



Facultad de Medicina y Odontología  
Universitat de València  
Programa de Doctorado en Medicina  
Departamento de Medicina

**“INFLUENCIA DEL PROCESAMIENTO DE LA LECHE HUMANA DONADA  
SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL, LA EXPRESIÓN GENÓMICA Y EL  
EQUILIBRIO OXIDATIVO EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO MENORES DE 32  
SEMANAS DE EDAD GESTACIONAL.”**

**TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL**  
Presentada por: Dña. Anna Parra Llorca

**Dirigida por :**

Dr. Máximo Vento Torres

Dra. María Carmen Collado Amores

Dra. Eva Serna García

**Tutor:**

Dr. Federico V. Pallardó Calatayud

Valencia. Febrero 2021.



**INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS**

**Director (es) / Codirector (es):**

1.- Apellidos y nombre: Máximo Vento Torres. N.I.F. 19818218-S, Departamento/Instituto: Instituto de Investigación Santiaria La Fe. Centro: Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

2.- Apellidos y nombre: María Carmen Collado Amores. N.I.F. 24377448-R, Departamento/Instituto: Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos. Centro: IATA-CSIC. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Parque Científico de la Universidad de Valencia. Paterna. España.

3.- Apellidos y nombre: Eva Serna García. N.I.F. 53054627-K, Departamento/Instituto: Departamento de Fisiología. Centro: Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia.

**Tutor o tutora (si procede)**

Apellidos y nombre: Federico Pallardó Calatayud. N.I.F. 22685282-Z, Departamento/Instituto: Departamento de Fisiología. Centro: Universidad de Valencia.

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: “

**“INFLUENCIAS DEL PROCESAMIENTO DE LA LECHE MATERNA DE DONANTE SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL, LA EXPRESIÓN GENÓMICA Y EL EQUILIBRIO OXIDATIVO EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO MENORES DE 32 SEMANAS DE EDAD GESTACIONAL.”** de D/Dña. Anna Parra Llorca,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe FAVORABLE para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 02/12/2020.

Directores:



Máximo Vento Torres



María Carmen Collado Amores



Eva Serna García

Tutor:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Federico Pallardó Calatayud', written over a horizontal line.

Federico Pallardó Calatayud

**ESCUELA DOCTORAL  
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**



Los Doctores D. Máximo Vento Torres, Dña. María Carmen Collado Amores y Dña. Eva Serna García como directores de tesis, así como D. Federico V. Pallardó Calatayud, como tutor de tesis,

EXPONEN:

Que los tres artículos que se recogen en la tesis están publicados en revistas indexadas con los siguientes factores de impacto:

1. **Parra-Llorca A**, Gormaz M, Alcántara C, Cernada M, Nuñez-Ramiro A, Vento M, Collado MC. Preterm Gut Microbiome Depending on Feeding Type: Significance of Donor Human Milk. *Front Microbiol.* 2018;9:1376.

Doi: 10.3389/fmicb.2018.01376. PMID: 29997594; PMCID: PMC6030370.

Indicadores de calidad: *Frontiers in Microbiology*. Impact Factor 4.23. Q1.

2. **Parra-Llorca A**, Gormaz M, Sánchez-Illana Á, Piñeiro-Ramos JD, Collado MC, Serna E, Cernada M, Núñez-Ramiro A, Ramón-Beltrán A, Oger C, Galano JM, Vigor C, Durand T, Kuligowski J, Vento M. Does Pasteurized Donor Human Milk Efficiently Protect Preterm Infants Against Oxidative Stress? *Antioxid Redox Signal.* 2019;31:791-799.

Doi: 10.1089/ars.2019.7821. PMID: 31250657.

Indicadores de calidad: *Antioxidants & Redox Signaling*. Impact Factor 6.32. Q1.

3. **Parra-Llorca A**, Gormaz M, Lorente-Pozo S, Cernada M, García-Robles A, Torres-Cuevas I, Kuligoswki J, Collado MC, Serna E, Vento M. *Impact of Donor Human Milk in the Preterm Very Low Birth Weight Gut Transcriptome Profile by Use of Exfoliated Intestinal Cells. Nutrients.* 2019;11:2677.

Doi: 10.3390/nu11112677. PMID: 31694290; PMCID: PMC6893464.

Indicadores de calidad: *Nutrients*. Journal Impact Factor 4.17. Q1.

Así mismo, EXPONEN:

Que la Doctoranda, Anna Parra Llorca, ha participado en cada uno de los 3 artículos planificando el experimento, escribiendo el proyecto y solicitando su aceptación por el comité ético. Anna Parra Llorca recogió todas las muestras y datos clínicos. Junto con sus directores realizó el análisis microbiológico de las heces, el análisis del estrés oxidativo en orina y el estudio de la expresión genómica en las células intestinales exfoliadas de las muestras recogidas. La Doctoranda escribió el primer borrador de los artículos y el resto de autores lo revisaron. Todos los autores aceptaron la versión final del manuscrito.

Las muestras y los datos expuestos en los artículos han sido explícitamente recogidos para esta Tesis Doctoral y no han sido utilizados para otros proyectos ni estudios.

Para la realización de la Tesis Doctoral Internacional presentada, la investigadora Anna Parra Llorca ha disfrutado de:

- La beca Post-Médico Interno Residente, otorgada por el **Instituto de Investigación Sanitaria La Fe**.
- La beca *Río Hortega*, otorgada por el Instituto de **Investigación en Salud Carlos III**.

Para la obtención de la Tesis Doctoral presentada con mención de “Tesis Internacional”, la investigadora ha realizado una estancia internacional en:

- Hospital Vrije Uinversiteit & Emma Children’s Hospital, Amsterdam. Países Bajos. bajo la supervisión del Prof. Dr. Tim de Meij, MD, PhD y Prof. Dr. J. B. van Goudoever, MD. PhD.



## **AGRADECIMIENTOS**

## A TODOS LOS QUE CONFIASTEIS EN MI

### LAS PERSONAS QUE ELIGES EN TU VIDA REFLEJAN EL AMOR QUE SIENTES POR TI

Desde pequeña...SIEMPRE he querido escribir un libro. Adoraba leer. Ese 'Anna! Apaga ya la luz'. Esas contestaciones a: '¿Qué quieres ser de mayor?'... y mi respuesta siempre era: 'Claramente: Escritora de libros'...

Y ESTA...parece que es mi oportunidad (\*Tendréis que ir a la bibliografía indexada para descubrir más ;)

Poco a poco, fui creciendo. Y cambié de opinión. ¡¡Iba a ser Farmacéutica!! Adoraba las horas en el horno, vendiendo, peleándome con la máquina registradora. Relacionándome con la gente. TODO...apuntaba al mundo de la SALUD.

Y un día, no recuerdo ni cómo ni cuando...decidí: SER PEDIATRA. Algo nació en mí. Siempre digo...que nuestro camino, intentamos decidirlo y organizarlo, pero...Nace así. Lo vives. Lo aceptas. Lo disfrutas. De hecho, LA VIDA... 'ES ALGO QUE TE VA PASANDO MIENTRAS TE EMPEÑAS EN HACER OTROS PLANES' ☺.

Ésta es una oportunidad ÚNICA de dar GRACIAS ABIERTAMENTE y dedicar estas palabras, a todas esas personas...que me han hecho ser quien soy. Que se han subido al tren de mi vida y me la han hecho tan BONITA.

Empezaré a dar las GRACIAS sabiendo TODOS/AS/ES...que "el orden de los factores no altera el producto"<sup>1</sup>.

Nombraré cada recuerdo y personas importantes en mi vida. Pero, seguramente...tras 34 años...alguien me falte o esté al final. Pero os QUIERO A TODOS POR IGUAL. LO SABEIS. O AL MENOS, INTENTO TRANSMITÍROSLO. DÍA A DÍA.

Gracias a esa persona 'Panadero de toda la vida'. Esa sonrisa inmensa, eterna. Esa persona que siempre me ha inculcado: "SE FELIZ. Acuéstate sabiendo que hoy...has cumplido! Yo ponía harina, aceite y sal, cada noche, y por la mañana TODOS me agradecían mi trabajo"<sup>2</sup>.

Gracias...a esa persona que...me ha querido de forma incondicional desde que nací. Que me ha llevado con ella a cada parte del mundo. Que es parte de mis 'HIJIS Y MAMIS'<sup>3</sup>.

Gracias...a esa persona que me sigue mirando y guiando DESDE EL CIELO. Se que estás con tu mejor vestido y tu mejor pintalabios, sonriendo mientras nos miramos<sup>4</sup>.

Gracias...por siempre creer en mí. A esa figura que tengo de: Firmeza. Valentía. CARIÑO. Disciplina. Por saber formar una familia tan bonita<sup>5</sup>.

Gracias...a esas DOS personas que han sido para mí, lo más parecido que he tenido a un hermano. Gracias por vuestro cariño, vuestra preocupación siempre por mí. Vuestros 'sin filtros contándome todo, hasta el infinito y más allá'<sup>6</sup>.

Gracias a esa persona SENSATA, modesta, de pocas palabras, pero increíbles, siempre. Ese cariño y amor eterno<sup>7</sup> y gracias por traer a casa a esa mujer tan DULCE siempre, tan agradecida y que desde el momento en que os llevé las arras...nos tenemos<sup>8</sup>.

Gracias a esas llamadas inesperadas. A tus DETALLES. Tu decisión de hacerme madrina de tu hija, al igual que mi padre el tuyo, y tú la mía. Gracias por hacerme formar parte de esa gran familia que has formado. Por tus sesiones de belleza en tu esteticien. Por tanto, siempre<sup>9</sup>.

Gracias a esos primos-Parra que siempre me han tenido como ‘la pequeña y me han CUIDADO “como si no hubiera un mañana”<sup>10</sup>.

Gracias a esos primos-Llorca-Canet. Porque siempre nos tenemos<sup>11</sup>.

Gràcies... a les meues ‘AMIGUES’. Per TOT I PER TANT. Per tantes clases compartides, festes, consells, moments i vida<sup>12</sup>.

Gràcies...a ‘OLIWOOD’. Perque sempre heu apostat per mi. I m’heu empoderat<sup>13</sup>.

Gràcies...a les meues ‘SANTIAGUERES’. ‘Bordel de estrellas tierra i mar, lo importante es CAMINAR’. Per ensenyar-me que...si volem... TOT ES POT. Que si li possem ganas i AMOR. A tot arribem. Que a pesar de les dificultats... ens tenim i lluïtem juntes. PER SEMPRE<sup>14</sup>.

Gràcies a eixa personeta amb qui compartisc ‘caixeta de RECORDS INFINTIS’<sup>15</sup>.

Gracias ‘CHATIS’<sup>16</sup> y ‘BARCO’<sup>17</sup>. Por coincidir con vosotras/os/es en la residencia y hacérmela vivir tan INTENSA Y BONITA.

Gracias mi ALMA GEMELA. Mi compañera diaria de vida. De anécdotas. Nos tenemos...a pesar de la distancia<sup>18</sup>.

Gràcies a eixes amigues del ‘Cole’...que segueixen amb mi a pesar de tants anys<sup>19</sup>.

Gràcies a les meues ‘PERRYS DOCTORS<sup>20</sup> i PERROS EN GENERAL<sup>21</sup>’. Amics de la carrera. Llarga, ho sabem, però inoblidable. Com pot ser que recorde eixa etapa amb tanta estima? Amb tants moments bonics? Amb tant viscut i après? Val. Si. Ho se. Gràcies a VOS :).

Gracias a mis ‘Co-R i mi Co-CoR’ ☺ por hacer que tantas horas en el hospital fueran increíbles. Nadie dijo que fuera fácil. ¡¡¡¡Conseguimos ser PEDIATRAS!!!! Pero nadie nos había dicho todo lo que había detrás. Pues ya os lo digo yo...que detrás estáis vosotros. Y fue duro, pero a vuestro lado...fue GENIAL<sup>22</sup>.

Gracias a mis ‘BRILLI-BRILLI’. Por hacerme llegar al trabajo con una sonrisa diaria. Por enseñarme que ‘LA VIDA ES UNA VERBERNA Y NO DEBEMOS DEJAR DE BAILAR’<sup>23</sup>.

Gracias a mis ‘SEÑORAS BIEN/EXPERTAS’. Porque me dais la vida. Día a día en Valencia. Me sacais muchas risas. Y mucho ánimo y comprensión<sup>24</sup>.

Gracias a mis compañeros de viajes...a cualquier rincón del mundo<sup>25</sup>.

Gracias a mi ‘FORMENTERA TEAM’. Amigas...sois magia :)<sup>26</sup>.

Gracias a mi ‘EMPRESA’. Que siempre apuesta, porque “ después del chaparrón, siempre sale el arco Iris”<sup>27</sup>.

Gracias a mis “SEMPRE UNITS”<sup>28</sup>.

Gracias a mi madre de Valencia<sup>29</sup>.

Gracias a mi INSPIRACIÓN musical. A mis maestras de PIANO e instructoras de vida<sup>30</sup>.

Gracias a mis R2-R3-R4-Adjuntillos jóvenes...Resis pequeños. Mi pequeña-gran familia Pediátrica<sup>31</sup>.

Gracias a esas personas INCREÍBLES que me enseña cada día el IMPRESIONANTE MUNDO DE LA NEONATOLOGÍA<sup>32</sup>.

Gracias a todos los ADJUNTOS de Pediatría que me han enseñado todo lo que se 'del niño que habla'. Desde equipo de Nutrición y Metabolopatías, Atención Primaria, Neurología, Lactantes, Escolares, Urgencias, Endocrino, Neumología y Alergia, Oncología, Gastro-Enterología, Cardiología, etc infinito<sup>33</sup>.

Gracias a mi experiencia post-MIR / Adjuntilla Joven, en territorio nuevo pero familiar, SIEMPRE: Hospital 9 Octubre. Consuelo. Hospital Universitario de Castellón. Manisses<sup>34</sup>.

A esa secretaria que me ha hecho todo tan fácil <sup>35</sup>.

Gracias al GIP: SOIS GRANDES!!!!!! Gracias por dejarme formar parte de vuestro equipo<sup>36</sup>.

Gracias a esas exbecarias. Que me dieron luz y calma para emprender este proyecto<sup>37</sup>.

Gracias a esas personitas de apoyo en mesa redonda<sup>38</sup>.

Thanks to my Dutch Family for welcoming me so well! I will be back when the Pandemic will finish, for sure!<sup>39</sup>.

Gracias a CADA PADRE/MADRE, RECIÉN NACIDO PREMATURO, ENFERMERAS, AUXILIARES, BANCO DE LECHE...sin vosotros. Esto no hubiera sido posible<sup>40</sup>.

Gracias a esas **GRANDES MENTES**...que me dieron la idea de este proyecto de tesis<sup>41,42,43</sup>.

**Y por último, pero no por ello menos importante, cómo Llorca-Canet et al.<sup>1</sup> nos había reseñado:**

Gracias **INFINITAS E INCONDICIONALES**...a **MIS DIRECTORES**:

Por toda su paciencia, dedicación, enseñanzas, horas invertidas en mi<sup>44,45,46</sup>. Detrás de este largo camino habeis estado vosotros, dándome ánimo y confiando en mi.

Gracias a mi **TUTOR**<sup>47</sup>.

Cada uno de vosotros...sabeis que esto ha sido una carrera de fondo. En todos los sentidos. Intelectual y personal. Sin vosotros...nunca hubiera llegado.

Dependía de mi, pero apoyada, nivel máximo, de mil personas increíbles a mi a alrededor, he llegado más rápido y sobretodo, más BONITO.

Y con todo concluyo que:

BAILEMOS<sup>48</sup>.

Anna Parra-Llorca<sup>∞</sup>

## BIBLIOGRAFÍA:

1. A mi MADRE. INMA. A quien debo TODO. A esa profesora de matemáticas que siempre tenía razón al resolver los problemas ☺ aunque yo no lo quisiera ver. Por toda su paciencia y dedicación. Por el interés para que estudiara. Por todo Tu AMOR incondicional. Por darme LA VIDA.
2. A mi PADRE. VICENTE. Que siempre me dice que “yo quería ser Panadera, trabajando de noche y vistiendo de blanco”. Gracias por enseñarme a sonreír siempre. Por tu interés en que hiciera deporte. Gracias por tus ‘sermonets’ de enseñanzas de vida y estar siempre ahí.
3. A mi TÍA ROSA. Mi segunda madre. De ella aprendí la inquietud por conocer mundo. Por viajar. Por aprender a conocer otras culturas y tener experiencias inolvidables. Todos deberíamos tener una ‘Tía Rosa’ en nuestra vida ☺.
4. A mi ABUELA RAMONA. Por enseñarme a organizar, limpiar, cocinar. Ser una VALIENTE en la vida. Por enseñarme el camino de Jesús, Juniors, acampadas, y todo lo que secundariamente eso me ha aportado en la vida. Por cada abracito eterno que siempre AÑORO. Por esos ‘sucesos y anécdotas’ que siempre me has contado. Por enseñarme esa parte de ‘presumida’ que siempre has tenido ☺. Estamos JUNTAS. Te Sueño cada noche. Se que HOY Y SIEMPRE ESTÁS AQUÍ.
5. A mi ABUELO VICENTE. Ese trabajador sin descanso. Ese labrador que tiene todas sus lesiones de la piel por tanto sol. Por esas naranjas tan sabrosas que siempre hemos tenido en casa.  
Se que hoy vistes tu mejor corbata, o pajarita ;). Se lo que significa para ti que tus 3 nietos estén bien e intenten llegar lo más lejos que puedan. Y lo estamos intentando. Tennes paciencia ☺. ‘TE QUIERO MUCHO ABUELO!’
6. JOSE VICENTE y JUAN RAMÓN. Mis súper-primos! Mi ‘TOP-SECRET’. Cuando nacisteis...yo tenía 9-10 años más. Esos juegos de ‘bomberos, policías, conductores de trenes, ingenieros de fábricas’... Pues aquí estamos. CUMPLIENDO NUESTROS SUEÑOS. Tan unidos cómo siempre o más. Gracias por vuestro cariño y hacerme formar parte de vuestras vidas.
7. A mi TÍO JOSE. PADRINO. Por tanta sabiduría, tanto saber estar. Tanto objetivismo de las cosas. Porque desde tu silencio...estás siempre.
8. A mi TÍA GEMA. Por tanto cariño siempre conmigo. Por tus consejos, tu saber escuchar. Por siempre tanto.
9. A mi PRIMA MAITE. MADRINA. Por darme calma siempre, de que todo llegará. Que no tenga prisa. Que sonría y tenga calma. Te hago caso ;) siempre tienes razón. Espero ser con Teresa todo lo que tu sido para mi. Mario y Toni también forman parte de este reto. Siempre :).
10. Als meus PARRETES. Sempre guiats per la IAIA MARIA (sigo teniendo esos rizos que te perdían :) i per el IAIO FRANCISCO. A la tia MARU i el tio PEPE. Al tio SALVA i la tia ROSITA. Al tio PACO i tia TERESA (que ens cuiden desde el cel). A cada un dels meus 9 cosins Parra. Parelles i fills. Per tindrem sempre tan mimada i fer-me sentir una més, a pesar de la diferència d’edat. Rafa, por llevarme en moto a ver a los reyes :), per cada missatge, cridaeta o dinaret en panderetes i versets nadalencs. Vos estime.
11. A mis primos i tios LLORCA. RosaMari: Eixos jocs amb la cuineta, eixes Barbies, bicis, patins, els playmòbils, eixos pesics que em feien espabilar ☺ Salva, Pere, Silvia, Natalia, etc. A mis tios i primos CANET. Gracias a todos por tanto.
12. A les meues ‘AMIGUES’: PER TOT. PER TANT. Luz...eres LUZ. Nada más que añadir que no sepas. Gracias por esos 5 años de convivencia, e incontables de amistad. Por tu calma. Tu paciencia. Tus consejos. Lucia (companya també de carrera). Pauli (companya també de ‘la capi’ ☺). AnnaF (encara no sabem qui ha copiat el nom a qui :) Gràcies per sempre estar. A qualsevol hora, en qualsevol lloc, en qualsevol moment. Per tant viscut. I tant que ens queda. SOU UNA DE LES MEUES MILLORS CASUALITATS.
13. A ‘OLIWOOD’. Per sempre tant. ‘El Mar’ (Manel). Aixó resumeix tot. Això, i ‘el pontet’. Tot s’ha de dir :) Xarraetes, escapaes, i confiar amb mi com a Pediatra i com a amiga.

14. A les meues 'SANTIAGUERES': EVA.....eixa ESTRELLETA que el món ha portat a la meua vida per a ajudar-me a trobar el camí :). Sara i la nostra aventura conductora amb besets de vaca inclosos, Trici i els nostres passejos pel Turia, Mar i les nostres xarraetes telefòniques eternes. VOS ESTIME INFINIT.
15. ESTER. Eté-Júlia-Pol-Thibs. Que dir-te que no sàpies. 4 anys. Col·legi Rebollet. Ballet. Anglès. Piano. Carrera. La vida ens ha fet fer un camí juntes. La vida i nostrales. Gràcies per fer-me Padrina del teu Fill. Gràcies per comptar amb mi sempre. Per preguntar-me. Per escoltar-me. Per aconsellar-me. Per confiar. Per ser de casa. Gràcies per tant i per SEMPRE.
16. A mis 'CHATIS': cómo puede ser hacer... algo tan sacrificado...tan INOLVIDABLE? Sí. Así sois. Anita, Carazo, Viri, Isa. Gracias por tantos consejos. Por tantas noches de guardia, escapadas, videoconferencias-cotilleos, CONSEJOS. Gracias por TANTO.
17. Esos PARCERITOS...que siempre nos han ofrecido fiesta eterna, BACHATITAS, conciertos, risas, viajes. Interconsultas a altas horas de la noche, siempre contestadas con el mejor cariño. Esteban, Dieguini, Jorge, Camilito, JoseTomás...TODOS. SIEMPRE.
18. MABEL. Poco puedo decir que no sepas. GRACIAS. Sólo Tu y Yo sabemos lo que hay detrás de esta amistad. "HEMOS VENIDO A SER FELICES...que nada nos distraiga "☺. Porque al final. Siempre sale el arco iris. O no, pero lo pintamos nosotras ☺.
19. Patty...esas llamadas anuales casi de: quedamos ahora ya? ☺ si. Siempre es un Sí. Rosa. Cridaetes inesperades de 'puesta al día'. Estic amb tu. Sandra...TATASHH. SempreJuntas ☺ Mónica, por tanto vivido. PER SEMPRE JUNTES.
20. A les meues 'PERRYS DOCTORS'. Suppose que açò no quedarà molt be escrit en una tesis ☺ però es que tinc tantes gràcies por donar-vos per TANT. Desde els primers canvis d'apunts en la carrera, els primers cafés, les primeres nits de pijama Disney, despedides, bodes, Tot. Desde TOT. GRÀCIES PER SEMPRE I PER TANT.
21. Als meus 'PERROS EN GENERAL'. DE CADA UN de vosaltres...HE APRÉS MOLT. A banda dels crèdits de lliure elecció (piragüisme, rem, vela, moros :) Desde cridaetes telefòniques infinites... (gràcies a eixes xarraetes crec que telefònica viu i tinc el MIR aprovat :) Per les cridaetes incondicionals d'ànims i carinyo, per els xistes infinits per whats'upp, per les guàrdies de UCIP\_N amb tanta seguretat i confiança els dos junts, PER CRÈIXER AMB TÚ durant 13 anys ☺ .
22. Gracias INFINITAS a mis Co-R. Llegamos como 12 desconocidos, con el mismo objetivo. Podría haber habido rivalidad...pero encontré apoyo, constancia, ánimos, amor. Puesta de guardias, noches en vela, pero también risas, villancicos y mucho, mucho compañerismo. POR SIEMPRE. PARA SIEMPRE. Por un compañero de vida y de viajes (Vic), por una compañera de misiones (Reich), por un apoyo diario (MariaRamon, RPayá), por el apoyo incondicional de todos/as (GABI, Hemir, Cata, Silvi, Rosita, Cami), por salvar km para seguir con la amistad (Leyre), por entendernos y apoyarnos e informarnos. Por confiar en mi en vuestros partos. Por todo. Por tanto. SIEMPRE.
23. BAILA LENTO. SUEÑA SIEMPRE. AMA MUCHO. SE VALIENTE. Aguar/Cer/Bru. No sabría por donde empezar. Por mi descubridora de Lucia-B y de que 'eres muy bonita'. Por mis DESCUBRIDORAS de artículos, estadística, proyectos científicos. Hacerme partícipe de vuestra vida familiar, del padel-surf, de los cuentos antes de dormir. De 'les xarraetes conciencia-todo de la taquilla' mientras nos ponemos ese traje de HEROÍNAS :) NO TENGO PALABRAS SUFICIENTES, POR TODO Y POR TANTO.
24. A mis 'SEÑORAS BIEN Y EXPERTAS'. ¿Qué decir? Que os quiero siempre en mi vida. Desde San y un Fitboxing y compresión/serenidad infinita, amor y viajes. Hasta unas llamadas de mi Ester de 'madurez ya por favor' que me hacen entender el mundo mejor y más fuerte. Lu pequeña y sus consejos, su saber escuchar, su compartir pleno. Lu Fer y nuestros viajes a la nieve cuanto más lejos mejor. Albita. MeryPorto. Amor eterno. TODO con vosotras.
25. VIAJES ETERNOS. Costa Oeste. Japón. Myanmar. Risas. Fotos. Paz. Tranquilidad... Adri y nuestras confesiones ETERNAS E INFINITAS. San Y NUESTROS CONSEJOS y cami-corre. LuciaFer Y NUESTRAS RISAS. Gracias... por sacarme en mis peores momentos. Gracias por enseñarme el MUNDO ☺

26. FORMENTERA TEAM...que os puedo decir? ¡Que me dais vida! Que siempre estais ahí para escuchar los Parri-Capítulos. Mi Martis, Jess, Perecita, MerySue, Mamen. ¡¡Que suerte teneros!!
27. A mi EMPRESA. Por esos amigos invisibles. Por ... estar SIEMPRE. Y comprender TODO. “Las personas que eliges en tu vida...reflejan el amor que siente por ti”. Gracias por Tanto. Antonio. Toni. Hector. Adell. Silvi. Macri. Volveremos a Piccadilly :)
28. AMICS DELS JUNIORS. JUANJO...SENSE PARAULES. Esmeralda. Gràcies per tan poca distància amb tants km. Fernando, Óscar, Carlos, Peris, Gema, Paco Pérez, Arturo, Pau, Anabel, Marta (i el nostre 31Oct)...Acampaes. Vivaks. Vivències. Camins...”SEMPRE UNITS”.
29. LILIANA. Gracias por ser mi madre de Valencia. Por estar siempre. Cualquier dia. A cualquier hora. Gracias por venir a vestirme cuando no llego a las cremalleras de los vestidos. Gracias por dejarme casa taaaaan ordenada y limpiita siempre. Gracias por tanto siempre.
30. Patri Gasqué. Dolores Medina. MÚSICA. PIANO. VIDA. LUZ. Cuantos años y cuanta sabiduría me habeis inculcado. Os conocí con 6 años...y hasta ahora. Esas neuronas que parecen que hacen sinapsis tras aprender música... las tengo por vuestro, esfuerzo, por vuestra paciencia, por vuestra dedicación. Hemos compartido muchas horas de música...pero también una forma de vida y muchos momentos personales. Os llevo siempre en el corazón. GRACIAS INFINITAS. Esther Molió, Paco, Victor, Noelia, Tobar...quantos hores de conservatori. De festes. De risas. Gràcies per Tot i per Sempre.
31. R-2-3-4...mis discípulos más cercanos. Y yo su mayor ‘follower’ ☺ Andrea...mención a parte de lo que significa AMISTAD. EN SU PLENO SIGNIFICADO. Esteban... y nuestra complicidad. LauritaTorrejón y nuestra CALMA. Cris y nuestras llamadas. FerBirl que brilla allá dónde va. Toni y nuestro rio. MaríaRodri y nuestras confesiones. EtcEtc. Vir. ☺ Paloma por tanto, Yolanda, Cris, Lucía, Prax, etcetc. No os puedo nombrar pero sabeis quién sois y cómo me habeis ayudado. A nivel científico y sentimental. Resis pequeños...esa alegría que me inspiraba a daros ‘esquemitas prácticos’ y a organizar QUEDADITAS NEGRITO y Noches de ‘cenar es de cobardes’, que nos daban la vida ☺ GRACIAS DE CORAZÓN.
32. A mis... GUÍAS NEONATALES. Cada día me levanto con una sonrisa porque voy a trabajar a gusto y se que voy a aprender algo gracias a vosotras/os y con vosotras/os.
- \*Isabel Izquierdo: que viaje tan compartido... “QUE SUERTE TENERNOS”. Gracias por tanta calma. Por estar. Siempre.
- \*Ana Gimeno, Pilar Saenz, Raquel Escrig: Por siempre CONFIAR. Por siempre ENSEÑARME. Por tanta docencia y vida compartida. Por TODO. Por TANTO.
- \*Ariadna: vas ser la meua primera llum a la Neonatología. Em vas ensenyar lo boniqueta que era.
- \*Guti! ¡Paco! Mención Especial. Grandes Mentes y Grandes Personas. Os adoro. Desde el dia que os conocí.
- \*Puri Marín: gracias por confiar en mi e intentar instruirme en tu sabiduría Dismorfológica.
- \*Nuria Boronat: Gracias por confiar en que les pase la postura del candelabro y paracaidista a estos bebés. No sabes cómo me preguntan por ti.
- \*Sergio. Santi. Jd: Gracias por esos ‘cafés matutinos’ ☺. Me dan vida.
- \*Toñi: ¿¿¿Pero que haría yo sin ti??? Gracias por ayudarme en mi tetrix para organizarme las guardias. Eres un cielo.

Gracias por vuestra paciencia. Por vuestra calma. GRACIAS AL EQUIPAZO EN GENERAL. Que suerte ir con una sonrisa a trabajar cada día. QUE SUERTE TENEROS.

33. A mis...ADJUNTOS DE RESIDENCIA DEL HOSPITAL LA FE. Que me han guiado durante todo este tiempo. Y me han hecho llegar aquí. No se poner nombres, Dr. Dalmau, Dr. Victoria, Dra. Gallego, Dr. Cortell, Dr. Tomás, Dras. Ferrer, Dra. Tellez, Dra. Polo, Dr. Aragón, Dra. Moreno, Dr. Ruiz, Dr. Fernández, Dr. Modesto, Dr. Ibiza. Dra. Vidal...Un largo sin fin

- de personas que han ido poniendo en mi su granito de arena para llegar dónde estoy ☺.  
Gracias.
34. Experiencia post-MIR...donde he iniciado nuevas amistades que perduran Tanto a nivel médico como de enfermería y auxiliares. OS ADORO. Gracias por traerme ‘mis libretas del saber’ para comprobar las técnicas :)  
9OCT: Manoli, Bea, Vane, Majo: gracias por tanto. RosaMerlos, RosaNavarro, Sonia, Antonia, JaviMiranda, SalvaMartínez. Gracias por confiar y contar conmigo.  
Castellón: Sandra (comprensió infinita, boomerang amb TOT. Amistat i feina tot a una :). Carlos (amics dsd sempre i per sempre). Irene. Carol. Ana E. Toni. Vicente, Arancha. TOTS. SEMPRE.
35. MARI... Qué dir? Que darrere de una pantalla.... I quan has posat tanta il.lusió per una cosa... sentir-te tan a prop. Amb noticies contínues. ‘No intentes entendre les FASES ☺ jajaja. ¡Val! Quina locura de papeleo i que calma tindret ahí.
36. GIP: Definido como Grupo de Investigación en Perinatología. Julia...sin palabras para expresar tanto apoyo y tanta confianza. Ana G. Robles... esos cafés mañaneros. Ese apoyo diario e incondicional. GRACIAS. Ana G. Blanco... a quien intento seguir y ser como ella. Gracias por tanta confianza plena.  
Ángel, David, Sheila... Gracias por compartir este camino conmigo.
37. ¡Albita! Bego! Cubells! Esto lo iniciamos juntas. Y lo acabamos juntas también.
38. Equipazo! MESAS REDONDAS. De consejos. De estar. De escuchar. De apoyar. Álvaro. Ale. Inma. Gracias. Esos "becarios-precarious-Motivados" ☺ ... gracias por contar conmigo. Ahora soy la ‘mayor’ y no se si llego a ser con vosotros como los que me enseñaron. Pero lo intento. Gracias por confiar. Por recoger mis cafés esparcidos por ahí y por confiar en mi ☺ para todo. Espero que sepais que me teneis, SIEMPRE.
39. Rotatorio externo. Tesis Internacional. Amsterdam. Dr. Tim de Meij. Dr. Van Goudoever. Thanks for that welcome. For make me feeling like at home. Thanks for invite me to your congress, to your hospital. Thank you for opening your home to me. Nancy, Sofía, Thomas, ... I will come back to do all the tinkgs that we have pending to do.
40. SERVICIO DE NEONATOLOGÍA DEL HOSPITAL LA FE. Equipazo. Gracias por cada llamada para recoger muestras, por interesaros por el estudio. Por preguntarme y apoyarme de forma altruista. Gracias a los padres que me han permitido recoger muestras para el estudio... con el fin de conocer cada día más acerca de estos bebés....mis PEQUEÑOS GRANDES HÉROES.  
Gracias Amparo Ramón. Por tu ayuda incondicional. Por tu calma y organización. Por estar siempre con tu mejor sonrisa. Gracias Toñi.
41. MARÍA GORMAZ...GRACIAS por estar siempre. Por tenerme en cuenta. Por tus ideas. Por tu sonrisa. Por confiar en mi.
42. MARÍA CERNADA... ¿qué faria jo sense tu?. La meua guia científica/espiritual ☺ Gràcies per tans minuts dedicats a mi. Davant de l'ordinador i davant de la taquilla. PER SEMPRE.
43. JULIA KULIGOWSKI. Te confieso que todavía sigo buscando tu apellido para no escribirlo mal :) Gracias por tu interés, paciencia, ganas de enseñarme y por hacerme recitar sin respirar palabras como ‘cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas’.



44. Al **Doctor Máximo Vento**. MI PADRE CIENTÍFICO. Por tanto. Por todo. No tengo palabras de agradecimiento. No se pueden plasmar. Por esos cafés de sabiduría y lluvia de ideas en Torre A con alguien tan GRANDE y tan cercano.
45. A la **Doctora MariaCarmen Collado**. Por confiar en mi. Por tenerme siempre presente. Por tanta ayuda y tanto apoyo. Por enseñarme tanto. Por ese MAMI y mil estudios más. POR UN PRINCIPIO DE UN TODO.
46. A la **Doctora Eva Serna**. Por ser tan cercana. Por esa paciencia. POR TODO LO QUE HE APRENDIDO A TU LADO, contigo. Esas largas horas de teléfono :) Por esa enseñanza sábados noches al teléfono. Nunca sabré como devolverte tanto.
47. Al **Doctor Federico Pallardó**, por confiar en mi y estar siempre disponible. Por siempre tan cercano. Por tanto. Por todo.
48. Quédate con lo bueno. Que HOY es TODO lo que tenemos y todo lo que necesitas es AHORA. Recuerda porqué empezaste y BAILA. Bailemos Óscar. Siempre. Bailemos :)

*∞ Me pregunto si las estrellas se iluminan con el fin de que algún día, cada uno, pueda encontrar la suya ☺ La verdad, nos hará libres :)*

Hay un tiempo para hacer que las cosas sucedan y un tiempo para dejar que sucedan las cosas.

Anna Parra-Llorca<sup>∞</sup>





**“ Quien no sabe lo que busca, no entiende lo que encuentra”**

Claude Bernard. Fundador de la Medicina Experimental.

# ÍNDICE

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
	<u>I.1. PREMATURIDAD.....</u>	<u>3</u>
	I.1.1. PREMATURIDAD: RELEVANCIA DE LA MICROBIOTA Y FACTORES QUE LA AFECTAN.....	4
	<u>I.2. PREMATURIDAD: RELEVANCIA DE LA ALIMENTACIÓN.....</u>	<u>11</u>
	I.2.1. LECHE MATERNA. COMPOSICIÓN.....	11
	I.2.2. BENEFICIOS DE LA LECHE MATERNA EN PREMATUROS.....	15
	I.2.2.1. EFECTO SOBRE LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES DE LA PREMATURIDAD.....	15
	I.2.2.2. EFECTO EN LA COLONIZACIÓN.....	15
	I.2.2.3. EFECTO ANTIOXIDANTE Y SU IMPORTANCIA EN LA PREMATURIDAD.....	16
	I.2.2.4. EFECTO DE LA LECHE MATERNA SOBRE LA EXPRESIÓN GENÓMICA.....	19
	<u>I.3. LECHE HUMANA DONADA.....</u>	
	I.3.1. DEFINICIÓN E IMPORTANCIA DE LA MISMA.....	22
	I.3.2. CONSECUENCIAS DE LA PASTEURIZACIÓN Y CONGELACIÓN.....	26
	I.3.3. NUEVOS MÉTODOS DE PASTEURIZACIÓN.....	28
	<u>I.4. LECHE DE FÓRMULA.....</u>	<u>29</u>
<b>II.</b>	<b>RAZÓN FUNDAMENTAL DE LA TESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>

<b>V.</b>	<b>POBLACIÓN Y MÉTODOS</b> .....	36
	V.1. Diseño del estudio.....	37
	V.2. Criterios de inclusión y exclusión.....	38
	V.2.1. Criterios de inclusión.	
	V.2.2. Criterios de exclusión.	
	V.3. Método de recogida y almacenamiento de muestras.....	38
	V.3.1. Recolección de muestras de heces.	
	V.3.2. Recolección de muestras de orina.	
	V.4. Diagramas de flujo de los pacientes reclutados en los diferentes objetivos.....	40
	V.5. Aspectos éticos.....	41
<b>VI.</b>	<b>CAPÍTULOS</b> .....	44
	 <b>CAPÍTULO I.</b> Parra-Llorca A, et al. “ <i>Preterm Gut Microbiome Depending on Feeding Type: Significance of Donor Human Milk</i> ” . <i>Front Microbiol.</i> 2018;9:1376.....	46
	 <b>CAPÍTULO II.</b> Parra-Llorca A, et al. “ <i>Does Pasteurized Donor Human Milk Efficiently Protect Preterm Infants Against Oxidative Stress?</i> ”. <i>Antioxid Redox Signal.</i> 2019;31:791-799.....	58
	 <b>CAPÍTULO III.</b> Parra-Llorca A, et al. “ <i>Impact of Donor Human Milk in the Preterm Very Low Birth Weight Gut Transcriptome Profile by Use of Exfoliated Intestinal Cells</i> ”. <i>Nutrients.</i> 2019;11:2677.....	69
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	84
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	98
<b>IX.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	101
<b>X.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	104

<b>XI. ANEXO. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....</b>	<b>116</b>
XI.1. <u>ANEXO 1</u> : Hoja de solicitud de leche humana donada en nuestra unidad.....	117
XI.2. <u>ANEXO 2</u> : Diagrama de flujo. Proceso de selección de madres donantes. Criterios de inclusión y exclusión.....	118
XI.3. <u>ANEXO 3</u> : Historia clínica con los datos solicitados a las madres donantes.....	119
XI.4. <u>ANEXO 4</u> : Carta de aprobación del CEIM.....	121
XI.5. <u>ANEXO 5</u> : Aceptación mención internacional de la tesis.....	125

## TABLA DE CONTENIDOS

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Factores que influyen en la colonización temprana de la microbiota y su impacto en la salud infantil. Adaptada del artículo: Collado et al. Gut microbes 2012 (1) (with permission).....	7
<b>Figura 2:</b> Transición fetal-neonatal y su relación con el estrés oxidativo. Adaptada del artículo: " Torres-Cuevas et al. Redox Biol 2017 (2) (with permission).....	8
<b>Figura 3:</b> Diagrama de flujo sobre el funcionamiento de la recogida, almacenamiento, tratamiento y dispensación de la leche humana donada.....	24
<b>Figura 4:</b> Diagrama de flujo de los pacientes reclutados en los diferentes objetivos del estudio.....	40
<b>Figura 5:</b> Diagrama de flujo del reclutamiento de pacientes y la recolección de muestras..	41
<b>Figura 6:</b> Alimentación de prematuros $\leq 32$ semanas de EG, $\leq 1.500$ gramos, con LM, LHD Y FP. Efectos sobre la microbiota intestinal, el estrés oxidativo en orina y la expresión genómica en CIEE.....	87

### ÍNDICE DE TABLAS:

<b>Tabla 1:</b> Beneficios de la Lactancia Materna.....	11
<b>Tabla 2:</b> Componentes de la leche materna.....	13
<b>Tabla 3:</b> Efectos de la Pasteurización tipo Holder sobre la LM. Adaptada del Artículo: Pelia et al. Nutrients. 2016 (3).....	27



## **ABREVIATURAS**

**8-OHdG:** 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**ADNr:** Ácido desoxirribonucleico ribosómico.

**ANOVA:** Análisis de la varianza.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.

**AUC:** Área bajo la curva.

**BLH:** Bancos de leche humana donada.

**CAT:** Catalasa.

**CD:** Células dendríticas.

**CIEE:** Células intestinales epiteliales exfoliadas.

**DBP:** Displasia broncopulmonar.

**ECN:** Enterocolitis necrotizante.

**EO:** Estrés oxidativo.

**FDR:** Tasa de descubrimiento falso.

**FiO<sub>2</sub>:** Fracción inspiratoria de oxígeno.

**FP:** Leche de fórmula de prematuros.

**GAG:** Glicosaminoglicanos.

**GLM:** Ganglio linfático mesentérico.

**GPx:** Glutación peroxidasa.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno.

**HIV:** hemorragia intraventricular.

**HTPP:** hipertensión pulmonar persistente.

**HMO:** Oligosacáridos de la leche humana.

**IgA:** Inmunoglobulina A.

**IL:** Interleuquina.

**INF-1:** Interferón 1.

**IsoFs:** Isofuranos.

**IsoPs:** Isoprostanos.

**Lf:** Lactoferrina.

**LF:** Leche de fórmula.

**LHD:** Leche humana donada.

**LM:** Leche materna.

**LPV:** Leucomalacia periventricular.

**M-tyr:** Meta-tirosina,

**MAMP:** Patrón molecular asociado a microbiota.

**NeuFs:** Neurofuranos.

**NeuPs:** Neuroprostanos.

**NF-κB:** Factor de transcripción nuclear kappa B.

**O-tyr:** orto-tirosina.

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>**: Radical superóxido.

**O<sub>2</sub>**: Oxígeno.

**•OH**: Radical hidroxilo.

**PaO<sub>2</sub>**: Presión parcial de oxígeno arterial.

**qPCR Cuantitativa**: Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa.

**RNPT**: Recién nacidos prematuros.

**RNS**: Radicales libres de nitrógeno.

**RNT**: Recién nacido a término.

**ROP**: Retinopatía del prematuro.

**ROS**: especies reactivas de oxígeno

**SOD**: Superóxido dismutasa.

**SpO<sub>2</sub>**: Saturación parcial de oxígeno.

**TGF-β**: Factor de crecimiento transformante beta.

**TGI**: Tracto gastrointestinal.

**TLR**: Receptores tipo Toll.

**TNF-α**: Factor de necrosis tumoral alfa.

**TRx**: Tiorredoxina.

**UCIN**: Unidad de cuidados intensivos neonatales.

# ABSTRACT

## INTRODUCTION

Worldwide, 15 million babies are born prematurely each year, which is to be estimated at approximately 11% of all births, with an increasing tendency in most of the countries.

The neonatal period is an exceptionally vulnerable period of life during which not only full-term newborns but also, and especially premature ones have, compared to other stages of life, an increased risk of mortality and morbidity that can lead to permanent neurocognitive, motor and sensory sequelae, thus constituting a major economic and social problem.

Annually, prematurity causes about 1 million deaths worldwide. Whereas neonatal deaths in premature newborns have decreased over the last 20 years, especially in countries with high development rates, it remains the leading global cause of neonatal mortality and recently also the leading cause of infant mortality in children under the age of five.

The first 1,000 days of life are considered an essential period due to the high energy and nutrient needs associated with the rapid growth and development observed during antenatal and postnatal periods. This is also a critical period in metabolic, immunological, cognitive and educational development. An adequate microbial colonization during this period is essential for proper maturation of the immune system, metabolism as well as the development of the central nervous system, encouraging the maturation of cognitive and sensory functions, such as vision. Microbiota alterations can have important health consequences.

Microbial colonization in the neonatal period is affected by gestational age, antibiotic treatment, birth type, and also by the kind of feeding.

**Breast milk (BM)** has been recognized as the gold standard for human nutrition.

Beyond nutritional components, perfectly suited to infant requirements, BM is a complex and living fluid, which contains important bioactive compounds such as oligosaccharides (prebiotics), carbohydrates, cytokines, immune cells, lysozyme, lactoferrin, immunoglobulin, microorganisms (probiotics), fatty acids and proteins, among others, that directly influence in the baby's development and it also induces colonization of guts microbiota.

