Respuesta de las citocinas a la combinación de simbióticos y lactoferrina en recién nacidos de muy bajo peso al nacer: ensayo controlado aleatorizado

Cytokine responses to symbiotic and lactoferrin combination in very low birth weight neonates: a randomized control trial

Prof. Asoc. Dra. Ozge Serce Pehlevan^a, Dra. Derya Benzer^a, Prof. Dra. Tugba Gursoy^b, Prof. Asoc. Dra. Esin Aktas Cetin^c, Prof. Dra. Guner Karatekin^a y Prof. Dr. Fahri Ovali^a

RESUMEN

Introducción. Los probióticos y prebióticos presentan beneficios potenciales en la inflamación crónica de las mucosas, incluida la prevención de la enterocolitis necrosante. No obstante, los mecanismos y resultados de estos efectos inmunomoduladores son confusos. El objetivo fue investigar la respuesta de las citocinas a *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* asociados con fructo- y galactooligosacáridos (simbióticos) y lactoferrina en recién nacidos de muy bajo peso al nacer.

Población y métodos. Se asignó aleatoriamente a lactantes con ≤ 32 semanas de gestación y ≤ 1500 g de peso para recibir simbióticos o 1 ml de agua destilada como placebo desde la primera alimentación hasta el alta. Se obtuvieron muestras de sangre los días posnatales 0 ± 2 , 14 ± 2 y 28 ± 2 , y se midieron interferón- γ , interleucina (IL)-5, IL-10 e IL-17A.

Resultados. En el grupo del estudio ($n = 25$), la concentración de IL-10 disminuyó a lo largo del estudio ($p = 0,011$), pero no cambió en el grupo de referencia. La concentración de IL-5 se mantuvo constante los primeros 14 días y luego disminuyó significativamente ($p = 0,042$) en el grupo del estudio, mientras que aumentó en los primeros 14 días ($p = 0,019$) y luego disminuyó en 28 días ($p = 0,011$) en el grupo de referencia ($n = 25$). La concentración de otras citocinas no cambió a lo largo del estudio.

Conclusión. El uso combinado de probióticos con oligosacáridos y lactoferrina estuvo asociado con una disminución en la concentración de IL-10, pero no se observó un cambio en las otras citocinas.

Palabras clave: citocinas, lactoferrina, enterocolitis necrosante, prebióticos, probióticos.

<http://dx.doi.org/10.5546/aap.2020.e8>

Texto completo en inglés:

<http://dx.doi.org/10.5546/aap.2020.eng.e8>

- a. Hospital de Formación e Investigación Materno Infantil Zeynep Kamil, Unidad de Neonatología, Estambul, Turquía.
- b. Facultad de Medicina de Koç Üniversitesi, Unidad de Neonatología, Estambul, Turquía.
- c. İstanbul Üniversitesi, Instituto de Medicina Experimental (DETAE), Departamento de Inmunología, Estambul, Turquía.

Correspondencia:
Dra. Ozge Serce Pehlevan:
ozge_serce@hotmail.com

Financiamiento y Conflicto de intereses:
Los kits ELISA y la preparación fueron suministrados por Nobel Pharmacy Inc.

Recibido: 9-10-2018
Aceptado: 14-8-2019

INTRODUCCIÓN

Las bacterias de colonización posnatal se comunican con las células intestinales y activan la respuesta inmunitaria, el desarrollo de enterocitos y la función de la barrera mucosa durante el desarrollo del tubo digestivo.¹ Los microorganismos probióticos mejoran la microbiota intestinal cuando la colonización no es adecuada.^{2,3} Los prebióticos, como los oligosacáridos, estimulan el desarrollo y la actividad de estos microorganismos y les suministran sustratos.^{2,3} Muchos factores afectan la microbiota de los recién nacidos prematuros.² En esta población, la disbiosis puede causar enterocolitis necrosante.¹ La falta de maduración intestinal, la respuesta inflamatoria desregulada y la colonización bacteriana incompleta son las principales vías de la patogenia de la enterocolitis necrosante.⁴

La lactancia, que reduce la incidencia de la enterocolitis necrosante, está asociada con una mejor expresión de bacterias beneficiosas, como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, con la ayuda de sus ingredientes, como oligosacáridos, lisozimas y lactoferrina.¹ La lactoferrina tiene actividades antibióticas de amplio espectro e inmunomoduladoras potentes.⁵ Influye en la diferenciación, el desarrollo y la proliferación de los enterocitos y disminuye la incidencia de sepsis y enterocolitis necrosante en los recién nacidos.⁵ Por el contrario, la función de otros prebióticos en la profilaxis de la enterocolitis

