



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

María del Carmen
Fernández Tuñas

Tesis doctoral

Influencia del estrés materno en la calidad y cantidad de leche materna, en la microbiota intestinal y en la evolución inmediata del recién nacido prematuro ≤ 32 semanas de gestación y/o ≤ 1500 gramos

Santiago de Compostela, 2024

Programa de doctorado en Investigación Clínica en Medicina

TESIS DOCTORAL

INFLUENCIA DEL ESTRÉS MATERNO EN LA CALIDAD Y CANTIDAD DE LECHE MATERNA, EN LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EN LA EVOLUCIÓN INMEDIATA DEL RECIÉN NACIDO PREMATURO ≤ 32 SEMANAS DE GESTACIÓN Y/O ≤ 1500 GRAMOS

Autor

María del Carmen Fernández Tuñas

Directores: María Luz Couce Pico, José Ramón Fernández Lorenzo

Tutora: María Luz Couce Pico

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EN MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

Dña. María del Carmen Fernández Tuñas

Declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral titulada:

Influencia del estrés materno en la calidad y cantidad de leche materna, en la microbiota intestinal y en la evolución inmediata del recién nacido prematuro ≤ 32 semanas de gestación y/o ≤ 1500 gramos.

A Alejandro

A mis hijos, Rocío y Alex

*“La recompensa de nuestro trabajo no está en lo
que obtenemos sino en lo que nos convertimos”*

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Al fin he llegado al final de este camino. Ha sido complicado a veces, muy intenso, pero altamente gratificante. No me he sentido sola en ningún momento y eso se lo tengo que agradecer a muchas personas, espero no olvidarme de ninguna. Empezaré por mi directora de tesis, Luz Couce, que ha confiado en mi trabajo y desde el primer momento me ha animado y ha conseguido que supere mis dudas. Gracias Couce, por ser tan exigente y ayudarme en los momentos más desbordantes.

Gracias también a mi otro director de tesis, Lorenzo, al que le tengo un cariño especial desde que comencé mi trabajo como enfermera en Neonatología. Tu profesionalidad y seriedad en el campo de la Neonatología siempre ha merecido todo mi respeto y admiración. Ha sido un placer trabajar contigo.

Agradecer al Servicio de Microbiología su colaboración y ayuda, que han sido determinantes. Gracias a Rocío Trastoy, que me ha resuelto montones de dudas y en cualquier momento, en el mundo de los microorganismos, un tema inicialmente desconocido para mí.

Agradezco a mis compañeros (enfermería, TCAES, neonatólogos y personal del Banco de Leche Humana) del Servicio de Neonatología, por haberme ayudado a recoger infinidad de muestras para el estudio. Gracias a cada uno de vosotros.

Volviendo la vista atrás, a quienes primero les tengo que agradecer todo lo que soy es a mis padres. Les agradezco todo el trabajo que han hecho conmigo, dándome lo mejor de ellos y sobre todo una educación impecable. Sé que, para ellos, y para mis queridísimos dos hermanos, Luz y Domingo, es un orgullo que hoy esté finalizando un proyecto como este. Mis padres han tenido años difíciles, pero han conseguido que los tres pudiésemos estudiar. Gracias por darme tanto.

Mi querido suegro Vicente, un gran luchador en la vida, catedrático de Física y un referente para mí. Siempre me ha apoyado y animado en este proyecto, como a cualquiera de sus hijos. Gracias, Vicente.

Han sido muchas las horas robadas, mucho tiempo invertido en este trabajo, dejando a un lado lo más importante para mí, mi familia. Mis dos hijos, Rocío y Alex, han aguantado momentos de ausencia, de mal humor, de momentos perdidos con ellos, aunque considero que también es una lección que les dejo. Nuestro trabajo implica una formación constante para dar lo mejor de nosotros mismos, espero que sepan apreciarlo. Perdonad todo el tiempo que he dejado de estar con vosotros, os quiero infinito.

Gracias también a Lourdes. Ella ha hecho de abuela, de madre y de amiga, en muchas ocasiones, aguantando mi mal humor a veces y mi ausencia. Sin ella no habría podido.

Y la piedra angular en mi vida, mi marido Alejandro, mi compañero, amigo y el que ha estado conmigo desde el principio, aguantando todo tipo de dificultades y mis lágrimas cuando no podía más. Ha releído el texto montones de veces, me ha ayudado con sus consejos, su trabajo y su constante empuje. Él ha sido y es mi mayor apoyo a nivel personal y profesional. Su gran profesionalidad e implicación en el trabajo ha sido siempre el gran motor para mí. Trabajar juntos no siempre ha sido fácil por su elevado nivel de exigencia con los pacientes, pero es maravilloso porque me ha dado la oportunidad de conocerlo mejor. Su convicción y el empeño que pone en cada paciente es algo admirable. Gracias por darme tanto cada día, por tu sonrisa en los peores momentos, por tus abrazos, por tu apoyo incondicional y por quererme tanto.

Gracias a mis amigos por soportarme durante estos años, y por comprender mi ausencia cuando a lo mejor me necesitaron. La amistad es maravillosa y es un privilegio que he conocido en todo su esplendor gracias a vosotros. Os quiero.

Me acuerdo de cada persona que ha marcado mi vida y que me acompaña y ha acompañado siempre a lo largo de los años. Dicen que la vida se comprende hacia atrás, pero debe vivirse hacia adelante. Somos lo que somos por lo que hemos vivido. Gracias a ese espíritu libre que vive conmigo y en mí.

Este trabajo es tan mío como vuestro.

RESUMEN

Los padres de un niño prematuro pasan por etapas de elevado estrés que causan una crisis emocional, que condiciona su vida familiar, laboral y/o económica, para lo que no están preparados. Asumir la nueva situación supone poseer herramientas personales para controlar y aceptar la situación. Es, por tanto, un período de un elevado riesgo para iniciar un patrón alterado del vínculo afectivo que puede condicionar el desarrollo psicológico posterior del prematuro.

El estrés materno, además, puede influir en la instauración y/o mantenimiento de la lactancia materna, en sus macronutrientes, en la microbiota de la leche materna (LM) y en la microbiota intestinal del recién nacido prematuro. Por otro lado, la calprotectina fecal (CPF) es un marcador de procesos de inflamación intestinal y presenta cifras superiores en recién nacidos que en adultos, de manera fisiológica. El tipo de parto, el sexo, los antibióticos o el peso al nacimiento son factores que pueden influir tanto en la microbiota como en los niveles de CPF. Como objetivo principal nos hemos marcado el valorar la influencia del estrés de las madres lactantes en la cantidad de LM extraída, en sus macronutrientes y en la microbiota de la LM e intestinal del recién nacido prematuro. Secundariamente veremos cómo se va modificando el estrés a lo largo de los 15 días del estudio y cómo influye en la biodiversidad de la microbiota de la LM y en la intestinal del recién nacido. Veremos las diferencias que hay entre la microbiota de la LM y en el intestino del recién nacido prematuro, en función de variables como tipo de parto, antibióticos prenatales/postnatales o edad gestacional. Además, veremos cuál es la microbiota predominante en la LM de nuestras madres y en el intestino de los prematuros y qué géneros e incluso especies, comparten madre e hijo. Podremos valorar cómo influyen determinados factores sobre marcadores de inflamación intestinal, como la CPF, o si influye el nivel educativo de las madres en el control del estrés y qué factores actúan como protectores del mismo.

Hemos hecho un estudio prospectivo longitudinal en recién nacidos prematuros ≤ 32 semanas de edad gestacional y/o ≤ 1500 g de peso alimentados con LM, en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, durante un período de 2 años. La evaluación del estrés materno en 45 madres y su repercusión en sus 52 recién nacidos grandes prematuros se ha llevado a cabo mediante la escala de estrés parental (PSS:NICU) y el registro de variables clínicas del prematuro a los 3, 7 y 15 días de vida. El análisis de la microbiota de la LM e intestinal de los recién nacidos se ha hecho con técnicas de secuenciación masiva de segunda generación en el Servicio de Microbiología del mismo hospital y la CPF mediante técnica ELISA.

Hemos visto que el estrés parental disminuye con el paso de los días, siendo la subescala que más estrés produce la relacionada con el vínculo materno filial y la que menos la referida a la comunicación con el personal sanitario. El estrés influye negativamente en la producción de LM, pero no en sus macronutrientes (proteínas, grasas e hidratos de carbono), donde sí influye el tipo de parto, habiendo mayor producción de LM y más grasa en el calostro de los partos vaginales que en las cesáreas. Además, producir menos de 140 ml/día en el día 4 postparto predice una menor producción de LM a día 15 (< 500 ml/día), pudiendo comprometer una lactancia exclusiva exitosa al alta. Las madres ≥ 35 años tienden a producir menos leche que las < 35 años. Además, el método canguro se postula como un factor protector frente al estrés, sobre todo cuanto más precoz se establece.

En relación con la CPF, encontramos valores más elevados en los niños con respecto a las niñas, a los 15 días. Son menores los niveles de CPF cuando se administran antibióticos postnatales y en el parto vaginal con respecto a la cesárea. Además, hemos encontrado una relación inversamente proporcional entre peso al nacimiento y valores de CPF, a los 3 días de vida.

En cuanto a la microbiota, objetivamos que hay mayor biodiversidad en la microbiota de heces cuando el parto es por vía vaginal en comparación con la cesárea, en el período más inmediato, y en la LM a los 15 días. Además, hay determinados filos que sólo aparecen cuando el parto tiene lugar por vía vaginal (*Bacteroidetes*) y que representan uno de los filos dominantes en la etapa adulta. Por lo tanto, el patrón de colonización intestinal que se sigue en los partos vaginales y en las cesáreas, siguen un curso diferente. Encontramos también mayor biodiversidad en LM cuando el estrés es bajo y en heces del prematuro a los 15 días. El filo dominante en el intestino del prematuro son las *Proteobacterias* y en la LM los *Firmicutes*. Hemos visto también, cómo el estrés causa cambios en los filos de la LM (descienden *Firmicutes* y aumentan *Proteobacterias*) al igual que los antibióticos que cambian la dominancia de los mismos (disminuyen las *Proteobacterias* y aumentan los *Firmicutes*) y afectan a la biodiversidad en la microbiota intestinal del prematuro y de la LM.

En conclusión, el estrés materno es un factor importante en el establecimiento de la microbiota intestinal del prematuro y en la de la LM, así como en su biodiversidad. El tipo de parto, los antibióticos o la alimentación influyen en su composición. Por otro lado, el peso al nacimiento, el sexo o los antibióticos modifican los niveles de CPF, que basalmente, son más elevados que en adultos, en ausencia de enfermedad.

El estrés materno influye también en la instauración y mantenimiento de la LM. Conocer qué factores ayudan a reducirlo (canguro precoz) y cuáles actuarían como un mayor riesgo para una peor gestión del estrés, son importantes para tener en cuenta en los Servicios Neonatales para reducir el estrés en las madres. Se deben establecer medidas para controlar el estrés materno durante el período perinatal. Aunque ciertas variables sociales independientes (mayor nivel educativo) favorecen un mejor control del estrés, se pueden aplicar medidas adicionales en la UCIN (método canguro precoz) que han sido probadas de forma eficaz.

RESUMO

Os pais dun fillo prematuro atravesan etapas de alto estrés que provocan unha crise emocional, que condiciona a súa vida familiar, laboral e/ou económica, para a que non están preparados. Asumir a nova situación supón contar con ferramentas persoais para controlar e aceptar a situación. Trátase, polo tanto, dun período de alto risco para iniciar un patrón alterado de vínculo emocional que pode condicionar o desenvolvemento psicolóxico posterior do bebé prematuro.

O estrés materno tamén pode influír no establecemento e/ou mantemento da lactación materna, os seus macronutrientes, a microbiota do leite materno (LM) e a microbiota intestinal do recentemente nado prematuro. Por outra banda, a calprotectina fecal (CPF) é un marcador dos procesos inflamatorios intestinais e presenta niveis máis altos nos recentemente nados que nos adultos, fisiolóxicamente. O tipo de parto, o sexo, os antibióticos ou o peso ao nacer son factores que poden influír tanto na microbiota como nos niveis de CPF.

O noso obxectivo principal é avaliar a influencia do estrés nas nais lactantes sobre a cantidade de LM extraído, sobre os seus macronutrientes e sobre a microbiota do LM e a intestinal do neonato prematuro. En segundo lugar, veremos como cambia o estrés ao longo dos 15 días de estudo e como inflúe na biodiversidade da microbiota do LM e da microbiota intestinal do recentemente nado. Veremos as diferenzas entre a microbiota do LM e a do intestino do neonato prematuro, dependendo de variables como o tipo de parto, os antibióticos prenatais/posnatais ou a idade xestacional. Ademais, veremos cal é a microbiota predominante no LM das nosas nais e no intestino dos bebés prematuros e qué xéneros e mesmo especies comparten a nai e o fillo. Poderemos valorar como determinados factores inflúen nos marcadores de inflamación intestinal, como a CPF, ou se o nivel educativo das nais inflúe no control do estrés e qué factores actúan como protectores do mesmo.

Fixemos un estudo lonxitudinal prospectivo en prematuros ≤ 32 semanas de idade xestacional e/ou ≤ 1500 g de peso alimentados con LM, no Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, durante un período de 2 anos. A avaliación do estrés materno en 45 nais e a repercusión nos seus 52 recentemente nados grandes prematuros realizouse mediante a Parental Stress Scale (PSS:UCIN) e o rexistro de variables clínicas do prematuro aos 3, 7 e 15 días de vida. A análise da microbiota do LM e da intestinal dos recentemente nados realizouse con técnicas de secuenciación masiva de segunda xeración no Servizo de Microbioloxía do mesmo hospital e a CPF mediante a técnica ELISA.

Vimos que o estrés parental diminúe a medida que pasan os días, estando a subescala que máis estrés produce a relacionada co vínculo materno-filial e a que menos estrés produce é a de comunicación co persoal sanitario. O estrés inflúe negativamente na produción de LM pero non nos seus macronutrientes (proteínas, graxas e hidratos de carbono), onde si inflúe o tipo de parto, con maior produción de LM e máis graxa no calostro dos partos vaxinais que nas cesáreas. Ademais, producir menos de 140 ml/día o día 4 posparto prevé unha menor produción de LM a día 15 (< 500 ml/día), que pode comprometer a lactación materna exclusiva exitosa no momento da alta. As nais ≥ 35 anos tenden a producir menos leite que aquelas < 35 anos. Ademais, o método canguro postúlase como un factor protector contra o estrés, sobre todo canto antes se establece.

En relación á CPF, atopamos valores máis altos nos nenos en comparación coas nenas, aos 15 días. As medidas de CPF son máis baixas cando se administran antibióticos posnatais e no parto

vaxinal en comparación coa cesárea. Ademais, atopamos unha relación inversamente proporcional entre o peso ao nacer e os niveis de CPF aos 3 días de vida.

En canto á microbiota, obxectivamos que existe unha maior biodiversidade na microbiota fecal cando o parto é vaxinal en comparación coa cesárea, no período máis inmediato, e no LM aos 15 días. Ademais, existen certos filos que só aparecen cando o nacemento ten lugar por vía vaxinal (Bacteroidetes) e que representan un dos filos dominantes na etapa adulta. Polo tanto, o patrón de colonización intestinal seguido nos partos vaxinais e nas cesáreas leva un curso diferente. Tamén atopamos unha maior biodiversidade no LM cando o estrés é baixo e nas feces dos bebés prematuros aos 15 días. O filo dominante no intestino dos bebés prematuros son as Proteobacterias e no LM os Firmicutes. Tamén vimos como o estrés provoca cambios nos filos do LM (diminúen os Firmicutes e aumentan as Proteobacterias) así como os antibióticos que cambian a súa dominancia (diminúen as Proteobacterias e aumentan os Firmicutes) e afectan á biodiversidade na microbiota intestinal dos prematuros e no LM.

Podemos concluír que o estrés materno é un factor importante no establecemento da microbiota intestinal dos prematuros e no LM, así como a súa biodiversidade. O tipo de parto, os antibióticos ou a dieta inflúen na súa composición. Por outra banda, o peso ao nacer, o sexo ou os antibióticos modifican os niveis de CPF, que son máis altas que nos adultos, en ausencia de enfermidade.

O estrés materno tamén inflúe no establecemento e mantemento do LM. Coñecer que factores axudan a reduci-lo (canguro temperán) e cales actuarían como un maior risco de peor xestión do estrés son importantes a ter en conta nos Servizos Neonatais para reducir o estrés nas nais. Deben establecerse medidas para controlar o estrés materno durante o período perinatal. Aínda que certas variables sociais independentes (o nivel educativo superior) favorecen un mellor control do estrés, pódense aplicar medidas adicionais na UCIN (canguro temperán) que demostraron ser eficaces.

ABSTRACT

Parents of a premature child go through stages of high stress that cause an emotional crisis, impacting their family, work, and/or economic life, for which they are not prepared. Taking on the new situation involves having personal tools to control and accept it. Therefore, it is a period of high risk for initiating an altered pattern of emotional bonding that may influence the later psychological development of the premature infant.

Maternal stress can also affect the establishment and/or maintenance of breastfeeding, its macronutrients, the breast milk (BM) microbiota, and the intestinal microbiota of the premature newborn. Additionally, fecal calprotectin (FCP) is a marker of intestinal inflammation processes and physiologically presents higher levels in newborns than in adults. The type of delivery, gender, antibiotics, or birth weight are factors that can influence both the microbiota and FCP levels.

Our main objective is to assess the influence of stress in lactating mothers on the quantity of expressed BM, its macronutrients, and the microbiota of both BM and the intestinal tract of the premature newborn. Secondly, we will observe how stress changes over the 15 days of the study and its impact on the biodiversity of the microbiota in BM and the infant's intestine. We will explore differences in the microbiota of BM and the intestine of premature newborns based on variables such as the type of delivery, prenatal/postnatal antibiotics, or gestational age. Additionally, we will identify the predominant microbiota in the BM of mothers and in the intestines of premature infants, including shared genera and species between mother and child. We aim to assess how certain factors influence markers of intestinal inflammation, such as FCP, and whether maternal education level affects stress control, along with identifying protective factors.

We conducted a prospective longitudinal study on premature newborns ≤ 32 weeks of gestational age and/or ≤ 1500 g in weight, fed with BM, at the University Clinical Hospital of Santiago de Compostela, over a 2-year period. Maternal stress evaluation in 45 mothers and its impact on their 52 large premature newborns was conducted using the Parental Stressor Scale (PSS:NICU) and clinical variable records at 3, 7, and 15 days of life for the premature infants. Microbiota analysis of BM and the newborns' intestines was performed using second-generation massive sequencing techniques at the hospital's Microbiology Service, and FCP was assessed using ELISA.

We found that parental stress decreases over the days, with the maternal-filial bond-related subscale causing the most stress, while communication with healthcare personnel causes the least stress. Stress negatively affects BM production, but not its macronutrients (proteins, fats, and carbohydrates), where the type of delivery plays a role, with higher BM production and more fat in vaginal deliveries compared to cesarean sections. Producing less than 140 ml/day on day 4 postpartum predicts lower BM production at day 15 (< 500 ml/day), potentially jeopardizing successful exclusive breastfeeding upon discharge. Mothers ≥ 35 years tend to produce less milk than those < 35 years. Additionally, kangaroo care is considered a protective factor against stress, especially when established early.

Regarding FCP, we found higher levels in boys compared to girls at 15 days. FCP levels are lower when postnatal antibiotics are administered and in vaginal deliveries compared to cesarean sections. Moreover, we observed an inversely proportional relationship between birth weight and FCP values at 3 days of life.

Concerning the microbiota, we observed greater biodiversity in fecal microbiota when delivered vaginally compared to cesarean section, especially in the immediate period, and in BM at 15 days. Certain phyla only appear in vaginal deliveries (Bacteroidetes) and represent one of the dominant phyla in adulthood. Therefore, the colonization pattern in vaginal and cesarean deliveries follows a different course. We also found greater biodiversity in BM when stress is low and in the premature infant's feces at 15 days. Proteobacteria dominate in the premature infant's intestine, while Firmicutes dominate in BM. We also observed how stress causes changes in BM phyla (Firmicutes decrease, Proteobacteria increase), similar to the effects of antibiotics on the dominance shift (decreasing Proteobacteria, increasing Firmicutes), affecting the biodiversity of the premature infant's intestinal and BM microbiota.

In conclusion, maternal stress is a significant factor in establishing the intestinal microbiota of the premature infant and in BM, as well as in their biodiversity. The type of delivery, antibiotics, or feeding influence their composition. Birth weight, gender, and antibiotics modify FCP levels, which are inherently higher than in adults in the absence of disease.

Maternal stress also influences the establishment and maintenance of BM. Understanding factors that help reduce stress (early kangaroo care) and those that act as a greater risk for poorer stress management is important for consideration in Neonatal Services to reduce stress in mothers. Measures should be established to control maternal stress during the perinatal period. Although certain independent social variables (higher education level) favor better stress control, additional effective measures in the Neonatal Intensive Care Unit (early kangaroo care) can be implemented.

ABREVIATURAS

ABT: antibióticos

AFC: apariencia física y comportamiento

AGAPREM: asociación gallega de niños prematuros

AVS: aspectos visuales y sonoros

CCDF: cuidados centrados en el desarrollo y la familia

CI: consentimiento informado

CPF: calprotectina fecal

CPS: comunicación con el personal sanitario

DB: decibelios

Ductus AV: arteriovenoso

EC: estrés común

EG: edad gestacional

ET: estrés total

HdC: hidratos de carbono

Ig: inmunoglobulinas

IMC: índice masa corporal

LHD: leche humana donada

LM: leche materna

NA: no aplicable

ND: no detectable

NEC: enterocolitis necrosante

NIDCAP: newborn individualized developmental care and assessment program

PSS:NICU: parental stressor scale: neonatal intensive care unit

RM: rol madre

RN: recién nacido

RNBPN: recién nacido bajo peso al nacer

RNEBPN: recién nacido extremado bajo peso al nacer

RNMBPN: recién nacido muy bajo peso al nacer

SENEO: sociedad española de neonatología

SNC: sistema nervioso central

UCIN: unidad cuidados intensivos neonatales

ÍNDICE

1.- Introducción	1
1.1.- Incidencia de partos prematuros	1
1.2.- Definición de prematuridad	2
1.3.- Etapas psicológicas del embarazo	2
1.4.- Teoría del apego	4
1.4.1.- Apego seguro	4
1.4.2.- Apego inseguro	4
1.4.2.1.- Apego evitativo huidizo	4
1.4.2.2.- Apego ansioso ambivalente	4
1.4.2.3.- Apego desorganizado	4
1.5.- Una nueva filosofía del cuidado	5
1.6.- El estrés	9
1.6.1.- Estrés agudo	9
1.6.2.- Estrés agudo episódico	10
1.6.3.- Estrés crónico	10
1.7.- El estrés ante un parto prematuro	14
1.7.1.- Crisis emocional	14
1.7.2.- Etapas emocionales	14
1.7.3.- Estrés y procesos de duelo	15
1.7.4.- Estrés postraumático	15
1.7.5.- El estrés ante el ambiente de la UCIN	16
1.8.- Sentimientos que experimentan los padres de niños prematuros	16
1.9.- Escala de estrés parental (PSS:NICU)	18
1.10.- Apoyo a los padres de niños prematuros	18
1.11.- Calprotectina fecal (CPF)	19
1.12.- Lactancia materna (LM)	20
1.12.1.- Composición y beneficios de la LM	20
1.12.2.- Composición de la LM en madres de niños prematuros	22
1.12.3.- LM y estrés	24
1.13.- Microbiota intestinal	25
1.13.1.- Definición	25
1.13.2.- Transmisión de la microbiota	25
1.13.3.- Funciones de la microbiota intestinal	27

1.13.4.- Función cognitiva y homeostasis intestinal en relación con el estrés	28
1.13.5.- Disbiosis microbiana	28
1.13.6.- Factores que influyen en la microbiota	29
1.13.7.- Lactancia materna y microbiota	30
1.13.8.- Taxonomía de los microorganismos	32
1.14.- Contexto	32
2.- Justificación	33
3.- Objetivos	35
3.1.- Principal	35
3.2.- Secundarios	35
4.- Material y Métodos	37
4.1.- Diseño del estudio	37
4.2.- Población	37
4.2.1.- Criterios de inclusión	37
4.2.2.- Criterios de exclusión	37
4.3.- Variables del estudio	37
4.3.1.- Datos sociodemográficos	37
4.3.2.- Variables clínicas del recién nacido	38
4.3.3.- Inicio del Método madre canguro	38
4.4.- Plan de trabajo	38
4.5.- Método	39
4.5.1.- Escala de estrés parental (PSS:NICU)	39
4.5.2.- Cantidad de leche materna extraída	41
4.5.3.- Análisis nutricional de macronutrientes de la LM	41
4.5.4.- Análisis de CPF	42
4.5.5.- Análisis de la microbiota en heces del RN y en LM	42
4.5.6.- Información a los padres previa al estudio	45
4.5.7.- Recopilación de datos y registro	45
4.6.- Análisis estadístico	45
5.- Resultados	47
5.1.- Población de estudio	47
5.2.- Recogida de datos y muestras	47
5.3.- Análisis de frecuencias	48
5.3.1.- Descripción de la muestra de pacientes	48
5.3.2.- Evolución del peso	51
5.3.3.- Evolución del soporte respiratorio, ductus y sepsis	51
5.3.4.- Evolución de la alimentación parenteral, enteral, fortificación de LM y uso de antibioterapia materna (prenatal) y neonatal	52

5.3.5.- Evolución de la cantidad de LM y de la cantidad total a los 3, 4, 7 y 15 días	52
5.3.6.- Composición de macronutrientes de la LM	53
5.3.7.- Escala de estrés parental (PSS:NICU)	53
5.3.8.- Calprotectina fecal (CPF)	54
5.4.- Análisis correlacional	55
5.4.1.- Relación entre la variación de estrés e inicio del método canguro	55
5.4.2.- Relación entre el nivel de estudios materno y el estrés	55
5.4.3.- Evolución del estrés materno en relación con la aparición de morbilidades en el recién nacido prematuro	56
5.4.4.- Relación entre cantidad de LM y estrés	56
5.4.5.- Cantidad de LM en función de la estratificación del nivel de estrés	57
5.4.6.- Relación entre cantidad de LM a los 3, 7 y 15 días y tipo de parto	58
5.4.7.- Producción de LM en relación con la edad de la madre	58
5.4.8.- Relación entre producción de LM en el día 4 y día 15	59
5.4.9.- Relación entre estrés materno y la producción de LM inferior o superior a 500 ml en el día 15	60
5.4.10.- Calidad de los macronutrientes de la LM en relación con el estrés	60
5.4.11.- Composición de la LM según la vía del parto	61
5.4.12.- Composición de la LM (proteínas, grasas, HC) en función del sexo del RN	61
5.4.13.- Composición de la LM en función de la edad de la madre	62
5.4.14.- Relación entre los niveles de CPF y la calidad de la LM	62
5.4.15.- Relación entre los niveles de CPF y haber recibido antibióticos prenatales	62
5.4.16.- Relación entre los niveles de CPF y haber recibido antibióticos postnatales	63
5.4.17.- Relación de CPF en función del sexo	63
5.4.18.- Relación entre los niveles de CPF y el peso al nacimiento	63
5.4.19.- Relación entre niveles de CPF y la edad gestacional	64
5.4.20.- Relación entre los niveles de CPF y la vía de parto	64
5.5.- Análisis microbiológico de heces y LM	64
5.5.1.- Relación entre biodiversidad en LM/heces en relación con tipo de parto	64
5.5.2.- Relación entre biodiversidad en LM/heces y el estrés materno	65
5.5.3.- Estudio del filo en las muestras de LM y heces	66
5.5.4.- Relación entre el filo en la LM y heces según el tipo de parto	66
5.5.5.- Relación entre el orden de especie en LM y heces y el tipo de parto	68
5.5.6.- Valoración del filo en la LM y heces en función del estrés materno	70

5.5.7.- Filo y antibióticos prenatales y postnatales	72
5.5.8.- Estudio de la biodiversidad (I Shannon) en heces y LM en relación con los antibióticos prenatales	76
5.5.9.- Estudio de la biodiversidad (I Shannon) en heces en relación con los antibióticos postnatales	76
5.5.10.- Relación del orden taxonómico en LM en función del estrés materno	76
5.5.11.- Relación entre CPF y Clostridiales en heces	78
5.5.12.- Géneros más frecuentes en heces y LM por positividad en las muestras	79
5.5.13.- Especies más frecuentes en heces y LM por positividad en las muestras	80
5.5.14.- Relación entre Bifidobacteriales, Lactobacillales y Clostridiales en función del tipo de parto	82
6.- Discusión	85
6.1.- Escala de estrés parental (PSS:NICU)	85
6.2.- Cantidad de LM	88
6.2.1.- Cantidad de LM y estrés	90
6.3.- Composición de la LM	92
6.3.1.- Composición de LM y estrés	93
6.3.2.- Macronutrientes de LM relacionados con el tipo de parto y sexo del recién nacido	94
6.4.- Cantidad de LM y macronutrientes en relación con la edad de la madre	94
6.5.- Estrés y su modulación (estudios, método canguro y morbilidades del RN)	95
6.6.- Calprotectina fecal	96
6.6.1.- Niveles de CPF	96
6.6.2.- Niveles de CPF y composición de la LM	97
6.6.3.- Niveles de CPF y sexo	97
6.6.4.- Niveles de CPF y antibióticos prenatales	97
6.6.5.- Niveles de CPF y antibióticos postnatales en el recién nacido	97
6.6.6.- Niveles de CPF y peso al nacimiento	98
6.6.7.- Niveles de CPF y edad gestacional	98
6.6.8.- Niveles de CPF y tipo de parto	98
6.7.- Análisis microbiológico	99
6.7.1.- Biodiversidad de microbiota en heces y LM en función de la vía de parto	99
6.7.2.- Biodiversidad en LM y heces del recién nacido en relación con el estrés materno	101
6.7.3.- Filos más frecuentes en LM y heces	103

6.7.4.- Filos más frecuentes en LM/heces en relación con el tipo de parto	104
6.7.5.- Orden más frecuente en LM/heces relacionado con la vía de parto	106
6.7.6.- Valoración del filo en la LM y heces en función del estrés materno	106
6.7.7.- Filo predominante en heces/LM en relación con la presencia de antibióticos	107
6.7.7.1.- Heces y antibióticos prenatales	107
6.7.7.2.- Heces y antibióticos postnatales	108
6.7.7.3.- LM y antibióticos prenatales	109
6.7.8.- Biodiversidad en LM/heces y antibióticos prenatales y postnatales	109
6.7.9.- Taxones a nivel de orden en la LM cuando el estrés es alto y bajo	110
6.7.10.- Taxones a nivel de género en LM y heces	111
6.7.11.- Estrés y LM	111
6.7.12.- Relación entre CPF y Clostridiales en heces	112
6.7.13.- Bifidobacteriales, Lactobacillales y Clostridiales en función del tipo de parto	112
6.7.14.- Especies en LM y heces	113
6.7.15.- La importancia de la microbiota materna transmitida al recién nacido prematuro	113
7.- Conclusiones	117
8.- Bibliografía	119
Anexo 1. Variables sociodemográficas	133
Anexo 2. Escala de estrés parental (PSS:NICU)	135
Anexo 3. Cantidad de leche materna extraída	139
Anexo 4. Información a los padres previa al estudio	141
Anexo 5. Consentimiento informado	143
Anexo 6. Comité de ética	145
Anexo 7. Iconografía	147
Anexo 8. Aportaciones científicas	149

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.- Subescalas de PSS:NICU	18
Tabla 4.1.- Plan de trabajo	38
Tabla 4.2.- Grado de estrés	39
Tabla 5.1.- Muestras obtenidas durante el estudio	47
Tabla 5.2.- Muestras secuenciadas con alto valor biológico	47
Tabla 5.3.- Descripción global de la muestra	49-50
Tabla 5.4.- Niveles de macronutrientes de nuestra muestra de LM	53
Tabla 5.5.- Relación entre método canguro y estrés	55
Tabla 5.6.- Relación entre puntuación de estrés y nivel de estudios de la madre	55
Tabla 5.7.- Variación de la puntuación del estrés materno según el estado clínico del recién nacido	56
Tabla 5.8.- Producción de LM en relación con estrés alto o bajo	57
Tabla 5.9.- Relación entre producción de LM y estrés (ninguno/leve, moderado/grave)	57
Tabla 5.10.- Producción de LM en relación con la vía de parto	58
Tabla 5.11.- Producción de LM en función de la edad materna	58
Tabla 5.12.- Relación entre estrés y producción de LM < 500ml ó ≥ 500ml a los 15 días	60
Tabla 5.13.- Composición de la LM en función de la vía de parto	61
Tabla 5.14.- Composición de la LM en función del sexo del recién nacido	62
Tabla 5.15.- Niveles de CPF en función de haber recibido antibióticos prenatales	63
Tabla 5.16.- Niveles de CPF en función de haber recibido antibióticos postnatales	63
Tabla 5.17.- Niveles de CPF en función del sexo del recién nacido	63
Tabla 5.18.- Niveles de CPF en función de la vía de parto	64
Tabla 5.19.- Valores de índice de Shannon en LM/heces en función de la vía de parto	64
Tabla 5.20.- Valores de índice de Shannon en LM/heces en función del estrés materno	65
Tabla 5.21.- Distribución de los filos en las muestras de LM y heces	66
Tabla 5.22.- Filos más frecuentes en heces y LM en parto vaginal	67
Tabla 5.23.- Filos más frecuentes en heces y LM en parto por cesárea	67
Tabla 5.24.- Orden taxonómico en LM y heces en función del tipo de parto a los 3 días	68
Tabla 5.25.- Orden taxonómico en LM y heces en función del tipo de parto a los 7 días	69

Tabla 5.26.- Orden taxonómico en LM y heces en función del tipo de parto a los 15 días	69
Tabla 5.27.- Distribución de filos en heces en función del estrés materno	70
Tabla 5.28.- Distribución de filos en LM en función del estrés materno	71
Tabla 5.29.- Distribución de filos en heces en función de haber recibido antibióticos prenatales	72
Tabla 5.30.- Distribución de filos en heces en función de haber recibido antibióticos postnatales	72
Tabla 5.31.- Distribución de filos en LM en función de antibióticos prenatales	75
Tabla 5.32.- Relación entre biodiversidad en LM/heces y administración de antibióticos prenatales	76
Tabla 5.33.- Relación entre biodiversidad en heces y administración de antibióticos postnatales	76
Tabla 5.34.- Orden taxonómico en LM a día 3 en relación con el estrés materno	77
Tabla 5.35.- Orden taxonómico en LM en día 7 en relación con el estrés materno	77
Tabla 5.36.- Orden taxonómico en LM en día 15 en relación con el estrés materno	77
Tabla 5.37.- Estudio de correlación de Spearman para CPF y Clostridiales	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.- Porcentaje de prematuridad en Galicia	1
Figura 1.2.- Porcentaje de prematuridad en España	2
Figura 1.3.- Cobertores para evitar exceso de luz	6
Figura 1.4.- Sonómetro	6
Figura 1.5.- Recién nacido prematuro en nido de contención en incubadora	7
Figura 1.6.- Contención y manipulación entre 2 profesionales	7
Figura 1.7.- Madre canguro con gemelar de 25 semanas de EG	8
Figura 1.8.- Madre canguro con prematura de 32 semanas de EG	8
Figura 1.9.- Contención por un padre	9
Figura 1.10.- Contención por enfermería	9
Figura 1.11.- Logo de AGAPREM	17
Figura 1.12.- Calostro, leche de transición y madura	22
Figura 1.13.- Factores que influyen en la microbiota del recién nacido	30
Figura 1.14.- Transmisión de la microbiota materna a través de la LM	31
Figura 4.1.- Estructura jerárquica de los taxones y ejemplo	44
Figura 5.1.- Distribución de la prematuridad por edad gestacional y peso	51
Figura 5.2.- Distribución por sexo	51
Figura 5.3.- Incremento de peso desde nacimiento hasta los 15 días	51
Figura 5.4.- Evolución del soporte respiratorio	52
Figura 5.5.- Evolución de la LM producida (mediana) a los 3, 4, 7 y 15 días	53
Figura 5.6.- LM acumulada desde los 0 a los 15 días de vida (ml)	53
Figura 5.7.- Macronutrientes de LM a los 3, 7 y 15 días. Valores medianos (g/dl)	53
Figura 5.8.- Evolución del estrés medido en las diferentes subescalas, así como el estrés total ponderado	54
Figura 5.9.- Evolución de los niveles de calprotectina fecal ($\mu\text{g/g}$ heces)	55
Figura 5.10.- Relación entre estrés y nivel de estudios materno	56
Figura 5.11.- Relación entre producción de LM y puntuación de estrés	57
Figura 5.12.- Producción de LM en relación con estrés bajo o alto	58
Figura 5.13.- Producción de LM en función de la edad materna	59
Figura 5.14.- Número de madres que producen más o menos de 500 ml a los 15 días en función de su producción a los 4 días.	60
Figura 5.15.- Macronutrientes de la LM en función de la vía de parto	61
Figura 5.16.- Macronutrientes de la LM en función del sexo del recién nacido	62

Figura 5.17.- Relación entre los niveles de CPF a los 3 días y peso al nacimiento	63
Figura 5.18.- Índice de Shannon en LM/heces a los 3, 7 y 15 días estratificado por la vía de parto.	65
Figura 5.19.- Distribución de los filos en LM y heces	66
Figura 5.20.- Distribución de filos en parto vaginal	67
Figura 5.21.- Distribución de filos en parto por cesárea	68
Figura 5.22.- Orden bacteriológico en las heces en función del parto	70
Figura 5.23.- Orden bacteriológico en la LM en función del parto	70
Figura 5.24.- Distribución del filo en LM en relación con el estrés materno	72
Figura 5.25.- Distribución de filos en heces sin antibióticos postnatales	73
Figura 5.26.- Distribución de filos en heces con antibióticos postnatales	73
Figura 5.27.- Distribución de filos en heces sin antibióticos prenatales	74
Figura 5.28.- Distribución de filos en heces con antibióticos prenatales	74
Figura 5.29.- Distribución de filos en LM en función de los antibióticos prenatales	75
Figura 5.30.- Distribución del orden taxonómico en LM en función del nivel de estrés materno	78
Figura 5.31.- Distribución del género en muestras de LM y meconio a los 3 días. Diagrama de Venn	79
Figura 5.32.- Distribución del género en muestras de LM y meconio a los 7 días. Diagrama de Venn	80
Figura 5.33.- Distribución del género en muestras de LM y meconio a los 15 días. Diagrama de Venn	80
Figura 5.34.- Distribución de especie en muestras de LM y meconio a los 3 días. Diagrama de Venn	81
Figura 5.35.- Distribución de especie en muestras de LM y meconio a los 7 días. Diagrama de Venn	81
Figura 5.36.- Distribución de especie en muestras de LM y meconio a los 15 días. Diagrama de Venn	82
Figura 5.37.- Ejemplo del binomio número 35, por parto vaginal	82
Figura 5.38.- Ejemplo del binomio número 41, con parto por cesárea	83
Figura 6.1.- Evolución de la natalidad en España desde el año 2000 hasta el 2021	85
Figura 6.2.- Cantidad de LM producida a los 15 días en nuestra muestra en relación con la cantidad ideal de 500ml/día	89
Figura 6.3.- Comparación de los niveles medianos de macronutrientes (grasa y proteínas) de nuestro estudio con los ideales del estudio de Gidrewicz	92

1.- INTRODUCCIÓN

El nacimiento de un hijo es considerado, generalmente, un acontecimiento positivo que traerá consigo una serie de cambios en la rutina cotidiana de la familia y que es asumido desde el primer momento de la gestación. El problema surge cuando ese hijo nace de forma prematura rompiendo los esquemas de normalidad, para los que los padres no están preparados. En estas situaciones, los niveles de estrés aumentan por razones como el temor a la muerte del bebé, la incertidumbre, el sentimiento de fracaso por tener un niño que va a necesitar muchos cuidados, que nace antes de tiempo, y los padres van a ver alterada la relación de apego con su hijo, temiendo por su cuidado y teniendo que delegarlo en otras personas desconocidas para ellos. Al mismo tiempo, ven alterada su rutina y conciliación familiar, sobre todo si tienen otros hijos.

1.1.- INCIDENCIA DE PARTOS PREMATUROS

Los partos de niños prematuros han ido en aumento con el paso de los años manteniéndose ya más invariable en los últimos años. Ello es debido a causas multifactoriales, como pueden ser: enfermedades maternas (infecciones, hipertensión, diabetes...), patología obstétrica y ginecológica (malformaciones uterinas, placenta previa...), estilo de vida (tabaco, abuso de sustancias tóxicas, estrés laboral...), técnicas de reproducción asistida, factores fetales (gestación múltiple, alteraciones congénitas...), edad tardía materna, etc. La prematuridad es la complicación más frecuente en la medicina materno-fetal muchas veces marcada por el propio estilo de vida, suponiendo un desafío importante a nivel mundial para la Neonatología que trata de conseguir una calidad de vida adecuada para estos pacientes. El avance en la instrumentalización y en la mejora de los cuidados y atención en los Servicios de Obstetricia y de Neonatología, hace que mejoren las expectativas de vida en estos pacientes. Los recién nacidos prematuros requieren largos tiempos de hospitalización y múltiples cuidados específicos debido a la gran inmadurez de sus órganos y sistemas, lo que va a condicionar su morbilidad a corto y largo plazo ⁽¹⁾.

A nivel mundial la tasa de prematuridad oscila entre un 5 y un 12%. En España, según el Instituto Nacional de Estadística y en base a los últimos datos del año 2020, los partos de niños prematuros suponen alrededor de un 6% de todos los partos ⁽²⁾ al igual que en Galicia que se sitúa alrededor de un 6%. (Figuras 1.1 y 1.2).

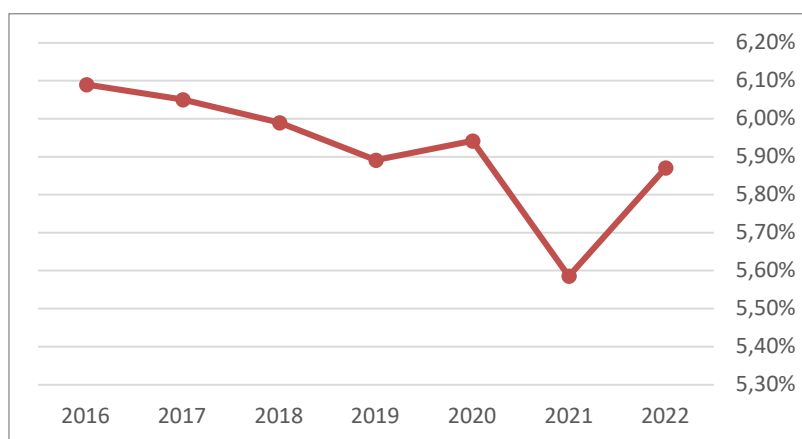


Figura 1.1.- Porcentaje de Prematuridad en Galicia

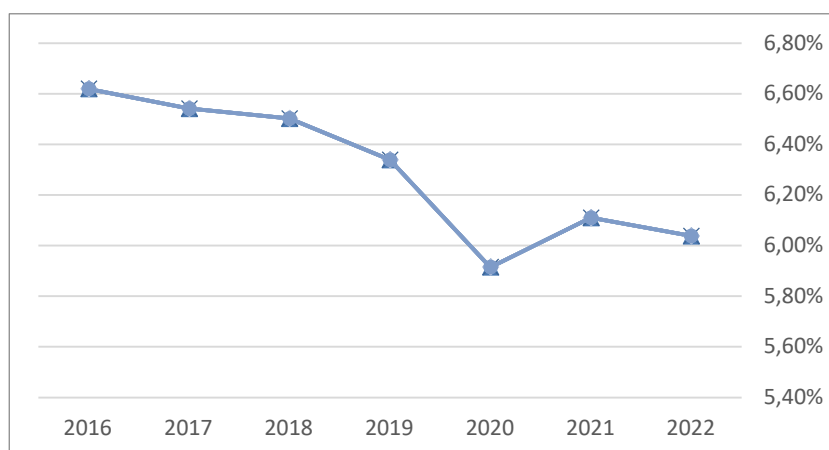


Figura 1.2.- Porcentaje de Prematuridad en España

1.2.- DEFINICIÓN DE PREMATURIDAD

Según la OMS, se considera un recién nacido prematuro a aquel nacido antes de completarse las 37 semanas o antes de 259 días de gestación. Existen diferentes grados de prematuridad según la edad gestacional (EG) y/o peso al nacimiento.

Según la EG se clasifican en:

- . Prematuro moderado: de 32+0 a 33+6 semanas de EG.
- . Prematuro tardío: de 34+0 a 36+6 semanas de EG.
- . Muy Prematuro: de 28 a 31+6 semanas de EG.
- . Extremadamente Prematuro: < 28 semanas de EG.

Según el Peso al nacimiento se clasifican en:

- . Peso normal al nacimiento: 2500- 4500 gramos.
- . Bajo peso al nacimiento: < 2500 gramos. (RNBPN).
- . Muy bajo peso al nacimiento: < 1500 gramos. (RNMBPN).
- . Extremado bajo peso al nacimiento: < 1000 gramos. (RNEBPN).

1.3.- ETAPAS PSICOLÓGICAS DEL EMBARAZO

Según el pediatra Thomas Brazelton, los nueve meses de embarazo le dan la oportunidad a los nuevos padres para prepararse psicológica y físicamente y aceptar el cambio que ocurrirá en sus vidas a partir de ahora (3). La preparación psicológica va emparejada con las etapas físicas de desarrollo del embarazo. De esta forma, se asume que, a los nueve meses, los padres estarán preparados a nivel físico y psicológico, para atender las necesidades del nuevo miembro. Se dan, según Brazelton, tres etapas diferentes, que van ligadas al desarrollo del embarazo (3):

- Adaptación a la noticia del embarazo. A medida que empiezan los cambios propios del embarazo en el cuerpo de la madre, los padres se van adaptando también a nivel psicológico. Los futuros padres quieren evitar los conflictos propios de su infancia y desean convertirse en padres perfectos, protegiendo a su futuro hijo de aquellos aspectos negativos que perciben en ellos mismos y de los fracasos percibidos en sus propias vidas.

- Primeros indicios de un ser separado. Esto ocurre a partir del quinto mes de embarazo, que es cuando la madre empieza a sentir el movimiento del bebé. Es donde comienza el vínculo más temprano ya que los padres empiezan a ver al bebé como un ser independiente. En esta etapa la madre puede recordar momentos de su infancia, con su madre, tanto positivos como negativos. Esto puede hacer que la madre sufra momentos de depresión y alegría, dependiendo

de sus experiencias previas en su relación con su madre. Quieren un niño perfecto, idealizado y empiezan a tener preferencias por el sexo.

- Aprendizaje sobre el futuro bebé. El feto ya es más autónomo y tiene sus propios ciclos de actividad, movimiento y descanso. Es cuando los padres le eligen el nombre, organizan la casa y ultiman los preparativos para integrar al nuevo miembro de la familia. Empiezan a imaginarlo con su carácter, personalidad e incluso cómo será físicamente.

Cuando tiene lugar el parto, después de esos nueve meses, los padres ya están preparados para ver a su bebé como un ser independiente, que cambiará sus vidas y su forma de organizarse para integrarlo en su núcleo familiar, adaptándose a la nueva situación. A partir de ahora, la madre se enfrenta a la abrupta pérdida de la fusión con el feto propiciada por el embarazo y tiene que ir adaptándose. Pueden aparecer sentimientos de extrañeza, añoranza por el hijo imaginario que era perfecto, y debe adaptarse al bebé real, así como aprender a tolerar las exigentes demandas del mismo.

Al producirse un parto de forma prematura, los progenitores todavía no han pasado por la última fase y no están preparados para enfrentarse al rol de padres puesto que no han tenido tiempo para asumirlo. La vivencia de las últimas etapas del embarazo, que suele coincidir con los preparativos para su nacimiento, se ve truncada y el parto prematuro se convierte en un proceso traumático, en donde los padres se encuentran en una situación de vulnerabilidad psicológica, con un gran coste emocional agravado además con el ingreso de su hijo en una Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN). Por lo tanto, se produce una alteración del proceso natural de ser padres. El nacer prematuramente hace que se bloquee el sistema representacional de los padres sobre el futuro hijo y se enfrentan a un niño frágil, real y con unas características muy diferentes a las que ellos se imaginaban ⁽⁴⁾. Necesitarán mucha ayuda para fortalecer las habilidades personales necesarias para enfrentarse a esta nueva situación.

Se denomina “anidación psicobiológica” al proceso que se da durante los nueve meses de embarazo y consiste en esa preparación tanto biológica como psicológica para el nacimiento del hijo ⁽⁵⁾. A medida que el feto va creciendo en el útero, se va desarrollando una representación en la mente de la madre, durante los nueve meses que dura el embarazo. Entre el séptimo y noveno mes de gestación, se produce un cambio en las representaciones de la madre con respecto al bebé, viéndolo como un ser más real que le sirve para ir preparándose y poder atender de forma adecuada los cuidados y necesidades de su futuro hijo ⁽⁶⁾. Al producirse el parto de forma prematura, este proceso de anidación psicobiológica se ve fuertemente alterado y los padres adquieren un nuevo rol para el que todavía no están preparados psicológicamente. Si la prematuridad es extrema, se produce una situación más angustiante en los padres, puesto que es un momento en el que no tienen una certeza médica y no pueden elaborar un desarrollo futuro con su hijo. El parto se convierte en un momento estresante y de crisis por temor a la pérdida del recién nacido. Estos padres sufren un shock inicial y un estado de desconsuelo ante la pérdida del “niño idealizado” e incluso pueden llegar a tener una desconexión con su propio hijo ⁽⁶⁾. Si el proceso de este duelo inicial se desenvuelve de forma correcta, poco a poco van asumiendo la realidad y formando parte del cuidado de sus hijos.

La etapa perinatal durante la cual el bebé prematuro nace y permanece ingresado en una UCIN, es un período crítico para las familias, puesto que no están preparadas para enfrentarse a esta nueva situación, como hemos visto. Es también un período con un elevado riesgo para iniciar un patrón alterado de apego y vínculo afectivo, condicionando el desarrollo psicológico posterior del recién nacido.

1.4.- TEORÍA DEL APEGO

La Teoría del Apego fue desarrollada por el psicoanalista John Bowlby (1969-1982) y estudiada por Mary Ainsworth, especialista en psicología del desarrollo (7). El apego se puede definir según Bowlby, como “cualquier forma de conducta que tiene como resultado el logro o conservación de la proximidad con otro individuo claramente identificado al que se considera mejor capacitado para enfrentarse al mundo. Esto resulta sumamente obvio cada vez que la persona está asustada, fatigada o enferma, y se siente aliviada en el consuelo y los cuidados”. El establecimiento de una relación de apego entre el bebé y el cuidador principal (que suelen ser los padres), promueve que se establezca un tipo particular de vínculo, que es un lazo afectivo resultado de una organización afectivo- cognitiva y que permanece en el tiempo (7, 8).

Ainsworth, estudiando la interacción entre madres y bebés, diseña una situación experimental en el laboratorio (la Situación del Extraño) y observa dos tipos de apego claramente diferenciados (9,10):

1.4.1.- Apego seguro (tipo B)

Aquel en el que se desarrolla una relación favorable entre el bebé y la madre. En este tipo de apego, la madre tiene un contacto positivo con el bebé y se muestra disponible cuando éste la demanda con su llanto o intranquilidad. La madre es sensible y responde a las llamadas del bebé, proporcionándole un ambiente de tranquilidad, seguridad y protección. El bebé así lo percibe y se establece un tipo de apego positivo. El bebé usa a la figura de apego como una base segura. Así, el niño puede explorar el mundo porque tiene la seguridad de que puede recurrir a la figura de apego siempre que lo necesite.

1.4.2.-Apego inseguro

1.4.2.1.- Apego evitativo-huidizo (tipo A)

La madre se siente amenazada por el llanto o las necesidades del bebé y se distancia emocionalmente de él. Esto hace que el niño esquive o ignore a su madre, mostrándose indiferente con ella. Los bebés, habiendo sufrido numerosos rechazos intentan negar la necesidad que tienen de su madre, para evitar frustraciones. Se muestran autosuficientes, no necesitando de otros.

1.4.2.2.- Apego ansioso-ambivalente (tipo C)

Los padres carecen de una sincronía emocional con el bebé. La figura materna en ocasiones se muestra sensible y cercana, pero en otras ocasiones es insensible y fría. Esto genera inseguridad en el niño sobre la disponibilidad de su madre cuando la necesita. El niño manifiesta también conductas ambivalentes; unas veces reacciona con cólera y otras busca desesperadamente el consuelo.

1.4.2.3.- Apego desorganizado (tipo D)

Los padres presentan una incompetencia parental crónica, con patologías psiquiátricas, alcoholismo o consumo de drogas, que lleva a una relación parental violenta, posiblemente relacionado con experiencias muy traumáticas en la infancia. Los niños se muestran con conductas confusas y desorganizadas de búsqueda y evitación.

Los estudios sobre el apego han sido muy importantes y han puesto de manifiesto que la forma en la que un niño organiza su conducta hacia sus padres o cuidadores principales afecta a la forma en la que organizará su comportamiento futuro. Por ello es necesario que se desarrolle un tipo de apego seguro entre el bebé y sus cuidadores principales porque esto determinará su desarrollo futuro. Serán personas con mayor nivel de satisfacción e implicación, confiarán en

las personas con las que se relacionan, sabrán manejar mejor las emociones negativas y buscar ayuda cuando la necesiten, enfrentándose de una forma más adecuada a las frustraciones. Sin embargo, los niños con un tipo de apego inseguro, que tuvieron experiencias negativas con sus figuras de apego, desconfiarán de las relaciones con los demás y esperan más rechazos, porque es a lo que están acostumbrados. Serán menos persistentes y competentes, tendrán menos tolerancia a la frustración, mayores niveles de ansiedad, depresión, agresividad, etc. (9) Por todo esto, es de vital importancia fomentar el apego en las familias desde el momento en el que se prevé el nacimiento de un niño prematuro, así como disminuir los efectos de la separación forzosa a la que se van a ver sometidos los padres de estos niños, debido a la hospitalización que sufren los bebés prematuros durante largos períodos de tiempo.

1.5.- UNA NUEVA FILOSOFÍA DEL CUIDADO

En las últimas décadas, el avance de la Neonatología se ha producido de una forma espectacular. Actualmente, en nuestro país se presta atención al recién nacido prematuro en todo su proceso asistencial, así como también después del alta continuando con las consultas de seguimiento hasta los 7 años de vida, como en nuestro centro.

Esto se ha conseguido después de muchos años de trabajo y estudios, en donde el descubrimiento de la incubadora, a finales del siglo XIX, marcó un antes y un después en la supervivencia y cuidado de los niños prematuros. En esta época, se mantenía a los niños separados de sus padres durante mucho tiempo viéndose que se perdía el apego entre ellos e incluso estos padres, después de un tiempo, no querían hacerse cargo de sus hijos (11). Se mantenía a los padres separados con convicciones erróneas de que éstos les podían transmitir infecciones y además así se protegía a los padres evitándoles sufrimiento al ver a sus hijos enfermos.

En los años 70, el Dr. Barnett, plantea una forma distinta en el cuidado del recién nacido, valorando la presencia de la familia en sus cuidados, que hasta ese momento no era tenida en cuenta (11). Surge así un modelo de cuidados cuyo objetivo es favorecer el desarrollo neurosensorial y emocional del recién nacido prematuro, llamado Cuidados Centrados en el Desarrollo y la Familia (CCDF), que comienza a implantarse en España a partir de 1999 (12).

Los CCDF suponen una nueva forma de cuidar situando al bebé y su familia en el centro de atención de los cuidados, haciendo que ésta forme parte de los mismos e implicándoles durante todo el tiempo de hospitalización. También supone un cambio en el entorno del recién nacido, para disminuir el estrés y favorecer el desarrollo neurosensorial. El recién nacido prematuro pasa de un ambiente protector, que es el útero materno, a un ambiente cargado de estímulos para los que no posee recursos extrauterinos adecuados para adaptarse debido a su inmadurez, lo que puede afectar a la organización de su cerebro en desarrollo. Las UCIN, por lo tanto, tienen un ambiente nocivo para el neurodesarrollo del prematuro que se ve sometido a una sobreestimulación tóxica, no estando preparados para ello.

Poco a poco, con el tiempo, tienen lugar una serie de cambios en los Servicios de Neonatología para favorecer este nuevo modelo de atención, considerando al recién nacido prematuro como un ser capaz de sentir y relacionarse. Así, con los CCDF se intentan paliar estos problemas de exceso de estimulación, cuidando el llamado macro y el microambiente, centrándose en el binomio recién nacido y familia. Se produce, por tanto, una interacción entre ambiente, recién nacido y familia (13).

Tienen lugar una serie de cambios para mejorar el llamado macroambiente, en los Servicios de Neonatología, en relación con la luz y el sonido. Los recién nacidos prematuros son muy sensibles a los estímulos luminosos. Hay estudios que demuestran que, disminuyendo la intensidad de la luz, disminuye la frecuencia cardíaca, mejora el sueño y se reduce el estrés,

mejorando la alimentación y la ganancia de peso (14,15,16). Por ello, la Sociedad Española de Neonatología (SENeo) recomienda que la intensidad luminosa sea entre 10 y 60 luxes, procurando usar luz natural, gradual e individual, protegiendo al recién nacido prematuro de la luz usando cobertores sobre las incubadoras y luces con intensidad regulable (Figura 1.3).



Figura 1.3.- Cobertores para evitar exceso de luz. (Autoría propia)

En cuanto al ruido, es necesario disponer de sonómetros en las unidades y no superar los 40 dB, según recomendaciones de la SENeo. Se debe disminuir el volumen de las alarmas y limitar las conversaciones al lado de las incubadoras, evitar los golpes de las puertas en las incubadoras, no poner objetos encima de las mismas, entre otras cosas. Se ha visto que el ruido produce hipoxemia, bradicardia, aumento de la presión arterial e intracraneal, estrés, etc (13,14,15). Por ello es muy importante controlar también los estímulos sonoros (Figura 1.4).



Figura 1.4.- Sonómetro. (Autoría propia)

En los CCDF se llevan también a cabo acciones para mejorar el llamado microambiente del recién nacido prematuro. El sistema músculo esquelético de los prematuros tiene mucha plasticidad y se adaptan fácilmente a las posiciones, llegando a producirse deformidades posturales que pueden afectar a su futuro desarrollo psicomotor. Por ello se debe prestar especial atención al cuidado postural, recogiendo en flexión, utilizando nidos de contención que proporcionen límites, tanto en la cabeza como en los pies, favoreciendo la comodidad del

recién nacido (Figura 1.5). De esta forma se posibilita la autorregulación y la capacidad para tranquilizarse, lo que ayudará en la organización de la conducta. Se deben alternar ambos lados. También se debe de estimular la flexión activa del tronco y extremidades de forma que se facilite la actividad mano-boca. Se debe de estimular la exploración visual del entorno favoreciendo la alineación del cuerpo (11).



Figura 1.5.- Recién nacido prematuro en un nido de contención, dentro de incubadora
(Fotografía realizada con la autorización de sus padres con fin docente)

Otras acciones como la mínima manipulación y conjunta del recién nacido prematuro aunando cuidados, minimiza riesgos como alteraciones en la presión arterial del neonato que puede suponer un riesgo potencial de hemorragia intracerebral. Así mismo, la manipulación del recién nacido prematuro se debe hacer entre dos personas, para favorecer la contención del mismo durante las técnicas o procedimientos que se le hagan (Figura 1.6), para evitar así el estrés y los cambios hemodinámicos o respiratorios que pueden ser derivados de la propia manipulación (11,13).

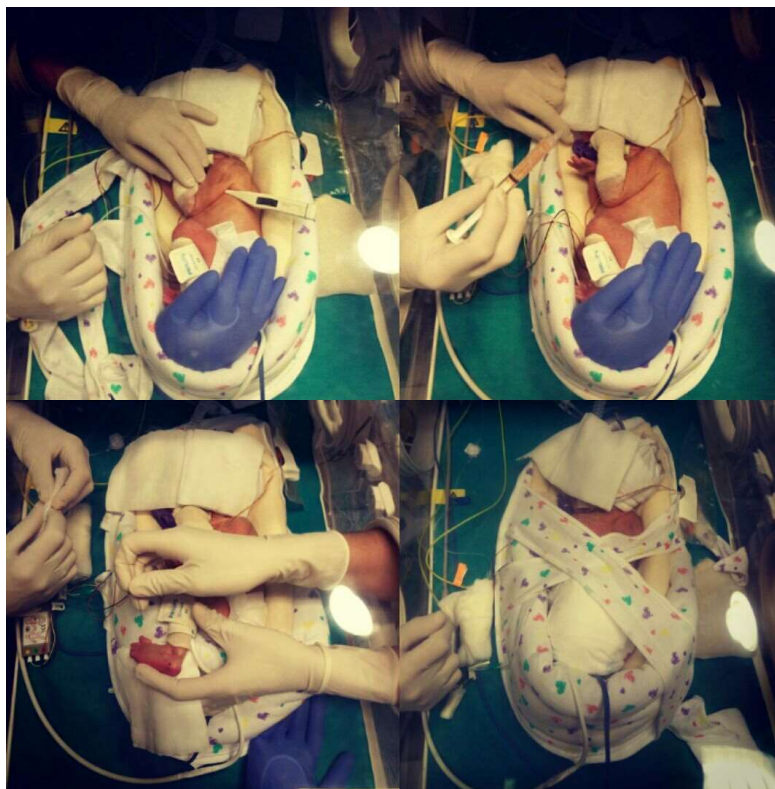


Figura 1.6.- Contención y manipulación entre 2 profesionales.
(Autoría propia)

La administración de analgesia al recién nacido prematuro ante una técnica o procedimiento doloroso, forma parte también de este tipo de CCDF, puesto que se ha demostrado que son extremadamente sensibles a los estímulos dolorosos y estos pueden producir alteraciones hemodinámicas, respiratorias o del desarrollo cerebral ^(13,14). Se deben de utilizar escalas para medir el dolor, así como analgesia farmacológica y no farmacológica, como el uso de sacarosa oral o lactancia materna, succión nutritiva o no nutritiva, para los procedimientos rutinarios. El papel que desempeña la familia como parte integrante de los cuidados del recién nacido es muy importante. La aplicación del método madre canguro para favorecer el contacto piel con piel entre el recién nacido prematuro y sus padres, lo más precozmente posible, potencia el vínculo e incrementa la confianza que los padres tienen en el cuidado de sus hijos (Figuras 1.7 y 1.8). Con el método madre canguro se consiguen unos resultados de estabilidad hemodinámica, respiratoria, metabólica, de maduración cerebral y de descanso, ideales en el recién nacido prematuro que incidirán positivamente en la ganancia ponderal y en su desarrollo neurossensorial ⁽¹¹⁾. Consiste en la colocación del bebé piel con piel con uno de los padres, durante un período no inferior a noventa minutos, puesto que un período inferior al indicado no sería suficiente para compensar el estrés al que se ven sometidos estos niños al ser sacados de su ambiente de la incubadora. Los padres deben tener el tórax descubierto para favorecer el contacto con su hijo, sin cadenas, pulseras, colonias ni perfumes que alteren su propio olor corporal. Se pondrán simplemente una camiseta limpia, preferiblemente de algodón, o una faja, donde le colocaremos a su hijo, para que esté lo más recogido y cómodo posible, durante el tiempo que ellos quieran. Es muy recomendable también para favorecer la lactancia materna, que es el alimento ideal para todo recién nacido ^(13,14).



Figura 1.7.- Madre canguro con gemelar de 25 semanas de EG



Figura 1.8.- Madre canguro con prematura de 32 semanas de EG

(Fotografías realizadas con la autorización de sus padres con fin docente)

Los CCDF han supuesto una revolución en la manera de cuidar a los recién nacidos prematuros, puesto que implica una serie de cambios importantes en los Servicios de Neonatología, así como en la forma de trabajar de sus profesionales. Se permite la entrada de los padres a las unidades

las 24 horas del día y pasan a formar parte activa en el cuidado de sus hijos, favoreciéndose además una relación de apego y un vínculo desde los primeros momentos del ingreso en la UCIN (Figuras 1.9 y 1.10). El ambiente pasa a ser más silencioso y con menos estímulos ya que pueden perjudicar el sistema nervioso central (SNC) inmaduro del niño prematuro, favoreciendo así su neurodesarrollo (16).



**Figura 1.9.- Contención por un padre
(Autoría propia)**



**Figura 1.10.- Contención por enfermería
(Autoría propia)**

El programa NIDCAP (Newborn Individualized Developmental Care and Assessment Program), es el modelo de CCDF más desarrollado en la actualidad y hace hincapié en la individualidad de cada recién nacido. El NIDCAP ofrece una metodología para la formación de todos los profesionales implicados en el cuidado de los recién nacidos prematuros (17). Esta formación sólo puede ser impartida por personal cualificado y autorizado para la misma, dependiendo de los centros acreditados por la Federación Internacional de NIDCAP.

1.6.- EL ESTRÉS

La OMS define el estrés como “el conjunto de reacciones fisiológicas que prepara al organismo para la acción” (18). El estrés es considerado un proceso normal en nuestras vidas, que se pone en marcha cuando percibimos una situación como amenazante, actuando como un estímulo que nos prepara para emitir una respuesta ante esa amenaza. A esto se le conoce como “eustrés”; cuando hay una activación adecuada ante una respuesta del ambiente. Por el contrario, cuando ante una activación del ambiente percibimos que la situación escapa a nuestro control, se produce el llamado “distrés”. El estrés se entiende, por tanto, como una interacción entre sujeto y entorno. Si el sujeto posee recursos para enfrentarse a esa situación nueva emitida por el entorno, estaríamos ante un caso de eustrés, sin embargo, si el sujeto no tiene recursos suficientes para enfrentarse a esa nueva situación del entorno y esto le genera un elevado malestar, estaríamos ante una situación de distrés.

Según la Academia Americana de Psicología, hay tres tipos de estrés, relacionados con su duración en el tiempo (19):

1.6.1.- Estrés Agudo

Es la forma más habitual de estrés y surge de las exigencias de un pasado reciente y las presiones anticipadas del futuro cercano. Suele ser emocionante y fascinante, a pequeñas dosis.

Suele ocurrir en un corto plazo de tiempo, es fácilmente manejable y sus síntomas más importantes son:

- Agonía emocional; irritabilidad, ansiedad y depresión.
- Problemas musculares; cefaleas y tensiones musculares.
- Problemas estomacales; acidez, flatulencia, intestino irritable, etc.
- Sobreexcitación pasajera, con aumento de la presión arterial, frecuencia cardíaca, mareos, etc.

