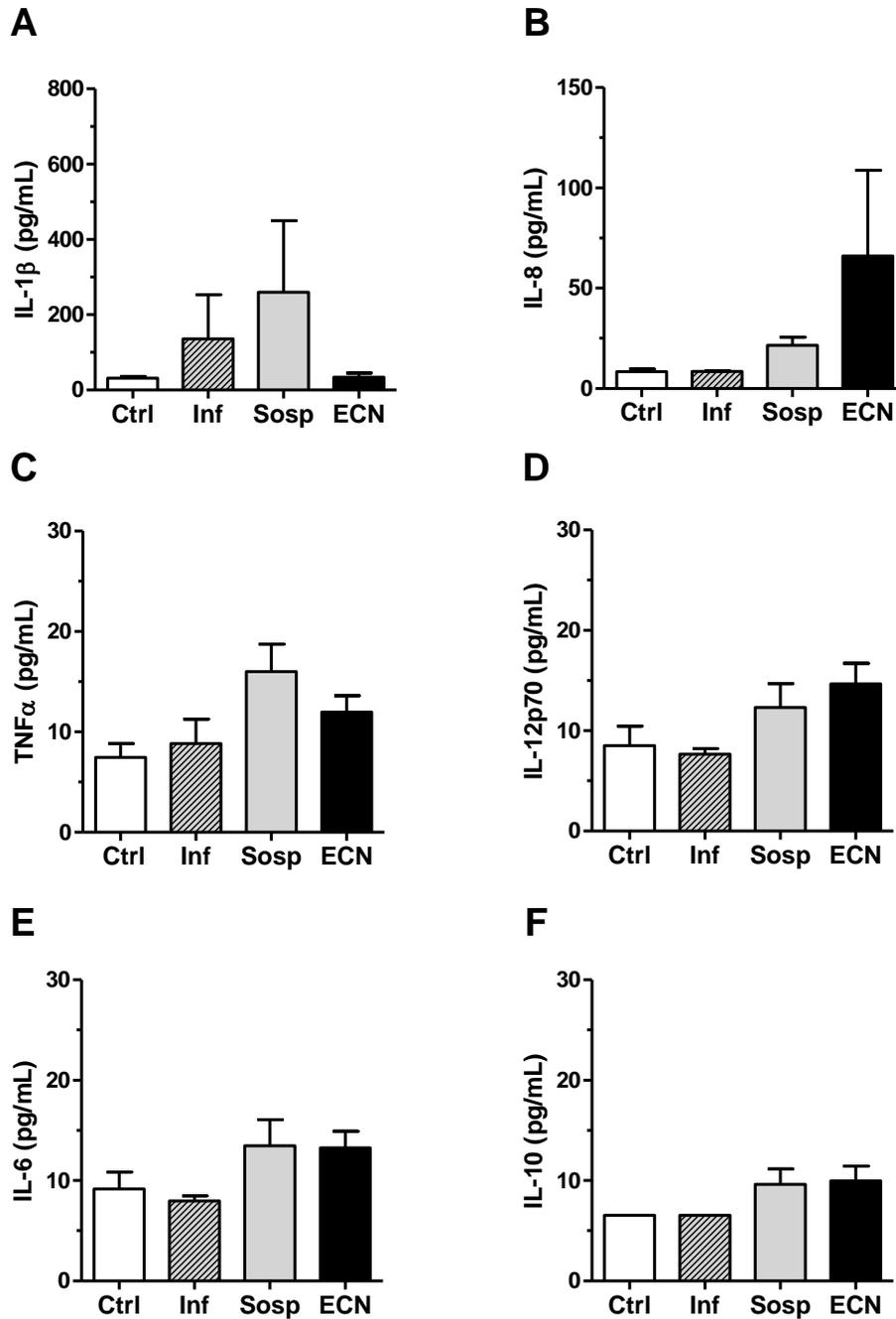


Figura 12. Niveles de citocinas en heces de neonatos prematuros. Se analizó la concentración de IL-1 β (A), IL-8 (B), TNF α (C), IL-12p70 (D), IL-6 (E) e IL-10 (F) en los sobrenadantes de heces de neonatos control (Ctrl, n=5), con sepsis o neumonía (Inf, n=4), con sospecha de ECN (Sosp, n=3), y con ECN confirmada (ECN, n=7) mediante el ensayo CBA. Se muestra la media \pm SEM. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía con post-test de Tukey. Una $p < 0.05$ fue considerada significativa. Donde se observa que la única citocina prometedora a ser un potencial biomarcador temprano de ECN para la predicción oportuna de la enfermedad de manera no invasiva es IL-8.