Those bioactive compounds are considered not only protectors but also stimulators of growth and neurodevelopment along with the maturation of the immature immune system.

In turn, they modulate metabolic and inflammatory conditions in late childhood and adulthood, signally when the individual has had contact with them during the first months of life. Early exposure reduces the risk of developing certain kinds of diseases such as inflammatory bowel diseases, gastrointestinal, respiratory, allergy, and so on...Furthermore, breastfeeding practices have been associated with a reduction in the risk of Late on Sepsis and Necrotizing Enterocolitis (NEC) in premature newborns. Particularly, for this last one any volume of BM is better than preterm formula (PF), and the higher the dose, the greater the protection.

On the other hand, oxygen is one of the most critical components of life.

To accomplish the perfect balance between protection and lethality is a complex process. The role of oxygen in energy metabolism is to be an electron acceptor in the respiratory chain. By accepting four electrons, it reduces to water, but a small portion of the oxygen requires four steps for this process to be completed. Each intermediate step occurs within the mitochondria and generates reactive oxygen species (ROS), including radical superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. Superoxide and hydroxyl radicals are free radicals and therefore highly toxic and have the capacity to destroy cell membranes through lipid peroxidation, structural and enzymatic proteins and DNA oxidation. Free radicals can interfere with protein folding and unfolding, which leads to a dysfunction or anomalies at the structure levels.

The fetal-neonatal transition of newborn is a physiological oxidative stress.

Full-term newborns have an antioxidant defense system that will protect them against increased production of oxygen-free radicals (ROS) and nitrogen (RNS). Nevertheless, premature newborns have an immature antioxidant defense system. Stabilization of those ones in the maternity ward often requires ventilation administration with positive pressure and oxygen supplements, which leads to the generation of ROS and oxidative stress.

The same happens for other provided treatments such as phototherapy, parenteral nutrition, mechanical ventilation or antibiotics, among others. All this steers to high production of ROS/RNS as for pathological levels of oxidative stress with severe oxidative damage to macromolecules, which contribute to the development of serious complications, mediated by these inflammatory markers, such as bronchopulmonary dysplasia, retinopathy of prematurity, intraventricular hemorrhage and NEC, among others.

Human milk (HM), therefore, provides antioxidant protection and thereupon premature newborns fed with human milk presents lower levels of biomarkers related to oxidative stress than those fed with formula.

There is growing evidence that nutrition plays an important role in regulating neonatal development and intestinal function. Detailed functions of milk-specific bioactive molecules, and different types of milks (BM and PF), modulate the newborn's immune system. Gene regulation is different depending on the type of feed.

It has been observed that at bovine colostrum levels; a study proved that it can protect and preserve the integrity of the intestinal mucus barrier in the host by controlling the expression levels of early and late inflammatory genes after the invasion of enteric pathogens.

In cells exposed to skimmed BM, seventeen differentially expressed genes were found, most of them up-regulated, including four chemokine genes (CXCL1, CXCL2, CXCL3, and CXCL10) and other immunity-related genes.

**Pasteurized donated human milk (DHM)** is the best alternative in premature children under 32 weeks of gestational age, lighter than 1.500 grams, when mother's own milk (OMM) is not available.

The proven benefits of feeding newborns with DHM versus artificial formulas are for a short-term: protection against necrotizing enterocolitis, nosocomial infection and better enteral tolerance. For the long term, they have a better neurodevelopment than those fed with formula and a lower cardiovascular risk during adolescence.

DHM must be processed to ensure its microbiological safety aimed at eliminating hazardous bacteria and ensuring the absence of viruses. The heat type treatment used by most milk banks to inactivate viral and bacterial agents is pasteurization using the Holder method, which is characterized by subjecting breast milk to a temperature of 62.5 °C for 30 minutes and then cooling it quickly in less than 15 minutes to 4 °C. Pasteurization causes the loss of some of the biological, structural and functional properties of HM since it promotes cell destruction (including B and T lymphocytes) and bacteria, as well as partial or total alteration of the structure and function of some of its components. Therefore, new pasteurization techniques are being designed to minimize the impact on milk components, such as the *High Temperature Short Time (HTST)* method or high pressure processing (HPP).

Nonetheless, little is known about the effect of DHM on the gut microbiota on premature and the possible biological implications, over whether it protects against oxidative stress and what changes it produces on genomic expression in exfoliated intestinal cells.

## **OBJECTIVES:**

Our objective was to determine the impact of DHM on the gut microbiota, oxidative stress in urine and genomic expression in exfoliated epithelial intestinal cells (EEIC), in premature newborns admitted to a reference neonatal intensive care unit.

## **POPULATION AND METHODS:**

A cohort, prospective, observational and unicentric study was carried out where all newborns are included for a period of 12 months,  $\leq$  32 weeks gestational age,  $\leq$  1.500 grams, admitted in the Neonatology Unit of the University and Polytechnic Hospital La Fe (Valencia, Spain).

Fecal and urine samples of 69 preterm were collected, when the neonates reached complete enteral feeding (defined as  $\geq$ 150 cc/ kg / day). There were 3 groups: neonates fed with OMM, DHM or FP.

According to neonatal unit protocols, full OMM feeding was attempted in all cases, but was not achieved in all patients. Two groups of patients were recruited, depending on the main type of diet,  $\geq$ 80% of nutritional intake with OMM or DHM. When it was necessary, DHM or OMM was provided respectively to complete the total volume. A third group in which the parents refused to feed the premature with OMM or DHM, was fed with FP.

Daily intake was provided with OMM or DHM to reach the prescribed feeding volume. Patients in the DHM group only received milk from one donor. Nutritional intake was controlled, but it was never influenced by this observational study.

No differences in prenatal demographic characteristics or confusion factors were found during hospitalization between the three groups so the populations were comparable in the 3 studies.

The study was approved by the scientific committee for biomedical research (CEIm) (#2015/0317) of the University and Polytechnic Hospital La Fe. All parents accepted and signed for informed consent.

The composition of the gut microbiota was analyzed by sequencing the 16S RNAr gene. The total fecal DNA was ingested using the MasterPure full RNA and DNA Purification Kit (Epicenter, Madison, WI, USA). According to the manufacturer's instructions with modifications that included a disruptor step and incubation of enzymes to increase DNA extraction as described elsewhere (31). Total DNA concentration was measured using a Qubit® 2.0 fluorometer (Life Technology, Carlsbad, CA, USA) And it was normalized to 5 ng/L for the amplification of the 16 S RDD gene (region V3-V4) using the Nextera XT Index

kit. The amps were verified with a Bioanalyzer DNA 1000 chip and the libraries were sequenced using a paired 2x300pb cycle (MiSeq Reagent kit v3) on a MiSeq-Illumina platform (FISABIO sequencing service, Valencia, Spain). Controls during DNA extraction and PCR amplification were also included and sequenced.

The data was obtained using RStatistics (r Core Team, 2012) (32) and data processing was done using QIIME (version 1.9.0) (Coaporaso et al. 2010).

The determination of biomarkers of oxidative damage to DNA and proteins in urine samples of premature newborns, as well as lipid peroxidation biomarkers mediated by individual free radicals, was performed following a pre-validated Ultra Performance liquid chromatography method - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The samples were analyzed using a Waters Acquity-Xevo TQ system (Milford, MA, USA.). LC-MS/MS data was acquired and processed using MassLynx 4.1 and QuanLynx 4.1 (Waters, Milford, MA, USA), respectively. Biomarker concentrations below the LOQ were replaced by 0.5xLOQ prior to data analysis. Data analysis was performed at Matlab 2017a of The Mathworks (Natick, MA, USA) and SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

The total RNA of EEIC was processed for the expression analysis of the entire genome. Total RNA was isolated directly from fecal samples using the Trizol reagent (TRIZOL, Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), Followed by a polyA<sup>+</sup> RNA enrichment step to remove polluting DNA and bacterial RNA using ONLY the mRNA™ Eukaryotic mRNA isolation kit (Epicenter Analytics Inc., Etobicoke, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. The RNA integrity number (RIN) was tested using bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and the concentration and purity of RNA were determined using a spectrophotometer (GeneQuant, GE Healthcare Biosciences, German, Europe). The 260/280 ratio and integrity of RNA between the two populations were compared using the T-Student test. The values of RIN> 6 were considered optimal for hybridization and were statistically similar (p-value s 0.6).

The synthesis of CDDs and NCDs, marking, hybridization and scanning of samples were performed in accordance with the WT plus Reagent Kit Manual (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). To prepare the hybridization cocktail, 5.5 g of fragmented biotinylated cRNA was used. Subsequently, this cocktail was hybridized in the Clariom S Human micro-matrix for 16 hours at 45 °C (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). This microarray contains more than 20,000 well-annotated genes. The microarray used is specific only to the human organism.



Raw data was imported into Partek Genomics Suite v6.6 (Partek, Inc., St. Louis, MO, USA) Like CEL files. Raw data was preprocessed, including background correction, normalization, and summary using robust multi-array average analysis (RMA) and then transformed into log<sub>2</sub>.

## RESULTS:

Despite greater variability, no differences in diversity and microbial wealth were found, even though the type of diet significantly influenced the composition of the gut microbiota in preterm ones and in the predictive functional profiles.

Significant differences in microbiota composition were unveiled depending on the type of feeding. We found a lower relative abundance of *Firmicutes* (30.9 vs. 45.5%, p value s 0.029) and a higher abundance of *Actinobacteria* (20.1 vs. 10.2%, p-value x 0.040) in the OMM group in comparison with DHM.

At the family level, a higher abundance of *Bifidobacteriaceae* (19.5 vs. 9.0%, p-value x 0.027) and a lower abundance of *Clostridiaceae* (3.7 vs. 11.2%, p-value x 0.029) were observed in the OMM group, compared to DHM (Figure 1B). At gender level, greater levels of *Bifidobacterium* (19.5 vs. 8.98%, p-value x 0.027) and *Unclassified Enterobacteriaceae* (29.77 vs. 18.48%, p-value s 0.060) and lower levels of *Citrobacter* (2.60 vs. 9.83%, p-value x 0.060), and *unclassified Clostridiaceae* (3.46 vs. 9.43%, p-value x 0.062) were observed in fecal OMM samples in comparison with the DHM group.

At the bacterial family level, OMM samples were more upgraded in the *Bifidobacteriaceae* family, compared to DHM samples (LDA x 4.90, value p s 0.025) whereas the DHM samples were more enriched in the family *Staphylococcaceae* (LDA x 4.63, p-value ≤0.042) and *Pasteurellaceae* (LDA -4,358, p-value -0.050).

The DESeq2 test was applied to identify differential abundances of specific bacteria among feeding groups. The *Actinobacteria Edge* was greater in OMM compared to the LHD group (20.07 vs. 10.25%, p-value x 0.0044, FDR x 0.013). The profusion of *Staphylococcus* (value p <0.0001, FDR <0.0001), *Clostridium* (value p <0.0001, FDR s 0.0013), *Serratia* (value p <0.0001, FDR s 0.0022), *Coprococcus* (p-value s 0.0021, FDR s 0.012), *Aggregatibacter* (value p x 0.015, FDR s 0.059) and *Lactobacillus* (p-value s 0.056, FDR x 0.18) was significantly larger in the DHM group than in the OMM group. Nonetheless, *Bacteroids* (p<0.0001 value, FDR s 0.0044), *Acinetobacter* (value p <0.0001, FDR s 0.002) and

*Haemophilus* (p-value  $\leq$  0.0014, FDR  $\leq$  0.009) were significantly greater in those nourished by OMM than in those nurtured with DHM.

The redundant multivariate discriminant analysis based on the observed OTU unveiled statistically significant differences in microbial composition between the groups (OMM, DHM, PF) ( $p < 0.001$ ). A significantly higher relative abundance of *Firmicutes* (p-value  $\leq$  0.027, FDR  $\leq$  0.016) was observed in the Formula group in comparison with OMM and DHM. At the gender layer, the greater *significant abundance of Blautia* (p value  $< 0.001$ , calibrated p-value  $\leq$  0.033, FDR  $\leq$  0.033), strep (p value  $\leq$  0.0024, FDR  $\leq$  0.054), Acidaminococcus (p value  $\leq$  0.0093, FDR  $\leq$  0.099), Rothia (p value  $\leq$  0.0059, FDR  $\leq$  0.088) and *Dorea* (p value  $\leq$  0.011, FDR  $\leq$  0.099) were perceived in the Formula group in comparison with the OMM and DHM groups.

Premature newborns nourished with DHM showed microbial profiles closer to those fed with OMM.

The central core of the gut microbiome in preterm is composed of a total of 15 shared genera, regardless of the diet type of diet. The genus *Acinetobacter* was present exclusively in the OMM group; while the genus *Coprococcus* was present in the DHM group and the genus *Peptostreptococcaceae* not classified in the Formula group.

The test of the size of the effect of linear discriminant analysis showed that in the Formula group there was more enrichment of *Rothia genera, Streptococcus and Acidaminococcus*, in comparison with the OMM and DHM group, while the OMM group was more enhanced with the genera *Bifidobacterium, Acinetobacter and Haemophilus*, by way of comparison with DHM, which represents a distinctive mark for the gut microbiota of breastfed preterms.

The PICRUSt inferred metagenomic prediction revealed significant differences in the main functional classes (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG categories at level 2), derived from functional acquisitions associated with different diets (multivariate RDA test,  $p < 0.007$ ).

Furthermore, no different metabolic profile was discovered (RDA test value  $p > 0.05$ ) when comparing the preterm ones nourished with OMM and DHM, whereas the functional profile of the Formula group was significantly different from those observed in the OMM group (p RDA test value  $\leq$  0.024) and DHM (RDA test, p value  $\leq$  0.002).

The ADCP to identify specific groups of functional activity (KEGG level 2 and 3) of the gut microbiome in preterm ones according to the type of diet (Figure 5B) suggests a different KEGG activity. The functional activities of the gut microbiome of those fed with OMM and DHM presents more similarities among them than those observed in the Formula group.

Inferred metagenomic analyses manifested that a greater presence of the genus

Bifidobacterium in the breast milk group was related to biosynthesis route enrichment and glycan metabolism, which was not identified in DHM-fed or formula-fed groups of preterms.

Moreover, the non-invasive in vivo evaluation of oxidative stress revealed no statistically significant differences in any of the 22 biomarkers in urine, between the two groups (OMM vs. DHM) when they reached full enteral nutrition (150 ml / kg / day).

As a further matter, changes in urine biomarker levels were evaluated in urine 1, 2 or 3 weeks later (up to hospital discharge). (Value  $p > 0.05$ , Wilcoxon rank sum test). This is the first longitudinal study on oxidative stress levels in DHM-fed preterms compared to OMM-fed preterms.

In order to study the longitudinal evolution of oxidative stress biomarkers, the mean values and the interquartile ranks of each biomarker detected throughout the study of the population (OMM and DHM) were evaluated at different stages. Urinary levels of 8OHdG/2dG remained unchanged. 11 out of 15 detected individual isoprostanes and related substances, as well as total NeuroPs and NeuroFs remained unchanged during the study period. However, as shown in Figure 3, the o-Tyr/Phe ratio, four individual isoprostanes, total IsoPs, total IsoFs, and total dihom-IsoFs changed significantly during the study period ( $p < 0.05$  values, Wilcoxon rank sum test).

Regarding the analysis of genomic expression in EEIC, a total of 47 premature newborns less than 32 weeks gestation and /or less than 1.500 g of birth weight who received OMM (n= 27) or DHM (n= 20) were included in the study.

We performed a Principal Component Analysis (PCA) of gene expression in EIC for premature newborns less than 32 weeks of gestational age, three-dimensionally, simplifying the identification of patterns and sources of variability in a wide set of data. There is a great similarity observed between the OMM and DHM groups, although there is 12.1% variability between both groups.

Differentially expressed genes (DEGs) derived from the ANOVA analysis ( $p < 0.05$  value) revealed statistically significant changes in 1629 genes of EIC, in pretermes nourished with OMM vs. DHM. Within those, 807 genes were up-regulated (49.5%), and 822 were down-regulated (50.5%) OMM groups, in comparison with the DHM group.

Election gene criteria for choosing most of the over and under expressed genes in newborn pretermes nourished with OMM in comparison with those who were nurtured with DHM, was the fold change absolute value of  $| 1.6 |$ .

The OMM group overexpressed the lactalbumin alpha gene (*LALBA*), the cytochrome C oxidase subunit I gene (*COX1*) and the casein kappa gene (*CSN3*), the beta gene (*CSN2*)

and the alpha gene (*CSN1S1*) and the neutrophil cytosolic factor gene 1 (*NCF1*) was down-expressed in comparison with the DHM group.

This explains the lack of activation of inflammatory pathways, the formation of non-inflammatory cytokines and the blocking of oxygen-free radical generation (ROS). Afterwards, we performed a gene validation for the genes COX1 and NCF1 by means of a Real time- PCR.

## **DISCUSSION AND CONCLUSIONS:**

In relation to the microbiota, our results have shown that the type of feeding received in premature newborns  $\leq 1.500$  grams /  $\leq 32$  weeks gestational age, has a significant impact on the intestinal microbial composition of them. Thereby, our results unveiled that the microbial profiles induced by OMM vs. DHM were different.

By adjusting by gender, gestation age and birth weight, it could be verified that the diversity of the gut microbiota increased with postnatal age and was always higher in OMM-fed infants in comparison with infants nourished by other types of feeding.

Lastly, in those preterm nourished with formula, the microbial profile was different from those observed in OMM and DHM, suggesting that DHM favourizes an intestinal microbiome more similar to that induced by OMM, despite the differences among the characteristics of both milks. This could have potential long-term beneficial effects on intestinal functionality, the immune system and metabolic activities.

KEGG profiles in DHM and OMM found in our studies indicated that they were more similar between both, than those observed in formula-fed preterms. The functional profile of OMM-fed preterms is mainly represented by the bacterial secretion system, the biosynthesis of LPS and proteins, which would be mainly related to the presence of Gram-negative bacteria. Curiously, we did observe a significant reduction in the biosynthesis of LPS and proteins in formula-fed preterms compared to those fed OMM or DHM (without differences among them).

In our context, OMM and DHM modulates the gut microbiota in premature newborns causing an enrichment of *Bifidobacterium spp.* and *Bacteroides spp.* that could promote specific LPS signaling and its contribution to the immune system. The FP group reported a significant reduction in comparison with the groups that received OMM or DHM in the

functions derived from the presence of oligosaccharides and involved in complex carbohydrate metabolism (e.g. glucan biosynthesis).

These differences could be explained by the profusion of metabolizing bacteria of oligosaccharides such as *Bifidobacterium* and *Bacteroides spp.* in the intestine of pretermatures fed with OMM and DHM in comparison to those nourished by the PF.

In our study, we also unveiled enhancement of the functions related to fatty acid metabolism and sulfur/nitrogen metabolism in the OMM and DHM groups. Several enteric and oral bacteria can produce reduced sulfur and nitrogen and perhaps some specific bacteria, such as *Deltaproteobacteria*, *Clostridium spp.*, *Veillonella spp.*, *Rothia spp.*, would be responsible for this functional contribution, as they are enriched in the DHM group and also in the OMM group.

In the metagenomic of formula-nourished preterms, we did observe the enhancement of KEGG functions related to sugar metabolism such as galactose metabolism, which is involved in the conversion of galactose into glucose. This could arise due to the consumption of formula and/or dairy products. KEGG functions related to the metabolism of amino sugars and nucleotides are also enriched in this group.

By and large, minor differences in functional profiles were distinguished between those preterm nourished with OMM and DHM, suggesting the potential effect of DHM by imitating the functionality of the microbiome induced by breast milk feeding. These results are promising and would open up new and further possibilities in future research.

Nevertheless, we did appreciate two important factors that could influence the differences found in the gut microbiota of OMM-nourished or DHM-fed preterms.

The first factor would be related to the time of milk extraction in relation to gestational age and lactation phase. While OMM is the biological product of prematurely discontinued gestation, DHM comes mainly from mothers who have full-term neonates, and begin donation at least 3 months after birth. It is, therefore mature milk, with a change in its composition with respect to a mother's milk with preterm birth. Whilst breast milk is highly variable among individuals, postnatal age and gestational stage (preterm versus term) were discovered to be important predictors of breast milk composition. Thus, colostrum encloses more proteins, fats and lactose in both premature milk and full-term milk, compared to mature milk. As milk matures, over time there is a change in its composition. That compendium of factors is indispensable not only for proper nutrition but also to promote microbiota colonization.

The second factor would be allied to the pasteurization procedure which inevitably alters thermolabile components, some of which are essential.

Thereby, the differences found in the fecal microbiota of OMM vs. DHM-fed preterms would be explained, at least partially, by the different composition of the nutrient received and its bioactive compounds such as immune markers, microbiota, oligosaccharides, neurotrophic and growth factors, among others.

No significant statistically differences were found in the levels of a complete panel of oxidative stress biomarkers, suitable for non-invasive in vivo evaluation, in urine of premature newborns of both groups. Based on these results, we hypothesize that DHM, despite pasteurization, is a valid alternative when OMM is not available, inasmuch as it protects preterms from oxidative stress as well as OMM, accordingly preventing them from conditions associated with free radical damage and immature antioxidant defenses and, consequently, its use could prevent diseases related to it.

The study of genomic expression in EEIC, microbiome and volatile acid compounds allows to investigate host-microbiota mutualism interactions in the infant in a non-invasive way and could be used to prospectively study intestinal development or, preventively, to identify possible triggers of disease (sepsis, NEC). For this reason, diverse authors affirm that nutrition plays an important role in regulating neonatal development and intestinal function and its target was to identify sets of genes (combinations) that are regulated in a differential manner in response to the type of food.

Using a pre-validated non-invasive sample collection method, we analyze the transcriptional profile of OMM vs. DHM-fed preterms.

Our results revealed overexpression of genes of different types of caseins and lactalbumin in preterm OMM-nourished newborns. These changes are consistent with the higher protein content of milk obtained from preterm mothers compared to full-term mothers who donate mature milk, starting at 3 months of delivery and donating mature milk to the bank.

It was also shown that OMM induced a differential expression of specific genes that would contribute to a more efficient response to an early pro-oxidant challenge in the postnatal period when preterm have an increased risk of oxidative stress, due to the differential expression of highly specific genes, such as *COX1*, *PPAR-alpha*, *NCF1*, and *NF-B*.

We show that in preterm OMM-nourished newborns, the expression of *NCF1* is down-regulated and, at the same time, *COX1* is up-regulated. These changes could explain why OMM has better anti-inflammatory and antioxidant properties than DHM. The codified protein by this *NCF1* gene is a cytosolic subunit of neutrophil NADPH oxidase. This oxidase is an enzyme that is activated to produce superoxide anion and subsequently oxidative stress.

The down-regulation of *NCF1* also reduces cytokine production; therefore, it plays an essential role in modulating autoimmunity, immune processes, inflammation, proliferative responses and apoptosis.

The *COX1* gene regulates the flow of electrons through the mitochondrial electron transport chain and the formation of H<sub>2</sub>O, consequently reducing the generation of free radicals and, secondarily, the activation of pro-inflammatory pathways. Moreover, *COX1*, through interaction with the HSPA8 chaperone protein, also plays an important role in prooxidant conditions, such as hypoxia-reoxygenation by inactivating *NF-KB* and pro-apoptotic pathways. Furthermore, the alpha receptor activated by peroxisome proliferator (*PPAR-α*) also inhibits *NF-KB*, but not the stress-activated protein kinase.

Differences in the gut microbiota induced by a different diet could be a potential mediating role in inducing changes in gene expression profile. But systemically, no differences in oxidative stress levels between LM and LMD are observed.

All in all, the 3 studies underlined the importance of the use of OMM in preterm babies under 32 weeks, less than 1500 grams. On the other hand, breast milk banks providing OMM for the nutrition of preterm must be promoted in situations where OMM is unavailable or the volume is insufficient.

By the same token it is necessary to promote improvements in pasteurization methods in order to upgrade the conservation of essential components of OMM and consequently to hone the quality of DHM.

## CONCLUSIONS:

1. Donor human milk favors the development of a gut microbiome that resembles the microbiome acquired by infants nourished by their own mother's milk more than microbiome in formula fed infants. Nonetheless, preterm infants nourished donor human milk, have a distinct microbial profile but shortage in the microbial diversity and richness present in the gut microbiome of infants fed with own's mother milk.
2. Despite these differences, donor human milk confers beneficial potential effects upon intestinal functionality, immune system and metabolic activities.
3. Preterm infants nourished with donor human milk have similar antioxidant capacity as preterm fed own mother's milk as reflected in the level of urinary biomarkers of oxidative damage to proteins, DNA or lipids.
4. The variability in terms of transcriptomic expression in exfoliated intestinal cells was 12.1% between own mother's milk and donor human milk. Nevertheless, 1629 genes were differentially expressed between both groups.
5. The candidate genes with different expression between preterm nourished with own mother's milk and donor human milk were Lactalbumin alpha (*LALBA*), Casein kappa (*CSN3*), Casein beta (*CSN2*), Casein alpha-1 (*CSN1S1*), Cytochrome C oxidase subunit 1 (*COX1*), Neutrophil cytosolic factor 1 (*NCF1*).
6. The biological analysis of these genes indicates that donor human milk possesses a lower anti-inflammatory potential than its own mother's milk. This is important in terms of its ability to protect against pathogens and the development of necrotizing enterocolitis.
7. Notwithstanding the differences, our studies show many data in favor of important advantages of donor human milk over formula milk. Conversely, new pasteurization methods that preserve the integrity of donor human milk should be developed.





**“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”**

Albert Einstein.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## I. INTRODUCCIÓN.

A nivel mundial, 15 millones de neonatos nacen prematuros cada año, lo que se estima en aproximadamente el 11% de todos los partos, con tendencia al alza en la mayoría de los países (4). El período neonatal es un período de vida excepcionalmente vulnerable durante el cual los recién nacidos a término (RNT) pero especialmente los recién nacidos prematuros (RNPT) tienen, comparado con otras etapas de la vida, un mayor riesgo de mortalidad y morbilidad que puede conducir a secuelas neurocognitivas, motoras y sensoriales permanentes, constituyendo así un grave problema de salud económico y social.

En este escenario, diversos estudios han mostrado una relación entre riesgo de enterocolitis necrotizante (ECN) y sepsis en prematuros y alteraciones en la microbiota intestinal (5) . Además, se ha descrito que el patrón de colonización microbiana se relaciona claramente con la edad gestacional y el tipo de parto, así como a la exposición a antibióticos (6,7), pero también con la nutrición infantil (8). Con todo ello, la relevancia de la alimentación en esta población de recién nacidos prematuros, está relacionada también con el importante poder antioxidante que otorga de la leche materna, que previene el desarrollo de patologías relacionadas con el estrés oxidativo con complicaciones graves, como la displasia broncopulmonar (DBP), la retinopatía de la prematuridad (ROP) o la hemorragia intraventricular (HIV), hipertensión pulmonar persistente (HTPP), ECN, entre otras (9,10).

Hay cada vez más evidencia de que la nutrición desempeña un papel importante en la regulación del desarrollo y la función intestinal neonatal (11). Las funciones detalladas de las moléculas bioactivas específicas de la leche, así como los diferentes tipos de leches (leche materna (LM) y leche de fórmula (LF)), en la modulación del sistema inmunológico del recién nacido y en los conjuntos de genes que se regulan de manera diferencial en respuesta al tipo de alimentación, se han investigado previamente *in vitro* e *in vivo* y actualmente son objeto de una intensa investigación para su traducción a aplicaciones clínicas.

## **I.1. PREMATURIDAD.**

Se considera prematuro un recién nacido (RN) vivo antes de que se hayan cumplido 37 semanas de gestación. Los RNPT se clasifican en subcategorías en función de la edad gestacional (12):

- prematuros muy extremos (< 28 semanas)
- prematuros extremos (28 - 31 semanas + 6 días)
- prematuros moderados (32 - 33 semanas + 6 días)
- prematuros tardíos (34 a 36 semanas + 6 días)

Los recién nacidos también se pueden clasificar según el peso al nacimiento:

- Peso normal al nacimiento (2.500 g – 4.500 g).
- Bajo peso al nacimiento (<2.500 g).
- Muy bajo peso al nacimiento (<1.500 g).
- Extremado peso al nacimiento (< 1.000 g).

La prematuridad causa anualmente alrededor de 1 millón de muertes en todo el mundo (13). Aunque las muertes neonatales en recién nacidos prematuros han disminuido en los últimos 20 años, especialmente en países con elevado nivel de ingresos, continúa siendo la principal causa mundial de mortalidad neonatal y, recientemente, también es la principal causa de mortalidad infantil en niños menores de cinco años (14). Así, de los 6,3 millones de niños que murieron antes de los 5 años en 2013, 51,8% murieron por causas infecciosas y 44% murieron en el período neonatal. Si las tendencias actuales continúan, 4,4 millones de niños menores de 5 años seguirán muriendo en 2030 (15).

La etiología de la muerte neonatal temprana está estrechamente relacionada con el nivel de industrialización de un país (16). La muerte neonatal temprana (muerte de un recién nacido entre cero y siete días después del nacimiento) representa el 73% de todas las muertes posnatales en todo el mundo. A pesar de una reducción del 50% en la mortalidad infantil, contribuye cada vez más a la mortalidad general en niños <5 años (16).

Sorprendentemente, la prevalencia de complicaciones graves como ROP, DBP, ECN o LPV se ha mantenido prácticamente sin cambios o incluso han aumentado, especialmente en los recién nacidos muy prematuros (< 32 semanas de gestación) (17). Ello se atribuye a la supervivencia cada vez mayor de pacientes extremadamente prematuros casi en el límite de la viabilidad (<26 semanas).

### **I.1.1 PREMATURIDAD: RELEVANCIA DE LA MICROBIOTA Y FACTORES QUE LA AFECTAN.**

La microbiota se define como el conjunto de microorganismos que se encuentran generalmente asociados a tejidos sanos (piel, mucosas, etc.) del cuerpo humano y que está integrada principalmente por bacterias, virus y hongos. El microbioma humano es el conjunto de genes de los microorganismos presentes en nuestro cuerpo (microbiota). Más de cien mil billones de bacterias habitan en el organismo humano, siendo este número incluso 10 órdenes de magnitud mayor al número de nuestras células ( $10^{13}$ ) (18). Si bien no se han logrado estimar con exactitud estas cifras, hoy en día se conoce que millones de bacterias están jugando un papel esencial en la regulación de numerosos procesos fisiológicos.

La microbiota intestinal es un complejo ecosistema bacteriano que realiza actividades relacionadas con la nutrición metabolismo y estimulación del sistema inmune (19).

Los primeros 1,000 días de vida (desde la concepción hasta los 2 años de edad) (20) se consideran un período esencial debido a las altas necesidades de energía y nutrientes asociadas con el rápido crecimiento y desarrollo humano observado durante los períodos prenatal y postnatal (21). Este es también un período crítico en el desarrollo metabólico, inmunológico, cognitivo y educativo. De acuerdo con los orígenes del desarrollo de la hipótesis de salud y enfermedad, nuestra salud está determinada por eventos experimentados en el útero y durante la primera infancia (22). Como ejemplo, Barker formuló la hipótesis que la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) representaba un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y endocrinas, durante la vida adulta (23). Este período sensible potencialmente tendrá consecuencias a corto y

largo plazo para el desarrollo somático e intelectual, así como para el riesgo de obesidad y el desarrollo de enfermedades metabólicas, inflamatorias y alérgicas y enfermedades autoinmunes (24).

En el momento del nacimiento, el intestino humano se coloniza rápidamente por una gran variedad de microbios procedentes de la microbiota materna y de la microbiota ambiental (25). Este inoculo inicial está determinado por la influencia de diferentes factores como: la edad gestacional, el tipo de parto (parto vaginal versus cesárea), dieta infantil (leche materna, alimentación mixta y/o fórmula infantil), tratamiento con antibióticos, condiciones higiénicas del ambiente, presencia de hermanos y/o animales de compañía, entorno en el que viven (rural o urbano), etc...(26–28). En general, la microbiota intestinal neonatal se caracteriza por una baja diversidad bacteriana y un dominio de bacterias pertenecientes a los filos Proteobacteria y Actinobacteria, y esa microbiota va desarrollándose en cantidad y diversidad a lo largo del primer año con la aparición y el dominio de Firmicutes y Bacteroidetes (29,30). Al final del primer año de vida, los neonatos poseen un perfil microbiano individualmente distinto, que converge hacia la microbiota característica de un adulto sobre los 2-5 años de edad (31).

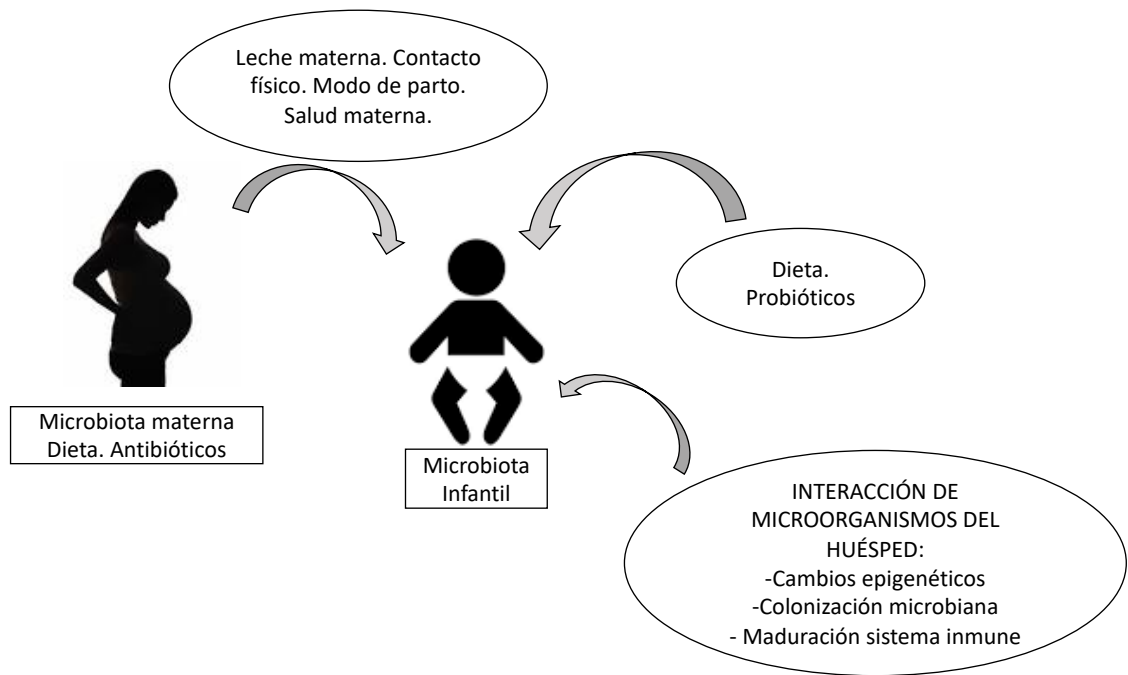
El tipo de parto es un factor determinante. Los neonatos que nacen por vía vaginal están expuestos a la microbiota de la misma que contiene *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides* y *Escherichia*, entre otros (32) y a además a bacterias que provienen del intestino materno. La diversidad de la composición microbiana también es mayor en los partos vaginales que en las cesáreas (33). Así, los recién nacidos producto de parto vaginal se ven colonizados en un 72% por bacterias intestinales maternas mientras que aquellos que lo hacen por cesárea tan sólo en un 41% (34). Sin embargo aquellos nacidos por cesárea están colonizados principalmente por bacterias asociadas con la piel y la boca materna o el entorno incluido el hospital y el lugar de nacimiento. Así, en la microbiota de los neonatos nacidos por cesárea abundan las *Enterobacterias* con reducción de *Bacteroides*, *Staphylococcus* (incluyendo *S. aureus*), *Streptococcus* y *Veillonella*, entre otros) (6,25), *Corynebacterium* y *Propionibacterium* spp. (35) o comunidades microbianas potencialmente patógenas como *Klebsiella*, *Enterococcus* y *Clostridium* (35) y están menos colonizados por especies de *Bifidobacterium*. Hay que

destacar que la mayoría de los partos por cesárea van asociados a profilaxis antibiótica intraparto y además, muchos de los prematuros continúan con tratamiento con antibióticos.

Una gran evidencia científica, muestra que el uso de antibióticos altera significativamente el perfil temprano de colonización intestinal y tienen efectos relativamente duraderos (más en los nacidos por cesárea), presentando una diversidad reducida y una abundancia baja del filo Actinobacterias, sobretodo por la reducción de Bifidobacterias (28,34,36) y el aumento de bacterias pro-inflamatorias del filo Proteobacteria (27). La importancia de estos hallazgos se debe a que la gran abundancia de especies de *Bifidobacterium* en los lactantes promueve la maduración del sistema inmunitario sano, mientras que la alta presencia de *Clostridium difficile* se considera uno de los principales riesgos intrahospitalarios de infecciones gastrointestinales graves durante la infancia (6). Además, parece que estas diferencias en la composición de las bacterias intestinales se acentúan en el caso de la cesárea electiva en comparación con la cesárea de emergencia, por lo que los mecanismos de trabajo aumentan la permeabilidad intestinal durante el parto (37).

La composición y diversidad del microbiota también se han relacionado con la salud neonatal, incluido el desarrollo de enterocolitis necrotizante, sepsis de inicio tardío, crecimiento físico alterado y desarrollo neurológico deficiente (38).





**Figura 1: Factores que influyen en la colonización temprana de la microbiota y su impacto en la salud infantil.** Adaptada del artículo: Collado et al. Gut microbes 2012 (1).

Diversos estudios han sugerido una asociación entre el parto prematuro y la disbiosis en la microbiota vaginal materna, sobretodo por el aumento de patógenos que se ha asociado a ese mayor riesgo de parto prematuro y aborto espontáneo (39).

Distintas investigaciones muestran diferencias en la microbiota de neonatos nacidos a término (RNT) y prematuros (RNPT) (40). La prematuridad tiene consecuencias directas sobre el estado de la microbiota neonatal.

Los RNT primero son colonizados por *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Lactobacilus* y *Enterobacter*. Estas especies consumen oxígeno y permiten la posterior colonización de especies bacterianas anaeróbicas, principalmente *Clostridia*, *Bifidobacterium* y miembros del phylum *Firmicutes*. (41).

En RNPT la colonización ocurre de forma diferente ya que se alimentan con nutrición enteral de forma temprana, y reciben fortificantes. Presentan un sistema inmune inmaduro y precisan soporte ventilatorio y tratamientos farmacológicos complejos.

En los RNPT, se han apreciado desequilibrios bacterianos caracterizados por una reducida diversidad, por la dominancia de bacterias de las familias Enterobacteriaceae y Enterococcaceae (42,43) y por un aumento del número de bacterias patógenas como *Klebsiella pneumoniae* y *Clostridium difficile* (44), *Escherichia coli*, y *Staphylococcus* (45). Todo ello, en perjuicio de los niveles de *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Atopobium* (40,44). Diversos estudios también encuentran diferencias en la colonización cutánea, oral e intestinal entre recién nacidos prematuros y los a término. *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y bacterias gram negativas entéricas, incluidas *Escherichia* y *Enterobacter*, dominaron la microbiota de la piel. Los prematuros presentaron menor diversidad alfa y mayor enriquecimiento con *Staphylococcus* e *Escherichia*. La microbiota encontrada difirió según el sitio corporal, la edad postnatal y la edad gestacional (40). Otro estudio también observa más *Staphylococcus epidermidis* en el meconio de los prematuros (46). Korpela y colaboradores, describen como el desarrollo de la microbiota procedió, en recién nacidos prematuros, en cuatro fases, indicadas por el predominio de *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter* y finalmente *Bifidobacterium*. La fase de *Enterococcus* solo se observó entre los bebés extremadamente prematuros y pareció retrasar la sucesión de la microbiota. Los resultados indican que los bebés prematuros hospitalizados que reciben leche materna pueden desarrollar una microbiota normal similar a la de los bebés nacidos a término (47).

En los recién nacidos prematuros, la dinámica microbiana neonatal y las alteraciones en la microbiota intestinal temprana pueden preceder y / o predisponer a enfermedades como la ECN o la sepsis tardía (5).

La **enterocolitis necrotizante** es la emergencia gastrointestinal neonatal severa más común que afecta predominantemente a los bebés prematuros, afectando aproximadamente al 13% de los mismos (48,49).

Su patogénesis todavía es desconocida, aunque existen evidencias de que la inadecuada colonización bacteriana y la inflamación son factores que ejercen un papel importante en su desarrollo (50). De hecho, se observan datos que muestran la existencia de diferencias entre el microbioma intestinal de sujetos que la padecen y sujetos sanos. En este sentido, los niños con enterocolitis necrotizante reflejan altos niveles de *Proteobacterias* (51)

especialmente de *Gammaproteobacterias* como *Cronobacter sakazakii*, *Klebsiella sp.*, y *Escherichia coli* (52,53).

Se está a la búsqueda de marcadores predictivos en fases muy precoces antes de que se manifieste clínicamente la enfermedad para poder iniciar un tratamiento precoz y, así, mejorar el pronóstico. Entre otras, se han ensayado la proteína S100 A8/A9, la apolipoproteína CII, la IL-10, el antagonista del receptor de interleucina 1, entre muchos. (50) La fisiopatología de la ECN ocurre en el medio hiperreactivo del intestino prematuro tras su colonización bacteriana. Esta situación conlleva una pérdida del equilibrio pro-y-anti-inflamatorio en favor del primero abocando a una alteración de todas las funciones intestinales, inflamación mantenida, riesgo de traslocación bacteriana y sepsis secundaria, e incluso perforación intestinal con graves consecuencias para la integridad del paciente (53).

La **sepsis** es disfunción orgánica potencialmente mortal causada por una respuesta desregulada del huésped a la infección. Durante décadas, se pensó que el intestino desempeñaba un papel importante en la patogénesis de la misma (54).

En el proceso séptico la composición del microbioma intestinal, se ve alterada pudiendo contribuir a su desarrollo. La microbiota, tiene un papel importante en el mantenimiento de la función de barrera intestinal y la modulación del sistema inmune innato y adaptativo (55). Algunos estudios revelan como durante el curso de la sepsis, el intestino se invade de patógenos resistentes a antibióticos como *Clostridia spp* y *Enterococcae spp*. (56) y pierde géneros bacterianos clave que representan una parte importante de la microbiota de individuos sanos. como por ejemplo *Faecalibacterium spp*, *Prevotella spp*, *Blautia spp* y *Ruminococcaceae spp* (57). Adicionalmente, algunas bacterias anaerobias (por ejemplo, bifidobacterias) se han asociado con aumento de la función de barrera intestinal (58).

Los avances en metagenómica pueden dar una nueva claridad a la relación entre el microbioma intestinal y el desarrollo de la ECN y la sepsis, con el objetivo de realizar tratamientos dirigidos mediante manipulación del microbioma (51).

Se ha propuesto que la modulación de la microbiota mediante intervenciones dietéticas, prebióticos o trasplante de microbiota fecal, podría disminuir la incidencia de sepsis, mejorar su evolución y disminuir la mortalidad tardía tras la misma (59).

Después del nacimiento, el tipo de alimentación (lactancia materna o alimentación con fórmula) modula la microbiota. Muchos estudios epidemiológicos han documentado diferencias en la composición de la microbiota intestinal en lactantes amamantados y alimentados con fórmula (26), y además, la lactancia materna exclusiva podría predecir diferencias en la composición taxonómica del microbioma intestinal (60).

## **I.2. PREMATURIDAD: RELEVANCIA DE ALIMENTACIÓN.**

La leche materna (LM) es un fluido complejo y vivo, que se adapta a los requerimientos nutricionales y favorece el neurodesarrollo junto con la maduración del sistema inmune inmaduro (mejorando la función de la barrera intestinal, entre otras) (61). A su vez, modulan las condiciones metabólicas e inflamatorias en la infancia tardía y la edad adulta (35), en especial cuando el individuo tiene contacto con ellos durante los primeros meses de vida.

Su exposición temprana reduce el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades como enfermedades inflamatorias intestinales, infecciones gastrointestinales, respiratorias, alergia, etc...(62).

### **I.2.1. LECHE MATERNA. COMPOSICIÓN.**

La LM se considera el estándar de oro para la nutrición infantil en recién nacidos a término y prematuros (63). La OMS recomienda la LM exclusiva hasta los 6 meses de vida como alimentación del lactante y continuar hasta los 24 meses o hasta que la madre y el niño deseen (64,65).

Las **ventajas de la lactancia materna** son numerosas. Quedan reflejadas en la Tabla 1.

**Tabla 1: Beneficios de la Lactancia Materna.**

<b>Favorece el vínculo entre la madre y el recién nacido.</b>
<b>Favorece un adecuado desarrollo psicomotor a corto y largo plazo.</b>
<b>Disminuye morbilidad por diarrea, infecciones respiratorias y otitis media.</b>
<b>Disminuye mortalidad por enterocolitis necrotizante.</b>
<b>Disminuye mortalidad relacionada con síndrome de muerte súbita del lactante.</b>
<b>Efecto beneficioso en sobrepeso, obesidad y diabetes futuros.</b>
<b>En madres lactantes, disminuye riesgo de cáncer de mama, ovario y diabetes.</b>

La **composición de la LM** es muy compleja y varía continuamente con la edad postnatal (66). Son múltiples los factores que producen cambios en la composición de la misma, entre ellos, la etapa de la lactancia, la genética materna, el peso al nacimiento y la edad gestacional del recién nacido, la dieta materna y su estado de salud. Incluso se ha descrito una variación circadiana en sus componentes (67).

