



Título:

**Impacto de la Lectina de Unión a la Manosa (MBL) y β -
Defensina 2 en la susceptibilidad frente a infecciones en
neonatos prematuros extremos**

Trabajo que presenta el licenciado Peter
Olbrich para optar al grado de Doctor en
Medicina y Cirugía.

Sevilla, 2015

D. JOSÉ VILLAR ORTIZ, PROFESOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA : Que D. Peter Olbrich, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado
bajo nuestra dirección el trabajo titulado “Impacto de la Lectina de Unión a la
Manosa (MBL) y β -Defensina 2 en la susceptibilidad frente a infecciones en
neonatos prematuros extremos”.

Revisado el presente trabajo por creer que reúne las condiciones necesarias,
estimamos que puede ser presentado como Tesis Doctoral.

Sevilla, Mayo 2015

ÍNDICE DEL CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	15
1.1 PREMATURIDAD	1
1.2 SEPSIS NEONATAL	8
1.3 EL SISTEMA INMUNE EN LA EDAD NEONATAL	11
1.4 LAS BETA DEFENSINAS HUMANAS 2	16
1.5 LA LECTINA DE UNIÓN A LA MANOSA (MBL)	22
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
III. MÉTODOS	29
3.1 ÁMBITO DE LOS ESTUDIOS:	30
3.2 DISEÑO DE LOS ESTUDIOS:	31
3.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO:	31
3.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN E EXCLUSIÓN EN LOS DOS PROYECTOS (P1,P2):	31
3.5 RECOGIDA DE VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS Y CLÍNICAS:	33
3.6 OBTENCIÓN, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE MUESTRAS DE PLACENTA	35
3.7 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:	35
3.8 ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DEL PÉPTIDO HBD2	36
3.9 CUANTIFICACIÓN DE NIVELES DE HBD2	36
3.10 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE MBL:	37
3.11 ANÁLISIS DE DATOS	38
3.12 ASPECTOS ÉTICOS	39
IV. RESULTADOS	41
ESTABILIDAD Y CACACTERÍSTICAS DE LAS BETA DEFENSINAS HUMANA EN MUESTRA DE SUERO	41
PROYECTO 1	42
DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN	42
NIVELES DE HBD2 EN RELACIÓN CON LAS VARIABLES EN ESTUDIO	43
DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN	46
VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE LA BETA DEFENSINA HUMANA Y DE LA LECTINA DE LA UNIÓN A LA MANOSA DURANTE LA SOSPECHA DE UN EPISODIO SÉPTICO	49
NIVELES DE LA BETA DEFENSINA HUMANA EN RELACIÓN CON LAS VARIABLES EDAD GESTACIONAL Y PESO AL NACER	50
HBD2 Y LA EDAD GESTACIONAL DICOTOMIZADA	51
HBD2 Y EL PESO AL NACER COMO VARIABLE DICOTOMIZADA	53
NIVELES DE LA MBL EN RELACIÓN CON LAS VARIABLES EDAD GESTACIONAL Y PESO AL NACER	55
MBL Y LA EDAD GESTACIONAL	55
MBL Y EL PESO AL NACER DICOTOMIZADO	57
ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE HBD2, PROTEÍNA C REACTIVA Y RECUENTO DE NEUTRÓFILOS	58
ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MBL, PROTEÍNA C REACTIVA Y RECUENTO DE NEUTRÓFILOS	59
ESTRATIFICACIÓN DE LA MUESTRA EN FUNCIÓN DE LA VARIABLE SEPSIS NOSOCOMIAL	60
ANÁLISIS DEL ESTRATO DE "NEONATOS SIN DATOS DE SEPSIS"	61
ASOCIACIÓN ENTRE NIVELES DE HBD2 Y EDAD GESTACIONAL Y PESO AL NACER (DICOTOMIZADOS) EN NEONATOS SIN DATOS DE SEPSIS	61
ASOCIACIÓN ENTRE MBL, EDAD GESTACIONAL Y PESO AL NACER	64
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MBL, RECUENTO DE NEUTRÓFILOS Y VALOR DE PCR EN ESTRATO DE "NEONATOS SIN DATOS DE SEPSIS"	65
ANÁLISIS DEL ESTRATO DE "NEONATOS CON SEPSIS CLÍNICA"	66