1.6.2.- Estrés Agudo Episódico

Se refiere a personas que sufren un estrés agudo frecuente, con vidas bastante desordenadas, que asumen demasiadas responsabilidades y son demasiado autoexigentes. Suelen tener mal carácter, personas ansiosas y con relaciones interpersonales alteradas. Tienen una personalidad tipo A y síntomas relacionados con la tensión muscular mantenida en el tiempo; migrañas, hipertensión arterial o enfermedades cardíacas.

1.6.3.- Estrés Crónico

Se trata de un estrés mantenido en el tiempo, que no cesa, mermando capacidades en la persona que lo sufre, consumiendo los recursos físicos y mentales. No visualizan una salida, no tienen esperanza e incluso se acostumbran a ese estado asumiéndolo como normal. Puede terminar en abandono, suicidio, violencia, etc.

El concepto de estrés fue popularizado por Hans Selye (20), quien lo entiende como “el estado que se manifiesta por un síndrome específico, consistente en todos los cambios inespecíficos inducidos dentro de un sistema biológico. Así, el estrés tiene su forma y composición características pero ninguna causa particular”. El agente desencadenante atenta contra la homeostasis del organismo.

Hay múltiples formas de estudiar el estrés, sin embargo, se puede conceptualizar desde tres perspectivas teóricas (20):

- El estrés como una respuesta o reacción del organismo ante una situación que le exige una fuerte demanda. H. Selye, con su Teoría del Estrés, es uno de los autores que representa este enfoque. Ante un agente identificado como “estresor”, que puede ser psicológico, cognitivo o emocional, se producen una serie de respuestas o reacciones biológicas y emocionales, tales como la activación del sistema hipotálamo-hipofisario, suprarrenal y del Sistema Nervioso Autónomo. Si estas respuestas se mantienen en el tiempo, estaríamos ante el Síndrome General de Adaptación, en el que veríamos tres fases:
 - . Fase de Alarma; cuando nos enfrentamos por primera vez a un agente estresor. Es el momento en el que el organismo se percata del agente nocivo causante del estrés y se activa el Sistema Nervioso Simpático y la corteza-médula suprarrenal, secretándose glucocorticoides y adrenalina. Esto hace que se movilen los recursos energéticos necesarios para hacer frente a la situación.
 - . Fase de Resistencia; en donde el organismo se adapta al estresor con la consecuente disminución de los síntomas de la fase de alarma.
 - . Fase de Agotamiento; si el cuerpo sigue expuesto al estresor de forma prolongada, se pierde la adaptación de la fase anterior y reaparecen los síntomas de la fase de alarma.
- El estrés como un estímulo. Es el llamado Enfoque Psicosocial o de los sucesos vitales. Uno de los teóricos más importantes de este enfoque es H. Holmes, quien universalizó una línea de investigación sobre el estrés y la salud. En este caso, el estrés se localiza

fuera del individuo. Son los estímulos del ambiente los que perturban el funcionamiento del organismo y éste necesita un reajuste. Los sucesos vitales son experiencias objetivas que causan un reajuste en la conducta del individuo. Hay determinados sucesos vitales que llevan al individuo a una reacción de estrés. Éstos se dividen en; sucesos vitales estresantes (grandes catástrofes naturales, pérdida de personas, etc), sucesos vitales menores o contratiempos del día a día, y estresores menores estables, que están presentes de forma permanente y constante, aunque son poco intensos (como un ruido mantenido). Los sucesos vitales pueden actuar como factores predisponentes o precipitantes, en relación con el inicio del trastorno que genera el estrés. Sucesos ocurridos durante la infancia, tales como la pérdida de algún ser querido, el maltrato infantil, entre otros, pueden actuar como factores predisponentes e incrementar la vulnerabilidad individual ante un suceso vital reciente causante de estrés (21).

- El estrés como interacción entre las características de la situación y los recursos del individuo. Lazarus y Folkman (20), son los autores de la perspectiva interaccional, definiendo el estrés como “el conjunto de relaciones particulares entre la persona y la situación, siendo ésta valorada por la persona que excede sus propios recursos y que pone en peligro su bienestar personal”.

Según el Modelo de Lazarus y Folkman (20), es más importante la valoración que hace el individuo de la situación causante del estrés, que las características objetivas de dicha situación. La evaluación actúa como mediador cognitivo de las reacciones de estrés. Lazarus nos habla de tres tipos de evaluación;

- A- Evaluación primaria; cuando nos encontramos por primera vez ante el causante del estrés, pudiendo desencadenar cuatro tipos de respuestas;
 - Amenaza; anticipación de un daño que ocurrirá de forma inminente. Es el llamado “estrés de amenaza”.
 - Daño o Pérdida; daño psicológico que ya se ha producido. Es el llamado “estrés de pérdida”.
 - Desafío; cuando el individuo se enfrenta a una demanda difícil, pero se siente seguro para superarla, con estrategias de afrontamiento adecuadas. Es el llamado “estrés de desafío”.
 - Beneficio; esta respuesta no induciría ningún tipo de estrés.
- B- Evaluación secundaria; cuando vemos de qué recursos disponemos para enfrentarnos a la situación estresante. Así, los recursos personales de los que disponga el sujeto van a determinar que se sienta asustado, desafiado u optimista.
- C- Reevaluación; en donde valoramos los procesos de feedback derivados de la interacción entre el individuo y las demandas internas, pudiendo hacer correcciones sobre valoraciones previas y mejorar así nuestros recursos de afrontamiento.

Según Lazarus, la evaluación cognitiva que se hace de una situación estresante es la que determina que se llegue a producir o no estrés en el individuo (20). De esta forma, cuando una persona valora una situación como amenazante, tiene lugar una reacción de ansiedad que será mayor cuanto menor sea su capacidad de afrontamiento ante dicha amenaza. Actualmente, se entiende por afrontamiento a los esfuerzos cognitivos y conductuales que el individuo hace para hacerle frente al estrés.

Los recursos de afrontamiento son las características personales y sociales en los que se basan las personas para hacer frente al estrés. El apoyo social se refiere a los recursos sociales que posee el individuo y que le van a ayudar o no, a superar el problema que le genera el estrés. Es

muy importante la valoración que el individuo haga sobre el apoyo social que tiene, puesto que no es lo mismo el apoyo social real que el apoyo social percibido ⁽²⁰⁾. Los efectos del apoyo social percibido (sentirse comprendido y querido por otros) parecen ser más significativos que los del apoyo social recibido. Por lo tanto, el apoyo social ejerce un papel protector de la salud de las personas, sobre todo cuando están pasando por momentos muy estresantes, actuando como un amortiguador del estrés. La sensación de pertenencia a un grupo ayuda a incrementar la autoestima, a controlar la información relacionada con el estrés, aumentando la resistencia a los efectos del mismo ⁽²¹⁾. De ahí la gran importancia que tienen los grupos de apoyo en determinadas situaciones altamente estresantes, como en el afrontamiento del cáncer, catástrofes y otras situaciones como puede ser el nacimiento de un niño prematuro.

Las características personales van a influir en la respuesta al estrés. M. Friedman y R. Rosenman, observaron que las reacciones ante el estrés variaban en base a unos rasgos de personalidad identificables. De esta forma, personas con características de personalidad similares, experimentarán respuestas ante el estrés también similares. Estos 2 cardiólogos, estudiando personas afectadas de dolencias cardíacas, fueron los primeros en relacionar el tipo de personalidad con determinadas enfermedades. Ellos describen 2 tipos de personalidad diferenciadas (A y B) y posteriormente se han estudiado otras 2 ⁽²²⁾:

➤ Personalidad tipo A:

- Competitivos; buscan el éxito, altamente autoexigentes, perfeccionistas y autocríticos.
- Hostiles si no consiguen el objetivo marcado, mostrando agresividad.
- Impacientes; son impulsivos, estrictos con horarios, plazos de entrega, reglas.
- Elevada necesidad de control, gran implicación en las tareas, dificultad para trabajar en equipo.
- Baja tolerancia a la frustración.
- Nerviosismo, agitación.
- Poca capacidad para la relajación y desconexión.

Friedman y Rosenman, estudiaron este tipo de conducta representada por un elevado nivel de competitividad y lo relacionaron con una probabilidad mayor de padecer enfermedades de tipo coronario; como hipertensión arterial, cardiopatías isquémicas, hipercolesterolemia, etc. Lo relacionan también con la ansiedad y el mayor abuso de tabaco y consumo de otras sustancias.

➤ Personalidad tipo B:

- Asertivo.
- Reflexivo.
- Relajado y tranquilo; disfruta de lo que hace.
- Satisfecho y seguro de sí mismo.
- Empático y emotivo.

Es un tipo de personalidad que nos protege del estrés y hace que nos enfrentemos a él de una forma positiva y constructiva.

➤ Personalidad tipo C: Son personas con una tendencia a la represión emocional, sobre todo referente a los sentimientos negativos, y suelen tener problemas con el afrontamiento al estrés.

➤ Personalidad tipo D: Tendencia a las emociones negativas, pesimistas, baja autoestima, depresivos, ansiosos y con un pobre apoyo social percibido.

Hay que tener en cuenta, por tanto, que existen un conjunto de variables personales que van a modular las reacciones del individuo frente a las situaciones de estrés. Esto es lo que explica

las diferencias individuales en las reacciones de estrés. Así, por ejemplo, una persona neurótica valora una situación estresante como más amenazante evocando una sintomatología mayor que una persona no neurótica. Una persona optimista, con un locus de control interno y adecuada autoestima, se enfrentará al estrés usando estrategias focalizadas en el problema y llevando a cabo acciones para aliviar sus síntomas y superarlo (20). Por lo tanto, hay variables de personalidad consideradas potenciadoras de la salud, como; el optimismo, el sentido del humor, la autoestima, la motivación o el “hardiness” (la resistencia ante el estrés). Otro tipo de variables como; la reactividad al estrés, el estilo represor, la alexitimia (incapacidad para describir verbalmente la experiencia emocional) o la personalidad tipo A, C ó D, se consideran facilitadoras de enfermedad.

Estas variables de personalidad también van a influir en el apoyo social, puesto que está determinado por el grado con el que el sujeto se relaciona con otra gente. Existe una relación positiva entre extroversión y el tamaño de la red social o disponibilidad de apoyo. Las personas con un menor manejo de habilidades sociales pueden demandar mayor apoyo, ser más dependientes y deteriorar la red de apoyo social disponible, es decir, aprovechan peor los recursos que tienen que aquellos que poseen un mayor manejo de las habilidades sociales (20).

El estrés produce en el organismo unas respuestas fisiológicas claramente identificadas, que afectan a diferentes órganos y sistemas, debido a una alteración en la actividad neuroendocrina. Así se pueden observar diferentes síntomas como: aumento de la frecuencia cardíaca, respiratoria, de la presión arterial, de la liberación de glucosa, de las secreciones gástricas, de la tensión muscular general, etc. También se producen respuestas psicológicas, sobre todo de tipo emocional; como ansiedad, miedo o depresión. Pueden ser también respuestas de tipo cognitivo-conductual, más dependientes de los modos de afrontamiento individual.

Según la teoría Psicósomática de H. Eysenck y Grossarth-Maticek (20), existen seis tipos de reacción al estrés:

- 1- Tipo I: Predisposición al cáncer. Son personas con un alto grado de dependencia conformista. Reaccionan ante situaciones de estrés con sentimientos de desesperanza, indefensión, con tendencia a idealizar los objetos emocionales y reprimen las reacciones emocionales abiertas. Predomina la hipoestimulación.
- 2- Tipo II: Predisposición a la cardiopatía. Reaccionan al estrés con excitación general, ira, agresividad e irritación crónica. Evalúan de forma extrema las personas u objetos perturbadores, soliendo fracasar al establecer relaciones emocionales estables. Predomina la hiperexcitación.
- 3- Tipo III: Histérico. Son personas que se alternan entre los tipos I y II. Emocionalmente presentan sentimientos de indefensión y desesperanza, pero también ira, agresión e irritabilidad. Predomina la ambivalencia.
- 4- Tipo IV: Saludable. Son personas con un elevado grado de autonomía. Afrontan el estrés con estrategias de aproximación o evitación, de forma correcta. Predomina la autonomía personal.
- 5- Tipo V: Racional- Antiemocional. Suprimen o niegan las manifestaciones afectivas y tienen problemas para expresar las emociones. Están más predispuestas a la depresión y el cáncer. Predomina lo racional sobre lo emocional.
- 6- Tipo VI: Antisocial. Reaccionan al estrés con comportamientos antisociales o criminales. Son personas predispuestas al consumo de drogas. Predomina la conducta psicopática.

Estos autores, han elaborado un cuestionario para evaluar los seis tipos de reacción al estrés. El cuestionario recibe el nombre de SIRI (Short Interpersonal Reactions Inventory), para el que

existe una versión adaptada en español, sobre el que han trabajado posteriormente otros autores como Sandín, entre otros.

En definitiva, la vivencia del estrés como algo positivo o negativo, dependerá de la valoración que el sujeto haga acerca de las demandas de la situación, así como de sus propias capacidades para enfrentarse a las mismas. Constantemente nos enfrentamos a nuevas situaciones y a modificaciones del ambiente en el que nos encontramos, percibimos esas modificaciones, las interpretamos y vamos adaptándonos a ellas poniendo en marcha determinadas conductas. El estrés nos afectará más o menos, dependiendo de las características individuales y de la evaluación cognitiva que éste haga.

1.7.- EL ESTRÉS ANTE UN PARTO PREMATURO

1.7.1.- Crisis emocional

El parto prematuro, implica la interrupción en la vida mental de la madre acerca de las representaciones de su bebé imaginario, como hemos visto anteriormente. Estos padres van a verse sometidos a una crisis emocional, donde predominan sentimientos negativos de culpa, impotencia, miedo, rechazo, incertidumbre, pérdida de control, entre otros, para los que no están preparados, careciendo de mecanismos de afrontamiento previos, a no ser que ya hayan pasado por una situación similar. Se enfrentan a una situación nueva, en la que temen por la vida de su hijo o tienen miedo a las posibles secuelas que pueda sufrir en el futuro, pero además deben afrontar un proceso de separación del bebé y una ruptura de su vida familiar, sobre todo si tienen otros hijos u otras cargas familiares.

La crisis emocional que se produce en los padres de niños prematuros les causa una desorganización en su vida emocional, puesto que supone enfrentarse a esa situación nueva, para la que no poseen herramientas y les cuesta controlar sus sentimientos y aceptar la situación en la que se ven envueltos. Les supone también una desorganización en su vida familiar, laboral y/o económica, porque van a dedicar muchas horas a estar en el hospital desatendiendo otras facetas de su vida, lo que incrementa más su nivel de ansiedad. Cada nacimiento prematuro lleva implícito una vida familiar particular, con una serie de características propias de cada familia que puede hacer que su nivel de estrés aumente.

Los propios síntomas del estrés en los padres pueden interferir en la interacción con su hijo, así como en la comunicación con los profesionales que se encargan de su cuidado. Esto obliga a que el equipo de salud tenga que estar preparado para evitar estos efectos negativos en los padres, manteniendo una relación terapéutica lo más efectiva posible.

1.7.2.- Etapas Emocionales

Hay autores que definen las etapas emocionales por las que van pasando estos padres, a lo largo del proceso de afrontamiento (23). El choque inicial es la primera respuesta de los padres a la noticia, en donde suelen quedarse conmocionados por la misma siendo incapaces de procesar la información que reciben. Aparecen sentimientos de impotencia, insomnio, llanto, etc. A continuación, pueden tener una fase de negación, donde evitan admitir la situación que tienen y aparece el miedo en forma de “duelo anticipado” para dejar paso al momento en el que entran en juego las creencias religiosas y en el que se hace un “pacto con Dios”, en aquellas personas que son creyentes. Más tarde, aparece la ira, que puede proyectarse hacia la pareja o el personal sanitario, la tristeza, la culpa, la ansiedad, hasta que poco a poco las emociones negativas se van atenuando y dejan paso a las emociones más positivas, los padres son cada vez más participativos en los cuidados y van aceptando la nueva situación reorganizando su vida nuevamente.

El nacimiento prematuro, por lo tanto, se considera un acontecimiento traumático que tiene una gran repercusión emocional en los padres. En la madre, se produce además una doble crisis emocional, puesto que está perdiendo su embarazo para lo que todavía no está preparada, y al mismo tiempo pierde la cercanía con su hijo, debido a la necesidad indispensable de asistencia en un entorno mecanizado para asegurar su estabilidad. Así, los primeros momentos del vínculo, tienen lugar en un ambiente totalmente diferente al esperado por los padres, donde además hay poca intimidad, otros pacientes graves y una actividad asistencial intensa.

1.7.3.- Estrés y procesos de duelo

Se puede asumir que un parto prematuro lleva implícitos varios procesos de duelo que deben ser manejados de forma correcta por sus padres, para que sean correctamente superados. Se produce un duelo por la pérdida de la gestación y por no poder concluir adecuadamente el embarazo, un duelo ante la imposibilidad de tener un parto normal y esperado, un duelo ante la separación forzosa que tiene lugar después del nacimiento e incluso un duelo anticipado causado por el miedo a que su hijo no sobreviva a esa prematuridad. El duelo anticipatorio puede producir importantes dificultades en el establecimiento del vínculo, puesto que los padres evitan la interacción con su hijo por temor a la pérdida del mismo. Lo ven muy frágil y temen que no sobreviva. De esta forma quieren evitar el intenso dolor cuando lo pierdan ⁽²⁴⁾.

La imagen que causa en sus padres el niño prematuro es una imagen de un niño inmaduro, frágil y vulnerable. Físicamente no se parece a la imagen que sus padres se esperaban. Esto también puede provocar un duelo por ese bebé perfecto e imaginario para el que sus progenitores sí estaban preparados. Esto puede causar problemas a la hora de establecer un adecuado vínculo paterno- filial ^(24,25).

Se produce una pérdida prematura de ese niño idealizado que además se ve agravado por la hospitalización y separación de sus progenitores. No pueden ejercer su papel de padres, para el que se estaban preparando durante los meses de embarazo, pero además han de delegar esos cuidados en gente que para ellos es desconocida, que forma parte del equipo sanitario que se ocupará de su hijo.

El hecho de no poder ejercer el rol de padres como habían esquematizado hace que esta situación genere un elevado estrés en los padres. Suelen aparecer sentimientos de frustración, incapacidad e irritabilidad por no poder cuidar a sus hijos y verlos sometidos a procedimientos médicos que les pueden causar sufrimiento.

Los padres necesitan estar en contacto con sus hijos, acariciarlos, cogerlos en brazos, para favorecer el vínculo. Necesitan poder protegerlos y calmarlos cuando sienten que existe una amenaza para ellos, sin embargo, no pueden hacerlo porque están ingresados en un ambiente que no es conocido y no es el suyo, necesitando otro tipo de cuidados que ellos no habían programado y que no les pueden dar. Las madres necesitan poder dar el pecho a sus hijos para estrechar lazos de vínculo materno filial, pero tampoco pueden hacerlo de forma directa, aunque sí de una forma diferida, sacándose leche de una manera artificial con un sacaleches para alimentar posteriormente a su hijo. Por tanto, un ingreso en una UCIN hace que se pueda retrasar el establecimiento del vínculo, sobre todo si es un ingreso largo como es el caso de los grandes prematuros. El propio entorno de la UCIN va a frustrar el apego de los padres ⁽²⁵⁾.

1.7.4.- Estrés postraumático

El estrés agudo inicial, si no es manejado de una forma correcta, puede causar un trastorno por estrés postraumático, cuyos efectos van a mantenerse en el tiempo, en la forma de recuerdos invasivos, imágenes persistentes en la memoria o con intentos por olvidar determinadas

experiencias vividas que les han causado un gran sufrimiento, manteniendo una cierta alerta emocional. Esto puede influir de forma negativa en su papel como cuidadores en el futuro (26).

1.7.5.- El estrés ante el ambiente de la UCIN

El ambiente de una UCIN es extraño y hostil para los padres. Es algo muy novedoso e impactante para ellos, sobre todo si su hijo es un gran prematuro que necesite muchos cuidados. Esto genera una gran inestabilidad emocional en los padres, que pueden llegar a bloquearse emocionalmente los primeros días, perdiendo completamente el control de la situación.

El propio ambiente de la UCIN actúa como un factor estresante en sí mismo, al margen de lo que están viviendo. La presencia de otros niños enfermos y graves, las alarmas de los monitores, los aparatos a los que están conectados sus hijos, el gran número de personal sanitario, las situaciones críticas que presencian, así como la propia dinámica de trabajo, generan un impacto importante en los padres, causándoles un elevado grado de estrés puesto que sienten una falta total de control de la situación (24, 25, 27).

El funcionamiento dinámico y acelerado de la UCIN, hace que muchas veces los padres perciban un sentimiento de exclusión en el cuidado de sus hijos, incrementando más todavía el estrés e interrumpiendo el progreso en el desarrollo del vínculo, llevando incluso a una sensación de liminalidad parental. Van experimentando sentimientos desde la distancia hasta una cercanía emocional (28,29). En otras ocasiones, perciben que se presta más atención a la madre que al padre, como cuidador principal, ofreciéndole más apoyo a la figura materna (28,30). Todas estas percepciones subjetivas, por parte de los padres, hacen que los niveles de estrés aumenten en ellos y sientan una falta de apoyo por parte del personal sanitario.

La preocupación cada vez mayor por el estrés sufrido por los padres de niños prematuros ingresados en las UCIN, hace que diferentes autores investiguen sobre el tema y es así como surge el interés por evaluar el nivel de estrés percibido por los padres. Se desarrollan varias escalas para medir el estrés en esas circunstancias donde se valoran diferentes ítems causantes de estrés. Una de las autoras que ha investigado mucho sobre el tema es Margaret Miles (31), elaborando una escala de estrés parental para la UCIN.

1.8.- SENTIMIENTOS QUE EXPERIMENTAN LOS PADRES DE NIÑOS PREMATUROS

Como hemos visto hasta ahora, los padres son también prematuros en su rol de padres y enfrentarse a esta situación nueva genera un elevado grado de estrés y un desbordamiento emocional. Van a ver cómo se alteran completamente los planes que tenían con su futura familia.

No están preparados psicológicamente para asumir la faceta de padres tan prematuramente y necesitan disponer de estrategias de afrontamiento personales adecuadas para enfrentarse a la situación. El equipo sanitario juega aquí un papel relevante, puesto que se debe de cuidar tanto al recién nacido prematuro como a sus padres, que también lo son prematuramente.

Los padres, suelen experimentar sentimientos de irrealidad, sobre todo al principio. Se comportan como simples observadores e incluso tienen miedo de tocar a su hijo, porque lo ven muy frágil, y se mantienen a distancia.

Son frecuentes los sentimientos de culpa, sobre todo en la madre, porque cree que es culpa de ella que el embarazo haya llegado a su término antes de tiempo. Piensan en todo lo que han hecho en las últimas semanas y creen que los cuidados que tuvo durante el embarazo no fueron suficientes (32). Estos sentimientos de culpa suelen intensificarse en aquellos padres que han tenido tratamientos prolongados, difíciles y repetidos, de reproducción asistida.

Aparecen sentimientos de ansiedad, angustia, impotencia, tristeza que incluso se puede transformar en depresión, y sobre todo mucho estrés (33). Todo esto se potencia si los padres

tienen otros hijos pequeños en casa u otras cargas familiares que hace que la situación se complique al tener problemas para poder conciliar la vida familiar con la laboral, teniendo en cuenta que pasarán mucho de su tiempo en el hospital. Necesitan adaptar sus rutinas familiares a la nueva situación. Supone una sobrecarga emocional y física que muchos padres no son capaces de sobrellevar. Es una experiencia traumática que acabará marcando sus vidas, ya que sufren un impacto emocional, familiar, social y ocupacional.

El miedo a lo que pasará con su hijo, es uno de los sentimientos más descritos. Miedo a la muerte, a las secuelas que puedan quedarle, a si van a ser capaces de asumir tantos meses de hospitalización y separación de su hijo. La incertidumbre sobre lo que les deparará el futuro les acompaña incluso hasta después de la hospitalización (23,34).

En algunos padres hay un cierto componente de estrés postraumático en el que experimentan sentimientos negativos de forma puntual, aunque crónica, a lo largo de la infancia de su hijo, cuando éste sufre alguna enfermedad o intervención quirúrgica.

En definitiva, los padres acumulan un compendio de sentimientos, tanto negativos como positivos, por su hijo prematuro. Así, sus reacciones pueden ser muy variadas y van desde los padres que intentan visitar poco a su hijo para procurar encariñarse menos con él, por si éste fallece, o aquellos padres que no salen del lado de su hijo y dejan su vida completamente a un lado, tanto la familiar como la personal.

En cuanto a la actitud de los padres en la relación con sus hijos prematuros, suelen más activos en las interacciones, más vigilantes, sobreestimulantes, más protectores y preocupados por la alimentación, en comparación con niños a término (34).

Suelen experimentar también reacciones extrañas por parte de la sociedad y la familia que les rodea. Éstos no saben cómo actuar y a veces incurren en respuestas erráticas, no saben si alegrarse, mantenerse al margen o darles el pésame. Los padres se sienten incomprendidos por su propia familia y amigos, que no saben cómo reaccionar. Incluso se dejan de hacer rutinas propias del nacimiento de un hijo, tales como regalar flores, bombones u otro tipo de rituales.

Sin embargo, los padres encontrarán un apoyo emocional muy valioso en los padres de otros niños prematuros, que ya están en la unidad con sus hijos. Las asociaciones de padres de niños prematuros se convierten en una ayuda imprescindible. Son personas que han pasado por la misma situación traumática que ellos y les servirán de apoyo para todo el proceso de hospitalización y para la vuelta a casa. En Galicia contamos con AGAPREM (Figura 1.11), la Asociación Galega de Familias de nenos prematuros, que asesoran y ayudan a las nuevas familias a conocer el mundo de la prematuridad.



Figura 1.11- Logo Agaprem

1.9- ESCALA DE ESTRÉS PARENTAL (PSS:NICU)

El nacimiento de un niño prematuro y su ingreso en una UCIN es percibido por los padres como un estresor al que deben hacerle frente. El estrés psicológico al que se ven sometidos estos padres hace que se disparen sus niveles de ansiedad y depresión. Necesitamos conocer cuáles son las vivencias percibidas como más estresantes para poder ayudarles a sobrellevar de una forma óptima dichas situaciones.

Para ello, se ha utilizado una escala que fue desarrollada por la Dra Miles para medir y evaluar el estrés relacionado con la permanencia de los padres en la UCIN. Es la llamada Escala de Estrés Parental o PSS:NICU (Parental Stressor Scale: Neonatal Intensive Care Unit). Surge en EEUU y ha sido adaptada y validada a varios idiomas, entre ellos el español, siendo utilizada en innumerables estudios científicos, presentando niveles elevados de confiabilidad y validez (31, 35).

La escala está compuesta por cinco subescalas y 46 ítems, que evalúan diferentes dimensiones (Tabla 1.1):

Aspectos visuales y sonoros de UCIN	5 ítems donde se analiza el nivel de estrés en los padres propiciado por el propio ambiente de la UCIN; ruidos de monitores, aparatos, alarmas, así como también cómo le influye en su nivel de estrés la presencia de otros niños graves en la Unidad.
Apariencia física y comportamiento del recién nacido	19 ítems que hacen referencia al estado en el que se encuentra físicamente su hijo, así como los cuidados que necesita.
Relación con el recién nacido y el rol de madre	10 ítems donde se analiza el estrés producido por la alteración del vínculo entre madre-hijo al estar separados debido al ingreso en UCIN.
Comunicación con el personal sanitario	11 ítems que valoran el nivel de estrés que le produce la comunicación con el personal sanitario, la información recibida por parte del mismo, así como la empatía percibida.
Estrés común o general	1 ítem que valora el estrés parental general que sienten al tener ingresado su hijo en una UCIN

UCIN: Unidad de cuidados intensivos neonatales

Tabla 1.1.- Subescalas de PSS: NICU

Cada ítem debe ser respondido en una escala con un formato tipo Likert, que tiene una puntuación desde 1 (ningún grado de estrés) a 5 puntos (extremadamente estresante), en función del grado de estrés que le genera esa situación. Si los padres no han tenido ninguna de las experiencias que se describen en el ítem, contestará No Aplicable (NA).

Nosotros hemos utilizado en nuestro estudio la escala PSS:NICU para medir el nivel de estrés en la madre de los niños prematuros ingresados en nuestra UCIN.

El análisis de los resultados de la escala se puede hacer de dos formas, según las autoras. La llamada Métrica 1 o nivel de estrés producido cuando el suceso ocurre. En este caso, sólo los sujetos que han vivenciado el suceso reciben puntaje y si han puesto NA, esa puntuación se considera 0 y se descarta del cómputo total de ítems. La otra forma de medir es con la Métrica 2 o nivel de estrés global. En este caso todos los ítems se puntúan, incluso los señalados como NA que recibirán una puntuación de 1 (que indica que no ha habido estrés en ese ítem) (35,36)

Se recomienda la Métrica 1 como una medida más real del estrés que ha tenido la madre. No se tienen en cuenta los estresores que no han interactuado con ella.

1.10.- APOYO A LOS PADRES DE NIÑOS PREMATUROS

Como hemos visto hasta ahora, el estrés psíquico al que se ven sometidos los padres de niños prematuros puede enlentecer el inicio del vínculo parental y consecuentemente tener

consecuencias negativas. Es por ello por lo que es necesaria la intervención del equipo multidisciplinar para que esta adaptación de los padres a la nueva situación sea lo menos traumática posible.

Las intervenciones precoces enfocadas hacia las familias han demostrado su eficacia para disminuir el estrés y la depresión (37). Acciones tales como el acercamiento de los padres a conocer la unidad donde permanecerá su hijo, antes de que ingrese, en caso de partos prematuros programados, así como conocer al personal que lo atenderá, proporcionará tranquilidad a los padres. Explicarle el funcionamiento de la unidad y sobre todo transmitirles que podrán estar con su hijo todo el tiempo que deseen, que podrán tocarle y proporcionarle cuidados, siempre y cuando la situación clínica lo permita, o que podrán realizar el método canguro con su hijo, va a ayudar a que sus niveles de ansiedad debido a la incertidumbre se vean disminuidos. Se le explicará que la madre no podrá amamantar de forma directa a su hijo, durante un tiempo, pero que podrá hacer una lactancia materna diferida, donde se extraerá la leche para posteriormente administrársela a su hijo a través de una sonda. Todo esto ayudará a que sus niveles de estrés se reduzcan porque podrán conocer el lugar a dónde irá su hijo una vez nazca y el personal que estará a su cargo. El desconocimiento y la incertidumbre, generadores de gran estrés, se intentan mitigar con este tipo de acciones.

Se harán intervenciones sobre la familia, para que a través de los CCDF los padres sean los cuidadores principales, dándoles el rol que les pertenece. El equipo sanitario debe trabajar conjuntamente con los padres para favorecer que éstos participen en el cuidado de sus hijos. Se fomentará el mayor tiempo posible la presencia de los padres en la unidad, haciendo que ésta sea lo más cómoda y confortable posible. Se habilitarán espacios donde los padres puedan interactuar y relacionarse entre ellos. Habrá una sala de padres cómoda con mobiliario básico, donde tendrán un espacio para relajarse.

El equipo multidisciplinar debería de contar también con un Psicólogo clínico especializado en Psicología Perinatal, que tuviese entrevistas con los padres de forma reglada, para que pueda detectar situaciones de riesgo y les ayude a sobrellevar todo el ingreso e incluso hará un seguimiento familiar una vez el niño esté en su casa. Se trata de minimizar el impacto sufrido por haber tenido un hijo prematuro tanto en la familia como en el entorno (38).

Las asociaciones de padres de niños prematuros, como hemos mencionado, tienen una labor muy importante en todo el proceso y sirven como guía a nuevos padres que pasan por las mismas situaciones que ellos. Aportan la experiencia, desde un punto de vista de iguales, y les ayudan a resolver sus dudas, pero sobre todo empatizan con ellos mejor que nadie, comparten experiencias y hacen que normalicen sus miedos y actitudes. Los padres, en este ambiente, se sienten comprendidos y no juzgados.

Todo el apoyo psicosocial ofrecido a los padres contribuye a disminuir su nivel de estrés y aumenta la capacidad de respuesta a la hora de interactuar con su hijo teniendo esto un efecto positivo tanto en los padres como en el desarrollo del niño.

1.11.- CALPROTECTINA FECAL (CPF)

La calprotectina es una proteína abundante en el organismo que va unida al calcio y al zinc, perteneciente a la familia S100. Forma parte de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, pero también se encuentra en menor medida en los monocitos y macrófagos reactivos. Su valor se incrementa, en plasma, del orden de entre 5 a 40 veces cuando existen procesos inflamatorios o infecciosos. Es una proteína antimicrobiana con propiedades fungicidas y bacteriostáticas (39). La calprotectina también se encuentra en las heces, es la llamada calprotectina fecal y ésta es mayor (unas 10 veces) que sus niveles plasmáticos. Ante la presencia de procesos inflamatorios del intestino, se estimula la migración de neutrófilos a la luz digestiva, aumentando así las cifras

de CPF. Se considera el límite superior de la normalidad en 50 µg/g, en mayores de un año (39). Sin embargo, en niños se ha visto que este valor puede estar aumentado durante los primeros años de vida (hasta 10 veces), sin tener una significación patológica (39, 40). Esto es debido a una inmadurez del sistema inmune, así como de la barrera epitelial intestinal, generando un aumento de la permeabilidad a través de la mucosa. Esto se agrava todavía más en los recién nacidos prematuros, puesto que poseen un intestino y un sistema inmune mucho más inmaduros. Se producirá, por tanto, un estado fisiológico de inflamación intestinal subclínica con cifras más elevadas de CPF. A medida que el intestino va madurando y la permeabilidad disminuye, las cifras de CPF se van estabilizando.

Roseth, en 1992, mediante una técnica ELISA, desarrollan el primer método para determinar la CPF. A lo largo de los años se ha mejorado mucho la técnica y hoy en día se pueden analizar cantidades muy pequeñas de heces. Además, se ha visto que la CPF es una proteína muy estable y resistente a la degradación (se mantiene hasta 7 días a temperatura ambiente, sin degradarse), por lo que no requiere su análisis inmediato. Suele eliminarse intacta por las heces, lo que la convierte en un buen marcador no invasivo para un cribaje de la inflamación intestinal (39).

La CPF suele estar elevada ante procesos inflamatorios e infecciosos, sin embargo, existe una gran variabilidad individual en cuanto a las cifras de CPF durante las primeras semanas de vida, lo que impide utilizar dicho marcador de forma exclusiva, para una detección precoz de una de las complicaciones más importantes en los recién nacidos prematuros, como es la enterocolitis necrosante (NEC) (41), aunque sí se podría utilizar como un marcador de pronóstico no invasivo para ver la progresión de la enfermedad (42).

Por lo tanto, los valores de CPF se consideran más altos que en los adultos y sus valores de referencia deben ser tomados con cautela puesto que, como se ha dicho, existe una inmadurez del sistema digestivo e inmunitario que puede causar un incremento de los valores, de forma normal. Hay estudios que encuentran una correlación negativa en cuanto a los niveles de CPF y la edad, no encontrándose, sin embargo, un valor de CPF que ejerza de marcador absoluto al variar estos niveles con la edad (43, 44).

1.12.- LACTANCIA MATERNA (LM)

La LM es el mejor alimento para el recién nacido puesto que contiene todos los nutrientes necesarios para su correcto desarrollo. Se digiere fácilmente, contiene factores que ayudan a la digestión y absorción de nutrientes, conteniendo también factores inmunitarios que van a fortalecer el sistema inmune protegiendo al bebé de diferentes agentes infecciosos.

La OMS recomienda la lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses de vida, a partir de los cuales se comenzará con la alimentación complementaria manteniendo la LM hasta, al menos, los 2 años de edad.

1.12.1.- Composición y beneficios de la LM

La LM va cambiando de composición a lo largo de los días e incluso dentro de una misma toma, sin embargo, enumeraremos los componentes más importantes que están presentes en cada gota de leche (45, 46):

- Grasas: Contiene, aproximadamente, 3,5g de grasa/100 ml de leche. La grasa se secreta en gotas y aparece en el final de la toma, donde se observa un color más blanquecino y espeso. Contiene ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (DHA y ácido araquidónico) que son importantes para el desarrollo neurológico, de la retina y modulan respuestas inflamatorias e inmunes al activar la proliferación de linfocitos. En las leches artificiales se añaden dichos componentes no siendo tan eficaces como en la propia LM.

Contiene también lipasa, que ayuda a que la digestión de las grasas sea más ligera. La calidad de la grasa es ideal para facilitar la digestión del recién nacido, a diferencia de las leches de fórmula.

-Hidratos de carbono: La lactosa es el principal hidrato de carbono de la LM. Contiene unos 7g/100ml de leche. Favorece la proliferación de la flora intestinal por las Bifidobacterias, impidiendo el crecimiento de gérmenes patógenos al ser acidificante. Mejora la absorción del calcio y mantiene en equilibrio las concentraciones de sodio y potasio. Contiene también galactosa, importante para el desarrollo neurológico.

-Proteínas: La LM tiene una concentración menor de proteínas, comparado con la leche de vaca. Contiene unos 0,9g/100ml de leche y posee un equilibrio de aminoácidos que la hace ideal para los lactantes. La caseína de la LM es mucho más fácil de digerir y está en menores cantidades que en la leche animal. También contribuye al transporte de calcio, fósforo y aminoácidos para la formación estructural a nivel celular.

Aparte de la caseína, también contiene alfa-lactoalbúmina, lactoferrina (que favorece la absorción del hierro y tiene actividad antiinflamatoria, antiviral y antimicrobiana, jugando un papel destacado en la expansión de la microbiota intestinal) y otros aminoácidos como: la taurina (que favorece la digestión de grasas y desarrollo del sistema nervioso central), la carnitina (útil en la oxidación de lípidos en la mitocondria del cerebro), el ácido glutámico, cistina y glutamina (actúan como neurotransmisores y neuromoduladores).

- Nucleótidos: Como la adenosina, guanosina, cistidina, uridina e inosina, que son importantes en el desarrollo de la microbiota intestinal, favoreciendo la función inmune.

-Vitaminas, minerales y oligoelementos: Contiene vitaminas hidrosolubles en concentraciones adecuadas, siendo la vitamina C y niacina las más abundantes. En cuanto a las liposolubles, no alcanza los niveles óptimos en vitamina D, con lo que necesita ser suplementada, ni en vitamina K, por ello se le administra a todos los recién nacidos 1mg intramuscular, en una única dosis al nacimiento.

En cuanto a los minerales destaca el hierro, que es esencial para el transporte de oxígeno a las células y la formación de glóbulos rojos, suele estar en baja concentración, sobre todo en los partos prematuros, aunque el retraso en la ligadura de cordón ha demostrado ser eficiente al favorecer los depósitos de hierro en el recién nacido, al menos en los 6 primeros meses de vida. La relación calcio/fósforo es la adecuada para la formación de los huesos.

El flúor, aunque aparece en baja concentración, es suficiente para evitar caries, y el zinc, importante para la formación de enzimas, el crecimiento y la diferenciación celular, también en baja concentración, tienen una elevada biodisponibilidad y absorción.

-Factores inmunes: La LM es la llamada “primera vacuna” proporcionando la inmunidad pasiva, ya que es una fuente de factores antiinfecciosos que protegen a los lactantes de múltiples enfermedades para las que todavía su sistema inmune no está preparado. A través de la LM pasan inmunoglobulinas (Ig) como la A, que ayuda a recubrir la mucosa intestinal y evita que entren bacterias y causen infección, además contienen anticuerpos producidos por la madre contra las infecciones que ella ha padecido. También pasan a través de la LM los glóbulos blancos, Ig D, Ig G, Ig M, lactoferrina y lisozima (que destruyen bacterias, virus y hongos), entre otros.

-La LM también posee factores de crecimiento epidérmico y endotelial, ayudando al crecimiento de los tejidos de la piel y vasos sanguíneos. Las citoquinas y leucotrienos presentes actúan como antiinflamatorio y antialérgico.

La LM va cambiando de composición a lo largo de los días. En el último trimestre de la gestación una sustancia es formada por la glándula mamaria, denominada precalostro, formado por exudado de plasma, Ig, células, lactoferrina, sodio, cloro, lactosa y seroalbúmina.

La leche de los 5-7 primeros días postparto se denomina calostro y es más rica en proteínas, Ig A, vitaminas liposolubles, lactoferrina, Bifidobacterias, sodio y zinc, teniendo menos grasas, hidratos de carbono y vitaminas hidrosolubles. Tiene un color más amarillento y es de consistencia pegajosa. En este momento, se produce la inmunidad pasiva donde se transfiere de la madre al lactante, una gran cantidad de inmunoglobulinas. Además, ayuda a la expulsión del meconio.

La leche de transición se inicia sobre los 7 días hasta los 10 días, aproximadamente, y tiene un mayor contenido en lactosa, grasas y vitaminas hidrosolubles, disminuyendo el número de proteínas, Ig y vitaminas liposolubles. Tiene un color más blanco.

A partir de los 10-15 días, aproximadamente, se produce la leche madura, donde aparece un elevado porcentaje de agua y el aporte de energía la causan en su mayoría las grasas e hidratos de carbono (Figura 1.12).



Figura 1.12. Calostro, leche de transición y madura, obtenidas de madres que lactan a sus hijos (Autoría propia)

Los niños alimentados con LM al menos los 6 primeros meses de vida, tienen menor riesgo de padecer enfermedades alérgicas e inmunes como: asma, dermatitis atópica, alergias alimentarias o rinitis alérgica. Tienen menos riesgo de enfermedad celíaca, Crohn, colitis ulcerosa, etc (45, 46, 47).

La LM tiene beneficios a corto plazo, como hemos visto, pero también a lo largo del tiempo se van a ver beneficiados los niños alimentados con leche de sus madres. Tienen menor riesgo de obesidad (48), atopias, diabetes (49) entre otras enfermedades, así como también tienen mejores niveles cognitivos que los alimentados con leche de fórmula (50).

Por todo ello, la LM se considera la mejor forma de transición y adaptación entre la vida intrauterina y la extrauterina, tanto en aspectos nutricionales como de defensa contra microorganismos.

1.12.2.- Composición de la LM en madres de niños prematuros

Las madres que tienen un parto prematuro presentan características diferentes en la composición de la LM, con respecto a una madre que tiene un recién nacido a término. Su leche va adaptada al momento del nacimiento, proporcionando un mayor efecto protector, al contener niveles más altos de factores inmunológicos y antiinflamatorios como la lactoferrina, así como una mayor cantidad de proteínas, sodio, grasas y algunos minerales como el calcio o el fósforo. Posee una menor cantidad de lactosa y su aporte energético es mayor que en un recién nacido a término (58-70 Kcal/dl, en comparación con 48-64 Kcal/dl) (51).

Se ha visto que los recién nacidos prematuros menores de 1500 gramos, van a absorber un porcentaje muy elevado de lípidos de la LM (90%). Esto les va a aportar una gran cantidad de energía y además supone un aporte muy importante de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), como el ácido docosahexanoico (DHA) y ácido araquidónico, que son fundamentales en la composición de las membranas celulares e importantes para el desarrollo neurológico y retiniano ⁽⁵¹⁾.

El calostro de las madres de niños prematuros presenta niveles más elevados de Ig A favoreciendo la protección del pretérmino que tiene un elevado riesgo de infección debido a su inmadurez. Se ha visto que la administración de gotas de calostro por vía oral mejora la respuesta inmune a través de la estimulación del tejido linfoide asociado a la mucosa oral. Esta administración orofaríngea de calostro se dará como un complemento a mayores, no como sustituto de la nutrición enteral trófica ⁽⁵²⁾.

Sin embargo, el aporte de calorías, minerales y proteínas de la LM es insuficiente para cubrir las necesidades nutricionales tan elevadas que posee un recién nacido prematuro, pudiendo causarle graves secuelas en el crecimiento, el desarrollo neurológico y la mineralización ósea, por lo que la LM suele fortificarse con suplementos añadidos que aportan calcio, fósforo, proteínas y un aporte calórico más elevado, para suplir dichas deficiencias. Los fortificantes suelen recomendarse en los recién nacidos menores de 32 semanas de EG y/o menores de 1500 g de peso, y se utiliza de forma individualizada, dependiendo de cada recién nacido y de sus características en cada momento. Se introducen una vez que la tolerancia enteral es adecuada, a partir de los 7 días de vida, de forma general. Suele recomendarse una cantidad de 4g de proteína por cada 100ml, dependiendo del fortificante utilizado, y hasta que el niño tome directamente del pecho y alcance una adecuada ganancia ponderal. Hay que tener en cuenta que los fortificantes aumentan la osmolaridad y el niño tiene más riesgo de padecer una NEC o alguna otra complicación como lactobezoar (por el aumento de calcio y fósforo del fortificante) que llega a causar cuadros de obstrucción intestinal ⁽⁵¹⁾.

Se ha demostrado que los niños prematuros que son alimentados con LM fortificada desarrollan un mayor crecimiento de los parámetros antropométricos de longitud, peso y perímetro cefálico, con respecto a los que no se le añade fortificación en su LM ⁽⁵³⁾.

La leche materna de las madres de niños que nacen prematuramente, como hemos visto, tiene unas características diferentes a la leche de las madres que tienen sus hijos a término. Estas diferencias se suplen parcialmente con los fortificantes que se añaden a la LM, sin embargo, la madre de un niño prematuro tiene mucho más complicado mantener la LM cuando tiene a su hijo ingresado durante meses, está sometida a mucho estrés debido a la incertidumbre del estado de su hijo, entre otros factores personales que pueda tener, como el cuidado de otros hijos, la imposibilidad de estar todo el tiempo con su hijo hospitalizado, el trabajo, el cuidado del hogar, etc, convirtiéndose en todo un desafío para las madres.

Para favorecer el mantenimiento de la LM en las madres de hijos prematuros, se recomienda que las madres permanezcan el máximo tiempo posible con ellos. Es muy recomendable que hagan el Método Madre Canguro, la mayor parte del tiempo, así como extracciones frecuentes después de estar en contacto con él, llevarse fotos o vídeos de su hijo a casa, para el momento en el que hace las extracciones de leche, así como impregnar una prenda con su olor para que pueda tener siempre con ella y favorezca la formación de leche. El hecho de sacar leche para alimentar a su hijo hace que aumente el sentimiento materno y esto se debe de apoyar y fomentar desde los servicios de Neonatología. El apoyo emocional a esas madres es fundamental para el correcto establecimiento y sobre todo el mantenimiento de la LM. El personal que trabaja en las UCIN debe de estar formado en LM y saber aconsejar a una madre que está lactando, para que esa lactancia se mantenga en el tiempo y sea exitosa. Esto será muy beneficioso para el

recién nacido prematuro, pero también para su madre a nivel emocional, haciendo que se sienta un poco más madre y útil al estar ayudando de la forma que puede.

Por tanto, el beneficio de la LM está más que demostrado, pero en los niños prematuros todavía más, sobre todo si éstos son alimentados con leche de sus propias madres puesto que, como hemos visto, su leche tiene unas características especiales adaptadas al momento que están viviendo y que la hacen óptima para el desarrollo y nutrición de su hijo prematuro. En el caso de que la LM de la propia madre no sea suficiente para cubrir las necesidades energéticas del prematuro, se complementará con leche de bancos de leche humana.

1.12.3.- LM y Estrés

El nacimiento de un hijo conlleva una serie de cambios en la rutina de la madre o pareja y ya sólo este hecho produce estrés. Si el parto se presenta de forma prematura, el estrés aumenta, como hemos visto. A todo esto, hay que sumarle el hecho de la separación del binomio madre-hijo, al tener que estar ingresado éste en una UCIN durante un largo período de tiempo, alterándose así la relación de apego. Temen por su cuidado y tienen que delegar esa función en personas desconocidas para ellos, aumentando todavía más el grado de estrés.

En un primer momento, todo ocurre muy deprisa y no tienen tiempo de asumir tantos cambios inesperados en su vida. Sin embargo, van a poder estar con su hijo todo el tiempo que ellos quieran y van a poder participar de sus cuidados, en la medida de lo posible, lo que les irá dando confianza y mayor tranquilidad con el paso de los días.

La LM, en estos casos, se convierte en algo fundamental, por los múltiples beneficios que conlleva en los niños prematuros, pero a la vez les genera un estrés añadido, en muchos casos. La madre siente la necesidad de extraerse leche en cantidad suficiente para suplir las necesidades de su hijo y además experimenta la sensación de ser el único modo en el que ella puede ayudarlo.

La madre se convierte así en un pilar fundamental para su hijo, aportando lo que él más necesita en ese momento. Las madres tienen que hacer un esfuerzo importante para extraer leche, muchas veces cuando aquel está en una situación crítica. Además, pueden pasar por dificultades como el dolor en el pecho, en los pezones, la congestión mamaria o incluso tener otras complicaciones como la mastitis, que se convierten en otro problema añadido al que ya tienen. El estrés durante el embarazo produce cambios neuroendocrinos que afectan negativamente tanto a la madre como al feto. Los elevados niveles de cortisol en la madre en situación de estrés atraviesan la placenta y pueden producir alteraciones en el feto. Así, un elevado nivel de estrés en la madre se ha relacionado con mayor riesgo de parto prematuro, de bajo peso al nacer, de alteraciones en su neurodesarrollo o incluso con enfermedades tipo autismo o esquizofrenia en la edad adulta, y alteraciones conductuales en el niño. Esto se ha visto en estudios donde se determina el cortisol en saliva o pelo de madres gestantes (54, 55).

En la madre lactante y en situaciones estresantes, la adrenalina y noradrenalina van a disminuir el aporte de oxígeno, glucosa y ácidos grasos a la glándula mamaria, lo que puede hacer disminuir la cantidad de leche (47). Se produce por tanto una afectación fisiológica derivada de un mecanismo psicológico.

Asimismo, el estrés y el cansancio al incrementar nuevamente los niveles de cortisol y disminuir la producción de prolactina, disminuyen la cantidad de leche. Si esta situación no se modifica puede dar lugar a un fracaso de la LM (54).

La motivación de la madre lactante es fundamental para el inicio y mantenimiento de la LM, sobre todo en madres de niños prematuros. Una de las causas más importantes de abandono de la LM es la sensación de poca producción de leche o hipogalactia o la incorporación de la madre

al trabajo, sin embargo, la influencia de la familia que rodea a la madre actúa como un factor importante a la hora del destete ⁽⁵⁶⁾.

Las expectativas que tienen los padres acerca de cómo será la LM juegan un papel muy importante porque no suelen coincidir con la realidad. Los despertares nocturnos y los períodos de vigilia, aunque son mayores en los niños alimentados con fórmula artificial ⁽⁵⁶⁾, son percibidos por los padres como que el niño no se queda suficientemente saciado con el pecho y esto hace que se produzca un abandono precoz de la LM.

A pesar de todas estas circunstancias que puedan influir negativamente en la producción y mantenimiento de la lactancia, las madres de niños prematuros suelen conseguir una lactancia materna adecuada que, aunque no cubra las necesidades del niño, puede ser complementada por leche humana donada (LHD), aportada por los bancos de leche humana, proporcionando así una óptima alimentación en estos pacientes. La LM se convierte en todo un reto para estas madres, que suelen superar a pesar de las múltiples dificultades a las que se enfrentan, aunque depende mucho de la capacidad de afrontamiento y resiliencia individual.

El equipo sanitario que trabaja en una UCIN debe prestar apoyo para fomentar la LM en esa madre y aconsejarle e informarle sobre la importancia de la LM y el mantenimiento de la misma, favoreciendo su presencia todo el tiempo necesario al lado de su hijo, así como el establecimiento del Método Madre Canguro, lo más precozmente posible.

A pesar de toda la información que la población general tiene a su alcance acerca de los beneficios de la LM, las tasas de amamantamiento no son siempre las esperadas. Un porcentaje elevado de madres indican falta de recomendaciones adecuadas por parte del personal sanitario, así como falta de apoyo en temas de LM por parte de los profesionales de la salud ⁽⁵⁶⁾. Por todo ello, se debe seguir trabajando para conseguir una óptima educación sanitaria en cuanto a temas de LM, formación del personal que trabaja en estas áreas y priorizar la LM sobre cualquier otro tipo de alimentación artificial en el recién nacido.

1.13.- MICROBIOTA INTESTINAL

1.13.1.- Definición

La microbiota intestinal se define como el conjunto de microorganismos que habitan en el intestino y está compuesta por más de un billón de microorganismos por gramo de heces. La mayoría se localizan en el intestino grueso, en el colon, considerado uno de los ecosistemas más poblados del planeta, existiendo también en otras zonas del aparato digestivo, aunque en menor cantidad y diversidad ⁽⁵⁷⁾.

Se espera que haya una microbiota abundante y sobre todo diversa en cuanto a especies, puesto que cuanto más variada sea, más recursos tendrá para reaccionar a los agentes patógenos. La mayor diversidad microbiana está relacionada directamente con marcadores saludables, como menor resistencia a la insulina, menor colesterol y bajos marcadores de inflamación.

Al conjunto de genes de todos los componentes de la microbiota humana se le denomina microbioma. La metagenómica es la ciencia encargada de estudiar comunidades microbianas en su hábitat natural, mediante técnicas genómicas. A nivel intestinal, más de un 90% de los gérmenes encontrados son bacterianos describiéndose miles de especies bacterianas, entre las que destacan los filos Bacteroidetes y Firmicutes.

1.13.2.- Transmisión de la microbiota

La microbiota se transmite de una persona a otra de varias formas. Una de las que más nos interesa es la transmisión vertical, de madre a hijo. La madre transfiere parte de su hábitat microbiótico cuando su hijo pasa por el canal vaginal durante el parto, donde las bacterias maternas de la vagina, mayoritariamente *Lactobacillus*, impregnan al bebé. Este es uno de los

motivos por el que es importante el parto vaginal frente a la cesárea, donde no se transfiere dicha microbiota tan beneficiosa para el recién nacido, transmitiéndose fundamentalmente microorganismos propios de la piel, predominando los *Streptococcus*, *Staphylococcus* y muchos menos *Lactobacillus*. Esto puede influir negativamente en el sistema inmune del recién nacido al verse reducida la diversidad microbiana (57).

En la madre, durante la gestación, se van produciendo una serie de cambios que favorecen el desarrollo del feto y preparan el cuerpo para el momento del parto. De esta forma, ocurren cambios a nivel de la microbiota vaginal, como el incremento de *Lactobacillus*, que forman una barrera eficaz frente a bacterias y hongos patógenos. En el canal del parto las bacterias de la zona vaginal, como los *Lactobacillus*, y de la zona perianal, como las *Enterobacterias* y *Bifidobacterium*, entran en contacto con la cara y boca del recién nacido. Al ingerirlos llegan al intestino y comienzan así a reproducirse, siendo los primeros colonizadores del intestino al nacimiento.

El recién nacido nace también con cierta microbiota intestinal transferida de la madre, antes de pasar por el canal del parto. Durante las últimas etapas del período intrauterino, se produce en la madre un aumento de la permeabilidad intestinal para que una pequeña cantidad de sus bacterias intestinales pasen a la sangre y puedan llegar a la placenta para entrar en contacto con el feto, lo que se conoce como traslocación bacteriana. De esta forma, se está transfiriendo microbiota de la madre al feto, incluso antes de su nacimiento, en contra de lo que se pensaba hasta hace poco tiempo, donde se afirmaba que ni el útero, ni la placenta ni el cordón umbilical o el líquido amniótico, tenían microorganismos que se transmitieran al recién nacido (58).

Durante la LM, la madre sigue transfiriendo parte de su microbiota, además de múltiples componentes, como hemos visto. El contacto piel con piel después del nacimiento, es fundamental para ese intercambio de microorganismos tan importantes, así como también el no aseo al nacimiento de los recién nacidos puesto que con ello eliminamos parte de la microbiota que le ha sido transmitida por la madre durante el parto. Los recién nacidos, al chuparse las manos, están ingiriendo microorganismos que le serán de mucha utilidad y han sido donados por su madre en el complejo proceso del parto.

La madre, por tanto, va colonizando a su hijo, ya desde momentos antes de su nacimiento con bacterias intestinales propias, con bacterias presentes en el canal del parto tanto vaginales como de la zona perianal, con bacterias de la piel o las aportadas a través de la LM. Todo este proceso está programado para favorecer una adecuada formación de microorganismos que van a proteger al recién nacido de patógenos.

Otra forma de transmisión de microbiota es a través de besos y caricias, sobre todo por parte de los padres, puesto que en la boca y en las manos también hay microorganismos que se van transmitiendo. Las relaciones sociales y el entorno, por tanto, van a ser favorecedores de la transmisión microbiana.

Por todo ello, hay estudios que nos alertan de un mayor número de alergias en niños que nacen por cesárea o que no reciben LM, puesto que tienen una menor diversidad de microbiota intestinal para que los proteja. Hay autores que sugieren incluso impregnar con frotis vaginales a niños nacidos por cesárea, para intentar transmitirles los microorganismos que no les han sido transferidos.

Los llamados primeros 1000 días de vida (desde la concepción hasta los 2 años de edad), son claves debido a que se produce un rápido crecimiento y desarrollo cognitivo, del lenguaje, habilidades sociales y emocionales, para el que se necesitan gran cantidad de energía y nutrientes. En este período, juega un papel fundamental la alimentación materna o sus hábitos de salud. De esta forma, una microbiota materna alterada puede ser transferida a su hijo durante la gestación, parto o lactancia (59). Estos 1000 días, representan el período más crítico para el

establecimiento y modulación de la microbiota. Una colonización diversa y adecuada va a influir positivamente en el correcto desarrollo inmunitario, del metabolismo, cognitivo y sensorial del recién nacido (60,61).

1.13.3.- Funciones de la microbiota intestinal

Desde que la microbiota se adquiere, va creciendo y modificándose con el tiempo. Durante la infancia es cuando suelen producirse más cambios y aquí la genética, la alimentación, las enfermedades y sobre todo el uso frecuente de antibióticos, son pilares fundamentales para un correcto desarrollo del ecosistema microbiótico.

A)- **Función Protectora e Inmunológica:** una de las funciones más importantes de la microbiota intestinal es su función protectora frente a microorganismos patógenos. Se forma una doble capa de mucus como efecto de la interacción entre el sistema inmune y la microbiota, que constituye la primera barrera impidiendo el paso de bacterias desde la luz intestinal. El mucus favorece la adhesión microbiana a su parte más externa permitiendo que aniden bacterias sin penetrar la capa. Se produce un equilibrio entre la microbiota comensal y el organismo. En el lumen intestinal las bacterias comensales se van nutriendo de los alimentos que comemos, ayudándonos a digerirlos para que el organismo también se beneficie.

Las bacterias patógenas que intentan invadir el organismo cruzando la barrera mucosa para llegar al epitelio, se encuentran con las bacterias comensales que se lo impiden al reaccionar reconociéndolas como agresoras y poniendo en marcha acciones inmunitarias tanto innatas como adquiridas, haciendo frente a estos microorganismos patógenos.

La microbiota comensal residente ofrece una resistencia a la colonización por microorganismos patógenos mediante mecanismos de competición y modificaciones de la microbiota, produciendo bacteriocinas, cambios de pH y producción de ácidos orgánicos.

El efecto barrera de la microbiota, donde las bacterias ocupan un nicho ecológico, impiden que se implanten y proliferen bacterias ajenas al ecosistema, que pueden estar presentes en el intestino, pero bajo una proliferación controlada para que no produzcan un daño. El equilibrio entre las diferentes especies bacterianas es fundamental para mantener la estabilidad de la población microbiana. Si este equilibrio se rompe es cuando se produce una enfermedad por invasión de microorganismos no deseables.

B)- **Función Trófica:** la microbiota comensal influye en la proliferación de las células epiteliales contribuyendo a fortalecer la función del epitelio como barrera física frente a agentes patógenos.

C)- **Función Metabólica:** la microbiota intestinal se encarga de metabolizar determinados residuos de la dieta, destacando la actividad enzimática de hidratos de carbono complejos como la celulosa, la pectina o fructanos, que no pueden ser degradados hasta llegar al colon. Son compuestos que están presentes en las frutas, verduras, legumbres y hortalizas. La fibra de la dieta sirve como sustrato a la microbiota intestinal y proporciona protección al epitelio intestinal favoreciendo la motilidad intestinal, previniendo el estreñimiento, y favorece también la absorción de nutrientes y minerales.

La flora intestinal también degrada péptidos y proteínas liberando aminoácidos esenciales y metabolitos bacterianos nitrogenados que se absorben por el epitelio intestinal. Del mismo modo, la microbiota del intestino participa en la degradación de las grasas, dando lugar a compuestos beneficiosos como el ácido linoleico o los ácidos grasos poliinsaturados omega 3. La microbiota intestinal también va a ser fundamental en el metabolismo de los polifenoles presentes en alimentos como la fruta y vegetales. Los polifenoles tienen efectos antioxidantes, antiinflamatorios, de protección cardiovascular y anticancerígenos. Estos productos suelen

llegar intactos al colon donde son metabolizados por efecto de los microorganismos allí presentes.

La síntesis de determinadas vitaminas indispensables para el ser humano, como la vitamina K y la mayoría de las vitaminas B, también se deben a los microorganismos del intestino, sobre todo a los *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* residentes en el colon.

1.13.4.- Función cognitiva y homeostasis intestinal en relación con el estrés

Se ha demostrado una relación entre la microbiota intestinal y la función cognitiva. Es el llamado “eje cerebro-intestino-microbiota”. Los microorganismos intestinales se comunican con el cerebro a través de sustancias neurotransmisoras, citoquinas proinflamatorias del sistema inmune, del sistema nervioso periférico y del nervio vago. El cerebro responde con hormonas como el cortisol. Existen, por tanto, vías directas e indirectas que interaccionan bidireccionalmente entre el intestino y el cerebro, involucrando a su vez a los sistemas endocrino, neurológico e inmune.

Así, por ejemplo, bajo condiciones de estrés crónico, se produce un incremento de cortisol por las glándulas suprarrenales, afectando negativamente a la musculatura intestinal provocando episodios de estreñimiento y diarrea crónicos. Esto va a provocar daños en la mucosa intestinal con inflamación, afectando así al sistema inmune puesto que la barrera mucosa puede aumentar su permeabilidad permitiendo el paso de bacterias patógenas. De esta forma, se pueden producir alergias, intolerancias alimentarias o más sensibilidad a infecciones al romperse el equilibrio entre las bacterias comensales y las patógenas.

Del mismo modo que el cerebro puede influir en el intestino, al ser un proceso bidireccional, la alteración intestinal también tiene su efecto en el cerebro. La serotonina es secretada en su mayor parte por células de la mucosa intestinal a partir del triptófano. La serotonina se relaciona con las funciones cognitivas y el estado de ánimo, por lo que la alteración en la microbiota del intestino puede tener su repercusión a nivel cerebral debido a la disminución de la producción de serotonina, influyendo negativamente en las funciones cognitivas y en el estado de ánimo.

Por lo tanto, el estrés puede producir alteraciones muy importantes en la microbiota intestinal, aumentando los niveles de cortisol (que alteran la mucosa intestinal y producen daños colaterales) y disminuyendo, por otro lado, los niveles de serotonina (que alteran las funciones cognitivas y el estado de ánimo).

1.13.5.- Disbiosis microbiana

La disbiosis consiste en un desequilibrio microbiano en donde aumenta la proliferación de especies que suelen ser minoritarias, en detrimento de otras, y suele asociarse a patologías. También se habla de disbiosis cuando disminuye la diversidad microbiana, es decir, disminuye el número de especies distintas al dominar unas sobre otras. En definitiva, se rompe el equilibrio entre los microorganismos que habitan en el intestino.

Al producirse un desequilibrio en la microbiota del intestino, la permeabilidad del epitelio se altera y se produce una invasión de la barrera mucosa produciéndose una respuesta inflamatoria del sistema inmune.

La disbiosis microbiana puede traer consigo desórdenes inmunológicos, metabólicos o neuronales y al mismo tiempo alteraciones a estos niveles pueden también producir disbiosis. El estrés, la mala alimentación, el abuso del alcohol o sustancias tóxicas, el uso continuado de antibióticos o las infecciones recurrentes, pueden causar disbiosis microbiana, aunque la carga genética juega también un papel muy relevante.

La “hipótesis de la higiene” mantiene que, como consecuencia de los avances sanitarios, las medidas higiénicas de potabilización de aguas y el procesado de la alimentación, no se produce

una correcta colonización inicial a nivel del intestino por bacterias comensales y esto genera un aumento de prevalencia de determinadas enfermedades como la dermatitis atópica o enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, factores externos están influyendo de forma negativa en la formación de la microbiota intestinal desde la infancia, debido a la menor exposición infantil a agentes externos e infecciosos, sobre todo en las sociedades más desarrolladas.

El uso continuado y abusivo de los antibióticos es también un factor de riesgo para la disbiosis microbiana. Se ha visto que la administración de antibióticos en la madre en el segundo y tercer trimestre de embarazo, así como del recién nacido en las primeras semanas de vida o en la infancia, se asocia a cuadros de disbiosis y a alteraciones metabólicas como la obesidad infantil. Los antibióticos, sobre todo los de amplio espectro, destruyen las bacterias del intestino y causan daños en la barrera intestinal que puede propiciar la aparición de bacterias patógenas. Si se administran antibióticos cuando la microbiota intestinal aún no se ha estabilizado, como en la época neonatal o infancia, algunas especies pueden desaparecer o no llegar a formarse en cantidad suficiente para reproducirse, causando daños irreparables en la diversidad microbiana o a nivel del sistema inmune. De hecho, hay especies microbianas que están en peligro de extinguirse, tales como el *Lactobacillus reuteri*, que produce un potente agente antimicrobiano frente a organismos patógenos, o las lombrices intestinales propias de la microbiota, que nos protegen de enfermedades autoinmunes.

El estrés materno produce una alteración en los microorganismos de la vagina e intestino como hemos visto, que se transmitirá al recién nacido por vía vertical, comenzando su vida con una microbiota intestinal ya alterada.

El cerebro del recién nacido se desarrolla intraútero y se sigue desarrollando poco a poco con el paso de los años. Si se producen situaciones muy estresantes, como maltrato, abandono, falta de afectividad o nutrición inadecuada, durante estos años de desarrollo cerebral, sobre todo en determinados períodos críticos como pueden ser los primeros años de vida o en la preadolescencia, que es cuando tiene lugar la mayoría de la reorganización cerebral, se produce un aumento de niveles de hormonas glucocorticoides, como el cortisol, que produce disbiosis microbiana así como alteraciones del desarrollo cerebral al disminuir los niveles de serotonina, ácidos grasos de cadena corta o niveles de citoquinas proinflamatorias. Estos niños tienen mayor riesgo de presentar ansiedad, conductas agresivas o cuadros depresivos.