7. DISCUSIÓN

Gracias a diferentes estudios se ha comprendido mejor la etiología de ECN, sin embargo, aún existen incógnitas, lo cual representa un reto para la clínica al momento del diagnóstico, limitando el uso de las mejores estrategias terapéuticas (por ejemplo: elección de antibióticos, necesidad de intervención quirúrgica, etc.). Una mejor comprensión sobre los mecanismos de inicio y desarrollo de ECN, así como el descubrimiento de biomarcadores de la enfermedad que condujeran a su diagnóstico oportuno, podrían lograr reducir las cifras de morbilidad y mortalidad, y evitar las secuelas de la enfermedad (C., R., M., V., & J., 2009; Cho et al., 2016; Denning & Prince, 2018; P. C. Ng, Ma, & Lam, 2015; Sylvester & Moss, 2015).

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la utilidad de I-FABP urinaria y citocinas fecales como herramientas para el diagnóstico oportuno y no invasivo de ECN en neonatos prematuros.

Dentro de los factores de riesgo asociados a ECN los más consistentes han sido la prematuridad, la baja edad gestacional, y el bajo peso al nacimiento. Nuestra población de estudio comprendió bebés con estas características (≤ 32 SDG, ≤ 1500 g al nacimiento), y no mostró diferencias significativas en las SDG y peso al nacimiento entre los grupos de neonatos con sospecha de ECN, ECN confirmada, infección y controles. No obstante, apreciamos que los bebés que desarrollaron ECN tendieron a presentar un menor peso al nacimiento con respecto a los otros grupos. Algunos otros factores asociados a ECN comprenden puntuaciones bajas de Apgar, transfusiones de concentrados eritrocitarios (CE), antecedentes infecciosos maternos (corioamnionitis, RPM), uso de medicamentos (por ejemplo: antibióticos e inhibidores de la bomba de protones), y alimentación con fórmula (Been et al., 2013; Denning & Prince, 2018, Alexander et al., 2011; Bokulich et al., 2016; Cotten et al., 2009; Hay, Zupancic, Flannery, Kirpalani, & Dukhovny, 2017). Aunque existen controversias, ya que también se ha reportado la falta de asociación de algunos de estos factores con ECN (Ahle et al., 2018). Nuestro análisis no mostró la asociación de ECN con ninguno de estos factores de riesgo pero nuestros

resultados aún no son concluyentes porque el tamaño de muestra de nuestros grupos de estudio es pequeño. El Apgar al minuto 1 tendió a ser menor en los grupos de infección, sospecha y casos confirmados de ECN con respecto a los controles, pero se observó que para el minuto 5, estos grupos de neonatos se recuperaron e incluso mostraron un puntaje superior al de los controles. Alrededor de un 40-50% de los neonatos controles, con ECN confirmada y con infección, y un 20% de los bebés con sospecha de ECN, requirieron la transfusión de CE. Los antecedentes infecciosos maternos (RPM, corioamnionitis, infección vaginal o de vías urinarias), tampoco estuvieron asociados a un mayor riesgo de ECN, de hecho, en el grupo de ECN algunas de estas afecciones tendieron a presentarse en un menor porcentaje con respecto a los otros grupos. El 100% de los neonatos de los grupos de infección, sospechas y casos de ECN, y un 60% de los neonatos controles recibieron tratamiento con antibióticos. En el caso de los controles, el tratamiento con antibióticos fue indicado por riesgo de sepsis, neumonía o picos febriles, pero cabe aclarar que las muestras de orina y heces empleadas como controles para las pruebas de I-FABP y citocinas fueron tomadas en periodos de tiempo donde estas afecciones no estuvieron presentes.