Entre las etapas de la lactancia diferenciamos el **calostro**, considerado la “primera vacuna”, con altas cantidades de inmunoglobulina A secretora, lactoferrina, leucocitos y factores de crecimiento epidérmico. Éste contiene relativamente bajas concentraciones de lactosa, siendo su función principal inmunológica y de preparación intestinal, más que nutricional. La **leche de transición**, producida entre los 7 y 14 días postparto, se caracteriza por una disminución de la concentración de inmunoglobulinas y proteínas totales y un aumento de lactosa, grasa y energía total. Ésta, apoya la recuperación del peso al nacer. Posteriormente se excreta una **leche madura**, con disminución progresiva de la cantidad de proteínas y lípidos totales, y aumento de cantidad de lactosa (67).

Bauer y Gerss compararon la composición de la leche materna de madres que dieron a luz bebés prematuros < de 28 semanas, con leche materna de madres con recién nacidos a término, descubriendo que los contenidos de carbohidratos, grasas y energía eran significativamente más altos en la leche prematura que a término. El contenido de proteínas de la leche de término y prematuro disminuyó con la duración de la lactancia, demostrando valores significativamente más altos en la leche de prematuro extremo que en la leche de término (63).

Los componentes esenciales de la misma vienen reflejados en la tabla 2.

**Tabla 2: Componentes de la leche materna.**

<b>Nutriente</b>	<b>Calostro</b>	<b>Leche madura</b>	<b>Leche de vaca</b>
<b>Agua</b>	87	88	88
<b>Calorías</b>	58	70	70
<b>Proteínas totales (g/100ml)</b>	2,3	0,9	3,3
<b>Caseína (g/100ml)</b>	0,14	0,25	2,7
<b>Nitrógeno total (mg/100ml)</b>	2,3	0,9	3,3
<b>Lactoalbúmina (mg/100ml)</b>	218	161	110
<b>Lactoferrina (g/100ml)</b>	0,33	0,17	trazas
<b>Ig A (g/100 ml)</b>	0,36	0,14	0,03
<b>Grasas totales (g/100 ml)</b>	2,9	4,2	3,8
<b>Colesterol (mg/100ml)</b>	28	16	14
<b>Ácido linoleico (% de la grasa)</b>	6,8%	8,3%	1,6%
<b>Lactosa (g/100 ml)</b>	5,3	7,3	4,8
<b>Vitamina A (mcg/100 ml)</b>	89	47	51
<b>Vitamina D (mcg/100 ml)</b>	trazas	0,004	0,002
<b>Vitamina E (mcg/100 ml)</b>	1280	315	70
<b>Vitamina K (mcg/100 ml)</b>	0,23	0,21	0,6
<b>Biotina (mcg/100ml)</b>	0,06	0,6	2,8
<b>Vitamina B 12 (mcg/100 ml)</b>	200	26	0,5
<b>Ácido ascórbico (mcg/100 ml)</b>	4,4	4,5	2
<b>Magnesio (mg/100 ml)</b>	4	3,5	13
<b>Calcio (mg/100 ml)</b>	23	28	125
<b>Potasio (mg/100 ml)</b>	74	58	140
<b>Sodio (mg/100 ml)</b>	50	15	58
<b>Fósforo (mg/100 ml)</b>	16	15	96
<b>Cloro (mg/100 ml)</b>	70	42	108

En general, el componente más abundante de la leche humana es la lactosa (70 g / L), seguido de los lípidos (40 g / L), los oligosacáridos de la leche humana (HMO) (5–15 g / L) y las proteínas (8 g / L) (68). La lactosa y los lípidos representan una fuente importante de nutrientes para el lactante. Además de los macronutrientes, la leche materna contiene compuestos bioactivos importantes como bacterias (probióticos), oligosacáridos (prebióticos), carbohidratos, citocinas, células inmunes, lisozima, osteopontina, poliaminas, lactoferrina, inmunoglobulinas (fundamentalmente IgA), ácidos grasos y proteínas, entre otros, que influyen directamente en el desarrollo del bebé e inducen una colonización de microbiota intestinal (7).

Todavía hoy se desconoce la función de gran parte de los compuestos bioactivos que contiene la LM y en su mayoría, no están representados en las fórmulas infantiles.

Los HMO son glucanos libres que muestran varias funciones biológicas; junto con muchas glicoproteínas y glicolípidos, representan los glicoconjugados totales en la leche. Se ha estimado que más del 70% de las proteínas de la leche humana están glicosiladas, y albergan restos de glicanos unidos a N y O (69). La mayoría de las glucoproteínas de la leche se encuentran en la leche descremada (suero y caseína), pero la membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM) contiene una cantidad representativa de glucoproteínas totales. Las glucoproteínas de la leche humana más abundantes son la  $\alpha$ -lactoalbúmina (17% de la proteína total), la lactoferrina (Lf) (17%) y la IgA secretora (sIgA) (11%), perteneciente a la fracción de suero, y  $\kappa$ -caseína, de fracción de caseína (9%) (70).



## **I.2.2. BENEFICIOS DE LA LECHE MATERNA EN PREMATUROS.**

### **I.2.2.1. EFECTO SOBRE LA PREVENCIÓN ENFERMEDADES DE LA PREMATURIDAD.**

La LM proporciona un claro efecto protector contra la ECN con una reducción aproximada del 4% en la incidencia en los recién nacidos prematuros (61,71,72)(61,71,72) particularmente para ésta enfermedad, cualquier volumen de LM es mejor que leche de fórmula de prematuro (FP), y cuanto mayor sea la dosis, mayor será la protección (73,74). Entre los muchos componentes de la leche que modulan la microbiota intestinal del lactante, los glucanos de la leche, que comprenden oligosacáridos, glucoproteínas y glucolípidos libres, son cada vez más reconocidos como impulsores del desarrollo de la microbiota y la salud intestinal en general. Estos glicanos pueden mostrar funciones pleiotrópicas, otorgando protección contra enfermedades infecciosas y también actuando como prebióticos, seleccionando para el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas. El efecto prebiótico de los glucanos de la leche tiene una aplicación directa en la prevención de enfermedades como la ECN (75) .

También está descrito que la LM contribuye a una reducción en sepsis tardía, displasia DBP, ROP severa, y ECN severa (73).

### **I.2.2.2. EFECTO EN LA COLONIZACIÓN.**

Los primeros 1,000 días de vida (20) son el periodo más crítico para las intervenciones dirigidas a la modulación de la microbiota (21), ya que una colonización microbiana adecuada, diversa y variada durante este periodo, es fundamental para la maduración apropiada del sistema inmune, el metabolismo, así como el desarrollo del sistema nervioso central (20) favoreciendo la maduración de funciones cognitivas y sensoriales y reflejándose en el crecimiento y el desarrollo infantil (76). La LM es un inóculo esencial de bacterias para inducir una buena colonización, con todos los beneficios secundarios a ésta y podría inducir diferencias en el microbioma intestinal (60).

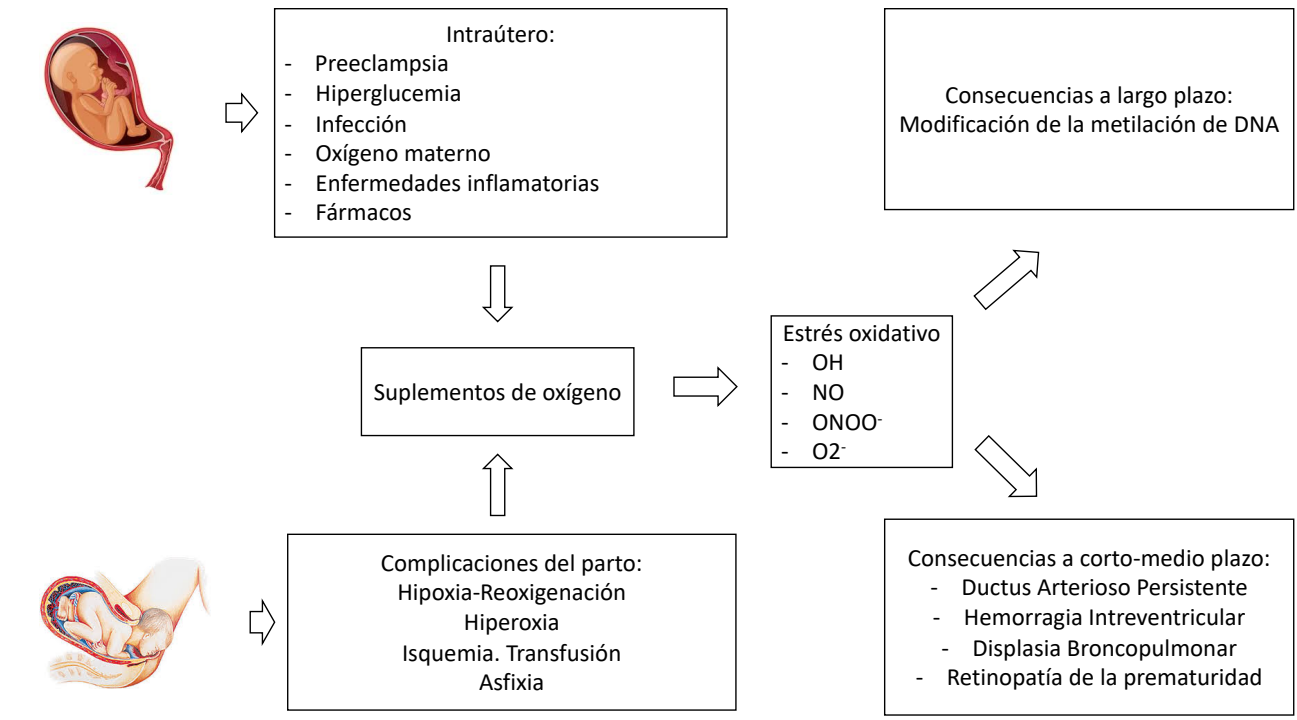
Se observa una gran abundancia de bacterias del género *Bifidobacterium* (77), así como de bacterias del ácido láctico (78) en los niños que reciben leche materna. Las especies comunes de *Bifidobacterium* en el intestino neonatal son *B. breve*, *B. infantis* y *B. longum*, mientras que el grupo *Lactobacillus acidophilus* o *Lactobacillus gasseri* son los lactobacilos más comunes que se encuentran en el intestino de los lactantes amamantados y alimentados con fórmula (1). Ho y colaboradores recientemente, realizaron un metaanálisis en el que compararon los perfiles microbianos de lactantes alimentados exclusivamente con lactancia materna y no (79). La población bacteriana de los segundos presentó un mayor número de Bacteroidetes y Firmicutes. A nivel de orden, se observaron mayores niveles de *Bacteroidales* y *Clostridiales*, mientras que en el rango de familia se reflejó un mayor dominio de *Bacteroidaceae* y *Veillonellaceae*. Y por último, en lo que respecta al género, se observaron incrementos en las poblaciones de *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Veillonella* y *Megasphaera*. Por el contrario, los lactantes alimentados con fórmula son colonizados más comúnmente por varios géneros de *Clostridiales* y *Proteobacterias*, incluidas las especies de *E. coli* y *Clostridium*, así como por *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides fragilis* y lactobacilos (80,81).

### **I.2.2.3. EFECTO ANTIOXIDANTE Y SU IMPORTANCIA EN LA PREMATURIDAD.**

El oxígeno es un elemento indispensable para la vida multicelular. La demanda de energía sólo puede ser satisfecha mediante la combustión aeróbica de los principios inmediatos obtenidos mediante la ingesta. El balance energético supera en 18 veces la cantidad de ATP producido en la combustión aeróbica de una molécula orgánica en presencia de oxígeno que en su ausencia. Sin embargo, un exceso de oxígeno puede producir un desbalance en el estado redox celular que es imprescindible para las funciones vitales celulares de crecimiento, especialización, división y metabolismo (82). Por ello, el desequilibrio del estado redox puede explicar múltiples patologías agudas y crónicas del ser humano (82).

La transición fetal-neonatal el RN supone un estrés oxidativo “fisiológico”. Al nacer, el intercambio de gases placentarios se sustituye abruptamente por la respiración aérea lo que conlleva a un aumento brusco de la presión parcial de oxígeno arterial (PaO<sub>2</sub>) dentro de los primeros minutos de vida de 25 a 30 mm Hg (3.3 kPa) en el feto a 75 a 85 mm Hg (10.5 kPa) en el recién nacido. La transición fetal-neonatal requiere una serie de cambios en la fisiología circulatoria cardiopulmonar con un patrón secuencial extraordinariamente regulado (83). El incremento de la disponibilidad de oxígeno por los tejidos va a causar un estrés oxidativo fisiológico que será perfectamente regulado por las defensas antioxidantes maduras en el nacido a término normal (84). Sin embargo, los recién nacidos prematuros tienen un sistema de defensa antioxidante inmaduro (2) que no se desarrolla totalmente hasta el tercer trimestre de la gestación (85). La estabilización de los mismos en la sala de partos a menudo requiere la administración de ventilación con presión positiva y suplementos de oxígeno, lo que conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y al estrés oxidativo (EO) (86).

Igualmente ocurre con otros tratamientos administrados como la fototerapia, la nutrición parenteral con vitaminas, minerales y lípidos pro-oxidantes, la ventilación mecánica con oxigenoterapia, o los antibióticos, entre otros (9). Todo esto conduce a una producción elevada de ROS/RNS y a niveles de estrés oxidativo fisiopatológico con graves daños oxidativos a macromoléculas, que contribuyen al desarrollo de patologías relacionadas con el estrés oxidativo con complicaciones graves, como la DBP, la ROP o la HIV, la HTPP y la ECN, entre otras (9,10).



**Figura 2: Transición fetal-neonatal y su relación con el estrés oxidativo.** Adaptada del artículo: Torres-Cuevas et al. Redox Biol 2017 (2) (with permission).

La leche materna (LM), a su vez, proporciona protección antioxidante (87) (con antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos) y, por lo tanto, los recién nacidos prematuros alimentados con leche humana presentan niveles más bajos de biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo que los alimentados con fórmula (88).

#### 1.2.2.4. EFECTO DE LA LECHE MATERNA SOBRE LA EXPRESIÓN GENÓMICA.

El dogma de la biología molecular, descrito por Crick en 1970 (89), explica que la información genética procedente del ácido desoxirribonucleico (ADN) se encuentra contenida en el ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Para la formación de una proteína, los genes del ADN son expresados y la información es transferida por medio de la transcripción a ARNm. Así, todo el ARNm transcrito bajo unas circunstancias específicas forma el transcriptoma. Estas moléculas serán más tarde usadas para sintetizar proteínas a partir de un proceso de traducción. Mediante mecanismos de corte y ajuste (splicing) alternativos y modificaciones post-traduccionales, cada gen puede producir diferentes proteínas. La expresión genómica se usa como un pilar destacable e importante dentro de la investigación básica y clínica para búsqueda de biomarcadores, caracterización de la patología, estudio de los mecanismos moleculares implicados en una patogenia, etc...tal y como se muestra a continuación.

Hay cada vez más evidencia de que la nutrición desempeña un papel importante en la regulación del desarrollo y la función intestinal neonatal (11). Las funciones detalladas de las moléculas bioactivas específicas de la leche, y los diferentes tipos de leches (LM y LF), modulan el sistema inmunológico del recién nacido. La regulación génica es diferente según el tipo de alimentación.

Este campo de estudio actualmente es objeto de una intensa investigación para darle una aplicación clínica.

#### **MOLÉCULAS BIOACTIVAS:**

Mediante biología de sistemas se han estudiado interacciones complejas subyacentes a la respuesta del huésped a las **poliaminas**. Gómez-Gallego y colaboradores realizaron un análisis de expresión génica a nivel gastrointestinal, un estudio de microbiota y del sistema inmunológico en un modelo de ratones lactantes alimentados con diferentes dietas (LM, LF con y sin poliaminas). Concluyeron que la suplementación de la fórmula infantil con poliaminas promueve comunidades microbianas a lo largo de todo el tracto

gastrointestinal, poblaciones de linfocitos y expresión de genes relacionados con el sistema inmune, similares a los de la LM, siendo diferentes a los de la LF sin poliaminas (90).

Otra proteína bioactiva que encontramos en la leche materna es la **osteopontina**. Un estudio evaluó su impacto sobre el transcriptoma yeyunal, en monos amamantados con LM vs alimentados con LF suplementada con osteopontina. Los resultados observados en el perfil de expresión génica fueron similares (91).

Chapkin y colaboradores, demostraron que el **factor de crecimiento transformante- $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2)** presente en la leche materna, modula la expresión de citocinas en las células intestinales epiteliales exfoliadas (CIEE) (11).

Li y colaboradores, realizaron un perfil de todo el genoma del transcriptoma epitelial intestinal en respuesta a **oligosacáridos (HMO)** mediante secuenciación de ARN. Encontraron cómo los HMO alteran el transcriptoma del huésped en 225 genes diana únicos relacionados con la proliferación y diferenciación celular. Además, emplearon un modelo in vivo de ECN y concluyeron que los HMO protegen contra la ECN en parte al alterar la diferenciación del eje velloso-cripta (92).

## **TIPOS DE LECHE:**

Por otra parte hay estudios centrados sobre el efecto de los diferentes tipos de leche y la expresión que inducen a nivel intestinal en CIEE.

A nivel de **calostro** bovino un estudio demostró que puede proteger y preservar la integridad de la barrera de la mucosa intestinal en el hospedador controlando los niveles de expresión de genes inflamatorios tempranos y tardíos después de la invasión de patógenos entéricos (93).

En células expuestas a la **LM desnatada**, se encontraron diecisiete genes expresados diferencialmente, la mayoría de ellos regulados positivamente, incluidos cuatro genes de quimiocinas (CXCL1, CXCL2, CXCL3 y CXCL10) y otros genes relacionados con la inmunidad. La evaluación de la importancia funcional de estos cambios transcriptómicos revela que la exposición a la leche materna puede contribuir a la regulación de la respuesta inflamatoria en el intestino durante el período perinatal, que se caracteriza por la inmadurez del sistema inmunológico y un fenotipo proinflamatorio (94).

Respecto a la alimentación con **LF** se ha observado que modifica la microbiota intestinal y la integridad estructural, el estrés oxidativo, inflamación ileal, apoptosis y los genes de la función inmune, presumiblemente aumentando la vulnerabilidad a la enfermedad (95,96).

Todos estos estudios confirman que el análisis de la expresión de genes microbianos y del huésped en recién nacidos alimentados con LF puede ofrecer una nueva perspectiva sobre cómo la dieta afecta la patogénesis de la enfermedad.

Como hemos observado existen pocos trabajos publicados en la población infantil, especialmente en prematuros. Profundizar en el estudio de la expresión genómica en las CIEE, nos permitiría elucidar los mecanismos moleculares implicados en la nutrición con LM comparado con otros tipos de leche e identificar dianas terapéuticas para tratar enfermedades frecuentes en la prematuridad (por ejemplo sepsis y ECN).

### **I.3. LECHE HUMANA DONADA.**

#### **I.3.1. DEFINICIÓN E IMPORTANCIA DE LA MISMA.**

A menudo las madres que dan a luz recién nacidos prematuros no pueden amamantar con éxito (97). La falta de disponibilidad puede ser secundaria a enfermedad materna, contraindicaciones para la lactancia materna o deseo materno de alimentación con LF.

En ocasiones la dificultad estriba en el establecimiento de la lactancia los primeros días, o en producir volumen de LM suficiente que cubra las necesidades del RN. En ausencia de leche materna propia (LM), existen dos opciones, o bien la utilización de la leche humana donada y pasteurizada (LHD) proporcionada por un banco de leche, o fórmula especial para prematuros (FP). En la actualidad, la mayoría de los servicios de Neonatología están optando por la administración de leche humana donada (98).

Los beneficios demostrados de alimentar a los recién nacidos con LHD frente a las FP son:

- A corto plazo: su protección frente a la ECN (73,74,99) la infección nosocomial (100) y mejor tolerancia enteral (101). Algunos artículos afirman que también protege contra la DBP (102).
- A largo plazo: presentan un mejor neurodesarrollo (103) que aquellos alimentados con FP y un menor riesgo cardiovascular durante la adolescencia (cifras menores de tensión arterial y mejor perfil de lipoproteínas con menor riesgo de sufrir arterioesclerosis) (104).

Se observa menor crecimiento a corto plazo en aquellos RNPT alimentados con LHD versus aquellos alimentados con LF, sin evidenciarse estas diferencias a largo plazo ni diferencias en mortalidad, sepsis ni en el neurodesarrollo.(73,105).

Disponer de LHD en la unidad permite avanzar más rápidamente con la nutrición enteral, retirando antes la nutrición parenteral, siendo además menor la exposición a FP y mayor el consumo de leche de madre propia y la lactancia materna al alta (106).



En nuestra Unidad de Neonatología (Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia), los **criterios de inclusión** para ser receptores de LHD son:

Peso al nacimiento  $\leq 1.500$  y/o edad gestacional  $\leq 32$  semanas, cardiopatía congénita, retraso del crecimiento intrauterino, patología intestinal, cirugía intestinal, encefalopatía hipóxico-isquémica en tratamiento con hipotermia, pérdida de bienestar fetal, metabolopatía, intolerancia alimentaria.

La hoja de solicitud de leche humana donada en nuestra unidad está recogida en el Anexo 1.

**Anexo 1:** HOJA DE SOLICITUD DE LECHE HUMANA DONADA EN NUESTRA UNIDAD DE TERCER NIVEL.

Los **bancos de leche humana donada** (BLH), son centros especializados responsables de la promoción y apoyo a la lactancia materna, donde la leche humana donada por madres seleccionadas, se recibe, procesa, analiza, almacena y posteriormente se distribuye, con todas las garantías sanitarias, a los centros hospitalarios para alimentar a recién nacidos hospitalizados que no pueden recibir leche de su propia madre.

En los últimos años existe un creciente interés por la creación de bancos de leche en nuestro país y a nivel internacional. En Europa funcionan 203 bancos agrupados en la European Milk Bank Association (EMBA). Actualmente existen en España 15 centros en activo, con diferentes modelos: ubicados en las propias Unidades de Neonatología, integrados en los Centros de Donación de Sangre y Tejidos, y modelos mixtos. El BLH del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, fue el tercero inaugurado en España e inició su actividad en Marzo 2010. En Junio del 2017 pasó a formar parte del Banco de sangre de la Comunidad Valenciana. Desde su inauguración en Marzo 2010, el BLH ha distribuido 2.130 litros de LHD proporcionada por 1.857 madres donantes (1.482 del Hospital La Fe), a 2.611 receptores (1.998 del Hospital La Fe). El volumen de leche distribuida ronda en torno a los 6.000 litros. Los bancos de leche se rigen por una estricta normativa internacional (107). En la actualidad el Banco de Leche Humana de nuestro Hospital, se ha convertido en BLH regional y se ha centralizado en el Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana. Ahí se realizan las funciones de transporte, procesamiento y análisis de la leche humana donada.

Las madre donantes pasan un proceso de selección que incluye una entrevista y un estudio analítico y serológico de las mismas, entre otros. El diagrama de flujo del proceso de selección de las madres donantes se encuentra adjunto en el Anexo 2.

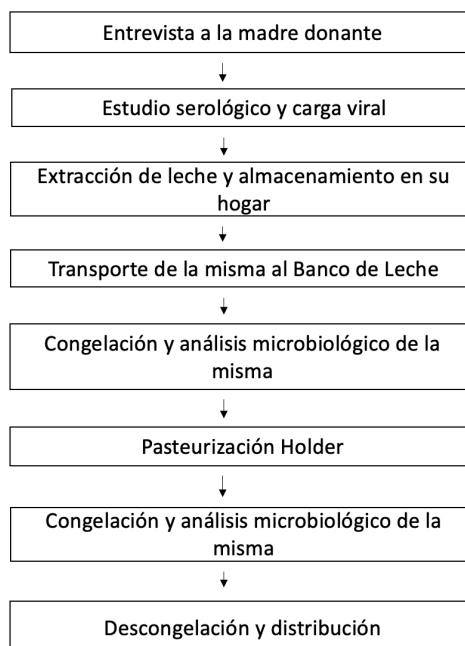
**Anexo 2:** DIAGRAMA DE FLUJO. PROCESO DE SELECCIÓN DE MADRES DONANTES. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.

En resumen, a las madres donantes, se les realiza a una entrevista clínica sobre estado de salud y hábitos de vida, antecedentes obstétricos, junto con una extracción de sangre para realizar estudio serológico y de carga viral.

Los detalles solicitados a las madres donantes se adjuntan en el Anexo 3.

**Anexo 3:** HISTORIA CLÍNICA CON LOS DATOS SOLICITADOS A LAS MADRES DONANTES.

A continuación se detalla el proceso realizado a la leche humana de la madre donante una vez queda seleccionada. Se contempla en la Figura 3.



**Figura 3:** Diagrama de flujo sobre el funcionamiento de la recogida, almacenamiento, tratamiento y dispensación de la leche humana donada.

La LHD es un producto biológico que debe ser procesado con la finalidad de administrarlo con seguridad, evitando la transmisión de virus (como el CMV, VIH, HTLV, VHB, VHC, parvovirus) y bacterias (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. Coli*, *Pseudomonas spp*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Salmonella spp*, etc) productoras de enfermedades (108,109). La leche humana donada ha de procesarse para garantizar su seguridad microbiológica cuyo objetivo es eliminar las bacterias y virus contaminantes.

El tratamiento térmico utilizado por la mayoría de los Bancos de Leche, para inactivar los agentes virales y bacterianos (107,110) es la pasteurización mediante el método Holder, el cual se caracteriza por someter a la leche materna a una temperatura de 62.5°C durante 30 minutos para después enfriarla rápidamente en menos de 15 minutos hasta 4 °C. Con el objetivo de garantizar su seguridad, se realiza un análisis microbiológico previo a la pasteurización.

Los CRITERIOS DE DESCARTE de la leche en el análisis PREPASTEURIZACIÓN son los siguientes:

- $>10^5$  UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC / ML en recuento total de cualquier crecimiento bacteriano.
- $>10^4$  UFC/ ML *Staphylococcus aureus*.

Después de la pasteurización se realiza un nuevo análisis microbiológico que debe certificar que la leche está estéril y apta para su administración. No se acepta ningún crecimiento bacteriano. Asimismo, se analiza el contenido de proteínas, grasa, lactosa y energía mediante un analizador de infrarrojos (MIRIS - Human Milk Analyzer). Los analizadores de leche humana se utilizan cada vez más para medir el contenido de macronutrientes en la leche materna para la fortificación de objetivos individuales, para reducir el riesgo de restricción del crecimiento postnatal (111). Esto permite seleccionar la leche nutricionalmente más adecuada. Después de este proceso la leche se congela a -20°C o -80°C hasta su distribución.

### **I.3.2. CONSECUENCIAS DE LA PASTEURIZACIÓN Y CONGELACIÓN.**

La pasteurización causa la pérdida de algunas de las propiedades biológicas, estructurales y funcionales de la LM (112) ya que favorece la destrucción celular (incluidos linfocitos B y T) y bacteriana, así como la alteración parcial o total de la estructura y función de algunos de sus componentes.

A lo largo de los últimos años, desde la generalización de los bancos de leche humana, se han realizado multitud de estudios orientados a determinar cuales eran los efectos sobre los distintos componentes biológicos y bioquímicos de la pasteurización y sus propiedades (3,113–125).

Estos componentes de la LM son importantes para el crecimiento, la respuesta inmune (prevención de sepsis y ECN) y absorción de grasas, entre muchas otras funciones. También se reduce mucho su capacidad antioxidante, según demuestran varios estudios (126). Por otra parte, otros componentes con relevancia biológica no se ven afectados.

La permanencia de estos componentes tras la pasteurización aumenta la evidencia relativa a otros beneficios potenciales de la leche materna donada, como propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras (127,128).

La tabla 3 ofrece un resumen de los efectos de la pasteurización tipo Holder sobre la LM.

**Tabla 3:** Efectos de la Pasteurización tipo Holder sobre la LM. Adaptada del Artículo: *Pelia et al.. Nutrients. 2016 (3)*.

Pérdida	Propiedades funcionales (destrucción celular, bacteriana, actividad enzimática), IgM, Lipoproteína lipasa, linfocitos.
Disminución (%)	<p>Inmunoglobulinas (IgG4), enzimas (lipasa, fosfatasa alcalina, amilasa) , citoquinas (IL.7, MIP-1<math>\beta</math>, MCAF/MCP-1), factores de crecimiento (IGF1, IGF2, IGFBP2, IGFBP3, EPO, HB-EGF, HGF, GM-CSF), hormonas (insulina, adiponectina), aminoácidos (arginina, leucina, aspartato, glutamina), vitaminas (ácido ascórbico, y dehidroascórbico, B6), marcadores de estrés oxidativo (glutación, actividad de glutación peroxidasa, capacidad antioxidante total)</p> <p>Contenido total de proteínas. Inmunoglobulinas (IgA, IgA secretora, IgG), lactoferrina, lisozima, citoquinas (IL1<math>\beta</math>, IL-8, IL-10, TNF-<math>\alpha</math>, Interferon-<math>\gamma</math>).</p> <p>Vitaminas (A, folacina, C, alfa y gamma-tocoferol, delta-tocoferol).</p>
Preservación	<p>Contenido total de Nitrógeno. Citoquinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-12p70, IL-17). Factores de crecimiento (EGF, TGF<math>\beta</math>1, TGF<math>\beta</math>2, MCP-1). Aminoácidos (libres, taurina, metionina, cistina, glutamato). Vitaminas (D, E, B2, B5, Biotina, B3, B12, Zinc). Ácidos grasos poliinsaturados (n3, n6), monoinsaturados y saturados. Oligosacáridos, glicosaminoglicanos, mioinositol, lactosa. Marcadores de estrés oxidativo (malondialdehído, capacidad de absorbanca oxígeno-radical,</p>

Otra intervención importante es la **congelación** de la leche tras su pasteurización. Ésta permite alargar la vida útil de la LH, ya que se minimizan los cambios en la composición de la leche, y se retardan los deterioros por procesos químicos y físicos, y se inhibe el crecimiento bacteriano y pueden destruirse algunos virus (129,130) Sin embargo, puede producir efectos sobre sus propiedades microbiológicas, nutricionales y funcionales (131).

Hay estudios que demuestran una disminución de la capacidad antioxidante total y de la glutatión peroxidasa tras la congelación a -20°C más de 48 horas (87,132).

Los bebés que reciben leche extraída almacenada hasta 96 horas reciben esencialmente el mismo suministro de ácidos grasos y lipasas activas que los bebés alimentados con leche fresca (131). La congelación durante un mes disminuye la concentración de lisozima, IgA soluble, actividad lactoperoxidasa, sin cambios en la lactoferrina (133). A los 3 meses de la congelación a - 20°C se observa una disminución relevante y significativa en la concentración de contenido de grasa y energía (134).

La refrigeración de cinco días de HM no disminuye apreciablemente los niveles de lactoferrina pero si congelarla durante más de 3 meses (135).

### **I.3.3. NUEVOS MÉTODOS DE PASTEURIZACIÓN.**

Las consecuencias derivadas del método Holder, han llevado a la búsqueda de métodos alternativos de pasteurización que repercutan menos en las propiedades biológicas/funcionales de la leche. La más prometedora en la actualidad es la pasteurización tipo **High Temperature Short Time (HTST)** / Elevada temperatura durante poco tiempo (70, 72, y 75°C durante 5-25 segundos). Se ha demostrado que con éste método, la concentración de IgA, IgG, IgM y leptina en LHD fue significativamente mayor que después del procedimiento Holder, que se aplica habitualmente en la actualidad (136) . Se observa la misma concentración de: TGF-β2, EGF, adiponectina y grelina y conserva mejor el perfil proteico (98,137,138).

Otro método de pasteurización innovador es el **procesamiento a alta presión (HPP)** dónde se evidencia que conserva la lactoferrina y mejora el perfil proteico tras la pasteurización (HPP > HTST > Holder) (137).

#### I.4. LECHE DE FÓRMULA.

Existe una gran variedad de LF (generalmente adaptadas de la leche de vaca (139). Estos varían en contenido energético, proteico y mineral pero, en términos generales, pueden considerarse como:

- Fórmula estándar "a término", diseñada para bebés a término basada en la composición de la leche materna madura; el contenido de energía típico es aproximadamente entre 67 kCal / 100 mL y 70 kCal / 100 mL;
- Fórmula "para prematuros" enriquecida con nutrientes, diseñada para proporcionar ingestas de nutrientes para igualar las tasas de acumulación intrauterina (140) estos están enriquecidos en energía (típicamente hasta aproximadamente 80 kCal / 100 ml) y de forma variable enriquecidos en proteínas y minerales (141).

Estudios demuestran que la flora bacteriana que coloniza a los lactantes alimentados con leche humana es diferente de aquellos alimentados con LF. En los primeros, se observan concentraciones más altas de especies de *Lactobacillus* y menos bacterias con alto potencial patogénico, por ejemplo, *E. coli*, *Campylobacter*, y *Bacteroides* (80). También se ha visto cambios en expresión de genes entre LM y LF (95,96).

Los estudios sobre los resultados del neurodesarrollo observan efectos significativamente positivos de la ingesta de leche materna en el desarrollo mental y motor, el cociente intelectual y la agudeza visual en comparación con la alimentación con fórmula. Los lactantes alimentados con leche materna también tienen menores tasas de rehospitalización después del alta (142).

En concreto, en los recién nacidos prematuros, numerosos estudios observan beneficios significativos para la defensa del huésped infantil, el desarrollo neuronal sensorial, la maduración gastrointestinal y algunos aspectos del estado nutricional cuando los bebés prematuros se alimentan con la propia leche materna. Se observa una reducción de la morbilidad relacionada con la infección en los lactantes prematuros alimentados con leche materna (143).

La mayoría de artículos demuestran que se produce menos ECN y ROP en aquellos recién nacidos prematuros menores de 32 semanas de edad gestacional, alimentados con LM y LHD, versus aquellos alimentados con LF (73,143).

Existe la preocupación de que los requisitos nutricionales de los lactantes prematuros o de bajo peso al nacer, que nacen con reservas de nutrientes relativamente empobrecidas y están sujetos a tensiones metabólicas adicionales en comparación con los lactantes a término, pueden no satisfacerse por completo con la alimentación enteral con leche materna de donante (71). Estas deficiencias pueden tener consecuencias adversas para el crecimiento y el desarrollo. Sin embargo, un posible beneficio importante de la leche materna de donante es que la administración de factores inmunoprotectores y de crecimiento a la mucosa intestinal inmadura puede prevenir resultados adversos graves, incluida la enterocolitis necrotizante y la infección invasiva (103).

Es por ello por lo que siempre que sea posible se administrará LM o en su defecto LHD, ambas fortificadas para poder aportar los requerimientos de energía y nutrientes (144).

Aunque la LHD ha demostrado ofrecer ventajas sobre la FP, la evidencia sobre la repercusión de la alimentación con ella a otros niveles es escasa. Hay pocos estudios realizados específicamente con leche de donante pasteurizada en recién nacidos prematuros y, por lo tanto, la mayor parte de la evidencia debe extrapolarse de los estudios que usan LM y FP (28, 30).

Hasta el momento actual no existen estudios que valoren las diferencias en la microbiota intestinal de los recién nacidos pretérminos alimentados con LM o LHD. Tampoco está estudiado si ambas presentan la misma protección antioxidante reduciendo los niveles de productos de daño oxidativo en orina, ni si se produce un cambio en el perfil transcriptómico en las CIEE.



**“No hay hechos, sólo interpretaciones”**

Nietzsche, 1886.

## **II. RAZÓN FUNDAMENTAL DE LA TESIS**

## II. RAZÓN FUNDAMENTAL DE LA TESIS.

Los últimos años han visto importantes avances en el campo de la nutrición y la medicina personalizada, en parte debido a la inclusión de otras prácticas como la ecología microbiana y la genómica nutricional. Además, el desarrollo de tecnologías "ómicas", incluidas la metabolómica o la transcriptómica, ha proporcionado nuevos enfoques en su estudio. Las recientes tecnologías de secuenciación y las herramientas bioinformáticas desarrolladas han facilitado el análisis del microbioma humano y han revelado su papel esencial en el desarrollo del huésped, especialmente durante los primeros años de vida. Varios estudios han puesto de relieve la posible relación entre los cambios en la colonización microbiana y el riesgo de enfermedades no transmisibles como aquellas de base inmune, obesidad, la diabetes, la alergia o la enfermedad inflamatoria intestinal más adelante en la vida. Por otra parte, la situación pro-oxidante postnatal a la que se ve sometido el prematuro con un sistema de defensa todavía incipiente favorece el desarrollo de patologías asociadas a los radicales libres. En este sentido, la leche materna propia e incluso la donada podrían ser útiles como antioxidantes y prevenir secuelas a corto y largo plazo de la patología por radicales libres. Finalmente, hay cada vez más evidencia de que la nutrición desempeña

un papel importante en la regulación del desarrollo y la función intestinal neonatal, modulando el sistema inmunológico del recién nacido e influyendo en la diferente expresión de genes en respuesta al tipo de alimentación. La manipulación de la leche humana en los bancos de leche podría modificar la expresión de genes relevantes.

En conjunto, se ha sugerido que los factores perinatales, entre ellos la nutrición, podrían modificar este proceso de adquisición de microbiota, el estado oxidativo y la expresión de genes. Sin embargo, los datos disponibles sobre el impacto de la pasteurización de la leche materna en los recién nacidos prematuros, siguen siendo limitados.

**III. HIPÓTESIS**  
**IV. OBJETIVOS**

### III. HIPÓTESIS.

La leche humana donada, pasteurizada, controlada microbiológicamente y almacenada en un banco de leche, podría conservar propiedades que la hacen superior a la leche de fórmula para la alimentación de prematuros  $\leq 32$  semanas de gestación y  $\leq 1.500$  gramos.

### IV. OBJETIVOS.

En una población de prematuros  $\leq 32$  semanas y  $\leq 1.500$  gramos:

- ❖ Analizar y comparar la **microbiota intestinal** entre aquellos que reciben LM, LHD pasteurizada en el Banco de Leche y FP.
- ❖ Analizar y comparar **marcadores de estrés oxidativo** en orina, en aquellos alimentados con LM (150 ml/kg/día) vs LHD.
- ❖ Determinar mediante estudio transcriptómico si existen diferencias en **perfiles de expresión genómica** a partir de células de descamación en heces, en los prematuros que reciben LM vs LHD.

## **V. POBLACIÓN Y MÉTODOS**

## **V. POBLACIÓN Y MÉTODOS.**

### **V.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.**

Se trata de un estudio de cohortes, prospectivo, observacional y unicéntrico dónde se han incluido durante un periodo de 12 meses, todos los recién nacidos  $\leq 32$  semanas de edad gestacional y  $\leq 1.500$  gramos, ingresados en el Servicio de Neonatología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia, España), que recibieron alimentación enteral completa (aporte= 150 mL/kg/día) o bien de leche materna (LM), o de leche humana de donante (LHD), o de fórmula de prematuro (FP).

Siguiendo los protocolos del Servicio de Neonatología, se intentó la alimentación completa con LM en todos los casos, aunque no se logró en todos los pacientes. Se reclutaron dos grupos de pacientes en los que uno de ellos recibía una nutrición enteral con LM (al menos  $\geq 80\%$  del volumen total de la ingesta, y el resto, en caso necesario, se completó con LHD) y otro grupo recibió LHD (con un mínimo del  $\geq 80\%$  y el resto, en caso necesario, con LM). Un tercer grupo en que los padres rechazaron la alimentación del prematuro con LM o LHD, fue alimentado con FP.

Los recién nacidos prematuros fueron alimentados al ingreso en la Unidad, con pequeños volúmenes de nutrición enteral trófica (entre 15-30 ml / kg / día), que se incrementó progresivamente hasta alcanzar la nutrición enteral completa en los días 10-12 después del nacimiento. La nutrición desde el momento del nacimiento, se complementó con nutrición parenteral intravenosa, que se fue disminuyendo de forma gradual, de acorde con el aumento de la nutrición enteral, hasta su total retirada.

La ingesta diaria se proporcionó con LM o LHD para lograr el volumen de alimentación prescrito. Los pacientes del grupo LHD solo recibieron leche de una madre donante. La ingesta nutricional se controló, pero nunca fue influenciada por este estudio observacional. Dado que ni la LM ni la LHD cubren completamente las elevadas necesidades energéticas, proteicas y de vitaminas y minerales de los recién nacidos  $\leq 32$  semanas de edad gestacional y/o  $\leq 1.500$  gramos, se han diseñado fortificantes para añadir a la leche éstos déficits que presenta. Los beneficios demostrados de esta fortificación son mejores tasas de ganancia de peso, talla y perímetro cefálico, normalización de los índices bioquímicos del estado mineral óseo, entre otros, sin aumentar las tasas de ECN.

Así pues, tras alcanzar los 100 ml/kg/día de LM o LHD, se inicia la fortificación con 1g/100 ml, aumentando diariamente 1g/100ml, hasta la dosis recomendada (4g/100ml).

## **V.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.**

### **V.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

- Recién nacidos prematuros  $\leq 32$  semanas de gestación y  $\leq 1.500$  gramos, con alimentación enteral exclusiva y aportes estables de 150 mL/kg/día.
- El nutriente recibido ya sea LM, LHD, o LF especial para bajo peso (leche de bajo peso estándar) representó al menos el 80% de la ingesta.
- LM fue proporcionada por la madre a su propio hijo. La LHD fue generalmente de la misma donante para un mismo prematuro. Sólo en caso de que no hubiese suficiente se utilizó leche de una segunda donante.
- No se incluyeron tratamientos adicionales que pudieran alterar la microbiota (e.g.: antibióticos, probióticos, etc.).

### **V.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.**

- Recién nacidos prematuros mayores de 32 semanas y mayores de 1.500 gramos.
- Rechazo de los padres a participar.
- Lactancia mixta.
- Cromosomopatías.
- Malformaciones mayores o cirugía de la vía digestiva.

## **V.3. MÉTODO DE RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS.**

Se recogieron muestras fecales y de orina a partir del momento en el que los recién nacidos prematuros alcanzaron una nutrición enteral completa (150 ml / kg / día).

### **V.3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE HECES.**

Se recogió una muestra de heces por niño, directamente del pañal, con una torunda estéril (mínimo 5 g, comprobado con una báscula de la unidad neonatal).

Las muestras fueron congeladas y almacenadas a  $-80^{\circ}$  C para su posterior análisis.

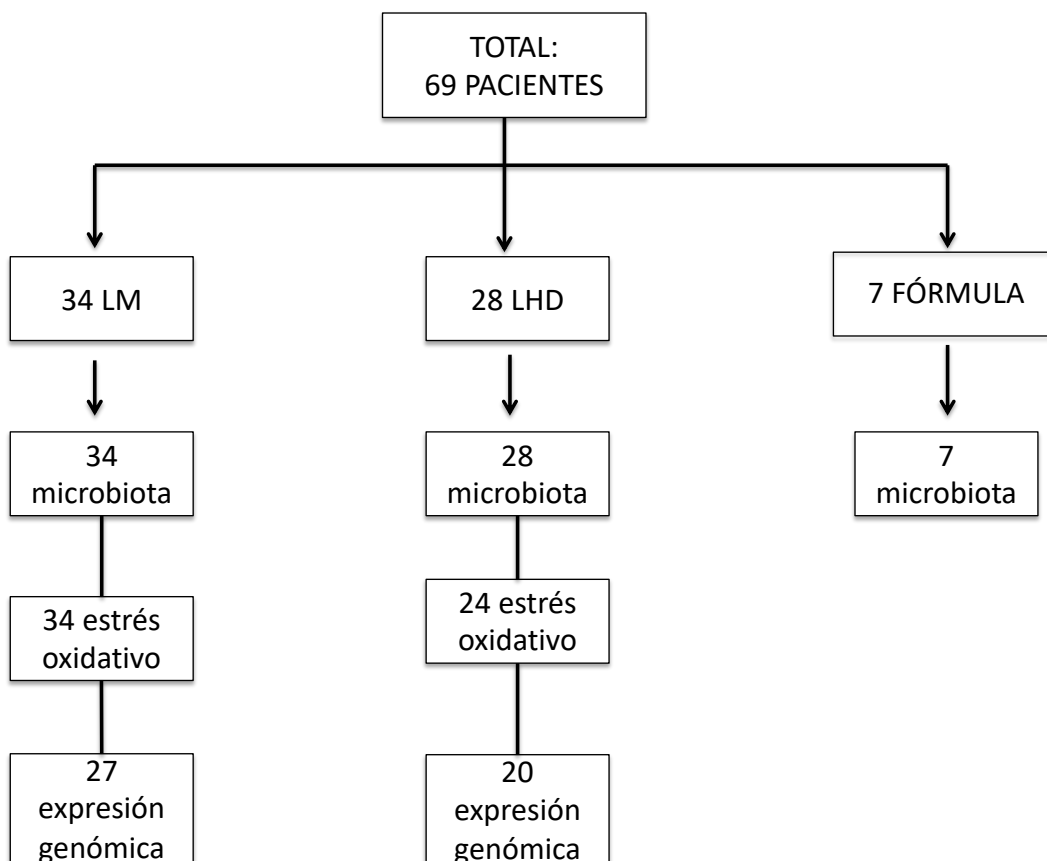


### **V.3.2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE ORINA.**

Se recogieron muestras de orina después de lograr una nutrición enteral completa y una vez por semana a partir de entonces hasta el alta hospitalaria. Se recogía la orina utilizando un parche de algodón estéril colocado en el pañal. El algodón se introducía posteriormente en una jeringuilla y se exprimía comprimiendo el émbolo de la misma. El proceso se repetía hasta recoger un mínimo de 1 ml. Las muestras de orina se dividieron en partes alícuotas destinadas a cada método analítico para evitar ciclos de congelación-descongelación. Se almacenaron a -80 °C hasta el análisis (ver la Figura 4 del artículo: “Does Pasteurized Donor Human Milk Efficiently Protect Preterm Infants Against Oxidative Stress?”(145), dónde se ofrece una visión general del proceso de recolección de muestras).