Cómo citar: Serce Pehlevan O, Benzer D, Gursoy T, Aktas Cetin E, et al. Respuesta de las citocinas a la combinación de simbióticos y lactoferrina en recién nacidos de muy bajo peso al nacer: ensayo controlado aleatorizado. Arch Argent Pediatr 2020;118(1):e8-e15.

necrosante es contradictoria.⁶⁻⁸ La colaboración Cochrane, que incluye ensayos controlados aleatorizados (ECA) con distintos tipos de probióticos, respalda el uso de estos para prevenir la enterocolitis necrosante.⁹ La combinación de estas cepas diferentes en suplementos de simbióticos es una estrategia alternativa, pero los resultados de los ECA son contradictorios porque la función probiótica es específica de una cepa.¹⁰⁻¹² Algunas cepas de probióticos aumentan las citocinas proinflamatorias, mientras que otras inducen la respuesta antiinflamatoria de las citocinas.¹³

Sin embargo, aún no existe una respuesta a qué sucede si el equilibrio entre las respuestas pro- y antiinflamatoria se inclina hacia un lado. ¿Es posible que las combinaciones de probióticos destinadas a reducir la incidencia de enterocolitis necrosante sean peligrosas para el huésped debido a sus efectos específicos de la cepa?

Las citocinas proinflamatorias de tipo Th1, como el interferón (IFN)- γ , fomentan la inmunidad celular, mientras que las citocinas de tipo Th2, como la interleucina-5 (IL-5), inducen la respuesta eosinofílica y la inmunidad humoral.¹² Los linfocitos T reguladores (Treg), como la IL-10, suprimen la respuesta inmunitaria aberrante a los autoantígenos.¹² Los linfocitos Th17 cumplen una función en la barrera mucosa.¹⁴ La inflamación es responsable del desarrollo de morbilidades en los recién nacidos. Por ejemplo, se asoció una concentración reducida de IL-10 en la sangre del cordón con el riesgo de displasia broncopulmonar.¹⁵ La alteración de IL-17/Th17 cumple una función importante en la patogenia de la retinopatía del prematuro.¹⁴ Por lo tanto, las cepas de probióticos que inducen las citocinas antiinflamatorias podrían ser beneficiosas en el control de las enfermedades inflamatorias y es relevante evaluar la respuesta inflamatoria causada por estas cepas en el huésped.¹² En consecuencia, nuestro objetivo fue investigar el efecto combinado de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* junto con oligosacáridos y lactoferrina en los distintos tipos de citocinas.

POBLACIÓN Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un ensayo aleatorizado, controlado con placebo, con ocultación simple y prospectivo en la unidad de neonatología entre julio y septiembre de 2013, una vez obtenida la aprobación del comité de ética (20 de julio de 2012). Los recién nacidos con ≤ 32 semanas de gestación y muy bajo peso al nacer cumplieron los requisitos para ingresar en

el ensayo. Se excluyó del estudio a los neonatos con anomalías congénitas o nacidos de madres con rotura prematura de membranas (RPM) o corioamnionitis. Tras la aleatorización, se excluyó del estudio a los recién nacidos con 1) respiración mecánica por más de 7 días, 2) sepsis confirmada mediante cultivo al momento de la obtención de la muestra de sangre, 3) enterocolitis necrosante, 4) cirugía y 5) que fallecieron en los primeros 30 días de vida, debido al posible efecto de estos factores en la concentración de citocinas.

Se determinó la concentración sérica de los distintos tipos de citocinas, como IL-5 (linfocito Th2), IL-10 (linfocito Treg), IL-17A (linfocito Th17) e IFN- γ (linfocito Th1), en el período posnatal inmediato y al final de las semanas 2 y 4. Se asignó aleatoriamente a los recién nacidos al grupo del estudio o al grupo de referencia en las primeras horas de vida con base en números consecutivos generados en el centro informático una vez obtenido el consentimiento informado del padre o la madre. Las asignaciones se colocaron en sobres sellados numerados consecutivamente.