1.13.6.- Factores que influyen en la microbiota

Hay determinados factores que van a influir en la adquisición o pérdida de la microbiota intestinal:

- El estilo de vida y entorno: Hay una similitud de microbiota entre las personas que cohabitan o que viven en el mismo entorno. Así, por ejemplo, no comparten la misma microbiota personas que viven en zonas urbanas que aquellas que habitan en el campo o personas con un estilo de vida muy diferente, como las tribus africanas. La cohabitación con animales genera una microbiota más diversa, con lo que es más beneficioso para el organismo.
- Los hábitos dietéticos van a influir directamente en la microbiota intestinal. Así, por ejemplo, una persona vegetariana, con el paso del tiempo, tendrá una microbiota diferente a una persona que toma todo tipo de alimentos, puesto que los cambios drásticos en la dieta causan variaciones consistentes en su microbiota. Por lo tanto, un niño alimentado con LM o en su defecto con LHD tendrá una microbiota intestinal diferente de aquel que es alimentado con leche de fórmula.
- El uso de antibióticos, sobre todo desde fases iniciales de la vida donde todavía la microbiota no es suficientemente resiliente, puede causar un daño irreparable. Otro

hecho importante es que la microbiota puede constituir un reservorio de genes de resistencia a antibióticos. Hay bacterias patógenas que ya son multirresistentes a antibióticos y esto supone un gran problema.

- El uso de sustancias tóxicas como alcohol y drogas, también pueden afectar negativamente al estado de nuestros microorganismos intestinales.
- El tipo de parto: vaginal o cesárea.
- Edad gestacional: la microbiota de un prematuro es menos diversa, con alto porcentaje de bacterias potencialmente patógenas y bajo número de *Bifidobacterium* y *Bacteroides*.
- Tipo de alimentación al nacimiento; niños alimentados con LM, LHD o fórmula artificial, presentarán una microbiota diferente.

Por lo tanto, podemos afirmar que la microbiota intestinal del recién nacido comienza en etapas prenatales y su correcta formación y desarrollo dependerá de factores de tipo genético, tipo de parto, edad gestacional, tipo de alimentación, la exposición ambiental (ambiente hospitalario), la exposición a antibióticos de forma temprana, la exposición al estrés, a sustancias tóxicas, al lugar geográfico en el que nos encontremos, etc. Es un proceso muy complejo que está influido por múltiples factores y circunstancias (Figura 1.13).

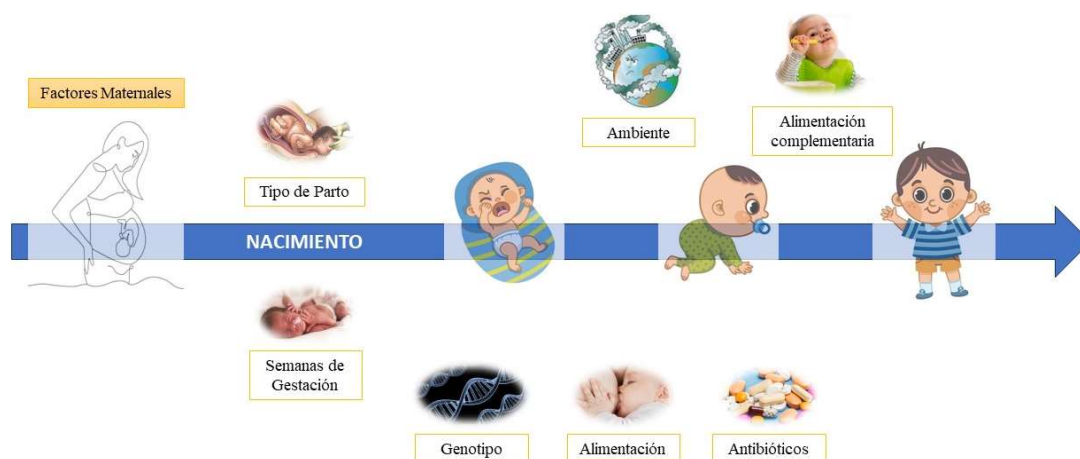


Figura 1.13- Factores que influyen en la microbiota del recién nacido. (Autoría propia)

1.13.7.- Lactancia materna y microbiota

En la LM se encuentran gran cantidad de microorganismos que son beneficiosos para el recién nacido y que además le ayudan a ir desarrollando y formando progresivamente su propia microbiota intestinal. Se produce un flujo constante de microorganismos desde la madre al recién nacido, siendo una fuente de bacterias comensales, mutualistas o probióticas, para el intestino del neonato (Figura 1.14).

La microbiota mamaria se comienza a formar en el último trimestre del embarazo y suele desaparecer cuando la madre deja de amamantar. Se ha observado una semejanza entre la microbiota del recién nacido y la microbiota intestinal de la madre, puesto que hay bacterias intestinales de la madre que son transportadas, a través de la vía entero-mamaria, vía linfática hasta la mama, donde se desarrollan y proliferan. De ahí pasan a través de la LM al recién nacido (58).

Los filos bacterianos más frecuentemente encontrados en la LM suelen ser los Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacterias y Proteobacterias, que guardan gran similitud con bacterias intestinales de la madre (58). También contiene bacterias propias de la piel, como *Streptococcus*,

Staphylococcus. A su vez, los hidratos de carbono complejos presentes en la LM van a favorecer el desarrollo de *Bifidobacterium*, que será la especie dominante en el intestino del recién nacido, además de un retraso en la implantación de *Enterobacterias*. Sin embargo, los niños que son alimentados con fórmula artificial presentan un mayor número de *Enterobacterias* y menos *Bifidobacterium* (60).

En el calostro, la microbiota identificada, es muy abundante y diversa. A medida que van pasando los días, en la leche ya madura, se observa una menor diversidad microbiana donde predominan más bacterias de la boca y la piel del lactante.

Por lo tanto, el tipo de alimentación que recibe el recién nacido va a modular su microbiota intestinal, siendo más abundante y diversa en aquellos que son alimentados con LM propia, luego en los que se alimentan de LHD y por último los alimentados con fórmula artificial para prematuros. La LHD, aunque presenta características diferentes a la LM propia, debido a los procesos de pasteurización y congelación a los que tiene que ser sometida para ser totalmente segura, favorece un perfil microbiano muy similar al ofrecido por la LM propia.

En el intestino de niños prematuros alimentados con LM propia o LHD, se encuentran una gran cantidad de *Bifidobacterium* y *Bacteroides* spp, que son bacterias metabolizadoras de oligosacáridos, los cuales actúan como agentes antimicrobianos anti adhesivos que interfieren con receptores de unión a patógenos, modulando así la respuesta inmune de una forma más indirecta. La presencia de estos microorganismos, por lo tanto, actúa como protector frente a infecciones (62).

En la LM se encuentran bacterias lácticas que tienen un papel fundamental para prevenir infecciones al adherirse a las mucosas y producir sustancias antimicrobianas. Esto es muy importante teniendo en cuenta que los niños prematuros pasan largos períodos de tiempo ingresados sometidos a un ambiente hospitalario altamente agresivo para su sistema inmune tan inmaduro (63).

También se han encontrado *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Escherichia coli* que reducen la incidencia de patógenos en los recién nacidos que permanecen en ambientes hospitalarios durante mucho tiempo (63).

La LM contiene lactoferrina, como hemos visto anteriormente, que juega un papel muy importante en la microbiota intestinal promoviendo el crecimiento de bacterias probióticas como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Además, la cantidad de lactoferrina es mayor durante la etapa del calostro y va disminuyendo con el paso de los días.



Figura 1.14- Transmisión de microbiota materna a través de la LM
(Fotografía de acceso público en red, modificada por autoría propia)

La LM, por tanto, es clave para la formación de la microbiota intestinal del recién nacido puesto que es su principal fuente de alimentación durante los primeros meses de vida. Posee gran cantidad de bacterias comensales, mutualistas y probióticas que son muy beneficiosas para el intestino del recién nacido. De esta forma, los gérmenes encontrados en su intestino son semejantes a los existentes en la LM. Sin embargo, cada mujer tiene una composición bacteriana diferente, lo que se ve reflejado en el intestino del recién nacido.

1.13.8.- Taxonomía de los microorganismos

A nivel genérico, se clasifican según (57):



1.14.- CONTEXTO

En el medio hospitalario vivimos rodeados de microorganismos que pueden invadir y afectar gravemente a los pacientes más vulnerables, entre los que se encuentran los niños prematuros. Conocer la microbiota intestinal que tienen y qué factores influyen positivamente en su adquisición y mantenimiento es un hito importante en su supervivencia y desarrollo. El parto por vía vaginal y la alimentación con LM, o en su defecto LHD, son factores de los más relevantes para la transmisión de microorganismos provenientes de la madre, que se convierten en los primeros colonizadores del intestino del recién nacido prematuro, como hemos visto.

El estrés puede afectar de forma muy negativa en el bienestar de los padres. Nosotros veremos cómo éste influye en la madre relacionado con la LM y como consecuencia en la microbiota intestinal del recién nacido. Veremos cuál es la microbiota que predomina en la LM y en el intestino de nuestros niños prematuros y cómo les influye el estrés de sus madres.

2.- JUSTIFICACIÓN

Actualmente el estrés forma parte de nuestra vida diaria y representa un conjunto de alteraciones en el organismo que tienen lugar cuando percibimos una situación como amenazante o que desborda nuestra capacidad para enfrentarnos a ella. Puede tener consecuencias positivas o negativas, dependiendo de la capacidad individual de afrontamiento. El embarazo puede suponer una situación de estrés importante puesto que conlleva una serie de cambios a nivel físico, personal y profesional, en condiciones normales. Si se presenta además un parto de forma prematura, el estrés aumenta debido a múltiples factores como la incertidumbre sobre la viabilidad del recién nacido prematuro, la escasa preparación de esos padres para enfrentarse a la situación que les está sucediendo y a otras causas familiares e individuales que puedan jugar un papel de estrés añadido en ese momento.

La formación de la microbiota intestinal es un proceso que tiene lugar ya intraútero y continúa desarrollándose desde los primeros momentos del nacimiento, ganando una mayor relevancia si el niño es nacido mediante un parto vaginal y alimentado con LM. Este es un episodio muy importante para el desarrollo del sistema inmune y del intestino, sobre todo en los recién nacidos prematuros donde, además, suelen ser bastante frecuentes los tratamientos farmacológicos con antibióticos y el retraso en la alimentación enteral, lo que dificulta la instauración de una adecuada microbiota. Se ha visto una relación entre altos niveles de estrés en el embarazo con una peor composición de la microbiota intestinal en esos niños, favoreciendo en éstos, síntomas gastrointestinales, alergias y otros problemas.

El recién nacido se sigue colonizando en los primeros días de vida, influenciado por el tipo de parto, la microbiota materna, el medio ambiente y la LM, que actúa como factor protector del niño, puesto que va colonizando el tracto gastrointestinal por bacterias anaerobias comensales, como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, entre otras, que son tan necesarias para la formación de su propia microbiota.

Los partos de niños prematuros son cada vez más frecuentes, debido a múltiples causas, y con una supervivencia cada vez más elevada. Además, la correcta formación de la microbiota del intestino es fundamental para el buen desarrollo del recién nacido, evitando la temprana y futura aparición de enfermedades.

El estrés materno puede influir en la composición de los macronutrientes y en la cantidad de LM extraída por la madre, así como en el desarrollo de la microbiota intestinal del niño y su evolución posterior. Se sabe que determinados factores como el nacer por vía vaginal o la toma de antibióticos tanto por parte de la madre como del niño, va a provocar una adquisición de una microbiota diferente.

Por todo ello, estaría justificado este estudio valorando en nuestra cohorte de pacientes si existe o no relación entre el estrés materno, la LM y la microbiota intestinal del recién nacido, así como cuál es la microbiota predominante dependiendo si nacen por vía vaginal o cesárea, si toman antibióticos o no, etc.

3.- OBJETIVOS

3.1.- PRINCIPAL

- Valorar la influencia del estrés de las madres lactantes en la cantidad de LM extraída, en sus macronutrientes y en la microbiota de la LM e intestinal del recién nacido prematuro ≤ 32 semanas de edad gestacional y/o ≤ 1500 g de peso.

3.2.- SECUNDARIOS

- Valorar el estrés durante el período de estudio, en las diferentes subescalas de la escala PSS:NICU.
- Valorar la influencia del nivel de estudios en el manejo del estrés de las madres.
- Valorar la cantidad de LM producida en madres de niños prematuros durante el período de estudio, así como las diferencias en la composición de macronutrientes en relación con diferentes factores (tipo de parto, sexo, edad de la madre, etc).
- Valorar los niveles de CPF en relación con determinados factores como: sexo, edad gestacional, peso, antibióticos prenatales y postnatales, cantidad de macronutrientes en la LM, tipo de parto y bacterias *Clostridiales* en heces.
- Valorar la microbiota predominante en LM y heces del recién nacido.
- Valorar las diferencias en la microbiota intestinal de los recién nacidos prematuros en relación con diferentes variables como: tipo de parto, edad gestacional, antibióticos pre y postnatales, etc.
- Valorar la biodiversidad de la LM y heces de los recién nacidos prematuros, en relación con diferentes factores como: estrés, tipo de parto, antibióticos pre y postnatales, etc.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio prospectivo para valorar el estrés de las madres de niños recién nacidos prematuros de menos de 1500 g y/o menos de 32 semanas de gestación y la influencia que éste pueda tener sobre la producción de LM (cantidad y composición), la colonización bacteriana del intestino del recién nacido y la calprotectina en heces del neonato.

Este estudio se realiza durante un período de 2 años (desde el 1 de Mayo del año 2019 hasta el 1 de Mayo del año 2021, ambos inclusive) en pacientes ingresados en la UCIN del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Nivel III, Q3+, de los niveles asistenciales para la atención neonatal del Comité de Estándares de la Sociedad Española de Neonatología (64). El tiempo de seguimiento en el estudio tanto en las madres como en el neonato ha sido durante los primeros 15 días de vida del recién nacido.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de Galicia, Santiago-Lugo, con el número de registro 2019/229, en su versión 3.0. Todas las muestras han sido utilizadas con el fin del presente estudio.

4.2.- POBLACIÓN

4.2.1.- Criterios de Inclusión

Todos los recién nacidos prematuros $\leq$ de 32 semanas de EG y/o $\leq$ 1500 g de peso, cuyas madres tengan la intención de dar LM, así como sus madres.

4.2.2.- Criterios de Exclusión

- Pacientes que por su gravedad no sea compatible su participación en el estudio.
- Pacientes cuyos padres no han accedido a participar del estudio y no hayan firmado el consentimiento informado (CI).
- Pacientes cuyas madres tienen intención de dar LM, pero deciden abandonarla en los primeros días de vida.

4.3.- VARIABLES DEL ESTUDIO

La variable principal de estudio es el estrés materno.

En nuestro estudio nos interesa conocer el estrés que una madre tiene ante determinadas situaciones vividas en una UCIN y cómo éste influye en otras variables como: la cantidad de la LM extraída por la madre y la composición de ésta en cuanto a macronutrientes (proteínas, grasas e hidratos de carbono) o cómo puede llegar a influir en la colonización bacteriana intestinal, con estudio de la microbiota en heces del recién nacido y LM así como de calprotectina en heces del neonato.

Se recogen variables en cuanto a:

4.3.1.- Datos sociodemográficos (Anexo 1)

- Edad de la madre. La hemos categorizado en añosa ($\geq$ 35 años) y no añosa ($<$ 35 años).
- Número de embarazos.
- Nivel de estudios: sin estudios, primarios, secundarios, superiores.
- Tipo de parto: vaginal o cesárea.

- Edad gestacional.
- Peso al nacimiento.
- Sexo.
- Gemelaridad.

4.3.2.- Variables Clínicas del recién nacido

Se recogen datos relativos a la situación clínica de los recién nacidos prematuros, en los tres puntos de corte de 3, 7 y 15 días de vida, tales como:

- Tipo de soporte respiratorio: ventilación mecánica invasiva (VMI), no invasiva (VMNI) o no necesidad de soporte respiratorio.
- Persistencia de ductus arterio-venoso (ductus AV) hemodinámicamente significativo.
- Sepsis.
- Días de antibióticos recibidos por el recién nacido y momento de inicio.
- Antibióticos recibidos por la madre, previos al parto.
- Día de inicio de la nutrición enteral y grado de tolerancia.
- Días de nutrición parenteral.
- Día de inicio de la fortificación de la LM.
- Peso del recién nacido prematuro al nacimiento, a los 3, 7 y 15 días de vida.
- Variable evolución: se han creado las variables evolución 3 días (d), evolución 7d y evolución 15d, en función de los resultados obtenidos en las morbilidades respiratorio, sepsis, ductus y digestivo. La alteración en 2 ó más de estas variables califica la evolución como muy mal; la alteración de 1 variable califica la evolución como mal y la normalidad en todas las variables determina una evolución como buena.

4.3.3.- Inicio del Método piel con piel o Madre Canguro

Hemos recogido el día de inicio del método canguro para relacionarlo con la variable estrés y se ha categorizado de la siguiente forma;

- a- Canguro precoz: desde nacimiento hasta ≤ 4 días.
- b- Canguro intermedio: 5-7 días.
- c- Canguro tardío: ≥ 8 días.

4.4.- PLAN DE TRABAJO

La recogida de muestras, así como del resto de los datos, se resume en la tabla (4.1).

	3 DÍAS	7 DÍAS	15 DÍAS
Heces: microbiota	✓	✓	✓
LM: microbiota	✓	✓	✓
Escala de estrés (PSS: NICU)	✓	✓	✓
Heces: CPF	✓	✓	✓
LM: macronutrientes	✓	✓	✓
LM: producción			✓
Datos sociodemográficos y CI	✓		

CI: consentimiento informado; CPF: calprotectina fecal; LM: lactancia materna; PSS: NICU: escala estrés parenteral en UCIN

Tabla 4.1.- Plan de trabajo

Una vez finalizados los 15 días, se daba por finalizada la recogida de datos tanto por parte del recién nacido como de la madre.

Cuando el recién nacido era dado de alta, se recogían las variables clínicas que debían ser estudiadas, para nuestra base de datos.

4.5.- MÉTODO

4.5.1.- Escala de Estrés Parental (PSS:NICU) (Anexo 2)

Para cuantificar el estrés en las madres de los recién nacidos prematuros, se ha usado la escala de estrés parental (PSS:NICU), desarrollada por la Dra Miles en 1987⁽³¹⁾. Consta de 46 ítems y se utiliza para valorar de forma objetiva la percepción del estrés de los padres dentro de una UCIN. La escala está formada por 5 subescalas que miden el estrés relacionado con:

- Aspectos visuales y sonoros de la UCIN (AVS); formada por 5 ítems donde se analiza el nivel de estrés en los padres propiciado por el propio ambiente de la UCIN; ruidos de monitores, aparatos, alarmas, así como también cómo le influye en su nivel de estrés la presencia de otros niños graves en la Unidad.
- Apariencia física y comportamiento del recién nacido (AFC); formada por 19 ítems que hacen referencia al estado en el que se encuentra físicamente su hijo, así como los cuidados que necesita.
- Relación con el recién nacido y rol de madre (RM); formada por 10 ítems donde se analiza el estrés producido por la alteración del vínculo entre madre-hijo al estar separados debido al ingreso en UCIN.
- Comunicación con el personal sanitario (CPS); formada por 11 ítems que valoran el nivel de estrés que le produce la comunicación con el personal sanitario, la información recibida por parte del mismo, así como la empatía percibida.
- Estrés común o general (EC); constituye un único ítem que haría referencia a la percepción individual de estrés a la que está sometida la madre al tener ingresado su hijo en la UCIN.

La puntuación global de los 46 ítems la hemos ponderado para obtener una calificación de estrés total (ET).

Cada ítem tiene un formato de respuesta en una escala tipo Likert de 5 puntos, que va desde 1 a 5, donde 1 significa que no existió estrés y 5 significa extremadamente estresante (Tabla 4.2).

Grado del nivel de estrés	
Ningún estrés	1
Estrés ligero	2
Estrés moderado	3
Muy estresante	4
Extremadamente estresante	5

Tabla 4.2.- Grado de estrés

Cuando la experiencia que se ha descrito en el ítem no tuvo lugar y no la experimentaron los padres, hay una opción que se denomina No Aplicable (NA) dentro de la escala que, en una de las formas de corrección, la métrica 1, implica valor inexistente, mientras que en la métrica 2 se asume como 1.

Las 5 subescalas de la PSS:NICU y la de estrés general, pueden ser corregidas de tres formas diferentes obteniendo tres métricas distintas, dependiendo de lo que queramos analizar, obteniéndose siempre puntuaciones medias⁽³⁶⁾:

- 1- Métrica 1: usamos esta medida para ver la ocurrencia de estrés relacionado con una situación particular. En este caso, sólo los padres que informan haber tenido la experiencia reciben una puntuación en el ítem. Los que informan que el ítem no ha sido experimentado, cuenta como NA y no se le asigna ningún valor. El denominador para conocer el promedio de cada subescala sería el número total de ítems experimentados, es decir, se descuentan los NA. Su valor se relaciona con lo que realmente les generó estrés.
- 2- Métrica 2: Proporciona un nivel de estrés más general. En este caso, si los padres no experimentaron el ítem, cuenta como NA y éste tendrá aquí un valor de 1, que significa que no hubo estrés. El denominador para conocer el promedio de cada subescala aquí sería el número total de ítems.
- 3- Puntuaciones de frecuencia o Métrica 3: Sería el sumatorio del número de elementos experimentados por los padres en cada una de las subescalas y la escala total o general de estrés. Indica el número total de elementos estresantes que los padres han experimentado en la UCIN. Es la métrica menos utilizada y permite valorar la frecuencia con la que los padres experimentan el contenido de los ítems.

Nosotros hemos utilizado la forma de corrección de la Métrica 1, puesto que es la que más se adecúa a nuestro análisis porque sólo tiene en cuenta las acciones que experimentaron las madres, eliminando las que no experimentaron nunca.

Los valores obtenidos en cada subescala, por lo tanto, se corrigen sumando cada puntuación y se van haciendo medias, en función de la métrica elegida (en nuestro caso la métrica 1).

No hemos utilizado las puntuaciones de frecuencia, pero sí hemos usado de forma independiente la escala de estrés general, puesto que con ella obtenemos un valor absoluto entre 1 (no estrés) y 5 (estrés en grado máximo).

Hemos analizado también cuál ha sido el ítem que más y menos estrés produjo en nuestras madres en general, así como también cuál de las subescalas es la que más y menos estrés les produce.

En la entrevista informativa que manteníamos con las madres de nuestras posibles candidatas al estudio, les explicábamos en qué consistía la escala de estrés parental y les informábamos de la escasa dificultad que tenía para ser cumplimentada.

Una vez aceptaban formar parte del estudio, les explicábamos de forma más pormenorizada la forma de cubrirla. Esta explicación siempre fue realizada por el mismo investigador, que era el encargado de ponerse en contacto con la madre, para cualquier duda o aclaración de la misma, evitando así posibles sesgos a la hora de la explicación o interpretación.

En nuestro estudio, la escala la han cubierto las madres en los 3 momentos de la recogida de las demás muestras; al tercer día, a los 7 y a los 15 días de vida del recién nacido. Queríamos valorar el nivel de estrés con el paso de los días, así como relacionar dicho nivel de estrés con la calidad y cantidad de LM y con la microbiota intestinal encontrada en el recién nacido. La escala era recogida al día siguiente de ser cubierta por la madre y era entregada al personal del Servicio de Neonatología, quien la custodiaba para el estudio.

La escala es fácil de entender, con un lenguaje sencillo y claro, y puede ser respondida en 10-15 minutos. Les hemos recomendado en todos los casos que la cubran en un ambiente tranquilo y relajado, donde puedan pensar bien las respuestas, sin que estén influidas por el personal sanitario ni por el propio ambiente de la UCIN.

En nuestro estudio, para algunas variables, hemos categorizado el estrés en función de su intensidad, de dos formas:

- a. En función de la mediana; dividiéndose en ningún estrés/ligero y moderado/grave según la puntuación fuese $<$ o $\geq$ a la mediana de estrés determinada en cada momento del estudio.
- b. En función del cuartil; ninguno/ligero ($< Q1$), moderado (entre $Q1$ y $Q3$) y grave ($\geq Q3$), valorando la puntuación obtenida en cada período del estudio.

4.5.2.- Cantidad de Leche Materna extraída (Anexo 3)

Recogemos datos sobre la cantidad de LM extraída por la madre durante los 15 días que se extiende la recogida de datos. Le proporcionamos a la madre una hoja de registro donde debe anotar la cantidad de leche que se va extrayendo cada día hasta completar los 15 días del estudio. La madre nos entrega la hoja de registro cubierta con la cantidad de leche recogida al cabo de los 15 días y se custodia para el estudio.

Se analizan 2 tipos de cantidades de LM:

- a. La cantidad obtenida en el día 3, 7 y 15 de vida, a la que llamamos cantidad de LM.
- b. El sumatorio de la cantidad de los 3 primeros días, los 7 siguientes y los 15 días, le llamamos cantidad total de LM.

También nos interesa la cantidad de LM extraída a día 4, para compararla con la extraída a día 15, como posible predictor de una buena/mala producción de LM.

4.5.3.- Análisis nutricional de macronutrientes de la LM

Se recoge una muestra de 5 ml de LM fresca en los días de análisis de datos (3, 7 y 15 días de vida) y se analiza su contenido nutricional en proteínas, grasas e hidratos de carbono, mediante el analizador de leche humana con tecnología FTIR (MilkoScan Mars, FOSS, Dinamarca) ⁽⁶⁵⁾ del Banco de Leche Humana Donada del Servicio de Neonatología del Complejo Universitario Hospitalario de Santiago de Compostela.

La recogida de leche se hacía directamente de la leche extraída por la madre, en el mismo momento que venía a la unidad, por la mañana y mediante un sacaleches, en todas las ocasiones. Se ha visto que si la LM se extrae de forma manual puede tener más contenido en grasas que si es extraída mediante una bomba extractora. Esto se ha tenido en cuenta a la hora de la recogida de las muestras, para que siempre fuese de la misma forma y no alterase el resultado del análisis ⁽⁶⁶⁾.

Se recogía en un frasco estéril la cantidad de 5 ml, se homogeneizaba agitándola varias veces y se calentaba a baño maría para su inmediato análisis. El analizador utilizado para la medición era sometido a su calibración diaria antes de realizar el análisis de los macronutrientes.

FTIR ⁽⁶⁵⁾ permite un análisis de macronutrientes de forma rápida, sencilla y económica. Sin embargo, estos analizadores fueron diseñados para la industria láctea, haciendo necesario realizar en ellos una validación previa a su uso dadas las diferencias existentes entre la leche de vaca y la leche humana (entre las que destacan: distinto ratio caseína: lactoalbúmina, diferentes perfiles de ácidos grasos y ausencia de oligosacáridos en la leche de vaca). Para dicha validación, debe llevarse a cabo un análisis de un número significativo de muestras de distintos tipos de leche materna (incluyendo calostro, leche intermedia, madura, de recién nacidos a término y de recién nacidos prematuros) en el laboratorio de referencia que proporcione unos resultados objetivos y fiables que permitan ajustar las curvas de los analizadores FTIR. Por otro lado, otros factores como el grado de homogeneización de la muestra pueden producir alteraciones en la matriz que alteren la lectura de los analizadores de infrarrojos. La literatura actual sugiere que los analizadores FTIR ofrecen unos resultados relativamente fiables en el caso del análisis de proteínas y grasas, válidos para llevar a cabo una fortificación “a la carta”; sin embargo, la medición de lactosa que realizan resulta imprecisa.

Para definir la calidad de la LM de las madres de nuestro estudio, hemos calculado la mediana para cada macronutriente y hemos asumido ésta como “ideal” de LM (de la misma forma que hemos hecho al calcular las medianas en el caso de la variable del estrés), y las hemos comparado con los valores encontrados en la bibliografía (67).

Hemos considerado LM de alta calidad cuando los 3 parámetros de macronutrientes analizados coinciden con la mediana o son superiores a ella y de baja calidad si alguno de los 3 macronutrientes está por debajo de la mediana.

De todas formas, hay que tener en cuenta que la LM siempre es superior y la más adecuada y beneficiosa para la alimentación de un recién nacido prematuro, por lo tanto, hablar de LM de alta y baja calidad sólo lo hacemos para referirnos a la proporción de grasas, lactosa y proteínas.

4.5.4.- Análisis de CPF

Las muestras de heces para el análisis de CPF eran recogidas del pañal, en los días de recogida de datos (3, 7 y 15 días de vida) y se almacenaba la muestra de forma inmediata en nevera a una temperatura entre 2 y 8° C, hasta ser enviada al Laboratorio Central del Complejo Universitario Hospitalario de Santiago de Compostela (CHUS). Se sabe que la CPF es una proteína muy estable y resistente a la degradación (permanece inalterable hasta 7 días a temperatura ambiente), por lo que no requiere su análisis inmediato. Suele eliminarse intacta por las heces, lo que la convierte en un buen marcador no invasivo para un cribaje de la inflamación intestinal, aunque menos valorable en niños por la elevada variabilidad interindividual en cuanto a cifras, que imposibilita establecer un valor a partir del cual se considera patológico (39).

En nuestro estudio, las muestras se han recogido directamente del pañal y se han enviado a analizar en frascos estériles. Según Olafsdottir y cols (44), al recoger las muestras directamente del pañal existen concentraciones de CPF hasta un 30% mayor, debido a que el pañal absorbe agua. Hemos tenido este hecho en cuenta y por ello se han recogido siempre las muestras de la misma forma, para solventar posibles sesgos de interpretación de resultados.

No existe un valor de CPF adaptado a niños prematuros. Se ha observado que los niños presentan niveles más elevados que en adultos, donde el límite superior a la normalidad se establece en 50 µg/g (39, 40). En niños sanos, en el primer año de vida, se aceptan valores hasta 10 veces superiores, sin tener repercusión clínica. La gran variabilidad interindividual hace que este marcador no sirva como valor absoluto en la detección o predicción de patologías tan importantes como la NEC. Por lo tanto, no se ha establecido en pediatría un rango decisivo de CPF (39, 40, 43). Estos niveles más elevados en la infancia pueden estar relacionados con una mayor permeabilidad intestinal debido a la inmadurez propias de la edad, puesto que va disminuyendo de forma progresiva con la edad.

En el Laboratorio Central fue determinada por técnica ELISA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, prueba que es una herramienta diagnóstica útil para la medición de la CPF (68).

4.5.5.- Análisis de la microbiota en heces del recién nacido y en LM

- Heces: se recogían directamente del pañal mediante una espátula, en todos los casos, y eran metidas en un frasco estéril. La situación clínica del paciente o el hábito intestinal presente en ese momento pudo provocar no lograr suficiente cantidad de muestra en algunos casos.
- LM: fue recogida también en un frasco estéril, después de haber sido extraída con sacaleches, con una cantidad de aproximadamente 1 cm, para su posterior análisis microbiológico. En alguna ocasión tampoco hemos conseguido muestra de LM, sobre

todo en la referente al tercer día de vida, puesto que todavía no había una lactancia correctamente establecida.

Tanto las muestras de heces como las de LM, eran identificadas, codificadas y enviadas directamente en mano al Servicio de Microbiología del CHUS, donde se conservaban congeladas a una temperatura de -80°C en tubos con tapón de rosca hasta su procesamiento y posterior análisis. La conservación a -80°C se utiliza para no alterar la comunidad microbiana hasta que puedan extraerse los ácidos nucleicos ⁽⁶⁹⁾.

Se utilizan para su análisis técnicas de secuenciación masiva de segunda generación, que es la mejor opción para estudiar el microbioma humano ^(69,70). Se realizó la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras de heces y leche materna en el equipo Maxwell® RSC utilizando el kit *Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el material genómico se cuantificó el ADN mediante Qubit DNA Assay Thermo Fisher® ⁽⁷⁰⁾.

Partiendo de una concentración fija de ADN de 5ng/microL se procedió a la amplificación de la región de interés, regiones variables V3 y V4 del gen ARNr 16S, usando primers específicos unidos a secuencias adaptadoras compatibles con los índices de Illumina. Una vez obtenidos los amplicones de unos 460 pares de bases se procedió a la preparación de las librerías usando los índices Nextera XT Illumina®. Tras la purificación, chequeo y cuantificación final se llevó a cabo la desnaturalización y carga de la librería a una concentración de 6pM en el secuenciador MiSeq (Illumina). Finalmente, se procedió al análisis de los resultados con BaseSpace de Illumina mediante la aplicación Metagenómica 16S ⁽⁷¹⁾.

Mediante técnicas de secuenciación para el análisis microbiológico, se han conseguido detectar un gran número de microorganismos. Se ha calculado el Índice de Shannon para valorar la biodiversidad de las muestras de LM y meconio. El índice de Shannon es uno de los indicadores más usados para cuantificar la biodiversidad y nos muestra la heterogeneidad de una comunidad, donde el valor de cero indica que sólo hay una especie y a partir de ahí, a mayor índice mayor es la diversidad de las especies ^(72,73). Un Índice de Shannon elevado en una muestra nos indicará que hay mucha riqueza de microorganismos diferentes.

Hemos analizado los microorganismos y los hemos clasificado según la taxonomía siguiendo el esquema Linneano, donde el reino es el grupo más grande y la especie es el más pequeño (Figura 4.1). Linneo fue un botánico al que se le considera el precursor de la taxonomía de los seres vivos y diseñó la nomenclatura binomial, por la cual cada especie aparece representada por 2 palabras en donde una representa el género y otra la especie. A partir de Linneo el sistema de clasificación de especies pasó por varias modificaciones a medida que se fueron haciendo nuevos descubrimientos microbiológicos hasta la época actual donde la ciencia de la Taxonomía y la Nomenclatura clasifica y da nombre a los microorganismos según un enfoque genético o molecular, siguiendo el Código Internacional de Nomenclatura de Procariotas (ICNP) ⁽⁷⁴⁾.

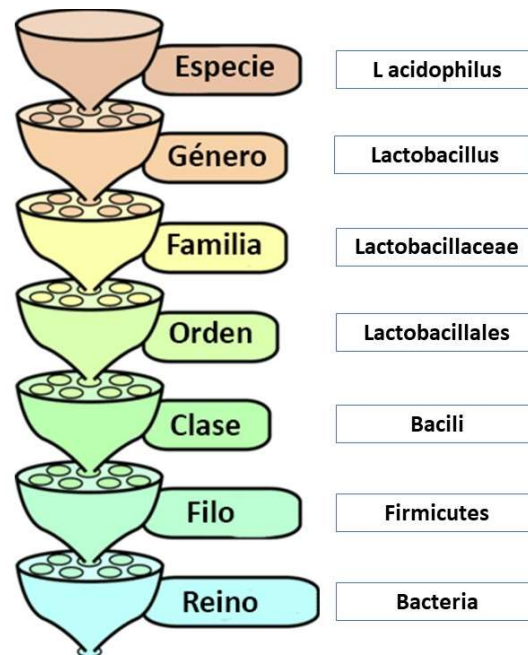


Figura 4.1.- Estructura jerárquica de los taxones y ejemplo

Nosotros hemos estudiado los filos, centrándonos sobre todo en los más representativos:

- 1- Las Proteobacterias; son bacterias Gram negativas que incluyen en su mayoría microorganismos potencialmente patógenos (como *Neisseria*, *Helicobacter*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*...). Suelen relacionarse con la presencia de procesos inflamatorios sobre todo intestinales, pero también extraintestinales, como alteraciones metabólicas, cardiovasculares o pulmonares (75).
- 2- Los Firmicutes; son bacterias Gram positivas, en su mayoría, y muy resistentes ya que son capaces de formar esporas. Suelen estar formados por microorganismos no patógenos, como *Facecalinebacterium*, *Roseburia* y es donde se encuentran también el género de los Lactobacillales, donde se enmarcan los *Lactobacillus*, quienes desempeñan un papel importante en la fermentación láctica. También contienen géneros patógenos como *Clostridium*, *Staphylococcus* o *Enterococcus*. Los Firmicutes junto con los Bacteroidetes, son los filos predominantes en la etapa adulta, en ausencia de enfermedad, representando aproximadamente el 90% de la microbiota intestinal (59, 76).
- 3- Las Actinobacterias; son bacterias en su mayoría beneficiosas para el organismo y Gram positivas. Destacan los *Streptomyces*, que producen antibióticos naturales, aunque una de las más conocidas es el género *Bifidobacterium*, que son sustancias con múltiples funciones saludables y de vital importancia para el organismo. Comienzan a aparecer con la LM y van progresando con el tiempo al tomar productos lácteos. Van disminuyendo progresivamente con la edad y son muy sensibles a las condiciones ambientales (antibióticos, mala alimentación). Cuantas más *Bifidobacterium* se pierden, mayor envejecimiento y poco saludable tendremos.
- 4- Los Bacteroidetes; son bacterias Gram negativas, donde se enmarcan los *Bacteroides* y *Prevotella*. Suelen ser bacterias beneficiosas para el organismo. Deben mantener un equilibrio con los Firmicutes para conseguir un estado de eubiosis intestinal (76).

Analizamos también el Orden taxonómico, el Género y las especies más abundantes, tanto en las muestras de heces como de LM.

En cuanto a la clasificación taxonómica de Orden, nos hemos centrado en estos cuatro:

- 1- Los Enterobacteriales: son bacterias pertenecientes al filo Proteobacterias.
- 2- Los Clostridiales: corresponden al filo de los Firmicutes.
- 3- Los Lactobacillales: son bacterias que pertenecen al filo de los Firmicutes.
- 4- Los Bifidobacteriales: corresponden al filo de las Actinobacterias.

4.5.6.- Información a los padres previa al estudio (Anexo 4)

Al día siguiente del nacimiento de un recién nacido prematuro que puede ser candidato a nuestro estudio y cuya madre va a dar LM propia a su hijo, se formaliza una entrevista con los padres para informarles sobre el mismo. Se les comenta nuestro estudio, cuál es el objetivo de la investigación, cómo hacemos el reclutamiento de pacientes, qué muestras necesitamos para el análisis y de qué forma se recogerán dichas muestras para las que les pedimos un permiso en forma de CI. Se les informa que no se aplicarán técnicas cruentas para la obtención de muestras de LM y heces del recién nacido y se les comenta que la madre tendrá que cubrir un cuestionario que evalúa el estrés, en los mismos días de la recogida de muestras, así como también necesitamos hacer un recuento de la cantidad de leche materna extraída, hasta que se cumplan los 15 días, momento en el que expira la recogida de datos. Se les presenta la información también por escrito que podrán consultar y meditar en su domicilio para valorar su interés en la participación del estudio.

Si aceptan ser participantes se les dará a firmar el CI (Anexo 5) donde se explica el tipo de muestras que se recogerán y en qué momento. Se les informa que pueden revocar dicho consentimiento en cualquier momento del estudio, sin consecuencia alguna.

Les entregaremos también las escalas de estrés parental, con las fechas en las que tendrán que cubrirlas, coincidiendo con las fechas de las recogidas de muestras (3, 7 y 15 días de vida del recién nacido). La escala será explicada por la investigadora principal y será la misma para las tres ocasiones en las que tendrán que cubrirla, lo que facilita la tarea.

Le daremos también a la madre una hoja de registro para anotar la cantidad de LM que se va extrayendo cada día. Aprovechamos la entrevista para recoger también los datos sociodemográficos que necesitamos.

Se les explica que se recogerán muestras de heces y LM en los días de corte del estudio, para su análisis en el laboratorio de Microbiología del propio hospital, así como también se analizarán las heces para determinar la cifra de CPF en el laboratorio central del mismo hospital. Le informamos que una muestra de LM será analizada en el Banco de Leche Humana del Servicio de Neonatología para valorar su contenido nutricional en macronutrientes en relación con grasas, proteínas e hidratos de carbono.

4.5.7.- Recopilación de los datos y registro

Finalizada la recogida de datos se recopilaban todos los resultados en una hoja de Excell hasta su posterior análisis.

4.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio de las variables diseñadas para este trabajo se ha utilizado el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 20.0.

Al ser el tamaño muestral máximo de 52 resultados, existiendo pérdida de datos en ocasiones, se optó por estudiar la normalidad de las variables cuantitativas mediante el test de Shapiro-Wilk. La existencia de una p inferior a 0.05 implica diferencias con una distribución normal, por lo que se debe considerar la variable de estudio como de distribución no normal. La mayoría de las variables estudiadas en este trabajo cumplen criterios de distribución no paramétrica, por

lo que se decidió emplear tests no paramétricos en todo el estudio para favorecer la homogeneidad del estudio.

Desde el punto de vista descriptivo, las variables cuantitativas se presentan mediante la mediana y rango intercuartílico.

Para la comparación estadística de variables cuantitativas de distribución no normal se utilizó el test no paramétrico de U Mann Whitney.

La comparación estadística de variables cualitativas se realiza mediante el test de chi cuadrado.

Para la comparación estadística de 3 ó más variables se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis.

La posible relación entre variables se estudió mediante el test de correlación de Spearman o mediante estudios de regresión lineal uni o multivariante.

En todas las comparaciones de variables se consideró la significancia estadística con una $p \leq 0.05$.

5.- RESULTADOS

Parte de los resultados aquí presentados, forman parte de la publicación:

Fernández-Tuñas MDC, Pérez-Muñuzuri A, Trastoy-Pena R, Pérez Del Molino ML, Couce ML. Effects of Maternal Stress on Breast Milk Production and the Microbiota of Very Premature Infants. *Nutrients*. 2023 Sep 16; 15(18): 4006. doi: 10.3390/nu15184006.

5.1.- POBLACIÓN DE ESTUDIO

Durante el período de estudio de 2 años en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela ingresaron un total de 79 recién nacidos prematuros con una EG $\leq$ 32 semanas y/o de peso $\leq$ 1500 g de los que 27 fueron excluidos por no obtener el consentimiento informado, no recibir leche materna propia o presentar condiciones clínicas graves que imposibilitaban la nutrición enteral. Finalmente se estudiaron un total de 52 prematuros y sus 45 madres lactantes. La muestra cuenta con 28 niños y 24 niñas, de los cuales hay 3 pares de gemelos y otro gemelo, cuyo hermano no ha sido ingresado por no cumplir los criterios de ingreso.

5.2.- RECOGIDA DE DATOS Y MUESTRAS

La tabla 5.1 recoge el número de muestras y registros analizados en cada uno de los momentos del período de estudio.

	3 días	7 días	15 días	Total
Heces (análisis microbiológico)	42	45	42	129
LM (análisis microbiológico)	29	36	35	100
Encuestas PSS:UCIN	41	43	42	126
Heces (CPF)	50	52	52	154
LM (análisis nutricional)	39	43	43	125
LM (análisis cuantitativo)	39	43	43	125
Datos Sociodemográficos Maternos	44			44
Variables Clínicas del Prematuro	52	52	52	156

Tabla 5.1.- Muestras obtenidas durante el estudio

Del total de 229 muestras de LM y heces, 94 tenían un elevado contenido microbiano. A continuación, mostramos la tabla 5.2 con el total de las muestras secuenciadas en las que se ha encontrado un valor biológico elevado.

	3 DÍAS	7 DÍAS	15 DÍAS	TOTAL
HECES	8	16	26	50
LM	10	18	16	44
TOTAL	18	34	42	94

Tabla 5.2.- Muestras secuenciadas con alto valor biológico

Se han recogido un total de 126 escalas PSS. No se han podido obtener algunos registros en aquellas madres que permanecían varios días ingresadas en el Servicio de Reanimación por inestabilidad clínica a causa de complicaciones del parto prematuro.

Se han analizado 154 muestras de heces para obtener CPF en el laboratorio central del CHUS, faltando la recogida de dos de ellas por pérdida de la estabilidad del recién nacido prematuro.

Asimismo, se ha realizado el análisis cualitativo (macronutrientes) en 125 muestras de LM, obteniendo su composición en grasas, proteínas e hidratos de carbono. No se han podido recoger todas las muestras de LM para el análisis nutricional puesto que, sobre todo al tercer día de vida, la madre todavía no tenía una cantidad suficiente de leche como para ser analizada, siendo la cantidad mínima para llevar a cabo el análisis de 5 ml.

5.3.-ANÁLISIS DE FRECUENCIAS

5.3.1.- Descripción de la muestra de pacientes

En la tabla 5.3 se recogen las características y resultados obtenidos de las madres estudiadas y sus recién nacidos prematuros. Y en las figuras 5.1 y 5.2 la distribución de los recién nacidos por edad gestacional, peso y sexo.

		Tiempo (días)															
		Al nacimiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Edad madre (años)		35 (31.5 - 38)															
Edad Gestacional (EG)		31s (29 - 32)															
Antibióticos prenatales (n,%)		17, 37.8%															
Nivel educativo (n,%)	Estudios primarios	4, 9%															
	Estudios secundarios	18, 40%															
	Estudios superiores	23, 51%															
Tipo de parto (n,%)	Vaginal	17, 33%															
	Cesárea	35, 67%															
Gemelaridad		8, 15.4%															
Sexo del recién nacido: M/H (n,%)		H (28, 56.8%) M (24, 46.2%)															
Mediana de peso del recién nacido (rango intercuartílico) y percentiles		1375 g (1012 - 1667) p33			1240 g (927-1467) p15				1280 g (990-1515) p12								1520 g (1125 - 1755) p14
Antibióticos neonatales en las primeras 48h (n,%)		34, 65.4%															
Duración del tratamiento antibiótico									7 días								
Soporte respiratorio (n,%)	Invasivo				2, 3.8%				0, 0%								1, 1.92%
	No invasivo				38, 73.1%				16, 30.8%								7, 13.5%
Ductus arteriovenoso significativo (n,%)					2, 3.8%				3, 5.8%								3, 5.8%
Sepsis (n,%)					7, 13.5%				4, 7.7%								3, 5.8%

Nutrición (n,%)	Parenteral				51, 98.1%					24, 46.2%							3, 5.8%
	Buena tolerancia				46, 88.5%					51, 98.1%							50, 96.2%
	Nutrición enteral completa				4, 7.7%					39, 75%							48, 92.3%
	Fortificación				0, 0%					19, 36.5%							45, 86.5%
Inicio Método Canguro (n,%)	Temprano				16, 30.8%					20, 38.5%							
	Intermedio																
	Tardío																
Niveles medianos CPF (µg/g heces), (rango intercuartílico)					70 (20.25-148.75)					26 (7.25-60.75)							42 (28-72.75)
Niveles medianos CPF (µg/g heces) en recién nacidos con/sin antibióticos (rango intercuartílico)					83.5 (22-168) vs 64 (19-129)					17 (6-39) vs 54 (17-94) p=0.027							49 (28-73) vs 38 (29-54)
Niveles medianos CPF (µg/g heces) en función del peso: <1000g; 1001-1500g; >1500g, (rango intercuartílico)					122 (55-246.5); 70 (21-127); 21 (12.5-120.5) p=0.044					24.5 (14.5-45); 21.5 (6-54); 42.5 (8-78.5)							40 (7.5-71.5); 43 (29.5-91.5); 47.5 (30-66.5)

CPF, calprotectina fecal; g, gramos; H, hombre; M, mujer; n, número; s, semanas

Tabla 5.3.- Descripción global de la muestra

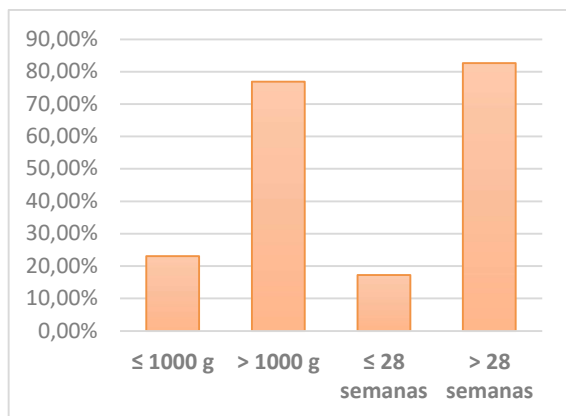


Figura 5.1.- Distribución de la prematuridad por EG y peso

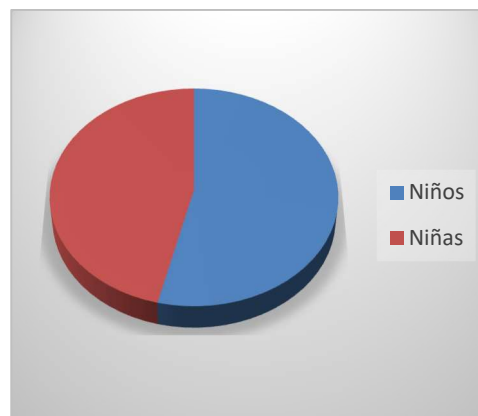


Figura 5.2.- Distribución por sexo

5.3.2.-Evolución del peso

La mediana de peso al nacimiento de la muestra estudiada es de 1375g. Al tercer día de vida todos pierden peso, con una mediana de 1240g. A los 7 días hay una recuperación ponderal con una mediana de 1280 g y a los 15 días superan el peso al nacimiento con una mediana de 1520 g (Figura 5.3).

La mediana de incremento de peso desde el nacimiento a los 15 días es de 120g (30-157.5g).

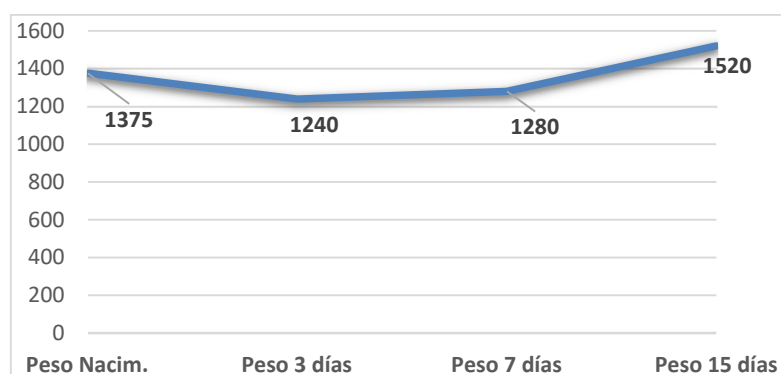


Figura 5.3.- Incremento de peso desde nacimiento hasta los 15 días

5.3.3.-Evolución del soporte respiratorio, ductus y sepsis

Como se observa en la Figura 5.4, a los 3 días de vida, la mayoría de nuestros pacientes necesitan soporte respiratorio no invasivo presentando, la gran mayoría, una evolución respiratoria favorable.

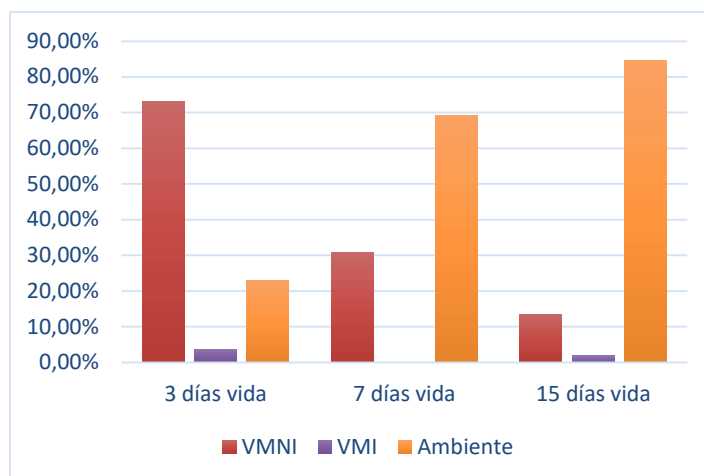


Figura 5.4.- Evolución del soporte respiratorio

El ductus arterio-venoso hemodinámicamente significativo es poco frecuente entre nuestros pacientes. La presencia de sepsis es mayor en los primeros días de vida.

5.3.4.- Evolución de la alimentación parenteral, enteral, fortificación de LM y uso de antibioterapia materna (prenatal) y neonatal

La administración de antibióticos, tanto en las madres como en los recién nacidos tiene lugar de la siguiente forma: el 37,8% de las madres reciben antibióticos prenatales durante el embarazo y parto inmediato. Los recién nacidos con pauta antibiótica suponen el 65,4% de la muestra. El inicio de antibióticos neonatales, en un 65,7% de los casos, tiene lugar desde el nacimiento y en el 34,28% restante durante los tres primeros días de vida. La duración mediana de los mismos es de 7 días, como podemos apreciar en la tabla 5.3.

Un porcentaje elevado de nuestros pacientes (98%) está con nutrición parenteral a los 3 días de vida, sin embargo, en las primeras 24 horas ya se comienza con una alimentación enteral trófica en un 56,7% de pacientes. Progresivamente se va disminuyendo aportes parenterales e incrementándose la alimentación enteral. Además, la tolerancia a la alimentación enteral en nuestros pacientes desde el inicio, en general, es buena. Así, a los 7 días, el 75% de nuestros pacientes tienen una alimentación enteral completa y a los 15 días, prácticamente la totalidad de los prematuros (92,3%) están sólo con nutrición enteral, en donde el 86,5% están ya con fortificación en la LM.

5.3.5.- Evolución de la cantidad de LM y de la cantidad total a los 3, 4, 7 y 15 días

Además de la cantidad de LM producida a día 3, 4, 7 y 15 días (figura 5.5), hemos medido también la cantidad total acumulativa de LM observando su incremento durante el período de estudio (Figura 5.6). De esta forma, a los 3 días la mediana de leche acumulada es de 30 ml, a los 7 días de 630,5 ml y a los 15 días de 2686 ml.

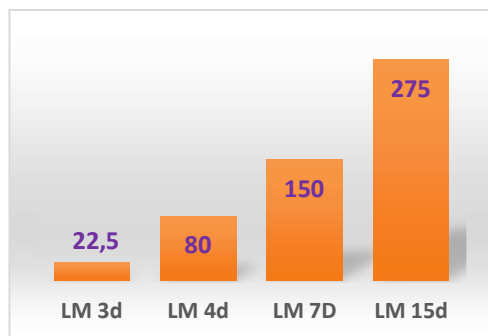


Figura 5.5.- Evolución de la LM producida (mediana), en ml, los días 3, 4, 7 y 15

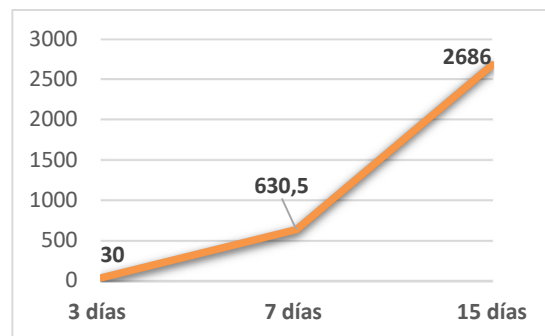


Figura 5.6.- LM acumulada desde los 0 a los 15 días de vida, en ml

5.3.6.- Composición de macronutrientes de la LM

En la tabla 5.4 y en la Figura 5.7, se refleja la composición de la LM en nuestra población de estudio.

	3 días	7 días	15 días
Proteínas (g/dl)	1,4 (1,3 - 1,4)	1,3 (1,3 - 1,4)	1,2 (1,2 - 1,3)
Grasas (g/dl)	1,79 (1,52 - 2,58)	3,16 (2,63 - 3,69)	3,27 (2,94 - 3,89)
Hidratos de carbono (g/dl)	6,55 (6,06 - 6,71)	6,85 (6,26 - 7,09)	7,19 (6,96 - 7,4)

Tabla 5.4- Niveles de macronutrientes de nuestra muestra de LM

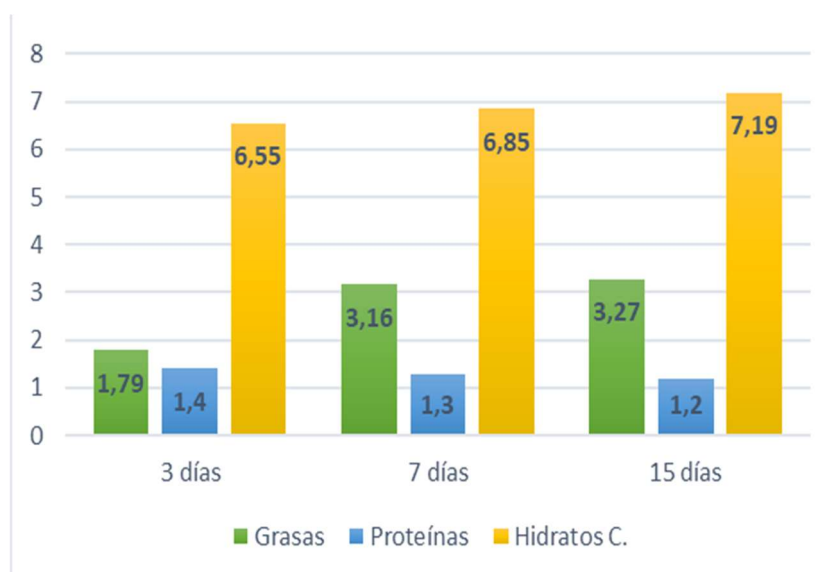


Figura 5.7.- Macronutrientes de la LM a los 3,7 y 15 días. Valores medianos en g/dl

Observamos en nuestra muestra, que los niveles de proteínas se mantienen en valores similares a lo largo de los 15 días mientras que las grasas e hidratos de carbono van en aumento a medida que transcurren los días.

5.3.7.- Escala de estrés parental (PSS:NICU)

El estrés medido mediante esta escala se ha subdividido en función de la mediana y en función de los cuartiles tal y como se explicó en el apartado de Material y Métodos.

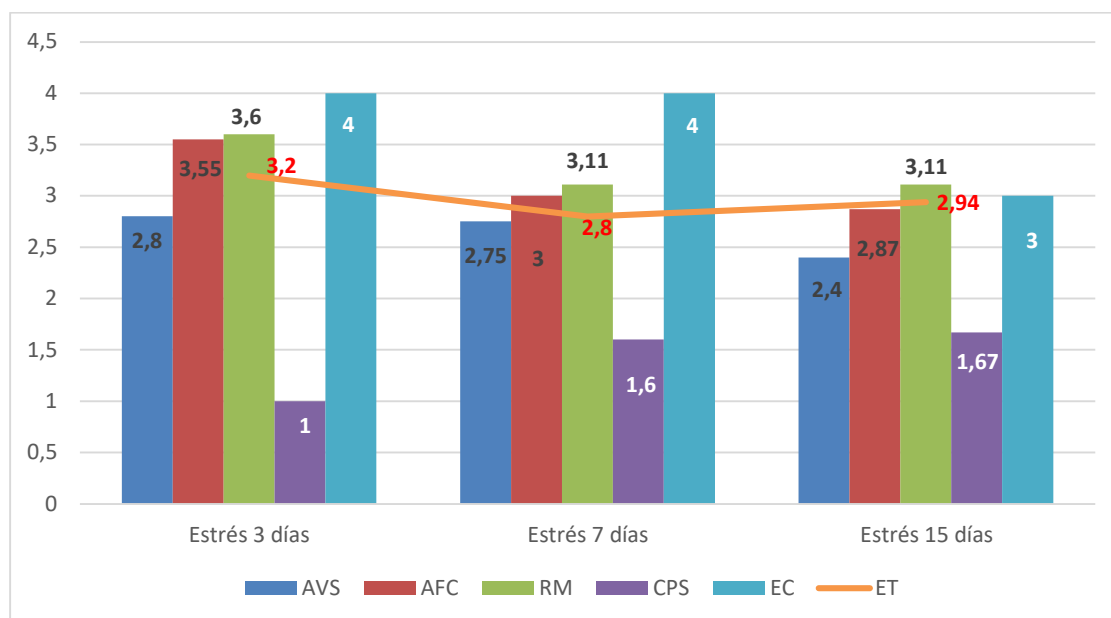
Después de analizar la escala de estrés parental, hemos identificado que la subescala que genera más estrés a nuestras madres es la que hace referencia al “rol de madre” (RM), donde se evalúa

el estrés que le produce a la madre el hecho de estar separada de su hijo y no poder cuidarlo, alimentarlo o compartirlo con miembros de su familia. Así, a los 3 días de vida, la puntuación mediana es de 3,6 puntos, manteniéndose un poco más baja a los 7 y 15 días, pero todavía en valores moderados de estrés.

Se observa una reducción del estrés en todas las subescalas con el paso de los días, siendo la subescala de RM la que, sin duda, les genera una mayor ansiedad durante todo el periodo de estudio. Sin embargo, en la subescala de “comportamiento y comunicación con el personal” (CPS), que les genera muy poco estrés, apreciamos una tendencia a incrementarse con el tiempo. La siguiente subescala que menos estrés produce es la de AVS y AFC. (Figura 5.8)

En cuanto al estrés general o común (EC), que indica la percepción general que tiene la madre sobre la situación de tener a su hijo ingresado en la UCIN, se observan puntuaciones elevadas (4) a los 3 y 7 días, lo que corresponde a muy estresante, para disminuir al valor de 3, considerándose todavía estrés moderado.

En cuanto al ET donde hemos ponderado la puntuación de los 46 ítems, podemos apreciar una disminución a los 7 días para volver a sufrir un ligero incremento a los 15 días. De esta forma, el estrés total a los 3 días fue de 3.2 (2.39 – 3.76), a los 7 días de 2.8 (2.27 – 3.87) y a los 15 días de 2.94 (1.97 – 3.81).



AVS vistas y sonidos; AFC: aspecto físico y comportamiento del recién nacido; CPS: comportamiento y comunicación con el personal; RM: rol de madre; EC: estrés común; ET: estrés total.

Figura 5.8.- Evolución del estrés medido en las diferentes subescalas, así como el estrés total ponderado

5.3.8.- Calprotectina Fecal (CPF)

Observamos valores iniciales elevados que descienden a los 7 días para volver a incrementarse a los 15 días. A los 3 días de vida tienen una mediana de 70 $\mu\text{g/g}$ (20,25 - 148,75 $\mu\text{g/g}$), a los 7 días su valor mediano es de 26 $\mu\text{g/g}$ (7,25 - 60,75 $\mu\text{g/g}$) y a los 15 días de vida alcanza una cifra de 42 $\mu\text{g/g}$ (28 - 72,75 $\mu\text{g/g}$) (Figura 5.9).

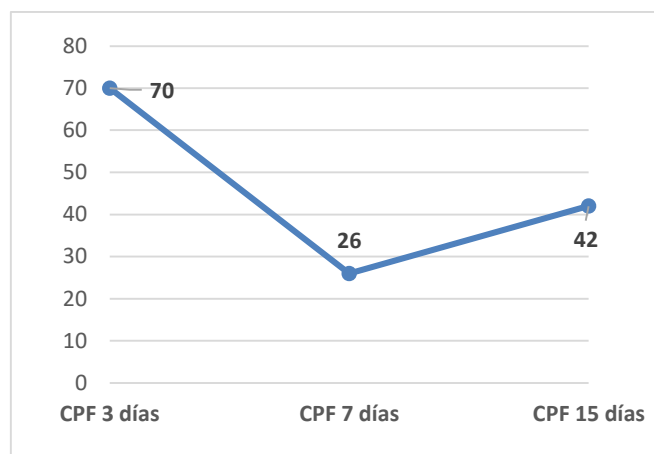


Figura 5.9.- Evolución de los niveles de calprotectina fecal (µg/g heces)

5.4.- ANÁLISIS RELACIONAL

5.4.1.- Relación entre la variación de estrés y el inicio del método canguro

Se valora el estrés total desarrollado por las madres en función de la variable método canguro y dependiendo del momento de inicio del mismo. Asimismo, se ha estudiado la reducción de estrés entre los 3 y los 15 días que supone el método canguro. Aunque no existen diferencias significativas en los valores absolutos de estrés en función del momento de iniciarse el canguro, sí observamos una mayor reducción significativa del estrés si el método canguro se inicia de manera precoz (Tabla 5.5).

MÉTODO CANGURO				
	Precoz	Intermedio	Tardío	p
Estrés 3d	3.19 (2.45 - 3.67)	2.97 (1.94 - 3.96)	3.33 (2.74 - 3.84)	0.498
Estrés 7d	2.65 (1.85 - 3.94)	3.04 (2.26 - 4.02)	2.96 (2.72 - 3.49)	0.658
Estrés 15d	2.37 (1.58 - 3.91)	3.15 (1.94 - 3.95)	2.97 (2.97 - 3.14)	0.593
Reducción de estrés	-0.65 [-1.00 - (-0.38)]	0.02 [(-0.41) - 0.34]	-0.38 [(-0.66) - (-0.12)]	0.011

Tabla 5.5.- Relación entre método canguro y estrés (puntuación) (test de Kruskal Wallis)

5.4.2.- Relación entre el nivel de estudios materno y el estrés

Tan sólo 4 madres de la muestra tenían estudios primarios, Se observa una peor gestión del estrés en el grupo de madres con estudios más básicos frente a las que tienen estudios de secundaria o superiores. En este segundo grupo, la reducción del estrés es más rápida, estableciéndose diferencias significativas a los 7 y 15 días (Tabla 5.6 y Figura 5.10).

	Primaria (n=4)	Secundaria/Superiores	P
Estrés 3d	3.64 (2.72 - 4.01)	3.2 (2.4 - 3.73)	NS
Estrés 7d	4.43 (3.48 - 4.58)	2.79 (2.25 - 3.78)	0.032
Estrés 15d	4.3 (3.14 - 4.51)	2.89 (1.84- 3.7)	0.04

Tabla 5.6.- Relación entre estrés y nivel de estudios de la madre

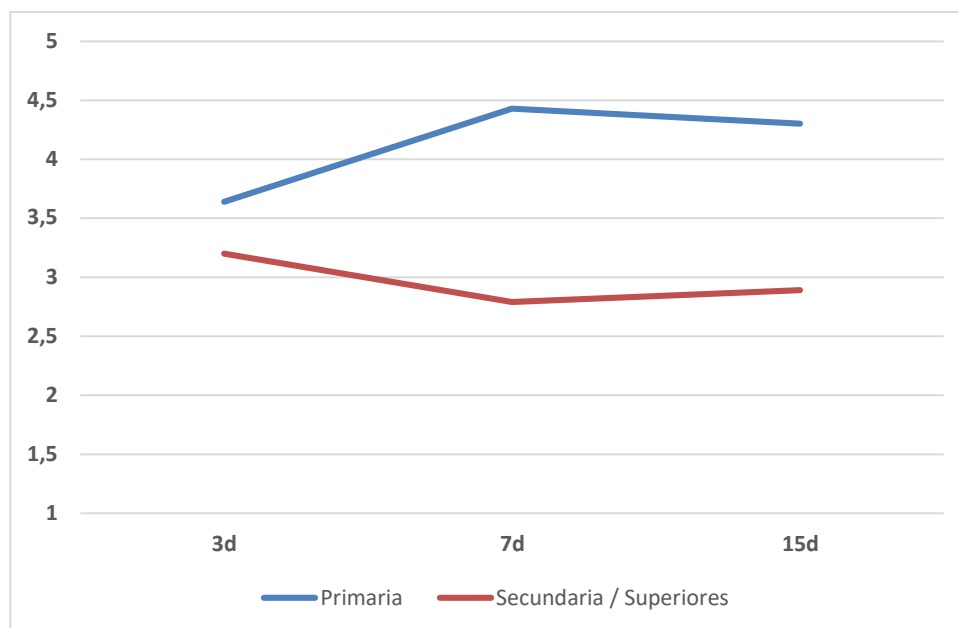


Figura 5.10.- Relación entre estrés y nivel de estudios materno

5.4.3.- Evolución del estrés materno en relación con la aparición de morbilidades en el recién nacido (RN) prematuro

No hemos encontrado variaciones significativas en el nivel de estrés en función de la mejoría o empeoramiento de las morbilidades asociadas estudiadas.