ASOCIACIÓN ENTRE HBD2, EDAD GESTACIONAL Y PESO AL NACER	66
CORRELACIÓN ENTRE HBD2, RECUENTO DE NEUTRÓFILOS Y VALOR DE PCR	68
ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MBL, EDAD GESTACIONAL Y PESO AL NACER	69
CORRELACIÓN ENTRE MBL, RECUENTO DE NEUTRÓFILOS Y VALOR DE PCR	70
ANÁLISIS DEL ESTRATO DE "NEONATOS CON SEPSIS CONFIRMADA"	71
ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE HBD2, EDAD GESTACIONAL Y PESO AL NACER	71
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE HBD2, NEUTRÓFILOS Y PROTEÍNA C REACTIVA	73
ASOCIACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MBL, EDAD GESTACIONAL Y PESO AL NACER	74
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MBL Y PROTEÍNA C REACTIVA Y NEUTRÓFILOS EN ESTRATO DE "NEONATOS CON SEPSIS CONFIRMADA"	75
ESTRATIFICACIÓN DE LA MUESTRA EN FUNCIÓN DE LA VARIABLE HEMOCULTIVO	76
ANÁLISIS DE LAS VARIABLES HBD2 Y MBL EN LOS ESTRATOS DE LA VARIABLE HEMOCULTIVOS	76
V. DISCUSIÓN	78
NIVELES DE HBD2 EN FUNCIÓN DE SU PROCESAMIENTO Y PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS	79
PROYECTO 1:	80
VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS, Y SU RELACIÓN CON LAS HBD2 EN LA POBLACIÓN	80
NIVELES DE HBD2 EN NEONATOS A TÉRMINO Y ADULTOS SANOS	80
NIVELES DE HBD2 EN NEONATOS A TÉRMINO Y PREMATUROS	81
HBD2 Y SUSCEPTIBILIDAD FRENTE INFECCIONES	82
HBD2 Y LA PRESENCIA DE CORIOAMNIONITIS	83
PROYECTO 2:	84
DATOS CLÍNICOS Y DEMOGRÁFICOS	84
REGULACIÓN DE HBD2 Y MBL DURANTE LA SOSPECHA DE SEPSIS	85
INFLUENCIA DE LA EDAD GESTACIONAL Y PESO AL NACER EN LOS NIVELES DE HBD2	85
INFLUENCIA DE LA EDAD GESTACIONAL Y PESO AL NACER EN LOS NIVELES DE MBL	87
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE HBD2 Y RECUENTO DE NEUTRÓFILOS EN LA POBLACIÓN GENERAL	87
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE HBD2 Y LOS VALORES DE LA PROTEÍNA C REACTIVA	88
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MBL, RECUENTO DE NEUTRÓFILOS Y LOS VALORES DE LA PROTEÍNA C REACTIVA	89
ESTRATIFICACIÓN DE LA COHORTE SEGÚN LAS VARIABLES: SEPSIS Y HEMOCULTIVOS	89
NIVELES DE HBD2 EN RELACIÓN CON LA EDAD GESTACIONAL Y EL PESO AL NACER EN LOS ESTRATOS DE LA VARIABLE SEPSIS	89
NIVELES DE MBL EN RELACIÓN CON LA EDAD GESTACIONAL Y EL PESO AL NACER EN LOS ESTRATOS DE LA VARIABLE SEPSIS	90
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE HBD2, RECUENTO DE NEUTRÓFILOS Y LOS VALORES DE LA PROTEÍNA C REACTIVA EN LOS ESTRATOS DE LA VARIABLE SEPSIS Y HEMOCULTIVOS	91
CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MBL, RECUENTO DE NEUTRÓFILOS Y LOS VALORES DE LA PROTEÍNA C REACTIVA EN LOS ESTRATOS DE LA VARIABLE SEPSIS Y HEMOCULTIVOS	92
VI. CONCLUSIONES	93
CONCLUSIONES	95
CONCLUSIONS	96
VII. BIBLIOGRAFÍA	96
VIII. ANEXOS	109