El grupo del estudio recibió una preparación certificada por la ISO-9001 que contenía 820 millones de *Lactobacillus* (*L.*) *rhamnosus* (colección coreana de cultivos tipo [KCTC] núm. 12202BP), 410 millones de *L. plantarum* (KCTC núm. 10782BP), *L. casei* (KCTC núm. 12398BP), *Bifidobacterium* (*B.*) *lactis* (KCTC núm. 11904BP), 383 mg de fructooligosacáridos, 100 mg de galactooligosacáridos y 2 mg de lactoferrina bovina (NBL Probiotic ATP, ½ saché cada 12 h). El grupo de referencia recibió un placebo (agua destilada, 1 ml por dosis, dos veces al día). La posología del suplemento se determinó con base en estudios previos.¹⁶ Las preparaciones se conservaron a temperatura ambiente y alejadas de la luz y la humedad y se añadieron a la leche materna o leche maternizada (Aptamil Prematil Formula [Milupa AG, Friedrichsdorf, Alemania]) desde la primera alimentación hasta el alta. Según las instrucciones del sobre sellado, el personal del equipo de lactancia mezcló los suplementos con agua destilada para obtener una suspensión de 1 ml y la añadió a la leche materna o leche maternizada antes de la alimentación; el añadido de la suspensión no modificó el aspecto de la leche.

Por lo tanto, los únicos miembros del personal que conocían las asignaciones de los lactantes a los grupos eran uno de los investigadores (TG) y aquellos en el equipo de lactancia que no participaron en la atención de los lactantes y los

análisis de los datos. Se inició la alimentación enteral mínima (10-20 ml/kg) el primer día posnatal salvo que estuviera contraindicada (por ejemplo, acidosis metabólica grave o asfisia). El aumento diario de la cantidad de alimentación dependía del peso al nacer (10 ml/kg/día para aquellos nacidos con <750 g, 20 ml/kg/día para aquellos nacidos con 750-1250 g y 30 ml/kg/día para aquellos nacidos con 1250-1500 g). Se retuvo la alimentación si se produjo aspiración gástrica de más de la mitad de la alimentación previa con distensión abdominal o vómitos. Se inició la fortificación si la alimentación enteral era mayor a 100 ml/kg/día. Se añadió una dosis fija (4 g por cada 100 ml de leche materna) de fortificante (Eoprotein [Milupa AG, Friedrichsdorf, Alemania]) a la leche hasta que el peso del lactante alcanzara ≥ 2500 g. Los lactantes recibieron alimentación parenteral total hasta

alcanzar los 100 ml/kg/día de nutrición enteral.

A los lactantes con un peso al nacer por debajo de dos desviaciones estándar (DE) según las curvas de crecimiento intrauterino se los clasificó como pequeños para la edad gestacional.¹⁷ Se emplearon las clasificaciones de Bell modificada, de Papile y del Instituto Nacional de Salud Infantil y Desarrollo Humano para definir enterocolitis necrosante,¹⁸ hemorragia intraventricular¹⁹ y enfermedad broncopulmonar,²⁰ respectivamente. Se determinó la concentración sérica de citocinas mediante un enzimoimmunoanálisis de absorción de tipo sándwich en fase sólida (Diacclone, Francia) los días posnatales 0 ± 2 , 14 ± 2 y 28 ± 2 . Las muestras de sangre se obtuvieron entre las 8:00 a. m. y las 10:00 a. m. y se centrifugaron de inmediato durante 10 minutos a 3000 rpm. Luego se conservaron a -80°C hasta el momento del análisis. Todos los ensayos se hicieron conforme

FIGURA 1. Diagrama de flujo del estudio

a los protocolos del fabricante. Las muestras se analizaron por duplicado. Se emplearon los patrones provistos para generar las curvas estándar. Se aplicaron las muestras y los patrones en pocillos recubiertos previamente con anticuerpos monoclonales específicos para IL-5, IL-10, IL-17A e IFN- γ . Se eliminaron las proteínas no ligadas mediante lavado y se añadió estreptavidina con biotina y con peroxidasa de rábano en forma escalonada. Tras la reacción colorimétrica con el sustrato, se evaluaron las placas del ELISA inmediatamente a 450 nm con una corrección de longitud de onda de 620 nm.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa NCSS (versión 2007; Kaysville, Utah, EE. UU.). Los análisis descriptivos se presentaron como proporción, media $\pm$ DE y mediana (p25-p75). Se usó la prueba de la U de Mann-Whitney para comparar la concentración de citocinas entre ambos grupos. Se usó la prueba de Friedman para evaluar la significancia del cambio en la concentración de citocinas a lo largo del período del estudio. La prueba de Wilcoxon se hizo para analizar la significancia de las diferencias por pares entre el día 0 $\pm$ 2 y 14 $\pm$ 2, entre el día 0 $\pm$ 2 y 28 $\pm$ 2 y entre el día 14 $\pm$ 2 y

28 $\pm$ 2 en cada grupo. Se estableció un error de tipo I del 5 % global para inferir la significancia estadística de los demás análisis estadísticos.