	Estado clínico			p
	Empeora	Igual	Mejora	
Variación de estrés (3 a 7 días)	-0.17 ((-0.38) - 0.04)	-0.26 ((-0.56) - 0.22)	-0.34 ((-0.55) - 0.13)	NS
Variación de estrés (7 a 15 días)	-0.27 ((-0.47) - (-0.15))	-0.13 ((-0.39) - 0.06)	0.00 ((-0.2) - 0.22)	NS

Tabla 5.7- Variación del estrés materno (puntuación) según el estado clínico del recién nacido (RN)

Aunque no significativo, se observa una mayor reducción de estrés en la primera semana de vida del RN, siendo esta reducción más acusada cuando el estado clínico del RN mejora.

5.4.4.- Relación entre la cantidad de LM y estrés

Se estudia mediante regresión lineal la producción de LM en los días 3, 7 y 15 (mediana) con el estrés total de las madres en esos días determinado por métrica 1, observándose diferencias estadísticamente significativas a los 3 días (p 0.012), donde un mayor estrés se relaciona con una menor producción de LM. Esta diferencia se hace no significativa a los 7 y 15 días (Figura 5.11).

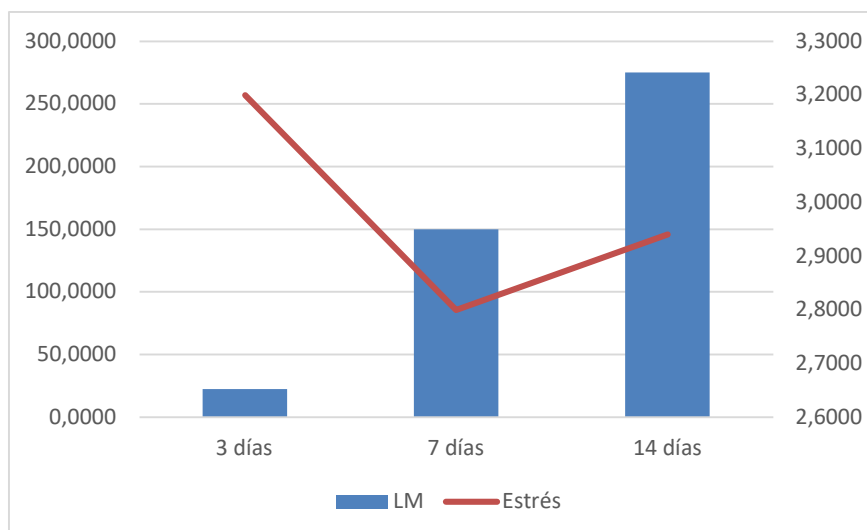


Figura 5.11.- Relación entre producción de LM (ml) y estrés (puntuación)

5.4.5.- Cantidad de LM en función de la estratificación del nivel de estrés

Mediante la prueba de U de Mann Whitney se comprueba la relación entre el nivel de estrés (alto o bajo según sea inferior o superior a la mediana) y la producción de LM a los 3, 7 y 15 días.

A los 3 días, las madres con mayor nivel de estrés producen de manera significativa menor cantidad de LM en relación con las madres que tienen menor estrés y producen mayor cantidad de LM. Esta diferencia no se mantiene significativa a los 7 y 15 días, aunque sí se mantiene la tendencia observada a los 3 días (Tabla 5.8).

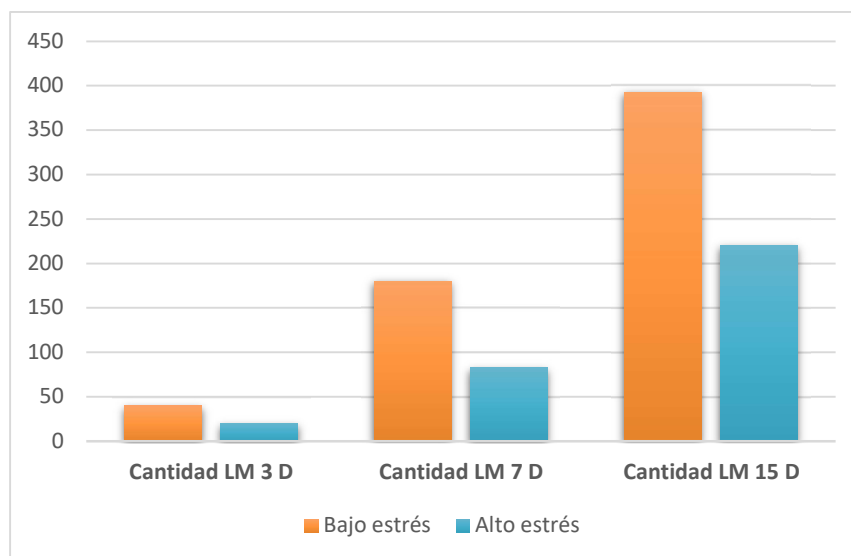
	3 días			7 días			15 días		
	Bajo Estrés (<3.2)	Alto Estrés (≥3.2)	p	Bajo Estrés (<2.8)	Alto Estrés (≥2.8)	p	Bajo Estrés (<2.94)	Alto Estrés (≥2.94)	p
LM	40 ml (11 - 122.5)	20 ml (5 - 48)	0.046	180 ml (117.5 - 370)	82.5 ml (44 - 340)	NS	392.5 ml (197.5 - 550)	220 ml (85 - 440)	NS

Tabla 5.8.- Producción de LM en relación con estrés alto o bajo

Asimismo, se comprobó la relación entre la producción de LM y el nivel de estrés dividido por los cuartiles en función de ninguno/leve, moderado o grave mediante el test de Kruskal-Wallis. Se observó la misma tendencia, a menor estrés, mayor producción, siendo estadísticamente significativa a los 3 días (Tabla 5.9 y Figura 5.12).

LM	Estrés ninguno/leve	Estrés moderado	Estrés grave	p
3 días	75 ml (30 - 140)	27.5 ml (4 - 65)	10 ml (5 - 25)	0.041
7 días	155 ml (95-210)	225 ml (50 - 467.5)	91 ml (40 - 405)	NS
15 días	297.5 ml (210 - 450)	375 ml (145 - 570)	225 ml (85 - 825)	NS

Tabla 5.9.- Relación entre producción de LM y estrés (ninguno/leve, moderado, grave)



D: días

Figura 5.12.- Producción de LM (ml) en relación con estrés bajo o alto

5.4.6.- Relación entre cantidad de LM a los 3, 7 y 15 días y tipo de parto

Hemos estudiado la influencia del tipo de parto en la producción de LM a los 3, 7 y 15 días mediante la prueba de U de Mann Whitney. No hemos encontrado diferencias significativas, aunque sí una tendencia de mayor producción de LM en los partos por vía vaginal, más significativa a los 7 y 15 días (Tabla 5.10).

	Tipo de parto		p
	Vaginal	Cesárea	
LM 3 días	20 ml (10 - 60)	25 ml (5 - 80)	NS
LM 7 días	307.5 ml (47.5 - 367.5)	145 ml (45 - 300)	NS
LM 15 días	440 ml (110 - 600)	250 ml (131 - 450)	NS

Tabla 5.10. Producción de LM (ml) en relación con la vía de parto

5.4.7.- Producción de LM en relación con la edad de la madre

No se encuentran variaciones significativas entre la cantidad de LM y la edad de la madre, considerando como añosa ≥ 35 años.

Sin embargo, observamos una tendencia donde las madres añosas producen una cantidad inferior de LM con respecto a las madres más jóvenes, en los 3 momentos de estudio (Tabla 5.11 y Figura 5.13).

	3 días	7 días	15 días
< 35 años	32,5 ml (75 - 97,5)	205 ml (55 - 395)	370 ml (220 - 705)
≥ 35 años	11 ml (5 - 44)	125 ml (36 - 327,5)	197,5 ml (105 - 450)

Tabla 5.11.- Producción de LM (ml) en función de la edad materna

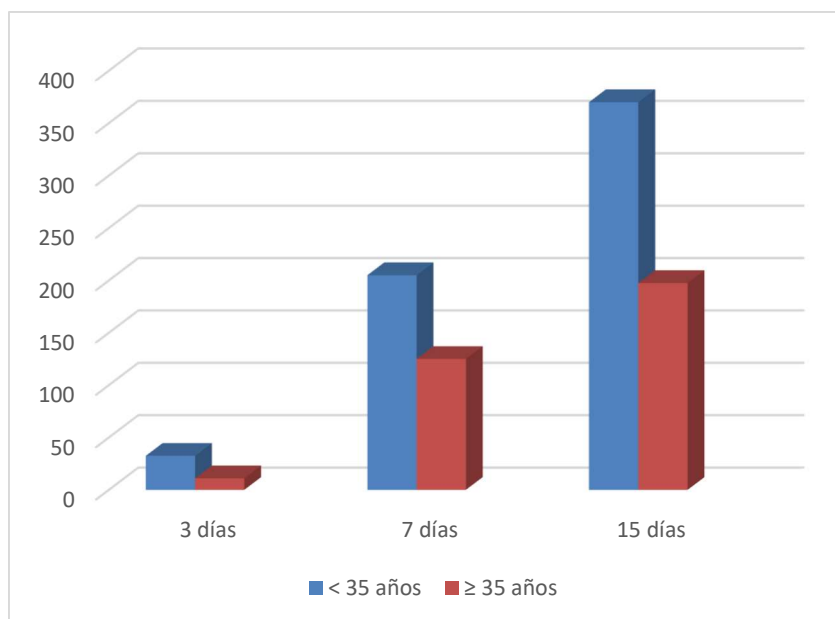


Figura 5.13.- Producción de LM (ml) en función de la edad materna

5.4.8.- Relación entre la producción de LM en el día 4 y el día 15

Hemos querido valorar la relación entre la producción de LM en el día 4 postparto y la producción de LM el día 15. Producir menos de 140 ml el día 4 es claramente predictor de producir menos de 500 ml el día 15 de manera estadísticamente significativa ($p = 0.003$). Asimismo, existe una mayor tendencia entre producir más de 140 ml a los 4 días y tener más de 500 ml a los 15 días (Figura 5.14).

Tabla de contingencia LM 4d_producción * LM 15d_producción

			LM 15d_producción		Total
			<500 ml	>=500 ml	
LM 4d_producción	<140 ml	Recuento	24	3	27
		Frecuencia esperada	19,9	7,1	27,0
	>=140 ml	Recuento	7	8	15
		Frecuencia esperada	11,1	3,9	15,0
Total		Recuento	31	11	42
		Frecuencia esperada	31,0	11,0	42,0

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,893 ^a	1	,003		
Corrección por continuidad ^b	6,843	1	,009		
Razón de verosimilitudes	8,739	1	,003		
Estadístico exacto de Fisher				,008	,005
Asociación lineal por lineal	8,681	1	,003		
N de casos válidos	42				

a. 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3,93.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

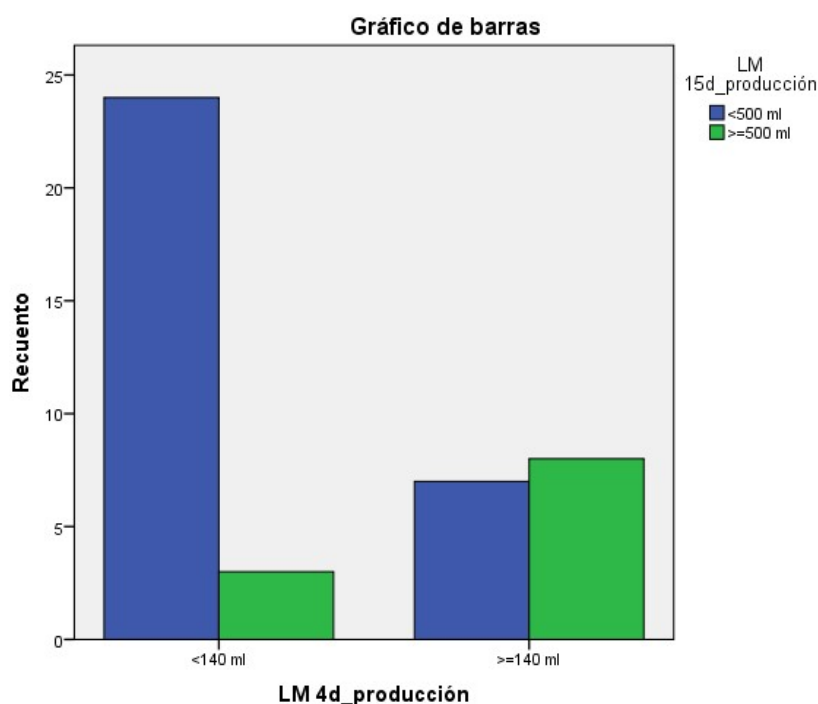


Figura 5.14.- Número de madres que producen más o menos de 500 ml a los 15 días en función de su producción a los 4 días

5.4.9.- Relación entre el estrés materno y la producción de LM inferior o superior a 500 ml en el día 15

Hemos querido valorar si el estrés influye en la producción de LM superior o inferior a 500 ml a los 15 días. No se han encontrado resultados estadísticamente significativos ni por estrés total, ni estrés general, ni estrés en la subescala RM. En la tabla parece apreciarse una discreta disminución de estrés, más llamativo en la subescala de RM, en las madres que producen más de 500 ml/día (Tabla 5.12).

	< 500 ml	≥ 500 ml	P
Estrés RM	3.255 (2.2 - 4.2)	2.8 (2.725 - 4.045)	NS
Estrés general/común	3 (2 - 4)	3 (3 - 5)	NS
Estrés global/total	2.98 (1.79 - 3.8)	2.91 (2.375 - 3.49)	NS

RM: rol de madre

Tabla 5.12.- Relación entre estrés y producción de LM < 500 ml ó ≥ 500 ml a los 15 días

5.4.10.- Calidad de los macronutrientes de la LM en relación con el estrés

En el análisis de macronutrientes practicado en LM se observó un incremento de grasas e hidratos de carbono a lo largo del período de estudio. Los niveles de grasas fueron 1.79 g/dl, 3.16 g/dl y 3.27 g/dl a los 3, 7 y 15 días; los niveles de carbohidratos fueron 6.55 g/dl, 6.85 g/dl y 7.19 g/dl a los 3, 7 y 15 días. Los niveles de proteínas sufrieron un ligero descenso en sus valores medianos a lo largo del tiempo, 1.4 g/dl, 1.3 g/dl y 1.2 g/dl a los 3, 7 y 15 días. No se observó ninguna asociación significativa entre los niveles de macronutrientes y el estrés materno durante el período de estudio.

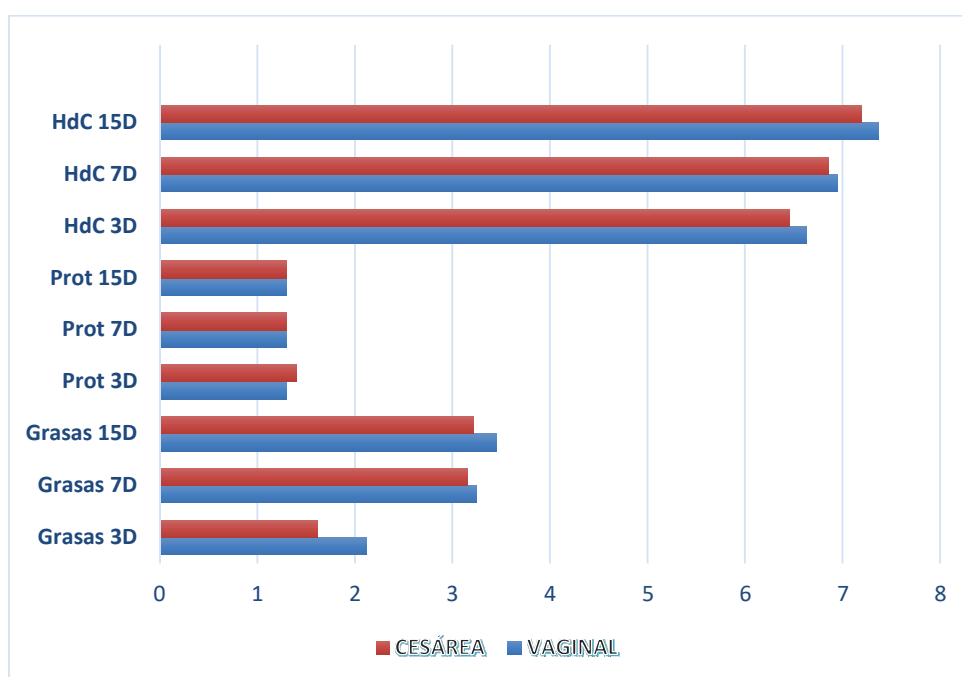
5.4.11.- Composición de la LM según la vía del parto

Se encuentran diferencias significativas en la composición de grasas a los 3 días, de manera que los nacidos por vía vaginal cuentan con más cantidad de grasa en su calostro (p 0.003) (Tabla 5.13 y Figura 5.15).

		Vaginal	Cesárea	p
3 días	Grasas (g/dl)	2.12 (1.75 - 2.815)	1.62 (1.20 - 1.99)	0.03
	Proteínas (g/dl)	1.30 (1.30 - 1.40)	1.40 (1.30 - 1.40)	NS
	HdC (g/dl)	6.63 (6.495 - 6.81)	6.46 (5.84 - 6.67)	NS
7 días	Grasas (g/dl)	3.25 (2.87 - 4.04)	3.16 (2.65 - 3.62)	NS
	Proteínas (g/dl)	1.30 (1.30 - 1.40)	1.30 (1.30 - 1.40)	NS
	HdC (g/dl)	6.95 (6.65 - 7.22)	6.85 (6.01 - 7.03)	NS
15 días	Grasas (g/dl)	3.45 (3.035 - 3.89)	3.21 (2.82 - 4.03)	NS
	Proteínas (g/dl)	1.30 (1.30 - 1.30)	1.30 (1.20 - 1.30)	NS
	HdC (g/dl)	7.37 (7.09 - 7.475)	7.19 (6.93 - 7.30)	NS

HdC: hidratos de carbono

Tabla 5.13.- Composición de la LM en función de la vía del parto



HdC: hidratos de carbono; D: días

Figura 5.15.- Macronutrientes de la LM (g/dl) en función de la vía del parto

La LM a los 3, 7 y 15 días postparto es más rica en grasas e HdC cuando el parto se produce por vía vaginal. No hemos encontrado diferencias en cuanto a proteínas y vía del parto.

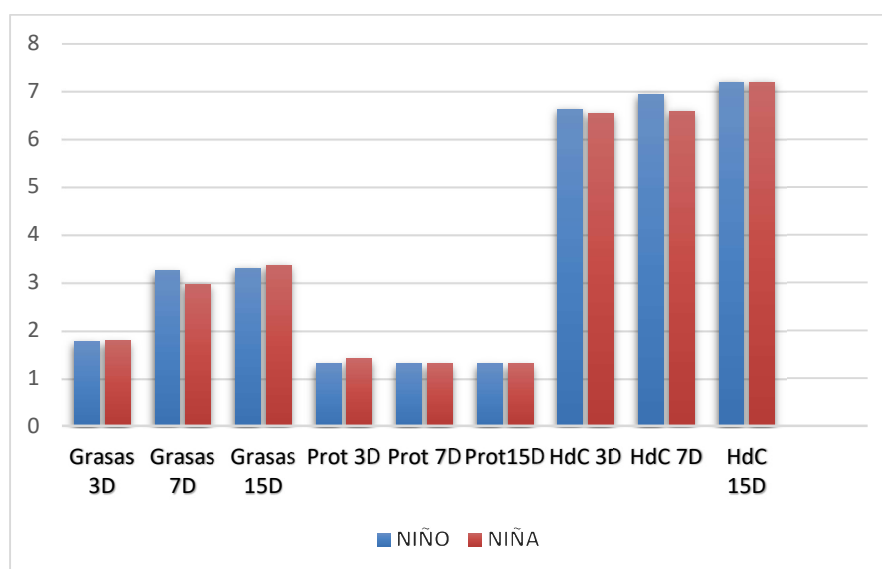
5.4.12.- Composición de la LM (proteínas, grasas, HdC) en función del sexo del RN

En nuestra muestra no se han encontrado diferencias en la composición de la LM en función del sexo del recién nacido (Tabla 5.14 y Fig 5.16).

		Niño	Niña	p
3 días	Grasas (g/dl)	1.78 (1.63 - 2.27)	1.79 (1.25 - 3.02)	NS
	Proteínas (g/dl)	1.30 (1.30 - 1.40)	1.40 (1.30 - 1.45)	NS
	HdC (g/dl)	6.63 (6.31 - 6.67)	6.55 (5.67 - 6.86)	NS
7 días	Grasas (g/dl)	3.25 (2.77 - 3.79)	2.97 (2.59 - 3.83)	NS
	Proteínas (g/dl)	1.30 (1.30 - 1.40)	1.30 (1.30 - 1.40)	NS
	HdC (g/dl)	6.95 (6.65 - 7.22)	6.79 (5.82 - 7.02)	NS
15 días	Grasas (g/dl)	3.31 (2.92 - 4.22)	3.37 (2.82 - 3.81)	NS
	Proteínas (g/dl)	1.30 (1.25 - 1.30)	1.30 (1.20 - 1.30)	NS
	HdC (g/dl)	7.2 (6.83 - 7.42)	7.24 (7.04 - 7.39)	NS

HdC: hidratos de carbono

Tabla 5.14.- Composición de la LM en función del sexo del RN



D: días; HdC: hidratos de carbono; Prot: proteínas

Figura 5.16.- Macronutrientes de la LM (g/dl) en función del sexo del recién nacido

5.4.13.- Composición de la LM en función de la edad de la madre

No se aprecian diferencias en la composición de la LM en función de la edad de la madre (≥ 35 años y < 35 años), en ninguno de los tres momentos del estudio.

5.4.14.- Relación entre los niveles de CPF y la calidad de la LM

No se aprecian diferencias significativas en los niveles de CPF determinada en las heces del recién nacido en función de la calidad de la LM a los 3, 7 y 15 días (p NS).

5.4.15.- Relación entre los niveles de CPF y haber recibido antibióticos prenatales

Recibir antibióticos de manera prenatal no altera los niveles de CPF a los 3, 7 y 15 días de manera significativa, aunque sí existe una tendencia a tener niveles más elevados en aquéllos que no recibieron antibióticos (Tabla 5.15).

	No ABT prenatales	Sí ABT prenatales	p
Calprotectina 3d	91 (34 - 153.5)	60 (22 - 127)	NS
Calprotectina 7d	39 (10 - 76)	16 (10 - 39)	NS
Calprotectina 15d	46 (27.5 - 72)	40 (29 - 72)	NS

ABT: antibióticos

Tabla 5.15.- Niveles de CPF ($\mu\text{g/g}$ de heces) en función de haber recibido antibióticos prenatales

5.4.16.-Relación entre los niveles de CPF y haber recibido antibióticos postnatales

Los niveles de CPF a los 7 días son inferiores de manera estadísticamente significativa en aquéllos que recibieron antibióticos (p 0,027) (Tabla 5.16).

	No ABT	Sí ABT	p
Calprotectina 3d	64 (19 - 129)	83.5 (22 - 168)	NS
Calprotectina 7d	54 (17.5 - 94)	17 (6 - 39)	0.027
Calprotectina 15d	38 (29 - 54.5)	49.5 (28 - 73)	NS

ABT: antibióticos

Tabla 5.16.- Niveles de CPF ($\mu\text{g/g}$ de heces) en función de haber recibido antibióticos postnatales

5.4.17.- Relación de CPF en función del sexo

Los niveles de CPF tienden a ser más elevados en los niños. Esta tendencia es estadísticamente significativa a los 15 días (p 0.017) (Tabla 5.17).

	Niños	Niñas	p
CPF 3 días	64 (12.5 - 112)	105 (53.5 - 169.5)	0.073
CPF 7 días	27 (8 - 51.5)	23 (7.5 - 54.5)	NS
CPF 15 días	53 (38 - 71.5)	28 (9 - 67)	0.017

Tabla 5.17.- Niveles de CPF ($\mu\text{g/g}$ de heces) en función del sexo del recién nacido

5.4.18.- Relación entre los niveles de CPF y el peso al nacimiento

Se realizó un estudio de regresión lineal observando una asociación estadísticamente significativa entre los niveles altos de CPF y menor peso al nacimiento (p 0.044). Esta asociación no se mantiene a los 7 y 15 días (Figura 5.17).

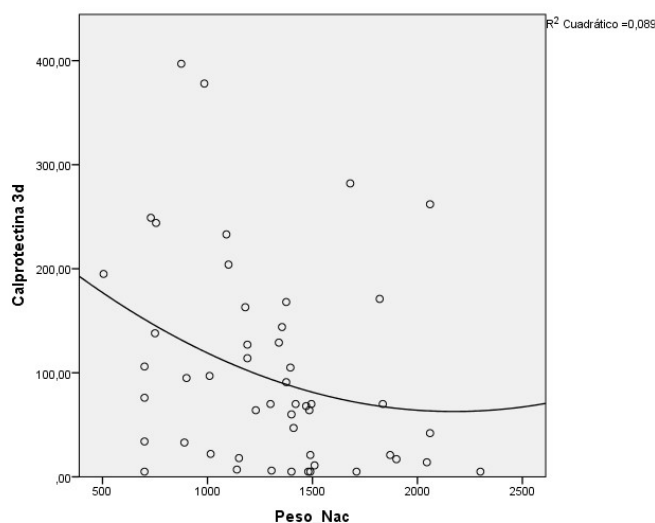


Figura 5.17.- Relación entre los niveles de CPF ($\mu\text{g/g}$ de heces) a los 3 días y peso al nacimiento (g)

5.4.19.- Relación entre niveles de CPF y la EG

Se realizó un estudio de regresión lineal, no encontrándose asociación entre los niveles de CPF y la edad gestacional en ninguno de los 3 momentos del estudio (p NS).

5.4.20.- Relación entre los niveles de CPF y la vía de parto

Nacer por vía vaginal determina niveles de CPF inferiores estadísticamente significativos a los 3 días (p 0.052). Esta diferencia no se mantiene a los 7 y 15 días (Tabla 5.18).

	Vaginal	Cesárea	p
CPF 3 días	37,5 (12,5- 82,5)	94 (34- 168)	0.052
CPF 7 días	20 (10-42)	27 (7,5- 64)	NS
CPF 15 días	42 (31- 104)	38 (26- 67,5)	NS

Tabla 5.18.- Niveles de CPF ($\mu\text{g/g}$ de heces) en función de la vía del parto

5.5- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE HECES Y LM

El análisis microbiológico de las muestras analizadas ha permitido obtener la biodiversidad de las muestras utilizando el índice de Shannon (72).

5.5.1.- Relación entre la biodiversidad en LM/heces en relación con la vía del parto

El índice de Shannon como marcador de la biodiversidad de las muestras de LM y heces se ha comparado en función de la vía del parto (Tabla 5.19).

	3 días			7 días			15 días		
	Vaginal	Cesárea	p	Vaginal	Cesárea	p	Vaginal	Cesárea	p
Heces	1.26 (0.79 - 1.74)	1.21 (0.82 - 1.56)	NS	1.00 (0.54 - 1.36)	0.71 (0.52 - 1.09)	NS	0.85 (0.68 - 1.23)	1.09 (0.52 - 1.37)	NS
LM	0.69 (0.26 - 1.16)	0.78 (0.64 - 1.19)	NS	0.63 (0.40 - 1.00)	0.72 (0.41 - 1.14)	NS	1.27 (0.98 - 1.34)	0.89 (0.47 - 1.35)	NS

Tabla 5.19.- Valores del índice de Shannon en LM/heces en función de la vía del parto

No podemos demostrar estadísticamente la relación entre el tipo de parto (vaginal/cesárea) y la biodiversidad en las muestras obtenidas de heces (3, 7 15 días) y LM (3, 7 y 15 días). Sin embargo, podemos observar una tendencia de mayor índice de Shannon en las heces de los prematuros cuyos partos han tenido lugar por vía vaginal con respecto a las cesáreas, a los 3 y 7 días, es decir, presentan una mayor biodiversidad de especies, aunque no es significativo estadísticamente.

Por el contrario, la LM de las cesáreas presentan una ligera mayor diversidad a los 3 y 7 días, pero a los 15 días la LM de los partos vaginales tiene una mayor biodiversidad, sin llegar a ser significativo estadísticamente en ningún momento (Figura 5.18).

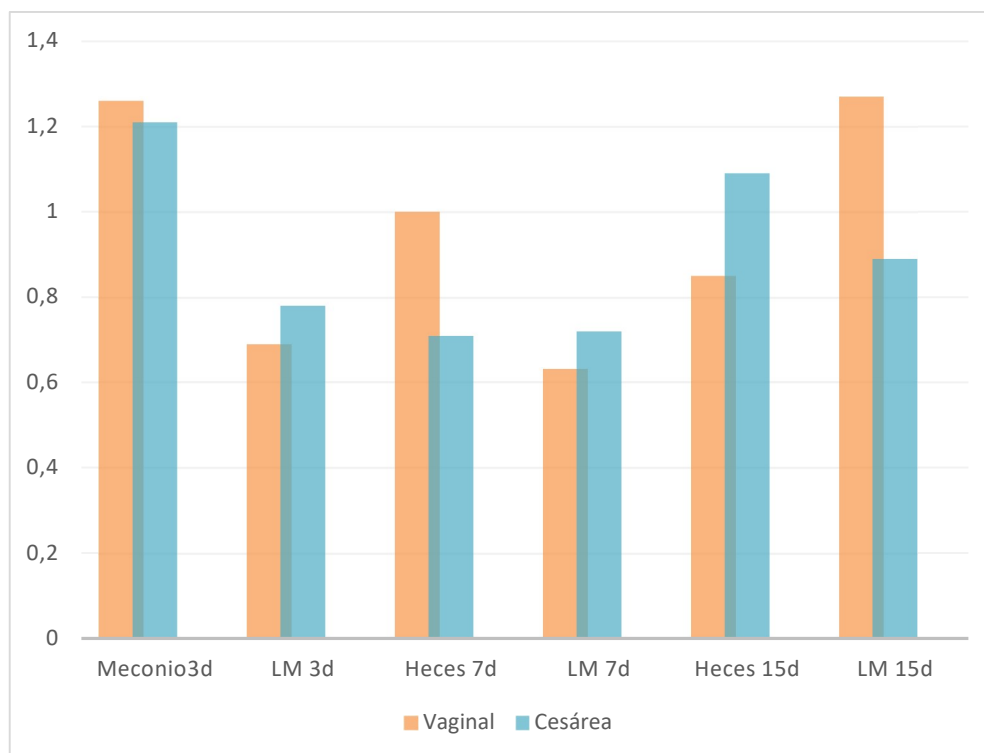


Figura 5.18.- Índice Shannon en LM/heces a los 3, 7 y 15 días estratificado por la vía del parto

5.5.2.- Relación entre la biodiversidad en LM/heces y el estrés materno

Se ha estudiado el índice de Shannon en las muestras de LM y heces del recién nacido en relación con el nivel de estrés expresado por la madre, a los 3, 7 y 15 días, clasificado como bajo o alto en función de la mediana (Tabla 5.20).

	Estrés 3 días			Estrés 7 días			Estrés 15 días		
	Bajo	Alto	p	Bajo	Alto	p	Bajo	Alto	p
Heces	1.00 (0.48 - 1.86)	1.56 (1.19 - 1.65)	NS	0.71 (0.31 - 1.24)	1.25 (0.76 - 1.36)	NS	1.13 (0.77 - 1.35)	0.91 (0.33 - 1.08)	NS
LM	0.99 (0.60 - 1.39)	0.76 (0.61 - 1.01)	NS	0.75 (0.46 - 1.21)	0.65 (0.38 - 1.14)	NS	1.19 (0.60 - 1.34)	0.99 (0.34 - 1.37)	NS

Tabla 5.20.- Valores del índice de Shannon en LM/heces en función del estrés materno

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en el índice de Shannon en las muestras obtenidas de heces de prematuros y LM, en ninguno de los tres momentos del estudio, en función del nivel de estrés.

Hemos observado una clara tendencia donde hay una mayor diversidad microbiana en la LM en los 3 momentos estudiados (con mayor I. Shannon) cuando el estrés materno es más bajo con respecto a un mayor estrés, aunque no sea estadísticamente significativo.

En cuanto a las heces de los recién nacidos, observamos en el día 15 una mayor diversidad ante un estrés más bajo con respecto a una puntuación mayor para el estrés, aunque tampoco es significativo. Sin embargo, a los 3 y 7 días vemos como la diversidad microbiana es mayor en las heces de los niños cuyas madres están más estresadas.

5.5.3.- Estudio del filo en las muestras de LM y heces

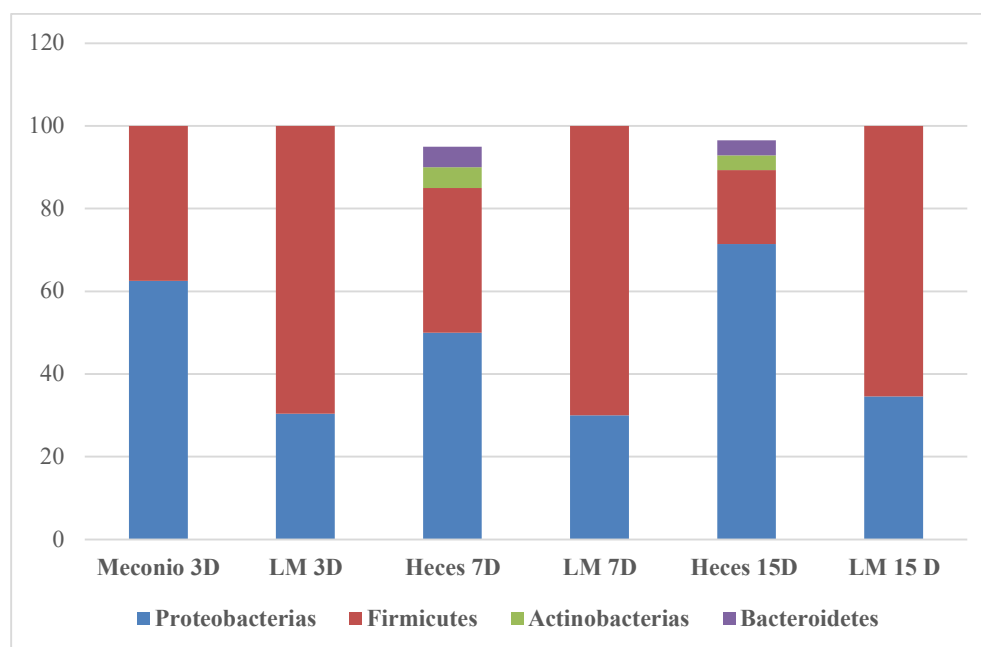
Se ha analizado el porcentaje de los filos (Proteobacterias, Firmicutes, Actinobacterias y Bacteroidetes) en la LM y heces de los recién nacidos, a los 3, 7 y 15 días.

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a filo entre heces y LM, en ninguno de los 3 momentos (Tabla 5.21 y Figura 5.19).

	3 días			7 días			15 días		
	Meconio	LM	p	Heces	LM	p	Heces	LM	p
Proteobacteria	62.5%	30.4%	NS	50%	30%	NS	71.4%	34.6%	NS
Firmicutes	37.5%	69.6%	NS	35%	70%	NS	17.9%	65.4%	NS
Actinobacteria	ND	ND	NS	5%	ND	NS	3.6%	ND	NS
Bacteroidetes	ND	ND	NS	5%	ND	NS	3.6%	ND	NS

ND: No Detectable

Tabla 5.21.- Distribución de los filos en las muestras de LM y heces



D: días

Figura 5.19.- Distribución de filos en LM y heces

En el gráfico podemos observar que existe un predominio de Proteobacterias en las muestras de meconio y a partir del día 7 aparecen las Actinobacterias y Bacteroidetes, aunque en escasa proporción. En general, las Proteobacterias dominan en las heces de los prematuros, seguidos de los Firmicutes. Sin embargo, el filo más característico en la LM son los Firmicutes, seguido de las Proteobacterias. Además, se aprecia una tendencia a disminuir los Firmicutes y aumentar las Proteobacterias con el paso del tiempo, desde el día 3 al día 15.

5.5.4.- Relación entre el filo en la LM y heces según el tipo de parto

Hemos analizado el filo cuando el parto tenía lugar por vía vaginal y cuando era mediante una cesárea. No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las variables en ninguno de los 3 momentos del estudio. Sin embargo, hemos visto que en las cesáreas el filo de Bacteroidetes no aparece, estando presente cuando el parto es vaginal, a los

7 y 15 días. Además, vemos que las Actinobacterias sólo aparecen en las cesáreas, a los 7 y 15 días, y no en los vaginales (Tablas 5.22 y 5.23 y Figuras 5.20 y 5.21).

Vaginal	3 días			7 días			15 días		
	Meconio (n=2)	LM (n=7)	p	Meconio (n=6)	LM (n=9)	p	Meconio (n=7)	LM (n=8)	p
Proteobacteria	50%	28,6%	NS	50%	22.2%	NS	71.4%	12,5%	NS
Firmicutes	50%	71,4%	NS	33.3%	77.8%	NS	14.3%	87,5%	NS
Actinobacteria	ND	ND	NS	ND	ND	NS	ND	ND	NS
Bacteroidetes	ND	ND	NS	16.7%	ND	NS	14.3%	ND	NS

ND: No Detectable

Tabla 5.22.- Filos más frecuentes en heces y LM en el parto vaginal

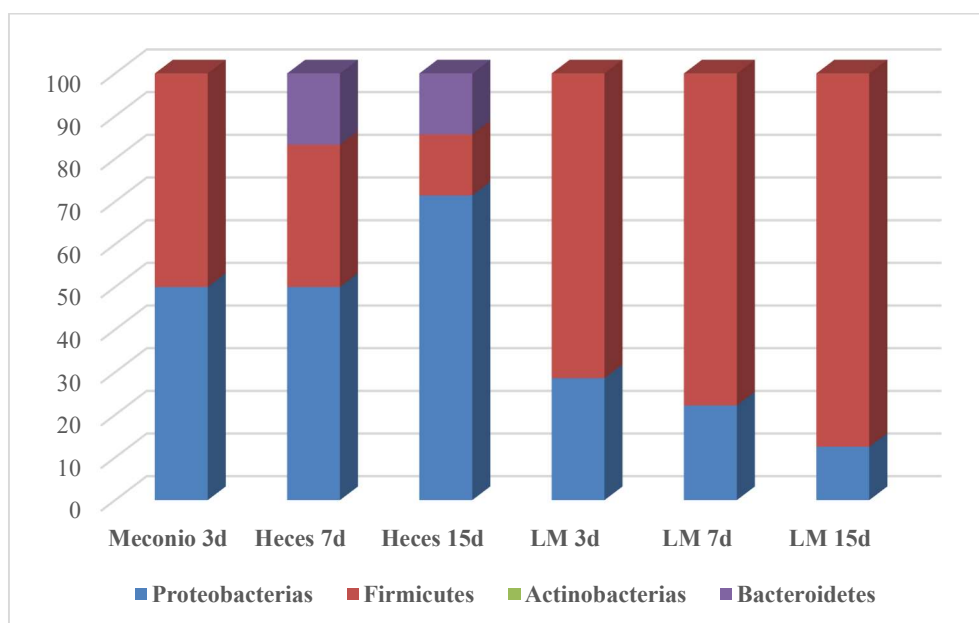
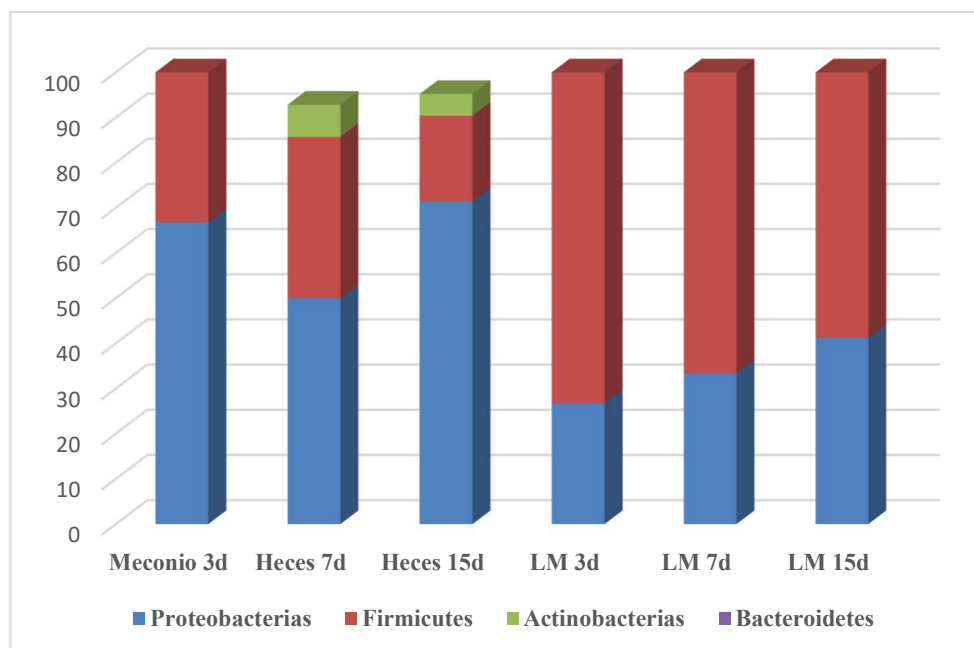


Figura 5.20.- Distribución de filos en el parto vaginal

Cesárea	3 días			7 días			15 días		
	Meconio (n=6)	LM (n=15)	p	Meconio (n=14)	LM (n=21)	p	Meconio (n=21)	LM (n=17)	p
Proteobacteria	66.7%	26.7%	NS	50%	33.3%	NS	71.4%	41.2%	NS
Firmicutes	33.3%	73.3%	NS	35.7%	66.7%	NS	19%	58.8%	NS
Actinobacteria	ND	ND	NS	7.1%	ND	NS	4.8%	ND	NS
Bacteroidetes	ND	ND	NS	ND	ND	NS	ND	ND	NS

ND: No Detectable

Tabla 5.23.- Filos más frecuentes en heces y LM en el parto por cesárea



D: días

Figura 5.21.- Distribución de filos en el parto por cesárea

5.5.5.- Relación entre el orden de especie en LM y heces y el tipo de parto

A nivel de la taxonomía orden en la clasificación de microorganismos, no hemos observado diferencias estadísticamente significativas en los resultados en las heces de los recién nacidos y LM a los 3, 7 y 15 días en función del tipo de parto (Tabla 5.24).

	3 días					
	Meconio			LM		
	Vaginal	Cesárea	p	Vaginal	Cesárea	p
Enterobacteriales	49.12% (5.22 - 93.01)	37.62% (1.32 - 98.04)	NS	1.36% (0.70 - 6.74)	0.64% (0.37 - 4.80)	NS
Clostridiales	20.71% (0.05 - 41.37)	0.17% (0.08 - 7.91)	NS	0.62% (0.21 - 0.69)	0.32% (0.15 - 0.97)	NS
Lactobacillales	4.42% (0.22 - 8.63)	0.34% (0.13 - 25.11)	NS	0.23% (0.15 - 0.54)	0.41% (0.19 - 0.69)	NS
Bifidobacteriales	3.56% (0.00 - 7.11)	0.01% (0.00 - 0.04)	NS	0.00% (0.00 - 0.01)	0.00% (0.00 - 0.00)	NS

Tabla 5.24.- Orden taxonómico en LM y heces en función del tipo de parto a los 3 días

Se observan más Enterobacteriales, Clostridiales, Lactobacillales y Bifidobacteriales en el meconio de los partos por vía vaginal con respecto a los de cesárea a los 3 días de vida. Presentan un mayor porcentaje microbiano los partos vaginales con respecto a las cesáreas, aunque las diferencias no sean estadísticamente significativas.

En cuanto al orden encontrado en la LM en el día 3, relacionado con el calostro, tampoco se aprecian diferencias significativas con respecto a la vía de parto. Observamos más Enterobacteriales y Clostridiales en los partos vaginales en relación con las cesáreas, aunque en menor medida que en el caso del meconio (Tabla 5.24).

	7 días					
	Meconio			LM		
	Vaginal	Cesárea	p	Vaginal	Cesárea	p
Enterobacteriales	41.74% (3.62 - 82.55)	38.74% (1.74 - 75.60)	NS	0.87% (0.19 - 1.79)	2.66% (0.29 - 6.76)	NS
Clostridiales	0.38% (0.23 - 1.43)	0.71% (0.05 - 11.66)	NS	0.22% (0.06 - 0.35)	0.43% (0.11 - 1.63)	NS
Lactobacillales	1.33% (0.40 - 6.65)	0.47% (0.33 - 4.49)	NS	0.60% (0.32 - 0.98)	0.61% (0.39 - 1.43)	NS
Bifidobacteriales	0.00% (0.00 - 0.00)	0.00% (0.00 - 0.02)	NS	0.01% (0.00 - 0.02)	0.00% (0.00 - 0.01)	NS

Tabla 5.25.- Orden taxonómico en LM y heces en función del tipo de parto a los 7 días

A los 7 días de vida sigue apreciándose un mayor porcentaje de Enterobacteriales y una disminución brusca de los Clostridiales en las heces de los nacidos por vía vaginal, no encontrándose Bifidobacteriales y una disminución de Lactobacillales. En cuanto a las cesáreas, se mantienen el porcentaje de Enterobacteriales desde el día 3, aumentando discretamente los Clostridiales y Lactobacillales.

En relación con la LM, a los 7 días vemos más Enterobacteriales y Clostridiales en las cesáreas que en los partos vaginales, a diferencia que a los 3 días (Tabla 5.25).

	15 días					
	Meconio			LM		
	Vaginal	Cesárea	p	Vaginal	Cesárea	p
Enterobacteriales	69.91% (25.26 - 86.22)	53.33% (6.30 - 85.89)	NS	0.83% (0.37 - 5.23)	1.18% (0.59 - 9.03)	NS
Clostridiales	2.21% (0.06 - 18.92)	0.46% (0.13 - 3.84)	NS	1.44% (0.46 - 4.59)	0.38% (0.07 - 3.55)	NS
Lactobacillales	0.60% (0.12 - 1.10)	0.87% (0.14 - 3.57)	NS	1.71% (0.50 - 2.97)	0.24% (0.05 - 1.16)	NS
Bifidobacteriales	0.00% (0.00 - 0.03)	0.00% (0.00 - 0.01)	NS	0.01% (0.01 - 0.05)	0.00% (0.00 - 0.01)	NS

Tabla 5.26.- Orden taxonómico en LM y heces en función del tipo de parto a los 15 días

A los 15 días se observa un incremento de los Enterobacteriales en las heces de los nacidos por parto vaginal y cesárea y un ligero aumento de los Clostridiales en los partos vaginales (Tabla 5.26).

En cuanto a la LM, sigue manteniéndose el mayor porcentaje de Enterobacteriales en las cesáreas y más Clostridiales en los vaginales. Lo que sí aparecen a los 15 días son los Lactobacillales en mayor medida en los partos vaginales con respecto a las cesáreas (Figura 5.22 y 5.23).

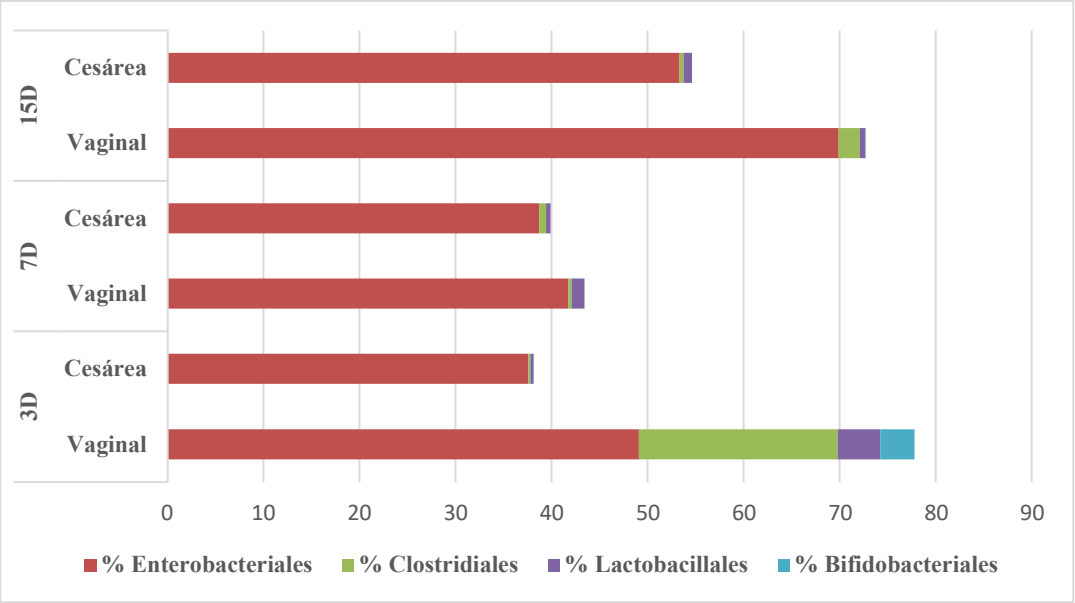


Figura 5.22- Orden bacteriológico en las heces en función del parto

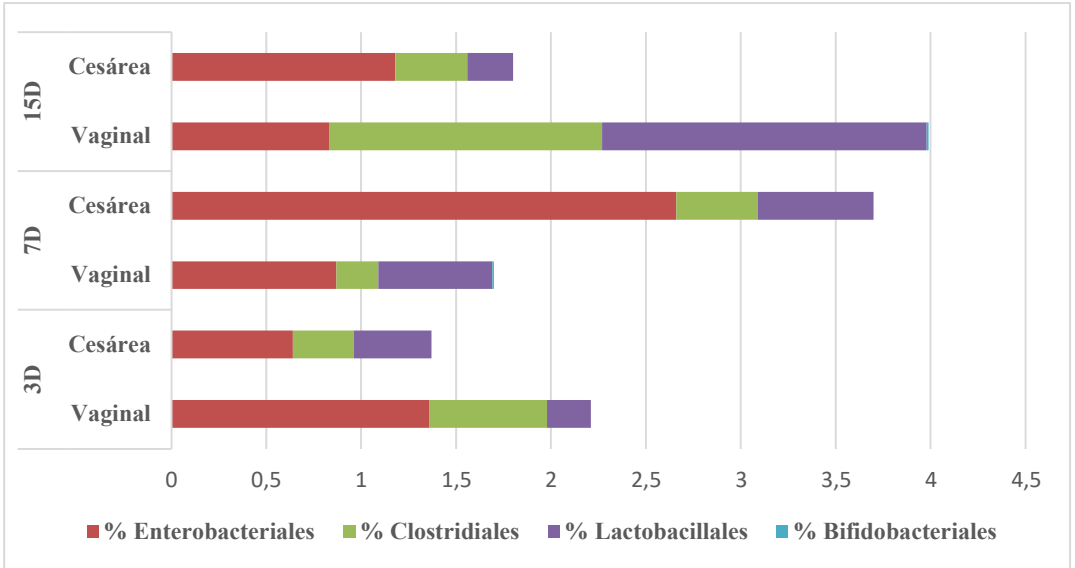


Figura 5.23- Orden bacteriológico en la LM en función del parto

5.5.6.- Valoración del filo en la LM y heces en función del estrés materno

Hemos analizado la distribución de filos en las heces de los prematuros y la LM en relación con el estrés expresado por la madre, categorizado entre alto y bajo estrés en función de su mediana (Tabla 5.27 y 5.28).

Heces	Estrés 3 días			Estrés 7 días			Estrés 15 días		
	Bajo	Alto	p	Bajo	Alto	p	Bajo	Alto	p
Proteobacterias	75%	33.3%	NS	66.7%	40%	NS	90%	70%	NS
Firmicutes	25%	66.7%	NS	22.2%	40%	NS	10%	20%	NS
Actinobacteria	ND	ND	NS	11.1%	ND	NS	ND	ND	NS
Bacteroidetes	ND	ND	NS	ND	20%	NS	ND	10%	NS

ND: No Detectable

Tabla 5.27.- Distribución de filos en heces en función del estrés materno

Podemos observar que, ante un estrés bajo en la madre, encontramos un mayor número de Proteobacterias y menor número de Firmicutes que ante un nivel de estrés elevado, a los 3 días. A los 7 días, ante un estrés bajo, sigue manteniéndose la tendencia de un mayor porcentaje de Proteobacterias con respecto a los Firmicutes, que ante un estrés elevado y aparecen también las Actinobacterias. El porcentaje de Proteobacterias y Firmicutes se iguala ante un estrés elevado y aparecen los Bacteroidetes, que no aparecen ante un bajo estrés.

A los 15 días, ante un estrés bajo, las Proteobacterias son las mayoritarias en cuanto a filo, y ante un estrés elevado también dominan las Proteobacterias, aunque siguen apareciendo los Bacteroidetes.

No hemos demostrado estadísticamente que el estrés en la madre modifica el filo en la microbiota intestinal del recién nacido prematuro, pero podemos decir, según nuestros datos, que elevados niveles de estrés en la madre y con el paso del tiempo, pueden tener una repercusión a nivel de filo en las heces del recién nacido, de forma que aumenten las Proteobacterias (33,3%, 40% y 70%) con respecto a los Firmicutes (66,7%, 40%, 20%) (Tabla 5.27).

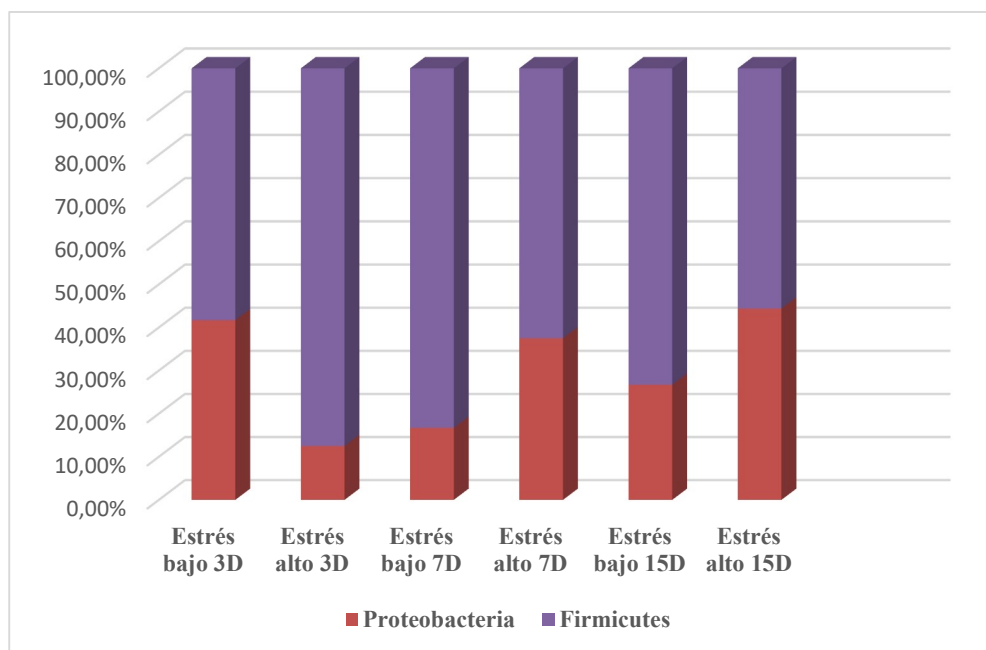
LM	Estrés 3 días			Estrés 7 días			Estrés 15 días		
	Bajo	Alto	p	Bajo	Alto	p	Bajo	Alto	p
Proteobacterias	41.7%	12.5%	NS	16.7%	37.5%	NS	26.7%	44.4%	NS
Firmicutes	58.3%	87.5%	NS	83.3%	62.5%	NS	73.3%	55.6%	NS
Actinobacteria	ND	ND	NS	ND	ND	NS	ND	ND	NS
Bacteroidetes	ND	ND	NS	ND	ND	NS	ND	ND	NS

ND: No Detectable

Tabla 5.28.- Distribución de filos en LM en función del estrés materno

En cuanto a la LM, observamos que ante un estrés bajo tenemos mayor número de Firmicutes y menor de Proteobacterias. Esta diferencia aumenta con el paso de los días. Sin embargo, ante un estrés elevado en la madre, también es mayor el porcentaje de Firmicutes, pero vemos cómo a medida que pasan los días éstos van disminuyendo y aumentando las Proteobacterias.

Por lo tanto, tampoco hemos demostrado estadísticamente dicha relación, pero observamos una tendencia en la que, con el paso del tiempo, ante un elevado estrés los Firmicutes van en descenso (87,5%, 62,5% y 55,6%) y las Proteobacterias en aumento (12,5%, 37,5% y 44,4%) y ante un bajo estrés observamos justo lo contrario (Tabla 5.28 y Fig 5.24).



D: días

Figura 5.24.- Distribución del filo en LM en relación con el estrés materno

5.5.7.- Filo y antibióticos prenatales y postnatales

Se estudió la distribución de filos en las muestras de heces y LM en función de la administración de antibióticos (ABT). Las muestras de heces se estudiaron con antibióticos pre y postnatales y las muestras de LM sólo con antibióticos prenatales. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, en ninguno de los tres momentos del estudio, entre las variables (Tablas 5.29 y 5.30).

ABT prenatales		Proteobacterias	Firmicutes	Actinobacterias	Bacteroidetes	p
Meconio 3d (n=8)	No (n=5)	80%	20%	ND	ND	NS
	Sí (n=3)	33.33%	66.67%	ND	ND	
Heces 7d (n=17)	No (n=13)	61.54%	30.77%	ND	7.69%	NS
	Sí (n=4)	25%	50%	25%	ND	
Heces 15d (n=26)	No (n=19)	84.21%	5.26%	5.26%	5.26%	NS
	Sí (n=7)	57.14%	42.86%	ND	ND	

ND: No Detectable; ABT: antibióticos; d: días

Tabla 5.29.- Distribución de filos en heces en función de haber recibido ABT prenatales

ABT postnatales		Proteobacterias	Firmicutes	Actinobacterias	Bacteroidetes	p
Meconio 3d (n=8)	No (n=1)	100%	ND	ND	ND	NS
	Sí (n=7)	57.14%	42.86%	ND	ND	
Heces 7d (n=19)	No (n=9)	66.67%	33.33%	ND	ND	NS
	Sí (n=10)	40%	40%	10%	10%	
Heces 15d (n=27)	No (n=8)	87.5%	ND	12.5%	ND	NS
	Sí (n=19)	68.42%	26.31%	ND	5.27%	

ND: No Detectable; ABT: antibióticos; d: días

Tabla 5.30.- Distribución de filos en heces en función de haber recibido ABT postnatales

En lo referente a la administración de antibióticos postnatales o la ausencia de éstos, hemos visto cambios en las heces de los recién nacidos prematuros.

Cuando se administran antibióticos postnatales vemos un descenso de Proteobacterias y un incremento de Firmicutes entre los 3 y 7 días, e incluso a los 7 días aparecen otros filos como los Bacteroidetes y las Actinobacterias.

Sin embargo, a los 15 días las Proteobacterias vuelven a incrementarse, en detrimento de los Firmicutes. Debemos tener en cuenta que la mediana de administración de antibióticos a nuestros pacientes, es de 7 días.

Por el contrario, en las heces de los niños que no reciben antibióticos tienen una mayor presencia de Proteobacterias y menos de Firmicutes (Figuras 5.25 y 5.26).

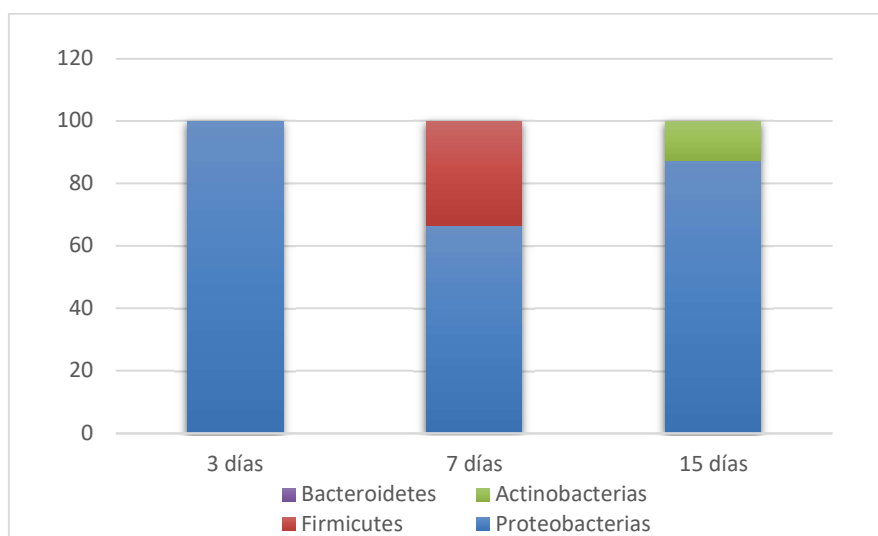


Figura 5.25.- Distribución de filos en heces sin ABT postnatales

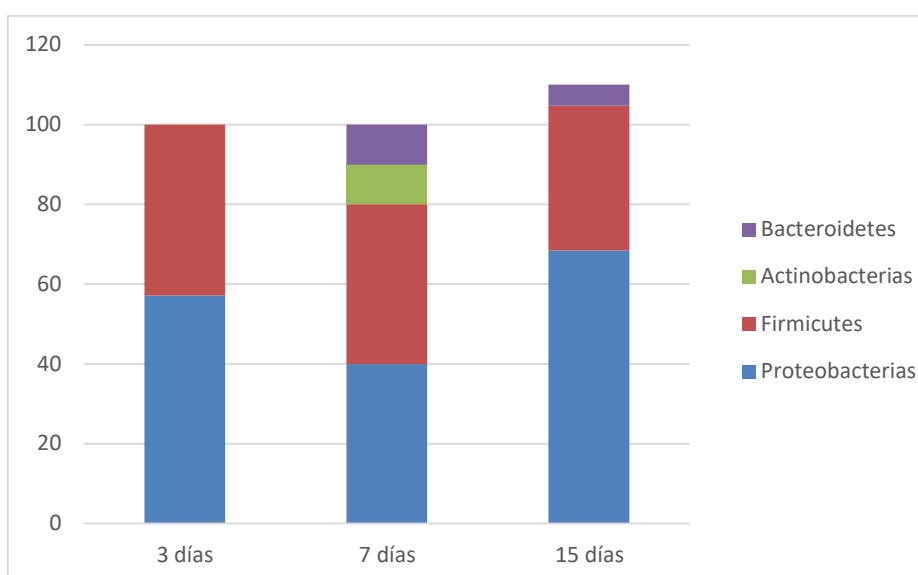


Figura 5.26.- Distribución de filos en heces con ABT postnatales



Si nos fijamos ahora en los filos que aparecen o predominan en las heces de los recién nacidos ante la administración o no de antibióticos prenatales, podemos ver que, en general, ante la

presencia de antibióticos prenatales las heces a los 3 y 7 días tienen menos Proteobacterias y más Firmicutes con respecto a los que no recibieron antibióticos prenatales, apareciendo también el filo de las Actinobacterias, en pequeña cantidad. En las muestras que no recibieron antibióticos prenatales, aparece el filo de los Bacteroidetes a los 7 días y a los 15 días al igual que las Actinobacterias, con respecto a los que tomaron antibióticos prenatales, es decir, hay mayor variedad de filos en las heces de los niños cuyas madres no han recibido antibióticos prenatales (Figuras 5.27 y 5.28).

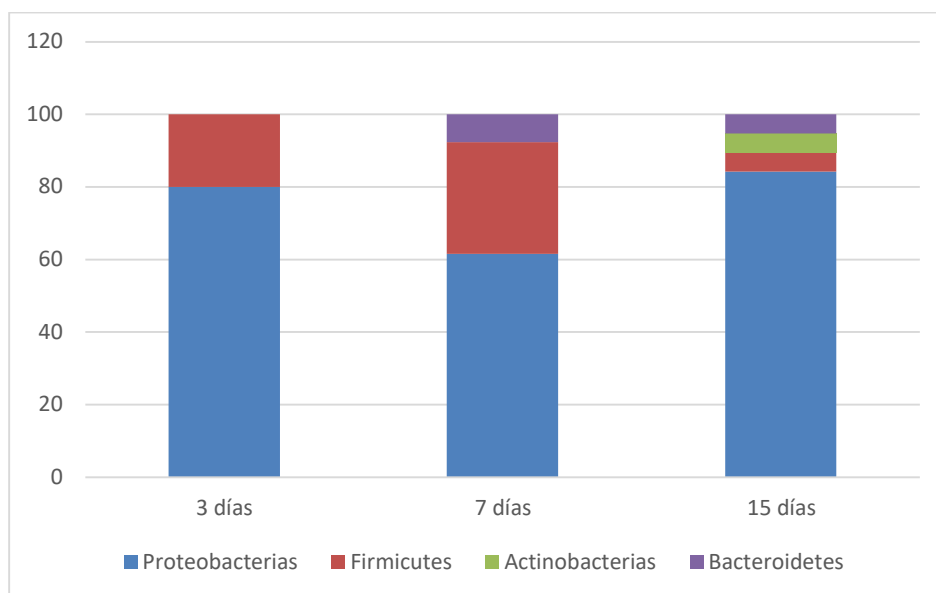


Figura 5.27.- Distribución de filos en heces sin ABT prenatales

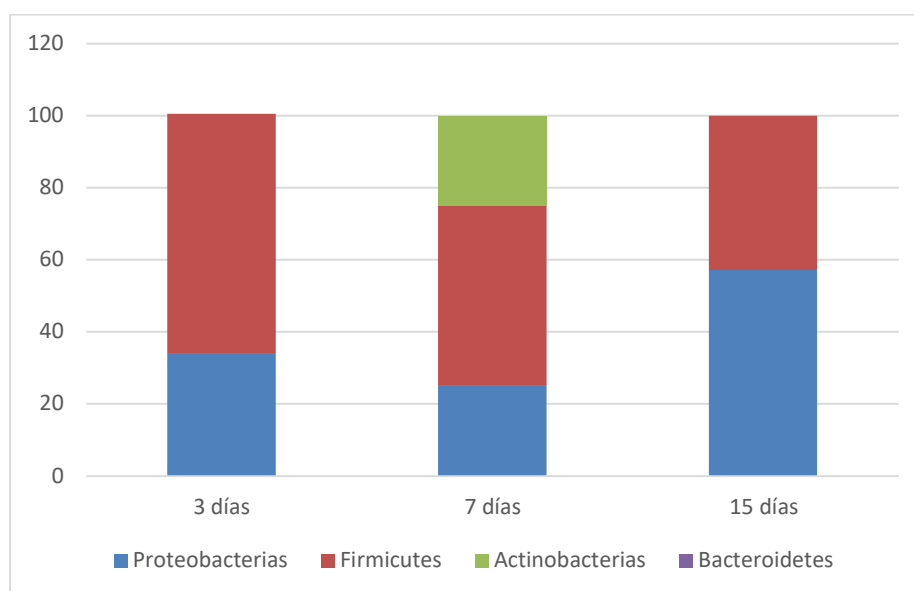


Figura 5.28.- Distribución de filos en heces con ABT prenatales

Comparamos también el filo predominante en LM ante la presencia y ausencia de antibióticos prenatales en la madre. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambas variables.