Actualmente el diagnóstico de la patología sigue siendo a través de los signos clínicos, hallazgos de laboratorio y radiografías de acuerdo con la clasificación de Bell modificada (C. et al., 2009) pero en la mayoría de los casos es demasiado tardío empeorando el panorama para el bebé. La presentación clínica de ECN comienza de forma inespecífica, con signos de intolerancia alimentaria (distensión abdominal, residuos gástricos) o sepsis (apneas, bradicardia, letargo, inestabilidad térmica, etc.) (Walsh & Kliegman, 1986). Ante la presentación de distensión abdominal y hematoquecia, se suele colocar al paciente en ayuno y realizar estudios radiológicos para confirmar la enfermedad mediante neumatosis intestinal, ascitis, neumoperitoneo y presencia de gas venoso portal (Cho et al., 2016; Walsh & Kliegman, 1986). Algunos de nuestros neonatos con sospecha de ECN presentaron distensión abdominal, dilatación de asas e inclusive hematoquecia. Sin embargo, ante la ausencia de más signos clínicos agregados, y una favorable evolución en

respuesta al tratamiento (ayuno o antibióticos), los pacientes se mantuvieron en el estadio I (sospecha), al perfilar con un diagnóstico compatible con intolerancia alimentaria, la cual es habitual en bebés de muy bajo peso al nacer (Walsh & Kliegman, 1986). Ahora bien, la mayoría de nuestros casos confirmados de ECN presentaron distensión abdominal, hematoquecia, peristalsis disminuida, dilatación de asas, neumatosis intestinal y en los casos más graves acidosis metabólica y respiratoria, CID, y compromiso del intestino y se ubicaron en los estadios II o III de la clasificación de Bell (Walsh & Kliegman, 1986). Recientemente, se ha propuesto la ecografía Doppler como una herramienta auxiliar en el diagnóstico de ECN, permitiendo corroborar signos clínicos clásicos de la enfermedad ante la presencia de radiografías no concluyentes, y presentando la ventaja de que al no utilizar radiación no pone en riesgo la salud neonatal (C. et al., 2009).

Un biomarcador es un indicador molecular de una propiedad biológica específica, que permite medir el estado de salud, e identificar el inicio y desarrollo de una enfermedad (V., 2012). En patologías como ECN, donde la enfermedad inicia de forma local en un tejido inaccesible (el intestino), sin necesidad de intervenciones quirúrgicas, pueden realizarse mediciones de marcadores biológicos en muestras más accesibles como sangre periférica, suero, plasma, fluido cerebroespinal, orina y heces, siendo estas últimas dos muestras preferidas al ser obtenidas de manera no invasiva (C. et al., 2009; P. C. Ng et al., 2015; Sylvester & Moss, 2015). Para tener un mejor juicio sobre la presentación, desarrollo o desenlace de la enfermedad, es aconsejable basar el diagnóstico en un conjunto de biomarcadores. Entre estos, al menos uno debe ser altamente específico, es decir, estar restringido al órgano o proceso de interés, y los otros pueden encontrarse río abajo implicados en la fisiopatología de la enfermedad. En nuestro estudio apostamos por I-FABP urinaria, y por las citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNF α) en heces, ya que se conocía su implicación en el desarrollo de ECN. Decidimos analizar la presencia de citocinas en heces, ya que además de tratarse de una muestra obtenida de manera no invasiva permite medir la inflamación producida de manera local en el intestino (C. et al., 2009; P. C. Ng et al., 2015; Sylvester & Moss, 2015).

El desarrollo de ECN es sostenido por la interacción de dos sistemas mal desarrollados: sistema gastrointestinal e inmunológico (Cho et al., 2016). Considerando la teoría multifactorial, que apoya que diversos factores pre- y posnatales proporcionan las condiciones necesarias para el daño a la mucosa intestinal (misma que ya es susceptible por inmadurez de funciones), acto que a su vez genera una translocación bacteriana provocando así una confrontación entre el sistema inmune del prematuro y las bacterias, toxinas y antígenos. Si este enfrentamiento se sale de control puede desencadenar una reacción inflamatoria severa que puede promover la muerte celular del tejido y por consiguiente la liberación de componentes intracelulares como I-FABP (Cho et al., 2016; Denning & Prince, 2018). Los enterocitos resguardan I-FABP en su citoplasma, la cual es liberada a circulación tras la lesión y muerte de estos, indicando así un daño celular a nivel intestinal cuando se encuentra en concentraciones elevadas (Coufal et al., 2016).

Algunos estudios han medido las concentraciones plasmáticas de I-FABP en neonatos prematuros sanos y con ECN, encontrado que I-FABP sérica puede distinguir entre ambas poblaciones e inclusive entre bebés con cuadros de sepsis, asociando además los niveles de la proteína con la severidad del daño intestinal (Aydemir et al., 2011; C. et al., 2009; Coufal et al., 2016; Heida et al., 2015; Thuijls et al., 2010; Vega, 2017).