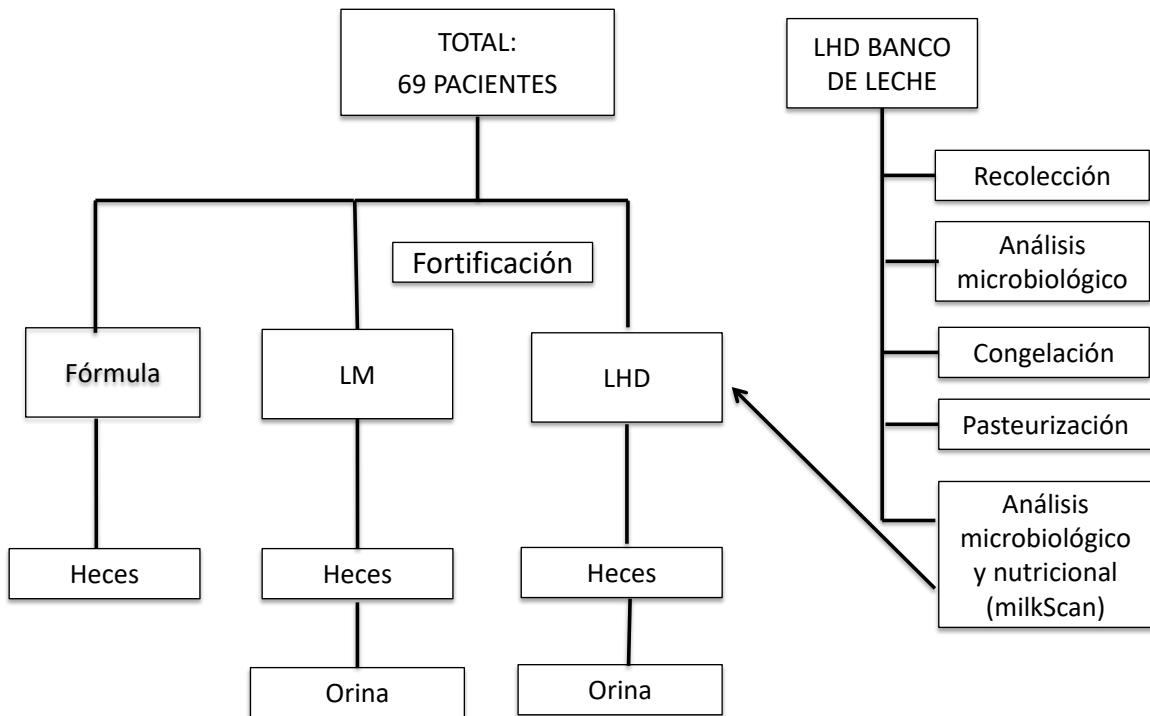
#### V.4. DIAGRAMAS DE FLUJO DE LOS PACIENTES RECLUTADOS EN LOS DIFERENTES OBJETIVOS.

Se reclutaron 69 pacientes en total, para los 3 estudios. 34 pertenecían al grupo de LM (de los cuales en los 34 se estudió la microbiota y el estrés oxidativo y en 27 de ellos la expresión genómica), 28 pertenecían al grupo de LHD (de los cuales en los 28 se estudió la microbiota, en 24 el estrés oxidativo y en 20 de ellos la expresión genómica), y 7 pertenecían al grupo de FP (de los cuales en 7 se estudió la microbiota). El diagrama de flujo queda representado en la Figura 4.



**Figura 4:** Diagrama de flujo de los pacientes reclutados en los diferentes objetivos del estudio.

La figura 5 muestra el diagrama de flujo de los 3 grupos de pacientes reclutados, según el tipo de alimentación recibida: LM, LHD o FP.



**Figura 5:** Diagrama de flujo del reclutamiento de pacientes y la recolección de muestras. Se reclutaron 69 pacientes  $\leq$  de 32 semanas y  $\leq$  de 1.500 gramos. Tras alcanzar la nutrición enteral completa con al menos 80% de la ingesta con LM, LHD o FP. Se analizaron las heces de los tres grupos y la orina de los dos primeros.

## **V.5. ASPECTOS ÉTICOS.**

El estudio fue aprobado por el comité científico para la investigación biomédica (CEIm) (#2015/0317) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Todos los padres que aceptaron participar firmaron el consentimiento informado.

En el anexo 4 se adjunta la carta de aprobación del proyecto por el Comité Ético.

En el anexo 5, se adjunta la aceptación de la mención internacional de la tesis.

**ANEXO 4:** CARTA DE APROBACIÓN DEL CEIM.

**ANEXO 5:** ACEPTACIÓN MENCIÓN INTERNACIONAL DE LA TESIS.

**“He aquí mi secreto, que no puede ser más simple: sólo con el corazón se puede ver bien; lo esencial es invisible para los ojos”**  
El Principito (Antoine de Saint-Exupéry).

## **VI. CAPÍTULOS**

## VI. CAPÍTULOS.

**CAPÍTULO I.** Parra-Llorca A, et al. “*Preterm Gut Microbiome Depending on Feeding Type: Significance of Donor Human Milk*” . *Front Microbiol.* 2018;9:1376.

**CAPÍTULO II.** Parra-Llorca A, et al. “*Does Pasteurized Donor Human Milk Efficiently Protect Preterm Infants Against Oxidative Stress?*”. *Antioxid Redox Signal.* 2019;31:791-799.

**CAPÍTULO III.** Parra-Llorca A, et al. “*Impact of Donor Human Milk in the Preterm Very Low Birth Weight Gut Transcriptome Profile by Use of Exfoliated Intestinal Cells*”. *Nutrients.* 2019;11:2677.

## **CAPÍTULO I.**

**Nuestra primera publicación versó sobre la influencia del procesamiento de la leche humana donada en la microbiota intestinal de prematuros  $\leq 32$  semanas y  $\leq 1.500$  gramos, tal y cómo exponemos en la publicación que se adjunta:**

**Parra-Llorca A, et al. Preterm Gut Microbiome Depending on Feeding Type: Significance of Donor Human Milk. *Front Microbiol.* 2018;9:1376 (146).**

La colonización microbiana en prematuros se ve afectada por la edad gestacional, el tratamiento con antibióticos, el tipo de nacimiento, y también por el tipo de alimentación. La leche materna ha sido reconocida como el estándar de oro para la nutrición humana. En los recién nacidos prematuros, la leche materna se ha asociado a un mejor crecimiento y desarrollo cognitivo y un menor riesgo de enterocolitis necrotizante y sepsis tardía. En ausencia de leche materna, la leche humana donada (LHD) pasteurizada, podría ser la mejor alternativa disponible debido a su similitud con la primera. Sin embargo, poco se sabe sobre el efecto de la LHD sobre la microbiota intestinal en prematuros y las posibles implicaciones biológicas. Nuestro objetivo fue determinar el impacto de la LHD sobre la microbiota intestinal en recién nacidos prematuros ingresados en una unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) de referencia. Se realizó un estudio de cohortes observacional, prospectivo, en una población de 69 recién nacidos  $<32$  semanas de gestación y con un peso al nacer  $< 1.500$  g. Los recién nacidos se clasificaron en tres grupos según las prácticas de alimentación en la unidad, que consistían en su LM, LHD o FP. Se recogieron muestras fecales cuando se consiguió la alimentación enteral completa (definida



como  $\geq 150$  cc / kg / día). La composición de la microbiota intestinal se analizó mediante secuenciación del gen de ARNr 16S. A pesar de una mayor variabilidad, no se encontraron diferencias en la diversidad y riqueza microbiana, aunque el tipo de alimentación influyó significativamente en la composición de la microbiota intestinal en los prematuros y en los perfiles funcionales predictivos. Los recién nacidos prematuros alimentados con LM mostraron una presencia significativamente mayor de *Bifidobacteriaceae* y menor de *Staphylococcaceae*, *Clostridiaceae* y *Pasteurellaceae* en comparación con los prematuros alimentados con LHD. El perfil microbiano intestinal en los prematuros alimentados con FP fue diferente al observado en aquellos alimentados con LM.

Sorprendentemente, los recién nacidos prematuros alimentados con LHD mostraron perfiles microbianos más cercanos a los de aquellos alimentados con LM. Los análisis metagenómicos inferidos mostraron que una mayor presencia del género *Bifidobacterium* en el grupo de la leche materna estaba relacionada con el enriquecimiento en la vía de biosíntesis y metabolismo de glicanos, cosa que no se identificó en los grupos de prematuros alimentados con LHD o con FP. En conclusión, la LHD favorece un microbioma intestinal más similar a el inducido por LM que al inducido por la FP, a pesar de las diferencias entre LM y LHD.

Esto podría tener posibles efectos beneficiosos a largo plazo sobre la funcionalidad intestinal, el sistema inmunológico y las actividades metabólicas.



# Preterm Gut Microbiome Depending on Feeding Type: Significance of Donor Human Milk

Anna Parra-Llorca<sup>1</sup>, María Gormaz<sup>1,2</sup>, Cristina Alcántara<sup>3</sup>, María Cernada<sup>1,2</sup>, Antonio Nuñez-Ramiro<sup>1,2</sup>, Máximo Vento<sup>1,2\*†</sup> and María C. Collado<sup>3\*†</sup>

<sup>1</sup> Neonatal Research Group, Health Research Institute La Fe, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain,

<sup>2</sup> Division of Neonatology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain, <sup>3</sup> Department of Biotechnology, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Spanish National Research Council, Valencia, Spain

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Sandra Torriani,  
University of Verona, Italy

### Reviewed by:

Carlotta De Filippo,  
Consiglio Nazionale delle Ricerche  
(CNR), Italy  
Christopher James Stewart,  
Newcastle University, United Kingdom

### \*Correspondence:

Máximo Vento  
maximo.vento@uv.es  
María C. Collado  
mcolam@iata.csic.es

† Shared senior authorship

### Specialty section:

This article was submitted to  
Food Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 22 December 2017

Accepted: 06 June 2018

Published: 27 June 2018

### Citation:

Parra-Llorca A, Gormaz M,  
Alcántara C, Cernada M,  
Nuñez-Ramiro A, Vento M and  
Collado MC (2018) Preterm Gut  
Microbiome Depending on Feeding  
Type: Significance of Donor Human  
Milk. *Front. Microbiol.* 9:1376.  
doi: 10.3389/fmicb.2018.01376

Preterm microbial colonization is affected by gestational age, antibiotic treatment, type of birth, but also by type of feeding. Breast milk has been acknowledged as the gold standard for human nutrition. In preterm infants breast milk has been associated with improved growth and cognitive development and a reduced risk of necrotizing enterocolitis and late onset sepsis. In the absence of their mother's own milk (MOM), pasteurized donor human milk (DHM) could be the best available alternative due to its similarity to the former. However, little is known about the effect of DHM upon preterm microbiota and potential biological implications. Our objective was to determine the impact of DHM upon preterm gut microbiota admitted in a referral neonatal intensive care unit (NICU). A prospective observational cohort study in NICU of 69 neonates <32 weeks of gestation and with a birth weight  $\leq 1,500$  g was conducted. Neonates were classified in three groups according to feeding practices consisting in their MOM, DHM, or formula. Fecal samples were collected when full enteral feeding (defined as  $\geq 150$  cc/kg/day) was achieved. Gut microbiota composition was analyzed by 16S rRNA gene sequencing. Despite the higher variability, no differences in microbial diversity and richness were found, although feeding type significantly influenced the preterm microbiota composition and predictive functional profiles. Preterm infants fed MOM showed a significant greater presence of Bifidobacteriaceae and lower of Staphylococcaceae, Clostridiaceae, and Pasteurellaceae compared to preterm fed DHM. Formula fed microbial profile was different to those observed in preterm fed MOM. Remarkably, preterm infants fed DHM showed closer microbial profiles to preterm fed their MOM. Inferred metagenomic analyses showed higher presence of *Bifidobacterium* genus in mother's milk group was related to enrichment in the Glycan biosynthesis and metabolism pathway that was not identified in the DHM or in the formula fed groups. In conclusion, DHM favors an intestinal microbiome more similar to MOM than formula despite the differences between MOM and DHM. This may have potential beneficial long-term effects on intestinal functionality, immune system, and metabolic activities.

**Keywords:** preterm infant, their mother's own milk, donor human milk, formula milk, intestinal colonization, microbiota

**Abbreviations:** BPD, bronchopulmonary dysplasia; DHM, donor human milk; FM, special preterm formula; HM, human milk; LOS, late onset sepsis; MOM, mother's own milk; NEC, necrotizing enterocolitis; NICU, neonatal intensive care unit; PVL, periventricular leukomalacia; ROP, retinopathy of prematurity.

## INTRODUCTION

In preterm infants, neonatal microbial dynamics and alterations in early gut microbiota may precede and/or predispose to diseases such as NEC or LOS (The European Perinatal Health Report, 2010). In the newborn period differential microbial colonization clearly relates to weeks of gestation and mode of delivery (Lehtonen et al., 2017), but also to infant nutrition (Collado et al., 2015).

Human milk is the gold standard for infant nutrition in the first 12 months of life for term and preterm newborn infants (American Academy of Pediatrics, 2012). Beyond nutritional components, HM contains important bioactive compounds such oligosaccharides, cytokines, immunoglobulins, microbes, and proteins among others that directly influence the developing infant and shape the intestinal microbiota colonization. Those bioactive compounds are considered not only protective but also stimulate the development and maturation of the immature immune system (Agostoni, 2010; Ballard and Morrow, 2013). Moreover, breastfeeding practices have been associated with a risk reduction of NEC and LOS in preterm infants (Meinzen-Derr et al., 2009; Collado et al., 2012) and an improvement in growth and cognitive development and modulating metabolic and inflammatory conditions in later childhood and adulthood (Ballard and Morrow, 2013; Belfort et al., 2016). However, often mothers who deliver preterm are not able to successfully breastfeed (Wilson et al., 2017). In the absence of MOM, DHM has become the preferred alternative for preterm infants (ESPGHAN Committee on Nutrition et al., 2013). Despite the beneficial effects of DHM, little is known about its effect upon preterm gut microbiota colonization and its potential biological implications. Most HM bank guidelines recommended Holder pasteurization (62.5°C for 30 min) in order to inactivate viral and bacterial agents (Human Milk Banking Association of North America, 2000; Arslanoglu et al., 2010; National Institute for Health and Clinical Excellence, 2010; Peila et al., 2016). However, HM pasteurization causes the loss of several of the structural and functional properties of HM (Baro et al., 2001). Moreover, pasteurization also significantly reduces the cellular and bacterial constituents, enzymatic activities, and IgA, lactoferrin and lysozyme contents (Untalan et al., 2009; Christen et al., 2013; Espinosa-Martos et al., 2013; Sousa et al., 2014). Contrarily, other components with biological relevance such as oligosaccharides, nucleotides, and polyunsaturated and long chain fatty acids (LCPUEFA) are preserved (Bertino et al., 2008; Coscia et al., 2015). As a consequence, pasteurization is still a matter of debate (Bertino et al., 2009; ESPGHAN Committee on Nutrition et al., 2013; Corpeleijn et al., 2016; Madore et al., 2017).

In this scenario, we hypothesized that DHM would promote a specific microbiota profile similar to the observed in the preterm infants who receive MOM. To pursue this objective we analyzed the impact of different nutritional approaches upon the gut microbiota composition of preterm infants born at  $\leq 32$  weeks of gestation.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Design

We conducted a prospective, observational unicentric cohort study including consecutively admitted preterm infants born at  $\leq 32$  weeks of gestation and birth weight  $\leq 1,500$  g in the Division of Neonatology of the University and Polytechnic Hospital La Fe (Valencia, Spain) during a 12-month period. The study protocol was approved by the hospital IRB (Comité de Ética e Investigación Médica) and parents approved and signed informed consent in all cases.

### Patients' Characteristics

Inclusion and exclusion criteria are shown in **Table 1**. Demographic, perinatal, clinical, and analytical data were recorded and matched according to the type of feeding (**Table 2**). Administration and duration of antibiotic therapy was also collected.

Fresh DHM was collected and immediately frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until Holder pasteurization process (62.5°C for 30 min followed by fast cooling). After treatment, pasteurized DHM was frozen until the distribution to patients. The Division of Neonatology protocol involves strong support to breastfeeding and offering DHM as a supplement to preterm infants born below  $\leq 32$  weeks or  $\leq 1,500$  g birth weight. Type of feeding was a parents' decision. The infants were fed at least with an 80% of either MOM or DHM and table intakes of 150 cc/kg/day.

The nutritional intake was prospectively monitored but never influenced by this observational study.

### Fecal Samples, DNA Extraction, and 16S rDNA Sequencing

Fecal samples were directly collected from the diaper when full enteral feeding (defined as  $\geq 150$  cc/kg/day of MOM, DHM, or formula) was achieved. Samples were frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later analysis.

Total fecal DNA was isolated using the MasterPure Complete DNA & RNA Purification Kit (Epicentre, Madison, WI,

**TABLE 1** | Inclusion and exclusion criteria for preterm infants receiving different types of nutrition and whose microbiota was studied.

Inclusion criteria	Exclusion criteria
BW $\leq 1,500$ g and/or GA $\leq 32$ weeks	GA $> 32$ weeks
Enteral intake ( $\geq 150$ mL/kg/day)	Parents refuse to participate/sign informed consent
The principal nutrient received (MOM, DHM, or formula) represents 80% of the intake	Mixed breastfeeding
DHM from just one donor to one premature or maximum of two different donors	Chromosomopathies
No additional treatments that could alter the microbiota (e.g., probiotics) or oxidative status (e.g., vitamins C, A, and E)	Major malformations or surgery of the digestive tract

GA, gestational age; BW, birth weight; MOM, mother's own milk; DHM, donor human milk.

**TABLE 2** | Perinatal characteristics and confounders of preterm infants receiving different types of nutrition and whose microbiota was studied.

	MOM (n = 34)	DHM (n = 28)	p-Value
GA weeks, mean (SD)	28.85 (1.9)	29.78 (2.42)	0.09
Antenatal steroids full course (%)	97.1	92.8	0.44
Type of delivery (%)			
Vaginal	58.8	39.3	0.126
Cesarean section	41.2	60.7	
Birth weight (g), mean (SD)	1,228 (301)	1304.3 (262)	0.3
Race (%)			
Caucasian	85.3	67.8	0.1
Non-Caucasian	14.7	32.1	
Apgar 1 min (median; 5–95% CI)	7.3 (2.15)	7.1 (1.81)	0.68
Apgar 5 min (median; 5–95% CI)	9.02 (1.3)	8.6 (1.4)	0.24
Age (days) at sample collection, mean (SD)	9.7 (7.03)	8.7 (6.2)	0.52
Chorioamnionitis (%)	76.4	89.2	0.19
Mechanical ventilation	11.7	14.3	0.76
Non-invasive ventilation	75	85.3	0.3
Persistent ductus arteriosus	29.4	25	0.69
Antibiotic therapy (%)	38.2	39.2	0.93

United States) according to the manufacturer's instructions with modifications that included a bead-beater step and enzyme incubation to increase DNA extraction as described elsewhere (Boix-Amoros et al., 2016). Total DNA concentration was measured using a Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, United States) and normalized to 5 ng/μL for 16S rDNA gene (V3–V4 region) amplification using Nextera XT Index Kit. Amplicons were checked with a Bioanalyzer DNA 1000 chip and libraries were sequenced using a 2 × 300 bp paired-end run (MiSeq Reagent kit v3) on a MiSeq-Illumina platform (FISABIO sequencing service, Valencia, Spain). Controls during DNA extraction and PCR amplification were also included and sequenced.

### Bioinformatics and Statistical Analysis

Data were obtained using an *ad hoc* pipeline written in RStatistics environment (R Core Team, 2012) and data processing was performed using a QIIME pipeline (version 1.9.0) (Caporaso et al., 2010). Chimeric sequences and sequences that could not be aligned were also removed from the data set. The clustered sequences were utilized to construct operational taxonomic units (OTUs) tables with 97% identity and representative sequences were taxonomically classified based on the Greengenes 16S rRNA gene database (version 13.8). Sequences that could not be classified to domain level, or classified as cyanobacteria and chloroplasts, were removed from the data set. Subsequently, alpha diversity indices (Chao1 and Shannon, Species richness estimates and diversity index, respectively), beta diversity based on UNIFRAC unweighted distance (phylogenetic) and Bray–Curtis distance (non-phylogenetic), and PERMANOVA with 999 permutations

was used to test significance between groups. The DESeq2 method was used to determine differential abundances of specific bacteria between feeding groups. Calypso software<sup>1</sup> version 7.36 was used with total sum normalization for the statistical analysis, and also, cumulative sum scaling (CSS) normalization for multivariate test. Furthermore, predictive inferred functional analysis was performed using PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) approach as described (Langille et al., 2013). Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) (Segata et al., 2011) was used to detect unique biomarkers in relative abundance of bacterial taxonomy and specific functions (KEGG pathways). A size effect cut-off of 3.0 on the logarithmic linear discriminant analysis (LDA) score was used. The 16S rRNA gene sequence data generated is available through GenBank Sequence Read Archive Database under project accession number PRJEB25948.

## RESULTS

### Patients' Characteristics

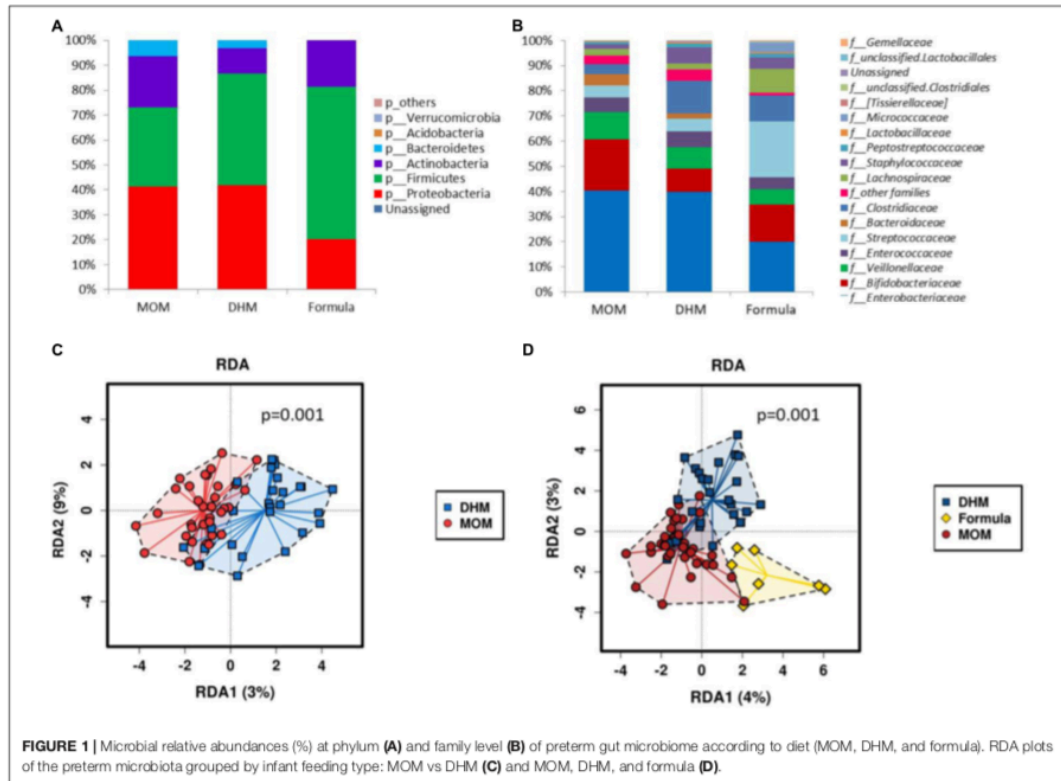
A total of 69 preterm infants ≤32 weeks of gestation pertaining to the MOM (n = 34), DHM (n = 28), and formula (n = 7) groups were recruited. No differences for prenatal demographic characteristics or confounders during the hospitalization between patients in the three feeding-type groups were found (Table 2). Individual information is available in Supplementary Table S1.

A small group of preterm neonates (n = 7) fed with formula milk was also included. The low number is explained because the protocol of our NICU recommends for all preterm ≤32 weeks of gestation and ≤1,500 g MOM and DHM as an alternative and therefore preterm fed with formula render exceptional. Characteristics of the formula group were as follows: 33 ± 2 weeks of gestation; 1,702 ± 321.6 g birth weight; 57.1% male; 14.3% born by vaginal delivery (85.7% by cesarean section); 57.1% received antenatal steroids.

### Impact of DHM on Preterm Microbiota

Significant differences were found in preterm microbiota composition according to feeding type. We found lower relative abundance of Firmicutes (30.9 vs 45.5%, *p*-value = 0.029) and higher abundance of Actinobacteria (20.1 vs 10.2%, *p*-value = 0.040) in MOM compared to DHM group (Figure 1A). At family level, higher abundance of Bifidobacteriaceae (19.5 vs 9.0%, *p*-value = 0.027) and lower abundance of Clostridiaceae (3.7 vs 11.2%, *p*-value = 0.029) were observed in MOM compared to DHM (Figure 1B). At genus level, higher levels of *Bifidobacterium* (19.5 vs 8.98%, *p*-value = 0.027) and unclassified Enterobacteriaceae (29.77 vs 18.48%, *p*-value = 0.060) and lower levels of *Citrobacter* (2.60 vs 9.83%, *p*-value = 0.060), and unclassified Clostridiaceae (3.46 vs 9.43%, *p*-value = 0.062) were

<sup>1</sup><http://cgenome.net/calypso/>



observed in fecal samples of MOM as compared to the DHM group.

The effect of the diet on the preterm gut microbiota was explored by applying the multivariate method PERMANOVA with 999 permutations on the phylogenetic distances ( $p$ -value = 0.09 for unweighted UNIFRAC distance) and Bray–Curtis distance (non-phylogenetic;  $p$ -value = 0.0046). Furthermore, multivariate redundant discriminant analysis (RDA) based on the observed OTUs showed statistically significant differences in microbial composition between MOM and DHM groups ( $p = 0.001$ ) (Figure 1C).

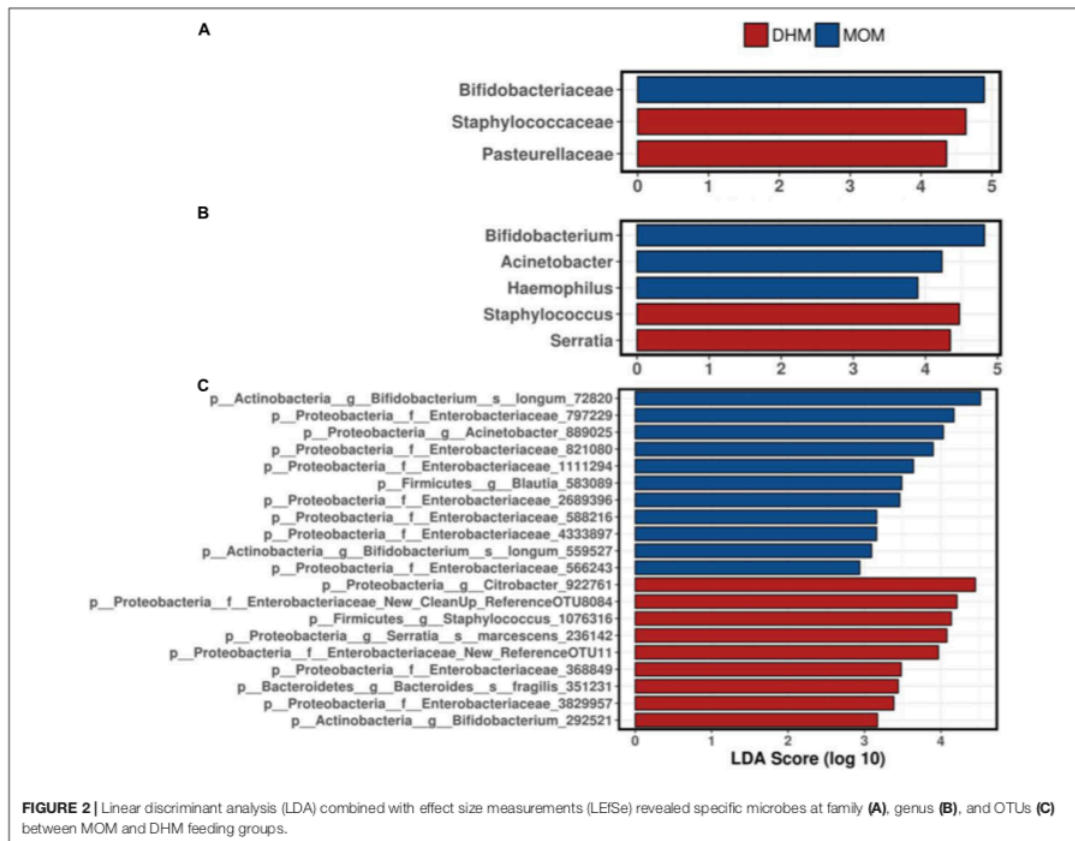
To explore the variation of the microbial community composition between MOM and DHM, we performed LEfSe tests to detect differences in relative abundance of bacterial taxa across fecal samples (Figure 2). At the family level, Bifidobacteriaceae family was significantly enriched in MOM compare to DHM samples (LDA = 4.90,  $p$ -value = 0.025) while Staphylococcaceae (LDA = 4.63,  $p$ -value  $\leq 0.042$ ). Pasteurellaceae family was enriched in DHM (LDA = 4.358,  $p$ -value = 0.050). Specific enriched features at genus and OTUs levels are shown in Figure 2.

DESeq2 test was used to identify differential abundances of specific bacteria between feeding groups. Actinobacteria phylum

was higher in MOM compared to DHM group (20.07 vs 10.25%,  $p$ -value = 0.0044, FDR = 0.013). The abundance of *Staphylococcus* ( $p$ -value < 0.0001, FDR < 0.0001), *Clostridium* ( $p$ -value < 0.0001, FDR = 0.0013), *Serratia* ( $p$ -value < 0.0001, FDR = 0.0022), *Coprococcus* ( $p$ -value = 0.0021, FDR = 0.012), *Aggregatibacter* ( $p$ -value = 0.015, FDR = 0.059), and *Lactobacillus* ( $p$ -value = 0.056, FDR = 0.18) was significantly higher in DHM group than MOM group. However, *Bacteroides* ( $p$ -value < 0.0001, FDR = 0.0044), *Acinetobacter* ( $p$ -value < 0.0001, FDR = 0.002), and *Haemophilus* ( $p$ -value = 0.0014, FDR = 0.009) were significantly higher in the MOM than in DHM group.

### Impact of Formula vs Human Milk Groups on Preterm Microbiome

Despite the low number of formula fed preterm infants, we analyzed the differences in microbiome between MOM, DHM, and FM groups. A multivariate RDA based on the observed OTUs showed statistically significant differences in microbial composition between groups ( $p = 0.001$ ) (Figure 1D). Significantly higher relative abundance of Firmicutes ( $p$ -value = 0.027, FDR = 0.016) was observed in FM group compared to MOM and DHM



(Figure 1A). At genus level, significant higher abundance of *Blautia* ( $p$ -value  $< 0.001$ , adjusted  $p$ -value = 0.033, FDR = 0.033), *Streptococcus* ( $p$ -value = 0.0024, FDR = 0.054), *Acidaminococcus* ( $p$ -value = 0.0093, FDR = 0.099), *Rothia* ( $p$ -value = 0.0059, FDR = 0.088), and *Dorea* ( $p$ -value = 0.011, FDR = 0.099) were observed in the FM group compared to the MOM and DHM groups.

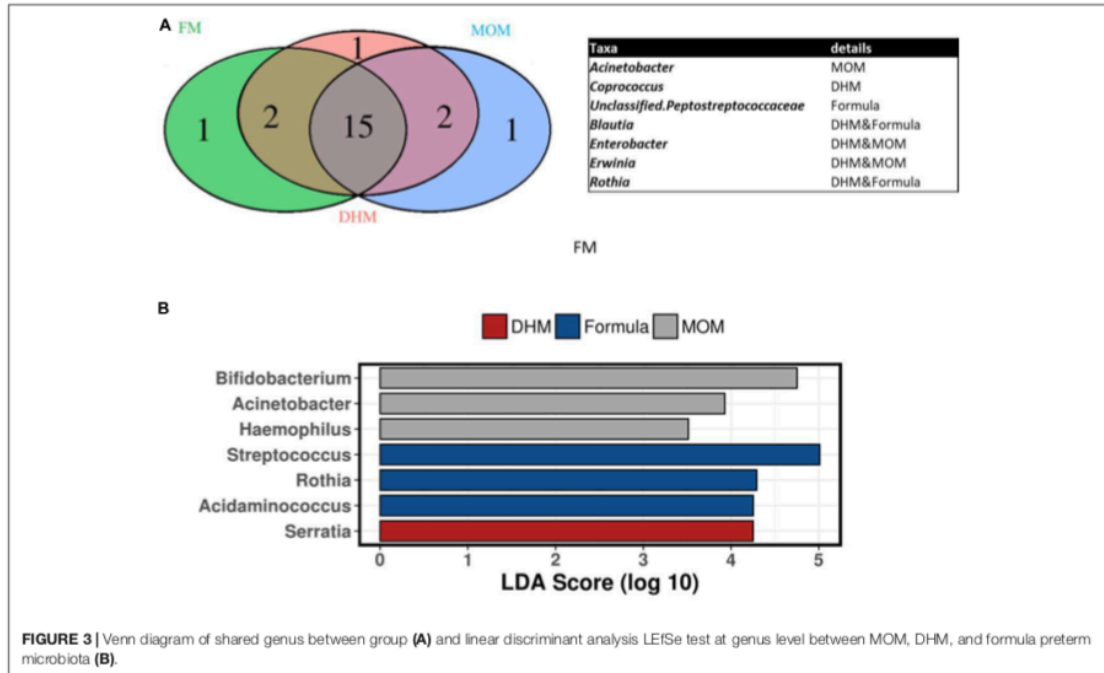
Preterm core microbiome was composed by a total of 15 shared genus independently of feeding-type diet (Figure 3A). *Acinetobacter* genus was exclusively present in MOM group; while *Coprococcus* genus was present in DHM and unclassified Peptostreptococcaceae genus in formula group.

Linear discriminant analysis effect size test showed that *Rothia*, *Streptococcus*, and *Acidaminococcus* genus were significantly enriched in formula group compared to MOM and DHM group, while *Bifidobacterium*, *Acinetobacter*, and *Haemophilus* genus were enriched significantly in MOM compared to DHM, representing a hallmark for breast fed preterm gut microbiota (Figure 3B).

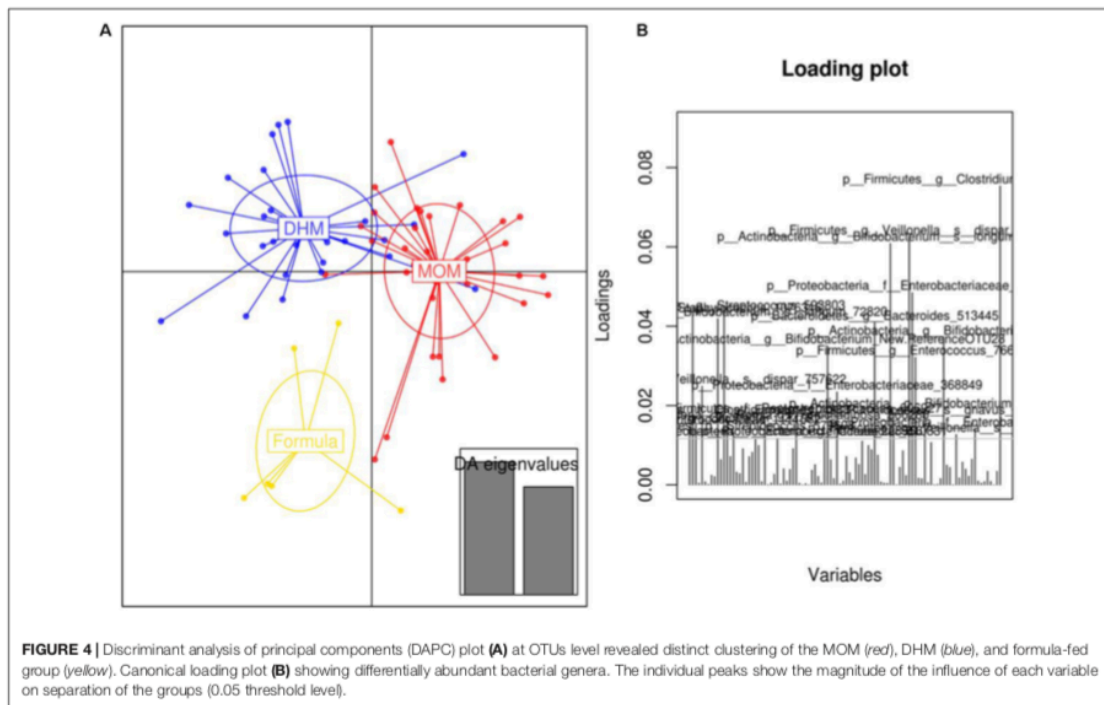
We also applied discriminant analysis of principal components (DAPC) identifying specific feeding-type related clusters of preterm microbiota (Figure 4). These microbial shifts were attributed to subtle changes in the abundance of several bacterial OTUs. *Clostridium*, *Bifidobacterium*, unclassified Enterobacteriaceae and *Veillonella* related OTUs were the strongest indicator of the presence of distinct microbial clusters.

### Functional Assignment of the Preterm Microbiota

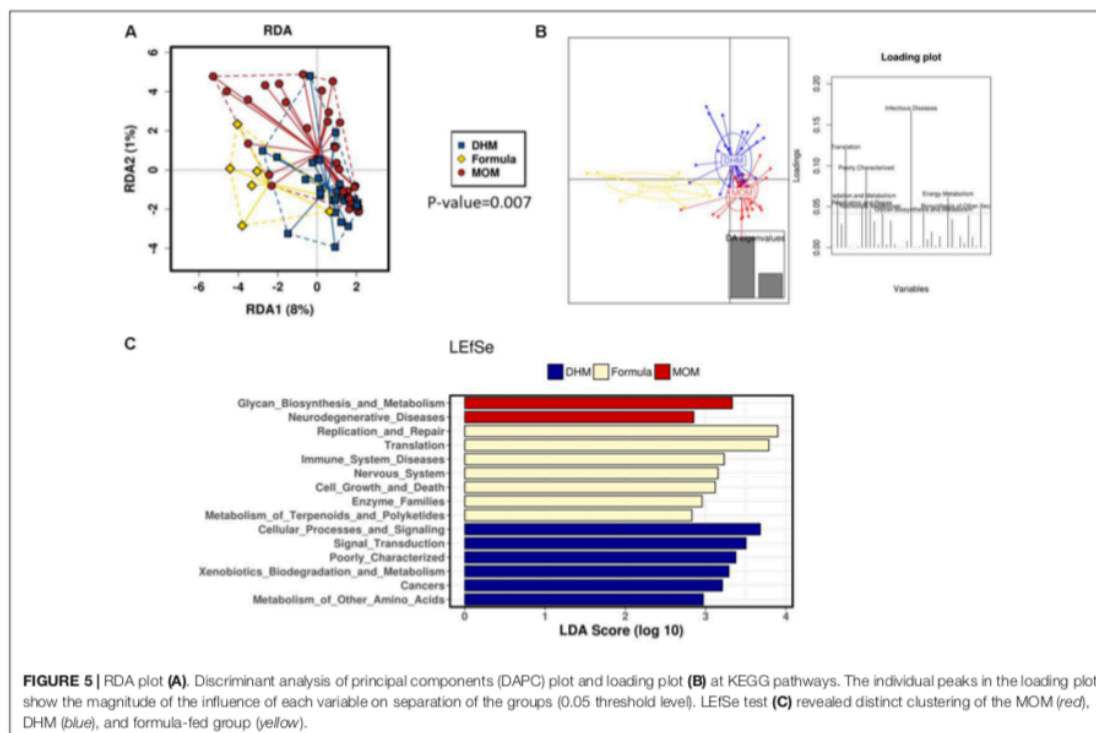
Inferred metagenomic PICRUSt prediction revealed significant differences in the main functional classes (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG categories at level 2), deriving from functional acquisitions associated with different diets (multivariate RDA test,  $p = 0.007$ ) (Figure 5A). Moreover, no different metabolic profile was found (RDA test  $p$ -value  $> 0.05$ ) when MOM and DHM were compared, while formula functional profile was significantly different from those observed in MOM (RDA test  $p$ -value = 0.024) and DHM (RDA test  $p$ -value = 0.002).



**FIGURE 3 |** Venn diagram of shared genus between group (A) and linear discriminant analysis LEfSe test at genus level between MOM, DHM, and formula preterm microbiota (B).



**FIGURE 4 |** Discriminant analysis of principal components (DAPC) plot (A) at OTUs level revealed distinct clustering of the MOM (red), DHM (blue), and formula-fed group (yellow). Canonical loading plot (B) showing differentially abundant bacterial genera. The individual peaks show the magnitude of the influence of each variable on separation of the groups (0.05 threshold level).



**FIGURE 5 |** RDA plot (A). Discriminant analysis of principal components (DAPC) plot and loading plot (B) at KEGG pathways. The individual peaks in the loading plot show the magnitude of the influence of each variable on separation of the groups (0.05 threshold level). LEfSe test (C) revealed distinct clustering of the MOM (red), DHM (blue), and formula-fed group (yellow).

The DAPC to identify specific clusters of functional activity (KEGG level 2 and 3) of the gut microbiome in preterm groups according to type of diet (Figure 5B) suggesting a distinct KEGG activities DHM and MOM microbiome activities are similar than those observed in the FM group.

Linear discriminant analysis effect size analysis performed on PICRUST output showed several KEGG (level 2, Figure 5C and level 3, Supplementary Figure S1) categories differentially present in the MOM, DHM, and formula groups. MOM functional profile is mostly represented by bacterial secretion system, lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis, and biosynthesis. In particular, we observed a deprivation in functions involved in complex carbohydrate metabolism, deriving from HMO present in breast milk, such as Glycan biosynthesis and metabolism in the formula group ( $p$ -value = 0.019) compared to the other MOM and DHM groups. This glycan pathway was not different between MOM and DHM profiles ( $p$ -value >0.05). Interestingly, we observed a reduced LPS biosynthesis ( $p$ -value <0.0001) and LPS biosynthesis proteins ( $p$ -value <0.0001) in formula fed infants compared to MOM and DHM (Supplementary Figure S2). However, the most predominant function in DHM group was the two-component regulatory system followed by other functions related to amino acid metabolisms, fatty acids metabolisms (butanoate metabolism) and to sulfur metabolism and sulfur relay system and also, nitrogen metabolism in DHM group

(Supplementary Figure S2). Methane metabolism pathway is also enriched in formula group as compared to MOM and DHM groups (Supplementary Figure S2). Furthermore, we also observed in formula group an enrichment of KEGG functions related to sugar metabolisms as galactose metabolism, and amino sugar and nucleotide sugar metabolisms compared to the observed ones in MOM and DHM (Supplementary Figure S2).

## DISCUSSION

In recent years, nutritional practices have shifted toward encouraging breastfeeding practices in preterm neonates (Keunen et al., 2015; O'Connor et al., 2016). In the absence of MOM, DHM has become the preferred nutritional alternative and a formula feeding remains the last option when the others are not available. The setting up of milk banks has rendered DHM the most widely prescribed alternative to MOM (Underwood, 2013).