El estudio mantuvo una potencia del 80 % con al menos 24 pacientes en cada grupo con una diferencia estadísticamente significativa de 0,75 DE en la concentración de citocinas entre ambos grupos (es decir, una diferencia de 1,5 pg/ml cuando la DE es de 2 pg/ml, de 0,75 pg/ml cuando la DE es de 1 pg/ml, etc.) y un error de tipo I del 5 % en cada punto temporal.

Aprobación ética: el ensayo fue aprobado por el comité de ética central de Angora, Turquía.

Registro: el ensayo está registrado en www.clinicaltrials.gov bajo el número de identificación: NCT01899677.

RESULTADOS

En la *Figura 1*, se muestra el diagrama de flujo del estudio. Finalmente, 25 recién nacidos en cada grupo completaron el estudio. La única diferencia en las características de los grupos fue la incidencia de preeclampsia (*Tabla 1*). No se observaron efectos adversos.

La concentración sérica de citocinas durante el período del estudio se muestra en la *Figura 2* y

TABLA 1. Características demográficas y clínicas de los grupos

	Grupo del estudio (n = 25)	Grupo de referencia (n = 25)	p
Peso al nacer (g), media (DE)	1266 (228)	1230 (262)	0,15
Edad gestacional (semanas), media (DE)	30,1 (2,03)	29,8 (2,3)	0,32
Apgar en el minuto 5, mediana (p25-p75)	8 (6-8)	7 (6-8)	0,91
Lactantes masculinos, n (%)	12 (48)	18 (64)	0,27
Cesárea, n (%)	24 (96)	25 (89)	0,61
Preeclampsia, n (%)	5 (20)	13 (46)	0,043
Tratamiento prenatal con corticosteroides, n (%)	22 (88)	22 (78)	0,47
Pequeño para la edad gestacional, n (%)	2 (8)	8 (28)	0,08
Síndrome de dificultad respiratoria, n (%)	6 (24)	11 (39)	0,23
Hemorragia intraventricular, n (%)	8 (32)	9 (32)	0,99
Conducto arterial persistente, n (%)	6 (24)	11 (39)	0,23
Enfermedad pulmonar crónica, n (%)	5 (20)	8 (28)	0,46
Día posnatal en que se inició la AEM ^a , mediana (p25-p75)	2 (1-2)	2 (1-2)	0,36
% de leche materna utilizada, mediana (p25-p75)	80 (50-92)	80 (50-90)	0,91
Peso el día 14 (g), media (DE)	1322 $\pm$ 306	1310 $\pm$ 267	0,89
Peso el día 28 (g), media (DE)	1421 $\pm$ 363	1517 $\pm$ 447	0,54
Peso el día del alta (g), media (DE)	1901 $\pm$ 453	1862 $\pm$ 318	0,72
Día sin alimentación por boca, media (DE)	1,8 $\pm$ 3,1	1,48 $\pm$ 2,7	0,67

^aAEM: alimentación enteral mínima.

TABLA 2. Efecto de la preparación de simbióticos en la concentración circulante de IL-5, IL-10, IFN- γ e IL-17A

	Grupo del estudio (n = 25)	Grupo de referencia (n = 25)	p^a
Interleucina-5 (pg/ml), mediana (p25-p75)			
Día 0 $\pm$ 2	4 (2,73-5,63)	4,2 (2,71-4,62)	0,68
Día 14 $\pm$ 2	4,1 (2,81-7,29)	4,5 (3,67-13,45)	0,15
Día 28 $\pm$ 2	3,7 (1,97-4,44)	3,6 (3,08-4,32)	0,39
p^b	0,066	0,013	
Interleucina-10 (pg/ml), mediana (p25-p75)			
Día 0 $\pm$ 2	11,9 (5,83-37,69)	10,6 (7,43-27,09)	0,97
Día 14 $\pm$ 2	11,8 (8,08-31,56)	16,3 (9,31-27,56)	0,64
Día 28 $\pm$ 2	9 (6,31-14,02)	12,4 (6,72-17,18)	0,35
p^b	0,011	0,17	
Interleucina-17A (pg/ml), mediana (p25-p75)			
Día 0 $\pm$ 2	1,7 (1,42-1,99)	1,7 (1,44-1,98)	0,91
Día 14 $\pm$ 2	1,7 (1,42-1,97)	1,6 (1,43-2,02)	0,86
Día 28 $\pm$ 2	1,8 (1,38-1,89)	1,7 (1,35-1,97)	0,91
p^b	0,88	0,96	
Interferón-γ (pg/ml), mediana (p25-p75)			
Día 0 $\pm$ 2	6,4 (5,58-10,12)	6,6 (5,53-8,41)	0,90
Día 14 $\pm$ 2	6,4 (6,81-11,49)	7,8 (7-9,53)	0,42
Día 28 $\pm$ 2	8,7 (7,02-11,95)	7,2 (6,16-8,33)	0,020
p^b	0,10	0,33	

a. Prueba de la U de Mann-Whitney; valor de p que denota la diferencia entre el grupo del estudio y el grupo de referencia.