I-FABP tiene una característica que juega a nuestro favor, su pequeño tamaño molecular (14-15 kDa), mismo que le permite pasar a través del riñón y ser excretada en orina, aportando así una forma no invasiva de medirla (Coufal et al., 2016). Diversos estudios han reportado la utilidad de I-FABP urinaria como marcador específico de ECN permitiendo distinguir entre recién nacidos sanos y con sepsis, y correlacionando además los niveles de la proteína con el grado de severidad de la enfermedad (Coufal et al., 2016; Derikx et al., 2007; Evennett et al., 2010; Gregory et al., 2014; Reisinger et al., 2014; Vega, 2017). Además, Coufal y

colaboradores, encontraron que I-FABP urinaria empleada en conjunto con técnicas de imagenología como los rayos X, permitían alcanzar una sensibilidad del 91% en el diagnóstico de la patología.

Una aportación importante de nuestro estudio es que realizamos la determinación de I-FABP entre los días 1 y 3 de vida extrauterina, lo cual no ha sido reportado previamente en la literatura, y encontramos que los bebés que desarrollaron ECN mostraron niveles elevados de la proteína al nacimiento en comparación con los controles. Esto es bastante relevante, ya que, de corroborarse nuestros resultados en estudios con un mayor tamaño de muestra, se podría identificar desde el nacimiento a los neonatos con señal de alarma de pérdida de la integridad de la mucosa intestinal, e implementar un monitoreo más cercano de salud neonatal, procurando evitar en lo posible factores de riesgo que pudieran desencadenar la enfermedad. En un estudio realizado por Gregory y colaboradores se encontró que I-FABP comienza a incrementarse hasta siete días antes de la presentación de ECN, y alcanza un mayor grado de acierto para el diagnóstico tres días previos al desarrollo de la enfermedad. Nosotros encontramos una tendencia a mayores niveles de I-FABP urinaria en los casos de ECN diez días previos al diagnóstico de la enfermedad. Por otra parte, es fundamental señalar que es importante normalizar I-FABP con la concentración de creatinina urinaria debido a las fluctuaciones de la proteína debidas a diferentes estados de hidratación (dilución de orina) de los pacientes que pueden variar significativamente con la tasa de filtración glomerular (P. C. Ng et al., 2015; Sylvester & Moss, 2015).

Por otro lado, de forma paralela al daño de la mucosa intestinal, donde se está liberando el contenido de las células (proteínas, citocinas y quimiocinas, etc.), el sistema inmune está respondiendo a la translocación bacteriana de forma violenta y excesiva, misma que supera los mecanismos de compensación, eventos que predisponen y conducen a la presentación de ECN (Cho et al., 2016). La inmunidad innata y adaptativa intestinal del prematuro tienen un desequilibrio en los mecanismos de defensa. Se piensa que esta población nace con una inmunidad

adaptativa poco desarrollada, que es compensada mediante la inmunidad pasiva provista por la madre (calostro, leche materna, transferencia de IgG a través de la placenta), misma que puede verse comprometida cuando la madre no puede alimentar a su hijo y se requiere el uso de fórmula (Denning & Prince, 2018). Como respuesta al ingreso de bacterias, toxinas y antígenos; la respuesta innata comienza con una respuesta inflamatoria excesiva mediada por receptores de reconocimiento de patrones proinflamatorios como TLR4, reclutando células fagocíticas e iniciando el procesamiento de antígenos, así como la producción y liberación de mediadores de inflamación, citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α) y anti-inflamatorias (IL-10), radicales libres de oxígeno, peróxidos, ácido nítrico, leucotrienos, PAF, prostaglandinas, factores de transcripción, etc.(C. et al., 2009; Cho et al., 2016; Denning & Prince, 2018). El intestino en desarrollo de un neonato expresa muchas citocinas inflamatorias a niveles mucho más altos que en el intestino adulto. Estas citocinas se originan en los enterocitos y macrófagos, que expresan altos niveles de varios receptores de respuesta innata y reguladores de la transcripción (NF- κ B y AP-1) (Neu & Pammi, 2017).