In preterm infants, our results have demonstrated that the feeding type has an important impact on gut microbial composition in preterm infants  $\leq 1,500$  g. We found that MOM and DHM microbial profiles were different. MOM fed babies showed a significantly enriched and greater presence of Bifidobacteriaceae and lower of Staphylococcaceae,



Clostridiaceae, and Pasteurellaceae compared to DHM fed babies. At genus level, higher levels of *Bifidobacterium* and unclassified Enterobacteriaceae and lower unclassified Clostridiaceae were observed in fecal samples from MOM group compared to DHM preterm group. It has been reported that preterm infant receiving MOM had a higher abundance of Clostridiales, Lactobacillales, and Bacillales compared to both the DHM and formula groups (Gregory et al., 2016). Both these groups had higher abundance of Enterobacteriales. After controlling for gender, postnatal age, weight, and birth gestational age, the diversity of gut microbiota increased over time and was constantly higher in infants fed MOM relative to infants with other feeding types. Finally, in the formula microbial profile was distinct than those observed in MOM and DHM, suggesting that DHM favors an intestinal microbiome more similar to MOM despite the differences between MOM and DHM.

In accordance to the microbiota shifts, we observed that KEGG profiles in DHM and MOM were similar than those microbial profile observed in formula. MOM functional profile is mostly represented by bacterial secretion system, LPS biosynthesis and biosynthesis protein which would be mainly related to the presence of Gram-negative bacteria. Interestingly, we observed a significant reduction on the LPS biosynthesis and proteins in formula fed infants compared to MOM and DHM (without difference between them). These data would suggest the potential link between LPS and immune response as reported previously (Cullen et al., 2015). Recent study has been shown that variation on the microbial LPS produced by specific microbiota groups as Enterobacteriaceae and *Bacteroides* spp., could either stimulate or actively inhibit inflammatory pathway and also, have a role on the autoimmune diseases risk (Vatanen et al., 2016). In our context, MOM and DHM modulate a preterm gut microbiota toward an enrichment in *Bifidobacterium* spp. and also, *Bacteroides* spp. that may promote the specific LPS signaling and its contribution to the immune system. Furthermore, we observed a significant reduction in functions derived from the presence of HMO and involved in complex carbohydrate metabolism (e.g., glycan biosynthesis) in the FM group as compared with the MOM and DHM groups. These differences could be explained by the abundance of HMO metabolizers as *Bifidobacterium* and *Bacteroides* spp. in preterm gut fed with MOM and DHM compared to formula fed preterm.

We also found enrichment on the functions related to the fatty acids metabolism and to sulfur and nitrogen metabolism in DHM and MOM groups. Several enteric bacteria and oral bacteria produce reduced sulfur and nitrogen and maybe some specific bacteria, as Deltaproteobacteria, *Clostridium* spp., *Veillonella* spp., *Rothia* spp., would be responsible for this functional contribution as they were enriched in DHM group although it was also observed in MOM group. In formula metagenome, we observed enrichment of KEGG functions related to sugar metabolisms as galactose metabolism, involved in conversion of galactose into glucose could arise from consumption of infant

formula and/or dairy products, and amino sugar and nucleotide sugar metabolisms. In general, minor differences were observed in the functional profiles between MOM and DHM suggesting the potential effect of DHM in mimicking the microbiome functionality of own maternal milk feeding. These results would open new possibilities in future research where bigger studies should be carried out.

Two important factors influence the differences found in preterm gut microbiota depending on feeding type (MOM and DHM). The first one would be related to the timing of milk extraction in relation to gestational age and to the lactation stage. While MOM is the biological product of a prematurely interrupted gestation, DHM is composed mainly by donated mature milk from mothers who completed term gestations and were extracting milk for several weeks thereafter. Preterm milk has higher amount of proteins, fats, and energy (Underwood, 2013; Gidrewicz and Fenton, 2014). Hence, depending on the staging of lactation they can be also a great variability among donors of components such as essential fatty acids or amino acids indispensable not only for an adequate nutrition but also for promoting microbiota colonization. Although donor milk pooling tries to avoid these circumstances, a recent study has shown a shortage of docosahexaenoic acid or lysine in DHM. Targeted supplementation would be needed not only to optimize nutritional properties of DHM but also to improve bacterial colonization (Ballard and Morrow, 2013). The second factor would be related with the pasteurization procedure that inevitably alters essential thermolabile milk components. Hence, differences in the microbiota would be at least partially explained by the different composition in relation to nutritional parameters and bioactive compounds such as immune markers, microbiota, oligosaccharides, neurotrophic, and growth factors among others (Bertino et al., 2008; Untalan et al., 2009; Ballard and Morrow, 2013; Christen et al., 2013; Espinosa-Martos et al., 2013; Sousa et al., 2014; Coscia et al., 2015; Valentine et al., 2017). Altogether these findings could explain the similarities and differences in the microbiota profile between preterm infants fed DHM or MOM and influence health outcomes in preterm infants.

Finally, the number of formula fed infants included in this study was limited ( $n = 7$ ) due mainly because milk bank provides with DHM to almost all preterm babies attended in our NICU (>90%) and therefore it is difficult to recruit preterm babies on formula feeding and randomization was not ethically acceptable. Despite these limitations, our results reveal a substantial impact of DHM feeding on the structure of the intestinal microbial community composition.

## CONCLUSION

Feeding type modulates the preterm microbiome composition. DHM feeding had an impact on preterm microbiota that could have potential beneficial long-term effects on intestinal

functionality, immune system, and metabolism. However, available pasteurization methods cause changes that may blunt many of the positives aspects derived from the use of MOM. Therefore, further studies are stringently need to understand the complex links between microbiome and DHM host, its impact on health programming, and to develop sensitive methods capable of providing promptly after birth preterm infants with HM as similar as possible to their MOM when the latter is not yet available.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AP-L, MG, MC, MCC, and MV planned the experiments. AP-L, MG, MC, AN-R collected the samples and clinical data. AP-L, CA, and MCC performed the microbiological analysis and analyzed data. AP-L wrote first draft and all authors commented criticized, and reviewed the manuscript. All authors accepted the final version the manuscript.

## FUNDING

CA and MCC would like to acknowledge the Spanish Government of Economy and Competitiveness (MINECO)

## REFERENCES

- Agostoni, C. (2010). Enteral nutrient supply for preterm infants: cmomentary from the European society of paediatric gastroenterology, hepatology and nutrition committee on nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 50, 85–91. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181adaee0
- American Academy of Pediatrics (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 129, e827–e884. doi: 10.1542/peds.2011-3552
- Arslanoglu, S., Bertino, E., Tonetto, P., De Nisi, G., Ambruzzi, A. M., Biasini, A., et al. (2010). Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. *J. Matern. Fetal Neonat. Med.* 23, 1–20. doi: 10.3109/14767058.2010.512414
- Ballard, O., and Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. North Am.* 60, 49–74. doi: 10.1016/j.pcl.2012.10.002
- Baro, C., Giribaldi, M., Arslanoglu, S., Giuffrida, M. G., Dellavalle, G., Conti, A., et al. (2001). Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Front. Biosci.* 3, 818–829.
- Belfort, M. B., Anderson, P. J., Nowak, V. A., Lee, K. J., Molesworth, C., Thompson, D. K., et al. (2016). Breast milk feeding, brain development, and neurocognitive outcomes: A 7-year longitudinal study in infants born at less than 30 weeks' gestation. *J. Pediatr.* 177, 133–139. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.06.045
- Bertino, E., Coppa, G. V., Giuliani, F., Coscia, A., Gabrielli, O., Sabatino, G., et al. (2008). Effects of Holder pasteurization on human milk oligosaccharides. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 21, 381–385. doi: 10.1177/039463200802100216
- Bertino, E., Giuliani, F., Occhi, L., Coscia, A., Tonetto, P., Marchino, F., et al. (2009). Benefits of donor human milk for preterm infants: current evidence. *Early Hum. Dev.* 85, S9–S10. doi: 10.1016/j.earhumdev.2009.08.010
- Boix-Amoros, A., Collado, M. C., and Mira, A. (2016). Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Front. Microbiol.* 7:492. doi: 10.3389/fmicb.2016.00492
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput cunity sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303

(AGL2015-707487-P grant) and also, the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program (ERC Starting Grant, project no. 639226). AP-L is a granted research fellow from the Health Research Institute La Fe (Valencia, Spain). MV and AN-R acknowledge research contract from RETICS funded by the PN 2018-2011 (Spain), ISCIII-Sub-Directorate General for Research Assessment and Promotion and the European Regional Development Fund (FEDER), reference RD12/0026. MC acknowledges a research grant JR16/00038 from the Health Research Institute Carlos III (Ministry of Economy, Industry and Competitiveness, Kingdom of Spain).

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for all the participant families providing biological samples for this study.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01376/full#supplementary-material>

- Christen, L., Lai, C. T., Hartmann, B., Hartmann, P. E., and Geddes, D. T. (2013). The effect of UV-C pasteurization on bacteriostatic properties and immunological proteins of donor human milk. *PLoS One* 8:e85867. doi: 10.1371/journal.pone.0085867
- Collado, M. C., Cernada, M., Bäuerl, C., Vento, M., and Pérez-Martínez, G. (2012). Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes* 3, 352–365. doi: 10.4161/gmic.21215
- Collado, M. C., Cernada, M., Neu, J., Pérez-Martínez, G., Gormaz, M., and Vento, M. (2015). Factors influencing gastrointestinal tract and microbiota immune interaction in preterm infants. *Pediatr. Res.* 77, 726–731. doi: 10.1038/pr.2015.54
- Corpeleijn, W. E., de Waard, M., Christmann, V., van Goudoever, J. B., Jansen-van, der Weide, M. C., et al. (2016). Effect of donor milk on severe infections and mortality in very low-birth-weight infants: the early nutrition study randomized clinical trial. *JAMA Pediatr.* 1, 654–661. doi: 10.1001/jamapediatrics.2016.0183
- Coscia, A., Peila, C., Bertino, E., Coppa, G. V., Moro, G. E., Gabrielli, O., et al. (2015). Effect of Holder pasteurisation on human milk glycosaminoglycans. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 60, 127–130. doi: 10.1097/MPG.0000000000000570
- Cullen, T. W., Schofield, W. B., Barry, N. A., Putnam, E. E., Rundell, E. A., Trent, M. S., et al. (2015). Gut microbiota. Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation. *Science* 347, 170–175. doi: 10.1126/science.1260580
- ESPGHAN Committee on Nutrition, Arslanoglu, S., Corpeleijn, W., Moro, G., Braegger, C., Campoy, C., et al. (2013). Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 57, 535–542. doi: 10.1097/MPG.0b013e3182a3af0a
- Espinosa-Martos, I., Montilla, A., de Segura, A. G., Escuder, D., Bustos, G., Pallais, C., et al. (2013). Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after Holder pasteurisation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 56, 560–568. doi: 10.1097/MPG.0b013e31828393ed
- Gidrewicz, D. A., and Fenton, T. R. (2014). A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatr.* 14:216. doi: 10.1186/1471-2431-14-216

- Gregory, K. E., Samuel, B. S., Houghteling, P., Shan, G., Ausubel, F. M., Sadreyev, R. L., et al. (2016). Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants. *Microbiome* 4:68. doi: 10.1186/s40168-016-0214-x
- Human Milk Banking Association of North America (2000). *Guidelines for the Establishment and Operation of a Donor Human Milk Bank*. Raleigh, NC: Human Milk Banking Association of North America.
- Keunen, K., van Elburg, R. M., van Bel, F., and Benders, M. J. (2015). Impact of nutrition on brain development and its neuroprotective implications following preterm birth. *Pediatr. Res.* 77, 148–155. doi: 10.1038/pr.2014.171
- Langille, M. G., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., et al. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* 31, 814–821. doi: 10.1038/nbt.2676
- Lehtonen, L., Gimeno, A., Parra-Llorca, A., and Vento, M. (2017). Early neonatal death: a challenge worldwide. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 22, 153–160. doi: 10.1016/j.siny.2017.02.006
- Madore, L. S., Bora, S., Erdei, C., Juman, T., Dengos, A. R., and Sen, S. (2017). Effects of donor breastmilk feeding on growth and early neurodevelopmental outcomes in preterm infants: an observational study. *Clin. Ther.* 39, 1210–1220. doi: 10.1016/j.clinthera.2017.05.341
- Meinzen-Derr, J., Poindexter, B., Wraga, L., Morrow, A. L., Stoll, B., and Donovan, E. F. (2009). Role of human milk in extremely low birth weight infants' risk of necrotizing enterocolitis or death. *J. Perinatol.* 29, 57–62. doi: 10.1038/jp.2008.117
- National Institute for Health and Clinical Excellence (2010). *Donor Breast Milk Banks: The Operation of Donor Breast Milk Bank Services*. London: National Institute for Health and Clinical Excellence.
- O'Connor, D. L., Gibbins, S., Kiss, A., Bando, N., Brennan-Donnan, J., Ng, E., et al. (2016). Effect of supplemental donor human milk compared with preterm formula on neurodevelopment of very low-birth-weight infants at 18 months: a randomized clinical trial. *JAMA* 316, 1897–1905. doi: 10.1001/jama.2016.16144
- Peila, C., Moro, G. E., Bertino, E., et al. (2016). The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutrients* 8:E477. doi: 10.3390/nu8080477
- R Core Team (2012). *A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., et al. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 12: R60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60
- Sousa, S. G., Santos, M. D., Fidalgo, L. G., Delgado, I., and Saraiva, J. A. (2014). Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. *Food Chem.* 151, 79–85. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.024
- The European Perinatal Health Report (2010). Available at: <http://www.europeristat.com/reports/european-perinatal-health-report-2010.html>
- Underwood, M. A. (2013). Human milk for the premature infant. *Pediatr. Clin. North Am.* 60, 189–207. doi: 10.1016/j.pcl.2012.09.008
- Untalan, P. B., Keeney, S. E., Palkowetz, K. H., Rivera, A., and Goldman, A. S. (2009). Heat susceptibility of interleukin-10 and other cytokines in donor human milk. *Breastfeed Med.* 4, 137–144. doi: 10.1089/bfm.2008.0145
- Valentine, C. J., Morrow, G., Reisinger, A., Dingess, K. A., Morrow, A. L., and Rogers, L. K. (2017). Lactational stage of pasteurized human donor milk contributes to nutrient limitations for infants. *Nutrients* 9:E302. doi: 10.3390/nu9030302
- Vatanen, T., Kostic, A. D., d'Hennezel, E., Siljander, H., Franzosa, E. A., Yassour, M., et al. (2016). Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans. *Cell* 165, 842–853. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.007
- Wilson, E., Edstedt Bonamy, A. K., Bonet, M., Toome, L., Rodrigues, C., Howell, E. A., et al. (2017). Room for improvement in breast milk feeding after very preterm birth in Europe: results from the EPICE cohort. *Matern. Child Nutr.* 14:e12485. doi: 10.1111/mcn.12485

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Parra-Llorca, Gormaz, Alcántara, Cernada, Nuñez-Ramiro, Vento and Collado. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## CAPÍTULO II.

En un segundo estudio buscamos responder a la pregunta de si el procesamiento de la leche humana donada tratada mediante pasteurización y congelación en el banco de leche, sufría una merma de su capacidad antioxidante de la misma. Los resultados fueron objeto de una publicación que se adjunta:

**Parra-Llorca A, Gormaz M, Sánchez-Illana Á, et al. Does Pasteurized Donor Human Milk Efficiently Protect Preterm Infants Against Oxidative Stress?. *Antioxid Redox Signal*. 2019;31:791-799 (145).**

La leche humana donada (LHD) pasteurizada es la mejor alternativa en los prematuros  $\leq 32$  semanas de edad gestacional,  $\leq 1.500$  gramos, cuando la leche de la propia madre (LM) no está disponible. Aún se desconoce si la LHD protege a los prematuros del estrés oxidativo. Cuantificamos un panel de biomarcadores de estrés oxidativo en muestras de orina de recién nacidos prematuros ( $\leq 32$  semanas de gestación y un peso al nacer  $\leq 1.500$  g) que recibieron  $\geq 80\%$  del volumen de alimentación como LHD o LM. La evaluación in vivo no invasiva del estrés oxidativo no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el momento en que se consiguió la nutrición enteral completa (150 ml / kg / día) y hasta el alta hospitalaria. Además, se evaluaron los cambios de los niveles de biomarcadores en orina con el tiempo. Este es el primer estudio longitudinal sobre los niveles de estrés oxidativo en prematuros alimentados con LHD en comparación con LM. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de estrés oxidativo en orina de los recién nacidos prematuros de ambos grupos, lo

que indica que a pesar de los efectos de la pasteurización, la LHD es una alternativa válida cuando la LM no está disponible. Con base a estos resultados, planteamos la hipótesis de que la LHD, a pesar de la pasteurización, protege a los prematuros del estrés oxidativo tan bien como la LM y, en consecuencia, su uso podría prevenir enfermedades relacionadas con el mismo.

## NEWS & VIEWS

# Does Pasteurized Donor Human Milk Efficiently Protect Preterm Infants Against Oxidative Stress?

Anna Parra-Llorca,<sup>1</sup> María Gormaz,<sup>2</sup> Ángel Sánchez-Illana,<sup>1</sup> José David Piñero-Ramos,<sup>1</sup> María Carmen Collado,<sup>3</sup> Eva Serna,<sup>4</sup> María Cernada,<sup>2</sup> Antonio Nuñez-Ramiro,<sup>2</sup> Amparo Ramón-Beltrán,<sup>2</sup> Camille Oger,<sup>5</sup> Jean-Marie Galano,<sup>5</sup> Claire Vigor,<sup>5</sup> Thierry Durand,<sup>5</sup> Julia Kuligowski,<sup>1</sup> and Máximo Vento<sup>1,2,\*</sup>

### Abstract

Pasteurized donor human milk (DHM) is the preferred alternative for infant nutrition when own mother's milk (OMM) is unavailable. Whether DHM is an efficient means for protecting preterm infants from oxidative stress remains unknown. We quantified a panel of oxidative stress biomarkers in urine samples from preterm infants ( $\leq 32$  weeks of gestation and a birth weight  $\leq 1500$  g) receiving  $\geq 80\%$  of feeding volume as either DHM or OMM. The noninvasive *in vivo* assessment of oxidative stress showed no statistically significant difference between both groups at the time when full enteral nutrition (150 mL/kg body weight) was achieved and until hospital discharge. In addition, the changes of urinary biomarker levels with time were assessed. This is the first longitudinal study on oxidative stress levels in preterm infants fed with DHM in comparison with OMM. There is no statistically significant difference in urinary oxidative stress levels of preterm infants from both groups indicating that despite the effects of pasteurization, DHM is a valid alternative when OMM is not available. Based on the results, we raise the hypothesis that pasteurized DHM protects preterm infants from oxidative stress as good as OMM, and consequently, its use could prevent oxidative stress-related diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 31, 791–799.

**Keywords:** preterm infant, full enteral feeding, oxidative stress, donor human milk (DHM), own mother's milk (OMM), biomarkers

### Introduction

PREMATURE BIRTH IS associated with high mortality and morbidity in the neonatal period and long-term neurodevelopmental and sensorial sequel, thereby constituting a serious health problem worldwide. The incidence of prematurity ranges from 8% to 10% in Western countries but is considerably higher in low-income countries in which it is one of the leading causes of early neonatal death.

Preterm infants are frequently submitted to oxygen supplementation, parenteral nutrition, radiation, or phototherapy among other therapies that cause the generation of reactive oxygen species (ROS). ROS will contribute to the develop-

### Innovation

A human milk (HM) diet protects preterm infants from oxidative stress, thereby preventing them from conditions associated with free radical attack and immature antioxidant defenses. Pasteurized donor human milk (DHM) is used for feeding preterm infants when own mother's milk (OMM) is not available. Results demonstrate that regardless of pasteurization, DHM protects infants against oxidative stress in a similar way as OMM as reflected in levels of a comprehensive panel of oxidative stress biomarkers suitable for a noninvasive *in vivo* assessment. This underpins the importance of promoting HM banks that provide DHM for preterm infant nutrition in situations where OMM is not available at all or volume is insufficient.

<sup>1</sup>Neonatal Research Group, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain.

<sup>2</sup>Division of Neonatology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain.

<sup>3</sup>Department of Biotechnology, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Spanish National Research Council (IATA-CSIC), Paterna, Spain.

<sup>4</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

<sup>5</sup>Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247 CNRS, ENSCM, Université de Montpellier, Montpellier, France.

\*Senior author.

ment of severe conditions such as bronchopulmonary dysplasia, retinopathy of prematurity, or intraventricular hemorrhage among others (8).

Human milk (HM) is a complex biological fluid that fulfills nutritional and immunological requirements and favors the neurodevelopment of the newborn infant. It is therefore considered the gold standard for newborn nutrition (4). A large variety of nutritional and bioactive components present in HM such as oligosaccharides, microorganisms, cytokines, immune cells, lysozymes, and lactoferrin have an immunostimulant and protective role (5). In addition, HM also enhances the antioxidant defenses by providing enzymatic and nonenzymatic antioxidants. Thus, preterm infants fed with HM present lower levels of oxidative stress biomarkers than those fed with preterm infant formula milk (FM) (4).

Pasteurized donor human milk (DHM) is a valid alternative when own mother's milk (OMM) is unavailable. Human milk banks are dedicated to collecting milk from donor mothers, and process, store, and dispense it following stringent protocols for assuring hygiene. However, pasteurization and freezing may change the activity and concentration of several biological factors and biomolecules, including antioxidants (5).

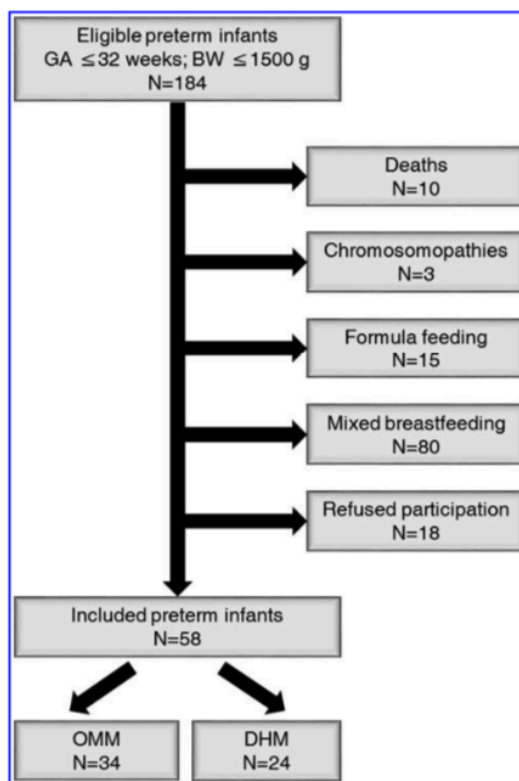
Although there is evidence indicating that DHM offers nutritional and immunological advantages over FM, and DHM has been associated with a reduced incidence of necrotizing enterocolitis in preterm infants (9), it remains yet to be proven whether pasteurized DHM maintains an efficient *in vivo* antioxidant capacity.

We hypothesized that DHM and OMM equally protect preterm infants from oxidative stress. We launched a longitudinal, observational cohort study aiming to compare the antioxidant properties of DHM *versus* OMM reflected in levels of a panel of oxidative stress biomarkers previously validated in preterm urine (6, 7). We performed analytical determinations in preterm infants' urine samples collected between the initiation of full enteral feeding and hospital discharge.

## Results

The flow diagram (Fig. 1) shows the number of eligible, disregarded, and finally included patients. From a total of 184 eligible preterm infants, 58 babies (34 in the OMM group and 24 in the DHM group) completed the study. Table 1 shows no differences in the demographic characteristics, as well as in the perinatal, clinical, and analytical variables or incidence of neonatal conditions related with prematurity between groups, matched according to the type of feeding.

Biomarkers that were not detected in >75% of the samples (*i.e.*, concentrations < limit of quantification [LOQ]) were excluded from the final data analysis. The results obtained from the determination of the remaining biomarkers of oxidative damage to DNA (8-oxo-2'-deoxyguanosine/2'-deoxyguanosine [8OHdG/2dG]), proteins (*o*-Tyr/Phe), and lipids (11 individual isoprostanooids and 5 total parameters), as well as 4 prostaglandins (PGs) and related substances in urine samples from preterm infants fed with OMM and DHM, are summarized in Table 2. Figure 2 shows standardized biomarker ratios found in urine samples from both study populations collected at different time points. No significant differences were found for any of the 22 detected biomarkers at the initiation of



**FIG. 1.** Flow diagram of patient enrollment. BW, birth weight; GA, gestational age; DHM, donor human milk; OMM, own mother's milk.

full enteral nutrition as well as 1, 2, or 3 weeks thereafter ( $p$ -value >0.05, Wilcoxon rank sum test).

To study the longitudinal evolution of oxidative stress biomarkers, median values and interquartile ranges of each detected biomarker in the whole study population (OMM and DHM) at different timings were assessed. Urinary levels of 8OHdG/2dG, 11 of 15 detected individual isoprostanooids and related substances, as well as total NeuroPs and total NeuroFs remained unchanged during the study period. However, as shown in Figure 3, the *o*-Tyr/Phe ratio, four individual isoprostanooids, total IsoPs, total IsoFs, and total dihom-IsoFs significantly changed during the study period ( $p$ -values <0.05, Wilcoxon rank sum test).

## Discussion

Premature babies have an immature antioxidant defense system, and ROS have been linked to the development of relevant conditions such as bronchopulmonary dysplasia, retinopathy of prematurity, intraventricular and periventricular hemorrhage, or NEC, among others (8). HM contains an ample array of antioxidants with positive effects on oxidative stress-associated conditions. In a recent meta-analysis (9), it has been shown that an exclusive HM diet reduces the risk of bronchopulmonary dysplasia, compared with a diet

TABLE 1. PERINATAL CHARACTERISTICS AND CONFOUNDERS DURING HOSPITALIZATION IN THE NEONATAL INTENSIVE CARE UNIT OF PRETERM INFANTS ≤32 WEEKS GESTATION OR ≤1500G FED OWN MOTHER'S MILK OR DONOR HUMAN MILK

Parameter	OMM (n=34)	DHM (n=24)	p-Value
GA weeks, median (95% CI)	28 (27–29)	29 (28–30)	0.06
Birth weight (g), mean (SD)	1200 (313)	1266 (270)	0.4
Antenatal steroids full course, n (%)	31 (91)	21 (88)	0.5
Pre-eclampsia, n (%)	5 (15.7)	7 (29)	0.2
Chorioamnionitis, n (%)	8 (24)	2 (8)	0.12
Type of delivery, n (%)			
Vaginal	16 (47)	11 (46)	0.6
C-section	18 (53)	13 (54)	
Twins, n (%)	6 (18)	7 (29)	0.2
Apgar 1 min, median (95% CI)	7 (6–9)	8 (7–10)	0.3
Apgar 5 min, median (95% CI)	9 (8–10)	9 (8–10)	1.0
Umbilical artery blood gases, mean (SD)	7.29 (0.12)	7.27 (0.08)	0.4
Umbilical vein blood gases, mean (SD)	7.3 (0.07)	7.3 (0.06)	0.06
Respiratory distress syndrome, n (%)	13 (38)	5 (21)	0.13
Apneic syndrome, n (%)	30 (88)	18 (75)	0.2
Persistent ductus arteriosus, n (%)	14 (41)	6 (25)	0.2
Antibiotic therapy, n (%)	13 (38)	9 (38)	0.6
Bronchopulmonary dysplasia, n (%)	2 (6)	1 (4)	0.6
Retinopathy of prematurity, n (%)	1 (4)	0 (0)	0.4
Intraventricular hemorrhage, n (%)	3 (9)	2 (8)	0.5
Nosocomial sepsis, n (%)	0 (0)	0 (0)	1.0

CI, confidence interval; GA, gestational age.

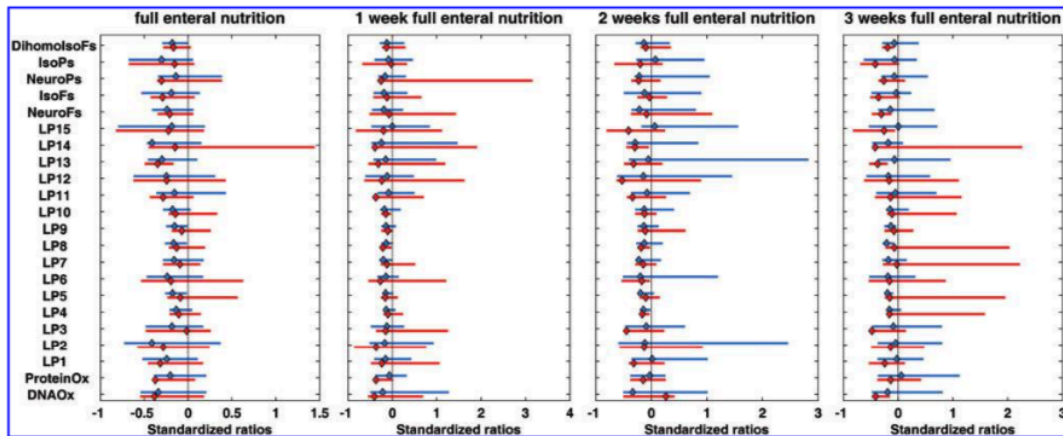
TABLE 2. RANGES OF THE MEASURED MOLECULAR BIOMARKERS IN OWN MOTHER'S MILK AND DONOR HUMAN MILK SAMPLES EXPRESSED AS MEDIAN AND THIRD AND FIRST QUANTILES INDEPENDENTLY OF THE SAMPLING TIME

Biomarker	OMM	DHM
	Median (Q <sub>3</sub> -Q <sub>1</sub> )	Median (Q <sub>3</sub> -Q <sub>1</sub> )
DNA oxidation (8OHdG/2dG)	0.06 (0.12–0.02)	0.03 (0.08–0.02)
Protein oxidation (o-Tyr/Phe)	0.044 (0.062–0.003)	0.003 (0.042–0.001)
5(RS)-5-F <sub>2c</sub> -IsoP [nmol/g <sub>creat</sub> ]	12.7 (20.7–9.1)	9.6 (14.8–6.8)
2,3-dinor-15-F <sub>2t</sub> -IsoP [nmol/g <sub>creat</sub> ]	23.7 (35.3–15.8)	22.3 (31.0–12.3)
4(RS)-4-F <sub>4t</sub> -NeuroP [nmol/g <sub>creat</sub> ]	6.3 (10.0–2.8)	5.1 (9.9–1.4)
10- <i>epi</i> -10-F <sub>4t</sub> -NeuroP [nmol/g <sub>creat</sub> ]	0.6 (1.0–0.3)	0.8 (1.6–0.4)
10-F <sub>4t</sub> -NeuroP [nmol/g <sub>creat</sub> ]	0.7 (1.1–0.4)	1.1 (1.4–0.6)
14(RS)-14-F <sub>4t</sub> -NeuroP [nmol/g <sub>creat</sub> ]	7.7 (12.3–5.0)	6.9 (13.8–2.8)
17-F <sub>2t</sub> -dihomo-IsoP [nmol/g <sub>creat</sub> ]	1.2 (2.6–0.3)	2.2 (3.0–0.5)
<i>ent</i> -7(RS)-7-F <sub>2t</sub> -dihomo-IsoP [nmol/g <sub>creat</sub> ]	1.1 (1.8–0.8)	1.2 (1.9–0.6)
17(RS)-10- <i>epi</i> -SC-Δ <sup>15</sup> -11-dihomo-IsoF [nmol/g <sub>creat</sub> ]	2.8 (5.0–0.9)	4.0 (6.6–2.4)
1a,1b-dihomo-PGF <sub>2x</sub> [nmol/g <sub>creat</sub> ]	4.4 (7.3–3.0)	5.2 (6.6–3.9)
15-F <sub>2t</sub> -IsoP [nmol/g <sub>creat</sub> ]	2.8 (4.6–1.5)	1.5 (3.2–0.4)
11β-PGF <sub>2x</sub> [nmol/g <sub>creat</sub> ]	3.4 (5.4–1.3)	3.0 (5.0–0.3)
15- <i>epi</i> -15-F <sub>2t</sub> -IsoP [nmol/g <sub>creat</sub> ]	12.4 (22.1–7.2)	7.5 (10.9–4.0)
6-keto-PGF <sub>1x</sub> [nmol/g <sub>creat</sub> ]	0.8 (1.7–0.3)	0.7 (1.8–0.3)
PGF <sub>2x</sub> [nmol/g <sub>creat</sub> ]	21.2 (28.1–15.8)	16.0 (21.2–11.5)
NeuroFs [p.d.u.]	140.0 (180.2–111.8)	146.1 (186.2–116.6)
IsoFs [p.d.u.]	71.2 (96.9–56.0)	64.8 (83.2–55.2)
NeuroPs [p.d.u.]	628.3 (920.0–366.8)	379.7 (642.1–245.0)
IsoPs [p.d.u.]	233.8 (291.3–155.0)	214.1 (273.8–75.1)
Dihomo-IsoFs [p.d.u.]	173.4 (300.5–57.8)	154.2 (232.9–109.0)

The number of samples used was 101 and 47 for OMM and DHM, respectively, except for DNA oxidation and protein oxidation, where it was 93 and 43.

DHM, donor human milk; OMM, own mother's milk.





**FIG. 2.** Median values (diamonds) and percentile 10 to 90 (straight line) of standardized biomarker levels found in urine samples from preterm infants fed with OMM (blue) and DHM (red) at the moment of achieving full enteral nutrition and 1, 2, and 3 weeks thereafter. ProteinOx = *o*-Tyr/Phe; DNAOx = 8OHdG/2dG; LP1 = 5(RS)-5-F<sub>2t</sub>-IsoP; LP2 = 15-*epi*-2,3-dinor-15-F<sub>2t</sub>-IsoP + 2,3-dinor-11 $\beta$ -PGF<sub>2x</sub> + 2,3-dinor-15-F<sub>2x</sub>-IsoP; LP3 = 4(RS)-4-F<sub>4t</sub>-NeuroP; LP4 = 10-*epi*-10-F<sub>4t</sub>-NeuroP; LP5 = 10-F<sub>4t</sub>-NeuroP; LP6 = 14(RS)-14-F<sub>4t</sub>-NeuroP; LP7 = 17-F<sub>2t</sub>-dihomo-IsoP + 17-*epi*-17-F<sub>2t</sub>-dihomo-IsoP; LP8 = *ent*-7(RS)-7-F<sub>2t</sub>-dihomo-IsoP; LP9 = 17(RS)-10-*epi*-SC- $\Delta$ <sup>15</sup>-11-dihomo-IsoF; LP10 = 1a,1b-dihomo PGF<sub>2x</sub>; LP11 = 15-F<sub>2t</sub>-IsoP; LP12 = 11 $\beta$ -PGF<sub>2x</sub>; LP13 = 15-*epi*-15-F<sub>2t</sub>-IsoP; LP14 = 6-keto-PGF<sub>1x</sub>; LP15 = PGF<sub>2x</sub>. Color images are available online.

with FM and/or bovine milk-based fortifier (risk ratio 0.80, 95% confidence interval 0.68–0.95). Moreover, feeding raw OMM, compared with feeding pasteurized OMM, is also protective against this chronic lung disease.

When OMM is unavailable, premature infants <32 weeks of gestation are fed with DHM. Whereas previous studies showed that premature infants fed with HM presented lower levels of metabolites derived from hydroxyl damage to proteins and DNA in urine than those fed with FM (4), the potential of pasteurized DHM to protect against oxidative stress and related pathologies remains unclear.

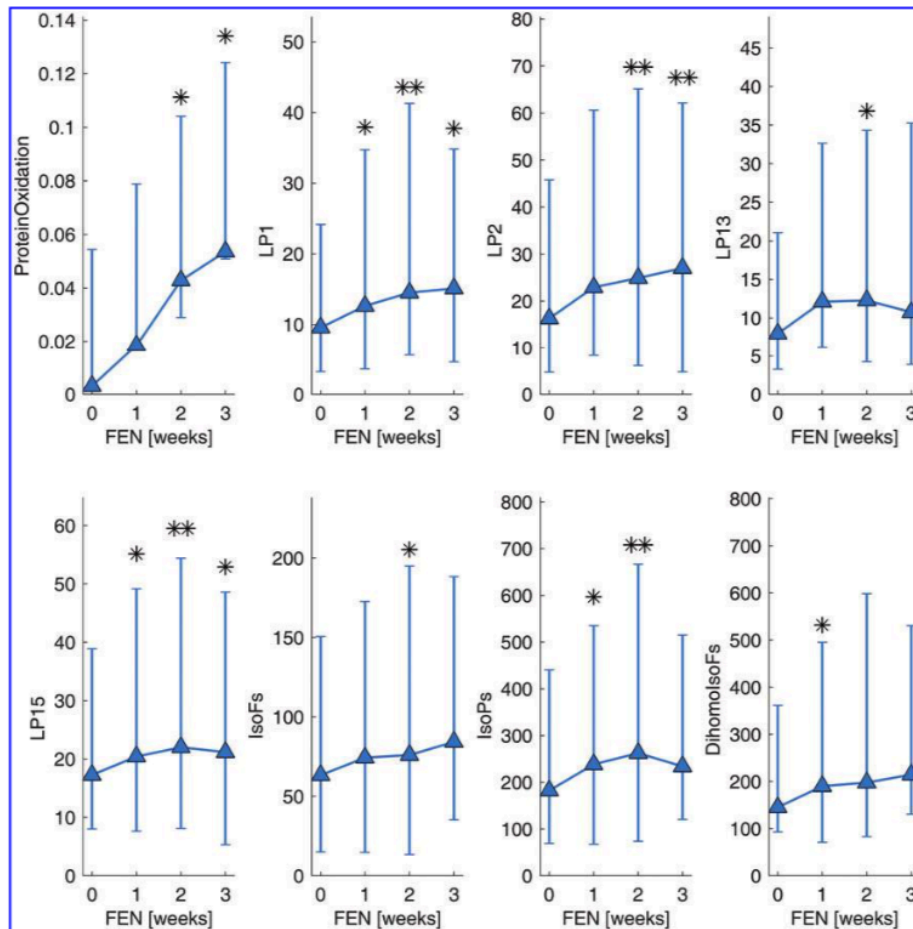
*In vivo* assessment of oxidative damage can be carried out by the detection of specific biomarkers in biological fluids that reflect damage to proteins, DNA, or lipids (8). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for the detection of biomarkers of oxidative damage to proteins and DNA (3), as well as lipids (6, 7) in noninvasively obtained urine samples, have been validated following stringent requirements of the FDA. Moreover, reference ranges of total parameters of lipid peroxidation by-products in very preterm infants evolving without significant clinical conditions in the postnatal period have been reported (6, 7).

Preterm infants included in this study were in good general condition and some of the measured biomarkers were found to be below the LOQ in the collected urine samples. For instance, biomarkers of myeloperoxidase action (3-Cl-tyrosine/*p*-tyrosine [3-Cl-Tyr/*p*-Tyr] and 3-nitrotyrosine [3-NO<sub>2</sub>-Tyr]/*p*-Tyr) were not detected in this study, indicating a low proinflammatory status in this population of preterm infants. This finding is in agreement with previous studies where low quantification frequencies in preterm urine samples were reported for *m*-Tyr, 3-Cl-Tyr, and 3-NO<sub>2</sub>-Tyr (3). In addition, the use of highly sensitive LC-MS/MS platforms

for the measurement of lipid peroxidation biomarkers allowed for the detection of a majority of measured isoprostanooids and related substances (15 out of 21) and total lipid peroxidation parameters (5 out of 6) in preterm infant's urine samples. We could speculate that the absence of some lipid peroxidation biomarkers might indicate relatively low levels of oxidative stress and a lack of associated damage to fatty acids. Alternatively, some isoprostanooids might have been metabolized or excreted at other than the studied time points.

We did not find statistically significant differences in a total of 22 biomarkers present at quantifiable levels in samples from infants consuming OMM and DHM at different time points that covered from achievement of full enteral nutrition to hospital discharge (Fig. 2). It has been described that Holder pasteurization alters some properties of OMM, and alternative systems of pasteurization are being studied to preserve more milk components such as ultraviolet-C irradiation, high pressure, or high temperature short time (heating at 72°C for 10–15 s). However, other biomolecules with an active role in the protection against free radical such as vitamins and oligosaccharides are preserved during heat treatment (5). Results presented in this study support that despite the detrimental effect of pasteurization on some of the antioxidant components of HM, newborns receiving DHM are equally protected against free radical-associated damage to macromolecules as newborns fed with OMM.

Figure 3 shows that some biomarker levels vary as a function of sampling time. This is a very important observation providing valuable information for the design of future studies aiming at the detection of those biomarkers in preterm infant urine samples. As earlier reported (6, 7), the excretion profiles of isoprostanooids may be different depending on the studied compound family.



**FIG. 3.** Longitudinal evolution of biomarker levels with time. ProteinOx = *o*-Tyr/Phe; LP1 = 5(RS)-5-F<sub>21</sub>-IsoP; LP2 = 15-*epi*-2,3-dinor-15-F<sub>21</sub>-IsoP + 2,3-dinor-11 $\beta$ -PGF<sub>22</sub> + 2,3-dinor-15-F<sub>22</sub>-IsoP; LP13 = 15-*epi*-15-F<sub>21</sub>-IsoP; LP15 = PGF<sub>22</sub>; \**p*-Values < 0.05; \*\**p*-values < 0.01; all comparisons were made referring to FEN 0 weeks. FEN, full enteral nutrition. Color images are available online.

Downloaded by University Of Hong Kong from www.liebertpub.com at 09/19/19. For personal use only.

A limitation of the present study is the small sample size. Given the policy of promoting the use of OMM in the neonatal intensive care unit (NICU), access to a study population exclusively fed with DHM over several weeks is highly difficult as DHM is typically provided only to complete the requirements of enteral feed until enough OMM is available to satisfy the infant's demand. The analysis of noninvasive urine samples allowed to study preterm infants and enabled longitudinal observations without performing repeated painful invasive procedures. However, some of the biomarkers could not be quantified even though highly sensitive and dedicated analytical procedures were used. Another shortcoming is the lack of information on the effect of pasteurization on HM used in this study, including the total antioxidant capacity of OMM and DHM, as well as levels of HM compounds that are of known importance for the protection against oxidative stress.

There is no statistically significant difference in urinary oxidative stress levels of preterm infants fed with DHM in comparison with OMM. This indicates that DHM provided by a milk bank is a good alternative when OMM is not available. Despite pasteurization, DHM offers similar protection to oxidative stress in preterm infants when compared with OMM.

#### Notes

##### Study design and ethics

A prospective, longitudinal, observational cohort study, including consecutively admitted preterm infants born  $\leq 32$  weeks of gestation and with a birth weight  $\leq 1500$  g in the Division of Neonatology of the University and Polytechnic Hospital La Fe (Valencia, Spain), was conducted during a 12-month period. The study protocol was approved by the Ethics

Committee for Biomedical Research (approval number (#2015/0371) and informed consent was obtained from parents or legal representatives.

#### Population

Table 3 shows inclusion and exclusion criteria. Thirty-four patients fed with OMM and 24 patients fed with DHM admitted to the NICU were enrolled by a designated research associate (trained neonatologist). Our feeding protocol strongly supports breastfeeding and offers DHM as a supplement to preterm infants born  $\leq 32$  weeks of gestation and/or  $\leq 1500$  g birth weight, if necessary. DHM from the milk bank is administered after being treated with Holder pasteurization (62.5°C for 30 min) to inactivate viral and bacterial agents, following the guidelines of most HM banks (5). Microbiological and nutritional tests are performed to check milk suitability. Subsequently, pasteurized milk is aliquoted and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until its administration.

Inclusion criteria requested that the intake of OMM or DHM represented  $\geq 80\%$  of the total volume when full enteral nutrition (150 mL/kg body weight) was achieved (Table 3). The nutritional intake was prospectively monitored but never modified for this observational study. Demographic characteristics and perinatal, clinical, and analytical variables, as well as the incidence of neonatal conditions related with prematurity, were recorded.

#### Urine sample collection

Figure 4 gives an overview of the sample collection process. Urine samples were collected after achieving full enteral nutrition and once per week thereafter until hospital discharge. Urine was collected using sterile cotton pads placed in the diaper. Cotton pads were collected after 1 h and squeezed with a syringe. The process was repeated until collecting a minimum of 1 mL. Urine samples were aliquoted (one aliquot for each analytical method) to avoid freeze-thawing cycles and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

TABLE 3. INCLUSION AND EXCLUSION CRITERIA OF PRETERM INFANTS  $\leq 32$  WEEKS/ $\leq 1500$  G RECEIVING OWN MOTHER'S MILK OR DONOR HUMAN MILK DURING HOSPITALIZATION

Inclusion criteria	Exclusion criteria
BW $\leq 1500$ g and GA $\leq 32$ weeks	GA $> 32$ weeks or BW $> 1500$ g
Enteral intake ( $\geq 150$ mL/kg/day)	Parents refuse to participate/sign informed consent.
The principal nutrient received (OMM, DHM) is $\geq 80\%$ of the total intake	Mixed breastfeeding
DHM from a maximum of two donors to one premature infant	Chromosomopathies
No additional treatments that could alter the microbiome (e.g., probiotics) or oxidative status (e.g., vitamin C, A, E)	Major malformations or surgery of the digestive tract

BW, birth weight.