b. Prueba de Friedman; el valor de p representa la diferencia entre las tres mediciones de la misma citocina en cada grupo.

FIGURA 2. Evolución de la concentración sérica de las citocinas entre los grupos

Nota al pie: Los valores de p (prueba del orden con signo de Wilcoxon) representan las diferencias en la concentración sérica de las citocinas en el grupo del estudio y el grupo de referencia entre el día 0 $\pm$ 2 y el día 14 $\pm$ 2 para IFN- γ : 0,24 frente a 0,15; IL-5: 0,53 frente a 0,019; IL-10: 0,48 frente a 0,67; IL-17-A: 0,66 frente a 0,98; entre el día 14 $\pm$ 2 y 28 $\pm$ 2 para IFN- γ : 0,69 frente a 0,36; IL-5: 0,042 frente a 0,011; IL-10: 0,014 frente a 0,053; IL-17A: 0,66-0,98; entre el día 0 $\pm$ 2 y 28 $\pm$ 2 para IFN- γ : 0,25 frente a 0,88; IL-5: 0,10 frente a 0,55; IL-10: 0,010 frente a 0,26; IL-17A: 0,94 frente a 0,88, respectivamente.

P^* ; $P \leq 0,05$.

la Tabla 2. La concentración de IL-10 disminuyó significativamente a lo largo del período del estudio en el grupo del estudio ($p = 0,011$). La concentración de IL-5 también disminuyó a lo largo del período del estudio, pero de forma no significativa ($p = 0,066$). Sin embargo, la disminución en la concentración de IL-5 del día 14 al día 28 en el grupo del estudio fue significativa ($p = 0,042$). En el grupo de referencia, la concentración sérica de IL-5 aumentó significativamente en los primeros 14 días ($p = 0,019$), pero disminuyó el día 28 ($p = 0,011$). Las concentraciones séricas de IL-17A e IFN- γ no difirieron entre los dos grupos.

DISCUSIÓN

La inflamación actúa en varias morbilidades de la prematuridad.^{14,15} Es importante determinar los efectos inmunomoduladores específicos de la cepa de los probióticos. Por lo tanto, nos centramos en el equilibrio de las citocinas proinflamatorias/antiinflamatorias y la respuesta antiinflamatoria prevista. Optamos por un suplemento que incluía los elementos de la leche materna. El hallazgo más importante de este estudio fue la disminución en la concentración de IL-10 en el grupo de simbióticos a lo largo del período del estudio. Los lactantes prematuros tienen una capacidad reducida para producir IL-10, que es necesaria para la homeostasis intestinal y protege a los lactantes contra la enterocolitis necrosante.²¹⁻²⁴ Los lactantes cuyas madres tienen una concentración baja de IL-10 tienen mayor riesgo de enterocolitis necrosante.^{21,25}

Los probióticos podrían regular la señalización de la IL-10 en los intestinos no desarrollados.²¹ La IL-10 tiene una modulación específica de la cepa junto con el IFN- γ , el TNF- α y la IL-12.¹² Se ha informado que la cepa *L. rhamnosus* GG es un probiótico antiinflamatorio debido a su función en la inducción de la IL-10 en los seres humanos.²⁶ Las bacterias *L. reuteri* y *L. casei* también fomentan el desarrollo de linfocitos Treg.^{20,27} *B. longum* SP07/3 y *B. bifidum* MF20/5 son mejores inductores de la IL-10 que las cepas de *Lactobacillus*.¹² Además de la producción de IL-10, todas las cepas indujeron citocinas proinflamatorias (IL-1b, IL-6 y TNF- α) en el estudio de Dong y cols., en el que se compararon las propiedades inmunomoduladoras de varias cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.¹² Se ha informado que las cepas de probióticos que inducen una concentración elevada de citocinas antiinflamatorias y una concentración baja de