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Mediadores solubles del sistema inmune innato con efecto regulador en las edades tempranas	12
TABLA 2: Localización y función de las defensinas humanas.	17
TABLA 3: Comparación de datos demográficos y clínicos entre los grupos según edad gestacional	42
TABLA 4: Comparación de niveles de HBD2 en suero en relación con variables demográficas y clínicas	43
TABLA 5: Características generales de la población	46
TABLA 6: Características maternas y resultado de anatomía patológica	46
TABLA 7: Características del parto en la población general	47
TABLA 8: Características clínicas y analíticas en la población general en el momento del ingreso	47
TABLA 9: Variables de la población general relacionadas con la sospecha de sepsis	48
TABLA 10: Niveles de HBD2 en diferentes momentos de extracción en la población general	49
TABLA 11: Niveles de MBL en diferentes momentos de extracción en la población general	49
TABLA 12: Correlaciones entre la edad gestacional y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción	50
TABLA 13: Asociación entre la variable edad gestacional y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción	51
TABLA 14: Correlaciones entre el peso al nacer y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción	52
TABLA 15: Asociación entre la variable peso al nacer y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción	54
TABLA 16: Correlaciones entre la edad gestacional y niveles de MBL en suero en los diferentes momentos de extracción.	55
TABLA 17: Correlaciones entre la variable peso al nacer y niveles de MBL en suero en los diferentes momentos de extracción	55
TABLA 18: Asociación entre la variable edad gestacional y niveles de MBL en suero en los diferentes momentos de extracción	57
TABLA 19: Asociación entre la variable peso al nacer y niveles de MBL en suero en los diferentes momentos de extracción	57
TABLA 20: Correlaciones entre el recuento de neutrófilos y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción	58
TABLA 21: Distribución de frecuencias de la presencia de las diferentes categorías de sepsis en la población general	60
TABLA 22: Edad gestacional (semanas) para las categorías de la variable sepsis	60
TABLA 23: Peso al nacer (gramos) para las categorías de la variable sepsis.	60
TABLA 24: Asociación entre los niveles de HBD2 y la edad gestacional en el estrato “no sepsis”	61
TABLA 25: Asociación entre los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “no sepsis”	62

TABLA 26: Correlaciones entre el recuento de neutrófilos y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción para el estrato de “No sepsis”.	62
TABLA 27: Asociación entre los niveles de MBL y la edad gestacional en el estrato “no sepsis”.	64
TABLA 28: Asociación entre los niveles de MBL y el peso al nacer en el estrato “no sepsis”	64
TABLA 29: Asociación entre los niveles de HBD2 y la edad gestacional en el estrato “sepsis clínica”	66
TABLA 30: Asociación entre los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “sepsis clínica”	67
TABLA 31: Correlación entre el recuento de neutrófilos y los niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de su extracción para el estrato “Sepsis clínica”	68
TABLA 32: Asociación entre los niveles de HBD2 y la edad gestacional en el estrato “sepsis clínica”	70
TABLA 33: Asociación entre los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “sepsis clínica”	70
TABLA 34: Asociación entre los niveles de HBD2 y la edad gestacional en el estrato “sepsis confirmada”	71
TABLA 35: Asociación entre los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “sepsis confirmada”	72
TABLA 36: Correlación entre el recuento de neutrófilos y los niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de su extracción para el estrato “Sepsis confirmada”	73
TABLA 37: Correlación entre el valor de PCR y los niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de su extracción para el estrato “Sepsis confirmada”	74
TABLA 38: Asociación entre los niveles de MBL y la edad gestacional en el estrato “sepsis confirmada”	74
TABLA 39: Asociación entre los niveles de MBL y el peso al nacer en el estrato “sepsis confirmada”	75
TABLA 40: Distribución de frecuencias de la presencia de las diferentes categorías de resultado de cultivos en la población general	76
TABLA 41: Correlación entre el recuento de neutrófilos y los niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de su extracción para el estrato “Hemcultivo negativo”	76