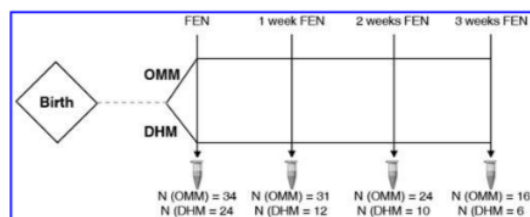


FIG. 4. Flow diagram of the sample collection process.

#### Urine analysis

**Standards and reagents.** LC-MS grade solvents (methanol  $\text{CH}_3\text{OH}$ , ethanol, heptane, and acetonitrile  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ). Formic acid (98%) and ethyl acetate (analytical grade) were from Panreac (Barcelona, Spain). Milli-Q grade water ( $>18.2$  M $\Omega$ ) from a Merck Millipore (Darmstadt, Germany) purification system was used.  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Standards of *o*-, *m*-, and *p*-tyrosine (*o*-, *m*-, and *p*-Tyr), 3-Cl-Tyr, 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, phenylalanine (Phe), 8OHdG and 2dG ( $>96\%$  w/w purity) were obtained from Sigma-Aldrich. Deuterated phenylalanine (Phe-D<sub>5</sub>) was purchased from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada) and 8-oxo-2'-deoxyguanosine-<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N<sub>2</sub> (8OHdG-<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N<sub>2</sub>) and 2'-deoxyguanosine-<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N<sub>2</sub> (2dG-<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N<sub>2</sub>) were from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Purities of isotopically labeled compounds were  $>98\%$  w/w.

Commercially available IsoPs (2,3-dinor-15-F<sub>2t</sub>-IsoP, 15-keto-15-E<sub>2t</sub>-IsoP, 15-keto-15-F<sub>2t</sub>-IsoP, 15-*epi*-15-F<sub>2t</sub>-IsoP, 15-E<sub>2t</sub>-IsoP, 15-F<sub>2t</sub>-IsoP), PGs (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , 2,3-dinor-11 $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , 11 $\beta$ -PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> ), and dihomom-PG (1 $\alpha$ ,1b-dihomom-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) with purities  $\geq 95\%$  were obtained from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI), as well as deuterated compounds (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -D<sub>4</sub> and 15-F<sub>2t</sub>-IsoP-D<sub>4</sub>) with purities  $\geq 98\%$  and incorporation  $\geq 99\%$  deuterated form (D<sub>1</sub>-D<sub>4</sub>);  $<1\%$  <sup>1</sup>H. Other analytical standards used were synthesized at the Institut des Biomolécules Max Mousseron (Montpellier, France) according to previously published procedures, with purities  $\geq 99\%$  and all physical data confirming the new structures reported in previous articles (1, 2), including F<sub>2</sub>-IsoPs (5-F<sub>2t</sub>-IsoP, 5-*epi*-5-F<sub>2t</sub>-IsoP, 15-*epi*-2,3-dinor-15-F<sub>2t</sub>-IsoP), F<sub>4</sub>-NeuroPs (4-F<sub>4t</sub>-NeuroP, 4-*epi*-4-F<sub>4t</sub>-NeuroP, 10-*epi*-10-F<sub>4t</sub>-NeuroP, 10-F<sub>4t</sub>-NeuroP, 14(RS)-14-F<sub>4t</sub>-NeuroP), F<sub>4</sub>-NeuroF (4(RS)-ST- $\Delta^5$ -8-NeuroF), F<sub>2</sub>-dihomom-IsoPs (17-F<sub>2t</sub>-dihomom-IsoP, 17-*epi*-17-F<sub>2t</sub>-dihomom-IsoP, *ent*-7(RS)-7-F<sub>2t</sub>-dihomom-IsoP), and F<sub>2</sub>-dihomom-IsoFs (17(RS)-10-*epi*-SC- $\Delta^{15}$ -11-dihomom-IsoF, 7(RS)-ST- $\Delta^8$ -11-dihomom-IsoF).

**Determination of urinary biomarkers of oxidative damage to DNA and proteins.** The determination of biomarkers of oxidative damage to DNA and proteins was performed following a previously validated ultraperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method (3). Briefly, samples were thawed on ice, homogenized for 5 s, and centrifuged at 15,000 g for 10 min at 4°C. Ninety microliters of supernatant was added to 10  $\mu\text{L}$  of internal standard (IS) solution containing 2  $\mu\text{M}$  of Phe-D<sub>5</sub>, 2dG-<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N<sub>2</sub>, and 8OHdG-<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N<sub>2</sub> in formic acid (0.1% v/v).

Samples were analyzed using an Acquity-Xevo TQ system from Waters (Milford, MA) operating in a positive



electrospray ionization (ESI<sup>+</sup>) mode. Separations were performed using an Acquity UPLC BEH C18 reversed-phase column (2.1 × 50 mm, 1.7 μm) from Waters and a CH<sub>3</sub>OH (0.05% v/v formic acid):H<sub>2</sub>O (0.05% v/v formic acid) binary gradient. For quantification of 8OHdG, 2dG, *o*-Tyr, *m*-Tyr, 3-Cl-Tyr, 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, *p*-Tyr, and Phe in urine, signals from samples were compared with signals of an external calibration line. Calibration standards were obtained from serial dilutions of a working solution containing pure analytical standards. Linear response curves were calculated using *p*-Tyr-D<sub>2</sub>, Phe-D<sub>5</sub>, 2dG-<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N<sub>2</sub>, and 8OHdG-<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N<sub>2</sub> as ISS. Parameters used for the measurement of different metabolites are summarized in Table 4. A quality control (QC) sample was prepared by mixing 5 μL of each sample. Aliquots of the QC sample were prepared as described for urine samples and intercalated every 15 samples in the measurement sequence for monitoring the instrument's performance. For comparisons between samples, the following metabolite ratios were determined: 8OHdG/2dG, *o*-Tyr/Phe, *m*-Tyr/Phe, 3-Cl-Tyr/*p*-Tyr, and 3-NO<sub>2</sub>-Tyr/*p*-Tyr.

Determination of free radical-mediated lipid peroxidation biomarkers in urine. Individual and total free radical-mediated lipid peroxidation biomarkers were determined in urine samples using previously validated UPLC-MS/MS methods (6, 7). In summary, urine samples were thawed on ice and homogenized followed by the addition of 10 μL of β-glucuronidase solution (10 mg mL<sup>-1</sup>) to 600 μL of sample and incubated at 37°C for 90 min. After incubation, 300 μL of IS solution (PGF<sub>2α</sub>-D<sub>4</sub> and 15-F<sub>2t</sub>-IsoP-D<sub>4</sub>, 0.2 μM) in H<sub>2</sub>O (0.1% v/v formic acid, pH = 3):CH<sub>3</sub>OH (85:15, v/v) was added, homogenized, and centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. For cleanup and preconcentration, solid-phase extraction (SPE) using Discovery<sup>®</sup> DSC-18 SPE 96-well plates (Sigma-Aldrich) was carried out. SPE cartridges were conditioned with 1 mL of CH<sub>3</sub>OH followed by rinsing with 1 mL of H<sub>2</sub>O. The diluted sample was loaded onto the SPE plate followed by washing with 500 μL of H<sub>2</sub>O and 500 μL of heptane. Elution of biomarkers was carried out using 4 × 100 μL of ethyl acetate. Recovered sample extracts were evaporated and dissolved in 60 μL of H<sub>2</sub>O (0.1% v/v formic acid, pH 3):CH<sub>3</sub>OH (85:15 v/v).

Samples were analyzed using an Acquity-Xevo TQS system from Waters operating in an ESI<sup>+</sup> mode using a Waters BEH C18 reversed-phase column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) and a binary H<sub>2</sub>O (0.1% v/v formic acid):CH<sub>3</sub>CN (0.1% v/v formic acid) gradient. For biomarker quantification in urine samples, an external calibration approach and the same quality control measures, as described for the previous method, were used. In case of total parameters (total IsoPs, IsoFs, NeuroPs, NeuroFs, dihom-IsoPs, and dihom-IsoFs), detection was carried out as previously described (7) and recently developed for dihom-IsoPs and dihom-IsoFs (6). Relative signal intensities normalized using the IS signal instead of absolute concentrations were determined to circumvent the lack of pure analytical standards. Total parameters were considered when the area was greater than nine times the signal of a blank. The measurement parameters used for the studied biomarkers are summarized in Table 4.

Biomarker concentrations and total parameter responses were normalized by creatinine that was quantified by the modified Jaffe method implemented in the DetectX<sup>®</sup> urinary

creatinine detection kit from Arbor Assays (Ann Arbor, MI) following the manufacturer's instructions.

#### Statistics

LC-MS/MS data were acquired and processed using MassLynx 4.1 and QuanLynx 4.1 (Waters, Milford, MA), respectively. Biomarker concentrations found below the LOQ were replaced by 0.5 × LOQ before data analysis. Data analysis was carried out in MATLAB 2017a from MathWorks (Natick, MA) and SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Categorical variables were compared using Pearson's chi-squared test (α = 0.05). Kolmogorov–Smirnov analysis was performed to test the normal distribution of data. Continuous variables were expressed as mean ± standard deviation or medians with interquartile range depending on underlying distributions, and comparisons were carried out using the Student's *t*-test (α = 5%) for data following a normal distribution or alternatively the Wilcoxon rank sum test (α = 5%).

#### Acknowledgments

The authors express their gratitude to the mothers and their newborns who participated in the study. They also thank the *Servicio de Soporte a la Investigación Experimental* (SCSIE) of the University of Valencia (Spain). J.K. received salary support from a *Miguel Servet* grant (CP16/00034), A.S.-I. from a PFIS grant (FI16/000380), and A.P.-L. from a *Río Hortega* grant (CM18/00165), all provided by the *Instituto Carlos III* (Ministry of Economy and Competitiveness, Spain). This work was partly funded through the *Instituto Carlos III* (grant number PI17/00127 and PI17/0131), the European Society for Paediatric Research (Young Investigator Start-up 2016 grant), and the Spanish Maternal, Neonatal, and Developmental Network SAMID RETICS (RD16/0022/0001) funded by the PN 2018–2021 (Spain), ISCIII-Sub-Directorate General for Research Assessment and Promotion, and the European Regional Development Fund (FEDER).

#### Author Disclosure Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### References

- de la Torre A, Yiu LY, Attilio M, Alexandre G, Valérie B-P, Thierry D, Camille O, Chung-Yung LJ, and Jean-Marie G. Total syntheses and in vivo quantitation of novel neurofuran and dihom-isofuran derived from docosahexaenoic acid and adrenic acid. *Chemistry* 21: 2442–2446, 2014.
- Guy A, Oger C, Heppekausen J, Signorini C, De Felice C, Fürstner A, Durand T, and Galano J-M. Oxygenated metabolites of n-3 polyunsaturated fatty acids as potential oxidative stress biomarkers: total synthesis of 8-F3t-IsoP, 10-F4t-NeuroP and [D4]-10-F4t-NeuroP. *Chemistry* 20: 6374–6380, 2014.
- Kuligowski J, Torres-Cuevas I, Quintás G, Rook D, van Goudoever JB, Cubells E, Asensi M, Lliso I, Nuñez A, Vento M, and Escobar J. Assessment of oxidative damage to

- proteins and DNA in urine of newborn infants by a validated UPLC-MS/MS approach. *PLoS One* 9: e93703, 2014.
4. Ledo A, Arduini A, Asensi MA, Sastre J, Escrig R, Brugada M, Aguar M, Saenz P, and Vento M. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am J Clin Nutr* 89: 210–215, 2009.
  5. Peila C, Moro GE, Bertino E, Cavallarin L, Giribaldi M, Giuliani F, Cresi F, and Coscia A. The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutrients* 8: pii: E477, 2016.
  6. Sánchez-Illana Á, Shah V, Piñero-Ramos JD, Di Fiore JM, Quintás G, Raffay TM, MacFarlane PM, Martin RJ, and Kuligowski J. Adrenic acid non-enzymatic peroxidation products in biofluids of moderate preterm infants. *Free Radic Biol Med* 2019 [Epub ahead of print]; DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.024.
  7. Sánchez-Illana Á, Thayyil S, Montaldo P, Jenkins D, Quintás G, Oger C, Galano J-M, Vigor C, Durand T, Vento M, and Kuligowski J. Novel free-radical mediated lipid peroxidation biomarkers in newborn plasma. *Anal Chim Acta* 996: 88–97, 2017.
  8. Vento M, Hummler H, Dawson J, Escobar J, and Kuligowski J. Use of oxygen in the resuscitation of neonates. In: *Perinatal and Prenatal Disorders*, edited by Dennery PA, Buonocore G, and Saugstad OD. New York: Humana Press, 2014, pp. 213–244.
  9. Villamor-Martínez E, Pierro M, Cavallaro G, Mosca F, Kramer BW, and Villamor E. Donor human milk protects against bronchopulmonary dysplasia: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 10: pii: E238, 2018.

Address correspondence to:  
 Dr. Julia Kuligowski  
 Neonatal Research Group  
 Health Research Institute La Fe  
 Avenida Fernando Abril Martorell 106  
 Valencia 46026  
 Spain

E-mail: julia.kuligowski@uv.es

Date of first submission to ARS Central, June 27, 2019; date of acceptance, June 27, 2019.

#### Abbreviations Used

DHM = donor human milk  
 FM = formula milk  
 HM = human milk  
 IS = internal standard  
 LC-MS/MS = liquid chromatography–tandem mass spectrometry  
 LOQ = limit of quantification  
 NICU = neonatal intensive care unit  
 OMM = own mother's milk  
 ROS = reactive oxygen species  
 SPE = solid-phase extraction  
 UPLC-MS/MS = ultraperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry

### **CAPÍTULO III.**





Finalmente, analizamos las consecuencias del procesamiento de la leche humana donada sobre la expresión genómica intestinal, para lo que utilizamos células intestinales exfoliadas, tal y como se describe en la publicación adjunta:

**Parra-Llorca A, Gormaz M, Lorente-Pozo S, et al. Impact of Donor Human Milk in the Preterm Very Low Birth Weight Gut Transcriptome Profile by Use of Exfoliated Intestinal Cells. *Nutrients*. 2019;11:2677 (147).**

La leche materna propia (LM) es la nutrición óptima para los prematuros. Sin embargo, la leche humana donada pasteurizada (LHD) es una alternativa válida. Exploramos las diferencias del transcriptoma en las células intestinales epiteliales exfoliadas (CIEE) de los recién nacidos prematuros que reciben alimentación completa con LM o LHDM. Métodos: Estudio observacional prospectivo que incluyó a recién nacidos prematuros  $\leq 32$  semanas de gestación y / o  $\leq 1.500$  g de peso al nacer. El ARN total de CIEE se procesó para el análisis de expresión de todo el genoma. Resultados: El análisis de componentes principales y el análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado revelaron dos grupos agrupados correspondientes a los grupos LM y LHD que mostraron diferencias en el perfil de expresión genómica en 1629 transcripciones. El grupo de LM sobreexpresó el gen de la lactoalbúmina alfa (*LALBA*), el gen de la subunidad I de la citocromo C oxidasa (*COX1*) y el gen kappa de las caseínas (*CSN3*), el gen beta (*CSN2*) y el gen alfa (*CSN1S1*) y el gen del factor citosólico de neutrófilos 1 (*NCF1*) infraexpresado en comparación al grupo LHD. Conclusiones: El análisis transcriptómico de CIEE mostró que la LM indujo una expresión diferencial de genes específicos que podrían contribuir a una respuesta más eficiente frente a un desafío pro-oxidante temprano en el período posnatal cuando los prematuros tienen un mayor riesgo de estrés oxidativo. Se debe promover fuertemente el uso de LM en esta población.

Article

# Impact of Donor Human Milk in the Preterm Very Low Birth Weight Gut Transcriptome Profile by Use of Exfoliated Intestinal Cells

Anna Parra-Llorca <sup>1</sup>, María Gormaz <sup>1,2</sup>, Sheila Lorente-Pozo <sup>1</sup>, Maria Cernada <sup>1,2</sup>, Ana García-Robles <sup>1</sup>, Isabel Torres-Cuevas <sup>1</sup>, Julia Kuligowski <sup>1</sup> , Maria Carmen Collado <sup>3</sup> , Eva Serna <sup>4,\*</sup>  and Máximo Vento <sup>1,2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Neonatal Research Group, Health Research Institute La Fe, 46026 Valencia, Spain; annaparralorca@gmail.com (A.P.-L.); gormaz\_mar@gva.es (M.G.); slopo@alumni.uv.es (S.L.-P.); mariacernada@gmail.com (M.C.); garcia.anarob@gmail.com (A.G.-R.); Maria.I.Torres@uv.es (I.T.-C.); julia.kuligowski@uv.es (J.K.)

<sup>2</sup> Division of Neonatology, University and Polytechnic Hospital La Fe, 46026 Valencia, Spain

<sup>3</sup> Department of Biotechnology, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Spanish National Research Council (IATA-CSIC), 46980 Valencia, Spain; mcolam@iata.csic.es

<sup>4</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

\* Correspondence: eva.serna@uv.es (E.S.); maximo.vento@uv.es (M.V.); Tel.: 96-3864646 (E.S.)

Received: 8 October 2019; Accepted: 30 October 2019; Published: 5 November 2019



**Abstract:** Background: Own mother's milk (OMM) is the optimal nutrition for preterm infants. However, pasteurized donor human milk (DHM) is a valid alternative. We explored the differences of the transcriptome in exfoliated epithelial intestinal cells (EEIC) of preterm infants receiving full feed with OMM or DHM. Methods: The prospective observational study included preterm infants  $\leq 32$  weeks' gestation and/or  $\leq 1500$  g birthweight. Total RNA from EEIC were processed for genome-wide expression analysis. Results: Principal component analysis and unsupervised hierarchical clustering analysis revealed two clustered groups corresponding to the OMM and DHM groups that showed differences in the gene expression profile in 1629 transcripts. The OMM group overexpressed lactalbumin alpha gene (*LALBA*), Cytochrome C oxidase subunit I gene (*COX1*) and caseins kappa gene (*CSN3*), beta gene (*CSN2*) and alpha gene (*CSN1S1*) and underexpressed Neutrophil Cytosolic Factor 1 gene (*NCF1*) compared to the DHM group. Conclusions: The transcriptomic analysis of EEIC showed that OMM induced a differential expression of specific genes that may contribute to a more efficient response to a pro-oxidant challenge early in the postnatal period when preterm infants are at a higher risk of oxidative stress. The use of OMM should be strongly promoted in preterm infants.

**Keywords:** prematurity; mother's milk; donor milk; genetics; intestinal cells; inflammation; oxidative stress

## 1. Introduction

Prematurity causes annually about 1 million neonatal deaths worldwide and is the second cause of neonatal and under five-years childhood mortality [1,2]. Preterm infants have an immature antioxidant defense system [3], and clinical therapies, such as radiation, parenteral nutrition, mechanical ventilation, or antibiotics increase oxidative stress-related conditions [4,5]. Moreover, preterm infants' stabilization in the delivery room frequently requires the provision of positive pressure ventilation and oxygen supplementation, both leading to the generation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress [6]. Breast milk provides antioxidant protection [7], and therefore, premature infants fed human milk (HM) had lower levels of oxidative stress-related biomarkers than those fed with formula [8].



Donor human milk (DHM) is a valid alternative when their own mother's milk (OMM) is unavailable. DHM protects against necrotizing enterocolitis (NEC) [9]; however, pasteurization and freezing processes alter the biological activity and concentration of several biological factors and biomolecules present in DHM [10].

In a previous study, we analyzed the transcriptome profile from exfoliated epithelial intestinal cells (EEIC) in preterm neonates with sepsis, and results showed that infection contributed to changes in the gene expression favoring a pro-oxidant status in the intestinal lumen [11]. To our knowledge, there are no studies showing the differences in fresh preterm own mother's milk compared to pasteurized human milk on the transcriptome of preterm infants' intestine. Accordingly, we studied the transcriptomic profile in EEIC collected from preterm infants fed OMM and compared to those fed with pasteurized DHM.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Study Design and Patients' Characteristics

This is a prospective, observational, cohort study performed in the Division of Neonatology of the University and Polytechnic Hospital La Fe (HUIP) from January 2016 to December 2017. The Neonatal Division protocol strongly supports breastfeeding to preterm infants born  $\leq 32$  weeks or  $\leq 1500$  g birth weight. OMM is the first choice, and DHM is used as a supplement when there is not enough OMM available or refusal of parents to breastfeed.

The study was approved by the Scientific and Ethics Committee for Biomedical Research (CEIm) (#2015/0371) of the HUIP. Parents signed an informed consent form.

Demographic, perinatal, clinical, and analytical data were recorded and matched according to the type of feeding (see Table 1). Enrolled patients had never been fed Formula Milk. Full OMM feeding was attempted in all cases, but not achieved in all patients. Two groups were recruited according to the main feeding type accounting for  $\geq 80\%$  of the nutritional intake by volume with either OMM or DHM. When necessary, DHM or OMM was provided respectively to complete the resting volume.

Preterm infants were fed upon admission to the NICU small volumes of trophic enteral nutrition (between 15–30 mL/kg/day), which was progressively increased until full enteral nutrition was reached at day 10<sup>th</sup>–12<sup>th</sup> after birth. Nutrition was complemented with intravenous parenteral nutrition, which was gradually decreased until it was withdrawn. Fecal samples were collected when preterm infants achieved complete enteral nutrition (150 mL/kg/day). A stool sample per child was collected.

Daily intake was provided with OMM or DHM to achieve the prescribed feeding volume. Patients of the DHM group only received milk from one donor. The nutritional intake was monitored, but never influenced by this observational study. Exclusion criteria included mixed breastfeeding, antibiotic therapy, chromosomopathies, major congenital malformations or abdominal surgery. DHM was pasteurized following the Holder method (62.5 °C degrees for 30 min).

Fecal samples were directly collected (minimum 5 g) from the diaper when full enteral feeding was achieved. Samples were frozen and stored at  $-80$  °C until analysis.

RNA extraction and transcriptomic analysis of samples from EEIC.

Total RNA was isolated directly from fecal samples using the Trizol reagent (TRIzol, Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA), followed by a polyA+ RNA enrichment step in order to eliminate contaminating DNA and bacterial RNA using the mRNA-ONLY™ Eukaryotic mRNA Isolation Kit (Epicentre Analytics Inc., Etobicoke, ON, Canada) according to the manufacturers' instructions. RNA integrity number (RIN) was tested employing the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and RNA concentration and purity were determined using a spectrophotometer (GeneQuant, GE Healthcare Biosciences, German). The ratio 260/280 and the integrity of RNA between both populations were compared using T-Student test. RIN values  $>6$  were considered optimal for hybridization and were statistically similar ( $p$ -value = 0.6).

The synthesis of cDNA and cRNA, labeling, hybridization, and scanning of the samples were performed according to the WT Plus Reagent Kit Manual (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). To prepare the hybridization cocktail, 5.5 µg of fragmented biotinylated cRNA was used. Subsequently, this cocktail was hybridized onto the Clariom S Human microarray for 16 h at 45 °C (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). This microarray contains more than 20,000 well-annotated genes. The microarray used is specific only for the human organism.

The raw data were imported into Partek Genomics Suite v6.6 (Partek, Inc., St. Louis, MO, USA) as CEL files. Raw data were pre-processed, which included background correction, normalization, and summarization using robust multi-array average (RMA) analysis and then log<sub>2</sub>-transformed.

## 2.2. Real-Time RT-PCR Validation

The Cytochrome C oxidase subunit 1 (*COX1*) (Hs02596864\_g1) and Neutrophil Cytosolic Factor 1 (*NCF1*) (Hs00165362\_mL) significant differentially expressed transcripts were validated by using a single real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using TaqMan Gene Expression Assays probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The endogenous reference gene used was glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (housekeeping control Hs02786624\_g1). RNA samples were reverse transcribed using random hexamers and MultiScribe reverse transcriptase (Applied Biosystems). After complementary DNA synthesis, real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out using the QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The same samples used in microarray analysis were run in triplicate, and fold-changes were generated for each sample by calculating  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [12].

Statistical significance of the differences was evaluated by the Mann-Whitney test. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## 2.3. Statistical Analysis

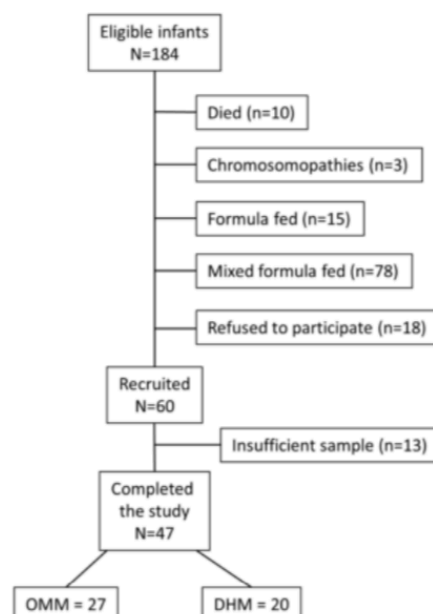
Categorical variables were compared using  $\chi^2$  or Fisher's exact test (two-tailed). Continuous variables were expressed as mean  $\pm$  SD or medians with the interquartile range, depending on data distribution. Two-tailed Student's *t* or Mann-Whitney *U* test and analysis of variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis were used to compare two or >two groups as appropriate. Kolmogorov-Smirnov analysis was performed to test the normal distribution of the data. Data analysis was performed using SPSS version 20.0 (IBM, Madrid, Spain). Significance was considered for a *p*-value  $< 0.05$ .

Unsupervised analysis of data was carried out employing principal component analysis (PCA) and unsupervised hierarchical cluster analysis. 1-way ANOVA (*p*-value  $< 0.05$ ) was applied to identify differentially expressed genes between OMM vs. DHM groups. Finally, the selected differentially expressed genes were imported into Pathway Studio version 10 (Elsevier Inc, Rockville, MD, USA) to identify relevant biological processes.

## 3. Results

### 3.1. Patients' Characteristics

A total of 47 preterm infants  $\leq 32$  weeks' gestation and/or  $\leq 1500$  g birth weight receiving OMM ( $N = 27$ ) or DHM ( $N = 20$ ) were included in the study (Figure 1). No differences in prenatal demographic characteristics or confounders during the hospitalization were found between both groups (Table 1).



**Figure 1.** Flowchart of patients' recruitment. A total of 47 preterm infants <32 weeks' gestation or <1500 g were recruited. Out of these, 27 were fed with their own mother's milk (OMM) and 20 with pasteurized donated human milk (DHM).

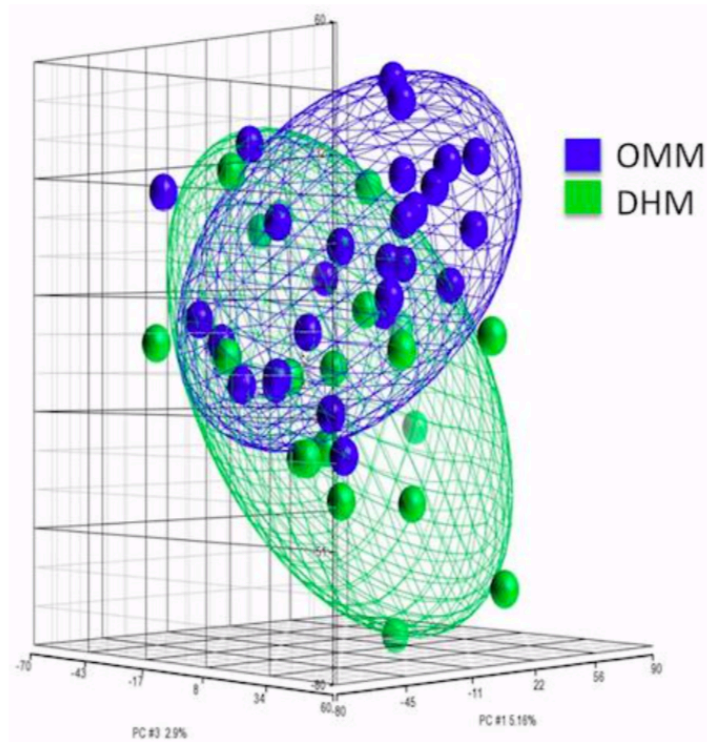
**Table 1.** Demographic, perinatal, clinical, and analytical data of preterm infants < 32 weeks' gestation receiving own mother's milk (OMM) or pasteurized donor human milk (DHM).

	OMM (N = 27)	DHM (N = 20)	p-Value
GA weeks, (median; 5–95% CI)	29 (28–30)	30 (29–31)	0.07
Antenatal Steroids full course, n (%)	25 (92.6)	20 (100)	0.21
Sex male, n (%)	21 (77.7)	11 (55)	0.1
Type of delivery, n (%)			
- Vaginal	13 (48.1)	10 (50)	0.9
- C- Section	14 (51.8)	10 (50)	
Birth weight (g), mean (SD)	1206 (264)	1315 (193)	0.22
Apgar 1 min (median; 5–95% CI)	7 (6–9)	7 (6–9)	0.48
Apgar 5 min (median; 5–95% CI)	9 (8–19)	9 (8–9)	0.28
Age (d) at sample collection, (median; 5–95% CI)	9 (7–11)	8 (6–10)	0.52
Chorioamnionitis, n (%)	4 (14.8)	2 (10)	0.62
Persistent ductus arteriosus, n (%)	8 (29.6)	6 (30)	0.98
Antibiotic therapy, n (%)	11 (40.7)	6 (30)	0.45
Bronchopulmonary Dysplasia, n (%)	1 (3.7)	0 (0)	0.38
Intraventricular hemorrhage, n (%)	6 (22.2)	3 (15)	0.53
Necrotizing enterocolitis, n (%)	1 (3.7)	0 (0)	0.38
Retinopathy of prematurity, n (%)	1 (3.7)	0 (0)	0.38

### 3.2. PCA of Gene Expression from EEIC of Preterm Infants

The PCA scores plot allowed to observe the distribution of fecal samples from newborns receiving OMM or DHM according to their transcriptome (see Figure 2).

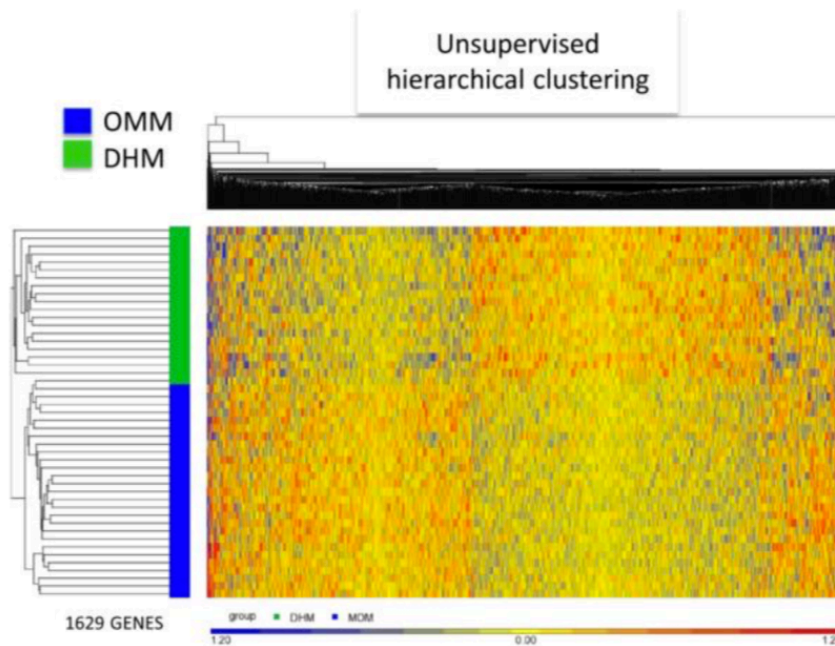
Our data were analyzed by PCA to determine the significant sources of variability of high-dimensional data, and thus, simplifying the identification of patterns and sources of variability in an extensive data set in a tridimensional fashion. The PCA scores plot depicted in Figure 2 shows a high similarity between the OMM and DHM groups; however, two different clustered groups that correspond to the OMM and DHM groups can be clearly appreciated. The variability between groups was 12.1%.



**Figure 2.** Principle components analysis (PCA) displays clear spatial separation of variations in expression values in the two groups of samples identified by unsupervised hierarchical clustering. In the 3-dimensional plot, the three principal components PC#1, #2 and #3 of all samples with over 20,000 well-annotated genes and their respective variations are expressed on the x-, y- and z-axis. The total percentage of PCA mapping variability is 12.1%. Each data point represents one sample. The ellipsoids highlight the portioning of the different samples. Assignment of samples by color: OMM (blue) and DHM (green).

### 3.3. EEIC Transcriptome Analysis in the OMM Versus DHM Groups

Differentially expressed genes (DEG) derived from ANOVA ( $p$ -value < 0.05) analysis revealed statistically significant changes in 1629 transcripts of EEIC in neonates fed OMM vs. DHM. Out of these, 807 genes were up-regulated (49.5%), and 822 were down-regulated (50.5%) in the OMM groups, when compared with the DHM group (see supplementary Figure S1, Volcano plot). Unsupervised hierarchical clustering analysis confirmed the differential intensity of gene expression between both groups (see Figure 3). Figure 3 represents in blue and red, the statistically significant underexpressed and overexpressed genes, respectively. Preterm infants fed OMM are clustered in the lower zone and fed DHM are clustered in the upper zone. No outliers are present despite being an unsupervised hierarchical clustering. The prevalence of yellow reveals that fold-change changes are subtle reconfirming PCA findings.



**Figure 3.** Heatmap of 27 preterm infants fed their own mother’s milk (OMM; blue bar) and 20 preterm infants fed donated human milk (DHM; green bar) and 1629 genes derived from ANOVA. Each line represents a patient and each column a gene. Overexpressed genes are represented in red and underexpressed genes in blue.

### 3.4. Biological Analysis

According to Pathway Studio v10, most of the changes in the gene expression between the two groups were related to transcription ( $p$ -value =  $3.62 \times 10^{-24}$ ). In the supplementary, Table S1 shows in detail the top 10 biological processes filtered for enrichment  $p$ -value, and Table S2 the expression of the 1629 differentially expressed genes.

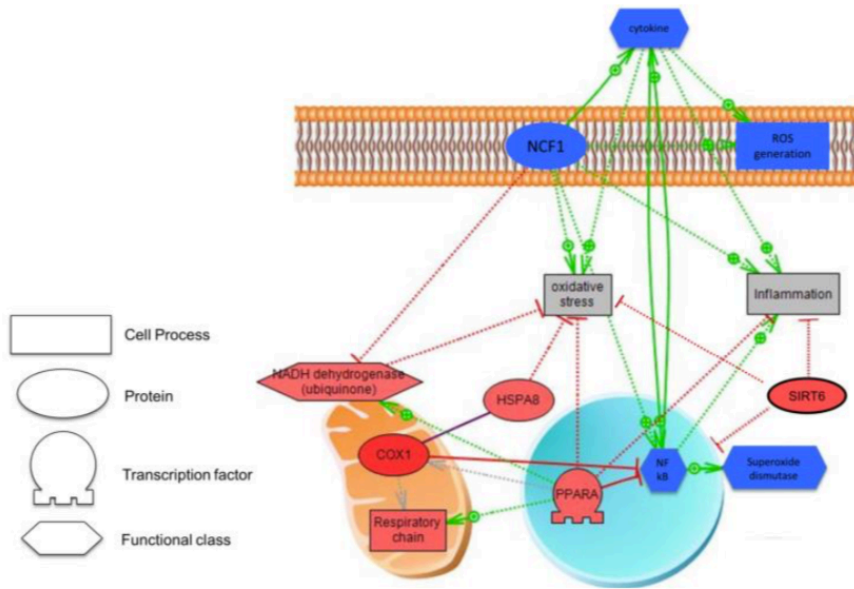
### 3.5. Biomarkers in Preterm Infants According to Type of Nutrition

The candidate genes to explain the transcriptomic changes between OMM versus DHM are represented in Table 2. The criterion for choosing the most over-and-underexpressed genes in premature neonates fed with OMM compared with those fed with DHM, was the absolute value of fold-change of  $|1.6|$ .

**Table 2.** The candidate genes with the highest fold-change between preterm infants < 32 weeks’ gestation/<1.500 g fed their own mother’s milk versus donated human milk in the neonatal period.

Gene Symbol	Gene Name	Fold-Change	$p$ -Value
LALBA	Lactalbumin alpha	2.9	0.002
CSN3	Casein kappa	2.6	0.002
CSN2	Casein beta	2.1	0.009
COX1	Cytochrome C oxidase subunit1	2.1	0.030
CSN1S1	Casein alpha-s1	1.7	0.008
NCF1	Neutrophil cytosolic factor 1	−1.6	0.040

Gene expression of Lactalbumin alpha (*LALBA*) and caseins kappa (*CSN3*), beta (*CSN2*), and alpha (*CSN1S1*) were overexpressed in preterms fed with OMM vs. DHM. Cytochrome C oxidase subunit I (*COX1*) was also one of the genes with a higher fold-change in the OMM vs. DHM. Neutrophil Cytosolic Factor 1 (*NCF1*) was the most underexpressed gene in the OMM group, thus, explaining the lack of activation of inflammatory pathways, non-activating cytokines formation, and blocking of ROS generation. Figure 4 illustrates changes in gene expression profile found in EEI cells of preterm infants fed OMM vs. DHM.

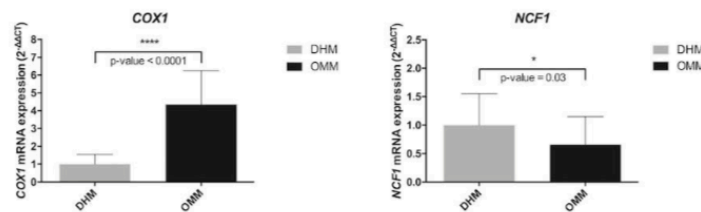


**Figure 4.** Model describing changes in gene expression profile observed in exfoliated epithelial intestinal cells (EEIC). Up-regulated (in red) and down-regulated (in blue) genes in preterm infants fed OMM vs. DHM. The solid line means expression and dashed line means regulation. Relations are colored by effect: Red expresses a negative effect, and green represents a positive effect. Grey means we can observe the unknown effect.

*COX1*: Cytochrome C oxidase subunit I, *HSPA8*: Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 8, *PPARA*: Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha

*NFkB*: Nuclear Factor kappa Beta, *NADH dehydrogenase*: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. *SIRT6*: Sirtuin 6. *NCF1*: Neutrophil Cytosolic Factor 1.

We performed real-time RT-PCR from RNA total of fecal samples from OMM and DHM to validate the biomarker genes *COX1* and *NCF1* (Figure 5).



**Figure 5.** Real-time RT-PCR from RNA total of fecal samples from OMM and DHM to validate the biomarker genes *COX1* and *NCF1*.

The real-time RT-PCR data confirmed significantly higher mRNA levels of *COX1* in OMM with respect DHM. In line with microarray data, this validation also showed statistically significant underexpression of *NCF1* in OMM compared with DHM (shown in Table S2 in the supplementary).

#### 4. Discussion

Chapkin et al. [13], for the first time, employed stool samples containing intact epithelial cells to quantify intestinal gene expression profiles in infants that exclusively received breast milk or formula at three months of age. Donovan et al. studied exfoliated intestinal cells within a term and also preterm population newborn babies fed human milk versus formula and found a differential expression of ~1200 genes, including genes regulating intestinal proliferation, differentiation, and barrier function. Of note, when term and preterm infants were compared, pathways associated with immune cell function and inflammation were up-regulated in preterm, whereas cell growth-related genes were up-regulated in the term infants [14]. Moreover, Knight et al. [15] applied next-generation sequencing to analyze differences in gene expression between term and preterm infants. However, to the best of our knowledge, this is the first report comparing the gut transcriptome in preterm babies fed OMM or DHM. For this purpose, we employed a previously validated, non-invasive sample collection method [11]. According to the World Health Organization (WHO), breastfeeding fulfills the requirements for infants' growth and development optimally [16]. In preterm infants, OMM has been associated with improved growth and cognitive development, reduced risk of NEC, and late-onset sepsis [17]. However, mothers who deliver preterm infants are often unable to breastfeed successfully [18]. When OMM is unavailable, or insufficient DHM has become the preferred alternative for the nutrition of preterm infants, because it confers clinical advantages over formula-feeding, such as reducing the incidence of NEC [19,20].

In the present study, the feeding of preterm infants with either OMM or DHM caused significant differences, as shown in the PCA scores plot. In fact, the transcriptional profile of around 1600 genes in a panel over 20,000 genes differed between both groups. The candidate genes in which the whole gene expression analysis of EEI cells showed significant changes were alpha-lactalbumin (*LALBA*), caseins kappa (*CSN3*), beta (*CSN2*), and alpha (*CSN1S1*), cytochrome c oxidase subunit I (*COX1*), and Neutrophil Cytosolic Factor 1 (*NCF1*).

DHM is collected, processed, and stored in milk banks. Milk bank guidelines recommend Holder pasteurization (62.5 °C degrees for 30 min) to inactivate viral and bacterial agents [10]. Pasteurization does not substantially alter the pattern of the gut microbial colonization. Hence, in a recent study, it was shown that preterm infants fed DHM or OMM had a similar pattern of gut microbiome, as opposed to formula feeding [21]. Differences in the intestinal microbiota induced by a different diet [20], could be a potential mediating factor to induce the changes in the profile of gene expression. Pasteurization has unwanted secondary effects upon human milk, such as killing cells and bacteria, and modifying the structure and function of specific proteins, lactoferrin, lysozyme, cytokines, and vitamins. However, other components with biological relevance, such as oligosaccharides and polyunsaturated and long-chain fatty acids (LCPUFA), are preserved [22,23]. Pasteurization affects nutritional, microbiological, metabolic and immunological properties, and therefore, the clinical benefits are still a matter of debate [22–27].

Proteins act as biologically active molecules to assist in nutrient digestion and absorption, confer protection against pathogens, and modulate the immune maturation and immune response [28–30]. The HM proteome is complex and includes 2500 different identified proteins [31]. Alfa-lactalbumin, lactoferrin, serum albumin, and caseins are amongst the most abundant proteins and account for approximately 85% of the total protein content of HM [32]. Our results revealed overexpression of different types of caseins and lactalbumin genes in preterm infants fed with OMM. These changes are consistent with the higher protein content of milk obtained from preterm mothers compared to mothers who deliver at term and donate mature milk to the bank [33].

On the other side, the immune system in early life undergoes intense and rapid changes [34]. Similar patterns of distinct Toll-like-receptor-mediated immune responses come to light when innate immune development at the beginning of life is compared with that towards the end of life [35].

Reactive oxygen species (ROS) can be beneficial because they are used by the immune cells, especially monocytes and macrophages, to kill pathogens [36]. Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of free radicals (FR) and the reduction capacity of the antioxidant defense system of the organism in favor of the former [3]. Oxidative stress triggers the expression of proinflammatory genes through the activation of the transcription factor NFκB [3,37,38]. ROS, cytokines and specific genes, such as NCF1, promote the translocation of NFκB to the nucleus where it binds to specific target genes that play a central role in inflammatory [39] and immune responses [40], and cytokine secretion by numerous cell types [41–46]. As shown in Figure 4, in preterm infants fed OMM NCF1 expression is down-regulated and concomitantly COX1 up-regulated. These changes may explain why fresh HM has higher anti-inflammatory and antioxidant properties than pasteurized milk [47]. The protein encoded by this NCF1 is a cytosolic subunit of neutrophil NADPH oxidase. This oxidase is a multicomponent enzyme that is activated to produce superoxide anion, and subsequently, oxidative stress [48]. Down-regulation of NCF1 reduces cytokine production, thus, playing an essential role in modulating autoimmunity, immunologic processes, inflammation, proliferative responses and apoptosis [49–52]. As shown in Figure 4, premature infants fed OMM overexpress COX1 compared with those fed with DHM. COX1 regulates the electron flow across the mitochondrial electron transport chain and the formation of H<sub>2</sub>O, thus, reducing free radical generation, and subsequently, the activation of pro-inflammatory pathways. [49]. Moreover, as also shown also in Figure 4, COX1, through the interaction with the chaperone protein HSPA8, also plays a vital important role under pro-oxidant conditions, such as hypoxia-reoxygenation in the inactivation of NFκB and pro-apoptotic pathways [50,51]. In addition, peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-α) also inhibits NFκB, but not stress-activated protein kinase [52,53].

The transcriptomic analysis in EEI cells of preterm infant's intestine receiving two different types of HM, preterm non-pasteurized and term pasteurized, has allowed the visualization genome expression changes. These results were obtained in fecal samples, and therefore, reflected local changes located in the gut of preterm infants. We may speculate that metabolites that are derived from the digestion of OMM or DHM exert a specific stimulus upon exfoliated epithelial intestinal cells eliciting a differentiated genetic response.