citocinas proinflamatorias previenen la colitis.²⁸ En paralelo con nuestros resultados, Braat y cols. informaron una menor producción de IL-10 en los pacientes con enfermedad de Crohn y en sujetos sanos después del tratamiento con probióticos.²⁹ En consecuencia, es posible especular que algunas combinaciones de probióticos, como el producto empleado en este estudio, podrían aumentar la incidencia de enterocolitis necrosante o de otras morbilidades de la prematuridad secundarias a la inflamación. Sin embargo, al contrario de esta hipótesis, tres pacientes excluidos que presentaron enterocolitis necrosante estaban en el grupo de referencia de nuestro estudio. A pesar de esto, el tamaño de la muestra de este estudio no fue suficiente para evaluar dichas morbilidades. En un ECA de publicación reciente, se informó un aumento de la incidencia de enterocolitis necrosante asociado con la administración de *L. acidophilus* y *B. longum* subsp. *infantis* en recién nacidos extremadamente prematuros.³⁰ También se informó una mayor incidencia de enterocolitis necrosante después de la administración de probióticos en cerdos prematuros.³¹

En el estudio de Dong y cols., ninguna de las cepas de probióticos afectó la concentración de IL-5.¹² La concentración de IL-5 aumentó significativamente en los primeros 14 días en el grupo de referencia, pero luego disminuyó significativamente en ambos grupos de nuestro estudio. El aumento de la concentración de IL-5 en el grupo de referencia durante las primeras dos semanas de vida podría ser secundario a la mayor incidencia de madres con preeclampsia en este grupo. En el estudio que evaluó la concentración de citocinas durante la primera semana de vida, se observó una mayor concentración de citocinas de la vía Th1 en los lactantes cuyas madres tenían preeclampsia que en el grupo de referencia.³² La prevalencia de linfocitos T CD4+ y la proporción de linfocitos CD4/CD8 fueron menores en los neonatos nacidos de madres con preeclampsia.³² La prevalencia de linfocitos T CD8+HLA-DR+ también fue significativamente menor en los casos de preeclampsia los días 0, 3 y 7.³² En otro estudio, la concentración de linfocitos Th2 y Treg fue significativamente más baja en las muestras de sangre del cordón de las mujeres con preeclampsia que en aquellas de mujeres sanas, mientras que la concentración de linfocitos Th1 (IFN- γ) y Th17 (IL-17) no mostró diferencias.³³ Como consecuencia, el efecto de la preeclampsia en el inmunofenotipo de los recién nacidos no es claro, aunque debe considerarse la influencia

posible en la concentración de citocinas en nuestra cohorte al interpretar los resultados.

Además de su función prebiótica, la lactoferrina presenta una actividad inmunomoduladora potente y antibiótica de amplio espectro,⁵ disminuye la concentración de IL-10 y la enterocolitis necrosante grave en los lactantes prematuros.^{5,34} Dado que la lactoferrina es un agente multifuncional, los efectos beneficiosos sobre la incidencia de enterocolitis necrosante podrían ser secundarios a los distintos mecanismos más que a la tendencia de las citocinas. La posología ideal de la lactoferrina en el tratamiento de la enterocolitis necrosante no es clara.⁵ Debido a la mínima dosis de lactoferrina (2 mg) en nuestro producto, es posible concluir que la lactoferrina tendría un efecto menor, si lo hubiera.

Se sabe que la IL-17A es una citocina proinflamatoria involucrada en el proceso de la inflamación intestinal.²¹ Se ha mencionado su implicancia en la patogenia de la enfermedad intestinal inflamatoria y queda suprimida por el IFN- γ derivado de Th1 y la IL-4 derivada de Th2.²¹ Sin embargo, recientemente, se ha informado que la IL-17A mantiene la función de barrera al regular las proteínas de unión intercelular.^{21,35} Algunas cepas de probióticos inhiben la actividad de los linfocitos Th17 y la IL17 al inducir subconjuntos de linfocitos Treg y Th1 y la producción de IL-27.³⁶ No obstante, el producto empleado en este estudio no afectó la concentración de IL-17.