Sin embargo, observamos una tendencia en la que hay un mayor número de Firmicutes en aquellas madres que no recibieron antibióticos prenatales (76,92%, 71,42% y 64,7% a los 3, 7 y 15 días) con respecto a las que sí los recibieron (57,14%, 62,5% y 75% a los 3, 7 y 15 días), excepto a día 15.

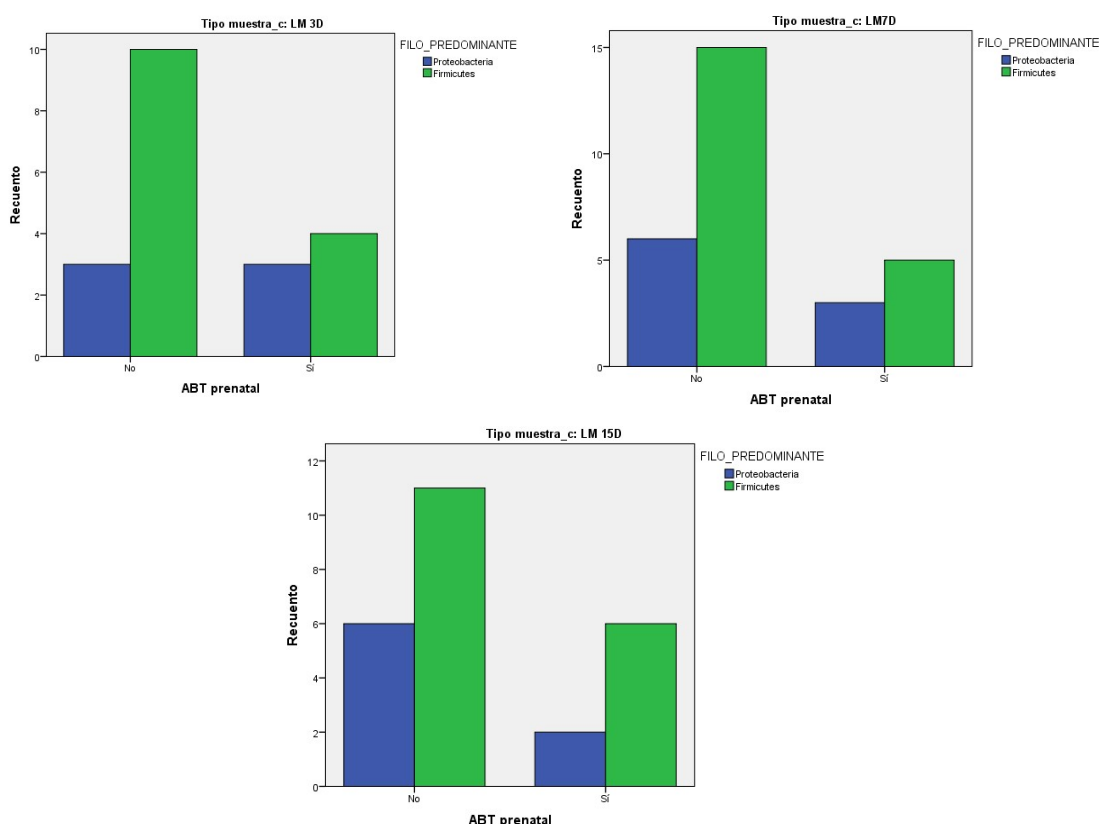
En el grupo de las que recibieron antibióticos prenatales, hay mayor número de Proteobacterias con respecto a las que no los tomaron, excepto a los 15 días, pero va en tendencia de descenso con el paso de los días.

El filo de los Firmicutes es el que domina en las muestras de LM en todos los momentos del estudio, independientemente de si las madres recibieron o no antibióticos previos al nacimiento de su hijo. Vemos también que el número de Firmicutes aumenta más rápido con el paso de los días en la LM de las que recibieron antibióticos prenatales al mismo tiempo que disminuyen más rápido las Proteobacterias (Tabla 5.31 y Figura 5.29).

ABT prenatales		Proteobacterias	Firmicutes	p
3 días (n=20)	No (n= 13)	23,07%	76,92%	NS
	Sí (n=7)	42,85%	57,14%	
7 días (n=29)	No (n= 21)	28,57%	71,42%	NS
	Sí (n= 8)	37,5%	62,5%	
15 días (n=25)	No (n= 17)	35,29%	64,7%	NS
	Sí (n= 8)	25%	75%	

ABT: antibióticos

Tabla 5.31.- Distribución de filos en LM en función de antibióticos prenatales



ABT: antibióticos

Figura 5.29.- Distribución de filos en LM en función de los antibióticos prenatales

5.5.8.- Estudio de la biodiversidad (Índice de Shannon) en heces y LM en relación a los antibióticos prenatales

No se han encontrado diferencias significativas, por lo que no se demuestra estadísticamente una variación en la biodiversidad cuando administramos antibióticos prenatales (Tabla 5.32).

ABT prenatales			
	No	Sí	p
LM 3 días	(n= 12) 0.74 (0.47 - 1.07)	(n= 6) 1.26 (0.79 - 1.42)	NS
LM 7 días	(n= 20) 0.75 (0.45 - 1.18)	(n= 7) 0.66 (0.42 - 0.83)	NS
LM 15 días	(n= 16) 0.94 (0.45 - 1.29)	(n= 7) 1.31 (1.09 - 1.58)	NS
Meconio 3 días	(n= 4) 1 (0.48 - 1.39)	(n= 3) 1.74 (1.28 - 2.12)	NS
Heces 7 días	(n= 13) 0.71 (0.46 - 1.09)	(n= 4) 1.35 (0.88 - 1.56)	NS
Heces 15 días	(n= 19) 0.97 (0.62 - 1.28)	(n= 7) 1.08 (0.62 - 1.24)	NS

ABT: antibióticos

Tabla 5.32.- Relación entre biodiversidad en LM/heces (índice de Shannon) y administración de antibióticos prenatales

Según nuestros datos, ante la presencia de antibióticos prenatales, la diversidad en LM es mayor manteniéndose dicha tendencia en la microbiota intestinal del recién nacido. El hecho de no tomar antibióticos prenatales hace que la diversidad en LM y heces sea menor.

5.5.9.- Estudio de la biodiversidad (Índice de Shannon) en heces en relación con los antibióticos postnatales

No se han encontrado diferencias significativas en la biodiversidad (I Shannon) en heces en función del empleo o no de antibióticos postnatales. No se demuestra una variación en la biodiversidad cuando administramos antibióticos postnatales (Tabla 5.33).

ABT postnatales			
	No	Sí	p
Meconio 3 días	Sin datos (n=1)	(n= 6) 1.19 (0.79 - 1.74)	NS
Heces 7 días	(n= 8) 0.87 (0.58 - 1.24)	(n= 11) 0.76 (0.53 - 1.30)	NS
Heces 15 días	(n= 8) 1.17 (0.66 - 1.37)	(n= 19) 0.97 (0.62 - 1.26)	NS

ABT: antibióticos

Tabla 5.33.- Relación entre biodiversidad en heces (índice de Shannon) y administración de antibióticos postnatales

No tenemos datos de biodiversidad en el meconio del día 3 en prematuros que no recibieron antibióticos, pero podemos observar que a día 7 y 15, la diversidad de la microbiota intestinal es mayor ante la ausencia de antibióticos postnatales.

5.5.10.- Relación del orden taxonómico en LM en función del estrés materno

Se estudiaron las variables de taxonomía bacteriana relacionada con el orden en función del estrés materno clasificado como alto y bajo en función de su mediana. No hemos encontrado diferencias significativas en la distribución del orden a los 3 y 7 días, pero a los 15 días vemos que ante un estrés elevado hay un mayor porcentaje de Enterobacteriales de forma significativa (p 0.046).

LM 3 días			
	Estrés bajo	Estrés alto	P
Enterobacteriales	3.03% (0.49 - 26.98)	0.70% (0.28 - 1.38)	NS
Clostridiales	0.32% (0.13 - 0.84)	0.52% (0.13 - 0.83)	NS
Lactobacillales	0.35% (0.11 - 1.07)	0.43% (0.27 - 0.67)	NS
Bifidobacteriales	0.00% (0.00 - 0.01)	0.00% (0.00 - 0.01)	NS

Tabla 5.34.- Orden taxonómico en LM a día 3 en relación con el estrés materno

A los 3 días, ante un estrés elevado hay mayor cantidad de Clostridiales y Lactobacillales en LM y menor cantidad de Enterobacteriales (Tabla 5.34).

LM 7 días			
	Estrés bajo	Estrés alto	P
Enterobacteriales	0.84% (0.35 - 2.31)	2.23% (0.21 - 8.11)	NS
Clostridiales	0.29% (0.11 - 0.93)	0.34% (0.11 - 2.72)	NS
Lactobacillales	0.64% (0.41 - 2.72)	0.59% (0.24 - 0.91)	NS
Bifidobacteriales	0.00% (0.00 - 0.01)	0.00% (0.00 - 0.01)	NS

Tabla 5.35.- Orden taxonómico en LM a día 7 en relación con el estrés materno

A los 7 días, ante un estrés elevado en la madre, la LM presenta mayor cantidad de Enterobacteriales y Clostridiales, aunque no es significativo estadísticamente. También observamos una menor proporción de Lactobacillales cuando el estrés es bajo (Tabla 5.35).

LM 15 días			
	Estrés bajo	Estrés alto	P
Enterobacteriales	0.73% (0.40 - 5.06)	6.97% (1.18 - 44.21)	0.046
Clostridiales	1.38% (0.16 - 3.74)	0.41% (0.32 - 1.33)	NS
Lactobacillales	0.75% (0.06 - 2.43)	0.62% (0.24 - 1.16)	NS
Bifidobacteriales	0.00% (0.00 - 0.01)	0.01% (0.00 - 0.02)	NS

Tabla 5.36.- Orden taxonómico en LM a día 15 en relación con el estrés materno

A los 15 días, ante un estrés alto en la madre, el porcentaje de Enterobacteriales en LM es todavía mayor, siendo estadísticamente significativo. El porcentaje de Clostridiales y Lactobacillales es menor cuando el estrés es alto (Tabla 5.36).

Cuando el estrés es elevado vemos una mayor cantidad de Enterobacteriales y menor cantidad de Lactobacillales que cuando el estrés es bajo, excepto a los 3 días. Los Bifidobacteriales no aparecen en las muestras de LM de nuestras pacientes (Figura 5.30).

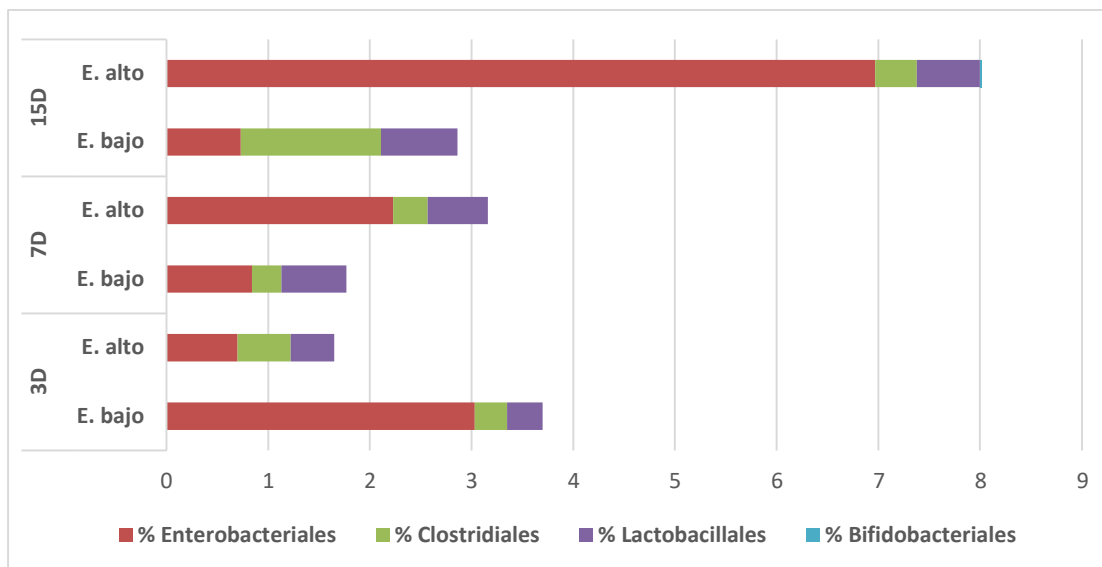


Figura 5.30.- Distribución del orden taxonómico en LM en función del nivel de estrés materno

5.5.11.- Relación entre CPF y Clostridiales en heces

Se ha analizado la relación entre la CPF y el porcentaje de Clostridiales en heces, a los 3, 7 y 15 días, mediante la prueba Rho de Spearman y no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre las variables, con lo que podemos afirmar que, en nuestra muestra de pacientes, las cifras elevadas de CPF no se relacionan estadísticamente con el porcentaje de Clostridiales en las muestras de heces (Tabla 5.37).

Correlaciones			Calprotectina 3d	% Clostridiales_ 3d	p NS
Rho de Spearman	Calprotectina 3d	Coefficiente de correlación	1,000	-,643	
		Sig. (bilateral)	.	,086	
		N	50	8	
	%Clostridiales_3d	Coefficiente de correlación	-,643	1,000	
		Sig. (bilateral)	,086	.	
		N	8	8	

Correlaciones			Calprotectina 7d	% Clostridiales_ 7d	p NS
Rho de Spearman	Calprotectina 7d	Coefficiente de correlación	1,000	,224	
		Sig. (bilateral)	.	,343	
		N	52	20	
	%Clostridiales_7d	Coefficiente de correlación	,224	1,000	
		Sig. (bilateral)	,343	.	
		N	20	20	

Correlaciones			Calprotectina 15d	% Clostridiales_ 15d	p NS
Rho de Spearman	Calprotectina 15d	Coefficiente de correlación	1,000	-,222	
		Sig. (bilateral)	.	,256	
		N	52	28	
	%Clostridiales_15d	Coefficiente de correlación	-,222	1,000	
		Sig. (bilateral)	,256	.	
		N	28	28	

Tabla 5.37.- Estudio de correlación de Spearman para CPF y Clostridiales

5.5.12.- Géneros más frecuentes en heces y en LM, por positividad en las muestras

Hemos analizado cuáles son los géneros mayoritariamente encontrados tanto en LM como en heces del recién nacido prematuro. Se presentan mediante diagramas de Venn los géneros encontrados en el 100% de las muestras analizadas (Figuras 5.31; 5.32 y 5.33).

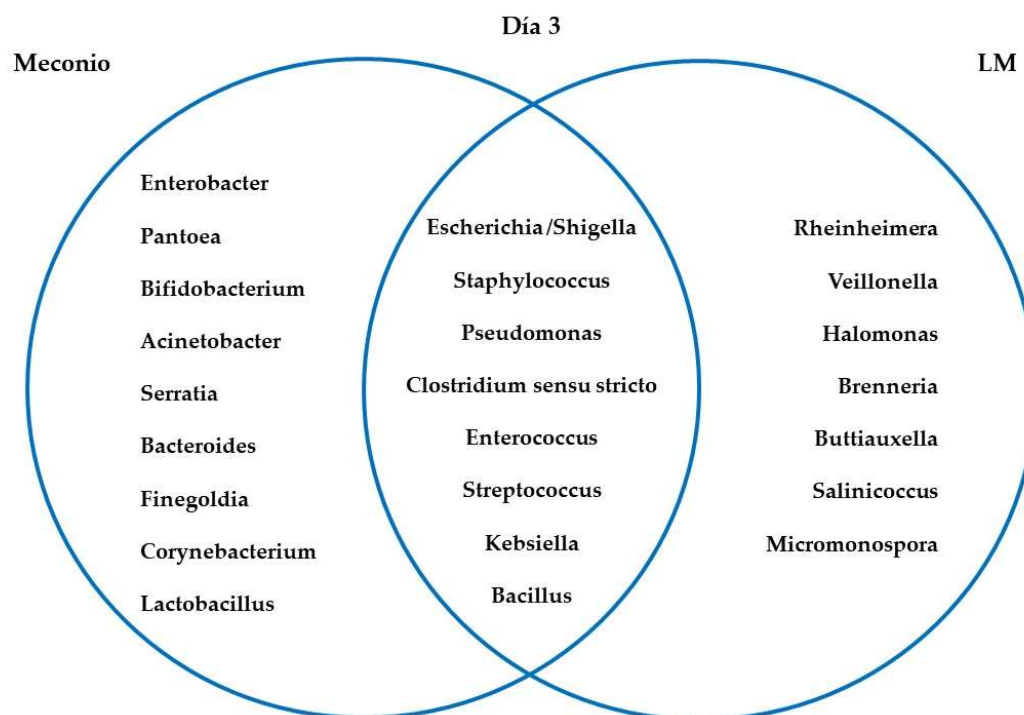


Figura 5.31.- Distribución del género en muestras de LM y meconio a los 3 días. Diagrama de Venn

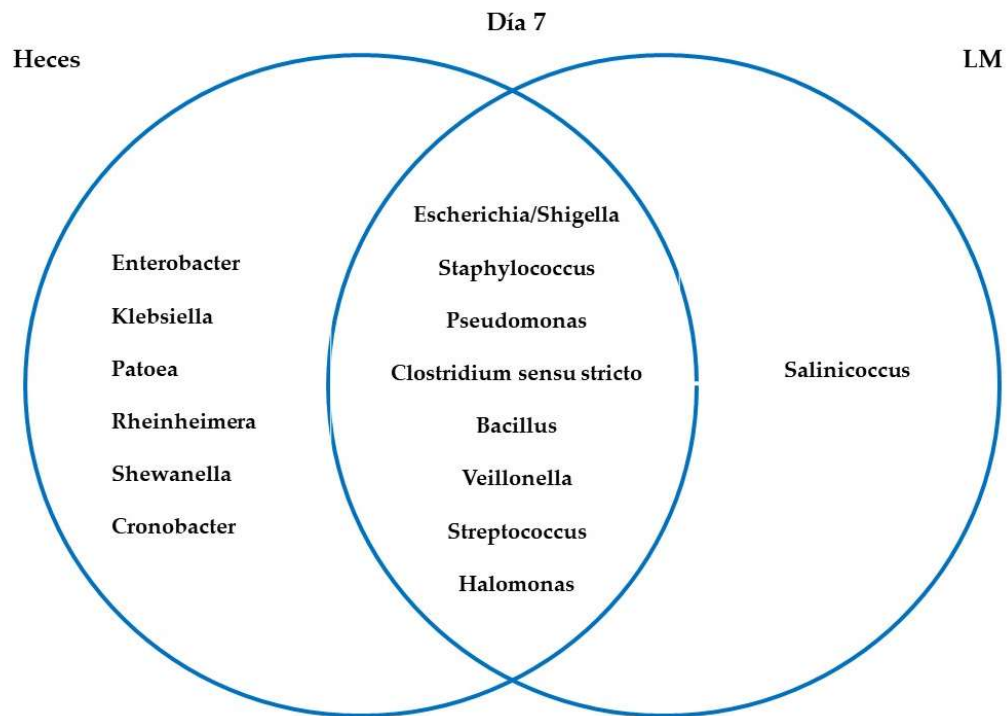


Figura 5.32.- Distribución del género en muestras de LM y meconio a los 7 días. Diagrama de Venn

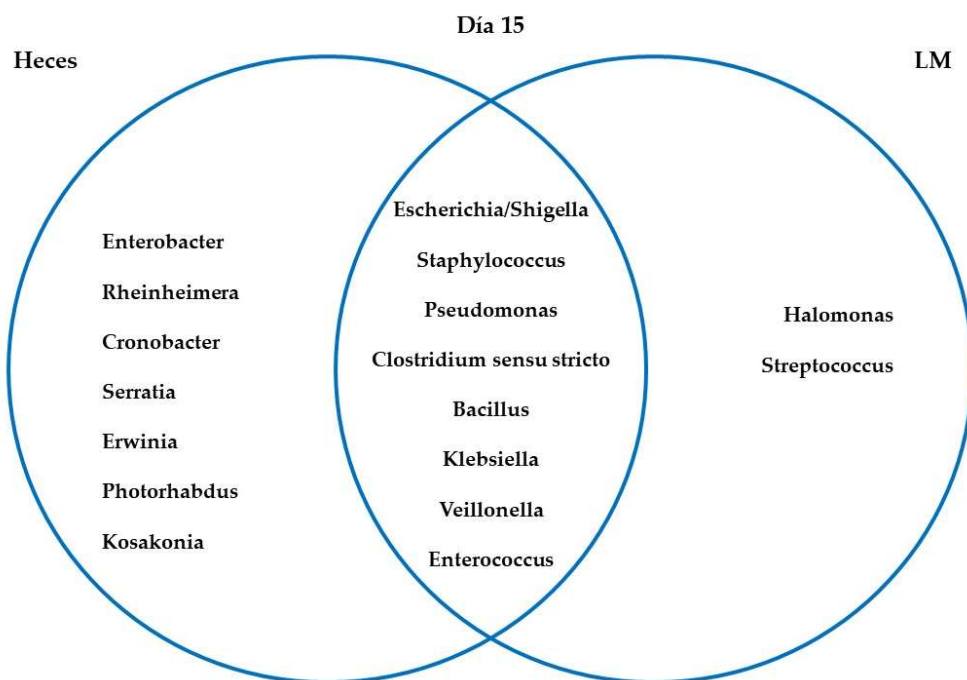


Figura 5.33.- Distribución del género en muestras de LM y meconio a los 15 días. Diagrama de Venn

5.5.13.- Especies más frecuentes en heces y LM, por positividad en las muestras

En la LM encontramos especies que forman parte de la microbiota habitual de la piel, como los *Staphylococcus* spp, *Bacillus* spp o *Propionibacterium* spp, apareciendo además bacterias anaeróbicas que suelen estar asociadas al ecosistema intestinal y se hacen evidentes en la LM

siguiendo la ruta entero-mamaria donde, a través de una traslocación bacteriana en el intestino materno, viajan hasta los ganglios linfáticos mesentéricos, la glándula mamaria y la leche, que es ingerida por el recién nacido. Tenemos así especies tan relevantes como *Roseburia* o *Faecalibacterium* tanto en LM como en heces del recién nacido en proporciones variables. En cuanto a las heces, se encuentran especies del género de *Enterococcus* (*E. faecalis*), *Enterobacterias* (*E. coli* o *Klebsiella spp.*) y *Staphylococcus spp.*, que forman parte de la microbiota intestinal. Las *Bifidobacterias* aparecen en proporciones escasas y tenemos especies del tipo *Bifidobacterium dentium*, *B. breve* o *B. bifidum*, en cantidades muy variables. También se encuentran especies de *Lactobacillus* en pequeñas cantidades, como *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, etc. (Figuras 5.34; 5.35 y 5.36)

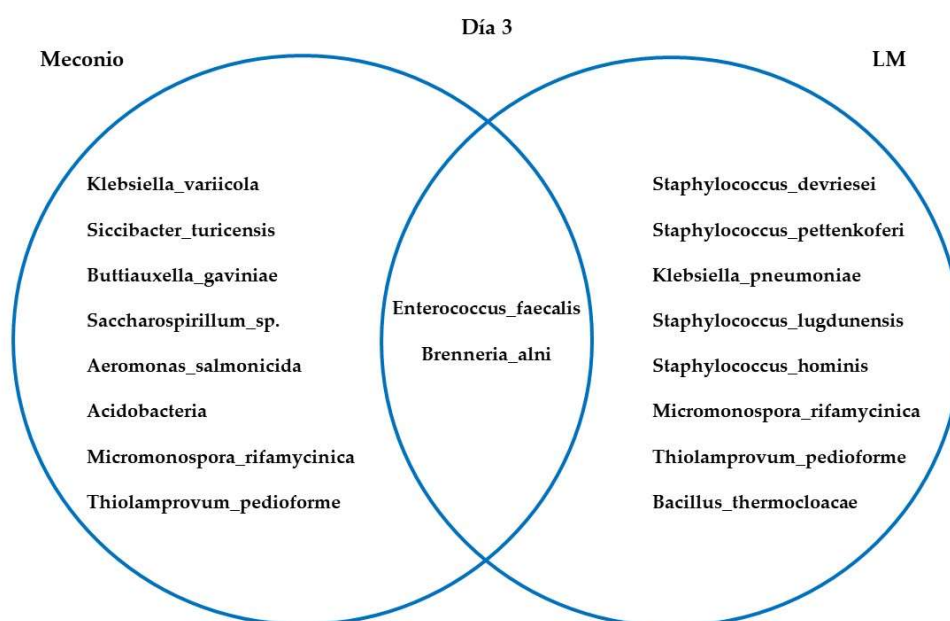


Figura 5.34.- Distribución de especie en muestras de LM y meconio a los 3 días. Diagrama de Venn

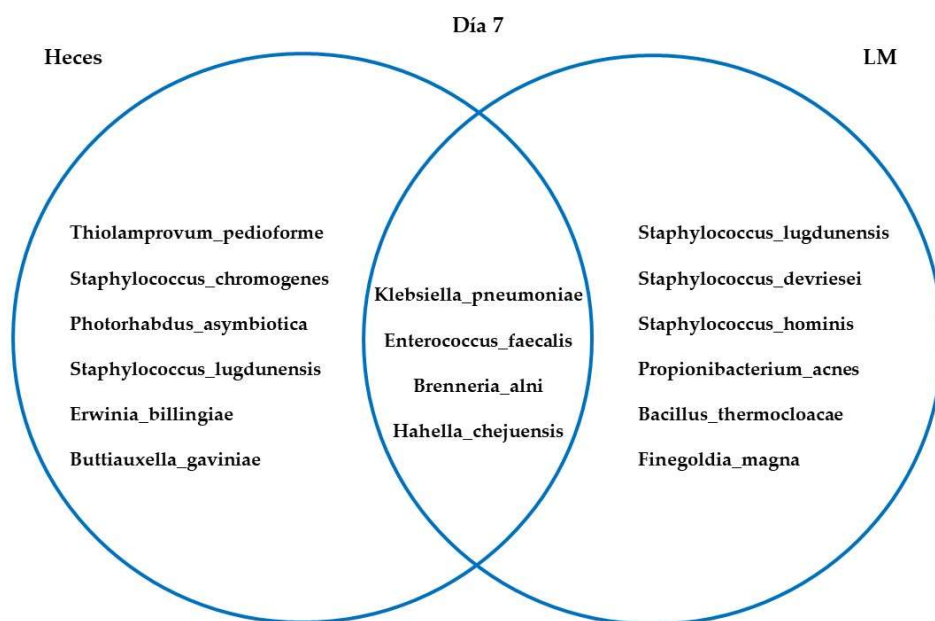


Figura 5.35.- Distribución de especie en muestras de LM y meconio a los 7 días. Diagrama de Venn

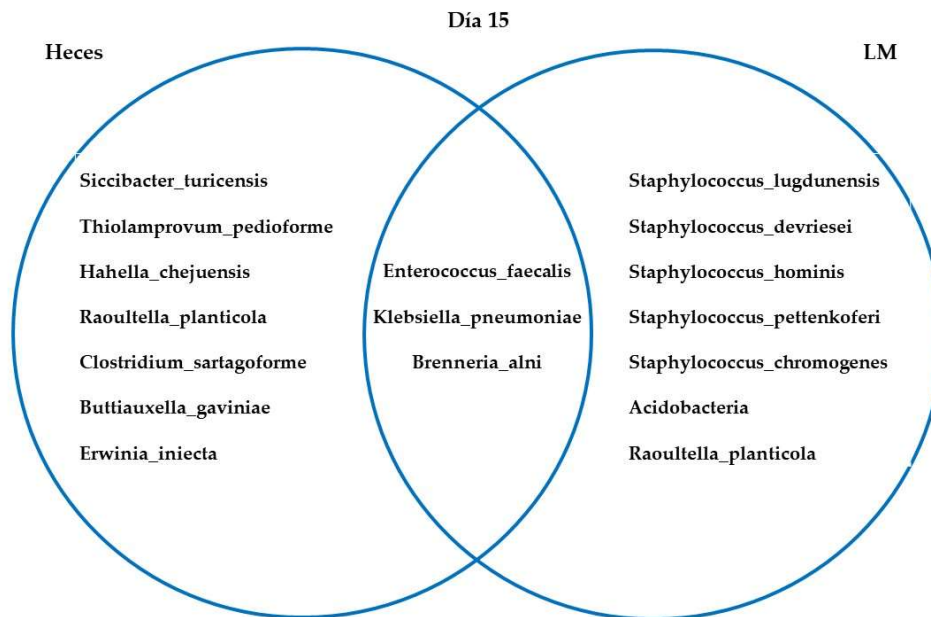


Figura 5.36.- Distribución de especie en muestras de LM y meconio a los 15 días. Diagrama de Venn

5.5.14.- Relación entre Bifidobacteriales, Lactobacillales y Clostridiales, en función del tipo de parto

Hemos analizado el binomio madre-hijo para ver cuáles eran las diferencias en cuanto a los taxones del orden Bifidobacteriales, Lactobacillales y Clostridiales, entre un parto por vía vaginal y una cesárea (Figuras 5.37 y 5.38).

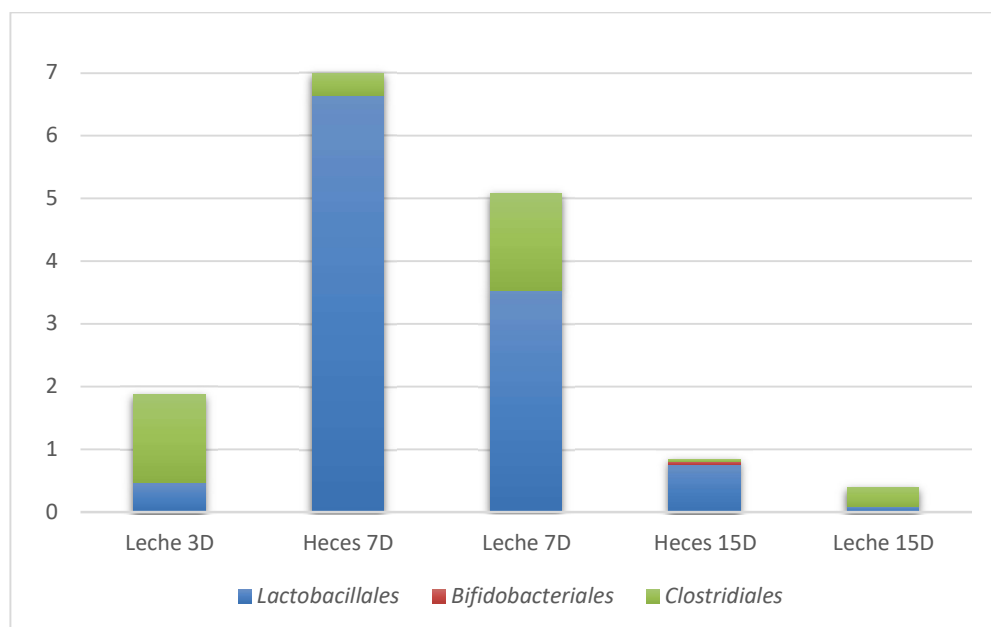


Figura 5.37.- Ejemplo del binomio número 35, por parto vaginal

Este binomio (número 35), se trata de un parto por vía vaginal, en el que observamos que en las heces del día 7 y 15 (falta meconio día 3) el niño presenta un mayor número de Lactobacillales que de Clostridiales. Sin embargo, los Bifidobacteriales son escasos.

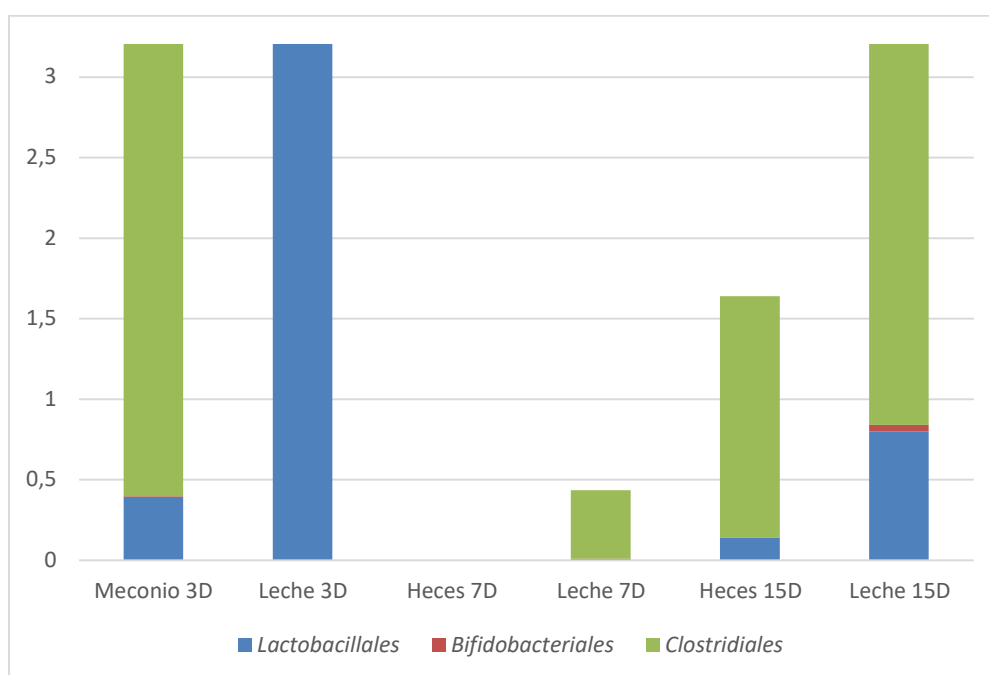


Figura 5.38.- Ejemplo del binomio número 41 con parto por cesárea

En el binomio número 41, cuyo parto fue mediante una cesárea, se observa una mayor presencia de Clostridiales en el día 3 y 15. No tenemos datos del día 7.

Se describen sólo 2 binomios puesto que los resultados obtenidos en los demás son similares a estos.

6.- DISCUSIÓN

En nuestro estudio hemos analizado el estrés de las madres de niños prematuros en tres momentos de su estancia hospitalaria; a los 3 días de vida, cuando todavía muchos padres están en un estado de shock inicial por lo que les ha ocurrido (cuando el parto se presenta de una forma inesperada); a los 7 días, cuando ya ha transcurrido ese primer momento de impacto y se hace la situación más real; y a los 15 días de vida, que es cuando ya empiezan a estar más familiarizados con la situación, con el ambiente de la UCIN y con el personal.

El tamaño de la muestra obtenida durante los dos años de recogida de datos se ha visto afectado por una caída brusca de la natalidad tanto a nivel autonómico como nacional, coincidiendo con la pandemia por SARS-CoV-2. Hemos obtenido para nuestro estudio una muestra de 52 pacientes prematuros alimentados con LM propia y de 45 madres.

La disminución de las fecundaciones in vitro, de la natalidad, así como el descenso de lactancias maternas propias, debido a la época del confinamiento y a la incertidumbre vivida en aquel momento, ha hecho que se vea reducido nuestro tamaño muestral. Situación similar se ha vivido en toda España (Figura 6.1)

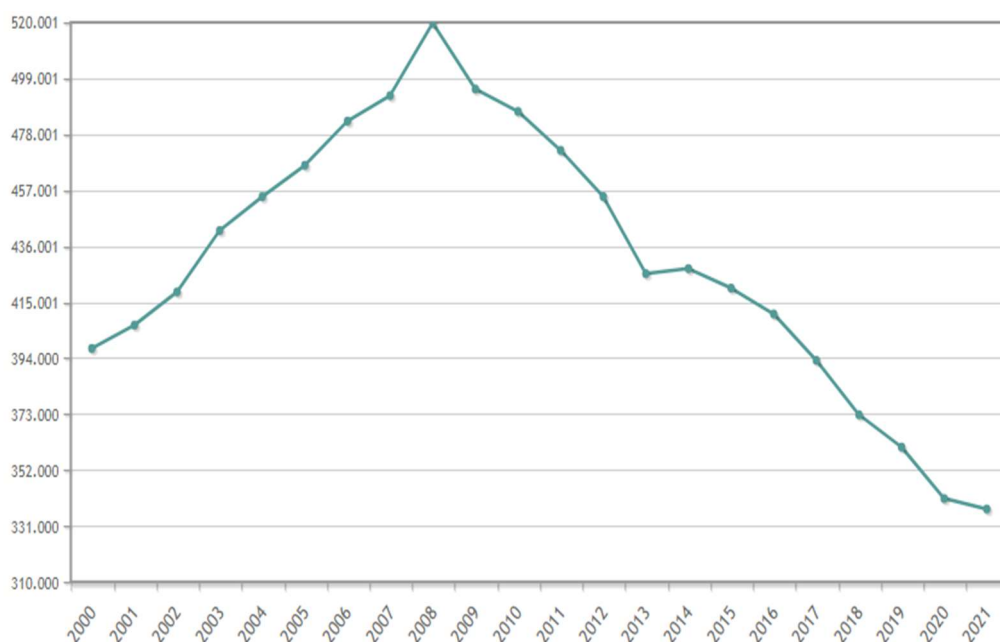


Figura 6.1.- Evolución de la natalidad desde el año 2000 hasta el 2021

6.1.- ESCALA DE ESTRÉS PARENTAL PSS:NICU

Existen varios estudios (77,78,79,80,81) donde se evalúa el estrés parental en las UCIN utilizando la escala PSS:NICU, la que hemos utilizado nosotros, para conocer la situación de los Servicios de Neonatología y demandar, sobre todo, la presencia de un profesional de la Psicología en dichos Servicios, así como la necesidad de crear grupos de apoyo, tanto de padres/madres como de intervención psicológica, para favorecer el afrontamiento de estas familias a la situación tan estresante a la que se ven sometidos y promover el vínculo con su hijo.

La escala PSS:NICU es de las más utilizadas en todo el mundo para valorar el estrés parental producido en las UCIN. Consta de 5 subescalas que evalúan diferentes aspectos, como ya hemos explicado anteriormente.

En nuestro estudio, la subescala con un mayor puntaje para estrés en las madres es la de “rol de madre”, con un estrés medio de 3,6 puntos a los 3 días, 3,11 puntos a los 7 y 3,11 puntos a los 15 días. Este resultado coincide con la mayoría de los estudios revisados (79, 81, 82), puesto que es la subescala que más se relaciona con el vínculo y el estrés que supone la separación madre-hijo. Las consecuencias de esta separación y no poder satisfacer las necesidades básicas de sus hijos en cuanto a alimentación, protección y cuidado es una causa generadora de gran estrés para las madres.

La subescala de “aspecto físico y comportamiento del bebé” es la siguiente en el orden de estrés generado en las madres, seguido de “vistas y sonidos” y “comportamiento y comunicación con el personal”. Los resultados de nuestro estudio son coincidentes con otros revisados, en donde las subescalas generadoras de mayor a menor estrés siguen el mismo orden que en nuestro caso (79, 80, 81).

El estrés parental, afrontado de una forma incorrecta, puede generar estados de ansiedad y depresión en las madres, causando trastornos importantes a nivel personal y en la vida familiar. Está demostrado que un elevado estrés parental debido al nacimiento de un hijo prematuro puede afectar en el futuro al vínculo madre-hijo estableciéndose un apego inseguro además de ser un factor de riesgo para el desarrollo conductual y social del recién nacido prematuro en la infancia (79, 83, 84, 85).

En una revisión bibliográfica sobre las experiencias de las familias en las UCIN se han detectado cuatro tipos de necesidades en las mismas (86): a nivel cognitivo, referidas al conocimiento que tienen sobre el estado de su hijo así como las particularidades de la UCIN, siendo aquí fundamental la comunicación con el equipo sanitario; a nivel social, ya que hay una carencia en este sentido por parte de los padres de un niño ingresado en UCIN; a nivel emocional, referidos a sentimientos que puedan experimentar los padres debido al estado de su hijo y aquí es donde es más significativo el apoyo emocional que se les debe prestar a esos padres por parte de todo el equipo sanitario, así como por parte de profesionales especializados; y a nivel práctico, derivadas de las comodidades estructurales de los servicios de Neonatología, donde es importante disponer de un lugar para que los padres se sientan lo más cómodos posible. Actualmente se están cambiando las estructuras físicas de algunas unidades de Neonatología para permitir una mayor humanización y comodidad de los padres que pasan tanto tiempo en las UCIN al lado de sus hijos.

Por lo tanto, debemos de facilitar las herramientas necesarias a las familias para que se establezca un apego seguro y disminuir el estrés dentro de nuestras UCIN. Contar con un equipo bien formado en cuidados de niños prematuros, especializado y multidisciplinar es fundamental hoy en día en todos los servicios de Neonatología para evitar futuros problemas a esas familias tan vulnerables. También son necesarios programas de humanización que hagan que las UCIN sean lo más abiertas posibles a los cuidados de los padres.

En nuestro estudio podemos observar cómo el estrés va disminuyendo con el paso de los días, sin embargo, la escala de RM es la que más elevada se mantiene en el tiempo, manteniéndose en cifras de estrés moderado. Deberíamos de conseguir que el estrés causado por la separación madre-hijo cada vez fuese menor, haciendo partícipes a los padres en todo lo relativo a cuidados, alimentación y cercanía con su hijo.

La escala de CPS genera estrés leve a los 3 días. Hay que destacar que nuestro servicio de Neonatología es una unidad abierta 24h para los padres, sin ningún tipo de restricción horaria. Además, trabajamos favoreciendo los cuidados centrados en el desarrollo y la familia,

instaurando el método madre canguro y haciendo partícipes a los padres del cuidado de sus hijos, desde un primer momento. Sin embargo, a medida que pasan los días, se observa un ligero incremento del estrés en esta subescala en nuestra muestra de madres. Esto puede ser debido a que los primeros días los padres están en un estado de shock inicial y con el paso del tiempo demandan más información y ser más partícipes en los cuidados. Pueden empezar a surgir algunas discrepancias con el personal al ir conociendo la forma de trabajar, así como también pueden enfocar sus frustraciones y miedos hacia el personal que atiende a sus hijos. Por ello es muy importante establecer desde un principio una adecuada relación terapéutica de comunicación y confianza, por parte del equipo sanitario, en la que los padres se sientan seguros, para disminuirles la ansiedad y responder todas sus dudas. Muchas veces, debido al estado emocional en el que se encuentran, les cuesta comprender la información que reciben y una de las funciones del equipo sanitario es volver a informarles las veces que sea necesario, hasta que estemos seguros de que nos están entendiendo.

La humanización de las UCIN es fundamental hoy en día. El hecho de que los padres participen del cuidado de sus hijos, que puedan calmarlos, que nos ayuden en alguna técnica con la contención, dejarlos que les cambien el pañal, los asean, los alimenten, así como otro tipo de acciones, va a conseguir que disminuya su ansiedad y van a sentirse más identificados con el rol de padres, con lo que se sentirán mucho más cercanos al personal sanitario e incluso aumentará su confianza hacia ellos mismos. El equipo sanitario debe ir suavizando el ambiente hostil en el que se encuentran para ir poco a poco haciéndoles que se integren en el equipo que presta los cuidados, pasando a ser cuidadores indispensables de sus hijos.

Programas de humanización como “FICARE”, donde los padres forman parte activa de los cuidados básicos de sus hijos, en un ambiente de UCIN, ya se llevan a cabo en España, en hospitales como La Paz, en Madrid. Este programa, basado en el empoderamiento de los padres hacia el cuidado de sus hijos, bajo la supervisión del equipo sanitario, ha demostrado disminuir el estrés en las familias, las infecciones nosocomiales, así como la estancia hospitalaria y mejorar la confianza de los progenitores y las tasas de lactancia materna (87, 88).

A nivel general, por lo tanto, vemos que el estrés disminuye más bruscamente del día 3 al 7, en todas las subescalas y suele aumentar del día 7 al 15. Esto suele estar en relación con una fase de estancamiento o ligera mejoría, en los primeros días de vida, a partir de los cuales comienzan a surgir complicaciones que hacen que la evolución del prematuro no sea la esperable para los padres. Pueden aparecer problemas como infecciones, problemas de tolerancia enteral, bajada de peso, displasia broncopulmonar, sintomatología compatible con la presencia de ductus arteriovenoso que es necesario tratar, entre otras complicaciones, que hace que los niveles de estrés aumenten.

En cuanto al estrés general o común percibido, las cifras se mantienen elevadas durante los 15 días, en niveles de estrés moderado. Es poco relevante la disminución del estrés a lo largo del tiempo. Hay que tener en cuenta, que el estudio ha sido realizado en tiempos de la pandemia por Covid 19 y esto ha generado un estrés más elevado, si cabe, en estos padres. El miedo a transmitir el Covid 19 por parte de los padres a sus hijos, ha hecho que vinieran menos a verlos, les tocasen o interactuasen menos con ellos, hiciesen menos el método canguro o menos tiempo del que solían hacerlo en época de no pandemia. Han estado menos presentes en nuestro servicio de Neonatología, lo que ha hecho que sus niveles de alerta estuviesen más disparados.

Las situaciones que han vivido los padres debido a la pandemia han hecho que sus niveles de alerta y estrés estuviesen por encima de lo que estarían en condiciones normales. En nuestro servicio, como en muchos otros, se han vivido situaciones de una mayor mortalidad durante una parte de la época de estudio, debido a peculiaridades propias de la pandemia y cambios de protocolos que nos hacía adaptarnos a la nueva situación a medida que se iban conociendo

instrucciones nuevas. Todo esto ha generado, tanto en profesionales como en padres, un ambiente propicio y generador de estrés. Los profesionales hemos estado sometidos también a un elevado estado de alerta y muchas veces se ha transmitido, aún sin quererlo y de forma indirecta, a los padres que en ese momento estaban en la UCIN con sus hijos. Por lo tanto, podría justificarse el elevado estrés general que manifiestan en los resultados de sus encuestas.

6.2.- CANTIDAD DE LM

Hemos visto cómo se ha ido incrementando la producción de LM con el paso de los días en nuestra muestra de madres, como era de esperar. Conseguir una producción adecuada de LM en madres de niños prematuros es una tarea más compleja que si se tratase de un niño a término, sobre todo por el hecho de la separación madre-hijo, al necesitar éste el ingreso en una UCIN. Hoy en día, se permite la entrada de los padres a los Servicios de Neonatología y éstos permanecen todo el tiempo que quieren con sus hijos, mejorando así la producción de LM, al estar en contacto con el bebé el mayor tiempo posible e incluso darles la opción de poder sacar leche al lado de su hijo, siendo esto lo más recomendable. El método piel con piel o madre canguro, también es un estímulo muy importante para incrementar la producción de leche. En nuestra UCIN se le suministra a los recién nacidos prematuros LM propia, siempre que sea posible, y en su defecto LHD.

Se ha demostrado en varios estudios que los niños alimentados con LM propia y fortificada tienen una mejor ganancia ponderal que los alimentados con LHD fortificada y peor que los alimentados con sucedáneos de LM ^(89, 90). Además de los múltiples beneficios de la LM, se ha visto que la ingesta de más del 50% de LM en los primeros 28 días de vida, se asocia a un mayor volumen de sustancia gris a nivel cerebral, así como mejores niveles cognitivos, intelectuales y motores en la edad escolar. Esta asociación es más fuerte cuanto menor es la edad gestacional ^(90, 91, 92).

No se ha encontrado bibliografía que nos indique cuáles son los valores normales de producción de LM con el paso del tiempo. Esto es algo muy variable, dependiente de múltiples factores y con un componente muy individual. Sin embargo, sí se ha podido demostrar que el volumen de LM extraída a las 2 semanas de vida parece predecir la alimentación con LM propia al alta si éste es ≥ 500 ml/día ⁽⁹³⁾.

Así mismo, hemos encontrado estudios que también predicen que el volumen de LM extraído en el día 4 postparto, puede indicar si una lactancia va a ser exitosa o no. Se ha visto que una producción de menos de 140 ml/día en el día 4, tiene un riesgo 9,5 veces mayor de baja producción de leche a las 6 semanas después del parto ^(94,95).

Hemos comparado nuestros datos con los de ambos estudios, para ver si en nuestra muestra de madres se cumplía este criterio.

La mediana de la cantidad de LM de nuestra muestra es de 80 ml en el día 4 postparto, con lo que podemos predecir problemas en la lactogénesis en la mayoría de nuestras madres, con el paso de los días. Es importante conocer este dato porque podríamos intervenir precozmente sobre la producción de estas madres y conseguir cifras adecuadas a las 2 semanas que garanticen una producción óptima al alta para ese recién nacido.

En nuestro estudio hemos analizado la cantidad de LM extraída en los días 3, 7 y 15 de vida. La mediana de nuestra muestra de madres a los 15 días es de 275 ml/día. Esto es inferior a los 500 ml/día, volumen que marcaremos como indicador de calidad para una lactogénesis exitosa al alta ⁽⁹³⁾ (Figura 6.2).

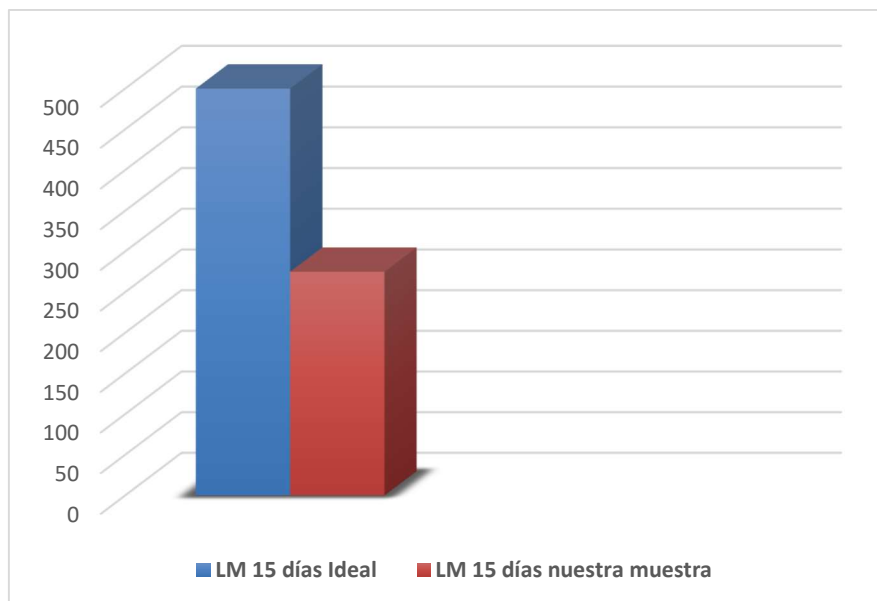


Figura 6.2.- Cantidad de LM producida a los 15 días en nuestra muestra en relación a la cantidad ideal de 500 ml/día

Hay que tener en cuenta una vez más que el estudio lo hemos realizado coincidiendo con la pandemia de Covid-19, donde las madres eran más reacias a venir al hospital debido a épocas de confinamiento total y/o parcial, tenían más dudas sobre los riesgos que podía tener la LM para sus hijos, ya que temían estar contagiadas sin saberlo, con lo que puede ser una de las causas por las que hemos visto mermada la cantidad de LM propia para nuestros pacientes prematuros. El hecho de tener banco de leche humana en el propio hospital ha servido, en muchas ocasiones, para que las madres estuviesen más tranquilas al tener cubierta la alimentación de sus hijos. Así se ha demostrado en otros estudios, donde se ha visto el impacto negativo que ha tenido la pandemia de Covid-19 sobre la reducción de las tasas de LM y el volumen de LM propia administrado a niños prematuros ⁽⁹⁶⁾, a pesar de que la IHAN, OMS, UNICEF, SENEo y diversas entidades científicas han recomendado la LM propia, aun siendo la madre Covid positiva.

En nuestra muestra, hay tan sólo 10 madres, de las 45, con cantidades de leche materna superior a 500 ml/día en la segunda semana, que es la cantidad que predice positivamente una lactancia materna exitosa al alta ⁽⁹³⁾. Esto supone que tan sólo el 23,8% de nuestras madres tendrá una lactogénesis adecuada con una producción suficiente de LM una vez se vaya de alta, y el 76,2% tendrán problemas para garantizar la LM exclusiva, al alta. Es un porcentaje bajo, sin embargo, es más elevado que el encontrado en algunos artículos, donde sólo un 6,3% de las madres consiguen llegar al volumen de 500 ml/día a las dos semanas ⁽⁹⁷⁾.

Además, el 65,1% de nuestras madres extraen una cantidad inferior a 140 ml/día en el día 4 postparto. De éstas, 27 madres en total, 24 no alcanzan el volumen de 500 ml/día en el día 15, lo que supone el 88,8% de las madres con baja producción a los 4 días. De esta forma, hemos podido verificar estadísticamente en nuestra muestra, que la producción de LM inferior a 140 ml/día en el día 4 de postparto predice una cantidad inferior a 500 ml/día en el día 15, según se ha demostrado en anteriores estudios.

Esto enfatiza la importancia de los registros de volúmenes de LM extraídos en los Servicios de Neonatología, desde el inicio de la lactancia, puesto que podremos adelantarnos a posibles problemas que puedan surgir en la madre y que pongan en riesgo la lactogénesis. A raíz de este estudio, hemos puesto en marcha registros de volumen de LM en nuestro Servicio para actuar

precozmente en aquellos casos de madres en los que a día 4 de postparto extraigan una cantidad inferior a 140 ml/día, e intentar que lleguen a esa cantidad que sabemos garantiza positivamente la lactogénesis a los 15 días.

Por todo ello, es muy importante incidir en la extracción precoz de LM, siempre y cuando ésta sea posible. Las extracciones tempranas de calostro contribuyen a una mayor producción de LM durante el período de hospitalización del recién nacido prematuro (98), además de proporcionar una colonización microbiótica muy saludable cuando es administrado de forma precoz en la mucosa oral del prematuro (98, 99) reduciendo la incidencia de NEC, sepsis de origen tardío o neumonía asociada al uso de ventiladores (100) e incluso se ha visto que puede reducir la incidencia de displasia broncopulmonar (101).

Está demostrado que el inicio de la extracción de LM en madres de recién nacidos prematuros en la primera hora después del parto aumentará el volumen de LM al disminuir el tiempo de la lactogénesis II (102, 103). Por lo tanto, la extracción temprana es fundamental, sobre todo en madres de niños prematuros, puesto que el volumen de LM es inferior si el niño se presenta de forma prematura que si se trata de un recién nacido a término (104).

El grado de desarrollo mamario de una mujer que tiene un hijo a término es el adecuado. Sin embargo, cuando se trata de un parto prematuro, el desarrollo de la glándula mamaria puede que no se haya completado y esto puede afectar al rendimiento de la lactancia materna (105). A pesar de esto, el inicio y mantenimiento de la lactancia van a requerir los mismos cambios hormonales, así como el mismo comportamiento por parte de la madre para conseguir una lactancia exitosa. El inconveniente más importante es la separación madre-hijo, que tiene lugar debido a la necesidad de cuidados sanitarios por parte del prematuro.

En nuestro servicio, recomendamos a las madres la extracción precoz de LM, siempre y cuando sea posible. Se le explica el procedimiento de estimulación y extracción manual, siendo ésta más recomendable al principio, en vez de utilizar el sacaleches, y cómo tendrán que hacer la recogida de leche con una jeringuilla en la que se va aprovechando cada gota. Se les enseña la correcta identificación de la leche, con el nombre, fecha y hora de extracción, informándoles de que se la daremos en forma de gotas en la mucosa oral desde el momento en que dispongamos de ella.

Es muy importante el refuerzo positivo en estas madres desde el principio. El apoyo emocional y la motivación por parte de todo el equipo, en un momento tan vulnerable para los padres, se convierte en uno de los objetivos primordiales para el inicio y mantenimiento de la LM, independientemente de que contemos con LHD.

En nuestro estudio hemos observado una mayor producción de LM cuando el parto se produce por vía vaginal frente a la cesárea. Esto se ha visto ya en la literatura donde se habla del parto por cesárea como un factor de riesgo predisponente para la alteración de la producción de LM (93).

6.2.1.- Cantidad de LM y estrés

Hay artículos que relacionan el estrés y/o ansiedad con el establecimiento, duración y la baja producción de LM (54, 106, 107), puesto que con el estrés se incrementa el cortisol, adrenalina o dopamina, inhibiéndose la producción de prolactina y oxitocina, que son hormonas fundamentales en la producción y secreción de la LM. Si el estrés se produce de forma puntual, la producción de leche se ve alterada en menor medida que si se trata de una situación de estrés mantenido, pudiendo terminar esto con la producción y secreción de LM.

En un dificultoso trabajo de parto o en una cesárea, se producen elevados niveles de estrés que pueden llegar a alterar la lactogénesis (106). Nosotros no hemos conseguido demostrar estadísticamente que el tipo de parto influye de forma significativa en la cantidad de la LM

extraída, aunque sí hemos observado una tendencia en la que en el parto vaginal se produce una mayor cantidad de leche. Tampoco hemos tenido en cuenta si se trata de una cesárea programada o si se produce por una complicación del parto, que siempre va a generar un mayor estrés, ni tampoco si el parto ha sido o no dificultoso.

Intervenciones sencillas, como escuchar música relajante o canciones de cuna mientras tiene lugar la extracción de leche, consiguen disminuir el estrés y aumentar las tasas de producción de LM al aumentar los niveles de oxitocina (108, 109). También se pueden utilizar fármacos, los llamados galactogogos, para incrementar dicha producción. Uno de los más utilizados es la domperidona a dosis de 10mg, tres veces al día durante 14 días como máximo, que bloquea los receptores de la dopamina y estimula la producción de prolactina (95). El uso de galactogogos se deberá hacer combinado con las técnicas de extracción frecuentes, al menos 5 en el día y una de ellas por la noche, donde se produce el mayor pico de prolactina.

La formación, el buen asesoramiento y apoyo por parte del personal sanitario durante el tiempo de hospitalización, ha demostrado ser beneficioso para aumentar el éxito de la LM en las madres de niños que tienen sus hijos ingresados en la UCIN (110). Para ello, es necesaria la correcta formación y actualización de todo el personal que trabaja en los Servicios de Neonatología, así como conseguir el apoyo de la institución y los altos mandos para poder poner en práctica todo lo relacionado con las políticas de LM que hagan aumentar las tasas de lactancia tanto durante la estancia hospitalaria como una vez se vayan de alta.

En nuestro estudio, hemos visto una relación inversa estadísticamente significativa entre el estrés y la producción de LM en los 3 primeros días. Se produce una mayor cantidad de LM cuando el nivel de estrés está por debajo de la mediana, a los 3 días. Vemos también que la cantidad de LM extraída a día 3 está relacionada estadísticamente con la subescala de RM, de forma que un mayor estrés en dicha subescala supone un descenso estadístico en la cantidad de LM a día 3.

Sin embargo, esta diferencia entre la cantidad de LM y el estrés no se mantiene significativa a los 7 y 15 días. Esto puede ser debido a que a medida que pasa el tiempo el impacto inicial del parto prematuro va desapareciendo y las madres se centran en proporcionar LM, que es una forma de poder ayudar a su hijo. La cercanía de la UCIN, el poder ver y tocar a su hijo o realizar el método madre canguro, van a propiciar que la madre se integre en los cuidados y aumente la producción de LM de forma progresiva. De todas formas, observamos una tendencia donde a menor estrés en la madre mayor producción de LM a los 7 y 15 días (figura 5.12).

Se ha revisado literatura contraria a nuestro hallazgo, donde no se encuentra relación entre estrés y volumen de LM (97, 111, 112). Sin embargo, en otros estudios analizados, sí se demuestra dicha relación. El proyecto GESTASTRESS, sobre los efectos que produce el estrés en el embarazo, desarrollado en España, relaciona los elevados niveles de cortisol en cabello materno y neonatal, con un inicio retardado de la lactogénesis (113). En otro estudio se ha encontrado una menor producción de LM en madres de prematuros que no tenían apoyo psicológico (con mayor estrés) en comparación con aquellas que sí lo tenían (con menor estrés) y se ha visto que, ante estímulos relajantes, como la música, la producción se ve incrementada (114, 109).

No hemos encontrado en nuestro estudio diferencias estadísticas entre baja producción de LM a día 15 (menor a 500 ml/día) y estrés en la escala de estrés parental ni en la subescala de RM, sin embargo, sí apreciamos un menor estrés en aquellas madres que tienen una producción $\geq$ 500 ml/día (2,8 puntos) frente a las que producen $<$ 500 ml/día (3,25 puntos) (tabla 5.12).

El estrés psicológico al que se enfrenta una madre de un recién nacido prematuro puede alterar el comienzo de su lactogénesis, como se ha visto, aunque esto es difícil de cuantificar. Además, la LM tiene un efecto reductor de estrés ya que favorece que se liberen hormonas, como la

oxitocina, con un efecto beneficioso y relajante para la madre ⁽¹⁰⁷⁾. Por lo tanto, el estrés y la lactancia parecen estar muy relacionados y ejercer una respuesta bidireccional.

Conociendo esto, es importante recalcar la necesidad de controlar y mejorar el estrés en las madres fomentando programas dirigidos a promover el contacto temprano con su hijo prematuro, haciéndoles partícipes en las UCIN de todos los cuidados de sus hijos y prestar asesoramiento en temas de LM, donde todo el personal esté formado en LM. El apoyo psicológico y el soporte emocional de estas madres, debería ser un reclamo en todas las UCIN.

6.3.- COMPOSICIÓN DE LA LM

Se sabe que la composición de la LM tiene un componente muy individual y dinámico, de manera que varía a lo largo del día, a lo largo de la toma y también es diferente si se trata de un parto a término o prematuro. Si un parto ocurre de forma prematura, los nutrientes de la LM, en general, tendrán un nivel más elevado de proteínas que un parto a término, debido a las necesidades que presenta en ese momento el recién nacido.

Nosotros hemos analizado los macronutrientes de la LM en los 3 momentos del estudio, 3, 7 y 15 días, en cuanto a grasas, proteínas e hidratos de carbono (lactosa). Se ha calculado la mediana de cada macronutriente y hemos asumido dicha mediana como la calidad ideal de LM, para diferenciar entre alta y baja calidad, teniendo siempre presente que la LM es la ideal para el recién nacido. En la literatura existe un metaanálisis donde se habla de cifras ideales de macronutrientes de LM ⁽⁶⁷⁾. Sin embargo, no lo hemos utilizado para el examen estadístico como referente en el que comparar nuestros datos, puesto que se trata de una revisión de artículos antiguos y, además, los hidratos de carbono vienen expresados en Kcal/dl, que al pasarlas a nuestras unidades de medida (g/dl) nos darían unos valores “extrañamente” bajos.

En la figura 6.3 podemos observar las medianas de los macronutrientes de nuestro estudio comparando con los del metaanálisis de Gidrewicz ⁽⁶⁷⁾, en cuanto a proteínas y grasas.

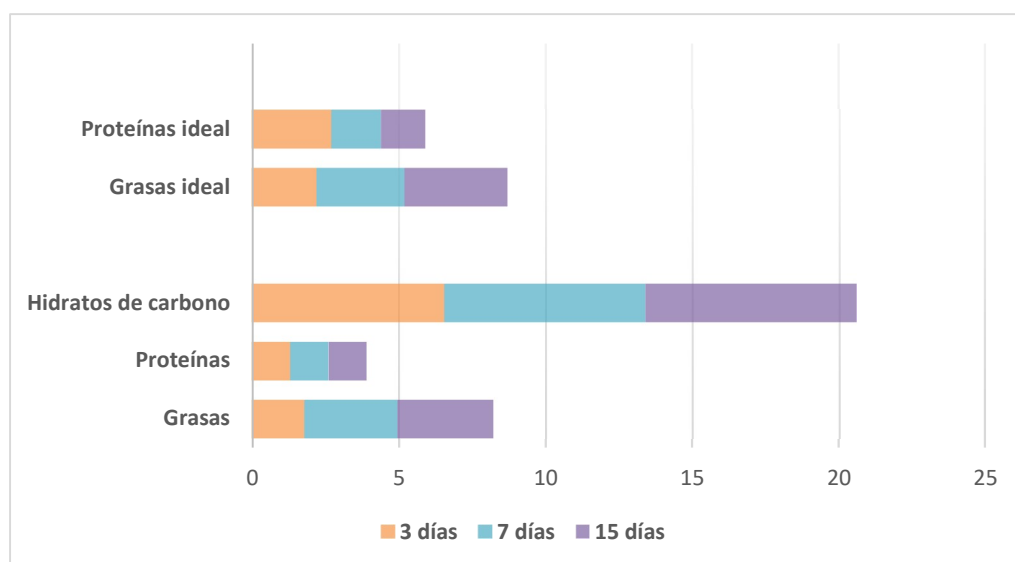


Figura 6.3.- Comparación de los niveles medianos de macronutrientes (grasas y proteínas) de nuestro estudio con los ideales del estudio de Gidrewicz

En nuestros datos vemos diferencias marcadas en las proteínas, puesto que en la leche de nuestras madres están muy por debajo, teniendo en cuenta que las madres de niños prematuros suelen tener unas cifras de proteínas más elevadas que las madres de niños a término, para garantizar un mayor aporte proteico.