We acknowledge the sample size as a limiting factor; however, our NICU promotion of the use of OMM explains the difficulties for enrolling patients fed almost exclusively (≥80%) with DHM. Despite this limitation, our study shows differences in genes involved in oxidative stress and inflammation in the transcriptome profiling of EEIC of preterm infants fed with OMM as compared to DHM. The use of non-invasive techniques in this vulnerable population should also be underpinned. Finally, our study stresses the need for optimizing pasteurization methods that enhance the preservation of essential components of HM, and consequently, improve the quality of DHM.

## 5. Conclusions

The transcriptomic analysis performed in EEIC of preterm infants has been used to visualize expression changes in the gut induced by two different types of human milk, fresh own preterm mother's milk, and donated term and pasteurized human milk. Our results, although preliminary, suggest that preterm infants fed OMM could have a better response against oxidative stress and inflammation, due to the differential expression of highly specific genes, such as *COX1*, *PPAR-alpha*, *NCF1* and *NFκB*. The use of OMM should be promoted, and improvement in pasteurization techniques should be implemented.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/11/2677/s1>, Figure S1: Volcano Plot of differentially expressed genes between preterm infants fed their own mother's milk (OMM) or pasteurized donated human milk (DHM), Table S1: The 10 most representative biological processes filtered for enrichment p-value in preterm infants; Table S2: Differential genes in transcriptomic analysis of exfoliated epithelial intestinal cells between preterm infants fed their own mother's milk (OMM) and pasteurized donated human milk (DHM).



**Author Contributions:** A.P.-L., M.G., M.C., M.C.C., E.S. and M.V. planned the experiments. A.P.-L., M.G., M.C. S.L.-P., A.G.-R., I.T.-C. collected the samples and clinical data; A.P.-L., J.K., E.S., M.C.C. and M.V. performed the analysis and analyzed data. A.P.-L. wrote first draft and all authors commented criticized, and reviewed the manuscript. All authors accepted the final version the manuscript.

**Funding:** A.P.-L.: A.G.-R., S.L.-P. and J.K. enjoy research grants CM18/00165, CM16/00174, FI18/0131, CP16/00034 respectively from the Instituto de Investigación Sanitaria Carlos III (Ministry of Science, Innovation and Universities); M.C.C. acknowledges the support from ERC Starting Grant 639226-MAMI from the European Union and also, the Spanish Government of Economy and Competitiveness (MINECO) (AGL2015-707487-P grant). MV a full grant from the RETICS funded by the P/N 2018-2021 (Spain), ISCIII- Sub-Directorate General for Research Assessment and Promotion and the European Regional Development Fund (FEDER), reference RD16/0022/0001 and PI17/0131 grant for the IIS Carlos III (Ministry of Science, Innovation and Universities).

**Conflicts of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### Abbreviations and Acronyms

ROP	Retinopathy of prematurity
BPD	Bronchopulmonary dysplasia
NEC	Necrotizing Enterocolitis
PVL	Periventricular leucomalacia
FR	Free Radicals
ROS	Reactive oxygen species
OMM	Own Mother's Milk
DHM	Donor Human Milk
FM	Formula Milk
HM	Human Milk
DEG	Differentially expressed genes
BW	Birth Weight
GA	Gestational Age
WHO	World Health Organization
EEIC	Exfoliated epithelial intestinal cells
COX1	Cytochrome C oxidase subunit 1
NCF1	Neutrophil Cytosolic Factor 1

### References

1. Yismaw, A.E.; Gelagay, A.A.; Sisay, M.M. Survival and predictors among preterm neonates admitted at University of Gondar comprehensive specialized hospital neonatal intensive care unit, Northwest Ethiopia. *Ital. J. Pediatr.* **2019**, *45*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Glass, H.C.; Costarino, A.T.; Stayer, S.A.; Brett, C.M.; Cladis, F.; Davis, P.J. Outcomes for extremely premature infants. *Anesth. Analg.* **2015**, *120*, 1337–1351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Torres-Cuevas, I.; Parra-Llorca, A.; Sánchez-Illana, A.; Nuñez-Ramiro, A.; Kuligowski, J.; Cháfer-Pericás, C.; Cernada, M.; Escobar, J.; Vento, M. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol.* **2017**, *12*, 674–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Smuder, A.J.; Sollanek, K.J.; Nelson, W.B.; Min, K.; Talbert, E.E.; Kavazis, A.N.; Hudson, M.B.; Sandri, M.; Szeto, H.H.; Powers, S.K. Crosstalk between autophagy and oxidative stress regulates proteolysis in the diaphragm during mechanical ventilation. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *115*, 179–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ozsurekci, Y.; Aykac, K. Oxidative Stress Related Diseases in Newborns. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, *2016*, 2768365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vento, M.; Saugstad, O.D. Oxygen supplementation in the delivery room: Updated information. *J. Pediatr.* **2011**, *158*, e5–e7. [[CrossRef](#)]
7. Păduraru, L.; Dimitriu, D.C.; Avasiloiu, A.L.; Moscalu, M.; Zonda, G.I.; Stamatina, M. Total antioxidant status in fresh and stored human milk from mothers of term and preterm neonates. *Pediatr. Neonatol.* **2018**, *59*, 600–605. [[CrossRef](#)]

8. Ledo, A.; Arduini, A.; Asensi, M.A.; Sastre, J.; Escrig, R.; Brugada, M.; Aguar, M.; Saenz, P.; Vento, M. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 210–215. [[CrossRef](#)]
9. Meinzen-Derr, J.; Poindexter, B.; Wrage, L.; Morrow, A.L.; Stoll, B.; Donovan, E.F. Role of human milk in extremely low birth weight infants' risk of necrotizing enterocolitis or death. *J. Perinatol.* **2009**, *29*, 57–62. [[CrossRef](#)]
10. Peila, C.; Moro, G.E.; Bertino, E.; Cavallarin, L.; Giribaldi, M.; Giuliani, F.; Cresi, F.; Coscia, A. The Effect of Holder Pasteurization on Nutrients and Biologically-Active Components in Donor Human Milk: A Review. *Nutrients* **2016**, *8*, 477. [[CrossRef](#)]
11. Cernada, M.; Bäuerl, C.; Serna, E.; Collado, M.C.; Martínez, G.P.; Vento, M. Sepsis in preterm infants causes alterations in mucosal gene expression and microbiota profiles compared to non-septic twins. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Chapkin, R.S.; Zhao, C.; Ivanov, I.; Davidson, L.A.; Goldsby, J.S.; Lupton, J.R.; Mathai, R.A.; Monaco, M.H.; Rai, D.; Russell, W.M.; et al. Noninvasive stool-based detection of infant gastrointestinal development using gene expression profiles from exfoliated epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* **2010**, *298*, G582–G589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Donovan, S.M.; Wang, M.; Monaco, M.H.; Martin, C.R.; Davidson, L.A.; Ivanov, I.; Chapkin, R.S. Noninvasive molecular fingerprinting of host-microbiome interactions in neonates. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 4112–4119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Knight, J.M.; Davidson, L.A.; Herman, D.; Martin, C.R.; Goldsby, J.S.; Ivanov, I.V.; Donovan, S.M.; Chapkin, R.S. Non-invasive analysis of intestinal development in preterm and term infants using RNA-Sequencing. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Garwolińska, D.; Namieśnik, J.; Kot-Wasik, A.; Hewelt-Belka, W. Chemistry of Human Breast Milk-A Comprehensive Review of the Composition and Role of Milk Metabolites in Child Development. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 11881–11896. [[CrossRef](#)]
17. Cortez, J.; Makker, K.; Kraemer, D.F.; Neu, J.; Sharma, R.; Hudak, M.L. Maternal milk feedings reduce sepsis, necrotizing enterocolitis and improve outcomes of premature infants. *J. Perinatol.* **2018**, *38*, 71–74. [[CrossRef](#)]
18. Wilson, E.; Edstedt Bonamy, A.K.; Bonet, M.; Toome, L.; Rodrigues, C.; Howell, E.A.; Cuttini, M.; Zeitlin, J. EPICE Research Group. Room for improvement in breast milk feeding after very preterm birth in Europe: Results from the EPICE cohort. *Matern. Child Nutr.* **2017**, *14*. [[CrossRef](#)]
19. ESPGHAN Committee on Nutrition; Arslanoglu, S.; Corpeleijn, W.; Moro, G.; Braegger, C.; Campoy, C.; Colomb, V.; Decsi, T.; Domellöf, M.; Fewtrell, M.; et al. Donor human milk for preterm infants: Current evidence and research directions. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2013**, *57*, 535–542. [[CrossRef](#)]
20. Quigley, M.; Embleton, N.D.; McGuire, W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *20*, 6:CD002971. [[CrossRef](#)]
21. Parra-Llorca, A.; Gormaz, M.; Alcántara, C.; Cernada, M.; Nuñez-Ramiro, A.; Vento, M.; Collado, M.C. Preterm gut microbiome depending on feeding type: Significance of donor human milk. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Baro, C.; Giribaldi, M.; Arslanoglu, S.; Giuffrida, M.G.; Dellavalle, G.; Conti, A.; Tonetto, P.; Biasini, A.; Coscia, A.; Fabris, C.; et al. Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Front. Biosci.* **2001**, *3*, 818–829. [[CrossRef](#)]
23. Sousa, S.G.; Santos, M.D.; Fidalgo, L.G.; Delgado, I.; Saraiva, J.A. Effect of thermal pasteurization and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. *Food Chem.* **2014**, *151*, 79–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Espinosa-Martos, I.; Montilla, A.; de Segura, A.G.; Escuder, D.; Bustos, G.; Pallás, C.; Rodríguez, J.M.; Corzo, N.; Fernández, L. Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after Holder pasteurization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2013**, *56*, 560–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Untalan, P.B.; Keeney, S.E.; Palkowetz, K.H.; Rivera, A.; Goldman, A.S. Heat susceptibility of interleukin-10 and other cytokines in donor human milk. *Breastfeed Med.* **2009**, *4*, 137–144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Bertino, E.; Coppa, G.V.; Giuliani, F.; Coscia, A.; Gabrielli, O.; Sabatino, G.; Sgarrella, M.; Testa, T.; Zampini, L.; Fabris, C. Effects of Holder pasteurization on human milk oligosaccharides. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2008**, *21*, 381–385. [[CrossRef](#)]
27. Coscia, A.; Peila, C.; Bertino, E.; Coppa, G.V.; Moro, G.E.; Gabrielli, O.; Zampini, L.; Galeazzi, T.; Maccari, F.; Volpi, N. Effect of Holder pasteurization on human milk glycosaminoglycans. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2015**, *60*, 127–130. [[CrossRef](#)]
28. Garcia-Rodenas, C.L.; De Castro, C.A.; Jenni, R.; Thakkar, S.K.; Beauport, L.; Tolsa, J.F.; Fisher-Fumeaux, C.J.; Affolter, M. Temporal changes of major protein concentrations in preterm and term human milk. A prospective cohort study. *Clin. Nutr.* **2019**, *38*, 1844–1852. [[CrossRef](#)]
29. Lonnerdal, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 1537S–1543S. [[CrossRef](#)]
30. Lonnerdal, B. Bioactive proteins in breast milk. *J. Paediatr. Child Health* **2013**, *49*, 1–7. [[CrossRef](#)]
31. Beck, K.L.; Weber, D.; Phinney, B.S.; Smilowitz, J.T.; Hinde, K.; Lonnerdal, B.; Korf, I.; Lemay, D.G. Comparative proteomics of human and macaque milk reveals species-specific nutrition during postnatal development. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 2143–2157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Prentice, A. Constituents of human milk. *Food Nutr. Bull.* **1996**, *17*, 305–312. [[CrossRef](#)]
33. Mimouni, F.B.; Lubetzky, R.; Yochpaz, S.; Mandel, D. Preterm Human Milk Macronutrient and Energy Composition: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Perinatol.* **2017**, *44*, 165–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Goenka, A.; Kollmann, T.R. Development of immunity in early life. *J. Infect.* **2015**, *71*, S112–S120. [[CrossRef](#)]
35. Kollmann, T.R.; Levy, O.; Montgomery, R.R.; Goriely, S. Innate immune function by Toll-like receptors: Distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity* **2012**, *37*, 771–783. [[CrossRef](#)]
36. Nathan, C.; Shiloh, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8841–8848. [[CrossRef](#)]
37. Sordillo, L.M.; Aitken, S.L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2009**, *128*, 104–109. [[CrossRef](#)]
38. Saugstad, O.D.; Oei, J.L.; Lakshminrusimha, S.; Vento, M. Oxygen therapy of the newborn from molecular understanding to clinical practice. *Pediatr. Res.* **2019**, *85*, 20–29. [[CrossRef](#)]
39. Rönnau, C.; Liebermann, H.E.; Helbig, F.; Staudt, A.; Felix, S.B.; Ewert, R.; Landsberger, M. The bio-complex "reaction pattern in vertebrate cells" reduces cytokine-induced cellular adhesion molecule mRNA expression in human endothelial cells by attenuation of NF-kappaB translocation. *BMB Rep.* **2009**, *42*, 106–112. [[CrossRef](#)]
40. Schwab, M.; Reynders, V.; Loitsch, S.; Steinhilber, D.; Stein, J.; Schröder, O. Involvement of different nuclear hormone receptors in butyrate-mediated inhibition of inducible NF kappa B signalling. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 3625–3632. [[CrossRef](#)]
41. Guan, Y.; Breyer, M.D. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int.* **2001**, *60*, 14–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Besson, V.C.; Chen, X.R.; Plotkine, M.; Marchand-Verrecchia, C. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, exerts neuroprotective effects in traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.* **2005**, *388*, 7–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Poynter, M.E.; Daynes, R.A. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32833–32841. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Chiueh, C.C. Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *890*, 301–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Fatehi-Hassanabad, Z.; Chan, C.B.; Furman, B.L. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *636*, 8–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Horton, J.W. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: The role of antioxidant therapy. *Toxicology* **2003**, *189*, 75–88. [[CrossRef](#)]
47. Aceti, A.; Beghetti, I.; Martini, S.; Faldella, G.; Corvaglia, L. Oxidative Stress and Necrotizing Enterocolitis: Pathogenetic Mechanisms, Opportunities for Intervention, and Role of Human Milk. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2018**, *2*, 7397659. [[CrossRef](#)]

48. Holmdahl, R.; Sareila, O.; Olsson, L.M.; Bäckdahl, L.; Wing, K. Ncf1 polymorphism reveals oxidative regulation of autoimmune chronic inflammation. *Immunol. Rev.* **2016**, *269*, 228–247. [[CrossRef](#)]
49. Rao, M.; Wong, C.; Kanetsky, P.; Girdt, M.; Stenvinkel, P.; Reilly, M.; Raj, D.S. Cytokine gene polymorphism and progression of renal and cardiovascular diseases. *Kidney Int.* **2007**, *72*, 549–556. [[CrossRef](#)]
50. Mino, T.; Takeuchi, O. Post-transcriptional regulation of cytokine mRNA controls the initiation and resolution of inflammation. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **2013**, *29*, 49–60. [[CrossRef](#)]
51. Prahalad, S.; Glass, D.N. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr. Rheumatol. Online J.* **2008**, *6*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Hojo, Y.; Shimada, K. Role of cytokines in acute coronary syndrome. *Nihon Rinsho.* **1998**, *56*, 2500–2503. [[PubMed](#)]
53. Lloyd, R.E.; Foster, P.G.; Guille, M.; Littlewood, D.T. Next generation sequencing and comparative analyses of *Xenopus* mitogenomes. *BMC Genom.* **2012**, *13*, 496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**"Aprendí que el coraje no era la ausencia de miedo, sino el triunfo sobre él. El valiente no es el que no siente miedo, sino el que vence ese temor"**

Nelson Mandela.

## **VII. DISCUSIÓN**

## VII. DISCUSIÓN.

El periodo neonatal es un periodo de vida excepcionalmente vulnerable, especialmente para los RNPT. La prematuridad tiene una incidencia aproximada del 11%, y elevada morbimortalidad (16) por lo que en los últimos años, las investigaciones para mejorar sus cuidados están en auge.

La **prematuridad** está causada por diferentes motivos. Se han descrito factores sociales, culturales y biológicos relacionados con la misma. Entre ellos destacan, baja talla de la madre, bajo peso materno anterior al embarazo, parto antes de los 18 o después de los 35 años, hábito de fumar, uso de alcohol y drogas, escasa educación materna (con cierta frecuencia no completan los estudios primarios).

Otros aspectos, son los antecedentes maternos en su salud y los trastornos en el embarazo actual, ya que ambas pueden aumentar la prematuridad. Una de las causas más importante es haber tenido un parto prematuro previo, ya que aumenta un 50 % la posibilidad de otro parto prematuro. Otros son abortos espontáneos durante el segundo trimestre, la incompetencia cervical, y el tiempo que ha pasado desde el embarazo previo (intervalo inter genésico) menor de 9 meses. Lo más apropiado, es que los embarazos no se reiteren hasta los 18 meses. Otros trastornos que aumentan en forma significativa la prematuridad son el embarazo múltiple, la placenta previa, el desprendimiento de placenta, la rotura prematura de membranas con amnionitis, y la infección urinaria reiterada (148). El motivo de la prematuridad, otras veces es por una activación de mecanismos inflamatorios intrauterinos, debidos a determinadas bacterias que colonizan las membranas y el líquido amniótico, e incluso son deglutidas.

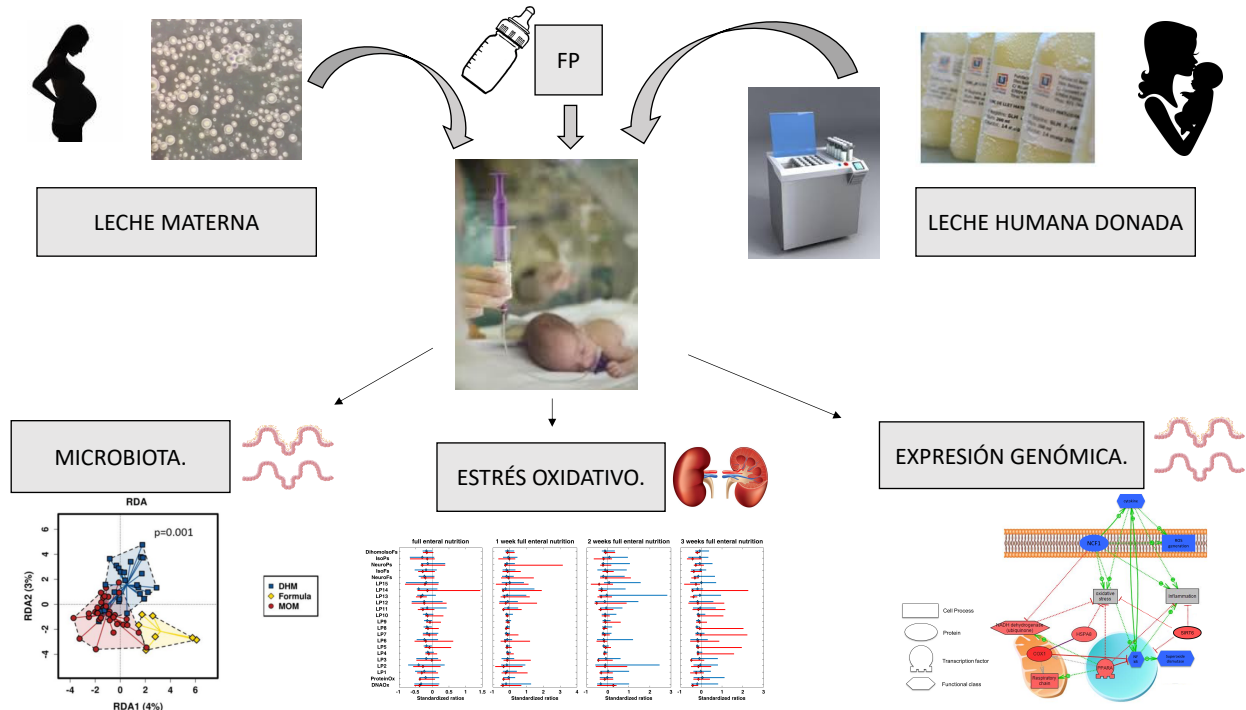
La mejor alimentación para los recién nacidos prematuros es la leche materna propia, por sus efectos beneficiosos para la salud, la inducción de una microbiota intestinal madura y estable (19), su poder antioxidante (88) y producción de cambios transcriptómicos que podrían contribuir a la regulación de la respuesta inflamatoria en el intestino durante el

período perinatal, que se caracteriza por la inmadurez del sistema inmunológico y un fenotipo proinflamatorio (94).

Cuando la LM no está disponible o es insuficiente, la LHD se ha convertido en la alternativa preferida para la nutrición de los recién nacidos prematuros prematuros  $\leq 32$  semanas de edad gestacional,  $\leq 1.500$  gramos, porque confiere ventajas clínicas sobre la alimentación con FP, como la reducción de la incidencia de NEC (73) y mejor tolerancia enteral, comparada con la FP (74). La alimentación con leche de FP sigue siendo la última opción, cuando las otras no están disponibles.

En esta Tesis Doctoral titulada cómo **“INFLUENCIAS DEL PROCESAMIENTO DE LA LECHE MATERNA DE DONANTE SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL, LA EXPRESIÓN GENÓMICA Y EL EQUILIBRIO OXIDATIVO EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO MENORES DE 32 SEMANAS DE EDAD GESTACIONAL”**, hemos estudiado los efectos de la pasteurización de la leche materna y su impacto en tres aspectos fundamentales (Figura 6) : microbiota inducida por la LHD comparada con la LM y la LF (Capítulo 1); niveles de estrés oxidativo en orina de prematuros alimentados con LM vs LHD (Capítulo 2) y expresión genómica en CIEE de prematuros alimentados con LM vs LHD (Capítulo 3).





**Figura 6:** Alimentación de prematuros  $\leq 32$  semanas de EG,  $\leq 1.500$  gramos, con LM , LHD Y FP. Efectos sobre la microbiota intestinal, el estrés oxidativo en orina y la expresión genómica en CIEE.

A lo largo de los tres artículos, observamos cómo, a pesar de la pasteurización, la LHD induce una microbiota intestinal similar a aquella presente en los prematuros alimentados con LM, en comparación a aquellos alimentados con FP. En orina, observamos niveles de estrés oxidativo similares, entre aquellos prematuros alimentados con LM y LHD, por lo que mantiene la misma protección antioxidante. Sin embargo, a nivel local, en células intestinales epiteliales exfoliadas, se observa que la LM produce una sobreexpresión de vías antiinflamatorias y de reducción de estrés oxidativo, no presente en aquellos prematuros alimentados con LHD.

## **Microbiota**

Los primeros 1.000 días de vida se consideran un período esencial debido a las altas necesidades de energía y nutrientes asociadas con el rápido crecimiento y desarrollo observado durante los períodos prenatal y postnatal (149). Este es también un período crítico en el desarrollo metabólico, inmunológico, cognitivo y educativo. Una colonización microbiana adecuada durante este periodo es fundamental para la maduración apropiada del sistema inmune, el metabolismo así como el desarrollo del sistema nervioso central, favoreciendo la maduración de funciones cognitivas y sensoriales, como la visión. Las alteraciones de la microbiota pueden tener consecuencias importantes para la salud.

Nuestros resultados han demostrado que el tipo de alimentación recibida en los recién nacidos prematuros  $\leq 1.500$  gramos /  $\leq 32$  semanas de edad gestacional, tiene un impacto importante en la composición microbiana intestinal de los mismos. Así, descubrimos que los perfiles microbianos inducidos por LM vs LHD eran diferentes, tal y cómo se observa en la figura 1 del artículo “Preterm Gut Microbiome Depending on Feeding Type: Significance of Donor Human Milk” (146).

Los prematuros alimentados con LM mostraron, en su microbiota intestinal, una presencia significativamente mayor y más enriquecida de Bifidobacteriaceae y menor de Staphylococcaceae, Clostridiaceae y Pasteurellaceae en comparación con bebés alimentados con LHD.

A nivel de género, se observaron niveles más altos de *Bifidobacterium* y Enterobacteriaceae sin clasificar y menores niveles de Clostridiaceae sin clasificar en muestras fecales del grupo LM en comparación con el grupo alimentado con LHD.

En estudios previos, se observó que los recién nacidos prematuros que recibieron LM, tuvieron una mayor abundancia de Clostridiales, Lactobacillales y Bacillales en comparación con los grupos de LHD y FP (150).

En ambos grupos se observó mayor abundancia de Enterobacteriales. Ajustando por género, edad de gestación y peso al nacimiento, se pudo comprobar que la diversidad de la microbiota intestinal aumentó con la edad postnatal y fue siempre mayor en los lactantes alimentados con LM en comparación con los lactantes alimentados con otros tipos de alimentación.

Finalmente, en aquellos alimentados con FP el perfil microbiano fue distinto de los observados en LM y LHD, lo que sugiere que ésta última, favorece un microbioma intestinal más similar a aquel inducido por LM, a pesar de las diferencias entre las características de ambas leches.

Los perfiles de KEGG en LHD y LM que encontramos en nuestros estudios, indicaban que eran más similares entre ambos, que aquellos observados en los prematuros alimentados con FP. El perfil funcional de los prematuros alimentados con LM está representado principalmente por el sistema de secreción bacteriana, la biosíntesis de lipopolisacáridos (LPS) y proteínas, y se relacionarían principalmente con la presencia de bacterias Gram negativas. Curiosamente, observamos una reducción significativa en la biosíntesis de LPS y proteínas en prematuros alimentados con FP en comparación con aquellos alimentados con LM o LHD (sin diferencia entre ellos). Estos datos sugerirían el posible vínculo entre LPS y la respuesta inmune, de acuerdo a la publicación de Cullen y colaboradores (151).

En nuestro contexto, LM y LHD modulan la microbiota intestinal en recién nacidos prematuros provocando un enriquecimiento de *Bifidobacterium spp.* y *Bacteroides spp.* que podría promover la señalización específica de LPS y su contribución al sistema inmune. El grupo de FP, presentó una reducción significativa en comparación con los grupos que recibieron LM o LHD en las funciones derivadas de la presencia de oligosacáridos e involucradas en el metabolismo complejo de carbohidratos (por ejemplo, la biosíntesis de glucano).

Estas diferencias podrían explicarse por la abundancia de bacterias metabolizadoras de oligosacáridos como *Bifidobacterium* y *Bacteroides spp.* en intestino de prematuros alimentados con LM y LHD en comparación con el grupo alimentado con FP. Los oligosacáridos actúan como antimicrobianos anti-adhesivos y moléculas de señalización que interfieren con los receptores de unión a patógenos, virus y toxinas; modulando también indirectamente la respuesta inmune, de ahí la gran ventaja que ofrece el uso de LM y LHD en las UCI neonatales donde el riesgo de infección es muy elevado (127).

En el metagenoma de los prematuros alimentados con FP, observamos el enriquecimiento de las funciones KEGG relacionadas con el metabolismo del azúcar como el metabolismo de la galactosa, que está involucrado en la conversión de galactosa en glucosa. Esto podría surgir del consumo de FP y / o productos lácteos. También están enriquecidas en este grupo las funciones KEGG relacionadas con el metabolismo de amino azúcares y nucleótidos (152).

En general, se observaron menores diferencias en los perfiles funcionales entre aquellos prematuros alimentados con LM y LHD, lo que sugiere el efecto potencial de la LHD al imitar la funcionalidad del microbioma inducido por la alimentación con leche materna. Estos resultados son prometedores y abrirían nuevas posibilidades en futuras investigaciones que deberían llevarse a cabo.

Sin embargo, observamos dos factores importantes que podrían influir en las diferencias encontradas en la microbiota intestinal de los prematuros alimentados con LM o con LHD. El primer factor estaría relacionado con el momento de la extracción de la leche en relación con la edad gestacional y la etapa de lactancia. Mientras que la LM es el producto biológico de una gestación interrumpida de forma prematura, la LHD procede principalmente de madres que dieron a luz neonatos a término, e iniciaron la donación como mínimo 3 meses tras el parto. Se trata, por tanto, de una leche madura, con un cambio en su composición respecto a la leche de madre con parto prematuro. Aunque la leche materna es muy variable entre los individuos, se descubrió que la edad postnatal y la etapa gestacional (pretérmino versus término) son predictores importantes de la composición de la leche materna (153). Así, el calostro presenta más proteínas, grasa y lactosa tanto en leche prematura como en la leche a término, comparado con la leche madura. A medida que la leche va madurando, con el paso del tiempo se produce una reducción de la diversidad de proteínas.

El segundo factor estaría relacionado con el procedimiento de pasteurización que inevitablemente altera los componentes termolábiles, algunos de los cuales son esenciales. El tratamiento térmico utilizado por la mayoría de Bancos de Leche para inactivar agente virales y bacterianos es el método Holder (62.5°C durante 30 minutos). Ésta pasteurización causa la pérdida de algunas propiedades funcionales, biológicas y estructurales de la LM, favoreciendo la destrucción bacteriana. Otros componentes se ven disminuidos (Inmunoglobulinas, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, etc. Sin embargo, otros componentes no se alteran (HMO, algunas vitaminas, ácidos grasos, etc) (3,127).

Por lo tanto, las diferencias encontradas en la microbiota fecal de los prematuros alimentados con LM vs LHD, se explicarían, al menos parcialmente, por la diferente composición del nutriente recibido y sus compuestos bioactivos como los marcadores inmunes, la microbiota, los oligosacáridos, los factores neurotróficos y de crecimiento, entre otros (120–122,127,128,154,155).

### ***Estrés oxidativo***

Un segundo aspecto estudiado en nuestros artículos son los niveles de estrés oxidativo en orina de prematuros  $\leq 32$  semanas de EG y  $\leq 1.500$  g, alimentados con LM vs LHD (145). Como se ha mencionado anteriormente, los bebés prematuros tienen un sistema de defensa antioxidante inmaduro y los ROS se han relacionado con el desarrollo de patologías relevantes, como displasia broncopulmonar, retinopatía del prematuro, hemorragia intraventricular y periventricular o ECN, entre otros (9).

Sabemos que la LM contiene una amplia gama de antioxidantes con efectos positivos sobre las condiciones asociadas al estrés oxidativo. En un metaanálisis reciente (9), se demostró que una dieta exclusiva de leche humana reduce el riesgo de displasia broncopulmonar, en comparación con una dieta con FP y / o fortificante a base de leche bovina (RR 0,80, IC 95% 0,68– 0,95).

Un estudio previo demuestra que los prematuros alimentados con LM presentaron niveles más bajos de metabolitos en orina derivados del daño por hidroxilo a las proteínas y al ADN comparados con los niveles de aquellos alimentados con FP (88) pero se desconoce el potencial de la LHD para proteger contra el estrés oxidativo y sus patologías relacionadas. La evaluación in vivo del daño oxidativo puede llevarse a cabo mediante la detección de biomarcadores específicos en fluidos biológicos que reflejen el daño a proteínas, ADN o lípidos (9).

Los recién nacidos prematuros incluidos en este estudio presentaban buenas condiciones generales y se encontró que algunos de los biomarcadores medidos estaban por debajo del LOQ en las muestras de orina recogidas. Por ejemplo, los biomarcadores de acción de mieloperoxidasa (3-Cl-Tyr / p-Tyr y 3-NO<sub>2</sub>-Tyr / p-Tyr) no se detectaron en este estudio, lo que indica un bajo estado proinflamatorio en esta población de recién nacidos prematuros.

Este hallazgo concuerda con estudios previos donde se observaron bajos niveles de m-Tyr, 3-Cl-Tyr y 3-NO<sub>2</sub>-Tyr en muestras de orina de prematuros (156).

En nuestro estudio, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en un total de 22 biomarcadores, presentes en niveles cuantificables, en muestras de prematuros alimentados con LM vs LHD, en diferentes puntos temporales que abarcan desde el logro de la nutrición enteral completa (180 ml/kg/día) hasta el alta hospitalaria (ver Figura 2 del artículo “Does Pasteurized Donor Human Milk Efficiently Protect Preterm Infants Against Oxidative Stress?” (145).

Los resultados presentados en nuestro estudio respaldan, que a pesar del efecto perjudicial conocido de la pasteurización en algunos de los componentes antioxidantes de la LM, los recién nacidos que reciben LHD se encuentran igualmente protegidos contra el daño asociado a los radicales libres, que los recién nacidos alimentados con LM.

Nuestro estudio muestra que algunos niveles de biomarcadores de daño oxidativo, varían en función del tiempo (Figura 3 del artículo “Does Pasteurized Donor Human Milk Efficiently Protect Preterm Infants Against Oxidative Stress?” (145).

) y quizás otros factores, cómo el mecanismo subyacente, necesitarían ser estudiados.

El análisis de muestras de orina no invasivas permitió estudiar a recién nacidos prematuros y permitió observaciones longitudinales sin realizar procedimientos invasivos dolorosos, repetidos. Sin embargo, algunos de los biomarcadores no pudieron cuantificarse a pesar de que se emplearon procedimientos analíticos altamente sensibles. Otra deficiencia es la falta de información y de análisis de la capacidad antioxidante de la LM empleada en este estudio, pre y post-pasteurización, así como los niveles de compuestos de LM que son de conocida importancia para la protección contra el estrés oxidativo.

## **Expresión Genómica**

Para el estudio del perfil de expresión genómica en CIEE (147), empleamos un método de técnicas no invasivas previamente validado por nuestro grupo (157) y analizamos el perfil transcripcional intestinal en prematuros alimentados con LM vs LHD. Esta novedosa metodología vanguardista, consiste en aislar CIEE en heces de recién nacidos, en nuestro caso, prematuros, para estudiar la microbiota, así como poder establecer relaciones entre bacterias y la expresión de ciertos genes humanos, en función de la acción directa de los componentes de la leche materna sobre el epitelio intestinal.

En el análisis de componentes principales se observa un porcentaje de variabilidad del 12% entre ambos grupos. Se observaron 1.600 genes diferencialmente expresados entre los prematuros alimentados con LM, vs aquellos alimentados con LHD, en un panel global de más de 20,000 genes.

Los genes candidatos en los que el análisis de expresión génica de CIEE mostraron cambios significativos fueron: alfa-lactalbúmina (*LALBA*), caseínas kappa (*CSN3*), beta (*CSN2*) y alfa (*CSN1S1*), subunidad I de citocromo c oxidasa (*COX1*), y Factor citosólico de neutrófilos 1 (*NCF1*).

Las diferencias en la microbiota intestinal inducidas por una dieta diferente (101) podrían ser un factor mediador potencial para inducir los cambios en el perfil de expresión génica.

En nuestro estudio, por una parte, observamos diferente expresión en genes que sintetizan proteínas. Las proteínas actúan como moléculas biológicamente activas para ayudar en la digestión y absorción de nutrientes, confieren protección contra los patógenos y modulan la maduración inmune y la respuesta inmune (158–160).

El proteoma de la LM es complejo e incluye 2.500 proteínas diferentes identificadas (161). Tiene una importante función durante la lactancia, incluida la entrega de nutrientes y su mejor biodisponibilidad para el crecimiento, el desarrollo cognitivo, la defensa inmune y la maduración intestinal (162). La alfa-lactoalbúmina, la lactoferrina, la albúmina sérica y las caseínas se encuentran entre las proteínas más abundantes y representan aproximadamente el 85% del contenido proteico total de LM (163).

Nuestros resultados revelaron la sobreexpresión de genes de diferentes tipos de caseínas y lactoalbúmina en recién nacidos prematuros alimentados con LM. Estos cambios son consistentes con el mayor contenido de proteínas de la leche obtenida de madres de

prematuros en comparación con las madres de niño a término que donan leche madura, a partir de los 3 meses del parto y donan leche madura al banco (164).

Tal y cómo hemos mencionado anteriormente, los prematuros tienen un sistema de defensa antioxidante inmaduro. Los tratamientos que se les aplican generan altos niveles de estrés oxidativo y radicales libres.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden ser beneficiosas porque son utilizadas por las células inmunes, especialmente monocitos y macrófagos, para frente a los patógenos (165). El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad de reducción del sistema de defensa antioxidante del organismo a favor del primero (2). La presencia de ROS desencadena la expresión de genes proinflamatorios a través de la activación del factor de transcripción NFκB (166) (86). Tanto ROS, como citocinas y genes específicos, como *NCF1*, promueven la translocación de *NFκB* al núcleo, donde se une a genes diana específicos (ARE = Antioxidant responsive elements) favoreciendo la expresión de genes que juegan un papel central en las respuestas inflamatorias (167) e inmunes (168) y la secreción de citocinas por numerosos tipos de células (169–171).

Como mostramos en la Figura 4 del artículo “Impact of Donor Human Milk in the Preterm Very Low Birth Weight Gut Transcriptome Profile by Use of Exfoliated Intestinal Cells” (147), en los recién nacidos prematuros alimentados con LM, la expresión de *NCF1* está regulada de forma negativa y, al mismo tiempo, *COX1* regulada de forma positiva. Estos cambios podrían explicar por qué la LM fresca tiene mayores propiedades antiinflamatorias y antioxidantes que la leche pasteurizada (172). La proteína codificada por este gen *NCF1* es una subunidad citosólica de la NADPH oxidasa de neutrófilos (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa). Es un complejo enzimático unido a la membrana que se enfrenta al espacio extracelular. Se puede encontrar en la membrana plasmática, así como en las membranas de los fagosomas utilizados por los glóbulos blancos de neutrófilos para ingerir microorganismos. Esta oxidasa es una enzima que se activa para producir anión superóxido y, posteriormente, estrés oxidativo (173). La regulación negativa de *NCF1* reduce también la producción de citocinas, por lo tanto, desempeña un papel esencial en la modulación de la autoinmunidad, los procesos



inmunológicos, la inflamación, las respuestas proliferativas y la apoptosis (152,174,175). Por otra parte, en la figura 4 observamos la sobreexpresión del gen *COX 1* en aquellos prematuros alimentados con LM, comparados con aquellos alimentados con LHD. El gen *COX1* regula el flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones mitocondriales y la formación de H<sub>2</sub>O, reduciendo así la generación de radicales libres y, secundariamente, la activación de las vías proinflamatorias (174). Además, *COX1*, a través de la interacción con la proteína chaperona HSPA8, también juega un papel importante en condiciones prooxidantes, como la hipoxia-reoxigenación mediante la inactivación de *NFκB* y las vías pro-apoptóticas (176,177).

Además, el receptor alfa activado por proliferador de peroxisomas (*PPAR-α*) también inhibe la *NFκB*, pero no la proteína quinasa activada por el estrés (176,178).

Por tanto, en el análisis transcriptómico en CIEE de recién nacidos prematuros, se visualiza un cambio en la expresión genómica, entre aquellos alimentados con LM de su propia madre, con un recién nacido prematuro, comparando con aquellos que reciben leche madura y pasteurizada.

Estos resultados se obtuvieron en muestras fecales y, por lo tanto, reflejaron cambios locales ubicados en el intestino de los recién nacidos prematuros. Los metabolitos derivados de la digestión de LM y LHD podrían ejercer un estímulo específico sobre las CIEE que provocan una respuesta transcriptómica diferente.

Una limitación del estudio actual es el pequeño tamaño de la muestra. Dada la política de promover el uso de LM en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN), el acceso a una población de estudio alimentada exclusivamente con LHD durante varias semanas es muy difícil, ya que ésta generalmente se proporciona solo para completar los requisitos de alimentación enteral, hasta que haya suficiente LM disponible, para satisfacer la demanda del prematuro.

Nuestros resultados demuestran que, independientemente de la pasteurización, la LHD proporcionada por un banco de leche, es una buena alternativa cuando la LM no está disponible, ya que protege a los recién nacidos prematuros contra el estrés oxidativo de manera similar a la LM e induce una microbiota intestinal similar entre ambos. Esto subraya la importancia de promover los bancos de leche humana que proporcionan LHD para la nutrición en prematuros y otras patologías (cardiopatías, cirugías intestinales, encefalopatías hipóxico-isquémicas, etc...) en situaciones donde la LM no está disponible, o el volumen es insuficiente. Sin embargo, si se observan modificaciones a nivel local, produciendo un cambio en la expresión transcriptómica en las CIEE, por lo que se ha de seguir investigando en nuevas técnicas de pasteurización que produzcan menos pérdida en funciones como una respuesta antiinflamatoria y de reducción de estrés oxidativo.

**“Los momentos finales de una experiencia determinan el recuerdo que  
conservaremos de la misma”**

Daniel Kahneman.

## **VIII.CONCLUSIONES**

## VIII. CONCLUSIONS

1. Donor human milk favors the development of a gut microbiome that resembles the microbiome acquired by infants nourished by their own mother's milk more than microbiome in formula fed infants. Nonetheless, preterm infants nourished donor human milk, have a distinct microbial profile but shortage in the microbial diversity and richness present in the gut microbiome of infants fed with owns mother milk.
2. Despite these differences, donor human milk confers beneficial potential effects upon intestinal functionality, immune system and metabolic activities.
3. Preterm infants nourished with donor human milk have similar antioxidant capacity as preterm fed own mother's milk as reflected in the level of urinary biomarkers of oxidative damage to proteins, DNA or lipids.
4. The variability in terms of transcriptomic expression in exfoliated intestinal cells was 12.1% between own mother's milk and donor human milk. Nevertheless, 1629 genes were differentially expressed between both groups.
5. The candidate genes with different expression between preterm nourished with own mother's milk and donor human milk were Lactalbumin alpha (*LALBA*), Casein kappa (*CSN3*), Casein beta (*CSN2*), Casein alpha-1 (*CSN1S1*), Cytochrome C oxidase subunit 1 (*COX1*), Neutrophil cytosolic factor 1 (*NCF1*).
6. The biological analysis of these genes indicates that donor human milk possesses a lower anti-inflammatory potential than its own mother's milk. This is important in terms of its ability to protect against pathogens and the development of necrotizing enterocolitis.
7. Notwithstanding the differences, our studies show many data in favor of important advantages of donor human milk over formula milk. Conversely, new pasteurization methods that preserve the integrity of donor human milk should be developed.

**“Da siempre lo mejor de ti, y lo mejor vendrá”**

Madre Teresa de Calcuta.

## **IX. PERSPECTIVAS FUTURAS**

## **IX. PERSPECTIVAS FUTURAS.**

- Realizar un nuevo estudio con la misma población (prematuros  $\leq 32$  semanas de edad gestacional,  $\leq 1.500$  gramos, con el nuevo modelo de pasteurización HTST (Colaboración con el Hospital 12 de Octubre de Madrid) para comparar los resultados.
  
- Buscar marcadores predictores de enterocolitis necrotizante y sepsis tardía en prematuros  $\leq 32$  semanas,  $\leq 1.500$  gramos, mediante el estudio de microbiota intestinal, ácidos orgánicos volátiles y cambios en expresión de genes (vías de cascada inflamatoria, estrés oxidativo).
  
- Comprobar si con el uso de fortificantes humanos la microbiota intestinal inducida por la LHD sería más parecida a la inducida por la LM, manteniendo el mismo poder antioxidante y favoreciendo la sobreexpresión de genes antiinflamatorios.



**“El hombre nunca sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta”**

Charles Dickens.

## **X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Collado MC, Cernada M, B  uerl C, Vento M, Pérez-Martínez G. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes*. agosto de 2012;3(4):352-65.
2. Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sánchez-Illana A, Nuñez-Ramiro A, Kuligowski J, Ch  fer-Peric  s C, et al. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol*. 2017;12:674-81.
3. Peila C, Moro GE, Bertino E, Cavallarin L, Giribaldi M, Giuliani F, et al. The Effect of Holder Pasteurization on Nutrients and Biologically-Active Components in Donor Human Milk: A Review. *Nutrients*. 2 de agosto de 2016;8(8).
4. Harrison MS, Goldenberg RL. Global burden of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med*. abril de 2016;21(2):74-9.
5. European Perinatal Health Report 2010 - Euro-Peristat [Internet]. [citado 13 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://www.europeristat.com/reports/european-perinatal-health-report-2010.html>
6. Rutayisire E, Huang K, Liu Y, Tao F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol*. 30 de julio de 2016;16(1):86.
7. Korpela K, de Vos WM. Early life colonization of the human gut: microbes matter everywhere. *Curr Opin Microbiol*. 2018;44:70-8.
8. Collado MC, Cernada M, Neu J, Pérez-Martínez G, Gormaz M, Vento M. Factors influencing gastrointestinal tract and microbiota immune interaction in preterm infants. *Pediatr Res*. junio de 2015;77(6):726-31.
9. Vento M, Hummler H, Dawson J, MSci PhD, Kuligowski J. Use of Oxygen in the Resuscitation of Neonates. En 2014. p. 213-43.
10. Ciccoli L, Rossi V, Leoncini S, Signorini C, Paffetti P, Bracci R, et al. Iron release in erythrocytes and plasma non protein-bound iron in hypoxic and non hypoxic newborns. *Free Radic Res*. enero de 2003;37(1):51-8.
11. Chapkin RS, Zhao C, Ivanov I, Davidson LA, Goldsby JS, Lupton JR, et al. Noninvasive stool-based detection of infant gastrointestinal development using gene expression profiles from exfoliated epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. mayo de 2010;298(5):G582-589.
12. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller A-B, Narwal R, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet Lond Engl*. 9 de junio de 2012;379(9832):2162-72.
13. Yismaw AE, Gelagay AA, Sisay MM. Survival and predictors among preterm neonates admitted at University of Gondar comprehensive specialized hospital neonatal intensive care unit, Northwest Ethiopia. *Ital J Pediatr*. 7 de enero de 2019;45(1):4.
14. Glass HC, Costarino AT, Stayer SA, Brett CM, Cladis F, Davis PJ. Outcomes for extremely premature infants. *Anesth Analg*. junio de 2015;120(6):1337-51.
15. Liu L, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet*. 31 de enero de 2015;385(9966):430-40.
16. Lehtonen L, Gimeno A, Parra-Llorca A, Vento M. Early neonatal death: A challenge worldwide. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2017;22(3):153-60.
17. Manuck TA, Rice MM, Bailit JL, Grobman WA, Reddy UM, Wapner RJ, et al. Preterm neonatal morbidity and mortality by gestational age: a contemporary cohort. *Am J Obstet Gynecol*.