El IFN- γ es otra citocina con modulación específica de la cepa, y *L. rhamnosus* GG fue la única que no indujo IFN- γ en el estudio de Dong y cols.¹² Se ha demostrado que la leche maternizada suplementada con *Saccharomyces boulardii* y prebióticos produce un descenso regulado del IFN- γ .³⁷ Sin embargo, nosotros no observamos un cambio en la concentración de IFN- γ , aunque esta fue mayor en el grupo del estudio el día 28 de vida que en el grupo de referencia. *S. boulardii* es una levadura, mientras que, en este estudio, se emplearon bacterias. Pueden observarse diferencias en la composición de la pared celular entre las bacterias y las levaduras, y la pared celular es responsable de modular la respuesta inmunitaria de la mucosa por parte de los probióticos, lo que explica las diferentes respuestas obtenidas en estos estudios.²

Nuestros resultados no coinciden con los de Dong y cols.¹² Esta diferencia podría deberse al uso de una preparación que contenía una mezcla de probióticos, prebióticos y lactoferrina.

Cada componente podría ser responsable de los cambios observados en las concentraciones de citocinas, pero es difícil interpretar el efecto específico de cada elemento, ya que cada uno tiene un mecanismo inmunomodulador diferente, que es la principal limitación de nuestro estudio. Otra limitación de este estudio es que se llevó a cabo en un solo centro. La mayoría de los estudios *in vitro* se centraron en la producción de citocinas y usaron células mononucleares de sangre periférica.¹² Este modelo celular no puede reflejar precisamente la situación *in vivo* en la que las bacterias intestinales interactúan con placas de Peyer, linfocitos M, etc. También fue difícil comparar los resultados de los ensayos debido a las amplias variaciones en los criterios de valoración y los probióticos usados y sus dosis.

Las notificaciones de sepsis a causa de cepas de *Lactobacillus* son pocas.³⁸ Sin embargo, nosotros no observamos casos de sepsis. Todos los pacientes con enterocolitis necrosante (etapa 1 [n = 3]) estaban en el grupo de referencia.

A modo de conclusión, la combinación de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* junto con oligosacáridos y lactoferrina disminuye la concentración de IL-5 después del día 14 posnatal y la concentración de IL-10 a lo largo del período del estudio, mientras que no afectó las concentraciones de IFN- γ e IL-17A. Los cambios en la concentración de IL-10 podrían ser decisivos en el desarrollo de la enterocolitis necrosante. Los estudios futuros deberían centrarse en la importancia biológica de la interacción de los probióticos entre sí y con otras sustancias antibióticas. ■

REFERENCIAS

1. Walker A. Intestinal colonization and programming of the intestinal immune response. *J Clin Gastroenterol*. 2014; 48(Suppl 1):S8-11.
2. Serce O, Benzer D, Gursoy T, Karatekin G, Ovali F. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* on necrotizing enterocolitis or sepsis in very low birth weight infants: a randomised controlled trial. *Early Hum Dev*. 2013; 89(12):1033-6.
3. Johnson-Henry KC, Abrahamson TR, Wu RY, Sherman PM. Probiotics, Prebiotics, and Symbiotics for the Prevention of Necrotizing Enterocolitis. *Adv Nutr*. 2016; 7(5):928-37.
4. Panigrahi P. Probiotics and prebiotics in neonatal necrotizing enterocolitis: New opportunities for translational research. *Pathophysiology*. 2014; 21(1):35-46.
5. Pammi M, Suresh G. Enteral lactoferrin supplementation for prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017; 6:CD007137.
6. Srinivasjois R, Rao S, Patole S. Prebiotic supplementation in preterm neonates: updated systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Clin Nutr*. 2013; 32(6):958-65.
7. Dilli D, Aydin B, Fettah ND, Ozyazici E, et al. The Propre-