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Las localizaciones de la infección intrauterina más frecuentes	3
FIGURA 2: Posibles mecanismos de la relación entre la colonización bacteriana de las estructuras coriodeciduals y el parto prematuro	4
FIGURA 3: Causas de muerte a nivel global en el año 2010	5
FIGURA 4: Estimación de la distribución de las causas directas de los 4 millones de fallecimientos neonatales	6
FIGURA 5: Representación gráfica de la estructura terciaria de las defensinas	16
FIGURA 6: Papel de las defensinas como péptido antimicrobiano y otras funciones asociadas a la defensa del huésped	18
FIGURA 7: Niveles de APPs en suero en neonatos preterminos, términos en relación con niveles hallados a nivel materno	20
FIGURA 8: Estudios realizados en adultos con determinación de niveles plasmáticos	21
FIGURA 9: Visión simplificada del sistema de complemento incluyendo la vía de las lectinas y sus interacciones con la vía alternativa y la vía clásica	22
FIGURA 10: La estructura del gen MBL2 y de la Léctina de unión a la manosa	23
FIGURA 11: Efecto del tiempo de procesamiento e inhibidores de proteínasa sobre los niveles de HBD2 en suero	41
FIGURA 12: Niveles de HBD2 a) en función de la edad y b) la presencia de sepsis tardía en el grupo de los prematuros	44
FIGURA 13: Correlación entre la edad gestacional y la media de los niveles de HBD2 en suero obtenido los días 0, 4 y 7 de sospecha de sepsis nosocomial	50
FIGURA 14: Asociación entre las variables edad gestacional y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción	52
FIGURA 15: Correlación entre el peso al nacer y la media de los niveles de HBD2 en suero obtenido los días 0, 4 y 7 de sospecha de sepsis nosocomial	53
FIGURA 16: Asociación entre la variable peso al nacer y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción	54

FIGURA 17: Correlación entre las medias del recuento de neutrófilos con los niveles de HBD2 en suero de sospecha de sepsis nosocomial	59
FIGURA 18: Correlación entre las medias del recuento de neutrófilos con las medias de los niveles de HBD2 en suero para el estrato de “No sepsis”	63
FIGURA 19: Asociación entre la media de los niveles de HBD2 y la edad gestacional en el estrato “sepsis clínica”	67
FIGURA 20: Asociación entre las medias de los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “sepsis clínica”	68
FIGURA 21: Correlación entre la medias del recuento de neutrófilos con los niveles de HBD2 en suero para el estrato de “Sepsis clínica”	69
FIGURA 22: Asociación entre las medias de los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “sepsis confirmada”	72
FIGURA 23: Asociación entre las medias de los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “sepsis confirmada”	73
FIGURA 24: Gráfica de correlación entre las medias de los recuentos de neutrófilos con las medias de los niveles de HBD2 en suero para el estrato de “Hemocultivo negativo”	77

ABREVIATURAS

AMP:	Péptido antimicrobiano
AUC:	Área debajo de la curva
BPI:	Proteína-bactericida incrementadora de la permeabilidad
CRD:	Dominio rico en cisteína
DPB:	Panbronquiolitis difusa
EG:	Edad gestacional
ELISA:	Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay
FIRS:	Síndrome inflamatorio fetal
HBD:	Beta defensina humana
HNP:	Human neutrophil peptide
HV:	Voluntarios sanos
IC:	Intervalo de confianza
IFN:	Interferón
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleuquina
MBL:	Léctina de la unión a la manosa
MASP:	Serina-proteasas asociadas a la proteína de unión a la manosa
NK:	Natural killer
OD:	Densidad óptica
OR:	Odds ratio
PCR:	Proteína C reactiva
PN:	Peso al nacer
RN:	Recién nacido
RNEBPN:	Recién nacido de extremo bajo peso al nacer
RNMBPN:	Recién nacido con muy bajo peso al nacer
RR:	Riesgo relativo
SA-HRP:	Estreptovidina peroxidasa
sPLA2:	Fosfolipasa A2 soluble
Th:	Célula T helper
TLR:	Receptores toll-like
TNF:	Factor de necrosis tumoral
UCI-NN:	Unidad de cuidados intensivos neonatales

Resumen:

“Impacto de la Lectina de Unión a la Manosa (MBL) y β -Defensina humana 2 (HBD2) en la susceptibilidad frente a infecciones en neonatos prematuros extremos”

Introducción:

Los recién nacidos prematuros extremos (< 32 semanas de edad gestacional, EG) son una población de riesgo para desarrollar infecciones invasivas y sufrir complicaciones derivadas de la respuesta inflamatoria asociadas a estos procesos. Por otra parte, representan un modelo interesante para generar conocimientos sobre la importancia del sistema inmune innato dada su alta dependencia de esta rama de la inmunidad. La Lectina de Unión a la Manosa (MBL) y β -Defensina humana 2 (HBD2) son mediadores solubles del sistema inmune innato. En la actualidad no existen estudios sobre su impacto en procesos fisiológicos o fisiopatológicos en la edad neonatal en nuestro medio.