2016;215(1):103.e1-103.e14.

18. Montes EM. Microbioma, microbiota y cáncer. 2018;2.
19. LaTuga M, Stuebe A, Seed P. A Review of the Source and Function of Microbiota in Breast Milk. *Semin Reprod Med.* 3 de enero de 2014;32(01):068-73.
20. Selma-Royo M, Tarrazó M, García-Mantrana I, Gómez-Gallego C, Salminen S, Collado MC. Shaping Microbiota During the First 1000 Days of Life. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1125:3-24.
21. Finn S, Culligan EP, Snelling WJ, Sleator RD. Early life nutrition. *Sci Prog.* 1 de octubre de 2018;101(4):332-59.
22. Hoffman DJ, Reynolds RM, Hardy DB. Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. *Nutr Rev.* 1 de diciembre de 2017;75(12):951-70.
23. Molina Giraldo S, Correa Mendoza DM, Rojas Arias JL, Acuña Osorio E. Orígenes fetales de la patología del adulto: la restricción del crecimiento intrauterino como factor de riesgo. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2014;79(6):546-53.
24. Agosti M, Tandoi F, Morlacchi L, Bossi A. Nutritional and metabolic programming during the first thousand days of life. *Pediatr Medica E Chir Med Surg Pediatr.* 28 de junio de 2017;39(2):157.
25. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe.* 10 de junio de 2015;17(6):852.
26. Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, Aguilera M, Muñoz-Quezada S, Bermudez-Brito M, Peso-Echarri P, et al. Three main factors define changes in fecal microbiota associated with feeding modality in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* octubre de 2013;57(4):461-6.
27. Langdon A, Crook N, Dantas G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med.* 13 de abril de 2016;8(1):39.
28. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut.* abril de 2014;63(4):559-66.
29. Vandenplas Y, Carnielli VP, Ksiazek J, Luna MS, Migacheva N, Mosselmans JM, et al. Factors affecting early-life intestinal microbiota development. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 2020;78:110812.
30. Kapourchali FR, Cresci GAM. Early-Life Gut Microbiome-The Importance of Maternal and Infant Factors in Its Establishment. *Nutr Clin Pract Off Publ Am Soc Parenter Enter Nutr.* junio de 2020;35(3):386-405.
31. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis.* 2015;26:26050.
32. Stinson LF, Payne MS, Keelan JA. A Critical Review of the Bacterial Baptism Hypothesis and the Impact of Cesarean Delivery on the Infant Microbiome. *Front Med.* 2018;5:135.
33. Shi Y-C, Guo H, Chen J, Sun G, Ren R-R, Guo M-Z, et al. Initial meconium microbiome in Chinese neonates delivered naturally or by cesarean section. *Sci Rep.* 19 de 2018;8(1):3255.
34. Azad MB, Konya T, Persaud RR, Guttman DS, Chari RS, Field CJ, et al. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* mayo de 2016;123(6):983-93.
35. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29 de junio de 2010;107(26):11971-5.
36. Arboleya S, Suárez M, Fernández N, Mantecón L, Solís G, Gueimonde M, et al. C-section

- and the Neonatal Gut Microbiome Acquisition: Consequences for Future Health. *Ann Nutr Metab.* 2018;73 Suppl 3:17-23.
37. Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Chari RS, et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can.* 19 de marzo de 2013;185(5):385-94.
  38. Rodriguez J, Jordan S, Mutic A, Thul T. The Neonatal Microbiome: Implications for Neonatal Intensive Care Unit Nurses. *MCN Am J Matern Child Nurs.* diciembre de 2017;42(6):332-7.
  39. Peelen MJ, Luef BM, Lamont RF, de Milliano I, Jensen JS, Limpens J, et al. The influence of the vaginal microbiota on preterm birth: A systematic review and recommendations for a minimum dataset for future research. *Placenta.* 2019;79:30-9.
  40. Ne Y, F A-P, D B, Pc S. Early-life Skin Microbiota in Hospitalized Preterm and Full-Term Infants [Internet]. Vol. 6, Microbiome. *Microbiome*; 2018 [citado 24 de junio de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29855335/>
  41. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* julio de 2007;5(7):e177.
  42. Mesa MD, Loureiro B, Iglesia I, Fernandez Gonzalez S, Llurba Olivé E, García Algar O, et al. The Evolving Microbiome from Pregnancy to Early Infancy: A Comprehensive Review. *Nutrients* [Internet]. 2 de enero de 2020 [citado 5 de mayo de 2020];12(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7019214/>
  43. Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, de Vos W, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PloS One.* 2013;8(6):e66986.
  44. Arboleya S, Binetti A, Salazar N, Fernández N, Solís G, Hernández-Barranco A, et al. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol.* marzo de 2012;79(3):763-72.
  45. Schwiertz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res.* septiembre de 2003;54(3):393-9.
  46. Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, de Vos W, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PloS One.* 2013;8(6):e66986.
  47. Korpela K, Blakstad EW, Moltu SJ, Strømmen K, Nakstad B, Rønnestad AE, et al. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Sci Rep.* 06 de 2018;8(1):2453.
  48. Neu J. Necrotizing enterocolitis. *World Rev Nutr Diet.* 2014;110:253-63.
  49. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Walsh MC, Carlo WA, Shankaran S, et al. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012. *Jama.* 2015;314(10):1039–1051.
  50. Terrin G, Stronati L, Cucchiara S, De Curtis M. Serum Markers of Necrotizing Enterocolitis: A Systematic Review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;65(6):e120-32.
  51. Denning N-L, Prince JM. Neonatal intestinal dysbiosis in necrotizing enterocolitis. *Mol Med* [Internet]. 15 de marzo de 2018 [citado 1 de julio de 2020];24. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6016883/>
  52. Torrazza RM, Neu J. The altered gut microbiome and necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol.* marzo de 2013;40(1):93-108.
  53. Patel RM, Denning PW. Intestinal microbiota and its relationship with necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* septiembre de 2015;78(3):232-8.
  54. Shane AL, Sánchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *Lancet Lond Engl.* 14 de octubre de 2017;390(10104):1770-80.

55. Haak BW, Wiersinga WJ. The role of the gut microbiota in sepsis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(2):135-43.
56. Ojima M, Motooka D, Shimizu K, Gotoh K, Shintani A, Yoshiya K, et al. Metagenomic Analysis Reveals Dynamic Changes of Whole Gut Microbiota in the Acute Phase of Intensive Care Unit Patients. *Dig Dis Sci.* 2016;61(6):1628-34.
57. Zaborin A, Smith D, Garfield K, Quensen J, Shakhsheer B, Kade M, et al. Membership and behavior of ultra-low-diversity pathogen communities present in the gut of humans during prolonged critical illness. *mBio.* 23 de septiembre de 2014;5(5):e01361-01314.
58. Maier E, Anderson RC, Roy NC. Understanding how commensal obligate anaerobic bacteria regulate immune functions in the large intestine. *Nutrients.* 24 de diciembre de 2014;7(1):45-73.
59. Haak BW, Prescott HC, Wiersinga WJ. Therapeutic Potential of the Gut Microbiota in the Prevention and Treatment of Sepsis. *Front Immunol.* 2018;9:2042.
60. Rendina DN, Lubach GR, Phillips GJ, Lyte M, Coe CL. Maternal and Breast Milk Influences on the Infant Gut Microbiome, Enteric Health and Growth Outcomes of Rhesus Monkeys. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2019;69(3):363-9.
61. SECTION ON BREASTFEEDING. Breastfeeding and the Use of Human Milk. *PEDIATRICS.* 1 de marzo de 2012;129(3):e827-41.
62. Pannaraj PS, Li F, Cerini C, Bender JM, Yang S, Rollie A, et al. Association Between Breast Milk Bacterial Communities and Establishment and Development of the Infant Gut Microbiome. *JAMA Pediatr.* 01 de 2017;171(7):647-54.
63. Underwood MA. Human milk for the premature infant. *Pediatr Clin North Am.* febrero de 2013;60(1):189-207.
64. Weltgesundheitsorganisation, editor. Global strategy for infant and young child feeding. Geneva: WHO; 2003. 30 p.
65. OMS | La lactancia materna elemento clave para reducir la mortalidad infantil [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado 5 de noviembre de 2020]. Disponible en: [https://www.who.int/mediacentre/news/notes/2010/breastfeeding\\_20100730/es/](https://www.who.int/mediacentre/news/notes/2010/breastfeeding_20100730/es/)
66. Stuebe A. There Is No Formula for Human Milk. *Breastfeed Med Off J Acad Breastfeed Med.* septiembre de 2020;15(9):602.
67. Pham Q, Patel P, Baban B, Yu J, Bhatia J. Factors Affecting the Composition of Expressed Fresh Human Milk. *Breastfeed Med Off J Acad Breastfeed Med.* septiembre de 2020;15(9):551-8.
68. Zivkovic AM, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 de marzo de 2011;108 Suppl 1:4653-8.
69. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta.* 6 de diciembre de 1999;1473(1):4-8.
70. Peterson R, Cheah WY, Grinyer J, Packer N. Glycoconjugates in human milk: protecting infants from disease. *Glycobiology.* diciembre de 2013;23(12):1425-38.
71. Schanler RJ. Suitability of human milk for the low-birthweight infant. *Clin Perinatol.* marzo de 1995;22(1):207-22.
72. Hylander MA, Strobino DM, Dhanireddy R. Human milk feedings and infection among very low birth weight infants. *Pediatrics.* septiembre de 1998;102(3):E38.
73. Quigley M, Embleton ND, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 19 de 2019;7:CD002971.
74. Brown JVE, Walsh V, McGuire W. Formula versus maternal breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 12 de 2019;8:CD002972.
75. Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. Probiotics and prebiotics in

- intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(10):605-16.
76. Gómez-Gallego C, García-Mantrana I, Martínez-Costa C, Salminen S, Isolauri E, Collado MC. The Microbiota and Malnutrition: Impact of Nutritional Status During Early Life. *Annu Rev Nutr*. 21 de 2019;39:267-90.
  77. Indrio F, Martini S, Francavilla R, Corvaglia L, Cristofori F, Mastroli SA, et al. Epigenetic Matters: The Link between Early Nutrition, Microbiome, and Long-term Health Development. *Front Pediatr*. 2017;5:178.
  78. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2017;81(4).
  79. Ho NT, Li F, Lee-Sarwar KA, Tun HM, Brown BP, Pannaraj PS, et al. Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations. *Nat Commun*. 09 de 2018;9(1):4169.
  80. Ximenez C, Torres J. Development of Microbiota in Infants and its Role in Maturation of Gut Mucosa and Immune System. *Arch Med Res*. 2017;48(8):666-80.
  81. Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, Li H, et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med*. 15 de 2016;8(343):343ra82.
  82. Saugstad OD, Oei J-L, Lakshminrusimha S, Vento M. Oxygen therapy of the newborn from molecular understanding to clinical practice. *Pediatr Res*. 2019;85(1):20-9.
  83. Vento M, Escobar J, Cernada M, Escrig R, Aguar M. The use and misuse of oxygen during the neonatal period. *Clin Perinatol*. marzo de 2012;39(1):165-76.
  84. Vento M, Saugstad OD. Targeting Oxygen in Term and Preterm Infants Starting at Birth. *Clin Perinatol*. 2019;46(3):459-73.
  85. Frank L, Sosenko IR. Prenatal development of lung antioxidant enzymes in four species. *J Pediatr*. enero de 1987;110(1):106-10.
  86. Vento M, Saugstad OD. Oxygen supplementation in the delivery room: updated information. *J Pediatr*. febrero de 2011;158(2 Suppl):e5-7.
  87. Păduraru L, Dimitriu DC, Avasiloaiei AL, Moscalu M, Zonda GI, Stamatin M. Total antioxidant status in fresh and stored human milk from mothers of term and preterm neonates. *Pediatr Neonatol*. 2018;59(6):600-5.
  88. Ledo A, Arduini A, Asensi MA, Sastre J, Escrig R, Brugada M, et al. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am J Clin Nutr*. enero de 2009;89(1):210-5.
  89. Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature*. 8 de agosto de 1970;227(5258):561-3.
  90. Gómez-Gallego C, García Romo M, Frías R, Periago MJ, Ros G, Salminen S, et al. Mice exposed to infant formula enriched with polyamines: impact on host transcriptome and microbiome. *Food Funct*. 19 de abril de 2017;8(4):1622-6.
  91. Donovan SM, Monaco MH, Drnevich J, Kvistgaard AS, Hernell O, Lönnerdal B. Bovine osteopontin modifies the intestinal transcriptome of formula-fed infant rhesus monkeys to be more similar to those that were breastfed. *J Nutr*. diciembre de 2014;144(12):1910-9.
  92. Li B, Wu RY, Horne RG, Ahmed A, Lee D, Robinson SC, et al. Human Milk Oligosaccharides Protect against Necrotizing Enterocolitis by Activating Intestinal Cell Differentiation. *Mol Nutr Food Res*. 14 de septiembre de 2020;e2000519.
  93. Blais M, Fortier M, Pouliot Y, Gauthier SF, Boutin Y, Asselin C, et al. Colostrum whey down-regulates the expression of early and late inflammatory response genes induced by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Typhimurium components in intestinal epithelial cells. *Br J Nutr*. 28 de enero de 2015;113(2):200-11.

94. Gimeno-Alcañiz JV, Collado MC. Impact of human milk on the transcriptomic response of fetal intestinal epithelial cells reveals expression changes of immune-related genes. *Food Funct.* 22 de enero de 2019;10(1):140-50.
95. Carlisle EM, Poroyko V, Caplan MS, Alverdy J, Morowitz MJ, Liu D. Murine gut microbiota and transcriptome are diet dependent. *Ann Surg.* febrero de 2013;257(2):287-94.
96. Elolimy AA, Washam C, Byrum S, Chen C, Dawson H, Bowlin AK, et al. Formula Diet Alters the Ileal Metagenome and Transcriptome at Weaning and during the Postweaning Period in a Porcine Model. *mSystems.* 4 de agosto de 2020;5(4).
97. Wilson E, Edstedt Bonamy A-K, Bonet M, Toome L, Rodrigues C, Howell EA, et al. Room for improvement in breast milk feeding after very preterm birth in Europe: Results from the EPICE cohort. *Matern Child Nutr.* 2018;14(1).
98. ESPGHAN Committee on Nutrition, Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, Braegger C, Campoy C, et al. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013;57:535-42.
99. Altobelli E, Angeletti PM, Verrotti A, Petrocelli R. The Impact of Human Milk on Necrotizing Enterocolitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 6 de mayo de 2020;12(5).
100. Narayanan I, Prakash K, Murthy NS, Gujral VV. Randomised controlled trial of effect of raw and holder pasteurised human milk and of formula supplements on incidence of neonatal infection. *Lancet Lond Engl.* 17 de noviembre de 1984;2(8412):1111-3.
101. Boyd CA, Quigley MA, Brocklehurst P. Donor breast milk versus infant formula for preterm infants: systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* mayo de 2007;92(3):F169-175.
102. Villamor-Martínez E, Pierro M, Cavallaro G, Mosca F, Kramer BW, Villamor E. Donor Human Milk Protects against Bronchopulmonary Dysplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 20 de febrero de 2018;10(2).
103. Lucas A, Morley R, Cole TJ, Gore SM. A randomised multicentre study of human milk versus formula and later development in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* marzo de 1994;70(2):F141-146.
104. Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, Lucas A. Breastmilk feeding and lipoprotein profile in adolescents born preterm: follow-up of a prospective randomised study. *Lancet Lond Engl.* 15 de mayo de 2004;363(9421):1571-8.
105. O'Connor DL, Gibbins S, Kiss A, Bando N, Brennan-Donnan J, Ng E, et al. Effect of Supplemental Donor Human Milk Compared With Preterm Formula on Neurodevelopment of Very Low-Birth-Weight Infants at 18 Months: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 08 de 2016;316(18):1897-905.
106. Impacto en la práctica clínica de la apertura de un banco de leche en una unidad neonatal [Internet]. [citado 20 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.analesdepediatria.org/es-pdf-S1695403313004785>
107. Weaver G, Bertino E, Gebauer C, Grovslie A, Mileusnic-Milenovic R, Arslanoglu S, et al. Recommendations for the Establishment and Operation of Human Milk Banks in Europe: A Consensus Statement From the European Milk Bank Association (EMBA). *Front Pediatr.* 2019;7:53.
108. Lawrence RM, Lawrence RA. Breast milk and infection. *Clin Perinatol.* septiembre de 2004;31(3):501-28.
109. Viljoen J, Tuailon E, Nagot N, Danaviah S, Peries M, Padayachee P, et al. Cytomegalovirus, and possibly Epstein-Barr virus, shedding in breast milk is associated with HIV-1 transmission by breastfeeding. *AIDS Lond Engl.* 14 de enero de 2015;29(2):145-53.
110. Arslanoglu S, Ziegler EE, Moro GE, World Association of Perinatal Medicine Working Group On Nutrition. Donor human milk in preterm infant feeding: evidence and recommendations. *J*



Perinat Med. julio de 2010;38(4):347-51.

111. Kwan C, Fusch G, Rochow N, Fusch C, MAMAS Study collaborators. Milk analysis using milk analyzers in a standardized setting (MAMAS) study: A multicentre quality initiative. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 3 de septiembre de 2019;
112. Baro C, Giribaldi M, Arslanoglu S, Giuffrida MG, Dellavalle G, Conti A, et al. Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Front Biosci Elite Ed.* 1 de junio de 2011;3:818-29.
113. Groer M, Duffy A, Morse S, Kane B, Zaritt J, Roberts S, et al. Cytokines, Chemokines, and Growth Factors in Banked Human Donor Milk for Preterm Infants. *J Hum Lact Off J Int Lact Consult Assoc.* agosto de 2014;30(3):317-23.
114. Braga LPM, Palhares DB. Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. *J Pediatr (Rio J).* febrero de 2007;83(1):59-63.
115. Czank C, Prime DK, Hartmann B, Simmer K, Hartmann PE. Retention of the immunological proteins of pasteurized human milk in relation to pasteurizer design and practice. *Pediatr Res.* octubre de 2009;66(4):374-9.
116. Tully DB, Jones F, Tully MR. Donor milk: what's in it and what's not. *J Hum Lact Off J Int Lact Consult Assoc.* mayo de 2001;17(2):152-5.
117. Venkatesh MP, Abrams SA. Oral lactoferrin for the prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 12 de mayo de 2010;(5):CD007137.
118. Venkatesh M, Abrams S. Can lactoferrin prevent neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis? *Expert Rev Anti Infect Ther.* junio de 2009;7(5):515-25.
119. Untalan PB, Keeney SE, Palkowetz KH, Rivera A, Goldman AS. Heat susceptibility of interleukin-10 and other cytokines in donor human milk. *Breastfeed Med Off J Acad Breastfeed Med.* septiembre de 2009;4(3):137-44.
120. Christen L, Lai CT, Hartmann B, Hartmann PE, Geddes DT. The effect of UV-C pasteurization on bacteriostatic properties and immunological proteins of donor human milk. *PLoS One.* 2013;8(12):e85867.
121. Espinosa-Martos I, Montilla A, de Segura AG, Escuder D, Bustos G, Pallás C, et al. Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after Holder pasteurisation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* mayo de 2013;56(5):560-8.
122. Sousa SG, Delgado I, Saraiva JA. Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. *Food Chem.* 15 de mayo de 2014;151:79-85.
123. Ewaschuk JB, Unger S, O'Connor DL, Stone D, Harvey S, Clandinin MT, et al. Effect of pasteurization on selected immune components of donated human breast milk. *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc.* septiembre de 2011;31(9):593-8.
124. Lindquist S, Hernell O. Lipid digestion and absorption in early life: an update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* mayo de 2010;13(3):314-20.
125. Unger S, Gibbins S, Zupancic J, O'Connor DL. DoMINO: Donor milk for improved neurodevelopmental outcomes. *BMC Pediatr.* 13 de mayo de 2014;14:123.
126. Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Romero FJ. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. agosto de 2008;97(8):1070-4.
127. Bertino E, Coppa GV, Giuliani F, Coscia A, Gabrielli O, Sabatino G, et al. Effects of Holder pasteurization on human milk oligosaccharides. *Int J Immunopathol Pharmacol.* junio de 2008;21(2):381-5.
128. Coscia A, Peila C, Bertino E, Coppa GV, Moro GE, Gabrielli O, et al. Effect of holder pasteurisation on human milk glycosaminoglycans. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* enero de

2015;60(1):127-30.

129. Hosseini M, Esmaili HA, Abdoli Oskouei S, Gojazadeh M, Mokari Yamchi Z, Layegh V, et al. Evaluation of the Freeze-Thawing Method in Reducing Viral Load of Cytomegalovirus in Breast Milk of Mothers of Preterm Infants. *Breastfeed Med Off J Acad Breastfeed Med.* 2016;11:557-60.

130. Schlotterer HR, Perrin MT. Effects of Refrigerated and Frozen Storage on Holder-Pasteurized Donor Human Milk: A Systematic Review. *Breastfeed Med Off J Acad Breastfeed Med.* 2018;13(7):465-72.

131. Bertino E, Giribaldi M, Baro C, Giancotti V, Pazzi M, Peila C, et al. Effect of prolonged refrigeration on the lipid profile, lipase activity, and oxidative status of human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* abril de 2013;56(4):390-6.

132. Hanna N, Ahmed K, Anwar M, Petrova A, Hiatt M, Hegyi T. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* noviembre de 2004;89(6):F518-520.

133. Akinbi H, Meinzen-Derr J, Auer C, Ma Y, Pullum D, Kusano R, et al. Alterations in the host defense properties of human milk following prolonged storage or pasteurization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* septiembre de 2010;51(3):347-52.

134. García-Lara NR, Escuder-Vieco D, García-Algar O, De la Cruz J, Lora D, Pallás-Alonso C. Effect of freezing time on macronutrients and energy content of breastmilk. *Breastfeed Med Off J Acad Breastfeed Med.* agosto de 2012;7:295-301.

135. Rollo DE, Radmacher PG, Turcu RM, Myers SR, Adamkin DH. Stability of lactoferrin in stored human milk. *J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc.* abril de 2014;34(4):284-6.

136. Escuder-Vieco D, Espinosa-Martos I, Rodríguez JM, Fernández L, Pallás-Alonso CR. Effect of HTST and Holder Pasteurization on the Concentration of Immunoglobulins, Growth Factors, and Hormones in Donor Human Milk. *Front Immunol.* 2018;9:2222.

137. Aceti A, Cavallarin L, Martini S, Giribaldi M, Vitali F, Ambretti S, et al. Effect of Alternative Pasteurization Techniques On Human Milk's Bioactive Proteins. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 24 de diciembre de 2019;

138. Aceti A, Corvaglia L, Faldella G. Human milk banks: lights and shadows. *J Pediatr Neonatal Individ Med JPNIM.* 3 de octubre de 2014;3(2):e030225.

139. Quigley M, Embleton ND, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev [Internet].* 20 de junio de 2018 [citado 26 de septiembre de 2020];2018(6). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6513381/>

140. Tsang RC. Historical Perspective. *Nutr Care Preterm Infants.* 2014;110:1-3.

141. Lucas A, Gibbs JA, Baum JD. The biology of human drip breast milk. *Early Hum Dev.* diciembre de 1978;2(4):351-61.

142. Schanler RJ. Mother's own milk, donor human milk, and preterm formulas in the feeding of extremely premature infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* diciembre de 2007;45 Suppl 3:S175-177.

143. Maayan-Metzger A, Avivi S, Schushan-Eisen I, Kuint J. Human milk versus formula feeding among preterm infants: short-term outcomes. *Am J Perinatol.* febrero de 2012;29(2):121-6.

144. Mangili G, Garzoli E. Feeding of preterm infants and fortification of breast milk. *Pediatr Medica E Chir Med Surg Pediatr.* 28 de junio de 2017;39(2):158.

145. Parra-Llorca A, Gormaz M, Sánchez-Illana Á, Piñeiro-Ramos JD, Collado MC, Serna E, et al. Does Pasteurized Donor Human Milk Efficiently Protect Preterm Infants Against Oxidative Stress? *Antioxid Redox Signal.* 10 de octubre de 2019;31(11):791-9.

146. Parra-Llorca A, Gormaz M, Alcántara C, Cernada M, Nuñez-Ramiro A, Vento M, et al. Preterm Gut Microbiome Depending on Feeding Type: Significance of Donor Human Milk. *Front Microbiol.* 2018;9:1376.

147. Parra-Llorca A, Gormaz M, Lorente-Pozo S, Cernada M, García-Robles A, Torres-Cuevas I,

- et al. Impact of Donor Human Milk in the Preterm Very Low Birth Weight Gut Transcriptome Profile by Use of Exfoliated Intestinal Cells. *Nutrients*. 5 de noviembre de 2019;11(11).
148. Doyle LW, Cheong JLY, Burnett A, Roberts G, Lee KJ, Anderson PJ, et al. Biological and Social Influences on Outcomes of Extreme-Preterm/Low-Birth Weight Adolescents. *Pediatrics*. diciembre de 2015;136(6):e1513-1520.
149. Moreno Villares JM. Nutrition in early life and the programming of adult disease: the first 1000 days. *Nutr Hosp*. 12 de 2016;33(Suppl 4):337.
150. Gregory KE, Samuel BS, Houghteling P, Shan G, Ausubel FM, Sadreyev RI, et al. Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants. *Microbiome*. 30 de 2016;4(1):68.
151. Cullen TW, Schofield WB, Barry NA, Putnam EE, Rundell EA, Trent MS, et al. Gut microbiota. Antimicrobial peptide resistance mediates resilience of prominent gut commensals during inflammation. *Science*. 9 de enero de 2015;347(6218):170-5.
152. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res*. 4 de enero de 2016;44(D1):D457-462.
153. Gidrewicz DA, Fenton TR. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatr*. 2014;14:216.
154. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am*. febrero de 2013;60(1):49-74.
155. Valentine CJ, Morrow G, Reisinger A, Dingess KA, Morrow AL, Rogers LK. Lactational Stage of Pasteurized Human Donor Milk Contributes to Nutrient Limitations for Infants. *Nutrients*. 18 de marzo de 2017;9(3).
156. Kuligowski J, Torres-Cuevas I, Quintás G, Rook D, van Goudoever JB, Cubells E, et al. Assessment of oxidative damage to proteins and DNA in urine of newborn infants by a validated UPLC-MS/MS approach. *PLoS One*. 2014;9(4):e93703.
157. Cernada M, Bäuerl C, Serna E, Collado MC, Martínez GP, Vento M. Sepsis in preterm infants causes alterations in mucosal gene expression and microbiota profiles compared to non-septic twins. *Sci Rep*. 16 de 2016;6:25497.
158. Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr*. junio de 2003;77(6):1537S-1543S.
159. Lönnerdal B. Bioactive proteins in breast milk. *J Paediatr Child Health*. marzo de 2013;49 Suppl 1:1-7.
160. Garcia-Rodenas CL, De Castro CA, Jenni R, Thakkar SK, Beauport L, Tolsa J-F, et al. Temporal changes of major protein concentrations in preterm and term human milk. A prospective cohort study. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2019;38(4):1844-52.
161. Beck KL, Weber D, Phinney BS, Smilowitz JT, Hinde K, Lönnerdal B, et al. Comparative Proteomics of Human and Macaque Milk Reveals Species-Specific Nutrition during Postnatal Development. *J Proteome Res*. 1 de mayo de 2015;14(5):2143-57.
162. Zhu J, Dingess KA. The Functional Power of the Human Milk Proteome. *Nutrients*. 8 de agosto de 2019;11(8).
163. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev*. noviembre de 2015;91(11):629-35.
164. Mimouni FB, Lubetzky R, Yochpaz S, Mandel D. Preterm Human Milk Macronutrient and Energy Composition: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Perinatol*. 2017;44(1):165-72.
165. Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 de agosto de 2000;97(16):8841-8.
166. Sordillo LM, Aitken SL. Impact of oxidative stress on the health and immune function of

- dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 15 de marzo de 2009;128(1-3):104-9.
167. Rönnau C, Liebermann HEH, Helbig F, Staudt A, Felix SB, Ewert R, et al. The bio-complex «reaction pattern in vertebrate cells» reduces cytokine-induced cellular adhesion molecule mRNA expression in human endothelial cells by attenuation of NF-kappaB translocation. *BMB Rep.* 28 de febrero de 2009;42(2):106-12.
168. Schwab M, Reynders V, Loitsch S, Steinhilber D, Stein J, Schröder O. Involvement of different nuclear hormone receptors in butyrate-mediated inhibition of inducible NF kappa B signalling. *Mol Immunol.* julio de 2007;44(15):3625-32.
169. Broeders N, Abramowicz D. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int.* enero de 2002;61(1):354-5.
170. Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem.* 4 de diciembre de 1998;273(49):32833-41.
171. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology.* 15 de julio de 2003;189(1-2):75-88.
172. Aceti A, Beghetti I, Martini S, Faldella G, Corvaglia L. Oxidative Stress and Necrotizing Enterocolitis: Pathogenetic Mechanisms, Opportunities for Intervention, and Role of Human Milk. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:7397659.
173. Holmdahl R, Sareila O, Olsson LM, Bäckdahl L, Wing K. Ncf1 polymorphism reveals oxidative regulation of autoimmune chronic inflammation. *Immunol Rev.* enero de 2016;269(1):228-47.
174. Rao M, Wong C, Kanetsky P, Girndt M, Stenvinkel P, Reilly M, et al. Cytokine gene polymorphism and progression of renal and cardiovascular diseases. *Kidney Int.* septiembre de 2007;72(5):549-56.
175. Hojo Y, Shimada K. [Role of cytokines in acute coronary syndrome]. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med.* octubre de 1998;56(10):2500-3.
176. Mino T, Takeuchi O. Post-transcriptional regulation of cytokine mRNA controls the initiation and resolution of inflammation. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2013;29:49-60.
177. Prahalad S, Glass DN. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J.* 21 de julio de 2008;6:11.
178. Lloyd RE, Foster PG, Guille M, Littlewood DTJ. Next generation sequencing and comparative analyses of *Xenopus* mitogenomes. *BMC Genomics.* 19 de septiembre de 2012;13:496.

**“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total, es una victoria completa”**

Mahatma Gandhi.

## **XI. ANEXO. MATERIAL SUPLEMENTARIO**

## XI. ANEXO. MATERIAL SUPLEMENTARIO.

### ANEXO 1: HOJA DE SOLICITUD DE LECHE HUMANA DONADA EN NUESTRA UNIDAD DE TERCER NIVEL.

ETIQUETA DEL PACIENTE

#### SOLICITUD DE LECHE MATERNA DONADA

FECHA DE SOLICITUD.....

FECHA PREVISTA DE ADMINISTRACIÓN	VOLUMEN DE ALIMENTACIÓN PAUTADO /DÍA

EN CASO DE LECHE DE RESERVA, FECHA EN LA QUE SE HA ADMINISTRADO .....

DATOS RECEPTOR (a completar en la primera solicitud)

EG (S + d)	PN	SEXO

#### INDICACIÓN PARA RECIBIR LMD

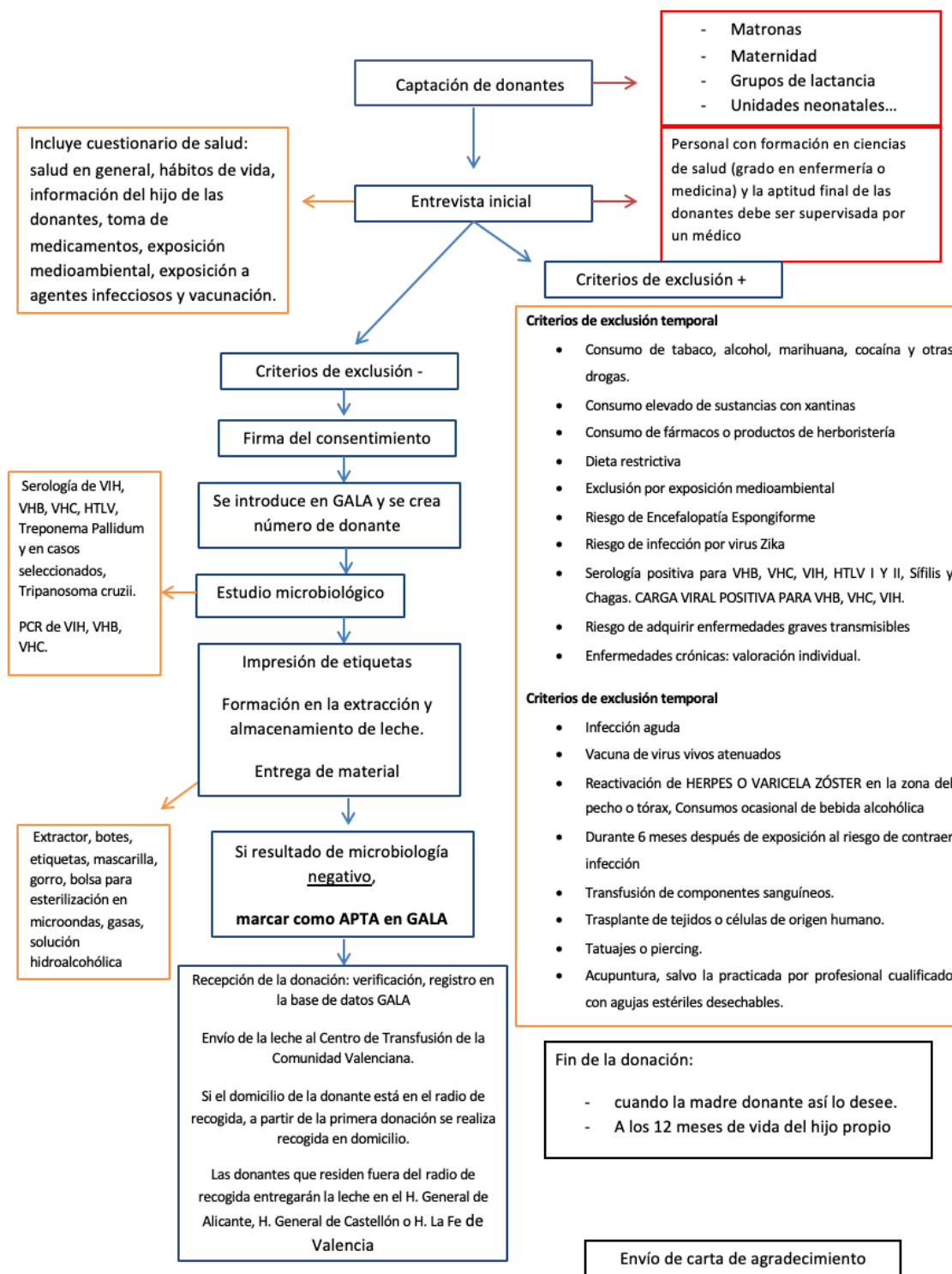
- 1) PN  $\leq$  1500 y EG  $\leq$  32 SG
- 2) PN  $\leq$  1500
- 3) EG  $\leq$  32 SG
- 4) PREMATURIDAD 33-36 SG
- 5) Cardiopatía congénita
- 6) Retraso del Crecimiento Intrauterino
- 7) Patología intestinal
- 8) Encefalopatía Hipóxico-Isquémica + hipotermia
- 9) Pérdida de Bienestar Fetal
- 10) Metabolopatía
- 11) Intolerancia alimentaria
- 12) Cirugía abdominal
- 13) OTROS (especificar).....

DATOS RECEPTOR (siguientes solicitudes): EG corregida.....Peso actual.....

Necesidad nutricional especial (mala curva, receptor de LMD exclusiva) que requiera dar LMD con mayor contenido proteico/calórico .....

FIRMA Dr/a. ....

## ANEXO 2: DIAGRAMA DE FLUJO. PROCESO DE SELECCIÓN DE MADRES DONANTES. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.





### **ANEXO 3: HISTORIA CLÍNICA CON LOS DATOS SOLICITADOS A LAS MADRES DONANTES:**

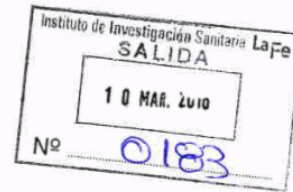
- **DATOS DE FILIACIÓN:** Nombre, Apellidos, Número de Historia Clínica, SIP, fecha de nacimiento, País de Origen, Dirección, Teléfono de contacto, correo electrónico. Información de cómo han conocido el banco de leche: Matrona CS, Pediatra CS, Enfermera CS, Maternidad, Grupo apoyo LM, Servicio de Neonatos, Medios de comunicación u otras vías de comunicación.
- **DATOS LACTANCIA :** número de embarazos (abortos e hijos). Nombre del bebé. Fecha del parto. Edad gestacional. Embarazo múltiple. Hospital de nacimiento. Peso al nacimiento.  
Fecha de inicio de la donación. Edad hijo/a en el momento del inicio de la donación. Antecedentes del bebé (ingresado o no, vivo o no, receptor de leche o no). Donación puntual de leche acumulada y el motivo (fallecimiento hijo, falta espacio, producción elevada...).
- **ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS:**
  - Enfermedades previas y cuáles. Fármacos y si son compatibles con la lactancia.
  - Vacuna polio o rubeola en las pasadas 4 semanas.
  - Enfermedades crónicas o infecciones activas incompatibles con lactancia
  - Grupo de riesgo de enfermedades graves transmisibles por sangre (transfusión sanguínea, trasplante órganos, diálisis, ADVP, pareja infección)
  - Antecedentes familiares de riesgo de contraer encefalopatía espongiforme (enfermedad de Creutzfeld- Jakob).
  - Trasplante de córnea o duramadre.
  - Tratamiento con medicamentos derivados de glándula pituitaria humana.

- HABITOS DE VIDA QUE SON CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:
  - Nicotina, alcohol, drogas. Dietas especiales (vegetariana, etc).
  - Xantinas (> 3 bebidas/día de café, té, cola).
  - Pareja con test positivo para VHB, VHC, VIH, HTLV o sífilis.
  - Tatuaje o piercing.
  
- EXCLUSIÓN TEMPORAL :
  - Infección aguda, Fármacos / hierbas, Reactivación Zóster/herpes local en pecho/ tórax, Vacuna virus vivos atenuados en las pasadas 4 semanas
  - Tiempo de exclusión temporal y unidades (horas, días, o meses).
  - Fecha reanudación donación.
  
- DATOS SOBRE EXTRACCIÓN DE LECHE: extracción previa, disponibilidad de sacaleches o préstamo del mismo. Número de sacaleches prestado. Disponibilidad de congelador a -20°C y esterilizador.



## ANEXO 4: CARTA DE APROBACIÓN DEL CEIM.

**Instituto  
de Investigación  
Sanitaria La Fe**  
Dirección General, José Vicente Castell



Dra. Dña. Anna Parra Llorca  
Servicio de Neonatología

*Asunto: Autorización Inicio Estudio.*

Valencia, 8 de Marzo de 2016

Adjunto le remito copia de los Informes Científico y Ético de Investigación, en el que se acuerda informar **favorablemente** sobre el Proyecto de Investigación titulado "INFLUENCIA DEL PROCESAMIENTO DE LA LECHE MATERNA DE DONANTE SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL, LA EXPRESIÓN GENÓMICA Y EL EQUILIBRIO OXIDATIVO EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO MENORES DE 32 SEMANAS DE EDAD GESTACIONAL", por usted presentado.

A la vista de los dictámenes emitidos, dicho Proyecto, puede iniciarse y llevarse a cabo.

Atentamente,

  
**Instituto de  
Investigación  
Sanitaria La Fe**  
CIF: G67067557  
José Vicente Castell Ripoll  
Director General

Valencia a 8 de Marzo de 2016

El **Dr. Rafael Botella Estrada**, Presidente de la Comisión de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe,

**INFORMA:**

Que el Proyecto de Investigación titulado: "INFLUENCIA DEL PROCESAMIENTO DE LA LECHE MATERNA DE DONANTE SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL, LA EXPRESIÓN GENÓMICA Y EL EQUILIBRIO OXIDATIVO EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO MENORES DE 32 SEMANAS DE EDAD GESTACIONAL" que presenta la **Dra. Anna Parra Llorca** del Área Clínica de Neonatología del Hospital U. i P. La Fe, contiene elementos objetivos suficientes en cuanto a la Hipótesis, Planteamientos y Plan de Trabajo que, a juicio de esta Comisión, permiten pronunciarse positivamente en cuanto a su viabilidad.



Rafael Botella Estrada  
Presidente de la Comisión de Investigación

## DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

### CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **10 de noviembre de 2015**, el Proyecto de Investigación titulado **“INFLUENCIA DEL PROCESAMIENTO DE LA LECHE MATERNA DE DONANTE SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL, LA EXPRESIÓN GENÓMICA Y EL EQUILIBRIO OXIDATIVO EN RECIÉN NACIDOS PRETÉRMINO MENORES DE 32 SEMANAS DE EDAD GESTACIONAL.”**, con nº de registro **2015/0371**.

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. ANNA PARRA LLORCA** del servicio de **NEONATOLOGÍA** como Investigador Principal.

Miembros del CEIB:

**Presidente:**

Dr. JOAN SALOM SANVALERO (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)

**Vicepresidente:**

Dr. JOSE VICENTE CERVERA ZAMORA (Hematología)

**Secretario:**

D. SERAFIN RODRIGUEZ CAPELLAN (Asesor jurídico)

**Miembros:**

Dr. SALVADOR ALIÑO PELLICER (Catedrático Farmacólogo Clínico)

Dr. LUIS ALMENAR BONET (Cardiología)

Dra. ESTHER ZORIO GRIMA (Cardiología)

Dra. BELEN BELTRAN NICLOS (Medicina Digestiva)

Dra. INMACULADA CALVO PENADES (Reumatología Pediátrica)

Dr. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL (Director de Investigación)

Dra. MARIA JOSE GOMEZ-LECHON MOLINER (Investigadora del Grupo Acreditado en Hepatología Experimental)

Dr. JOSE LOPEZ ALDEGUER (Enfermedades Infecciosas)

Dr. JAVIER PEMAN GARCIA (Investigador del Grupo Acreditado multidisciplinar para el estudio de la Infección Grave)

Dr. ALFREDO PERALES MARIN (Jefe de Servicio - Obstetricia)

Dra. PILAR SAENZ GONZALEZ (Neonatología)

Dr. MELCHOR HOYOS GARCIA ( )

Dra. BEGOÑA POLO MIQUEL (Gastroenterología Pediátrica)

Dr. ISIDRO VITORIA MIÑANA (Pediatria)  
Dra. EUGENIA PAREJA IBARS (Unidad de Cirugía y Trasplante Hepático)  
Dr. JAIME SANZ CABALLER (Investigador del Grupo Acreditado en Hematología y Hemoterapia)  
Dra. PILAR SEPULVEDA SANCHIS (Cardiocirculatorio)  
Dra. MARIA LUISA MARTINEZ TRIGUERO (Análisis Clínicos)  
Dra. MARIA TORDERA BAVIERA (Farmacéutica del Hospital)  
Dr. ENRIQUE VIOSCA HERRERO (Jefe de Servicio - Medicina Física y Rehabilitación)  
Dr. EDUARDO GARCIA-GRANERO XIMENEZ (Cirugía General y Digestivo)  
Dr. RAFAEL BOTELLA ESTRADA (Dermatología)  
Dr. OSCAR DIAZ CAMBRONERO (Anestesia y Reanimación)

Lo que firmo en Valencia, a 10 de noviembre de 2015





Fdo.: Don Serafín Rodríguez Capellán  
Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica

## **ANEXO 5: ACEPTACIÓN MENCIÓN INTERNACIONAL DE LA TESIS**

### **VALORACIÓN DE LA ESTANCIA REALIZADA MENCIÓN INTERNACIONAL**

La Comisión Académica del Programa de Doctorado 3139 en Medicina, en su reunión de 21 de julio de 2020, ha acordado emitir informe favorable sobre la estancia realizada por D/D<sup>a</sup> ANNA PARRA LLORCA, en el Hospital VUmc, en Ámsterdam, durante el período del 01/02/2020 al 30/04/2020, a los efectos de obtener la Mención Internacional al título de doctor.

Valencia, 21 de julio de 2020



Pilar Codoñer Franch  
Coordinadora Programa Doctorado en Medicina