En estudios previos se habían medido las concentraciones de IL-1 β (Neu & Pammi, 2017), IL-8 (Neu & Pammi, 2017), IL-6 (Harris et al., 1994), TNF α (Neu & Pammi, 2017), IL-12 (Halpern, 2002) e IL-10 (Cho et al., 2016) en muestras séricas, plasmáticas y tejido de resección intestinal encontrado concentraciones más altas en bebés que desarrollaron ECN con respecto a los controles. Sin embargo, otros estudios no han encontrado aumento significativo de las mismas (Cho et al., 2016; Harris et al., 1994; Neu & Pammi, 2017).

Nuestro interés era realizar la determinación de estas citocinas en heces para evaluar si podían fungir como marcadores de daño local al intestino. Dada la naturaleza inflamatoria de ECN, esperábamos encontrar un aumento de citocinas inflamatorias en los neonatos que desarrollaron la enfermedad con respecto a los otros tres grupos de estudio (sospechas de ECN, infección y controles). No obstante, solo IL-8 mostró una tendencia a ser un potencial marcador específico de

ECN, mostrando niveles más altos de la citocina en los casos de ECN con respecto al resto de los grupos. La IL-8, tiene como principal función reclutar neutrófilos al sitio de inflamación y promete tener un potencial importante como marcador para el diagnóstico de ECN (Cho et al., 2016; Neu & Pammi, 2017). El resto de las citocinas probadas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 y TNF α) no permitieron distinguir los neonatos con sospecha de ECN de aquellos con enfermedad confirmada, aunque en general mostraron una tendencia a estar más elevadas en estos grupos de estudio con respecto a los casos de infección y los controles.

8. CONCLUSIONES

Se aplicaron criterios de inclusión y exclusión para seleccionar los neonatos prematuros que entraron en el estudio, con el fin de recolectar sus muestras de orina y heces durante su estancia hospitalaria.

Se establecieron cuatro grupos de estudio: casos de ECN, sospechas de ECN, casos de infección y controles mediante la generación de una base de datos.

Se determinó la concentración de I-FABP urinaria como biomarcador específico de daño a la mucosa intestinal en los grupos de estudio encontrando que puede ser un prometedor marcador biológico temprano no invasivo para el diagnóstico de ECN incluso desde días cercanos al nacimiento.

Se cuantificaron citocinas fecales, detectando que por el momento con nuestros resultados preliminares: IL-1 β , IL-12p70, IL-6 e IL-10 no demuestran utilidad en el diagnóstico oportuno de ECN. No obstante IL-8 fecal, puede llegar a ser un potencial biomarcador temprano de ECN, para la predicción de la enfermedad de manera no invasiva.

En tanto no se corroboren los resultados de esta investigación, o surjan otros biomarcadores que demuestren utilidad en el diagnóstico oportuno y no invasivo de la enfermedad, el estándar de oro continuará siendo a través de la clasificación de Bell modificada basada en signos clínicos, datos de laboratorio, y radiografías de rayos X en etapas avanzadas que demuestren neumatosis intestinal, neumoperitoneo y gas en la vena porta.

9. PERSPECTIVAS

En este trabajo se evaluó I-FABP urinaria y citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en heces como herramientas para el diagnóstico temprano no invasivo de ECN. Para tales fines, se estandarizó la prueba de determinación de I-FABP urinaria en muestras neonatales mediante ELISA, y la metodología de extracción de sobrenadantes de heces para la determinación de citocinas mediante CBA. Nuestros resultados sugieren que I-FABP urinaria al nacimiento e IL-8 fecal ocho días previos al diagnóstico de ECN, se perfilan como marcadores potenciales de la enfermedad. Por ello, las perspectivas de este estudio son:

- ❖ Incrementar el tamaño de muestra de los diversos grupos de estudio para confirmar si I-FABP urinaria e IL-8 fecal realmente pueden ser empleados como marcadores específicos de ECN.
- ❖ Si incrementado el número de réplicas, el resultado es favorable para el diagnóstico de ECN por medio de estas proteínas, se podrían realizar estudios más detallados para definir con mayor precisión con cuanto tiempo de antelación se puede predecir la enfermedad. Proponemos concentrarse en muestras de tres, siete y diez días previos a la manifestación de la enfermedad con la intención de determinar si cuando empiezan los signos y síntomas inespecíficos (intolerancia a la alimentación, vómito o distensión abdominal) que pudieran sugerir la patología, ya se puede detectar o descartar.
- ❖ Analizar I-FABP urinaria y citocinas fecales en muestras de neonatos de cada uno de los estadios de la clasificación de Bell modificada (sospechas y casos confirmados de ECN, ECN avanzada y perforación intestinal), incluyendo casos de infección (sepsis temprana y tardía, neumonía, neonatos con picos febriles) y controles, con la finalidad de establecer los puntos de corte de las concentraciones de estas proteínas mediante curvas ROC o árboles de decisión, para estadificar y/o advertir el alcance de la enfermedad mediante estas proteínas.