En general, lo que resulta más llamativo es la escasez de proteínas en las leches prematuras de nuestra muestra y sobre todo la invariabilidad de resultado con el paso de los días. Si comparamos nuestra muestra de calostro con el metaanálisis de Gidrewicz vemos cómo nuestras madres tienen un valor bastante inferior (1,4 g/dl) con respecto a la mediana de las madres del mencionado estudio (2,7 g/dl). La diferencia en cuanto a proteínas también se aprecia a los 7 y 15 días, aunque de una forma menos acusada (1,7 g/dl y 1,5 g/dl, frente a 1,3 y 1,2 g/dl). No tenemos datos para comparar con madres a término, pero resultaría de interés realizar dicha comparativa, para ver si se trata de un problema generalizado y localizado en nuestra zona geográfica que pueda tener relación con hábitos dietéticos y/o estilo de vida, que no se ha tenido en cuenta a la hora de la recogida de datos.

En cuanto a las grasas, si comparamos nuestros datos con los del estudio de Gidrewicz, vemos cómo apenas existen diferencias. Lo que se ha visto en la literatura es que la relajación que produce la música influye positivamente en la cantidad de grasa de la LM extraída, dato a tener en cuenta para futuras investigaciones.

Nuestras muestras de LM muestran un elevado contenido en hidratos de carbono en los tres periodos del estudio (6,55 g/dl, 6,85 g/dl y 7,19 g/dl), y además van en aumento desde el día 3 al 15.

Recientemente se ha publicado un artículo de Borrás Novel, realizado en España, donde se analizan los macronutrientes de una gran muestra de madres de niños prematuros y han demostrado que determinados factores maternos y neonatales influyen en el contenido de macronutrientes, como la relación inversa entre edad gestacional y cantidad de proteínas y grasas, que las madres con sobrepeso tienen mayor cantidad de grasa y proteínas en la LM o que la concentración de proteína era mayor en las madres con bebés únicos, con respecto a los gemelares ⁽¹¹⁵⁾.

Si comparamos nuestros macronutrientes con los del estudio de Borrás Novel ⁽¹¹⁵⁾, podemos hacerlo a los 7 y 15 días, puesto que ellos no analizan macronutrientes a los 3 días de vida. Vemos que no hay tanta diferencia con nuestros datos en cuanto a proteínas, puesto que nosotros tenemos 1,3 y 1,2 g/dl a los 7 y 15 días y en este estudio nos habla de 1,5 g/dl y 1,3 g/dl, respectivamente. En cuanto a las grasas, obtienen un valor de 3,9 g/dl y 3,8 g/dl, y nosotros obtuvimos 3,16 g/dl y 3,27 g/dl. Finalmente, en lo referente a los hidratos de carbono, nos hablan de 7,1 g/dl y 7,3 g/dl y nosotros hemos obtenido valores de 6,85 g/dl y 7,19 g/dl, respectivamente. Por lo que podemos ver unos resultados no tan distantes a los nuestros, quizá porque estamos hablando de estudios dentro del mismo territorio nacional y el estilo de vida y dieta pueden ser similares.

6.3.1.- Composición de LM y estrés

Hemos relacionado la calidad de nuestras leches, en cuanto a macronutrientes, con el estrés percibido en las madres. No se han encontrado diferencias significativas estadísticamente entre la calidad de la LM y el estrés. De esta forma, madres con elevados niveles de estrés no ven modificada la calidad de su leche. Lo que sí observamos es que la reducción de estrés es ligeramente mayor en aquellas madres que tienen una mejor calidad de LM.

Se han encontrado estudios, con resultados similares al nuestro, donde el estrés no influye en la calidad o contenido de los macronutrientes ^(116,117). Sin embargo, otras investigaciones nos indican que, ante un estrés agudo, donde hay un aumento de cortisol, se observan niveles más bajos de hidratos de carbono y más elevados de grasa en la LM y ante estrés crónico disminuyen los niveles de grasa en LM ⁽¹¹⁸⁾.

No hemos tenido en cuenta los hábitos de vida, la dieta de la madre o el índice de masa corporal (IMC) en nuestra investigación, lo que podría resultar interesante a la hora de analizar los

resultados de los macronutrientes de las leches. Está demostrado que el IMC materno y la grasa de la LM están directamente relacionados; a mayor IMC, mayores cantidades de grasa en la LM ⁽¹¹⁹⁾. De la misma forma, otras investigaciones recientes sugieren una asociación negativa entre el estado nutricional y el contenido proteico en la LM ⁽¹²⁰⁾, aunque parece que es la composición corporal materna la que juega un papel fundamental en el valor nutricional de la LM, y no tanto la dieta ⁽¹²¹⁾. En otro estudio reciente han demostrado que la ingesta en la dieta materna de polifenoles en el postparto va a mejorar la memoria y la atención en la madre, así como también aumenta el perfil lipídico de la LM ⁽¹²²⁾.

6.3.2.- Macronutrientes de la LM relacionados con el tipo de parto y sexo del RN

Hemos estudiado la composición de macronutrientes en relación con otras variables y tampoco hemos encontrado diferencias en función del sexo, sin embargo, hay estudios que relacionan el sexo masculino con índices mayores de carbohidratos, con respecto a las niñas, debido a una mayor demanda energética por parte de los varones ⁽¹²³⁾. Esto ocurre ya desde el embarazo, donde las madres que se encuentran gestando niños tienen un consumo energético de un 10% mayor con respecto a madres que están gestando niñas ⁽¹²⁴⁾.

Con respecto al modo de nacimiento, en nuestro estudio hemos encontrado diferencias en cuanto al tipo de parto y la composición de macronutrientes en la LM. Tener un parto vaginal va a condicionar que la grasa del calostro sea mayor con respecto a las cesáreas, de forma significativa. Este hallazgo no se ha podido contrastar en la literatura revisada, pero sí encontramos que en los partos vaginales la cantidad de proteínas e hidratos de carbono son mayores en los partos vaginales con respecto a las cesáreas ^(125, 126). Observamos en nuestros datos una tendencia en donde la LM de los partos vaginales tiene una composición de grasas e hidratos de carbono ligeramente mayor que en las cesáreas, aunque no sea significativo.

En cualquier caso, la composición de los macronutrientes de la LM está muy influida por la dieta materna, así como el IMC de la madre, algo que no hemos tenido en cuenta en nuestro estudio y debería de ser contemplado en futuras investigaciones.

6.4.- CANTIDAD DE LM Y MACRONUTRIENTES EN RELACIÓN CON LA EDAD DE LA MADRE

No apreciamos diferencias significativas en cuanto a la cantidad de LM en relación con madre de edad fértil tardía (≥ 35 años) y madre joven (< 35 años), sin embargo, se observa una tendencia en donde las madres más jóvenes producen mayores cantidades de LM (32,5 ml a los 3 días, 205 ml a los 7 días y 370 ml a los 15 días) que las menos jóvenes (11 ml a los 3 días, 125 ml a los 7 días y 197,5 ml a los 15 días). En artículos revisados se encuentran resultados similares a los nuestros, donde la edad de la madre tampoco influye significativamente en la cantidad de la LM extraída ⁽¹²⁷⁾.

En cuanto a la composición de los macronutrientes de la LM, no hemos observado diferencias significativas en función de la edad de la madre, en ninguno de los 3 momentos del estudio. Sin embargo, en la literatura encontramos que el contenido de macronutrientes puede variar dependiendo de si la madre es más añosa o más joven. Tendrán más grasa en calostro e hidratos de carbono en leche madura, las mujeres que tienen una edad más avanzada (≥ 35 años) con respecto a las más jóvenes (< 35 años) y además a mayor edad de la madre mayor contenido de carbohidratos ⁽¹²⁸⁾.

Como ya hemos comentado, nosotros no hemos tenido en cuenta el tipo de alimentación materna ni su IMC, lo que puede influir en los macronutrientes de la LM.

6.5.- ESTRÉS Y SU MODULACIÓN (ESTUDIOS, MÉTODO CANGURO Y MORBILIDADES DEL RN)

Hemos querido valorar si el nivel de estudios en la madre influye en su respuesta al estrés. Según nuestros datos, las madres que tienen unos estudios más básicos gestionan peor el estrés de forma estadísticamente significativa que aquellas que tienen estudios secundarios o superiores. Este hallazgo está en la línea con otros estudios donde, un mayor nivel de estudios en las madres va a propiciar que perciban un mayor apoyo social y emocional, con lo que disminuirán sus niveles de estrés ⁽¹²⁹⁾.

Nuestra muestra de madres con estudios primarios es escasa (n= 4) en comparación con las que tienen estudios secundarios o superiores, con lo que se necesitaría aumentar la muestra para poder dar un mayor peso a dicho hallazgo.

Hemos relacionado el método canguro con la reducción de estrés y hemos encontrado que se reduce el estrés en la madre de forma estadísticamente significativa si el canguro se produce de forma precoz, definido esto como un período menor o igual a 4 días. Esto es concordante con un estudio de metaanálisis recientemente publicado que indica que los niveles de estrés se ven reducidos en las madres, sobre todo cuando el método canguro tiene una duración superior a 60 minutos y es más efectivo cuanto más precoz ⁽¹⁴⁶⁾. También se ha visto que las madres que hacen el canguro tienen una mejor calidad del sueño, debido a la disminución del estrés ⁽¹⁴⁷⁾ y los niños presentan una mayor ganancia ponderal y menores necesidades de alimentación parenteral ⁽¹⁴⁸⁾. Los niveles de cortisol en la madre y en el niño son más bajos y las madres tienen menor depresión postparto cuando el método canguro tiene una duración estimada de 90 minutos ⁽¹⁴⁸⁾. Esto no lo hemos analizado en nuestro estudio, pero el método canguro en nuestro servicio siempre tiene una duración mayor o igual a 90 minutos. Además, podemos aprovechar este momento para realizar procedimientos dolorosos en el prematuro (punción venosa, gasométrica, colocación sondaje nasogástrico...) puesto que la reducción del dolor también es uno de los beneficios del método canguro ^(149,150), aunque es más positivo si se aplican también otras medidas no farmacológicas como la administración de sacarosa o gotas de LM, siendo esto último lo más recomendable ⁽¹⁵¹⁾.

Hemos estudiado también la variación del estrés en función de las morbilidades del RN. En la primera semana es cuando los niños presentan, en general, una mayor mejoría que podría justificar un mayor descenso del estrés, mientras que la estabilidad de la segunda semana hace que no continúe descendiendo de forma significativa.

En resumen:

Como hemos visto, aunque no hay unas cifras de LM que se consideren normales, podemos ver cómo la LM extraída en el día 4 postparto y en el día 15 pueden alertarnos de problemas en la producción de leche al alta. Nuestra muestra de madres obtiene unos valores inferiores a los que predicen de forma positiva una lactancia exitosa al alta, con lo que tendríamos que estar más atentos a las dificultades que les van surgiendo a la hora de la producción y extracción de leche. El estrés, en nuestra muestra, no influye en la cantidad de leche extraída ni en la calidad de sus nutrientes. Vemos que los macronutrientes no se modifican de forma significativa con el sexo, sin embargo, en el parto por vía vaginal se obtienen unas cifras mayores de grasa en el calostro, con respecto a la cesárea. También observamos que nuestra muestra presenta un nivel bajo y muy poco variable de proteínas en la LM, teniendo en cuenta que normalmente la LM de madres de niños prematuros tiene un mayor aporte proteico.

La edad de la madre tampoco influye en la cantidad de leche extraída ni en la calidad de sus macronutrientes. Sin embargo, el nivel de estudios de la madre va a influir estadísticamente de forma inversamente proporcional en el estrés.

Estudios más elevados y un inicio precoz del método canguro suponen una importante ayuda en el control y manejo del estrés materno.

Las tasas de LM exclusiva en el mundo están por debajo de las recomendadas por la OMS, siendo menores a partir de los 6 meses, ocupando Europa el lugar donde estas tasas se encuentran todavía más por debajo de la media, representando menos del 25% a la edad de 6 meses (130). En España se encuentran en un 66% durante el primer mes y luego descienden al 28% en el sexto mes, que suele tener relación con la incorporación laboral de la mujer al terminar su permiso maternal, aunque también se asocian factores como el escaso apoyo a la lactancia materna, la percepción de tener leche insuficiente o recibir consejos para la alimentación artificial con sucedáneos (131).

Por todo esto, es necesario el apoyo a la LM desde un ámbito profesional, la formación en LM de todos los profesionales implicados y favorecer políticas de LM exclusiva incluyendo este como uno de los objetivos principales de la política sanitaria de todos los países. Los registros de tasas anuales de LM son imprescindibles para conocer la situación en cuanto a LM de un país. La colaboración internacional en relación con políticas sanitarias favorecedoras de la LM son un reclamo para conseguir unas cifras más elevadas siguiendo las recomendaciones de la OMS.

6.6.- CALPROTECTINA FECAL

6.6.1.- Niveles de CPF

Nuestros valores medianos de CPF han sido de 70 µg/g a los 3 días, 26 µg/g a los 7 días y 42 µg/g a los 15 días. Vemos que al principio es más elevada, disminuye a los 7 días en probable relación con la administración de antibióticos postnatales, y vuelve a aumentar a los 15 días, cuando el tratamiento antibiótico ha finalizado y se produce una alimentación completa con LM y fortificación, en la mayoría de los casos. La cinética de las cifras de CPF coincide con un estudio revisado (132), donde, además, a partir del día 15 las cifras comienzan a descender, aunque esto no podamos verlo en nuestros pacientes puesto que no se recogen muestras después de 15 días.

Hemos comprobado que los niveles de CPF de nuestra muestra de pacientes son más elevados que los de adultos, donde se admite como valor referencial 50µg/g (39) Nosotros obtuvimos cifras medianas por debajo de 50µg/g a los 7 días, que es cuando se alcanza el mayor porcentaje de tolerancia a la alimentación enteral (98,1%), coincidiendo con la finalización de la alimentación parenteral, que tiene una mediana de 6 días. A día 15 vemos como ya ha aumentado a 42 µg/g, donde la mitad de nuestros prematuros tienen fortificada la LM, lo que puede contribuir a una mayor osmolaridad e irritación a nivel intestinal, elevando las cifras de CPF. Se admite que las cifras de CPF están más elevadas en niños sin tener relevancia clínica, producto de la inmadurez de su sistema inmune, que permite una mayor permeabilidad intestinal, causando estados inflamatorios.

Nuestra muestra de pacientes prematuros recibe LM exclusiva o en su defecto LHD. En ningún caso han recibido fórmula artificial de prematuros. Se ha visto en diferentes artículos que las cifras de CPF están incluso más elevadas en aquellos niños que se alimentan de LM en comparación con los que se alimentan con fórmula debido a factores inmunomoduladores de la LM en la mucosa intestinal (133), sin embargo, también hay trabajos que han encontrado

justamente lo contrario y justifican que la LM tiene un efecto antiinflamatorio protector frente a la fórmula artificial ⁽¹³⁴⁾.

A los 15 días, el 96,2% tiene buena tolerancia enteral, estando con alimentación enteral completa un 92,3% de los prematuros y un 86,5% tiene ya la LM fortificada, lo que podría justificar este incremento de cifras.

La CPF es una proteína que refleja la migración de neutrófilos a la luz intestinal y puede servir de biomarcador de inflamación intestinal en adultos, sin embargo, en niños los valores de CPF no son concluyentes para establecer un rango de referencia que pueda ser de utilidad ⁽¹³⁵⁾. Se podría admitir su valor como indicador útil y no invasivo en el seguimiento de las alergias a proteínas de leche de vaca después de una intervención dietética ⁽¹³⁶⁾, aunque sigue sin existir evidencia suficientemente probada tampoco en este caso ⁽¹³⁷⁾ puesto que las diferencias interindividuales son demasiado importantes.

6.6.2.- Niveles de CPF y composición de la LM

Se han comparado las cifras de CPF en relación con la calidad de los macronutrientes de la LM y no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las cifras elevadas de CPF y menor calidad de LM. La CPF, como marcador de inflamación intestinal, debería descender con la mejora de la calidad de los macronutrientes de la LM, sin embargo, los niveles de CPF parecen estar más relacionados con la inmadurez del sistema digestivo de los niños prematuros. No hemos encontrado publicaciones similares en la literatura revisada para poder comparar este dato.

6.6.3.- Niveles de CPF y sexo

Se han comparado las variables y hemos encontrado una relación significativa entre los niveles de CPF y el sexo a los 15 días, de forma que los niños de nuestra muestra presentan unas cifras más elevadas de CPF con respecto a las niñas. En la literatura revisada se ha visto algún estudio donde el sexo parece no influir en las cifras de CPF de forma significativa ^(138, 139) a diferencia de nuestros resultados.

6.6.4.- Niveles de CPF y antibióticos prenatales

En nuestra muestra de pacientes no se han encontrado diferencias entre las cifras de CPF en los niños cuyas madres habían tomado antibióticos prenatales con respecto a las que no los habían tomado. Sin embargo, sí hemos encontrado bibliografía donde esta relación ocurre de forma que los niveles de CPF son más bajos en las madres que recibieron antibióticos de forma prenatal ^(138, 140).

En nuestra muestra de madres, sólo el 32,7% de la muestra recibe antibióticos prenatales, lo que puede justificar la no existencia de significación estadística entre ambas variables. Se necesitaría una muestra mayor para poder comparar de forma más valorable las variables estudiadas.

6.6.5.- Niveles de CPF y antibióticos postnatales en el recién nacido

Se han encontrado cifras más bajas de CPF a los 7 días en la muestra de pacientes que han recibido antibióticos postnatales, con respecto a los que no los han recibido, de forma significativa. Teniendo en cuenta que la mediana de antibióticos es de aproximadamente 7 días, los antibióticos pueden estar influyendo en la inflamación intestinal reduciendo los niveles de CPF, lo que podría justificar dicho hallazgo.

La bibliografía revisada aporta resultados similares a los nuestros ^(141, 142) donde se aprecian cifras menores de CPF en niños que reciben antibióticos debido a una disminución de la inflamación a nivel intestinal.

6.6.6.- Niveles de CPF y peso al nacimiento

Hemos encontrado una relación inversa estadísticamente entre las cifras de CPF al tercer día y el peso al nacimiento, de forma que, a menor peso al nacimiento, mayores valores de CPF en el meconio. En estudios revisados se han encontrado resultados contradictorios. En unos no encuentran dicha relación ⁽¹³⁸⁾ y en otros más recientes se ha visto que las cifras mayores de CPF en el meconio están en relación con bajo peso al nacer ^(142,143).

La CPF aumentada en el tercer día de vida está reflejando el ambiente intrauterino, la inmadurez del intestino e incluso un posible daño hipóxico-isquémico de la mucosa intestinal. Hay artículos que incluso la relacionan con la puntuación de Apgar a los 5 minutos de vida ⁽¹⁴⁰⁾. El estudio del meconio, por lo tanto, nos estaría dando mucha información acerca del período intrauterino, así como de un posible sufrimiento que haya tenido lugar.

6.6.7.- Niveles de CPF y edad gestacional

No hemos encontrado diferencias significativas entre la edad gestacional y los niveles de CPF en nuestra muestra de pacientes coincidiendo con otros estudios revisados ^(138, 142), aunque también hay bibliografía donde sí han demostrado dicha relación ⁽¹⁴³⁾, sobre todo en la CPF del meconio ⁽¹⁴⁴⁾, debido a procesos de inmadurez del sistema inmune del prematuro con baja edad gestacional.

6.6.8.- Niveles de CPF y tipo de parto

En cuanto a la relación entre la CPF y la vía de parto, podemos decir que se han encontrado diferencias significativas entre el parto por vía vaginal y niveles más bajos de CPF a los 3 días de vida. Esto coincide con artículos revisados donde se observan cifras de CPF mayores en los partos por cesárea con respecto a los vaginales ⁽¹⁴⁵⁾. Esto podría justificarse puesto que se ha demostrado que la cesárea retrasa la colonización bacteriana normal del intestino del recién nacido, interrumpiendo el paso de bacterias propias de la microbiota vaginal materna, las cuales aportarían un beneficio mucho mayor al recién nacido prematuro, haciendo que sus cifras de CPF fuesen menores ⁽¹⁴⁵⁾. Mientras, otros estudios encuentran cifras de CPF más bajas en las cesáreas, con respecto a los partos vaginales ^(140, 141) con lo que los resultados son contradictorios en la bibliografía revisada.

A los 7 y 15 días esta diferencia se hace no significativa, como en varios de los artículos contrastados ^(138, 141, 144) en donde probablemente otro tipo de factores estarían influyendo más que la vía de parto.

En resumen:

El sexo, los antibióticos, el peso al nacimiento y la vía de parto son factores que se asocian estadísticamente en nuestro estudio con el cambio en la CPF. Se puede ver cómo los prematuros presentan al nacer valores de CPF mucho más elevadas que los adultos sin que tenga repercusión clínica para ellos, simplemente reflejan un proceso inflamatorio producto de la inmadurez del sistema inmune. A lo largo de los días este incremento va descendiendo, muchas veces propiciado por el tratamiento antibiótico al que se ven sometidos. Cuando la alimentación enteral con LM se hace más presente, vuelven a elevarse estas cifras de CPF, al igual que en la literatura revisada ⁽¹⁴¹⁾, aunque en pocos días deberían de volver a descender en ausencia de

patología, según los artículos revisados (132,135). Es difícil indicar un valor en que la CPF nos sirva de marcador de enfermedad intestinal en los niños prematuros porque hay mucha variabilidad interindividual y además dichos valores pueden estar influidos por múltiples factores, sin embargo, se siguen haciendo investigaciones para intentar encontrar la forma en la que este marcador nos pueda ayudar de forma precoz en trastornos gastrointestinales, muchas veces mortales, como la NEC.

6.7.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Estudiar el meconio de los recién nacidos permite obtener mucha información sobre cómo se desarrolla el microbioma intestinal humano durante los primeros días. Tanto los defensores de la teoría de que el meconio y el útero son estériles como los que defienden que el meconio refleja el entorno microbiano del útero puesto que a través de éste se va colonizando poco a poco el feto, teoría más aceptada recientemente, están de acuerdo en que estudiar el meconio, lo más precozmente posible, traerá más luz sobre cómo se va formando progresivamente el microbioma intestinal humano. A medida que pasan los días, el meconio puede ir colonizándose con nuevas bacterias propias del ambiente en el que se encuentra el recién nacido como las proporcionadas por la LM a través de la alimentación. Por lo tanto, cuanto más precoz sea el estudio del meconio, más información nos va a dar de la colonización de esos primeros momentos (152).

Con el paso de los días la diversidad microbiana va cambiando y podemos valorar cómo determinados factores, como el tipo de parto, tomar antibióticos prenatales o postnatales, el estrés u otros elementos, van a influir en la colonización del intestino del recién nacido prematuro.

6.7.1.- Biodiversidad de microbiota en heces y LM, en función de la vía de parto

Hemos analizado la biodiversidad de microbiota, mediante el análisis del índice de Shannon, en las muestras de heces según el tipo de parto; vaginal o cesárea. El modo de parto, según nuestros datos, no afecta a la biodiversidad, de forma significativa. Este resultado coincide con estudios revisados, donde tampoco encuentran dicha relación estadística, lo que podría apoyar la teoría de la colonización intrauterina (153).

No hemos obtenido una relación estadísticamente significativa entre parto vaginal y aumento de biodiversidad en heces. Quizás la baja carga bacteriana en este tipo de muestra, así como la escasa cantidad de muestra recogida generalmente, hace que sea imposible realizar una secuenciación de calidad de la misma para poder obtener resultados más concluyentes.

De todas formas, hemos apreciado una tendencia de mayor biodiversidad en las heces de los partos ocurridos por vía vaginal, con un índice de Shannon discretamente más elevado (1,26 a los 3 días y 1 a los 7 días) que los que tuvieron lugar por cesárea (1,21 a los 3 días y 0,71 a los 7 días). Esto también se ha visto en un metaanálisis donde varios estudios encuentran una menor diversidad en las heces de los niños nacidos por cesárea en los primeros 7 días, en comparación con los nacidos por vía vaginal (154).

Podemos ver cómo la biodiversidad va disminuyendo con el paso de los días. En el caso de las heces (1,26 a los 3 días, 1 a los 7 y 0,85 a los 15 días, en los partos vaginales). Esto puede ser debido a la rapidez con la que se coloniza el intestino del recién nacido, a expensas de microorganismos maternos y propios del ambiente en el que se encuentran. Este resultado coincide con estudios revisados donde nos hablan de una pérdida de diversidad desde los primeros días, que guarda relación con la adaptación de determinados microorganismos al tracto gastrointestinal del recién nacido (153, 155). La transmisión del microbioma pionero que tiene lugar en el momento del nacimiento no se mantiene durante el paso de los días en algunos

casos, puesto que se ve sometido a procesos de adaptación en el intestino y muchas veces determinados microorganismos desaparecen. Sin embargo, otros son los colonizadores iniciales del recién nacido y se mantienen en el tiempo adaptándose al medio, siendo los microorganismos de transmisión vertical procedentes de cepas maternas los que presentan una colonización más duradera en el intestino del niño ⁽¹⁵⁵⁾.

Hemos estudiado también la biodiversidad de la LM en función del tipo de parto y tampoco hemos encontrado diferencias significativas entre parto vaginal o cesárea, en ninguno de los 3 momentos estudiados. La diversidad microbiológica está por debajo de 1, lo que significa que hay poca diversidad de microorganismos en las muestras de nuestras madres, salvo en la LM del día 15 de las que tuvieron un parto vaginal, donde observamos un incremento de la biodiversidad (1,27).

Este resultado concuerda con estudios revisados, donde tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a biodiversidad en el calostro de madres que han tenido parto vaginal o cesárea ⁽¹⁵⁶⁾. Sin embargo, en dicho estudio se aprecia una tendencia de un mayor aumento de diversidad microbiológica en la LM cuando los partos son vaginales con respecto a las cesáreas. Este hito no lo hemos encontrado en nuestra muestra analizada de LM, hasta los 15 días. Nosotros hemos secuenciado un total de 22 muestras de LM en el día 3, sin embargo, el tamaño muestral comparativo es muy pequeño puesto que hay tan sólo 7 madres que tuvieron un parto vaginal con respecto a las 15 que fueron cesárea. Esto podría justificar que la diversidad en nuestra muestra de partos vaginales no es suficiente para compararlo con tantas cesáreas.

En la LM del día 7 y 15 tampoco se ha encontrado una relación significativa estadísticamente entre biodiversidad en LM y tipo de parto, siendo coincidente dicho resultado con otros estudios donde no se demuestra dicha relación, sino que es más dependiente de la etapa de la lactancia en la que nos encontremos ⁽¹⁵⁷⁾. La LM es un tejido vivo, dinámico, que va cambiando en función de las necesidades nutricionales del recién nacido, por lo tanto, la biodiversidad también irá cambiando y adaptándose a dichas necesidades ⁽¹⁵⁷⁾. Por ello, la diversidad es mayor en los primeros momentos (calostro) para ir disminuyendo con el tiempo, aunque esto nosotros no lo hayamos podido contrastar estadísticamente.

Hemos encontrado artículos donde la microbiota de la LM es mucho más diversa que en heces ⁽¹⁵⁸⁾, sin embargo, no lo hemos verificado en nuestras muestras, que presentan una mayor diversidad en meconio y heces que en la LM, salvo a los 15 días, donde ésta presenta una mayor biodiversidad.

Se ha comprobado también que la diversidad en LM va disminuyendo a lo largo del tiempo, debido al cambio de las necesidades nutricionales del recién nacido, al igual que ocurre en las heces del prematuro, como hemos visto. La diversidad de la microbiota intestinal del bebé depende también de otros factores no exclusivos de la LM, como el ambiente en el que se está desarrollando. No hemos podido apreciar dicha característica en nuestro estudio puesto que hemos analizado el período más inmediato de 15 días.

La LM es una fuente de microorganismos beneficiosos para el recién nacido desde el primer momento, conteniendo sustancias probióticas y sustratos prebióticos, además de ser rica en vitaminas, minerales, inmunoglobulinas y otras sustancias de gran relevancia para la salud del recién nacido. Así, poco a poco, el microbioma intestinal del niño se va enriqueciendo y va aumentando su biodiversidad dependiendo también de otros factores como la relación con el ambiente que lo rodea ⁽¹⁵⁸⁾.

En resumen:

Hemos visto cómo el hecho de nacer por vía vaginal o mediante una cesárea, va a condicionar la biodiversidad intestinal del niño desde el primer momento. No es lo mismo el paso por el canal del parto, que ya está preparado de forma natural para impregnar al bebé de determinados microorganismos, que ser extraído del útero materno en una cesárea, donde será colonizado por otro tipo de bacterias más características de la piel y del ambiente hospitalario.

Las heces de los niños que tuvieron un parto vaginal presentan una tendencia donde hay mayor biodiversidad que los nacidos por cesárea, aunque no lo hemos podido demostrar estadísticamente, probablemente debido al tamaño de la muestra. Además, esa biodiversidad va disminuyendo con el paso de los días, en probable relación con procesos de adaptación del microbioma intestinal del recién nacido.

En cuanto a la biodiversidad de la LM, no se han encontrado diferencias significativas estadísticamente entre parto vaginal y cesárea y hemos observado una baja diversidad de microorganismos en las muestras analizadas, en relación con otros estudios ⁽¹⁵⁸⁾, sin embargo, la LM es una fuente constante de microorganismos beneficiosos para el microbioma del recién nacido.

6.7.2.- Biodiversidad en LM y heces del recién nacido en relación con el estrés materno

Se ha visto que el estrés prenatal o postnatal puede influir en la microbiota intestinal infantil y además es probable que factores genéticos individuales vayan a modular dicha influencia al estrés. Un estrés prenatal elevado ocasionaría mayor cantidad de Proteobacterias, que contienen en su mayoría bacterias potencialmente patógenas como *Escherichia*, *Serratia* o *Enterobacter*, y menos bacterias beneficiosas como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* en el intestino del recién nacido ⁽¹⁵⁹⁾.

La LM es uno de los fluidos corporales más ricos en moléculas de ARN circulantes (miARN) que presentan potentes efectos inmunorreguladores, influyendo en el sistema inmune del recién nacido. Cuando el parto es prematuro se observa que hay determinados miARN con funciones adaptativas a ese niño prematuro en función de las necesidades de ese momento, a diferencia de los niños a término, y además la extrusión de los miARN a la LM puede verse alterada ⁽¹⁶⁰⁾. Por lo tanto, alteraciones en la microbiota de la LM o intestinal de la madre puede dar lugar a alteraciones en la transmisión de moléculas tan importantes como los miARN procedentes de la madre al recién nacido, a través de la LM, pudiendo causar alteraciones en la inmunidad del prematuro.

Nosotros comparamos la diversidad de microorganismos en la LM en relación con el estrés en la madre y no hemos encontrado diferencias significativas estadísticamente entre ambas variables, sin embargo, se aprecia una tendencia en donde a medida que el estrés es más elevado, la biodiversidad de la LM es menor, en los 3 momentos estudiados.

Hemos revisado estudios donde se demuestra que el estrés influye de forma estadísticamente significativa en la diversidad de especies en la LM. Las madres más estresadas presentan un índice de Shannon más bajo (menos diversidad de especies) en comparación con las que no lo están, a partir de la semana 12 de vida ⁽¹⁶¹⁾, no de forma tan precoz como en nuestro estudio. Nosotros apreciamos una tendencia similar a estos resultados, desde el día 3 hasta el 15, con lo que podemos asumir que, si siguiésemos con el estudio durante más tiempo, este cambio en la diversidad se haría más marcado a medida que van pasando los días, hasta hacerse significativo.

La microbiota intestinal materna puede verse alterada a causa del estrés y esto puede causar a su vez una microbiota de la LM alterada. Este hito ocurre a través de dos vías; el eje microbiota-intestino-cerebro, en su relación bidireccional, o a través del eje hipotálamo-pituitario-

suprarrenal, donde los niveles de cortisol elevados, mediante diferentes mecanismos, pueden alterar la microbiota intestinal materna y a su vez la microbiota de la LM a través de la vía entero-mamaria ⁽¹⁶¹⁾.

En nuestro estudio, analizamos también las heces de los recién nacidos. Hemos visto que tampoco se ven modificadas estadísticamente de forma significativa en cuanto a diversidad a causa del estrés en la madre, sin embargo, en el día 15 vemos una tendencia en donde a mayor estrés materno menor biodiversidad en las heces de los prematuros (1,13 ante estrés bajo y 0,91 cuando el estrés es alto). Esto podría explicarse porque el estrés materno puede causar alteraciones a nivel de la microbiota materna y éstas son transmitidas a través de la LM al recién nacido, por las diferentes vías, como hemos comentado. Si hubiésemos prolongado el estudio, es probable que hubiéramos podido apreciar de una forma significativa cómo la diversidad desciende ante un estrés elevado.

Nosotros hemos analizado el estrés postnatal con una escala de estrés validada, aunque tiene un enfoque subjetivo. Otros estudios, como el de Zijlmans, han valorado el estrés en la madre mediante pruebas más objetivas como la medición de cortisol en saliva y han visto que las concentraciones elevadas de cortisol durante el período prenatal se relacionan con la cantidad de especies encontradas en la microbiota intestinal de los recién nacidos, de forma que predominan las Proteobacterias y disminuyen las bacterias lácticas y Bifidobacterias ⁽¹⁵⁹⁾.

En otros estudios revisados se ha encontrado que una respuesta baja al estrés en niños de 2,5 meses de edad, después de aplicarles un estresor, no se asocia con una microbiota fecal diversa ⁽¹⁶²⁾, sugiriendo que la composición de la microbiota intestinal está más asociada a otros factores de tipo ambiental, tipo de parto o número de hermanos. Sin embargo, en otra investigación, Rosin demuestra que una elevada diversidad a la edad de un mes está relacionada con mayores niveles de estrés, en relación con cifras más elevadas de cortisol, debido, probablemente, a que la activación del eje hipotálamo pituitario adrenal puede alterar la motilidad intestinal y secreción de ácidos biliares, causando alteraciones de la microbiota ⁽¹⁶³⁾.

Nosotros, a los 3 y 7 días, hemos visto que, ante un estrés elevado en la madre, la diversidad microbiana en heces es mayor, coincidiendo con el estudio de Rosin, sin embargo, esta relación tampoco es significativa estadísticamente. Esto puede explicarse porque ante un estado de estrés se puede producir una disbiosis intestinal donde proliferan otras bacterias que no son propias de una microbiota normal, de ahí que la diversidad aumente. En un estudio reciente, Weiss ha demostrado que un elevado estrés prenatal en el último trimestre se asocia a una mayor diversidad en las heces de los recién nacidos al mes de edad, favoreciendo la aparición de bacterias tan positivas como los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Weiss concluye que la exposición a un estrés leve/moderado en el tercer trimestre puede preparar mejor al recién nacido para su vida extrauterina ⁽¹⁶⁴⁾.

Como vemos, la literatura nos muestra resultados contradictorios y nosotros también lo hemos podido evidenciar en nuestro estudio, en donde durante los primeros 7 días un estrés elevado causa un aumento de biodiversidad, coincidiendo con el estudio de Weiss, aunque nosotros hayamos estudiado el estrés de forma postnatal, mientras que, a los 15 días, el aumento de estrés marca una tendencia a la disminución de la diversidad.

Se ha demostrado que la diversidad intestinal en los niños prematuros es más baja en comparación con los niños a término y que esta va aumentando con la edad, aunque dicho aumento no se mantenga estable con el paso del tiempo. Se ha visto mayor diversidad en niños prematuros al mes de vida que a los 3,5 años, debido probablemente a la inestabilidad que tienen determinados microorganismos y, además, la madurez que debería alcanzar la microbiota intestinal de los niños prematuros, se retrasa hasta 12 meses con respecto a los niños a término. Toubon ha podido demostrar también que a los 3,5 años la microbiota intestinal de niños

prematurados es menos diversa y tiene una composición diferente que los niños a término ⁽¹⁶⁵⁾. Nosotros sólo hemos estudiado las muestras por un corto período de tiempo de 15 días, pero podría tenerse esto en cuenta para futuros estudios y valorar la evolución de la microbiota intestinal en los prematurados en comparación con los a término.

En resumen:

El estudio de la biodiversidad en la LM y las heces debería de ser analizado en un mayor período de tiempo para poder apreciar los múltiples cambios que se van produciendo con el paso de los días. Quizá esta sea una de las limitaciones de nuestro estudio, puesto que se analiza la diversidad de especies en un período corto de tiempo, cuando todavía se está estableciendo y estabilizando la microbiota intestinal del recién nacido, teniendo en cuenta, además, que la alimentación enteral comienza en las primeras 24h en un 56,7% de los casos y no se alcanza la alimentación enteral completa hasta los 15 días, en un 92,3% de los casos.

Lo que sí podemos afirmar, es que todavía se necesita más investigación, con muestras de población más grandes, para determinar de qué forma influye el estrés en la diversidad de especies, tanto en LM como en heces de los recién nacidos prematurados. Hay estudios que ofrecen resultados contradictorios, como hemos visto, aunque el componente ambiental e individual juega un papel muy relevante en todo esto. El control de todas las variables que pueden influir en la microbiota de la LM (zona geográfica donde se reside, dieta materna, contacto con animales, etc) como de heces de los prematurados (tipo de parto, antibióticos, ambiente hospitalario, etc), es muy complejo y requiere de estudios muy exhaustivos.

6.7.3.- Filos más frecuentes en LM y heces

Hemos estudiado los filos más destacados tanto en las heces como en la LM, y cómo han variado durante el período de estudio.

En las muestras de LM que hemos analizado predomina el filo de los Firmicutes en los 3 momentos del estudio. Se aprecia una tendencia donde los Firmicutes disminuyen y van aumentando las Proteobacterias, desde el día 3 hasta el día 15. Este hallazgo coincide con otros estudios en donde el filo dominante en LM está representado por los Firmicutes seguido de las Proteobacterias, observándose además una disminución de los primeros y un aumento de los segundos, con el paso de los días ⁽¹⁶⁶⁾.

En cuanto a las heces, hemos observado una mayor proporción de Proteobacterias en los 3 momentos estudiados, seguido de los Firmicutes, al igual que en otros artículos revisados ⁽¹⁶⁷⁾. A los 7 días es cuando la diferencia entre ambos se hace menor y aparecen además otros filos, aunque en menor medida, como las Actinobacterias y los Bacteroidetes.

En la literatura revisada, normalmente, se hace una diferencia entre el tipo de parto y el filo predominante en heces y LM, puesto que se ha visto que la forma en que nacemos va a condicionar el tipo de bacterias pioneras que habitarán en nuestro intestino e incluso puede influir en la composición microbiana de la LM ^(153, 154).

A nivel general, podemos decir que las muestras de heces de nuestro estudio están dominadas por las Proteobacterias y a medida que van pasando los días se observan otros filos que irán enriqueciendo la microbiota intestinal del recién nacido, mientras que las muestras de LM presentan una mayor proporción de Firmicutes.

6.7.4.- Filos más frecuentes en LM/heces en relación con el tipo de parto

No hemos encontrado diferencias significativas estadísticamente entre filo y tipo de parto. Se han verificado cuáles son los filos que más predominan en nuestra muestra de LM y heces, a lo largo de los días, en función de la vía de parto.

Encontramos que, las heces de los niños prematuros cuyo parto fue por vía vaginal, en el día 3, tenían Proteobacterias y Firmicutes al 50%, si bien estos resultados no son extrapolables por el pequeño tamaño muestral de meconio en ese día. A los 7 y 15 días predominan las Proteobacterias y a partir del día 7 comienzan a aparecer otros filos como los Bacteroidetes. En el parto mediante cesárea, las Proteobacterias dominan de forma más acusada sobre los Firmicutes, en los 3 momentos del estudio y aparecen las Actinobacterias a partir del día 7, pero no Bacteroidetes.

En estudios revisados sobre meconio, se han encontrado resultados similares, donde las Proteobacterias son el filo predominante, tanto en los partos vaginales como en las cesáreas, seguido de los Firmicutes ⁽¹⁵³⁾. Las Proteobacterias, a pesar de contener bacterias características de la microbiota intestinal normal, son un grupo de bacterias que incluyen una gran cantidad de agentes potencialmente patógenos y su sobreproducción suele estar asociada con procesos inflamatorios donde se puede producir una disbiosis intestinal y consecuentemente una enfermedad ⁽⁷⁵⁾. Se ha visto que se produce mayor abundancia de Proteobacterias en enfermedades intestinales y también extraintestinales, como procesos asmáticos que tienen que ver con la microbiota pulmonar o enfermedades cardiovasculares ⁽⁷⁵⁾. Sin embargo, en otros artículos nos hablan de las Actinobacterias como el filo predominante en recién nacidos, después de la primera semana de vida (dominado por *Bifidobacterium*) ⁽¹⁵⁴⁾, lo que no hemos visto en nuestros resultados.

Dentro del filo Firmicutes, se encuentran bacterias muy beneficiosas para el recién nacido que provienen en gran medida de la transmisión vertical de la madre, sobre todo en los partos por vía vaginal donde abundan los *Lactobacillus*. También pertenecen al filo de los Firmicutes los *Clostridium*, que son microorganismos patógenos y más frecuentes en las cesáreas ^(153, 154), aunque no lo hayamos podido ver en nuestra muestra. Con el tiempo, los Firmicutes se convertirán en uno de los dominantes en la microbiota intestinal, durante la etapa adulta.

El filo de los Bacteroidetes, que será otro de los dominantes en la etapa adulta, se comienza a apreciar en las muestras de heces de nuestros niños a partir del séptimo día en los partos que tienen lugar por vía vaginal y también contiene bacterias muy beneficiosas para la salud del recién nacido, como los *Bacteroides*. Sin embargo, no aparecen en las heces de los niños que nacieron por cesárea. Esto también se aprecia en artículos revisados donde sólo aparecen en los partos vaginales ^(153, 154, 168) puesto que se adquieren por la propia exposición a la microbiota vaginal materna, explicando así que no aparezcan en las cesáreas. La ausencia de este filo en las cesáreas puede relacionarse con un mayor riesgo de colonización intestinal por gérmenes oportunistas, o el retraso en la colonización saludable impidiendo que los azúcares complejos se metabolicen de forma correcta, como sugiere la literatura ⁽¹⁶⁹⁾. Además, los *Bacteroides* son bacterias fundamentales en la modulación del sistema inmune del recién nacido e incluso son competidoras de microorganismos patógenos ⁽¹⁶⁹⁾.

En cuanto a la LM, hemos encontrado que predomina el filo de los Firmicutes seguido de las Proteobacterias, lo que también se ha visto en la literatura, independientemente de la vía de parto. Además, con el tiempo podemos ver cómo se van modificando los Firmicutes y las Proteobacterias, en función de la vía de parto. Así, en el parto vaginal, los Firmicutes aumentan y las Proteobacterias disminuyen con el paso de los días, sin embargo, en las cesáreas, el proceso se invierte. La diferencia entre ambos filos se haría más marcada a medida que transcurren las semanas ⁽¹⁶¹⁾, aunque nosotros sólo hemos estudiado las muestras durante 15 días y no se ha

podido valorar dicha diferencia en el tiempo. Sin embargo, en otros artículos revisados, se ha visto que en la primera semana dominan las Proteobacterias sobre los Firmicutes, pero a partir de las siguientes semanas pasan los Firmicutes a ser el filo dominante ⁽¹⁵⁷⁾. La microbiota encontrada en la LM puede proceder del bacterioma del tejido mamario, como se ha podido confirmar por muestras de cultivo en algún estudio, cuyo origen proviene de la vía entero-mamaria y del flujo retrógrado que tiene lugar cuando hay un intercambio de bacterias al succionar el niño directamente del pecho ⁽¹⁷⁰⁾.

Hay estudios que han conseguido demostrar las diferencias entre la microbiota de calostro dependiendo de la vía de parto, donde se observaba mayor cantidad de microorganismos ambientales en la LM de las cesáreas con respecto a los partos vaginales ⁽¹⁵⁶⁾ y otros han visto que hay menor cantidad de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en la LM de las cesáreas con respecto a los partos vaginales ⁽¹⁷⁰⁾. Sin embargo, en nuestro estudio no se han observado diferencias significativas en la microbiota de LM obtenida de madres con parto vaginal (n=7) o cesárea (n=15), este resultado también se ha observado en otros estudios donde no consiguen demostrar la relación entre los cambios en la microbiota de la LM y el modo de parto ⁽¹⁵⁷⁾.

Podemos apreciar que el patrón de colonización intestinal que se sigue en los partos vaginales y los que son por cesárea, siguen un curso diferente. Si hubiéramos seguido con el estudio durante un período de tiempo más prolongado, podríamos haber apreciado con mayor nitidez cómo se va afianzando la microbiota intestinal del recién nacido prematuro con unos microorganismos en detrimento de otros.

Por lo que hemos visto en nuestro estudio y a raíz de investigaciones anteriores, el microbioma de las heces en los niños prematuros se caracteriza por un dominio de 2 filos principales, Proteobacterias y Firmicutes. La colonización de microorganismos va teniendo lugar con el tiempo y es dependiente del tipo de parto. Si el parto es vaginal, los microorganismos de la vagina de la madre (fundamentalmente *Lactobacillus*) van a ser los principales colonizadores y aparecerán filos tan relevantes como los Bacteroidetes, mientras que si se produce una cesárea se transmitirá una microbiota más característica de la piel materna (como *Staphylococcus*) y del ambiente hospitalario, retrasándose la aparición de filos tan importantes como los Bacteroidetes. En los partos por cesárea hay una alteración de la microbiota, no encontrándose bacterias como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides* hasta pasado un tiempo, hecho que no ocurre si el parto es por vía vaginal ⁽¹⁷¹⁾.

Por otro lado, el microbioma de la LM, sigue un patrón muy individualizado sobre el que influyen factores tales como la zona geográfica donde habitamos, el estilo de vida, la alimentación, el IMC, la etapa de la lactancia en la que nos encontremos, etc ⁽¹⁶⁶⁾. La microbiota intestinal materna, como hemos visto, es transferida al lactante a través de la vía entero-mamaria y esto significa que la alimentación, hábitos tóxicos de la madre, antibióticos o cualquier otro factor que pueda influir en su microbiota, va a transmitirse a través de la LM. Además, el hecho de tomar del pecho directamente implica que el lactante esté en contacto con la microbiota de la piel materna que también será transmitida al intestino. Por lo tanto, la LM está surtiendo al lactante de microorganismos de diferentes zonas de la madre, que serán fundamentales para su sistema inmune y además aporta el sustrato para que dichos microbios puedan desarrollarse (como los HMOs), con lo que juega un papel fundamental e insustituible en la colonización de la microbiota del recién nacido.

Se han realizado estudios donde se administran probióticos a la madre durante el embarazo, mezclando diferentes cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y se ha visto que se produce un incremento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en la LM, lo que será muy beneficioso para la salud del lactante puesto que estas bacterias tan beneficiosas serán transmitidas a través de la

leche. Este efecto, además, se ha visto más exacerbado en los niños que habían nacido por vía vaginal ⁽¹⁷²⁾.

6.7.5.- Orden más frecuente en LM/heces relacionado con la vía de parto

Observamos en nuestros datos de meconio a los 3 días que hay un mayor porcentaje de Enterobacteriales, Clostridiales, Lactobacillales y Bifidobacteriales en los partos por vía vaginal con respecto a las cesáreas. Se aprecia una mayor identificación de bacterias de esos grupos en los partos vaginales con respecto a las cesáreas, donde apenas aparecen Bifidobacteriales ni Lactobacillales. En un estudio de meconio en niños alemanes, se ha visto que dependiendo del día que se expulse el meconio va a tener más o menos microorganismos de forma que tiene una mayor carga si tarda más días en ser expulsado ⁽¹⁵²⁾. Nosotros hemos recogido el meconio expulsado a día 3 con independencia de si era o no la primera deposición. A los 7 días de vida, observamos una caída brusca en Clostridiales y Lactobacillales, mientras que los Bifidobacteriales desaparecen, sin embargo, los Enterobacteriales se mantienen en valores similares, siendo todavía más abundantes en los partos vaginales. Se ve una tendencia de aumento de Clostridiales en las cesáreas con respecto a los partos vaginales, como sugiere la literatura ⁽¹⁵⁴⁾, aunque estos cambios no son estadísticamente significativos en nuestro estudio.

A los 15 días, se aprecia una tendencia al aumento de Clostridiales en los partos vaginales y siguen sin aparecer los Bifidobacteriales tanto en partos vaginales como en las cesáreas. Sería interesante haber seguido con el estudio durante un período de tiempo mayor para ver cómo se va estabilizando la microbiota de unos microorganismos con respecto a otros con el paso de los días.

Estos cambios podrían explicarse porque la microbiota intestinal del prematuro, está todavía estabilizándose y van predominando unos microorganismos con respecto a otros en función de diversos factores, como la alimentación que reciben, la administración de antibióticos, la presencia o no de infecciones, el tipo de parto, etc.

Con respecto a la evolución del orden de microorganismos de la LM, se observan más Enterobacteriales en la leche de las madres que se sometieron a una cesárea a los 7 y 15 días. No hemos podido demostrar estadísticamente que la vía de parto influye en la modulación de la microbiota de la LM.

6.7.6.- Valoración del filo en la LM y heces en función del estrés materno

Hemos comparado las diferencias de filo en la LM y heces del recién nacido con el estrés medido en la madre y no hemos encontrado diferencias significativas estadísticamente, pero sí hemos visto tendencias donde unos filos predominan con respecto a otros en función del estrés de la madre con el paso de los días, al igual que ocurre con la biodiversidad y el estrés, comentado más arriba.

En nuestra muestra de heces, ante un estrés elevado en la madre a los 3 días el porcentaje de Firmicutes es mayor que de Proteobacterias, pero del día 3 al 15 se ve un aumento de Proteobacterias (33,3%, 40% y 70%) con respecto a los Firmicutes (66,7%, 40%, 20%) de forma progresiva. Esto también lo hemos observado en la literatura revisada, donde se demuestra que el estrés se relaciona significativamente con mayor número de Proteobacterias ⁽¹⁵⁹⁾.

Nosotros hemos medido el estrés en la madre a través de una escala (PSS: NICU) que no deja de ser una herramienta subjetiva. La primera medición se realiza en el día 3 de vida de su hijo, no teniendo en cuenta el estrés que pudo haber tenido o no en los días previos, lo que puede justificar el resultado de un mayor número de Firmicutes en el día 3.

En cuanto a la relación entre estrés en la madre y filos en LM, podemos ver que ante un estrés elevado en la madre siguen predominando los Firmicutes sobre las Proteobacterias, en los 3 momentos del estudio, pero observamos una tendencia en la que a medida que pasan los días, esta diferencia cada vez es menor y los Firmicutes van disminuyendo con el tiempo (87,5%, 62,5% y 55,6%) a medida que van aumentando las Proteobacterias (12,5%, 37,5% y 44,4%). Sin embargo, cuando el estrés en la madre es bajo, predominan nuevamente los Firmicutes sobre las Proteobacterias, pero con el paso de los días esta diferencia se hace mayor y los Firmicutes van aumentando (58,3%, 83,3% y 73,3%) en detrimento de las Proteobacterias, progresivamente.

Nuestros resultados difieren de algún estudio hallado en la literatura, donde se demuestra que las madres con bajo estrés tienen menos Firmicutes en la LM y más Proteobacterias ⁽¹⁶¹⁾. Nosotros no hemos podido demostrarlo de forma estadística pero sí hemos visto tendencias que son contrarias a dicho estudio.

Nuestra investigación ha recogido datos de LM hasta el día 15 y en el estudio de Browne ⁽¹⁶¹⁾ las muestras de LM son recogidas hasta las 12 semanas postparto, donde ya se puede ver una microbiota más estabilizada que en nuestro caso. Nosotros hemos visto que a día 15, ante un elevado estrés, la diferencia entre Firmicutes (55,6%) y Proteobacterias (44,4%) se hace menor. Si hubiésemos seguido la investigación en el tiempo, probablemente hubiésemos visto que las Proteobacterias se igualarían a los Firmicutes o incluso podrían convertirse en el filo dominante ante un estrés elevado.

En resumen:

El estrés materno puede influir en la microbiota intestinal del recién nacido, puesto que ante un elevado estrés hemos observado una tendencia a un mayor porcentaje de Proteobacterias, entre los que se incluyen microorganismos potencialmente patógenos, con respecto a los Firmicutes, entre los que se encuentran bacterias más beneficiosas, como los Lactobacillus.

De igual forma, hemos visto que el estrés materno puede alterar la microbiota de la LM, donde apreciamos una tendencia a la disminución de Proteobacterias y al aumento en los Firmicutes cuando el estrés es bajo y el efecto contrario cuando el estrés es alto.

6.7.7.- Filo predominante en heces/LM en relación con la presencia de antibióticos

Hemos comparado los filos bacterianos en LM y heces en relación a la administración o no de antibióticos prenatales y postnatales, y no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas, aunque sí se ha observado una composición diferente en la microbiota tanto intestinal como en la de la LM.

6.7.7.1.- Heces y antibióticos prenatales

El hecho de no recibir antibióticos prenatales implica que hay un mayor porcentaje de Proteobacterias y menor de Firmicutes durante los 15 días del estudio de nuestra muestra, resultados que son coincidentes con los de la literatura revisada ⁽¹⁷³⁾. Nosotros hemos apreciado también una disminución de Firmicutes mientras que, en el artículo de revisión de Lee, nos hablan de un aumento. Este dato es importante puesto que se ha visto que el aumento de Proteobacterias y la disminución de Firmicutes, está relacionada con un mayor riesgo de NEC en los recién nacidos prematuros ⁽¹⁷³⁾, aunque el desarrollo de la enfermedad depende de muchos más factores.

Sin embargo, encontramos resultados contradictorios puesto que en otro documento revisado se observa que hay un mayor porcentaje de Proteobacterias y menos Firmicutes, en el grupo expuesto a antibióticos prenatales con respecto al grupo no expuesto, en el día 7 y 14 de estudio (174).

En nuestros datos también vemos que aparecen los Bacteroidetes a los 7 días en aquellos prematuros cuyas madres no han recibido antibióticos prenatales, manteniéndose a los 15 días, sin embargo, en los niños expuestos a antibióticos prenatales no aparece dicho filo. Este resultado concuerda con lo hallado en la literatura revisada (174).

Hay que tener en cuenta que todos los niños cuyas madres recibieron pauta antibiótica prenatal también recibieron antibióticos postnatales desde su nacimiento, excepto en un caso. Por lo tanto, el efecto sobre la microbiota a día 3, 7 y 15, está bajo la influencia tanto de los antibióticos prenatales como de los postnatales, con lo que es imposible saber si la modificación de la microbiota se debe a los antibióticos administrados de forma prenatal o si está más influida por los antibióticos postnatales. La mediana de tratamiento con antibióticos postnatales es de 7 días, con lo que se necesitaría una recogida de muestra de heces más allá de 15 días para ver cómo se va modificando la microbiota con el paso de un tiempo más prolongado.

El efecto de los antibióticos prenatales cambia la microbiota vaginal, disminuyendo el número de *Lactobacillus*, bacterias probióticas que aumentan durante el embarazo de forma fisiológica para garantizar el paso de éstas a través de la vagina e impregnar así el recién nacido. Por lo tanto, se debe de tener en cuenta que el uso de antibióticos prenatales cambiará la microbiota intestinal del recién nacido, sobre todo en los nacidos por vía vaginal, retrasándose también la colonización por *Bifodobacterium* (173, 174).

6.7.7.2.- Heces y antibióticos postnatales

La administración de antibióticos postnatales al niño prematuro también altera la composición de su microbiota. Observamos una tendencia donde hay menos Proteobacterias y más Firmicutes en los niños que recibieron antibióticos después del nacimiento con respecto a los que no los recibieron, siguiendo la misma evolución que en los antibióticos prenatales. En el análisis de meconio del día 3 hay un sólo paciente que no recibió pauta antibiótica y presenta una carga bacteriana compuesta tan sólo por Proteobacterias.

A los 7 días aparecen las Actinobacterias y Bacteroidetes en aquellos que recibieron antibióticos y además los Bacteroidetes se mantienen también a los 15 días, a diferencia de lo que ocurría en la administración de antibióticos prenatales. Sin embargo, las Actinobacterias aparecen en los 15 días entre los que no tomaron antibióticos. Podemos decir que tanto las Actinobacterias como los Bacteroidetes, no dependen exclusivamente de la administración de antibióticos pre o postnatales, sino también de otros factores.

El filo de las Proteobacterias contiene una mayor cantidad de microorganismos potencialmente patógenos, como hemos comentado, y suele ser un marcador de disbiosis donde predomina la inestabilidad microbiana, relacionándose más con estados de enfermedad. Por el contrario, el filo de los Firmicutes contiene mayor cantidad de microorganismos menos dañinos y más beneficiosos, entre los que se encuentran los *Lactobacillus* (174).

De todas formas, se necesitaría una mayor muestra de pacientes para poder establecer una mayor relación estadística. A pesar de esto, podemos valorar las tendencias entre el filo y los antibióticos, observándose diferencias de microorganismos ante la presencia y ausencia de estos.

6.7.7.3.- LM y antibióticos prenatales

Los microorganismos transferidos a través de la LM favorecen la instauración de una microbiota intestinal del recién nacido que irá aumentando con el tiempo en diversidad de especies, convirtiéndose poco a poco en una microbiota estable. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la diversidad de especies encontradas en niños prematuros es menor en comparación con recién nacidos a término, siendo además muy variable a nivel individual ^(165, 175).

La administración de antibióticos prenatales puede alterar la microbiota de la LM y ésta se transferirá alterada al recién nacido, provocando menos beneficios de los que cabría esperar y arrastrando además moléculas de antibióticos que irán a parar al intestino del recién nacido. Observamos en nuestra muestra que predominan los Firmicutes, independientemente de que las madres recibieran antibióticos prenatales o no, sin tener significación estadística entre las variables.

Vemos que el hecho de tomar antibióticos prenatales hace que los Firmicutes vayan aumentando con los días (57,14%, 62,5% y 75%) a medida que las Proteobacterias van disminuyendo (42,85%, 37,5% y 25%), en contraposición de lo que ocurre si la madre no ha tomado antibióticos, donde los Firmicutes disminuyen con el paso de los días (76,9%, 71,4% y 64,7%) y las Proteobacterias aumentan (23,07%, 28,57% y 35,29%). Por lo tanto, podemos decir que hemos visto una tendencia en la que los antibióticos prenatales van a influir en la microbiota de la LM de nuestra muestra, aunque no se haya demostrado de forma estadística.

Resultados similares al nuestro se han encontrado en un estudio reciente donde los Firmicutes fueron el filo más prevalente en LM, con independencia de si tomaban o no antibióticos prenatales, aunque en este estudio sólo se recogieron muestras de LM en los primeros días de nacimiento del bebé y a los 6 meses ⁽¹⁷⁶⁾, no comparándose la leche a lo largo de los días, como en nuestro caso. Según el estudio de C. Ji, los tratamientos con antibióticos podrían alterar la comunidad de bacterias en la LM, pudiendo transferirse estas alteraciones al intestino del recién nacido, incluso genes de resistencia a los antibióticos, lo que sería una huella importante y duradera para el resto de la vida del recién nacido. La resistencia a los antibióticos es hoy en día un problema emergente en la medicina debido a la dificultad a la hora de tratar infecciones causadas por bacterias multirresistentes que, por otra parte, son cada vez más frecuentes. El tratamiento antibiótico prenatal, en general, y en particular con antimicrobianos como los betalactámicos del grupo de las cefalosporinas, da lugar a una selección de cepas resistentes a los antibióticos en la microbiota materna. Pero lo que todavía es más preocupante es la potencial transferencia de genes de resistencia bacteriana a la microbiota del neonato ⁽¹⁷⁶⁾.

En el estudio de C. Ji, pudieron comprobar que los lactantes al cabo de 6 meses recuperaron parcialmente su microbiota, sin embargo, vieron que los genes de resistencia a los antibióticos aumentaron, dejando patente la huella que permanecerá en su microbiota intestinal ⁽¹⁷⁶⁾.

En otros estudios, se ha visto que los antibióticos prenatales/perinatales tienen también una repercusión en la microbiota de la LM, retrasando la aparición de microorganismos tan beneficiosos como los *Bifidobacterium* y los *Lactobacillus* ^(170, 172, 177).

6.7.8.- Biodiversidad en LM/heces y antibióticos prenatales y postnatales

Los datos de nuestro estudio no han mostrado diferencias significativas entre biodiversidad en LM y el tratamiento con antibióticos prenatales, al igual que en el estudio de C. Ji ⁽¹⁷⁶⁾.

Sin embargo, hemos observado una tendencia en donde la biodiversidad en LM aumenta en las madres que recibieron antibióticos prenatales, sobre todo en el día 3 (1,26 frente a 0,74) y en el día 15 (1,31 frente a 0,94), lo que nos indica que los antibióticos prenatales podrían estar influyendo sobre la microbiota de la LM. No hemos registrado el tipo de antibióticos recibidos

por la madre ni el total de días administrados, con lo que deberíamos tener cautela a la hora de interpretar estos resultados.

En la línea de esta tendencia en cuanto a la biodiversidad en la LM, Hermansson observa en muestras de LM recogidas al mes del parto, en madres que recibieron antibióticos prenatales e intraparto, una mayor diversidad en su leche en comparación con las que no los recibieron, demostrando que los antibióticos prenatales/intraparto están alterando la composición de la microbiota de la LM y su diversidad ⁽¹⁷⁸⁾. Si hubiéramos continuado con el estudio durante más tiempo y hubiésemos valorado otros factores como tipos y momento de administración de antibióticos (prenatal o intraparto) y duración del tratamiento, podríamos haber estudiado cuánto tiempo se mantiene ese aumento de la biodiversidad bacteriana de la LM.

En cuanto a la diversidad de especies en las heces de los prematuros, tampoco es significativa su relación con el tratamiento de antibióticos prenatales o postnatales, en nuestra muestra. Esto concuerda con estudios revisados que han tenido resultados similares a los nuestros, concluyendo que el efecto de los antibióticos prenatales o postnatales no tiene mucha influencia sobre la biodiversidad de especies en una fase temprana ⁽¹⁷⁴⁾, aunque pueden dejar una marca profunda en la microbiota del recién nacido al transferirse genes de resistencia a los antibióticos, como han demostrado en el estudio de C. Ji ⁽¹⁷⁶⁾.

Sin embargo, nosotros hemos visto algunas tendencias que hubieran podido ratificarse con mayor claridad si hubiésemos seguido con el estudio durante un tiempo más prolongado. Se observa que hay una mayor diversidad en heces ante la presencia de antibióticos prenatales, al igual que ocurría con la LM, en los 3 momentos del estudio (1,74 frente a 1, en el meconio de 3 días; 1,35 frente a 0,71 a los 7 días y 1,08 frente a 0,97 a los 15 días). Esto podría justificarse porque los antibióticos prenatales pueden generar una alteración de la microbiota materna, causando un estado de disbiosis, haciendo que se encuentren un mayor número de bacterias diferentes que cubren el nicho de la microbiota normal.

Por otro lado, apreciamos en nuestros datos el efecto contrario cuando se trata de antibióticos postnatales, puesto que podemos ver una tendencia en la que la diversidad en heces es menor ante la presencia de antibióticos postnatales en comparación con los que no los recibieron, en los 3 momentos del estudio (0,76 frente a 0,87 a los 7 días y 0,97 frente a 1,17 a los 15 días). Esto se corresponde con la literatura revisada, donde el índice de Shannon es menor ante la administración de antibióticos postnatales ⁽¹⁷³⁾. Los antibióticos atacan a determinadas bacterias patógenas para restaurar la eubiosis y finalizar con el estado de enfermedad, pero también tienen el inconveniente de que el número de bacterias beneficiosas se ven reducidas por este efecto, como los *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* ⁽¹⁷⁴⁾. Por ello, hoy en día sabemos que el uso de probióticos durante el tratamiento con antibióticos debe ir de la mano para evitar este temible efecto adverso, aunque en prematuros es una práctica controvertida y poco habitual.

Por lo tanto, se producen resultados no uniformes pues en algunos artículos se demuestra que los antibióticos alteran la diversidad y en otros apenas tiene relevancia dicha relación. Lo que está claro es que la microbiota intestinal va recuperándose con el tiempo una vez cesa el tratamiento con antibióticos, pudiendo permanecer los genes de resistencia a los antibióticos de una forma más permanente, suponiendo un problema. Lo que apreciamos en nuestro estudio es como a medida que pasan los días la biodiversidad va discretamente en aumento, como se recoge en la literatura, sin embargo, su mayor incremento es a partir de la tercera semana de vida, no pudiendo valorar este efecto en un tiempo más prolongado ^(173, 176).

6.7.9.- Taxones a nivel de orden en la LM cuando el estrés es alto y bajo

Se han correlacionado las variables estrés (alto y bajo) y el orden taxonómico de las bacterias de la microbiota de la LM. Hemos encontrado una relación estadísticamente

significativa a los 15 días, donde ante un estrés elevado hay una mayor presencia de Enterobacteriales. El taxón de Enterobacteriales está formado por bacterias de la microbiota normal de las heces, siendo el más frecuente el *Escherichia coli*, aunque también están compuestos por un gran número de bacterias potencialmente patogénicas.

Por lo tanto, elevados niveles de estrés pueden modificar la microbiota de la LM a los 15 días, aumentando el porcentaje de Enterobacteriales.

Con respecto a los Lactobacillales, que entre sus especies hay algunas muy beneficiosas para la salud, vemos cómo están menos presentes cuando el estrés es elevado (0,59% en estrés alto frente a 0,64% en estrés bajo a los 7 días y 0,62% frente a 0,75% a los 15 días), aunque esta relación no se manifieste estadísticamente significativa.

Los Bifidobacteriales están ausentes o son indetectables en nuestras muestras de LM, durante los 15 días, posiblemente por la limitación técnica que conlleva un menor porcentaje de secuencias identificadas a distintos niveles taxonómicos.

No hemos encontrado mucho soporte bibliográfico que nos informe de cómo se modifica el microbioma de la LM de madres de niños prematuros en condiciones de estrés materno, a nivel de orden. La mayoría de los artículos revisados analizan la microbiota a nivel de filo y género, sin embargo, el orden taxonómico es menos utilizado.

6.7.10.- Taxones a nivel de género en LM y heces

Analizando la microbiota de la LM que hemos conseguido identificar a nivel de género, encontramos bacterias de distintos géneros que forman parte de la microbiota habitual de la piel como los *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, entre otros. Se observan también géneros como la *Klebsiella*, *Clostridium* o los *Enterococcus*, que forman parte de la microbiota intestinal. Esto se demuestra en la literatura donde frecuentemente se encuentran en la LM bacterias características de la piel o del intestino materno (170, 172). Los gérmenes encontrados en la LM compiten por los nichos ecológicos impidiendo que aniden bacterias patógenas y además producen compuestos antimicrobianos que también ayudarán a la defensa contra microorganismos patógenos.