Objetivos:

Describir las posibles asociaciones entre los niveles de MBL y HBD2 en suero obtenido en el momento de nacer o durante la sospecha de un proceso infeccioso, con variables demográficas o eventos clínicos determinados.

Metodología:

Realización de dos proyectos (P1, P2) interrelacionados entre sí, reclutando neonatos de forma retrospectiva y prospectiva en el ámbito de un Hospital de tercer nivel. Se realizó el estudio histopatológico de muestras de placenta, determinación de niveles de MBL y HBD2 mediante técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) en muestras de sangre y recogida sistemática de datos clínicos y analíticos relevantes de las historias clínicas informatizadas. Para el análisis de datos se emplearon los procedimientos estadísticos correspondientes.

Resultados:

En total se reclutaron 157 neonatos (P1, n=73 y P2, n=84) y se analizaron 475 muestras (P1, n=73 y P2, n=402).

No se encontraron diferencias significativas analizando las muestras procesadas con o sin un inhibidor de proteinasas, en diferentes momentos tras su extracción.

P1: En el momento de nacer los neonatos a término presentaron niveles de HBD2 más elevados en comparación con los neonatos prematuros extremos (mediana 1882 versus 918 pg/ml, $p= 0,003$). Siete de los 31 neonatos prematuros sufrieron una sepsis neonatal. Los neonatos con esta complicación clínica presentaron niveles de HBD2 inferiores a aquellos neonatos que no sufrieron de sepsis (mediana 513 versus 1411 pg/ml, $p= 0,006$).

P2: Durante los episodios de sospecha de sepsis no se mostraron modificaciones significativas de los niveles de HBD2 ni de MBL. Se halló una correlación negativa para las variables EG y peso al nacer con los niveles de HBD2 (Rho: -0,314, $p=0,004$; Rho: -0,332, $p=0,002$). En cambio no se mostraron correlaciones significativas para estas variables con los niveles de MBL ($p=0,534$ y $p=0,661$). Se observó una correlación positiva entre los niveles de HBD2 y el recuento de neutrófilos (Rho: 0,375, $p=0,001$) pero no con el valor de la proteína C reactiva ($p=0,250$). Los niveles de MBL no se asociaron de forma significativa con ninguna de estas dos variables. Estratificando la cohorte en función de presencia de sepsis y resultados de hemocultivos se confirmaron las observaciones anteriores.

Conclusiones:

Existen niveles de HBD2 medibles y estables en muestras de suero en la edad neonatal. Estos niveles son más elevados en los neonatos en comparación con los adultos. Niveles bajos al nacer se asocian con un mayor riesgo de sufrir una sepsis nosocomial. En los prematuros extremos hay una correlación negativa entre los niveles de HBD2 con la EG. Los niveles de HBD2 se correlacionan con el recuento de neutrófilos pero no con los valores de la PCR. En nuestra cohorte los niveles de MBL no se asocian con la EG, riesgo de sepsis, recuento de neutrófilos o valores de la PCR.

Summary:

“Impact of Mannose binding lectin (MBL) and Human beta defensin 2 (HBD2) on the infection susceptibility of extreme preterm neonates”

Introduction:

Extreme preterm neonates (gestational age < 32 weeks) are prone to suffer from invasive infections and to develop complications due to an associated inflammatory response. In addition, this population represents an interesting group for the study of the innate immune system given its high dependency on this branch of the immune response. The Mannose binding lectin (MBL) and Human beta defensin 2 (HBD2) are soluble mediators of the innate immune system. To date there is no data regarding their impact on physiologic or pathophysiologic settings in the neonatal period in our environment.

Aims:

To describe the possible associations between MBL and HBD2 serum levels measured at birth or during suspected infectious processes in the neonatal period, with important demographic and clinical variables.