10.REFERENCIAS

- Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S. (2004). *Inmunología celular y molecular*. (Sanunders-Elsevier, Ed.) (5° Ed).
- Ahle, M., Drott, P., Elfvin, A., & Andersson, R. E. (2018). Maternal, fetal and perinatal factors associated with necrotizing enterocolitis in Sweden. A national case-control study. *PLoS ONE*, 13(3), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194352>
- Alexander, V. N., Northrup, V., & Bizzarro, M. J. (2011). Antibiotic exposure in the newborn intensive care unit and the risk of necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatrics*, 159(3), 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.02.035>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Been, J. V., Lievens, S., Zimmermann, L. J. I., Kramer, B. W., & Wolfs, T. G. A. M. (2013). Chorioamnionitis as a risk factor for necrotizing enterocolitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Pediatrics*, 162(2), 236–242.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.07.012>
- Cho, S. X., Berger, P. J., Nold-Petry, C. A., & Nold, M. F. (2016). The immunological landscape in necrotising enterocolitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 18(May), 1–17. <https://doi.org/10.1017/erm.2016.13>
- Choi, Y. Y. (2014). Necrotizing enterocolitis in newborns: Update in pathophysiology and newly emerging therapeutic strategies. *Korean Journal of Pediatrics*, 57(12), 505–513. <https://doi.org/10.3345/kjp.2014.57.12.505>
- Cotten, C. M., Taylor, S., Stoll, B., Goldberg, R. N., Hansen, N. I., Sanchez, P. J., ... Benjamin, D. K. (2009). Prolonged Duration of Initial Empirical Antibiotic Treatment Is Associated With Increased Rates of Necrotizing Enterocolitis and Death for Extremely Low Birth Weight Infants. *Pediatrics*, 123(1), 58–66. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-3423>
- Coufal, S., Kokesova, A., Tlaskalova-Hogenova, H., Snajdauf, J., Rygl, M., & Kverka, M. (2016). Urinary intestinal fatty acid-binding protein can distinguish necrotizing enterocolitis from sepsis in early stage of the disease. *Journal of*

- Immunology Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5727312>
- Denning, N.-L., & Prince, J. M. (2018). Neonatal intestinal dysbiosis in necrotizing enterocolitis. *Molecular Medicine*, 24(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0002-0>
- Derikx, J. P. M., Evennett, N. J., Degraeuwe, P. L. J., Mulder, T. L., Van Bijnen, A. A., Van Heurn, L. W. E., ... Heineman, E. (2007). Urine based detection of intestinal mucosal cell damage in neonates with suspected necrotising enterocolitis [4]. *Gut*, 56(10), 1473–1475. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.128934>
- Elshal, M. F., & McCoy, J. P. (2006). Multiplex bead array assays: Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*, 38(4), 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.11.010>
- Evennett, N. J., Hall, N. J., Pierro, A., & Eaton, S. (2010). Urinary intestinal fatty acid-binding protein concentration predicts extent of disease in necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery*, 45(4), 735–740. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2009.09.024>
- Fernández Jiménez, I., & De las Cuevas Terán, I. (2009). Protocolos de Neonatología. Enterocolitis necrotizante neonatal. *Bol Pediatr*, 46, 172–178. Retrieved from http://www.sccalp.org/boletin/46_supl1/BolPediatr2006_46_supl1_172-178.pdf
- Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Revista Médica Integral*, 39(2), 47–88. <https://doi.org/0210-9433>
- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), 1–3. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>
- Gasque-Góngora, J. J. (2015). Revisión y actualización de enterocolitis necrosante. *Revista Mexicana de Pediatría*, 82(5), 175–185.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. y Kuby, J. (2004). *Kuby Inmunología*. (M. G. Hill, Ed.) (5ª ed).
- Gregory, K. E., Winston, A. B., Yamamoto, H. S., Dawood, H. Y., Fashemi, T., Fichorova, R. N., & Van Marter, L. J. (2014). Urinary intestinal fatty acid binding