En las heces, mayoritariamente se encuentran géneros típicos de la microbiota intestinal como los *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, entre otros, al igual que en la bibliografía revisada (176, 152, 153).

Dado que la identificación a nivel de género no se consiguió en una parte importante de las secuencias, nos hemos limitado al análisis de los géneros más frecuentemente encontrados sin profundizar en la distribución de estos en función de otras variables.

6.7.11.- Estrés y LM

Hay múltiples factores que pueden influir en el microbioma de la LM, como ya hemos mencionado, y el estrés también es una variable importante a tener en cuenta. Se ha visto en la literatura que al analizar la LM de un parto vaginal o de aquel que se haya complicado y finalice en cesárea, no hay grandes diferencias, puesto que en el parto que termina en cesárea ya se han desencadenado los factores fisiológicos de estrés que caracterizan al parto, y esto puede ser un motivo para que haya un aumento de la permeabilidad intestinal en la madre y una mayor traslocación bacteriana, transfiriéndose bacterias a la LM. Cuando se trata de una cesárea electiva, no se produce tanto estrés fisiológico como el provocado por el parto y la LM tiene una microbiota diferente (170, 178, 179).

Sabemos que el estrés puede modificar la microbiota intestinal materna y secundariamente también la microbiota de la LM a través de la vía entero-mamaria, que se transmite alterada al recién nacido al ingerir la leche, como ya hemos visto. De igual forma, el estrés es capaz de

modificar la microbiota vaginal en las primeras o últimas etapas del embarazo, al alterar el pH y cambiar su composición, disminuyendo el número de *Lactobacillus*. El recién nacido al pasar por el canal del parto se impregna de esta microbiota alterada generando cambios en la adquisición del ecosistema pionero ⁽¹⁸⁰⁾.

Por otro lado, el estrés normalmente va asociado de alteraciones en la conducta del sueño y alimentación, lo que indirectamente también puede estar influyendo en los macronutrientes de la LM y en la microbiota transferida ⁽¹⁶¹⁾. Por lo tanto, el estudio de cómo influye el estrés en la LM implica múltiples factores a tener en cuenta.

La administración de probióticos a la madre gestante podría ser muy beneficioso en casos de estrés elevado, por ejemplo, puesto que se ha demostrado que aumenta la población de bacterias beneficiosas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en la LM que será transferida al recién nacido, aunque Mastromarino sólo ha demostrado dicho efecto en los partos vaginales ⁽¹⁸¹⁾ viéndose posteriormente su beneficio también en las cesáreas ⁽¹⁸²⁾.

Está demostrado que la LM de madres de niños prematuros, tiene un mayor porcentaje de oligosacáridos (HMOs) que la LM de madres de niños a término para protegerlos mejor contra posibles enfermedades infecciosas a las que estarán expuestos, reforzando más su sistema inmune ⁽¹⁸³⁾. A pesar de que cuentan con más HMOs, se han hecho estudios con la administración de prebióticos a las embarazadas, obteniéndose efectos similares y muy beneficiosos para la LM ⁽¹⁷²⁾, que podrían revertir los efectos negativos de, por ejemplo, el estrés.

La administración de probióticos con *Bifidobacterium* a los recién nacidos prematuros, ha demostrado disminuir el riesgo de NEC, al mejorar la barrera intestinal, la producción de IgA y citocinas antiinflamatorias, aumentar la diversidad y disminuir la traslocación bacteriana ⁽¹⁸²⁾. Sin embargo, su uso en los niños prematuros sigue siendo muy controvertido no generalizándose su administración, en el momento actual.

6.7.12.- Relación entre CPF y *Clostridiales* en heces

Hemos buscado una relación entre los niveles elevados de CPF (que nos orienta hacia una inflamación intestinal) y la cantidad de *Clostridiales* en heces de nuestra muestra de prematuros, puesto que los altos valores de CPF en los primeros momentos podrían estar relacionados con la alteración de las bacterias intestinales. No hemos encontrado relación estadística entre las variables en las heces de los recién nacidos. Sin embargo, en la literatura encontramos artículos que relacionan positivamente ambas variables, en donde cifras elevadas de CPF están relacionadas con niveles más elevados de *Clostridium* en heces ⁽¹³⁸⁾.

Hay pocos estudios que busquen la relación entre estas variables, siendo a veces contradictorios. En otro artículo, Mohan demuestra estadísticamente el descenso de cifras de CPF cuando se administran suplementos probióticos de *Bifidobacterium* breve al recién nacido prematuro, posiblemente por atenuar la respuesta inflamatoria al mejorar la maduración de la inmunidad a nivel de la mucosa intestinal ⁽¹⁸⁴⁾. Sin embargo, hay artículos contrarios en donde los niveles elevados de CPF no se asociaron estadísticamente con ninguna especie bacteriana ⁽¹⁸⁵⁾.

6.7.13.- *Bifidobacteriales*, *Lactobacillales* y *Clostridiales*, en función del tipo de parto

Hemos analizado a nivel de orden las diferencias que podría haber entre los binomios (madre-hijo) cuando se trata de un parto vaginal y una cesárea, en cuanto a *Bifidobacteriales*, *Lactobacillales* y *Clostridiales*. Se han visto algunos cambios, aunque para extraer resultados más concluyentes habría que disponer de un mayor número de díadas que pudiesen compararse a lo largo del tiempo.

Se aprecia que en el parto ocurrido por vía vaginal la presencia de *Lactobacillales* en heces es mayor, puesto que en la vagina materna abundan los *Lactobacillus* como se ha demostrado ampliamente en la literatura (154, 171, 180), mientras que en las cesáreas suelen predominar los *Clostridiales*, coincidiendo este resultado con varios artículos revisados (153, 154).

Apenas detectamos *Bifidobacteriales*, que deberían de ser más frecuentes en los partos por vía vaginal que en las cesáreas, sin embargo, en nuestra muestra hemos encontrado una escasa cantidad tanto en los partos vaginales como en las cesáreas.

En la literatura se ha demostrado que la colonización por *Bifidobacterium sp* se retrasa en los niños prematuros, sobre todo los nacidos de < de 33 semanas de edad gestacional (173).

6.7.14.- Especies en LM y heces

Hemos llegado a identificar gran cantidad de especies tanto en meconio como en LM. De entre las más frecuentes, por positividad en las muestras analizadas, en la LM encontramos especies típicas de la microbiota de la piel, como *Staphylococcus spp*, *Bacillus spp* o *Propionibacterium spp*

En las heces, se encuentran especies como *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella spp* y *Staphylococcus spp*. Los *Lactobacillus* y los *Bifidobacterium* se encuentran en pequeñas cantidades.

Hay que tener en cuenta que las Bifidobacterias pueden aparecer subestimadas, sobre todo en los primeros años de vida, cuando no son los suficientemente abundantes. Por otra parte, los métodos de extracción usados pueden no ser los óptimos para estas bacterias, la sensibilidad de la técnica es limitada y puede que no se consiga identificar específicamente algunas secuencias en especial a nivel de género y/o especie. Esto también puede ser debido al uso de primers genéricos para un fragmento del gen 16SrRNA, que no siempre son los más adecuados para todas las bacterias presentes en la muestra (186).

Por otro lado, debemos de tener cautela a la hora de hacer interpretaciones debido a que los resultados ofrecen datos de abundancia relativa y nunca de cuantificación absoluta (187). Por ello también es más acertado realizar el análisis a nivel de género y no tanto de especie. Pueden aparecer especies propias de otros ambientes que representan contaminación de las muestras, como restos de agua y bacterias propias de la misma, contaminantes de las superficies donde estamos analizando las muestras, del suelo o incluso resto de ADN que estén en los reactivos o soluciones utilizadas (172).

Por lo tanto, el análisis de las especies requiere de una técnica muy depurada y de unos cebadores altamente específicos y sensibles. También hay que considerar que dada la baja carga bacteriana de las muestras utilizadas en el estudio y la poca cantidad disponible, hizo especialmente complicado a nivel técnico la optimización del análisis genómico. Es por ello que se necesitaría un mayor tamaño muestral y la combinación de distintos primers para amplificar varias regiones.

6.7.15.- La importancia de la microbiota materna transmitida al recién nacido prematuro

La microbiota intestinal comienza a desarrollarse en el vientre materno y la forma en la que nacemos, la edad gestacional, la dieta, los antibióticos, la zona geográfica en la que nos encontremos y nuestros contactos sociales o con animales domésticos, van a influir en el desarrollo de unos microorganismos sobre otros. La eubiosis entre las diferentes especies es necesaria para mantener la salud. Cuando este equilibrio se rompe, entramos en un estado de disbiosis y se produce la enfermedad.

En el intestino de los recién nacidos encontramos 4 filos dominantes: Proteobacterias, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacterias. Poco a poco y con el desarrollo evolutivo y de la alimentación variada, se alcanza una microbiota cada vez más estable, más diversa y que acaba siendo dominada por 2 de los filos en la etapa adulta: los Bacteroidetes y los Firmicutes ⁽¹⁷³⁾. Ambos filos han de estar en equilibrio puesto que si los Firmicutes predominan sobre los Bacteroidetes se producen trastornos metabólicos como la obesidad o la diabetes. La microbiota obesogénica se puede transmitir al recién nacido y así los hijos de madres obesas tienen un mayor riesgo de tener sobrepeso, que será todavía mayor si el parto se produce por cesárea ⁽¹⁸²⁾. La diversidad de especies va aumentando con el tiempo y con el tipo de alimentación, siendo la LM el alimento ideal para los recién nacidos y más si nacen de forma prematura, puesto que transmiten microorganismos muy necesarios y beneficiosos para la colonización de la microbiota intestinal del recién nacido, como los *Lactobacilos* o las *Bifidobacterias*.

El parto vaginal es la forma natural de alumbrar puesto que el cuerpo de la madre se va preparando durante las últimas fases del embarazo (aumentando la formación de *Lactobacillus*, por ejemplo), para la transmisión de bacterias que serán las ideales para el anidamiento de microorganismos en el intestino del recién nacido. Si el parto ocurre por cesárea, esta transmisión tan importante se ve interrumpida y se transmitirán microorganismos más propios de la piel o del propio ambiente hospitalario que serán más perjudiciales que beneficiosos. Esto es muy importante hoy en día, puesto que, en determinadas zonas del planeta, como Sudamérica, el porcentaje de cesáreas es muy elevado ⁽⁶¹⁾.

La administración de antibióticos, tanto prenatales como después del nacimiento, salvan muchas vidas en la actualidad, sin embargo, su uso no es inocuo para nuestras propias bacterias. Se ha demostrado que los antibióticos retrasan la colonización por microorganismos tan relevantes como los *Bifidobacterium* o filos como los *Bacteroidetes* e incluso disminuye la biodiversidad de especies ⁽¹⁷³⁾. De esta forma, se ha visto cómo antibióticos administrados a niños de forma precoz, antes de los 6 meses, van a suponer un factor de riesgo para una mayor tendencia a la obesidad infantil, asma o problemas de la piel ^(188,189).

El estrés experimentado en la madre también puede alterar la microbiota intestinal de la propia madre y su diversidad. De esta forma, ésta puede transmitirse alterada al recién nacido a través de las diferentes vías de traslocación intestinal (a través de la placenta) y transmisión directa (vía entero-mamaria) ^(180, 182).

En una reciente investigación, Xiao ha recopilado más de 10 mil muestras de heces en niños hasta los 3 años de edad, en 17 países, y ha visto que la madurez del microbioma intestinal de los prematuros está retrasada con respecto a los niños a término. Además, ha identificado tres enterotipos (*Bifidobacterium*, *Prevotella* y *Bacteroides*) en la edad infantil que son más vulnerables que en la etapa adulta y tienden a cambiar a otro tipo, debido al crecimiento y desarrollo propios de las diferentes etapas de la infancia, hasta que se van estabilizando con la edad ⁽¹⁹⁰⁾.

El uso de combinaciones de probióticos con diferentes cepas ya desde etapas avanzadas del embarazo, así como administrados precozmente a los recién nacidos prematuros de forma segura, incrementan la presencia de bacterias beneficiosas, como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, para la joven microbiota. En febrero de 2020, se ha aprobado un documento con las pautas para la utilización de una combinación de probióticos de forma segura en recién nacidos prematuros, avalado por diferentes sociedades científicas ⁽⁶¹⁾, sin embargo, su uso en pacientes prematuros sigue siendo controvertido por el riesgo que suponen.

Enfermedades como la diabetes, la hipertensión, la retinopatía de la prematuridad, la enterocolitis, entre otras, parecen estar asociadas a alteraciones del ecosistema intestinal del prematuro, que además es inmaduro y está sometido a múltiples agresiones potenciales en el

entorno hospitalario de una UCIN. Por lo tanto, el uso de probióticos debe de ser más tenido en cuenta en la medicina actual. En esta línea, recientemente se ha publicado un artículo donde se administra un combinado de diferentes cepas de probióticos (Infloran®) a niños prematuros y se han recogido resultados muy beneficiosos, con mayor proporción de bacterias saludables (Lactobacilos y Bifidobacterias) que en una corte sin la administración de los probióticos (191). La importancia de transmitir y mantener una microbiota saludable en nuestros pacientes prematuros es cada vez más relevante puesto que sabemos que múltiples y diferentes factores van a influir de forma negativa en la colonización por microorganismos saludables. Los primeros 1000 días del recién nacido (donde se incluyen la gestación, y los 2 primeros años de vida) van parejos al desarrollo cognitivo, emocional, social y del lenguaje. Es un período crítico para el correcto desarrollo y dependiendo de cómo tenga lugar va a marcar el desarrollo también de una microbiota más o menos saludable.

Nuestra recogida de datos se produce en un período de tiempo muy inmediato, no pudiendo valorar más allá de las 2 semanas de vida el incremento de microbiota de unas especies con respecto a otras. Para futuras investigaciones sería interesante mantener esta recogida de datos al menos hasta los 3 o 6 meses de vida, dando un margen mayor de tiempo para que las colonias de microorganismos se vayan estableciendo en el organismo y a medida que se van introduciendo alimentos nuevos en la dieta del recién nacido.

En nuestro estudio no hemos recogido datos de la dieta de las madres, como ya hemos mencionado, y esto debería de ser un factor a tener en cuenta a la hora de la transmisión de microbiota de la madre al recién nacido, aun naciendo en las condiciones ideales de un parto vaginal. Si la madre ya tiene alteración de la microbiota esto va a afectar directa y negativamente a la de su hijo.

7.- CONCLUSIONES

- 1- La alteración de los procesos de apego y vínculo maternal, relacionados con la separación madre-recién nacido, son los que causan un mayor estrés en las madres.
- 2- El estrés disminuye la cantidad de LM, aunque no modifica sus macronutrientes. El tipo de parto y la edad influyen en la cantidad de LM extraída, aunque la composición de sus macronutrientes sólo se ve influida por el tipo de parto. El método canguro precoz es una medida eficaz frente al estrés en estas madres.
- 3- La cantidad de LM extraída a día 4 va a darnos información sobre qué cantidad podrá extraerse la madre a día 15, convirtiéndose en un fuerte marcador de éxito/fracaso de la LM exclusiva al alta.
- 4- Las madres con niveles de estudios más elevados gestionan mejor el estrés.
- 5- El sexo, los antibióticos postnatales, la vía de parto y el peso al nacimiento van a influir en los niveles de CPF, siendo estos mayores que en adultos.
- 6- El tipo de parto influye en la biodiversidad de las heces de los prematuros y el estrés influye negativamente en la biodiversidad de especies en la LM y heces del recién nacido.
- 7- En las heces de los prematuros predominan el filo de Proteobacterias y en la LM el de los Firmicutes. Sin embargo, el tipo de parto va a condicionar que se establezca una microbiota más o menos saludable en el intestino del prematuro.
- 8- El estrés materno influye negativamente en la microbiota intestinal del recién nacido y de la LM. Además, la administración de antibióticos varía su biodiversidad y composición.
- 9- En la microbiota de la LM encontramos gran cantidad de bacterias propias de la piel y de la microbiota intestinal materna. Sin embargo, en las heces de los prematuros abundan bacterias características del intestino.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- 1- Izquierdo Macian MI. Prematuridad. Medicina Fetal y Neonatal. En: Cruz M. Manual de Pediatría. 4ª edic. Madrid: Ergon; 2020.p. 172-177.
- 2- Instituto Nacional de Estadística. www.ine.es. INEbase / Demografía y población /Cifras de población y Censos demográficos /Cifras de población / Últimos datos
- 3- Brazelton TB, Cramer BG. La relación más temprana; padres, bebés y el drama del apego inicial. Barcelona: Edit Paidós; 1993.
- 4- Alberdi MC. Características del vínculo: estudio comparativo de niños prematuros y niños nacidos a término. [tesis doctoral en internet]. Barcelona. Universidad autónoma de Barcelona, Facultad de Psicología; 2006. 199 p. <http://hdl.handle.net/10803/5572>
- 5- Jofré Aravena VE, Henríquez Fierro E. Nivel de estrés de las madres con recién nacidos hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos neonatal, Hospital Guillermo Grant Benavente de Concepción. Cienc. enferm. 2002; 8(1):31-36. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95532002000100005&lng=es.
- 6- Villanova FG, Eimil B, Cuéllar Flores I, Palacios I. El estrés materno en la organización del vínculo madre-bebé prematuro de bajo peso. Clínica Contemporánea. 2013; 4 (2): 171-183.
- 7- Bowlby, J. Attachment and loss, vol.3: Loss, sadness and depression. Nueva York: Basic Books. 1980. (Trad. Cast.: La pérdida afectiva. Barcelona: Edit Paidós 1993)
- 8- Bowlby J. Una base segura: Aplicaciones Clínicas de una teoría del apego. Barcelona: Edit Paidós; 1988.
- 9- Repetur Safrany K, Quezada Len A. Vínculo y desarrollo psicológico; la importancia de las relaciones tempranas. Revista digital Universitaria. 2005; 6: 1-15.
- 10- Oliva Delgado A. Estado actual de la teoría del Apego. Revista de Psiquiatría y Psicología del Niño y del Adolescente. 2004; 4 (1); 65-81.
- 11- Ginovart Galiana G. Cuidados centrados en el desarrollo: un proyecto común. Aloma: Revista de Psicología, Ciències de l'Educació i de l'Esport. 2010; 26: 15-27.
- 12- López Maestro M, Melgar Bonis A, de la Cruz-Bertolo J, Perapoch López J, Mosqueda Peña R, Pallás Alonso C. Cuidados centrados en el desarrollo. Situación en las unidades de neonatología de España. Situación en las unidades neonatales españolas]. An Pediatr (Barc). 2014; 81(4): 232-40.
- 13- Harillo Acevedo D, Rico Becerra JI, López Martínez A. La filosofía de los cuidados centrados en el desarrollo del recién nacido prematuro (NIDCAP): una revisión de la literatura. Enferm. glob. 2017; 16 (48): 577-589.
- 14- Ministerio de Sanidad y Política Social. Cuidados desde el nacimiento basados en pruebas y buenas prácticas [monografía en Internet]. Madrid: Ministerio de Sanidad y Política Social; 2010 [acceso 29 de noviembre de 2014]. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/equidad/cuidadosDesdeNacimiento.pdf>
- 15- Pallás Alonso CR. Actualización: Cuidados centrados en el desarrollo en las unidades neonatales. An Pediatr Contin. 2014; 12 (2): 62-7.
- 16- Sánchez Rodríguez G, Quintero Villegas LJ, Rodríguez Camelo G, Nieto Sanjuanero A, Rodríguez Balderrama I. Disminución del estrés del prematuro para promover su

- neurodesarrollo: nuevo enfoque terapéutico. *Medicina Universitaria*. 2010; 12 (48): 176-180.
- 17- Pallás Alonso CR, López Maestro M. NIDCAP, práctica clínica y metaanálisis. *Evid Pediatr*. 2013; 9:40.
- 18- Organización Mundial de la Salud. CIE 10. Trastornos mentales y del comportamiento: criterios diagnósticos de investigación. 1994.
- 19- American Psychological Association. (2010). Los distintos tipos de estrés. <http://www.apa.org/centrodeapoyo/tipos>
- 20- Sandín B. El estrés. Belloch A, Sandín B, Ramos F. En: *Manual de Psicopatología*. Vol 2. Edit μgraw- Hill. Madrid. 2000: 3-53.
- 21- Sandín B, El estrés: un análisis basado en el papel de los factores sociales. *International Journal of Clinical and Health Psychology* [Internet]. 2003;3(1):141-157.
- 22- Rodríguez Belmares P, Cantú Guzmán R. Perfiles de personalidad en pacientes con hipertensión arterial. *Psicología y Salud*. 2015; 25 (2): 181-189.
- 23- Rossel CK, Carreño T, Maldonado ME. Afectividad en madres de niños prematuros hospitalizados. Un mundo desconocido. *Rev. chil. pediatr*. 2002; 73(1):15-21.
- 24- Ruíz A. La maternidad y paternidad prematura. En: Ruíz A. *El bebé prematuro y sus padres: creación de un programa de intervención psicológico*. 1ª edición. Argentina: Miño y Dávila. 2003: 69-101.
- 25- Iriarte RA, Carrión TM. Experiencias de los padres de grandes prematuros en la unidad de cuidado intensivo neonatal: revisión sistemática de la evidencia cualitativa. *Metas Enferm*. 2013; 16 (2): 20-25.
- 26- Pierrehumbert B, Nicole A, Muller-Nix C, Forcada-Guex M, Ansermet F. Parental post-traumatic reactions after premature birth: implications for sleeping and eating problems in the infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003; 88(5): F400-4.
- 27- Turan T, Başbakkal Z, Ozbek S. Effect of nursing interventions on stressors of parents of premature infants in neonatal intensive care unit. *J Clin Nurs*. 2008; 17(21): 2856-66.
- 28- Lundqvist P, Westas LH, Hallström I. From distance toward proximity: fathers lived experience of caring for their preterm infants. *J Pediatr Nurs*. 2007; 22(6): 490-7.
- 29- Watson G. Parental liminality: a way of understanding the early experiences of parents who have a very preterm infant. *J Clin Nurs*. 2011; 20(9-10): 1462-71.
- 30- Hollywood M, Hollywood E. The lived experiences of fathers of a premature baby on a neonatal intensive care unit. *J Neonatal Nurs*. 2011; 17: 32-40.
- 31- Miles MS, Funk SG, Carlson J. Parental Stressor Scale: neonatal intensive care unit. *Nurs Res*. 1993 May-Jun;42(3): 148-52.
- 32- Acosta-Romo MF, Cabrera-Bravo N, Basante-Castro Y, Jurado D. Sentimientos que experimentan los padres en el difícil camino de la hospitalización de sus hijos prematuros. Un aporte al cuidado humanizado. *Rev Univ. Salud*. 2017;19(1):17-25.
- 33- Obeidat HM, Bond EA, Callister LC. The parental experience of having an infant in the newborn intensive care unit. *J Perinat Educ*. 2009; 18 (3):23-9.
- 34- González Serrano F. Nacer de nuevo: la crianza de los niños prematuros: la relación temprana y el apego. *Cuadernos de Psiquiatría y Psicoterapia del niño y Adolescente*. 2009; 48: 61-80.
- 35- Caruso A, Mikulic IM. El estrés en padres de bebés prematuros internados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales: traducción y adaptación de la escala Parental Stressor Scale: Neonatal Intensive Care Unit (PSS: NICU - M.S. Miles y D. Holditch Davis, 1987; M.S. Miles y S.G. Funk, 1998). *Anuario de investigaciones*. 2012; 19(2): 19-26.

- 36- Dudek-Shriber L. Parent stress in the neonatal intensive care unit and the influence of parent and infant characteristics. *Am J Occup Ther* 2004; 58(5): 509-20.
- 37- Ruhe K, van den Hoogen A, Bröring-Starre T, Wielenga JM, van Weissenbruch MM. Getting a grip in the middle of chaos: Preparing for preterm parenthood during a high-risk pregnancy - Parental experiences and needs. *Acta Paediatr.* 2022; 111(7): 1324-1330.
- 38- Antúnez Segura AL, Funes Moñux RM, De la Hoz Martínez A, Ripalda Crespo MJ, Plana Farras N, Collado Gómez R. Opinión de padres de recién nacidos prematuros sobre la necesidad de un psicólogo en las unidades de neonatología. *Acta Pediatr Esp.* 2020; 78(3-4): 54-61.
- 39- Rodrigo L. Calprotectina fecal. *Rev. esp. enferm. dig.* [Internet]. 2007; 99 (12): 683-688.
- 40- Campeotto F, Butel MJ, Kalach N, Derrieux S, Aubert-Jacquín C, Barbot L, et al. High faecal calprotectin concentrations in newborn infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89 (4): F353-5.
- 41- Van Zoonen AGJF, Hulzebos CV, Muller Kobold AC, Kooi EMW, Bos AF, Hulscher JBF. Serial fecal calprotectin in the prediction of necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *J Pediatr Surg.* 2019; 54 (3): 455-459.
- 42- Aydemir O, Aydemir C, Sarikabadayi YU, Emre Canpolat F, Erdeve O, Biyikli Z, et al. Fecal calprotectin levels are increased in infants with necrotizing enterocolitis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012; 25 (11):2237-41.
- 43- Velasco Rodríguez-Belvis M, Viada Bris JF, Plata Fernández C, García-Salido A, Asensio Antón J, Domínguez Ortega G, et al. Normal fecal calprotectin levels in healthy children are higher than in adults and decrease with age. *Paediatr Child Health.* 2020; 25 (5):286-292.
- 44- Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G, Berstad A. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. *Acta Paediatr.* 2002; 91(1):45-50.
- 45- García-López, R. Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediátrica de México.* 2011; 32 (4): 223-230.
- 46- Lozano de la Torre. Lactancia Materna. Asociación Española de Pediatría. Trabajo de investigación. 2014.
- 47- Aguayo Maldonado J, Arena Ansótegui J, Díaz Gómez NM, Gómez Papí A, Hernández Aguilar MT, Landa Rivera L, et al. Composición de la leche humana. En: *Lactancia Materna, guía para profesionales.* Madrid. Ergon; 2004: 59-76.
- 48- Aguilar Cordero MJ, Sánchez López AM, Madrid Baños N, Mur Villar N, Expósito Ruiz M, Hermoso Rodríguez. Lactancia materna como prevención del sobrepeso y la obesidad en el niño y el adolescente: revisión sistemática. *Nutr. Hosp.* 2015; 31(2):606-620.
- 49- Sadauskaite-Kuehne V, Ludvigsson J, Padaiga Z, Jasinskiene E, Samuelsson U. Longer breastfeeding is an independent protective factor against development of type 1 diabetes mellitus in childhood. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004; 20 (2): 150-7.
- 50- Pérez Ruiz JM, Miranda León MT, Peinado Herreros JM, Iribar Ibabe MC. Lactancia materna y su influencia en los procesos cognitivos de escolares españoles (6 años de edad), valorada con la escala de inteligencia Wechsler. *ALAN.* 2013; 63(3):218-223.
- 51- Aguayo Maldonado J, Ansotegui Arena J, Díaz Gómez MN, Gómez Papí A, Hernández Aguilar MT, Landa Rivera L, et al. La Lactancia Materna en recién nacidos pretérmino. En: *Lactancia Materna: guía para profesionales.* Comité de Lactancia Materna de la AEP. Ergon 2004: 95-105.
- 52- Martín Álvarez E, Jiménez Cabanillas MV, Peña Caballero M, Serrano López L, Kajarabille Naroa, Díaz Castro Javier et al. Efectos de la administración de calostro

- orofaríngeo en recién nacidos prematuros sobre los niveles de inmunoglobulina A. *Nutr. Hosp.* 2016; 33 (2): 232-238.
- 53- Alonso-Díaz C, Utrera-Torres I, de Alba-Romero C, Flores-Antón B, López-Maestro M, Lora-Pablos D, et al. Prácticas de alimentación con leche materna en recién nacidos menores de 1.500 g o de menos de 32 semanas [Feeding practices with human milk in newborns less than 1.500 g or less than 32 weeks]. *An Pediatr (Barc)*. 2016; 85 (1): 26-33.
 - 54- Gorrita Pérez RR, Bárcenas Belló Y, Gorrita Pérez Y, Brito Herrera B. Estrés y ansiedad maternos y su relación con el éxito de la lactancia materna. *Rev Cubana Pediatr.* 2014; 86(2).
 - 55- Caparros-Gonzalez RA, García-García I, Mariñas-Lirola JC, Peralta-Ramírez MI. Protocolo del estudio de cohortes GESTASTRESS sobre los efectos del estrés durante el embarazo mediante la medida del cortisol en cabello de la mujer y del recién nacido. *Rev. Esp. Salud Publica [Internet]*. 2018; 92: e201804027.
 - 56- Díaz-Gómez N M, Ruzafa-Martínez M, Ares S, Espiga I, De Alba C. Motivaciones y barreras percibidas por las mujeres españolas en relación a la lactancia materna. *Rev. Esp. Salud Publica*. 2016; 90: e40016.
 - 57- Peláez C, Requena T. La microbiota intestinal. Madrid: CSIC. 2017; 11-108.
 - 58- Uberos J. Perinatal microbiota: review of its importance in newborn health. *Arch Argent Pediatr.* 2020; 118 (3): 265-270.
 - 59- Castañeda-Guillot C. Microbiota intestinal y salud infantil. *Revista Cubana de Pediatría [revista en Internet]*. 2017; 90(1).
 - 60- Moreno-Villares JM, Collado MC, Larqué E, Leis-Trabazo MR, Sáenz-de-Pipaon M, Moreno-Aznar LA. Los primeros 1000 días: una oportunidad para reducir la carga de las enfermedades no transmisibles. *Nutr. Hosp. [Internet]*. 2019; 36(1):218-232.
 - 61- Castañeda-Guillot C. Microbiota intestinal y los primeros 1000 días de vida. *Revista Cubana de Pediatría [revista en Internet]*. 2021; 93 (3). E 1382.
 - 62- Parra Llorca A. Influencia del procesamiento 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 en internet] Valencia. Universidad de Valencia; 2021. 125 p.
 - 63- Rodríguez JM, Jiménez E, Merino V, Maldonado A, Marín ML, Fernández L, Martín R. Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. *Acta Pediatr Esp.* 2008; 66 (2): 77-82.
 - 64- Pérez Muñuzuri A, Boix H, Sánchez Redondo MD, Cernada M, Espinosa Fernández MG, González Pacheco N, et al. Niveles asistenciales en las unidades neonatales en España: una visión actualizada para una nueva calidad. *Anales de Pediatría*. 2023; 98: 301-307.
 - 65- Fusch G, Rochow N, Choi A, Fusch S, Poeschl S, Ubah AO, et al. Rapid measurement of macronutrients in breast milk: How reliable are infrared milk analyzers? *Clin Nutr.* 2015; 34 (3): 465-76.
 - 66- Mangel L, Ovental A, Batscha N, Arnon M, Yarkoni I, Dollberg S. Higher Fat Content in Breastmilk Expressed Manually: A Randomized Trial. *Breastfeed Med.* 2015; 10 (7): 352-4.
 - 67- 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.
 - 68- Malícková K, Janatková I, Bortlík M, Komárek V, Lukás M. Stanovení koncentrace kalprotektinu ve stolici u nemocných s idiopatickými strevními záněty-srovnání dvou komerčních testů [Calprotectin levels in patients with idiopathic inflammatory bowel

- disease comparison of two commercial tests]. *Epidemiol Mikrobiol Immunol*. 2008; 57 (4): 147-53.
- 69- Alarcón Cavero T, Dauria G, Delgado Palacio S, Del Campo Moreno R, Ferrer Martínez M. Microbiota. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. Madrid: Cercenado Mansilla E; 2016 [revised 2016; cited 2023]. Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia59mod.pdf>
 - 70- López Causapé C, González Candelas F, Tomás Carmona M, Oliver Palomo A. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. Madrid: Cercenado Mansilla E; 2021 [revised 2021; cited 2023]. Available from: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento71.pdf>
 - 71- 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation; 2013, Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Disponible en: https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prepguide-15044223-b.pdf (último acceso 26 Julio 2023).
 - 72- Pla L. Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *INCI*. 2006; 31(8):583-590.
 - 73- Haegeman B, Hamelin J, Moriarty J, Neal P, Dushoff J, Weitz JS. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *ISME J* 2013; 7 (6): 1092-101.
 - 74- Murray AE, Freudenstein J, Gribaldo S, Hatzenpichler R, Hugenholtz P, Kämpfer P, et al. Roadmap for naming uncultivated Archaea and Bacteria. *Nat Microbiol*. 2020; 5 (8): 987-994.
 - 75- Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 9351507.
 - 76- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019. 10; 7 (1): 14.
 - 77- León Martín B, Poudereux Mozas M, Giménez Rodríguez C, Beláustegui Cueto A. Sistema de intervención psicológica en unidad de cuidados intensivos neonatales: intervención psicológica en padres de niños prematuros. *Mapfre Medicina*; 2005; 16 (2).
 - 78- Ruiz AL, Ceriani Cernadas JM., Cravedi V, Rodríguez D. Estrés y depresión en madres de prematuros: un programa de intervención. *Arch. argent. pediatr*. 2005; 103(1):36-45.
 - 79- Wormald F, Tapia JL, Torres G, Cánepa P, González MA, Rodríguez D, et al. Estrés en padres de recién nacidos prematuros de muy bajo peso hospitalizados en unidades de cuidados intensivos neonatales. Estudio multicéntrico. *Arch. Argent. Pediatr* 2015; 113 (4): 303-309.
 - 80- Campo González A, Amador Morán R, Alonso Uría RM, Ballester López I. Estrés en madres de recién nacidos ingresados en unidad de cuidados intensivos. *Rev Cubana Obstet Ginecol*. 2018; 44(2):1-10.
 - 81- Peña Silva B, García Araya A, Miranda Iglesias M, Caviedes Fernández J, Ulloa Ramírez V, Rementería Rementería Y. Estrés parental y sus dimensiones en Unidades de Cuidado Intensivo Neonatal – Pediatría: Revisión Narrativa. *Cietna*. 2021; 8(2):67-4.
 - 82- Sánchez-Veracruz MJ, Leal-Costa C, Pastor-Rodríguez JD, Díaz-Agea JL. Relación entre el grado de satisfacción y el nivel de estrés identificado en padres y madres con hijos

- ingresados en una unidad de cuidado intensivo neonatal. *Enferm. glob.* 2017; 16(47): 270-291.
- 83- Huhtala M, Korja R, Lehtonen L, Haataja L, Lapinleimu H, Rautava P; PIPARI Study Group. Associations between parental psychological well-being and socio-emotional development in 5-year-old preterm children. *Early Hum Dev.* 2014; 90 (3): 119-24.
 - 84- Wolke D, Eryigit-Madzwamuse S, Gutbrod T. Very preterm/very low birthweight infants' attachment: infant and maternal characteristics. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2014; 99 (1): F70-5.
 - 85- Singer LT, Salvator A, Guo S, Collin M, Lilien L, Baley J. Maternal psychological distress and parenting stress after the birth of a very low-birth-weight infant. *JAMA.* 1999; 281(9): 799-805.
 - 86- Pardavila Belio MI, Vivar CG. Necesidades de la familia en las unidades de cuidados intensivos. Revisión de la literatura. *Enfermería Intensiva.* 2012; 23 (2): 51-67.
 - 87- Waddington C, van Veenendaal NR, O'Brien K, Patel N; International Steering Committee for Family Integrated Care. Family integrated care: Supporting parents as primary caregivers in the neonatal intensive care unit. *Pediatr Investig.* 2021; 5 (2):148-154.
 - 88- Franck LS, Waddington C, O'Brien K. Family Integrated Care for Preterm Infants. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2020; 32(2): 149-165.
 - 89- Vázquez-Román S, Bustos-Lozano G, López-Maestro M, Rodríguez-López J, Orbea-Gallardo C, Samaniego-Fernández M, et al. Impacto en la práctica clínica de la apertura de un banco de leche en una unidad neonatal [Clinical impact of opening a human milk bank in a neonatal unit]. *An Pediatr (Barc).* 2014; 81 (3): 155-60.
 - 90- China Jiméñez B, Sáenz de Pipaón M. Importancia de la leche humana y sus características nutricionales. Efectos a corto, medio y largo plazo. *Rev Enferm Neon.* 2020; 34: 33-40.
 - 91- Belfort MB, Anderson PJ, Nowak VA, Lee KJ, Molesworth C, Thompson DK, et al. Breast Milk Feeding, Brain Development, and Neurocognitive Outcomes: A 7-Year Longitudinal Study in Infants Born at Less Than 30 Weeks' Gestation. *J Pediatr.* 2016; 177:133-139.
 - 92- Belfort MB, Knight E, Chandarana S, Ikem E, Gould JF, Collins CT, et al. Associations of Maternal Milk Feeding With Neurodevelopmental Outcomes at 7 Years of Age in Former Preterm Infants. *JAMA Netw Open.* 2022;5(7): e2221608.
 - 93- Hoban R, Bigger H, Schoeny M, Engstrom J, Meier P, Patel AL. Milk Volume at 2 Weeks Predicts Mother's Own Milk Feeding at Neonatal Intensive Care Unit Discharge for Very Low Birthweight Infants. *Breastfeed Med.* 2018; 13(2): 135-141.
 - 94- Hill PD, Aldag JC. Milk volume on day 4 and income predictive of lactation adequacy at 6 weeks of mothers of nonnursing preterm infants. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2005; 19(3):273-82.
 - 95- Asztalos EV. Supporting Mothers of Very Preterm Infants and Breast Milk Production: A Review of the Role of Galactagogues. *Nutrients.* 2018; 10(5):600.
 - 96- Hu XS, Zhang M, Jiang CY, Yu ZB, Gu N. Influence of the coronavirus disease 2019 pandemic on maternal breastfeeding for very low birth weight infants]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2022; 24 (6): 643-647.
 - 97- Wormald F, Tapia JL, Domínguez A, Cánepa P, Miranda A, Torres G et al. Producción de leche materna y estado emocional en madres de recién nacidos de muy bajo peso. *Arch Argent Pediatr.* 2021; 119 (3): 162-169.

- 98- Maraboli Aguilera M, Lavanderos Bustamante G, León Martínez C, Zúñiga Ulloa M, Mena Nannig P. Evaluación de un protocolo de calostro para prematuros de muy bajo peso de nacimiento. 2022. *Andes pediatri*; 93 (3): 343-350.
- 99- Moles L, Manzano S, Fernández L, Montilla A, Corzo N, Ares S, Rodríguez JM, Espinosa-Martos I. Bacteriological, biochemical, and immunological properties of colostrum and mature milk from mothers of extremely preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015; 60(1):120-6.
- 100- Huo M, Liu C, Mei H, Zhang Y, Liu C, Song D, et al. Intervention Effect of Oropharyngeal Administration of Colostrum in Preterm Infants: A Meta-Analysis. *Front Pediatr*. 2022; 10: 895375.
- 101- Zhu Y, Chen X, Zhu J, Jiang C, Yu Z, Su A. Effect of First Mother's Own Milk Feeding Time on the Risk of Moderate and Severe Bronchopulmonary Dysplasia in Infants With Very Low Birth Weight. *Front Pediatr*. 2022; 10:887028.
- 102- Parker LA, Sullivan S, Krueger C, Kelechi T, Mueller M. Effect of early breast milk expression on milk volume and timing of lactogenesis stage II among mothers of very low birth weight infants: a pilot study. *J Perinatol*. 2012; 32 (3): 205-9.
- 103- Parker LA, Sullivan S, Krueger C, Mueller M. Association of timing of initiation of breastmilk expression on milk volume and timing of lactogenesis stage II among mothers of very low-birth-weight infants. *Breastfeed Med*. 2015; 10 (2): 84-91.
- 104- Dandan L, Xiurong Y, Yunfang W. The research on milk volumen and its influencing factors in mothers with preterm infants hospitalized in NICU during periods of mother-infant separation. *Chinese Journal of Nursing*. 2018; 12: 65-70.
- 105- Lau C. Effects of stress on lactation. *Pediatric Clinics of North America*. 2001; 48 (1): 221-234.
- 106- Dewey KG. El estrés materno y fetal se asocia con lactogénesis alterada en humanos. *J Nutr*. 2001; 131 (11): 3012S-5S.
- 107- Nagel EM, Howland MA, Pando C, Stang J, Mason SM, Fields DA, et al. Maternal Psychological Distress and Lactation and Breastfeeding Outcomes: a Narrative Review. *Clin Ther* 2022; 44(2): 215-227.
- 108- Düzgün MV, Özer Z. The effects of music intervention on breast milk production in breastfeeding mothers: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Adv Nurs*. 2020; 76 (12): 3307-3316.
- 109- SefidHaji S, Aziznejadroshan P, Mojaveri MH, Nikbakht HA, Qujeq D, Amiri SRJ. Effect of lullaby on volume, fat, total protein and albumin concentration of breast milk in premature infants' mothers admitted to NICU: a randomized controlled trial. *Int Breastfeed J*. 2022; 17 (1): 71.
- 110- Araya Paulina, López-Alegría Fanny. Intervenciones efectivas para aumentar la duración y la exclusividad de la lactancia materna: una revisión sistemática. *Rev. chil. obstet. ginecol*. 2022; 87(1):26-39.
- 111- Hill PD, Aldag JC, Chatterton RT, Zinaman M. Psychological distress and milk volume in lactating mothers. *West J Nurs Res*. 2005; 27 (6): 676-93; discussion 694-700.
- 112- Hill PD, Aldag JC, Demirtas H, Zinaman M, Chatterton RT. Mood states and milk output in lactating mothers of preterm and term infants. *J Hum Lact*. 2006; 22 (3): 305-14.
- 113- Caparros-Gonzalez RA, Romero-Gonzalez B, Gonzalez-Perez R, Lara-Cinisomo S, Martin-Tortosa PL, Oliver-Roig A, et al. Maternal and Neonatal Hair Cortisol Levels and Psychological Stress Are Associated With Onset of Secretory Activation of Human Milk Production. *Adv Neonatal Care*. 2019; 19 (6): E11-E20.

- 114- Keith DR, Weaver BS, Vogel RL. The effect of music-based listening interventions on the volume, fat content, and caloric content of breast milk-produced by mothers of premature and critically ill infants. *Adv Neonatal Care*. 2012; 12 (2): 112-9.
- 115- Borràs-Novell C, Herranz Barbero A, Balcells Esponera C, López-Abad M, Aldecoa Bilbao V, Izquierdo Renau M, et al. Influence of maternal and perinatal factors on macronutrient content of very preterm human milk during the first weeks after birth. *J Perinatol*. 2023; 43 (1): 52-59.
- 116- Palnizky Soffer G, Siri M, Mangel L, Mandel D, Lubetzky R. Impact of Maternal Anxiety on Human Milk Macronutrients Content: A Prospective Observational Study. *Breastfeed Med*. 2020; 15 (9): 572-575.
- 117- Ryoo CJ, Kang NM. Maternal Factors Affecting the Macronutrient Composition of Transitional Human Milk. *Int J Environ Res Public Health*. 2022; 19 (6): 3308.
- 118- Ziomkiewicz A, Babiszewska M, Apanasewicz A, Piosek M, Wychowanec P, Cierniak A, et al. Psychosocial stress and cortisol stress reactivity predict breast milk composition. *Sci Rep* 2021; 11(1): 11576.
- 119- Daniel AI, Shama S, Ismail S, Bourdon C, Kiss A, Mwangome M, et al. Maternal BMI is positively associated with human milk fat: a systematic review and meta-regression analysis. *Am J Clin Nutr*. 2021;113(4):1009-1022.
- 120- Adhikari S, Kudla U, Nyakayiru J, Brouwer-Brolsma EM. Maternal dietary intake, nutritional status and macronutrient composition of human breast milk: systematic review. *Br J Nutr*. 2022; 127 (12): 1796-1820.
- 121- Bzikowska-Jura A, Czerwonogrodzka-Senczyna A, Olędzka G, Szostak-Węgierek D, Weker H, Wesołowska A. Maternal Nutrition and Body Composition During Breastfeeding: Association with Human Milk Composition. *Nutrients*. 2018; 10 (10): 1379.
- 122- Miranda AR, Cortez MV, Scotta AV, Soria EA. Dietary Intake of Polyphenols Enhances Executive/Attentional Functioning and Memory with an Improvement of the Milk Lipid Profile of Postpartum Women from Argentina. *J Intell*. 2022; 10 (2): 33.
- 123- Bzikowska-Jura A, Sobieraj P, Szostak-Węgierek D, Wesołowska A. Impact of Infant and Maternal Factors on Energy and Macronutrient Composition of Human Milk. *Nutrients*. 2020; 12 (9): 2591.
- 124- Tamimi RM, Lagiou P, Mucci LA, Hsieh CC, Adami HO, Trichopoulos D. Average energy intake among pregnant women carrying a boy compared with a girl. *BMJ*. 2003; 326 (7401): 1245-6.
- 125- Burianova I, Bronsky J, Pavlikova M, Janota J, Maly J. Maternal body mass index, parity and smoking are associated with human milk macronutrient content after preterm delivery. *Early Hum Dev*. 2019; 137:104832.
- 126- Hahn WH, Song JH, Song S, Kang NM. Do gender and birth height of infant affect calorie of human milk? An association study between human milk macronutrient and various birth factors. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2017; 30 (13): 1608-1612.
- 127- Bishara R, Dunn MS, Merko SE, Darling P. Volume of foremilk, hindmilk, and total milk produced by mothers of very preterm infants born at less than 28 weeks of gestation. *J Hum Lact*. 2009; 25 (3): 272-9.
- 128- Lubetzky R, Sever O, Mimouni FB, Mandel D. Human Milk Macronutrients Content: Effect of Advanced Maternal Age. *Breastfeed Med*. 2015; 10 (9): 433-6.
- 129- Rodríguez Leis P, Flores Gallegos R. Relación entre apoyo social, estrés, ansiedad y depresión durante el embarazo en una población mexicana. *Ansiedad y estrés*. 2018; 24: 67-72.

- 130- Theurich MA, Davanzo R, Busck-Rasmussen M, Díaz-Gómez NM, Brennan C, Kylberg E, et al. Breastfeeding Rates and Programs in Europe: A Survey of 11 National Breastfeeding Committees and Representatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2019; 68 (3): 400-407.
- 131- Gila-Díaz A, Carrillo GH, López de Pablo ÁL, Arribas SM, Ramiro-Cortijo D. Association between Maternal Postpartum Depression, Stress, Optimism, and Breastfeeding Pattern in the First Six Months. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17 (19): 7153.
- 132- Díaz Parra S. Valoración de la cinética de la calprotectina fecal como marcador precoz de estrés intestinal y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica en el recién nacido pretérmino. [Tesis doctoral en internet]. Málaga: Universidad de Málaga; 2017. 140 p. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10630/15781>
- 133- Li F, Ma J, Geng S, Wang J, Ren F, Sheng X. Comparison of the different kinds of feeding on the level of fecal calprotectin. *Early Hum Dev.* 2014; 90 (9): 471-5.
- 134- Costa S, Patti ML, Perri A, Cocca C, Pinna G, Tirone C, et al. Effect of Different Milk Diet on the Level of Fecal Calprotectin in Very Preterm Infants. *Front Pediatr.* 2020; 8:552.
- 135- Li F, Ma J, Geng S, Wang J, Liu J, Zhang J, et al. Fecal calprotectin concentrations in healthy children aged 1-18 months. *PLoS One.* 2015; 10 (3): e0119574.
- 136- Qiu L, Wang J, Ren F, Shen L, Li F. Can fecal calprotectin levels be used to monitor infant milk protein allergies? *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2021;17 (1): 132.
- 137- Xiong LJ, Xie XL, Li Y, Deng XZ. Current status of fecal calprotectin as a diagnostic or monitoring biomarker for cow's milk protein allergy in children: a scoping review. *World J Pediatr.* 2021; 17 (1): 63-70.
- 138- Rougé C, Butel MJ, Piloquet H, Ferraris L, Legrand A, Vodovar M, et al. Fecal calprotectin excretion in preterm infants during the neonatal period. *PLoS One.* 2010; 5 (6): e11083.
- 139- Dewaele R, Delgado L, Florio L, Carabio C, Iglesias C. Nivel de calprotectina fecal en niños sanos menores de 4 años. *Arch. Pediatr. Urug.* 2018; 89(Suppl1):34-40.
- 140- Cui X, Li J. Fecal calprotectin levels in preterm infants during the early neonatal period. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2012; 14 (3): 165-8.
- 141- Groer M, Ashmeade T, Louis-Jacques A, Beckstead J, Ji M. Relationships of Feeding and Mother's Own Milk with Fecal Calprotectin Levels in Preterm Infants. *Breastfeed Med.* 2016; 11 (4): 207-12.
- 142- Park JS, Cho JY, Chung C, Oh SH, Do HJ, Seo JH, et al. Dynamic Changes of Fecal Calprotectin and Related Clinical Factors in Neonates. *Front Pediatr.* 2020; 8: 326.
- 143- Zoppelli L, Güttel C, Bittrich HJ, Andrée C, Wirth S, Jenke A. Fecal calprotectin concentrations in premature infants have a lower limit and show postnatal and gestational age dependence. *Neonatology.* 2012;102(1):68-74.
- 144- Laforgia N, Baldassarre ME, Pontrelli G, Indrio F, Altomare MA, Di Bitonto G, et al. Calprotectin levels in meconium. *Acta Paediatr.* 2003; 92 (4): 463-6.
- 145- Josefsson S, Bunn SK, Domellöf M. Fecal calprotectin in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007; 44 (4): 407-13.
- 146- Cong S, Wang R, Fan X, Song X, Sha L, Zhu Z, et al. Skin-to-skin contact to improve premature mothers' anxiety and stress state: A meta-analysis. *Matern Child Nutr.* 2021; 17 (4): e13245.
- 147- Chen WY, Wu YY, Xu MY, Tung TH. Effect of Kangaroo Mother Care on the Psychological Stress Response and Sleep Quality of Mothers With Premature Infants in

- the Neonatal Intensive Care Unit. *Front Pediatr.* 2022; 10: 879956. doi: 10.3389/fped.2022.879956.
- 148- Cristóbal Cañadas D, Parrón Carreño T, Sánchez Borja C, Bonillo Perales A. Benefits of Kangaroo Mother Care on the Physiological Stress Parameters of Preterm Infants and Mothers in Neonatal Intensive Care. *Int J Environ Res Public Health.* 2022; 19 (12): 7183.
 - 149- Wang F, Zhang Q, Ni ZH, Lv HT. Effects of kangaroo care on pain relief in premature infants during painful procedures: A meta-analysis. *J Spec Pediatr Nurs.* 2022; 27 (4): e12390.
 - 150- Akcan E, Yiğit R, Atici A. The effect of kangaroo care on pain in premature infants during invasive procedures. *Turk J Pediatr.* 2009; 51 (1): 14-8.
 - 151- Zhao Y, Dong Y, Cao J. Kangaroo Care for Relieving Neonatal Pain Caused by Invasive Procedures: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Comput Intell Neurosci.* 2022; 2022: 2577158.
 - 152- Klopp J, Ferretti P, Meyer CU, Hilbert K, Haiß A, Marißen J, et al. Meconium Microbiome of Very Preterm Infants across Germany. *mSphere.* 2022; 7 (1): e0080821.
 - 153- Hanachi M, Maghrebi O, Bichiou H, Trabelsi F, Bouyahia NM, Zhioua F, et al. Longitudinal and Comparative Analysis of Gut Microbiota of Tunisian Newborns According to Delivery Mode. *Front Microbiol.* 2022; 13: 780568.
 - 154- 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.* 2016; 16 (1): 86.
 - 155- Ferretti P, Pasolli E, Tett A, Asnicar F, Gorfer V, Fedi S, et al. Mother-to-Infant Microbial Transmission from Different Body Sites Shapes the Developing Infant Gut Microbiome. *Cell Host Microbe.* 2018; 24 (1): 133-145.e5.
 - 156- Toscano M, De Grandi R, Peroni DG, Grossi E, Facchin V, Comberiati P, et al. Impact of delivery mode on the colostrum microbiota composition. *BMC Microbiol.* 2017; 17 (1): 205.
 - 157- Lyons KE, Shea CO', Grimaud G, Ryan CA, Dempsey E, Kelly AL, et al. The human milk microbiome aligns with lactation stage and not birth mode. *Sci Rep.* 2022; 12 (1): 5598.
 - 158- Banić M, Butorac K, Čuljak N, Leboš Pavunc A, Novak J, Bellich B, et al. The Human Milk Microbiota Produces Potential Therapeutic Biomolecules and Shapes the Intestinal Microbiota of Infants. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (22): 14382.
 - 159- Zijlmans MA, Korpela K, Riksen-Walraven JM, de Vos WM, de Weerth C. Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. *Psychoneuroendocrinology.* 2015; 53: 233-45.
 - 160- Hatmal MM, Al-Hatamleh MAI, Olaimat AN, Alshaer W, Hasan H, Albakri KA, et al. Immunomodulatory Properties of Human Breast Milk: MicroRNA Contents and Potential Epigenetic Effects. *Biomedicines.* 2022; 10 (6): 1219.
 - 161- Browne PD, Aparicio M, Alba C, Hechler C, Beijers R, Rodríguez JM, et al. Human Milk Microbiome and Maternal Postnatal Psychosocial Distress. *Front Microbiol.* 2019; 10: 2333.
 - 162- Keskitalo A, Aatsinki AK, Kortessluoma S, Peltö J, Korhonen L, Lahti L, et al. Gut microbiota diversity but not composition is related to saliva cortisol stress response at the age of 2.5 months. *Stress.* 2021; 24 (5): 551-560.
 - 163- Rosin S, Xia K, Azcarate-Peril MA, Carlson AL, Propper CB, Thompson AL, et al. A preliminary study of gut microbiome variation and HPA axis reactivity in healthy infants. *Psychoneuroendocrinology.* 2021; 124: 105046.

- 164- Weiss SJ, Hamidi M. Maternal stress during the third trimester of pregnancy and the neonatal microbiome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2023;36(1): 2214835.
- 165- Toubon G, Butel MJ, Rozé JC, Lepage P, Delannoy J, Ancel PY, et al. Very Preterm Children Gut Microbiota Comparison at the Neonatal Period of 1 Month and 3.5 Years of Life. *Front Microbiol.* 2022; 13: 919317.
- 166- Wan Y, Jiang J, Lu M, Tong W, Zhou R, Li J, et al. Human milk microbiota development during lactation and its relation to maternal geographic location and gestational hypertensive status. *Gut Microbes.* 2020; 11 (5): 1438-1449.
- 167- Yang J, Yao S, Cheng K, Xu L, Hou L, Wei Y, et al. Comparison of Meconium Microbiome in Dizygotic and Monozygotic Twins Born by Caesarean Section (CS). *Front Microbiol.* 2020; 11: 1139.
- 168- Matharu D, Ponsero AJ, Dikareva E, Korpela K, Kolho KL, de Vos WM, et al. *Bacteroides* abundance drives birth mode dependent infant gut microbiota developmental trajectories. *Front Microbiol.* 2022; 13: 953475.
- 169- Reyman M, van Houten MA, van Baarle D, Bosch AATM, Man WH, Chu MLJN, et al. Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 4997.
- 170- González-Rodríguez RI, Jiménez-Escobar I, Gutiérrez-Castrellón P. Microbiota de la leche humana y su impacto en la salud humana. *Gac Med Mex.* 2020;156 (Supl 3): S58-S66.
- 171- 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.* 2010; 107 (26): 11971-5.
- 172- Fernández L, Pannaraj PS, Rautava S, Rodríguez JM. The Microbiota of the Human Mammary Ecosystem. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 586667. doi: 10.3389/fcimb.2020.586667.
- 173- Lee JK, Hern Tan LT, Ramadas A, Ab Mutalib NS, Lee LH. Exploring the Role of Gut Bacteria in Health and Disease in Preterm Neonates. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17 (19): 6963.
- 174- Zou ZH, Liu D, Li HD, Zhu DP, He Y, Hou T, et al. Prenatal and postnatal antibiotic exposure influences the gut microbiota of preterm infants in neonatal intensive care units. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2018; 17 (1): 9.
- 175- 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.
- 176- Ji C, Zhang G, Xu S, Xiang Q, Huang M, Zhao M, et al. Antibiotic treatments to mothers during the perinatal period leaving hidden trouble on infants. *Eur J Pediatr.* 2022; 181 (9): 3459-3471.
- 177- Notarbartolo V, Giuffrè M, Montante C, Corsello G, Carta M. Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2022 ;25 (3): 194-210.
- 178- Hermansson H, Kumar H, Collado MC, Salminen S, Isolauri E, Rautava S. Breast Milk Microbiota Is Shaped by Mode of Delivery and Intrapartum Antibiotic Exposure. *Front Nutr.* 2019; 6: 4.
- 179- Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96(3): 544-51.

- 180- Jašarević E, Howard CD, Misic AM, Beiting DP, Bale TL. Stress during pregnancy alters temporal and spatial dynamics of the maternal and offspring microbiome in a sex-specific manner. *Sci Rep*. 2017; 7: 44182.
- 181- Mastromarino P, Capobianco D, Miccheli A, Praticò G, Campagna G, Laforgia N, et al. Administration of a multistrain probiotic product (VSL#3) to women in the perinatal period differentially affects breast milk beneficial microbiota in relation to mode of delivery. *Pharmacol Res*. 2015; 95-96: 63-70.
- 182- Jeong S. Factors influencing development of the infant microbiota: from prenatal period to early infancy. *Clin Exp Pediatr*. 2022; 65 (9) :439-447.
- 183- Łubiech K, Twarużek M. *Lactobacillus* Bacteria in Breast Milk. *Nutrients*. 2020; 12 (12): 3783.
- 184- Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Mueller M, Radke M, Blaut M. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. *Pediatr Res*. 2008; 64 (4): 418-22.
- 185- Björkström MV, Hall L, Söderlund S, Håkansson EG, Håkansson S, Domellöf M. Intestinal flora in very low-birth weight infants. *Acta Paediatr*. 2009; 98 (11): 1762-7.
- 186- Nagpal R, Kurakawa T, Tsuji H, Takahashi T, Kawashima K, Nagata S, et al. Evolution of gut *Bifidobacterium* population in healthy Japanese infants over the first three years of life: a quantitative assessment. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 10097.
- 187- Hu J, Ly J, Zhang W, Huang Y, Glover V, Peter I, et al. Microbiota of newborn meconium is associated with maternal anxiety experienced during pregnancy. *Dev Psychobiol*. 2019; 61 (5): 640-649.
- 188- Saari A, Virta LJ, Sankilampi U, Dunkel L, Saxen H. Antibiotic exposure in infancy and risk of being overweight in the first 24 months of life. *Pediatrics*. 2015; 135 (4): 617-26.
- 189- Jaramillo Espinosa L, Vasquez Trespalacios E, Alfaro Velasquez JM. Uso temprano de antibióticos en la infancia y obesidad pediátrica: revisión sistemática de la literatura. *Infectio*. 2019; 23 (4): 357-363.
- 190- Xiao L, Wang J, Zheng J, Li X, Zhao F. Deterministic transition of enterotypes shapes the infant gut microbiome at an early age. *Genome Biol*. 2021; 22 (1): 243.
- 191- Westaway JAF, Huerlimann R, Kandasamy Y, Miller CM, Norton R, Staunton KM, et al. The bacterial gut microbiome of probiotic-treated very-preterm infants: changes from admission to discharge. *Pediatr Res*. 2022; 92 (1): 142-150.

ANEXOS

ANEXO 1. DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS



DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS:

EDAD DE LA MADRE:

NÚMERO DE EMBARAZOS:

NIVEL DE ESTUDIOS:

- Sin estudios ☐
- Primarios ☐
- Secundarios ☐
- Superiores ☐

TIPO DE PARTO:

- Vaginal ☐
- Cesárea ☐

ENFERMEDADES CONCOMITANTES DE LA MADRE Y CUÁLES:

EDAD GESTACIONAL:

PESO DEL NIÑO AL NACIMIENTO:

SEXO:

GEMELARIDAD:

DIAGNÓSTICOS AL ALTA:

ANEXO 2. ESCALA DE ESTRÉS PARENTAL (PSS:NICU)

ESCALA DE ESTRÉS EN LOS PADRES: UNIDAD NEONATAL DE CUIDADOS INTENSIVOS:

Las enfermeras y otros empleados que trabajan en unidades neonatales de cuidados intensivos están interesados en cómo este ambiente y esta experiencia afecta a los padres. La unidad Neonatal de cuidados intensivos es la habitación donde su bebé recibe cuidados médicos. A veces llamamos a esta habitación la UCIN, a modo de abreviación. Nos gustaría saber sobre su experiencia como madre cuyo bebé está ahora en la UCIN.

Este cuestionario describe varias experiencias que otros padres han caracterizado de estresantes cuando su bebé estaba en la UCIN. Nos gustaría que usted indique lo estresante que ha sido para usted cada experiencia que describimos a continuación. Si no ha tenido una de las experiencias que describimos, conteste NA para indicar que no ha experimentado ese aspecto. Cuando mencionamos la palabra estresante, queremos decir que la experiencia le ha hecho sentir ansiosa, nerviosa, tensa.

En el cuestionario marque el número que mejor describa cómo de estresante ha sido cada experiencia para usted. Debe de puntuar en una escala numérica de 1 a 5:

1 -No ha sido estresante en absoluto: la experiencia no le hizo sentir ansiosa, nerviosa o tensa.

2- Un poco estresante.

3- Moderadamente estresante.

4-Muy estresante.

5- Extremadamente estresante: la experiencia le enfadó y le causó una gran ansiedad o tensión.

Recuerde, si no ha experimentado algunas situaciones que describimos marque NA "no aplicable".

Como ejemplo: Las luces fuertes en la UCIN.

Si, por ejemplo, usted cree que las luces de la unidad Neonatal de cuidados intensivos eran extremadamente estresantes, usted debe marcar el número 5:

Si usted cree que las luces no fueron estresantes en absoluto, debe marcar el número 1

Si las luces fuertes no estaban encendidas cuando usted visitó a su hijo/a, usted debe marcar NA, indicando así "no aplicable":

A continuación, hay una lista de varias VISTAS Y SONIDOS comunes en una UCIN.

Estamos interesados en saber su opinión sobre qué tan estresantes fueron estas VISTAS Y SONIDOS para usted. Marque el número que mejor represente su nivel de estrés. Si usted no vio o escuchó lo que describimos, marque NA para indicar "no aplicable".

1. La presencia de los monitores y los aparatos. NA 1 2 3 4 5

2. Los ruidos constantes de monitores y de aparatos. NA 1 2 3 4 5

3. Los ruidos repentinos de las alarmas del monitor. NA 1 2 3 4 5

4. Los otros bebés enfermos en la UCIN. NA 1 2 3 4 5

5. El gran número de personas trabajando en la unidad. NA 1 2 3 4 5

A continuación, hay una lista de situaciones que podrían describir EL ASPECTO Y COMPORTAMIENTO DE SU BEBÉ cuando usted lo visita la UCIN y algunos de los TRATAMIENTOS aplicados a su bebé. No todos los bebés tienen estas experiencias o el mismo aspecto. Marque NA si no ha experimentado o visto lo que describimos. Si, por el contrario, lo que describimos refleja algo que usted haya experimentado, indique entonces qué tan estresante fue la experiencia para usted marcando el número apropiado.

1. Tubos o aparatos puestos o cerca de mi bebé. NA 1 2 3 4 5
2. Moretones, cortes, o incisiones en mi bebé. NA 1 2 3 4 5
3. Un color poco usual en mi bebé (por ejemplo, pálido o amarillo). NA 1 2 3 4 5
4. Una forma de respirar anormal o poco usual. NA 1 2 3 4 5
5. Ver un cambio repentino de color en mi bebé (por ejemplo, ponerse pálido o azul). NA 1 2 3 4 5
6. Ver a mi bebé dejar de respirar. NA 1 2 3 4 5
7. El pequeño tamaño de mi bebé. NA 1 2 3 4 5
8. El aspecto arrugado de mi bebé. NA 1 2 3 4 5
9. Tener una máquina (respirador) que respira por mi bebé. NA 1 2 3 4 5
10. ver agujas y tubos puestos en mi bebe. NA 1 2 3 4 5
11. Mi bebé siendo alimentado por medio de una sonda o tubo intravenoso. NA 1 2 3 4 5
12. Cuando mi bebé parecía tener algún dolor. NA 1 2 3 4 5
13. Mi bebé llorando mucho tiempo. NA 1 2 3 4 5
14. Cuando mi bebé parecía asustado. NA 1 2 3 4 5
15. Cuando mi bebé parecía triste. NA 1 2 3 4 5
16. La apariencia débil de mi bebé. NA 1 2 3 4 5
17. Movimientos espasmódicos o nerviosos de mi bebé. NA 1 2 3 4 5
18. Mi bebé no pudo llorar como los otros bebés. NA 1 2 3 4 5
19. Dar unas palmaditas a mi bebé para despejarle el pecho. NA 1 2 3 4 5

Las últimas preguntas que queremos hacerle son sobre cómo se siente usted respecto a su propia RELACIÓN con su bebé y su PAPEL DE MADRE. Si usted ha experimentado las siguientes situaciones o sentimientos, indique qué tan estresada ha estado, marcando con un círculo el número apropiado. Una vez más, señale con un círculo NA si no experimentó lo que describimos.

1. Estar separado de su bebé. NA 1 2 3 4 5
2. No alimentar yo misma a mi bebé. NA 1 2 3 4 5
3. No ser capaz de abrazar a mi bebé yo misma (por ejemplo, ponerle los pañales o bañarlo). NA 1 2 3 4 5
4. No ser capaz de coger en brazos a mi bebe cuando quiera. NA 1 2 3 4 5
5. A veces, olvidar cómo es mi bebé. NA 1 2 3 4 5
6. No ser capaz de compartir a mi bebé con otros miembros de la familia. NA 1 2 3 4 5
7. Sentirme impotente e incapaz de proteger a mi bebé del dolor y de procesos dolorosos. NA 1 2 3 4 5
8. Tener miedo de tocar o coger a mi bebé en brazos. NA 1 2 3 4 5
9. Sentir que el personal está más cerca de mi bebé de lo que yo lo estoy. NA 1 2 3 4 5
10. Sentirme impotente sobre cómo ayudar a mi bebé durante esta etapa. NA 1 2 3 4 5

También estamos interesados en saber si usted experimentó algún tipo de estrés relacionado con el COMPORTAMIENTO y LA COMUNICACIÓN DEL PERSONAL.

De nuevo, si usted experimentó lo que describimos, indique qué tan estresante fue la experiencia marcando con un círculo el número apropiado. Si no experimentó lo que describimos, señale con un círculo NA ("no aplicable"). Recuerde que sus respuestas son confidenciales y no serán compartidas o discutidas con ningún miembro del personal.