Methods:

Two related projects (P1, P2), recruiting newborns retrospectively as well as prospectively in a tertiary hospital center were performed. Histopathologic examination of placenta fragments, measurement of MBL and HBD2 (ELISA, *Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay*) in serum samples and systemic collection of clinical and laboratory data were realized. For data evaluation corresponding statistical analysis was performed.

Results:

Within these two projects 157 neonates (P1, n=73 and P2, n=84) were recruited and 475 (P1, n=73, P2, n=402) samples were analyzed. The presence or absence of

a proteinase inhibitor or the different time points of sample processing did not show a significantly effect on HBD2 levels.

P1: Forty-two term and 31 preterm neonates were enrolled. Human beta-defensin-2 levels in term neonates were higher compared with preterm infants (median 1,882 vs 918 pg/mL; $p = 0.003$) and correlated with gestational age and birth weight. Of 31 preterm neonates, seven suffered from late-onset sepsis, and this was associated with lower human beta-defensin-2 levels (median 513 vs 1,411 pg/mL; $p = 0.006$).

P2: HBD2 and MBL levels did not show significant variations during suspected septic episodes. HBD2 levels were negatively correlated with GA and BW (Rho: -0,314, $p=0,004$; Rho: -0,332, $p=0,002$). In contrast, no significant relation was found for these variables with MBL serum levels ($p=0,534$ y $p=0,661$). The neutrophil count showed a positive correlation with the HBD2 concentrations (Rho: 0,375, $p=0,001$), but not with C-reactive protein (CRP) levels ($p=0,250$). MBL was not associated with any of these variables. Stratification of the cohort regarding the presence of sepsis and blood culture results confirmed the previously described observations.

Conclusion:

HBD2 is detectable and its levels remain stable in neonatal serum samples. Newborns show higher levels of this antimicrobial peptide compared to adults. Low human beta-defensin-2 levels in preterm neonates might be associated with an increased risk of late-onset sepsis. In the extreme premature neonates a negative correlation between the HBD2 levels and GA has been observed and the HBD2 concentrations were positively correlated with the neutrophil counts. In our cohort MBL levels were not associated with the variables: GA, sepsis risk, neutrophil counts or CRP.

I. INTRODUCCIÓN

Introducción

Esta tesis doctoral trata de analizar el impacto de partes solubles del sistema inmune innato sobre la susceptibilidad de sufrir infecciones en la edad neonatal. Del mismo modo es objetivo de este trabajo generar nuevas hipótesis y aumentar los conocimientos sobre la fisiología y fisiopatología de componentes del sistema inmune innato en recién nacidos. Para lograr estos objetivos se han realizado dos proyectos relacionados entre sí.

1.1 Prematuridad

Se define como parto pretérmino o prematuro aquellos partos que se producen antes de la semana 37 de gestación. Se ha introducido la siguiente nomenclatura para diferenciar subgrupos de prematuridad según la edad gestacional (EG): 32-37 semanas de EG “pretérmino tardío”; menor de 32 semanas de EG “recién nacido muy pretérmino” y menor de 28 semanas EG “recién nacido pretérmino extremo” [1,2].

Aunque en la práctica clínica se usa de forma sinónima el término de recién nacido pretérmino, esto no implica información sobre su estado de madurez. Dadas las dificultades de establecer con exactitud la edad gestacional se acepta la inclusión del peso del recién nacido como valor de referencia. Se diferencian los siguientes grupos: (1) menor de 2500 g “bajo peso al nacimiento”; (2) menor de 1500 g “muy bajo peso al nacimiento”; (3) menor de 1000 g “extremado bajo peso” [1,2]. A pesar de numerosos estudios e intervenciones realizados con el fin de prevenir el parto prematuro este evento sigue siendo actualmente uno de los grandes retos de los sistemas sanitarios [3-5].

La tasa de partos prematuros (menor de 37 semanas de EG) oscila en los últimos años alrededor de 12-13% en Estados Unidos (EEUU) y 5-9% en países europeos. Mujeres afro-americanas y afro-caribeñas demuestran una tasa elevada (16-18%) de presentar partos

INTRODUCCIÓN

prematurados en comparación con mujeres de raza blanca (6-9%) [6]. Una parte de las diferencias encontradas entre las tasas de partos prematuros en EEUU en comparación con otros países con similar nivel de desarrollo se debe posiblemente a esta asociación [6].