- protein predicts necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatrics*, 164(6), 1486–1488. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.01.057>
- Han, C. Q., & Wei, X. Y. (2017). Novel biomarkers to determine neonates with necrotizing enterocolitis. *Biomedical Research (India)*, 28(13), 6002–6006.
- Haque, K. (2016). Necrotizing enterocolitis - Some things old and some things new: A comprehensive review. *Journal of Clinical Neonatology*, 5(2), 79. <https://doi.org/10.4103/2249-4847.179877>
- Holman, R. C., Stoll, B. J., Clarke, M. J., & Glass, R. I. (1997). The epidemiology of necrotizing enterocolitis infant mortality in the United States. *American Journal of Public Health*, 87(12), 2026–2031. <https://doi.org/10.2105/AJPH.87.12.2026>
- Hong, C. R., Han, S. M., & Jaksic, T. (2018). Surgical considerations for neonates with necrotizing enterocolitis. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2018.08.007>
- INPer. (2017). La Prematurez en México, el gran reto. Retrieved from <http://www.inper.mx/noticias/2015/060-2015/>
- Maranduba, C. M. D. C., De Castro, S. B. R., Souza, G. T. De, Rossato, C., Da Guia, F. C., Valente, M. A. S., ... Silva, F. D. S. (2015). Intestinal microbiota as modulators of the immune system and neuroimmune system: Impact on the host health and homeostasis. *Journal of Immunology Research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/931574>
- Morgan, E., Varro, R., Sepulveda, H., Ember, J. A., Apgar, J., Wilson, J., ... Gaur, A. (2004). Cytometric bead array: A multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clinical Immunology*, 110(3), 252–266. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2003.11.017>
- Moschopoulos, C., Kratimenos, P., Koutroulis, I., Shah, B. V., Mowes, A., & Bhandari, V. (2018). The Neurodevelopmental Perspective of Surgical Necrotizing Enterocolitis: The Role of the Gut-Brain Axis. *Mediators of Inflammation*, 2018, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/7456857>
- Neu, J., & Pammi, M. (2017). Pathogenesis of NEC: Impact of an altered intestinal microbiome. *Seminars in Perinatology*, 41(1), 29–35. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2016.09.015>

- Ng, E. W. Y., Poon, T. C. W., Lam, H. S., Cheung, H. M., Ma, T. P. Y., Chan, K. Y. Y., ... Ng, P. C. (2013). Gut-associated biomarkers L-FABP, I-FABP, and TFF3 and LIT score for diagnosis of surgical necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Annals of Surgery*, 258(6), 1111–1118. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318288ea96>
- Ng, P. C. (2014). Biomarkers of necrotising enterocolitis. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 19(1), 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2013.09.002>
- OMS. (2015). ¿Qué es un niño prematuro? Retrieved from https://www.who.int/features/qa/preterm_babies/es/
- OMS. (2018). Nacimientos prematuros. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>
- Rabl, R. (1957). [Necrotizing enterocolitis in premature infants]. *Beitrage Zur Pathologischen Anatomie Und Zur Allgemeinen Pathologie*, 117(2), 266–282. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(65\)80003-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-3476(65)80003-8)
- Reisinger, K. W., Kramer, B. W., Van Der Zee, D. C., Brouwers, H. A. A., Buurman, W. A., Van Heurn, E., & Derikx, J. P. M. (2014). Non-invasive serum amyloid A (SAA) measurement and plasma platelets for accurate prediction of surgical intervention in severe necrotizing enterocolitis (NEC). *PLoS ONE*, 9(3), 3–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090834>
- Rodrigo, F. G. M., Henríquez, G. G., Aloy, J. F., & Pérez, A. G. A. (2014). Outcomes of very-low-birth-weight infants exposed to maternal clinical chorioamnionitis: A multicentre study. *Neonatology*, 106(3), 229–234. <https://doi.org/10.1159/000363127>
- Rutten, N. B. M. M., Rijkers, G. T., Meijssen, C. B., Crijns, C. E., Oudshoorn, J. H., van der Ent, C. K., & Vlieger, A. M. (2015). Intestinal microbiota composition after antibiotic treatment in early life: the INCA study. *BMC Pediatrics*, 15(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s12887-015-0519-0>
- Vega, J. R. (2017). TEMA 2 -2017 : Proteína Ligadora de Ácidos Grasos Intestinal en Neonatos con Enterocolitis Aguda Necrotizante ISSN, 5(I).