1. El personal explicando las cosas muy rápidas. NA 1 2 3 4 5
2. El personal usando palabras que no entiendo. NA 1 2 3 4 5
3. Que me digan versiones diferentes sobre la condición de mi bebé. NA 1 2 3 4 5
4. Que no me den suficiente información sobre Las pruebas y tratamientos aplicados a mi bebé. NA 1 2 3 4 5

5. Que no hablen conmigo lo suficiente. NA 1 2 3 4 5

6. Muchas y distintas personas (doctores, enfermeras, otros) hablándome. NA 1 2 3 4 5

7. Dificultad en obtener información o ayuda cuando visito o llamo por teléfono a la unidad.
NA 1 2 3 4 5

8. No tener la seguridad de que me llamen para informarme de cambios sobre la condición de mi bebé. NA 1 2 3 4 5

9. Que el personal parezca preocupado sobre mi bebé. NA 1 2 3 4 5

10. Que el personal actúe como si no quisieran a los padres en la unidad. NA 1 2 3 4 5

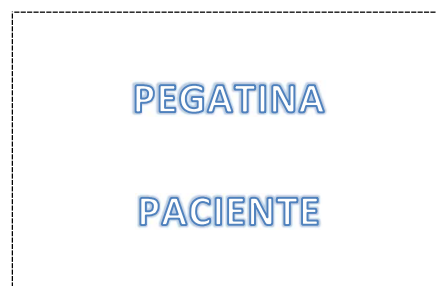
11. Que el personal actúe como si no entendieran el comportamiento de mi bebé o sus necesidades especiales. NA 1 2 3 4 5

Usando la misma escala indique qué tan estresante fue EN GENERAL para usted la experiencia de tener a su hijo hospitalizado en la UCIN. NA 1 2 3 4 5

Muchas gracias por su ayuda.

¿Hubo algo más que fuera estresante para usted durante la estancia de su hijo en la Unidad Neonatal de Cuidados Intensivos? Por favor, describa abajo:

ANEXO 3. CANTIDAD DE LECHE MATERNA EXTRAÍDA



Volumen de leche materna extraída por la madre (ml):

Día 1:		Día 9:	
Día 2:		Día 10:	
Día 3:		Día 11:	
Día 4:		Día 12:	
Día 5:		Día 13:	
Día 6:		Día 14:	
Día 7:		Día 15:	
Día 8:			

ANEXO 4. INFORMACIÓN A LOS PADRES PREVIA AL ESTUDIO

HOJA DE INFORMACIÓN

TÍTULO DEL ESTUDIO: INFLUENCIA DEL ESTRÉS MATERNO EN LA CALIDAD Y CANTIDAD DE LECHE MATERNA, EN LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EN LA EVOLUCIÓN INMEDIATA DEL RECIÉN NACIDO PREMATURO ≤ 32 SEMANAS DE GESTACIÓN Y/O ≤ 1500 GRAMOS.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: M^a DEL CARMEN FERNÁNDEZ TUÑAS.

CENTRO: HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

Este documento tiene por objeto ofrecerle información sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de investigación Santiago-Lugo.

Si decide participar en el mismo debe recibir información personalizada del investigador, leer antes este documento y hacer todas las preguntas que precise para comprender los detalles sobre el mismo. Si así lo desea puede llevar el documento, consultarlo con otras personas y tomar el tiempo necesario para decidir si participar o no.

La participación en este estudio es completamente voluntaria. Usted puede decidir no participar o, si acepta hacerlo, cambiar de parecer retirando el consentimiento en cualquier momento sin la obligación de dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a la relación con los profesionales sanitarios que le atienden ni a la asistencia sanitaria a la que usted tiene derecho.

¿Cuál es la finalidad del estudio?

En este estudio se pretende demostrar cómo el estrés influye negativamente en la cantidad y calidad de la leche materna, analizando la cantidad de glucosa, proteínas, grasas y cantidad de Bifidobacterias y Lactobacilos presentes, así como una disminución de bacterias del tracto gastrointestinal del niño prematuro, aumento de marcadores inflamatorios intestinales y una peor evolución.

¿Por qué me ofrecen participar a mí?

Usted puede participar en el estudio porque está dentro de las premisas del mismo. Es madre de un niño prematuro $<$ de 32 semanas de gestación o de un niño con un peso inferior a 1500 gramos y está proporcionando leche materna a su hijo.

¿En qué consiste mi participación?

Su participación consiste en el consentimiento para la recogida de tres muestras tanto de lactancia materna como de heces de su hijo, durante unos momentos puntuales de su proceso de ingreso hospitalario del mismo, así como en la cumplimentación de una encuesta con la que pretendemos medir su nivel de estrés en esos tres momentos puntuales. De esta forma intentaríamos averiguar cómo el estrés influye tanto en la calidad como en la cantidad de la leche materna y en la microbiota intestinal de su hijo y en la de su leche.

Las muestras de leche materna y heces del niño se enviarán al laboratorio de Microbiología, donde serán analizadas y cultivadas para averiguar la flora bacteriana.

Su participación tendrá una duración estimada de 15 días, que es el tiempo que dura la recogida de datos.

¿Qué molestias o inconvenientes tiene?

No se prevén inconvenientes.

¿Obtendré algún beneficio por participar?

No se espera que usted obtenga beneficio directo por participar en el estudio. La investigación pretende descubrir aspectos desconocidos o poco claros sobre el efecto del estrés en la leche materna y en la microbiota intestinal del recién nacido. Esta información podrá ser de utilidad en el futuro para otras personas.

¿Recibiré la información que se obtenga del estudio?

Si usted lo desea, se le facilitará un resumen de los resultados del estudio.

¿Se publicarán los resultados de este estudio?

Los resultados de este estudio serán remitidos a publicaciones científicas para su difusión, pero no se transmitirá ningún dato que pueda llevar a la identificación de los participantes.

Información referente a sus datos:

La obtención, tratamiento, conservación, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto por el Reglamento General de Protección de Datos (Reglamento UE 2016-679 del Parlamento europeo y del Consejo, del 27 de abril de 2016), la normativa española sobre protección de datos de carácter personal vigente, la Ley 14/2007 de investigación biomédica y el RD 1716/2011.

La institución en la que se desenvuelve esta investigación es la responsable del tratamiento de sus datos, pudiendo contactar con la responsable del estudio en el teléfono; 981-950162.

Los datos necesarios para llevar a cabo este estudio serán recogidos y conservados de modo seudonimizado (codificado). La seudonimización es el tratamiento de datos personales de forma que no podrán atribuirse a un interesado sin que se emplee información adicional. En este estudio solo el equipo investigador conocerá el código que permitirá saber su identidad.

La normativa que rige el tratamiento de datos personales le otorga el derecho de acceder a sus datos, oponerse, corregirlos, cancelarlos, limitar su tratamiento, restringir o solicitar la supresión de sus datos. También puede solicitar una copia de los mismos o que ésta sea remitida a un tercero (derecho de portabilidad).

Para ejercer estos derechos puede usted dirigirse a la responsable del estudio en el teléfono: 981-950162.

Así mismo, usted tiene derecho a interponer una reclamación ante la Agencia Española de Protección de Datos, cuando considere que alguno de sus derechos no fue respetado.

Sólo el equipo investigador y las autoridades sanitarias que deben de guardar la confidencialidad, tienen acceso a todos los datos recogidos en el estudio. Se podrá transmitir a terceros información que no pueda ser identificada. En caso de que alguna información sea transmitida a otros países, se realizará con un nivel de protección de los datos equivalente, como mínimo, al exigido por la normativa española y europea.

Al finalizar el estudio, o el plazo legal establecido, los datos recogidos serán eliminados o guardados anónimos para su uso en futuras investigaciones, según lo que usted escoja en la hoja de firma del consentimiento.

En cuanto a las muestras biológicas (LM y heces del neonato), éstas serán analizadas en los laboratorios de microbiología y laboratorio central, donde una vez estudiadas procederán a su eliminación por los cauces habituales, según los protocolos establecidos en dichas áreas.

¿Existen intereses económicos en este estudio?

No existe ningún interés económico en este estudio.

¿Cómo contactar con el equipo investigador del estudio?

Usted puede contactar con M^a del Carmen Fernández Tuñas en el teléfono 981950162, o dirección de mail: mariadelcarmen.fernandez.tunas@sergas.es

ANEXO 5. CONSENTIMIENTO INFORMADO

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: INFLUENCIA DEL ESTRÉS MATERNO EN LA CALIDAD Y CANTIDAD DE LA LACTANCIA MATERNA, EN LA MICROBIOTA INTESTINAL Y EN LA EVOLUCIÓN INMEDIATA DEL RECIÉN NACIDO PREMATURO ≤ 32 SEMANAS DE GESTACIÓN Y/O ≤ 1500 GRAMOS.

YO, _____ (nombre y apellidos),
representante legal de _____ (nombre y apellidos):

- Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude hablar con M^a del Carmen Fernández Tuñas y hacer todas las preguntas sobre el estudio.
- Comprendo que mi participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Accedo a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.
- Presto libremente mi conformidad para que participe en este estudio.

Al finalizar el estudio, los DATOS serán: acepto que sean:

- Acepto que sean anonimizados para usos futuros en otras investigaciones.....☐
- No acepto que sean anonimizados para usos futuros en otras investigaciones...☐

RESTRICCIONES DE USO: No autorizo a emplear mis muestras en investigaciones que

.....
.....
.....

Firmado.: El/ La representante legal
Nombre y apellidos:
Fecha:

Firmado: La investigadora que solicita el
consentimiento
Nombre y apellidos:
Fecha:

ANEXO 6. COMITÉ DE ÉTICA



Comité de Ética de la Investigación
Santiago Lugo



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Ana Estany Gestal, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 17 de septiembre de 2019 el estudio:

Título: Influencia do estrés materno na calidade e cantidade da lactancia materna, na microbiota intestinal e na evolución inmediata do recién nacido prematuro < 32 semanas de xestación e/ou < 1500 gramos

Versión: 3.0

Promotor/a: María del Carmen Fernández Tuñas

Código de Registro: 2019/229

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.

ANEXO 7. ICONOGRAFÍA

En esta tesis doctoral, desarrollada por *M^a del Carmen Fernández Tuñas*, con título *Influencia del estrés materno en la calidad y cantidad de leche materna, en la microbiota intestinal y en la evolución inmediata del recién nacido prematuro ≤ 32 semanas de gestación y/o ≤ 1500 gramos*, se presentan imágenes de pacientes obtenidas bajo consentimiento materno con fines docentes.

La autora de la tesis se declara responsable de la publicación de dichas fotos.

En Santiago de Compostela, a 23 de Enero de 2024

ANEXO 8. APORTACIONES CIENTÍFICAS

1. Fernández-Tuñas MDC ^{1,2,3}, Pérez-Muñuzuri A ^{1,2,3,4}, Trastoy-Pena R ⁵, Pérez Del Molino ML ⁵, Couce ML ^{1,2,3,4}. Effects of Maternal Stress on Breast Milk Production and the Microbiota of Very Premature Infants. *Nutrients*. 2023 Sep 16; 15(18): 4006. doi: 10.3390/nu15184006. ISSN: 2072-6643.

¹ Servicio de Neonatología, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela; Santiago de Compostela, España.

² Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela-IDIS; Santiago de Compostela, España.

³ Primary Care Interventions to Prevent Maternal and Child Chronic Diseases of Perinatal and Developmental Origin (RICORS-SAMID).

⁴ Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela; Santiago de Compostela, España.

⁵ Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela; Santiago de Compostela, España.

Contribución específica en la publicación: diseño del estudio, recogida y análisis estadístico de los datos, redacción y revisión del manuscrito original.

Índices de calidad: *Nutrients* es una revista Open Access que presenta en el año 2022 un factor de impacto de 5.9 y un factor de impacto acumulado de 5 años de 6.6. Ocupa la siguiente posición en las siguientes categorías: JCR - Q1 (*Nutrition & Dietetics*) / CiteScore - Q1 (*Nutrition and Dietetics*). (<https://www.mdpi.com>)

Este artículo contiene parte de los resultados expuestos en el capítulo 5 de esta Tesis Doctoral.

2. Microbiota en la lactancia materna y el recién nacido: su relación con el estrés y la calprotectina fecal. Comunicación Oral en el XXIX Congreso Neonatología y Medicina Perinatal y IX Congreso Enfermería Neonatal (Octubre 2023).
3. Influencia del estrés en la instauración de la lactancia materna en los primeros días de vida. Comunicación tipo Póster con defensa en el XXIX Congreso Neonatología y Medicina Perinatal y IX Congreso Enfermería Neonatal (Octubre 2023).
4. La calprotectina fecal y la influencia del estrés materno en la microbiota de la leche materna e intestinal del recién nacido prematuro. Comunicación Oral en el 73 Congreso de la Sociedad de Pediatría de Galicia (Noviembre 2023).
5. Primer Premio a la Mejor Comunicación de Neonatología presentada en el 73 Congreso de la Sociedad de Pediatría de Galicia (Noviembre 2023), otorgado por la Asociación Gallega de Neonatología (ASOGANE).

Article

Effects of Maternal Stress on Breast Milk Production and the Microbiota of Very Premature Infants

María del Carmen Fernández-Tuñas ^{1,2,3}, Alejandro Pérez-Muñuzuri ^{1,2,3,4,*} , Rocío Trastoy-Pena ⁵ ,
 María Luisa Pérez del Molino ⁵ and María L. Couce ^{1,2,3,4,*} 

- ¹ Department of Neonatology, University Clinical Hospital of Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain; carmen.fernandez.tunas@sergas.es
- ² IDIS-Health Research Institute of Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain
- ³ Primary Care Interventions to Prevent Maternal and Child Chronic Diseases of Perinatal and Developmental Origin (RICORS-SAMID), Carlos III Health Institute, 5 Monforte de Lemos Av., 28029 Madrid, Spain
- ⁴ Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, 15706 Santiago de Compostela, Spain
- ⁵ Department of Microbiology, University Hospital of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela University, 15706 A. Coruña, Spain; rocio.trastoy.pena@sergas.es (R.T.-P.); maria.luisa.perez.del.molino.bernal@sergas.es (M.L.P.d.M.)
- * Correspondence: apmunuzuri@yahoo.es (A.P.-M.); maria.luz.couce.pico@sergas.es (M.L.C.); Tel.: +34-981950162 (A.P.-M.); +34-981950151 (M.L.C.)



Citation: Fernández-Tuñas, M.d.C.; Pérez-Muñuzuri, A.; Trastoy-Pena, R.; Pérez del Molino, M.L.; Couce, M.L. Effects of Maternal Stress on Breast Milk Production and the Microbiota of Very Premature Infants. *Nutrients* 2023, 15, 4006. <https://doi.org/10.3390/nu15184006>

Academic Editors: Giovanna Verlati and Xanthi I. Courouli

Received: 15 August 2023

Revised: 6 September 2023

Accepted: 12 September 2023

Published: 16 September 2023



Copyright: © 2023 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Perinatal stress experienced by mothers of very premature newborns may influence the mother's milk and the infant's intestinal microbiota. This prospective study of mothers of very preterm infants fed with mother's own milk (MOM) was carried out in a tertiary hospital over a 2-year period. The assessment of maternal stress in 45 mothers of 52 very preterm newborns using the parental stress scale (PSS:NICU) revealed an inverse relationship between stress and MOM production in the first days of life ($p = 0.012$). The greatest contributor to stress was the one related to the establishment of a mother–child bond. Maternal stress was lower in mothers in whom the kangaroo method was established early ($p = 0.011$) and in those with a higher educational level ($p = 0.032$). Levels of fecal calprotectin (FC) decreased with the passage of days and were directly correlated with birthweight ($p = 0.044$). FC levels 7 days post-delivery were lower in newborns that received postnatal antibiotics ($p = 0.027$). High levels of maternal stress resulted in progressive decreases and increases in the proportions of Firmicutes and Proteobacteria species, respectively, over 15 days post-delivery, both in MOM and in fecal samples from premature newborns. These findings underscore the importance of recognizing and appropriately managing maternal stress in neonatal units, given its marked influence on both the microbiota of maternal milk and the intestinal microbiota of premature newborns.

Keywords: fecal calprotectin; maternal stress; microbiota; mother's own milk; very preterm

1. Introduction

Transmission of maternal bacteria to the intestine of a newborn through breast milk has been widely demonstrated, influencing the development of the intestinal microbiota of a newborn. Mother's own milk (MOM) is the gold standard nutritional source during the first months of life in both full-term and premature infants. Milk from mothers of premature newborns is adapted to the moment of the infants' birth, containing higher levels of immunological and anti-inflammatory factors (e.g., lactoferrin), and of protein, sodium, fat, and minerals such as calcium or phosphorus. Premature newborns absorb a very high percentage of lipids from MOM (90%), with a very important contribution from long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA), such as docosahexaenoic acid and arachidonic acid, wherein energy intake from breast milk is higher than in a full-term newborns (58–70 Kcal/dL vs. 48–64 Kcal/dL) [1–3]. Very preterm infants fed with

mother's own milk (MOM) have lower rates of neonatal morbidity and improved long-term metabolic and neurocognitive outcomes [4–6]. Furthermore, MOM has large amounts of circulating microRNAs, some of which are of great relevance in the immunoregulation of a newborn's immune system. Health teams working in neonatal intensive care units (NICUs) should provide support to the mothers of premature newborns to facilitate breastfeeding establishment and maintenance, her presence for the newborn, and establish the kangaroo method as early as possible, which favors a reduction in maternal stress and facilitates the production of breast milk [7–11].

The vast majority of premature newborns initially require donated human milk (DHM) when MOM is still not enough to cover a newborn's needs, probably due to maternal stress from the premature birth, separation of the mother from her baby, or concern about the clinical status of the child. In these circumstances, breast milk establishment and maintenance will be an important challenge. DHM is pasteurized in the donated human milk banks. The caloric or macronutrient content is not altered by this process, although it can variably affect the biologically active components. The potential mechanisms by which DHM reduces necrotizing enterocolitis (NEC) [12] include reduced exposure to bovine antigens and the effects of functional components such as lactoferrin and human milk oligosaccharides, which may act positively on gut microbiota [13–15].

The mother's microbiota colonizes the child from the intestinal bacteria during pregnancy with bacteria present in the birth canal, including the vaginal and perianal area, and bacteria from the skin and in MOM. This process favors adequate colonization by harmless microorganisms that protect a newborn from pathogens. Adequate and diverse colonization positively influences the immune, metabolic, cognitive, and sensory development of a newborn [16–18]. The intestinal microbiota of a newborn is very simple at birth and is influenced by the type of delivery, the use of antibiotics, or the type of diet, with the MOM being one of the first sources of bacteria. The bacterial phyla most frequently found in MOM includes *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, and *Proteobacteria*, closely resembling the make-up of the mother's intestinal bacteria. MOM also contains skin bacteria such as *Streptococcus* and *Staphylococcus*. Complex carbohydrates present in the MOM promote the development of *Bifidobacterium*, which are the dominant species in newborn's intestine fed with MOM, that delay the implantation of enterobacteria. Infants fed with artificial formula have higher levels of *Enterobacteria* and lower levels of *Bifidobacterium* [19–23].

There is a dearth of studies assessing the effect of maternal stress on the gut microbiota of mothers of very premature newborns; most studies of prenatal stress have been conducted in animal models. Stress is known to promote intestinal and vaginal dysbiosis in the mother, transmitting it to the newborn. Studies carried out in both humans and animals show different results about bacterial diversity in relation to maternal stress. A recently published study tells us about greater bacterial biodiversity in the children of mothers with a mild/moderate level of prenatal stress, which makes them better prepared to face extrauterine life [24]. Although rarely taken into account, maternal stress is an important factor, whose appearance and inadequate management could lead to a poor establishment of breastfeeding, or even alter the production or modify the composition of breast milk. We examined the association between postnatal maternal stress and the production and composition of breast milk through the process of bacterial colonization of the intestine of very premature infants [24–29].

2. Material and Methods

2.1. Study Design

This prospective observational study was carried out over a 2-year period, from 1 May 2019 to 30 April 2021, at the NICU of the level III Clinical University Hospital of Santiago de Compostela. The study included premature newborns, weighing less than 1500 g and/or less than 32 weeks of gestational age (GA) who were breastfed, and their mothers. The follow-up of both mothers and neonates spanned the first 15 days of the newborns' life.

The study was approved by the local ethics committee (registration code 2019/229) and data were collected in an encrypted manner in a database.

2.2. Study Population

The study population consisted of 52 premature newborns with a GA ≤ 32 weeks and/or bodyweight ≤ 1500 g, and their 45 mothers, who provided written informed consent (IC) and breastfed their newborns (Supplementary Figure S1). The following data were collected:

- Sociodemographic data: mother's age (≥ 35 years and < 35 years); educational level (primary, secondary, higher); type of delivery (vaginal or cesarean section); GA; twinhood; newborn sex and bodyweight.
- Data on the clinical status of premature newborns: respiratory support (invasive mechanical ventilation [IMV], non-invasive mechanical ventilation [NIMV]) required or not; hemodynamically significant patent ductus arteriosus; sepsis; antibiotics received by newborn; antibiotics received by mother prior to delivery; days of parenteral nutrition; complete enteral nutrition; degree of feeding tolerance; start date of milk fortification; and evolution of newborn's bodyweight.
- Initiation of kangaroo method: early (from birth to ≤ 4 days), intermediate (5–7 days), or late (≥ 8 days).
- Exposure to stress in mothers of premature newborns, measured using the parental stress scale (PSS:NICU).
- Breast milk parameters, determined by nutritional analysis and study of microbiota.
- Fecal calprotectin (FC) and microbiota, evaluated in fecal samples from premature newborns.

2.3. Inclusion and Exclusion Criteria

The following inclusion criteria were applied: all premature newborns ≤ 32 weeks GA and/or ≤ 1500 g body weight and their mothers, who specified the intention of breastfeeding and provided written IC to participate in the study. The exclusion criteria were as follows: newborns whose participation in the study was not compatible due to their very serious pathologies that did not make it possible to receive MOM; mothers who intend to give their own milk but abandoned to breastfeed in the 15 first days of life.

2.4. Outcome Measures

2.4.1. Anthropometric Assessment

Weight was measured accurate to the nearest 10 g. Measurements were taken by the same researcher in duplicate to minimize intra-observer bias. Weight percentiles were calculated using the Fenton scale.

2.4.2. Parental Stress Scale

To quantify stress in mothers of preterm infants, the PSS:NICU [30–33] was used. This consists of 5 subscales: (i) visual and auditory stimuli (VAS) in the NICU which is the stress generated by what they see and hear; (ii) physical appearance and behavior of the newborn (PAB), which is the stress generated by the physical appearance and behavior of the newborn; (iii) mother's relationship with the newborn and maternal role (MR), defined as the stress caused by the individual perception of her role as mother and the establishment of the maternal bond; (iv) communication with health personnel (CWS), which is the stress generated by the relationship with the health personnel; (v) common stress (CS) defined as the individual perception of stress to which the mother is subjected. The complete scale consists of a total of 46 items, each of which is rated by the user using a 5-point Likert scale, where 1 corresponds to no stress and 5 to extremely stressful. The overall score of the 46 items is weighted to obtain a total stress (TS) rating. The total stress experienced by the mother was defined as high or low depending on whether it was above or below the median value on 3, 7, and 15 days after birth of the newborn.

2.4.3. Nutritional Analysis of Macronutrients in MOM

A 5-mL sample of fresh MOM was collected on days 3, 7, and 15 after the birth of the newborn and its nutritional content (proteins, fats, and carbohydrates) was analyzed using the human milk analyzer with FTIR technology (MilkoScan™ Mars, FOSS, Hilleroed, Denmark) [34]. MOM samples were collected directly from milk expressed by the mother in the morning when she attended the neonatal intensive care unit (NICU) using a breast pump. MOM that is extracted manually can have a higher fat content than milk extracted using a breast pump [35]. This was taken into account when collecting the samples, and the same process was used to collect all samples to avoid variation. MOM was collected in a sterile bottle, homogenized by shaking it several times, and heated in a water bath for immediate analysis. The analyzer used for the measurement underwent daily calibration before carrying out the macronutrient analysis.

2.4.4. FC

Stool samples for FC analysis were collected from the newborn's diaper on days 3, 7, and 15 days after birth, and the sample immediately stored in a refrigerator for subsequent analysis by solid phase microplate enzyme immunoassay (ELISA).

2.4.5. Analysis of Microbiota in Newborn Stool and MOM

Stool samples were collected directly from the diaper using a spatula and placed in a sterile recipient. To collect MOM samples, the nipple area of the breast was washed with soap and water and approximately 1 mL of milk was extracted using a breast pump and collected in a sterile plastic jar. The samples were frozen at -80°C in tubes with screw caps for subsequent processing and analysis. Nucleic acid extraction was carried out using the Maxwell® (San Diego, CA, USA) RSC instrument with the Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication kit. Once genomic material was obtained, DNA was quantified using the Qubit DNA Assay (Thermo Fisher®, Waltham, MA, USA). The microbiota was analyzed using the MiSeq sequencer to carry out the 16 s microbiome protocol. The results were analyzed using Illumina BaseSpace together with the 16S Metagenomics application [36–38].

The Shannon index was used as an indicator to quantify biodiversity. A value of zero indicated the presence of a single species: the higher the index, the greater the diversity of species [39,40].

2.5. Data Collection

Data and samples for analysis were collected from mothers and newborns at birth and on days 3, 7, and 15 after birth.

At birth, an interview was carried out with the mother where consent to participate in the study was obtained and the sociodemographic data to be analyzed were recorded. At this time, the mother was instructed on how to initiate breastfeeding, how to obtain milk samples, as well as recording of the amount of milk obtained throughout the 15 days of the study. Also, at that time the stress scale that was going to be used and how the data should be recorded was explained.

The analysis of breast milk was carried out with fresh samples using a 5 mL aliquot. Stool samples were taken directly from the diaper on days 3, 7, and 15 of life. They were stored and processed as previously indicated.

The rest of the clinical variables, such as the start of kangaroo care or the need for antibiotics, were noted in an anonymized database.

2.6. Statistical Analyses

Data were analyzed using the statistical package IBM SPSS Statistics version 20.0. The normality of the quantitative variables was assessed using the Shapiro–Wilk test. Variables were mostly non-parametric and are presented as the median and interquartile range.

Statistical analyses were carried out using the non-parametric Mann–Whitney U test for quantitative variables, the chi-squared test for qualitative variables, and the non-

parametric Kruskal–Wallis test for comparison of three or more variables. The possible relationship between variables was studied using the Spearman correlation test or through univariate or multivariate linear regression studies.

In all the comparisons of variables, statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Characteristics of the Study Participants

Tables 1 and 2 show the data for the participating mothers and their infants. The study population consisted of 45 mothers and 52 very preterm newborns (24 females and 28 males) who met the inclusion criteria for the study. In newborns, there were no significant differences in sex distribution between groups. The mean percentile of weight decreased from P33 at birth to P15 at 3 days of life, after which bodyweight increased on the 15th percentile. Implementation of the kangaroo method was early or intermediate in 69.23% (36/52) of cases. Tolerance to enteral feeding among neonates was generally good, with complete enteral nutrition established at 15 days of life in 92.31% (48/52) of newborns.

Table 1. Characteristics of nursing mothers and their infants (part I).

		At Birth
Mothers' age (years)		35 (31.5–38)
median (interquartile range)		
Gestational age (w)		31 (29–32)
Prenatal antibiotics (n, %)		17, 37.8%
Educational level (n, %)	Primary studies	4, 9%
	Secondary studies	18, 40%
	Higher education	23, 51%
Type of delivery (n, %)	Vaginal	17, 33%
	Caesarean section	35, 67%
Twinhood (n, %)		8, 15.4%
Sex of newborn: M/F (n, %)		M (28, 56.8%)
		F (24, 46.2%)

F, female; M, male; n, number; y, years; w, week.

Median FC levels decreased with age and were higher at 7 days of life in newborns who did not receive antibiotics ($p = 0.027$) and newborns weighing <1000 g at birth ($p = 0.044$).

Non significant differences were found depending on the respiratory, hemodynamic, or infectious variables in relation to the level of maternal stress.

Common stress (CS) was 4 at days 3 and 7, indicating a very stressful situation, and decreased to 3 at day 15. Analysis of the individual subscales showed the highest stress scores for the MR subscale (Figure 1).

Table 2. Characteristics of nursing mothers and their infants (part II).

	At Birth	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Neonatal weight (g), median (interquartile range), and percentile	1375 (1012–1667) p33			1240 (927–1467) p15				1280 (990–1515) p12								1520 (1125–1755) p14
Neonatal antibiotics in first 48 h (n, %)	34, 65.4%															
Duration of neonatal antibiotic treatment								7 days								
Respiratory support (n, %)	Invasive			2, 3.8%				0, 0%								1, 1.92%
	Non-invasive			38, 73.1%				16, 30.8%								7, 13.5%
Significant patent ductus arteriosus (n, %)				2, 3.8%				3, 5.8%								3, 5.8%
Sepsis (n, %)				7, 13.5%				4, 7.7%								3, 5.8%
Nutrition (n, %)	Parenteral			51, 98.1%				24, 46.2%								3, 5.8%
	Well tolerated			46, 88.5%				51, 98.1%								50, 96.2%
	Complete enteral nutrition			4, 7.7%				39, 75%								48, 92.3%
	Fortification			0, 0%				19, 36.5%								45, 86.5%
Initiation of kangaroo method (n, %)	Early			16, 30.8%				20, 38.5%								
	Intermediate															
	Late														16, 30.8%	
FC (mcg/g stool), median (interquartile range)				70 (20.25–148.75)				26 (7.25–60.75)								42 (28–72.75)
FC levels (mcg/g stool) in newborns with vs. without antibiotics, median (interquartile range)				83.5 (22–168) vs. 64 (19–129)				17 (6–39) vs. 54 (17–94) p = 0.027								49 (28–73) vs. 38 (29–54)

Nutrients 2023, 15, 40067 of 16

Table 2. Cont.

	Time (Days)															
	At Birth	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
FC (mcg/g stool) in stool samples according to body weight <1000 g; 1001–1500 g; >1500 g; median (interquartile range)				122 (55–246.5); 70 (21–127); 21 (12.5–120.5) <i>p</i> = 0.044				24.5 (14.5–45); 21.5 (6–54); 42.5 (8–78.5)								40 (7.5–71.5); 43 (29.5–91.5); 47.5 (30–66.5)
FC, fecal calprotectin; g, grams; mcg, micrograms; n, number.																

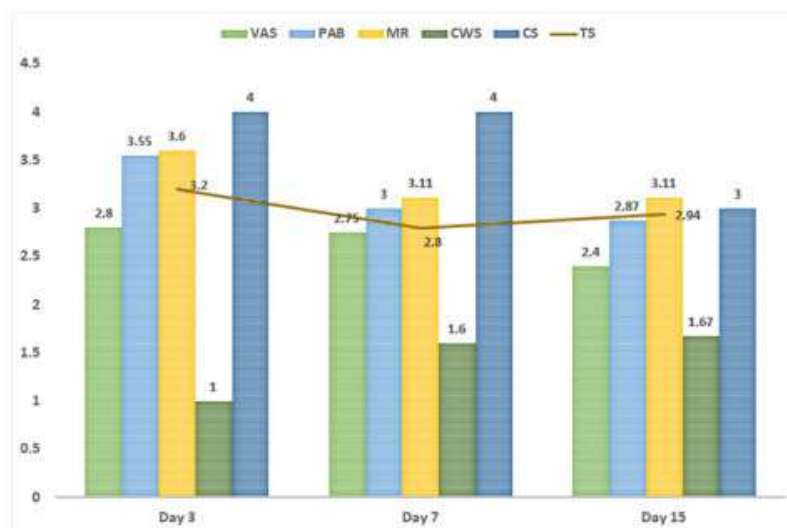


Figure 1. Stress scale scores for mothers on days 3, 7, and 15 post-delivery. CS, common stress; CWS, communication with healthcare team; d, day; MR, maternal role; PAB, physical appearance and behavior; TS, total stress; VAS, visual and auditory stimuli.

Table 3 shows significant associations between stress scores and other mother or newborn-related variables.

Table 3. Associations between maternal stress scores and other mother and newborn-related variables.

Day 3			Day 7			Day 15		
Breastfeeding volume	TS	<i>p</i>	Breastfeeding volume	TS	<i>p</i>	Breastfeeding volume	TS	<i>p</i>
22.5 mL (5–61)	3.2 (2.52–3.64)	0.012	150 mL (45–340)	2.8 (2.3–3.87)	NS	275 mL (130–530)	2.94 (2–3.8)	NS
Initiation of Kangaroo method	Decrease stress	<i>p</i>	Initiation of Kangaroo method	Decrease stress	<i>p</i>	Initiation of Kangaroo method	Decrease stress	<i>p</i>
Early	−0.65 (−1.00–−0.38)	0.011	Intermediate	0.02 (−0.41–0.34)	NS	Late	−0.38 (−0.66–−0.12)	NS
TS with Primary Educational level	TS with Secondary and Higher Educational level	<i>p</i>	TS with Primary Educational level	TS with Secondary and Higher Educational level	<i>p</i>	TS with Primary Educational level	TS with Secondary and Higher Educational level	<i>p</i>
3.64 (2.72–4.01)	3.2 (2.4–3.73)	NS	4.43 (3.48–4.58)	2.79 (2.25–3.78)	0.032	4.3 (3.14–4.51)	2.89 (1.84–3.7)	0.04

Breastfeeding volumes and total stress scores (TS) are presented as the median and interquartile range. mL, milliliters; NS, not significant.

The earlier the kangaroo method was established, the greater the reduction in stress was. Stress levels among mothers were very high over the first 3 days post-delivery, while MOM production over this period was very low. On day 7 post-delivery, stress levels decreased, and milk production increased, and continued to do so over the following days, although stress levels increased slightly.

Stress management was poorer in the group of mothers that had completed only primary education versus those that had completed secondary or higher education. In the latter group, stress levels decreased sooner after delivery, with significant decreases observed at 7 and 15 versus 3 days (Table 3).

We have also defined stress as low or high according to the median value at each day, 3.2 at 3 days, 2.8 at 7 days, and 2.94 at 15 days. We studied many variables according to this definition (Table 4).

Table 4. Associations between low or high maternal stress and other mother and newborn-related variables.

		Day 3			Day 7			Day 15		
		Low Stress (<3.2)	High Stress (≥3.2)	<i>p</i>	Low Stress (<2.8)	High Stress (≥2.8)	<i>p</i>	Low Stress (<2.94)	High Stress (≥2.94)	<i>p</i>
Mothers' age (y)	median (interquartile range)	35 (29.5–38.5)	35 (33–36)	NS	36 (35–39)	33.5 (26–36)	0.03	36 (32–39)	34 (26–36)	NS
Gestational age (w)	median (interquartile range)	31 (29–32)	30 (27–31)	NS	31 (30–32)	30 (26–31)	0.031	31 (29–32)	30 (27–31)	NS
Type of delivery	Vaginal	33.3%	66.7%	NS	31.2%	68.8%	NS	43.7%	56.3%	NS
	Caesarean section	57.7%	42.3%		59.2%	40.8%		53.8%	46.2%	
Twinhood (Yes)		57.2%	42.8%	NS	87.5%	12.5%	0.015	87.5%	12.5%	0.018
Initiation of kangaroo method	Early	50%	50%	NS	66.7%	33.3%	NS	58.3%	41.7%	NS
	Intermediate	52.9%	47.1%		47.1%	52.9%		43.7%	56.3%	
	Late	38.4%	61.6%		30.7%	69.3%		46.1%	53.9%	
MOM volume	median (interquartile range)	40 mL (11–122.5)	20 mL (5–48)	0.046	180 mL (117.5–370)	82.5 mL (44–340)	NS	392.5 mL (197.5–550)	220 mL (85–440)	NS

mL, milliliters; NS, not significant; y, years; w, week.

Mothers presented higher stress when the gestational age was lower, with no influence observed by age or type of delivery. Twinhood, on the other hand, seems to be a protective factor against stress. The volume of breast milk was greater in mothers with less stress. The results were not always significant, but a clear trend was observed.

3.2. Macronutrient Content in MOM

As expected, median levels of MOM fats and carbohydrates increased over time. Lipid levels were 1.79 g/dL, 3.16 g/dL, and 3.27 g/dL at 3, 7, and 15 days, respectively, and carbohydrates levels were 6.55 g/dL, 6.85 g/dL, and 7.19 g/dL at 3, 7, and 15 days, respectively. Protein levels had a slight decrease over time and were 1.4 g/dL, 1.3 g/dL, and 1.2 g/dL at 3, 7, and 15 days, respectively. We observed no association between the levels of macronutrients and maternal stress during the study period.

3.3. Microbiota in MOM and Neonatal Stool Samples

The Venn diagrams in Figure 2 depict the microbiota of MOM and neonatal stool samples collected at days 3, 7, and 15 post-delivery.

The bacteria detected in MOM samples included microorganisms commonly found on the skin (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*) and in the intestinal microbiota (*Klebsiella*, *Clostridium*, or *Enterococcus*). Bacteria found in neonatal fecal samples primarily consisted of species commonly found in the intestinal microbiota (*Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*). We investigated the association between microbial diversity in MOM and neonatal stool samples with maternal stress at days 3, 7, and 15 post-delivery (Table 5).

Although the results were not statistically significant, a trend towards greater microbial diversity (i.e., a higher Shannon index) was observed in milk from mothers with continually decreasing maternal stress over the study. The pattern observed for fecal samples was more erratic, although we observed a similar trend to that of breast milk at 15 days.

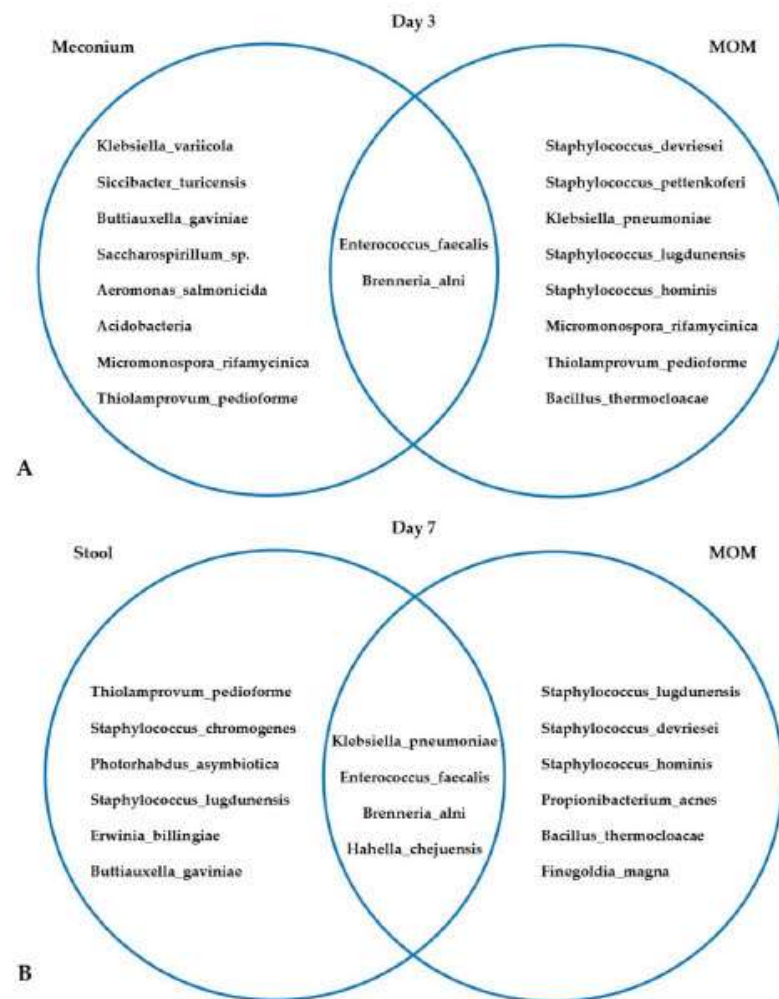


Figure 2. Cont.

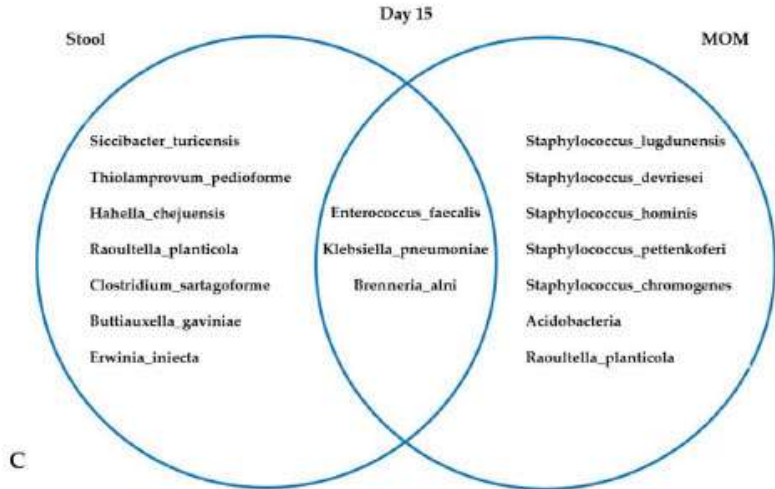


Figure 2. Microbiota of MOM and neonatal stool samples collected at days 3 (A), 7 (B), and 15 (C) post-delivery.

Table 5. Shannon index and maternal stress during the study period.

		Day 3		Day 7		Day 15	
Stress		Low (<3.2)	High (≥3.2)	Low (<2.8)	High (≥2.8)	Low (<2.94)	High (≥2.94)
Shannon index	Feces	1 (0.48–1.86)	1.56 (1.19–1.65)	0.71 (0.31–1.24)	1.25 (0.76–1.36)	1.13 (0.77–1.35)	0.91 (0.33–1.08)
	MOM	0.99 (0.60–1.39)	0.76 (0.61–1.01)	0.75 (0.46–1.21)	0.65 (0.38–1.14)	1.19 (0.60–1.34)	0.99 (0.34–1.37)

p NS (not significant).

The proportion of Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, and Bacteroidetes was analyzed in the MOM and neonatal fecal samples 3, 7, and 15 days post-delivery (Table 6).

Table 6. Proportions of indicated phyla in MOM and neonatal fecal samples.

	Day 3		Day 7		Day 15	
	Meconium	MOM	Feces	MOM	Feces	MOM
Proteobacteria	62.5%	30.4%	50%	30%	71.4%	34.6%
Firmicutes	37.5%	69.6%	35%	70%	17.9%	65.4%
Actinobacteria	N/A	N/A	5%	N/A	3.6%	N/A
Bacteroidetes	N/A	N/A	5%	N/A	3.6%	N/A

N/A: nondetectable.

Although the effect was not significant, we observed a greater proportion of Proteobacteria in neonatal fecal samples. Species of the phylum Firmicutes predominated in MOM. In milk samples from high-stress mothers, we observed a trend over the course of the study period towards decreasing proportions of Firmicutes (87.5%, 62.5%, and 55.6% on days 3, 7, and 15, respectively) and increasing proportions of Proteobacteria (12.5%, 37.5%, and 44.4% on days 3, 7, and 15, respectively). The opposite effect was observed in MOM samples from low-stress mothers (Table 7).

Table 7. Proportions of the indicated phyla in MOM and neonatal fecal samples, stratified according to maternal stress scores.

Phyla in MOM	Stress 3 Days		Stress 7 Days		Stress 15 Days	
	Low	High	Low	High	Low	High
Proteobacteria	41.7%	12.5%	16.7%	37.5%	26.7%	44.4%
Firmicutes	58.3%	87.5%	83.3%	62.5%	73.3%	55.6%
Phyla in feces						
Proteobacteria	75%	33.3%	66.7%	40%	90%	70%
Firmicutes	25%	66.7%	22.2%	40%	10%	20%
Actinobacteria	N/A	N/A	11.1%	N/A	N/A	N/A
Bacteroidetes	N/A	N/A	N/A	20%	N/A	10%

N/A: nondetectable.

We observed a trend towards greater biodiversity in stool samples collected 7 days post-delivery from neonates who received complete enteral nutrition. Relative proportions of bacteria from the phyla Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, and Bacteroidetes (52.94%, 35.29%, 5.88%, 5.88%, respectively) were higher in neonates who received complete enteral nutrition compared to those who did not. Indeed, in the latter group, bacteria from the phyla Actinobacteria and Bacteroidetes were completely absent.

4. Discussion

This study of very premature newborns and their mothers describes the negative effects of maternal stress on MOM production. It also shows a trend in the bacterial biodiversity of both milk and the neonatal intestinal microbiota depending on maternal stress, although it indicates that stress does not affect the macronutrient composition of milk.

4.1. Parental Stress and MOM

Parental stress, if improperly managed, can lead to states of anxiety and depression in mothers, with significant negative impacts at both the personal and family level. High levels of parental stress following the birth of a very premature child can result in suboptimal bonding between mother and child poses a risk factor for poor behavioral and social development in childhood [3,7–9]. In our study population, the total stress in mothers of preterm infants decreased between 3 and 7 days post-delivery, subsequently increasing slightly at 15 days, possibly coinciding with the appearance of prematurity-associated complications in the newborn. In line with previously reported findings [33], the stress subscale for which the highest scores were observed was MR, with mean scores of 3.6 (day 3), 3.11 (day 7), and 3.11 (day 15). This subscale assesses stress related to the mother–child bond, including stress resulting from mother–child separation. It should also be noted that this study was carried out during the COVID-19 pandemic, and the resulting impact on hospital care in particular and society in general may have contributed to additional stress among mothers of premature newborns [10,41].

Situations of stress lead to increases in cortisol, adrenaline, dopamine, and other mediators of stress, as well as inhibition of prolactin and oxytocin, hormones central to the production and secretion of milk [28,42]. We observed a statistically significant inverse relationship between stress and milk production 3 days post-delivery. However, this effect was not significant at 7 or 15 days post-delivery, possibly because the initial stress caused by preterm labor decreased, and the mothers focused on breastfeeding their newborn, which in turn has a stress-reducing effect as it favors the release of hormones such as oxytocin [28]. We show that maternal stress was significantly reduced if the kangaroo method was established early (≤ 4 days post-delivery). Provision of psychological and emotional support to mothers of premature newborns should be implemented in all NICUs.

Our findings indicate better stress management in mothers with a higher educational level, possibly because they have access to greater social and emotional support, which allows them to better manage their stress levels [43].

In line with the results of other studies [44,45], maternal stress did not alter the macronutrient content of MOM [44,45]. Other authors have reported that in conditions of acute stress, in which cortisol levels increase, milk contains lower levels of carbohydrates and higher levels of fat, while in chronic stress conditions, fat levels in milk decrease [46].

4.2. FC, Microbiota, MOM, and Maternal Stress

FC is a protein that reflects the migration of neutrophils to the intestinal lumen and can serve as a biomarker of intestinal inflammation in adults, although in children conclusive FC values to establish a reference range are lacking [47,48]. FC levels appear to be linked to the maturity of the digestive system, resulting in higher levels in full-term and preterm newborns than in adults but with similar values between preterm and term newborns [49]. Multiple factors could explain the elevation of FC in the first days of life, including the intrauterine environment, immaturity of the intestine, possible hypoxic-ischemic damage to the intestinal mucosa, and even bacterial colonization of the intestine [50]. FC levels decrease over the following days, often due to the antibiotic treatment that preterm newborns undergo, which may delay intestinal colonization. When enteral feeding is established, FC concentrations rise again, and subsequently decrease within a few days in the absence of any pathology [51,52]. It is difficult to specify FC levels that are indicative of intestinal disease in premature infants, owing to the marked variability in this parameter, which is influenced by multiple factors. However, research continues to investigate how FC could serve as a marker to facilitate the detection of potentially fatal gastrointestinal disorders in premature newborns, such as NEC.

Bacteria found in the MOM microbiota included skin microorganisms (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*) and bacteria present in the intestinal microbiota (*Klebsiella*, *Clostridium*, or *Enterococcus*), while those found in newborn fecal samples largely corresponded to the intestinal microbiota (*Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*). The species that predominated in newborn fecal samples were *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella* spp. and *Staphylococcus* spp., with *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* detected in small amounts. Prenatal or postnatal stress can also influence the newborn intestinal microbiota, and it is also likely that individual genetic factors modulate the effects of this stress [19–23].

The present study describes the effects of maternal stress on the diversity of microorganisms in MOM, and points to a trend towards reduced biodiversity with a lower Shannon index, in situations of greater stress. However, at days 3 and 7 post-delivery, when maternal stress levels were higher, microbial diversity in neonatal fecal samples was increased. This may be explained by intestinal dysbiosis resulting from stress, which allows bacteria not typically found in the normal microbiota to proliferate abnormally, hence increasing diversity. In infants born to mothers with higher stress levels from days 3 to 15, we observed a progressive increase in the proportion of Proteobacteria species (33.3%, 40%, and 70% on days 3, 7, and 15, respectively), while the opposite effect was observed for Firmicutes species (66.7%, 40%, and 20% on days 3, 7, and 15, respectively). In milk from mothers who experienced high levels of stress, the proportion of Firmicutes species was greater than that of Proteobacteria species at all three timepoints studied, but this progressively decreased over time (87.5%, 62.5%, and 55.6%, respectively), while the proportion of Proteobacteria species increased (12.5%, 37.5%, and 44.4%, respectively).

Some limitations of the present study should be noted. Although most premature infants required small amounts of DHM during the first days of the study period, its impact on the establishment of the microbiota was not the objective of this study (the perceived amount of DHM was similar for each of the patients studied); instead, we focused on how maternal stress influenced the establishment of breastfeeding and its influence on the microbiota. The study was carried out during the COVID pandemic, which may have affected the reported outcomes; fear of contagion may have influenced perceived levels

of maternal stress and decreased rates of breastfeeding. In some cases, it was impossible to obtain complete data for all the study participants. The study's main strength is its analysis of how stress influences the establishment of correct breastfeeding and intestinal colonization in the premature newborn.

5. Conclusions

We show that maternal stress influences bacterial biodiversity in the milk of mothers and in fecal samples from their premature newborns with clear trends despite non-significant results, which were probably due to the study limitations. This, in turn, affects the establishment of a healthy intestinal microbiota, which is required for adequate development and health of the premature newborn. Maternal stress, particularly that relating to the role of the mother, is a variable that must be taken into account in NICUs to ensure appropriate control and management, thereby increasing the production of milk and the bacterial biodiversity of both milk and the intestinal microbiota of the newborn.

Measures must be established to control maternal stress during the perinatal period. Although certain independent social variables (e.g., higher educational level) favor better stress control, additional measures can be applied in the NICU; as shown here, early initiation of the kangaroo method allows for more rapid control of stress caused by the separation from their premature newborn.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu15184006/s1>, Figure S1: Flow chart depicting recruitment of the study cohort.

Author Contributions: M.d.C.F.-T. designed the study, collected the data, carried out the statistical analyses, and drafted the manuscript. A.P.-M. designed the study, collected and analyzed the data, and drafted the manuscript. M.L.C. designed the study, obtained funding, and revised the manuscript. R.T.-P. and M.L.P.d.M. carried out the microbiological analyses and revised the manuscript. All authors approved the final manuscript as submitted and agree to be accountable for all aspects of the work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Next Generation EU funds, Maternal and Child Health and Development Research Network (RICORS-SAMID), Institute of Health Carlos III (ISCIII), under the framework of the Project: "Primary Care Interventions to prevent maternal and child chronic diseases of perinatal and developmental origin" (Ref: RD21/0012).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the local ethics committee of Santiago-Lugo, Spain (registration code 2019/229).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ballard, O.; Morrow, A.L. Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. N. Am.* **2013**, *60*, 49–74. [CrossRef]
2. Kramer, M.S. "Breast is best": The evidence. *Early Hum. Dev.* **2010**, *86*, 729–732. [CrossRef]
3. Kim, S.Y.; Yi, D.Y. Components of human breast milk: From macronutrient to microbiome and microRNA. *Clin. Exp. Pediatr.* **2020**, *63*, 301–309. [CrossRef]
4. Sadauskaitė-Kuehnė, V.; Ludvigsson, J.; Padaiga, Z.; Jasinskiene, E.; Samuelsson, U. Longer Breastfeeding in an independent predictive factor against development of type 1 diabetes in childhood. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2004**, *20*, 150–157. [CrossRef] [PubMed]
5. Hatmal, M.M.; Al-Hatamleh, M.A.I.; Olaimat, A.N.; Alshaer, W.; Hasan, H.; Albakri, K.A.; Alkhafaji, E.; Issa, N.N.; Al-Holy, M.A.; Abderrahman, S.M.; et al. Immunomodulatory Properties of Human Breast Milk: MicroRNA Contents and Potential Epigenetic Effects. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1219. [CrossRef] [PubMed]

6. Shah, K.B.; Chernausek, S.D.; Garman, L.D.; Pezant, N.P.; Plows, J.F.; Kharoud, H.K.; Demerath, E.W.; Fields, D.A. Human Milk Exosomal MicroRNA: Associations with Maternal Overweight/Obesity and Infant Body Composition at 1 Month of Life. *Nutrients* **2021**, *13*, 1091. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Sivanandar, S.; Sankar, M.J. Kangaroo mother care for preterm or low birthweight infants: A systematic review and meta-analysis. *BMJ Glob. Health* **2023**, *8*, e010728. [\[CrossRef\]](#)
8. Conde-Agudelo, A.; Díaz-Rossello, J.L. Kangaroo mother care to reduce morbidity and mortality in low birthweight infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2016**, *2016*, CD002771. [\[CrossRef\]](#)
9. Adejuyigbe, E.A.; Agyeman, I.; Anand, P.; Anyabolu, H.C.; Arya, S.; Assenga, E.N.; Badhal, S.; Brobby, N.W.; Chellani, H.K.; Chopra, N.; et al. Evaluation of the impact of continuous Kangaroo Mother Care (KMC) initiated immediately after birth compared to KMC initiated after stabilization in newborns with birthweight 1.0 to < 1.8 kg on neurodevelopmental outcomes: Protocol for a follow-up study. *Trials* **2023**, *24*, 265. [\[CrossRef\]](#)
10. Cristóbal-Cañadas, D.; Parrón-Carreño, T.; Nievas-Soriano, B.J. Effect of the Kangaroo Mother Method after Preterm Delivery on Maternal Stress and Anxiety in the Context of the COVID-19 Pandemic—A Cohort Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 16432. [\[CrossRef\]](#)
11. Samsudin, S.; Chui, P.L.; Kamar, A.B.A.; Abdullah, K.L. Maternal Kangaroo care education program in the neonatal intensive care unit improved mothers' perceptions, knowledge, perceived barriers and stress relates to premature infant. *Nurs. Open* **2023**, *10*, 349–357. [\[CrossRef\]](#)
12. Cañizo Vázquez, D.; Salas García, S.; Izquierdo Renau, M.; Iglesias-Platas, I. Availability of Donor Milk for Very Preterm Infants Decreased the Risk of Necrotizing Enterocolitis without Adversely Impacting Growth or Rates of Breastfeeding. *Nutrients* **2019**, *11*, 1895. [\[CrossRef\]](#)
13. Charbonneau, M.R.; O'Donnell, D.; Blanton, L.V.; Totten, S.M.; Davis, J.C.C.; Barratt, M.J.; Cheng, J.; Guruge, J.; Talcott, M.; Bain, J.R.; et al. Sialylated Milk Oligosaccharides Promote Microbiota-Dependent Growth in Models of Infant Undernutrition. *Cell* **2016**, *164*, 859–871. [\[CrossRef\]](#)
14. Masl, A.C.; Embleton, N.D.; Lamb, C.A.; Young, G.; Granger, C.L.; Najera, J.; Smith, D.P.; Hoffman, K.L.; Petrosino, J.F.; Bode, L.; et al. Human milk oligosaccharide DSLNT and gut microbiome in preterm infants predicts necrotising enterocolitis. *Gut* **2021**, *70*, 2273–2282. [\[CrossRef\]](#)
15. Moukartzel, S.; Bode, L. Human Milk Oligosaccharides and the Preterm Infant: A Journey in Sickness and in Health. *Clin. Perinatol.* **2017**, *44*, 193–207. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Ahearn-Ford, S.; Berrington, J.E.; Stewart, C.J. Development of the gut microbiome in early life. *Exp. Physiol.* **2022**, *107*, 415–421. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Neves, L.L.; Hair, A.B.; Preidis, G.A. A systematic review of associations between gut microbiota composition and growth failure in preterm neonates. *Gut Microbes* **2023**, *15*, 2190301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Stricker, S.; Hain, T.; Chao, C.M.; Rudloff, S. Respiratory and Intestinal Microbiota in Pediatric Lung Diseases—Current Evidence of the Gut-Lung Axis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6791. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Wang, K.; Xia, X.; Sun, L.; Wang, H.; Li, Q.; Yang, Z.; Ren, J. Microbial Diversity and Correlation between Breast Milk and the Infant Gut. *Foods* **2023**, *12*, 1740. [\[CrossRef\]](#)
20. Milani, C.; Duranti, S.; Bottacini, F.; Casey, E.; Turrone, F.; Mahony, J.; Belzer, C.; Delgado Palacio, S.; Arboleya Montes, S.; Mancabelli, L.; et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2017**, *81*, e00036–17. [\[CrossRef\]](#)
21. Vandenplas, Y.; Carnielli, V.P.; Ksiazek, J.; Luna, M.S.; Migacheva, N.; Mosselmans, J.M.; Picaud, J.C.; Possner, M.; Singhal, A.; Wabitsch, M. Factors affecting early-life intestinal microbiota development. *Nutrition* **2020**, *78*, 110812. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Notarbartolo, V.; Giuffrè, M.; Montante, C.; Corsello, G.; Carta, M. Composition of Human Breast Milk Microbiota and Its Role in Children's Health. *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.* **2022**, *25*, 194–210. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Li, Y.; Ren, L.; Wang, Y.; Li, J.; Zhou, Q.; Peng, C.; Li, Y.; Cheng, R.; He, F.; Shen, X. The Effect of Breast Milk Microbiota on the Composition of Infant Gut Microbiota: A Cohort Study. *Nutrients* **2022**, *14*, 5397. [\[CrossRef\]](#)
24. Weiss, S.J.; Hamidi, M. Maternal stress during the third trimester of pregnancy and the neonatal microbiome. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2023**, *36*, 2214835. [\[CrossRef\]](#)
25. Yeramilli, V.; Cheddadi, R.; Shah, J.; Brawner, K.; Martin, C. A Review of the Impact of Maternal Prenatal Stress on Offspring Microbiota and Metabolites. *Metabolites* **2023**, *13*, 535. [\[CrossRef\]](#)
26. Ziolkiewicz, A.; Apanasewicz, A.; Daneł, D.P.; Babiszewska, M.; Piosek, M.; Orczyk-Pawilowicz, M. Maternal Distress and Social Support Are Linked to Human Milk Immune Properties. *Nutrients* **2021**, *13*, 1857. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Juncker, H.; Naninck, E.; Schipper, L.; Lucassen, P.; van Goudoever, J.; de Rooij, S.; Korosi, A. Maternal stress in the postpartum period is associated with altered human milk fatty acid composition. *Clin. Nutr.* **2022**, *41*, 2517–2528. [\[CrossRef\]](#)
28. Nagel, E.M.; Howland, M.A.; Pando, C.; Stang, J.; Mason, S.M.; Fields, D.A.; Demerath, E.W. Maternal Psychological Distress and Lactation and Breastfeeding Outcomes: A Narrative Review. *Clin. Ther.* **2022**, *44*, 215–227. [\[CrossRef\]](#)
29. Zijlmans, M.A.; Korpela, K.; Riksen-Walraven, J.M.; de Vos, W.M.; de Weerth, C. Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. *Psychoneuroendocrinology* **2015**, *53*, 233–245. [\[CrossRef\]](#)
30. Miles, M.S.; Funk, S.G.; Carlson, J. Parental Stressor Scale: Neonatal intensive care unit. *Nurs. Res.* **1993**, *42*, 148–152. [\[CrossRef\]](#)

31. Kubicka, Z.; Fiascone, J.; Williams, D.; Zahr, E.; Ditzel, A.; Perry, D.; Rousseau, T.; Lacy, M.; Arzuaga, B. Implementing modified family integrated care in a U.S. neonatal intensive care unit: Nursing perspectives and effects on parents. *J. Perinatol.* **2023**, *43*, 503–509. [CrossRef] [PubMed]
32. Dudek-Shriber, L. Parent Stress in the Neonatal Intensive Care Unit and the Influence of Parent and Infant Characteristics. *Am. J. Occup. Ther.* **2004**, *58*, 509–520. [CrossRef] [PubMed]
33. Caruso, A.; Mikulic, I.M. El estrés en padres de bebés prematuros internados en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales: Traducción y adaptación de la escala Parental Stressor Scale: Neonatal Intensive Care Unit (PSS: NICU-M.S. Miles y D. Holditch Davis, 1987; M.S. Miles y S.G. Funk, 1998). *Anuario de Investigaciones* **2012**, *XIX*, 19–26.
34. Fusch, G.; Rochow, N.; Choi, A.; Fusch, S.; Poeschl, S.; Ubah, A.O.; Lee, S.Y.; Raja, P.; Fusch, C. Rapid measurement of macronutrients in breast milk: How reliable are infrared milk analyzers? *Clin. Nutr.* **2015**, *34*, 465–476. [CrossRef] [PubMed]
35. Mangel, L.; Ovental, A.; Batscha, N.; Armon, M.; Yarkoni, I.; Dollberg, S.; Eidelman, A.I.; Lubetzky, R.; Sever, O.; Mimouni, E.B.; et al. Higher Fat Content in Breastmilk Expressed Manually: A Randomized Trial. *Breastfeed. Med.* **2015**, *10*, 352–354. [CrossRef]
36. Alarcón Cavero, T.; Dauria, G.; Delgado Palacio, S.; Del Campo Moreno, R.; Ferrer Martínez, M. Microbiota. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica; Cercenado Mansilla E., Cantón Moreno R, Ed.; Madrid, Spain, 2016. Available online: <https://seimc.org/contenidos/documentoscience/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento1microbiologia59mod.pdf> (accessed on 20 March 2023).
37. López Causapé, C.; González Candelas, F.; Tomás Carmona, M.; Oliver Palomo, A. Aplicaciones de las Técnicas de Secuenciación Masiva en la Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica; Cercenado Mansilla E., Cantón Moreno R, Ed.; Madrid, Spain, 2021. Available online: <https://seimc.org/contenidos/documentoscience/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento71.pdf> (accessed on 2 April 2023).
38. *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation*; 2013, Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (publishers). Available online: https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf (accessed on 26 July 2023).
39. Pla, L. Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *INCI* **2006**, *31*, 583–590. Available online: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000800008&lng=es (accessed on 20 May 2023).
40. Haegeman, B.; Hamelin, J.; Moriarty, J.; Neal, P.; Dushoff, J.; Weitz, J.S. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *ISME J.* **2013**, *7*, 1092–1101. [CrossRef]
41. Iorio, C.; Ciuffo, G.; Landoni, M. Parent–Infant Skin-to-Skin Contact and Stress Regulation: A Systematic Review of the Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 4695. [CrossRef]
42. Dewey, K.G. Maternal and Fetal Stress Are Associated with Impaired Lactogenesis in Humans. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 3012S–3015S. [CrossRef]
43. Fang, Y.; Boelens, M.; Windhorst, D.A.; Raat, H.; van Grieken, A. Factors associated with parenting self-efficacy: A systematic review. *J. Adv. Nurs.* **2021**, *77*, 2641–2661. [CrossRef]
44. Soffer, G.P.; Sirl, M.; Mangel, L.; Mandel, D.; Lubetzky, R. Impact of Maternal Anxiety on Human Milk Macronutrients Content: A Prospective Observational Study. *Breastfeed. Med.* **2020**, *15*, 572–575. [CrossRef] [PubMed]
45. Ryoo, C.J.; Kang, N.M. Maternal Factors Affecting the Macronutrient Composition of Transitional Human Milk. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 3308. [CrossRef] [PubMed]
46. Ziomkiewicz, A.; Babiszewska, M.; Apanasiewicz, A.; Picek, M.; Wychowaniec, P.; Cierndak, A.; Barbarska, O.; Szoltysek, M.; Danel, D.; Wichary, S. Psychosocial stress and cortisol stress reactivity predict breast milk composition. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 11576. [CrossRef] [PubMed]
47. Li, F.; Ma, J.; Geng, S.; Wang, J.; Liu, J.; Zhang, J.; Sheng, X. Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Children Aged 1–18 Months. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119574. [CrossRef] [PubMed]
48. Campeotto, F.; Butel, M.J.; Kalach, N.; Derrieux, S.; Aubert-Jacquin, C.; Barbot, L.; Francoual, C.; Dupont, C.; Kapel, N. High faecal calprotectin concentrations in newborn infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **2004**, *89*, F353–F355. [CrossRef]
49. Kapel, N.; Campeotto, F.; Kalach, N.; Baldassare, M.; Butel, M.-J.; Dupont, C. Faecal Calprotectin in Term and Preterm Neonates. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2010**, *51*, 542–547. [CrossRef]
50. Rougé, C.; Butel, M.-J.; Piloquet, H.; Ferraris, L.; Legrand, A.; Vodovar, M.; Voyer, M.; de la Cochetière, M.-F.; Darmaun, D.; Rozé, J.-C. Fecal Calprotectin Excretion in Preterm Infants during the Neonatal Period. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11083. [CrossRef]
51. Groer, M.; Ashmeade, T.; Louis-Jacques, A.; Beckstead, J.; Ji, M. Relationships of Feeding and Mother’s Own Milk with Fecal Calprotectin Levels in Preterm Infants. *Breastfeed. Med.* **2016**, *11*, 207–212. [CrossRef]
52. Park, J.S.; Cho, J.Y.; Chung, C.; Oh, S.H.; Do, H.-J.; Seo, J.-H.; Lim, J.Y.; Park, C.-H.; Woo, H.-O.; Youn, H.-S. Dynamic Changes of Fecal Calprotectin and Related Clinical Factors in Neonates. *Front. Pediatr.* **2020**, *8*, 326. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



El estrés materno disminuye la cantidad de leche materna extraída, sobre todo en los primeros días, aunque no modifica la calidad de sus macronutrientes. Además, la microbiota intestinal del recién nacido prematuro se ve alterada cuando la madre está más estresada. Al mismo tiempo, la microbiota de la leche materna también se modifica por el estrés de la madre. Hemos observado cómo el hecho de recibir antibióticos o la forma en la que nacemos va a influir en el establecimiento de la microbiota intestinal del recién nacido, de forma que en partos vaginales se adquiere una microbiota más sana que cuando el parto se produce por cesárea y los antibióticos cambian la dominancia de los filos en la microbiota. El control del estrés materno mejorará el establecimiento de la lactancia y la microbiota.