Otros factores de riesgo de prematuridad son gestaciones múltiples, corto intervalo entre diferentes embarazos, antecedentes personales o familiares de partos prematuros, desnutrición, estrés social o psicológico, tabaquismo, uso de heroína o cocaína y enfermedades maternas como depresión, hipertensión arterial, diabetes mellitus u otras enfermedades que puedan llevar a inducir el parto de forma precoz por riesgo materno [3,7,8]. En la última década la mayor aplicación de técnicas de reproducción asistida ha contribuido posiblemente a que las cifras de prematuridad no se hayan reducido a pesar de intervenciones preventivas y terapéuticas importantes [3,8].

Las infecciones intrauterinas se reconocen como una causa importante del parto prematuro [9,10]. En los últimos años, se ha observado que las citoquinas inflamatorias sirven de señal fetal para el inicio del parto en el contexto de infecciones [9-13]. Un alto porcentaje de las infecciones tienen una presentación subclínica y los patógenos más frecuentemente identificados son *Trichomonas sspp*, *Chlamydia sspp*, *Neisseria gonorrhoea* y *Treponema pallidum*, mientras el papel de otros patógenos como *Streptococcus grupo B*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma ureolyticum* sigue siendo discutido [14-16]. Las vías de transmisión de los agentes infecciosos en las infecciones intrauterinas son múltiples y pueden afectar a diferentes estructuras fetales. En la **Figura 1** se puede observar en qué áreas anatómicas y funcionales ocurren la mayoría de las infecciones intrauterianas [17].

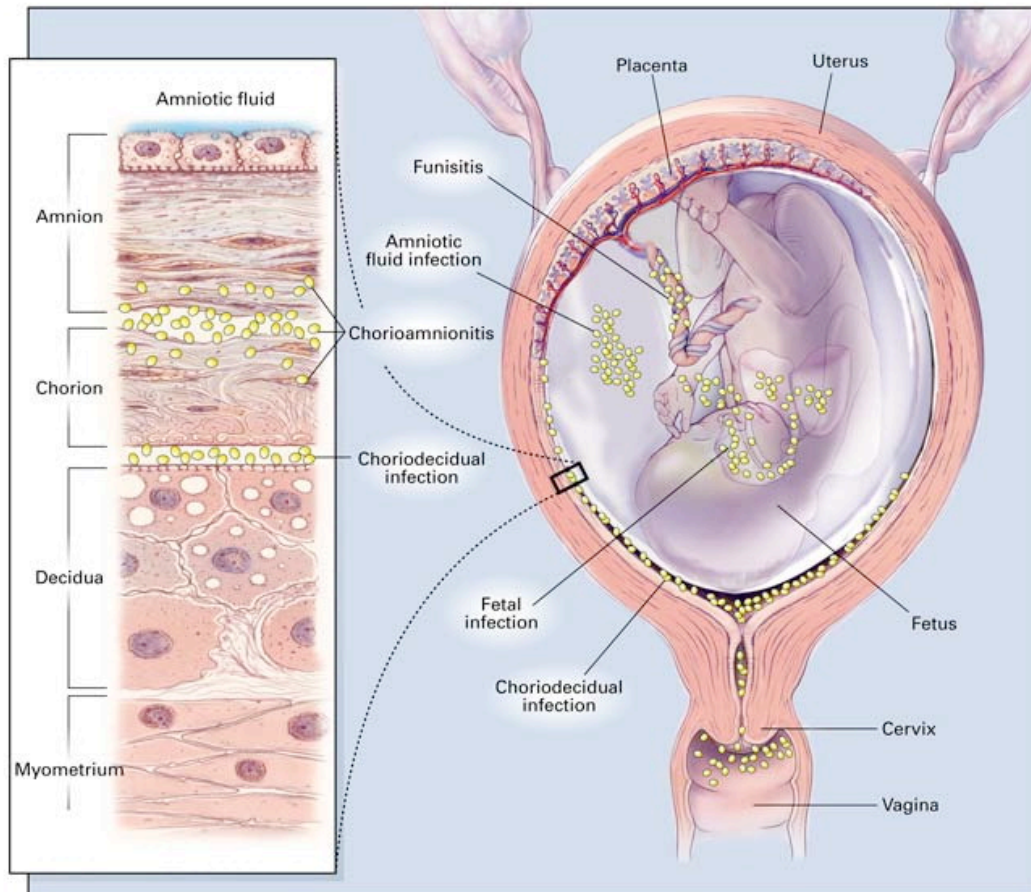


Figura 1: Lugares de infección intrauterina más frecuentes [17].