- Save study: effects of probiotics and prebiotics alone or combined on necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Pediatr*. 2015; 166(3):545-51. e1.
8. Armanian AM, Sadeghnia A, Hoseinzadeh M, Mirlohi M, et al. The effect of neutral oligosaccharides on reducing the incidence of necrotizing enterocolitis in preterm infants: a randomized clinical trial. *Int J Prev Med*. 2014; 5(11):1387-95.
9. AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; (4):CD005496.
10. Sreenivasa B, Sunil Kumar P, Suresh Babu MT, Ragavendra K. Role of symbiotics in the prevention of necrotizing enterocolitis in preterm neonates: a randomized controlled trial. *Int J Contemp Pediatr*. 2015; 2(2):127-30.
11. Nandhini LP, Biswal N, Adhisivam B, Mandal J, et al. Symbiotics for decreasing incidence of necrotizing enterocolitis among preterm neonates - a randomized controlled trial. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016; 29(5):821-5.
12. Dong H, Rowland I, Yaqoob P. Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *Br J Nutr*. 2012; 108(3):459-70.
13. Rocha-Ramírez LM, Pérez-Solano RA, Castañón-Alonso SL, Moreno Guerrero SS, et al. Probiotic *Lactobacillus* strains stimulate the inflammatory response and activate human macrophages. *J Immunol Res*. 2017; 2017:4607491.
14. Li Y, Zhou Y. Interleukin-17: the role for pathological angiogenesis in ocular neovascular diseases. *Tohoku J Exp Med*. 2019; 247(2):87-98.
15. Huusko JM, Karjalainen MK, Mahlman M, Haataja R, et al. A study of genes encoding cytokines (IL6, IL10, TNF), cytokine receptors (IL6R, IL6ST), and glucocorticoid receptor (NR3C1) and susceptibility to bronchopulmonary dysplasia. *BMC Med Genet*. 2014; 15:120.
16. Deshpande GC, Rao SC, Keil AD, Patole SK. Evidence-based guidelines for use of probiotics in preterm neonates. *BMC Med*. 2011; 9:92.
17. Ovali F. Intrauterine growth curves for Turkish infants born between 25 and 42 weeks of gestation. *J Trop Pediatr*. 2002; 49(6):381-3.
18. Walsh MC, Kliegman RM, Fanaroff AA. Necrotizing enterocolitis: a practitioner's perspective. *Pediatr Rev*. 1988; 9(7):219-26.
19. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: A study of infants with birth weight less than 1,500 gm. *J Pediatr*. 1978; 92(4):529-34.
20. Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 163(7):1723-9.
21. Denning TL, Bhatia AM, Kane AF, Patel RM, Denning PW. Pathogenesis of NEC: Role of the innate and adaptive immune response. *Semin Perinatol*. 2017; 41(1):15-28.
22. Chheda S, Palkowetz KH, Garofalo R, Rassin DK, et al. Decreased interleukin-10 production by neonatal monocytes and T cells: relationship to decreased production and expression of tumor necrosis factor-alpha and its receptors. *Pediatr Res*. 1996; 40(3):475-83.
23. Emami CN, Chokshi N, Wang J, Hunter C, et al. Role of interleukin-10 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Am J Surg*. 2012; 203(4):428-35.
24. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz M, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med*. 2009; 361(21):2033-45.
25. Fituch CC, Palkowetz KH, Goldman AS, Schanler RJ. Concentrations of IL-10 in preterm human milk and in milk from mothers of infants with necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr*. 2004; 93(11):1496-500.
26. Pessi T, Sütas Y, Hurme H, Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30(12):1804-8.
27. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells *in vitro* by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115(6):1260-7.
28. Foligne B, Nutton S, Grangette C, Dennin V, et al. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(2):236-43.
29. Braat H, van den Brande J, van Tol E, Hommes D, et al. *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80(6):1618-25.
30. Escribano E, Zozaya C, Madero R, Sánchez L, et al. Increased incidence of necrotizing enterocolitis associated with routine administration of Infloran™ in extremely preterm infants. *Benef Microbes*. 2018; 9(5):683-90.
31. Cilieborg MS, Thymann T, Siggers R, Boye M, et al. The incidence of necrotizing enterocolitis is increased following probiotic administration to preterm pigs. *J Nutr*. 2011; 141(2):223-30.
32. Sava F, Toldi G, Treszl A, Hajdú J, et al. Immune cell subsets, cytokine and cortisol levels during the first week of life in neonates born to pre-eclamptic mothers. *Am J Reprod Immunol*. 2017; 77(6):e12659.
33. Vargas-Rojas ML, Solleiro-Villavicencio H, Soto-Vega E. Th1, Th2, Th17 and Treg levels in umbilical cord blood in preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016; 29(10):1642-5.
34. Hwang SA, Kruzel ML, Actor JK. Immunomodulatory effects of recombinant lactoferrin during MRSA infection. *Int Immunopharmacol*. 2014; 20(1):157-63.
35. Lee JS, Tato CM, Joyce-Shaikh B, Gulen MF, et al. Interleukin-23-independent IL-17 production regulates intestinal epithelial permeability. *Immunity*. 2015; 43(4):727-38.
36. Frei R, Akdis M, O'Mahony L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015; 31(2):153-8.
37. D'Souza A, Cai CL, Kumar D, Cai F, et al. Cytokines and Toll-like receptor signaling pathways in the terminal ileum of hypoxic/hyperoxic neonatal rats: benefits of probiotics supplementation. *Am J Transl Res*. 2012; 4(2):187-97.
38. Whelan K, Myers CE. Safety of probiotics in patients receiving nutritional support: a systematic review of case reports, randomized controlled trials, and nonrandomized trials. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91(3):687-703.