En la actualidad no se dispone de herramientas con eficacia comprobada para prevenir el parto prematuro, probablemente por desconocerse todavía los mecanismos fisiopatológicos del parto prematuro en su complejidad. Se postulan como datos con mayor implicación, los procesos inflamatorios debidos a infecciones y la insuficiencia del cervix [7-9] siendo esta última el mecanismo común final que explicaría el parto pretérmino con independencia de la posible etiología subyacente [10]. La **Figura 2** representa un esquema de mecanismos que se inician tras un estímulo infeccioso y que finalmente pueden llevar al parto prematuro [17].

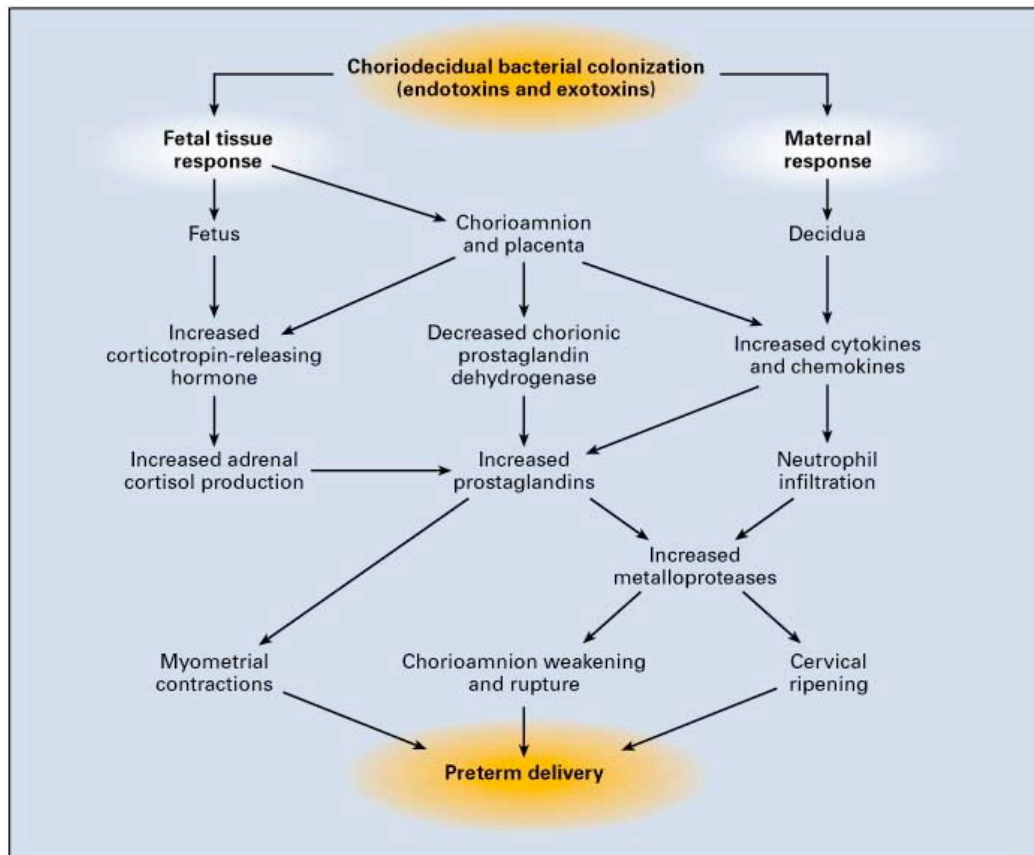


Figura 2: Posibles mecanismos de la relación entre la colonización bacteriana de las estructuras coriodeciduales y el parto prematuro [17].

Sin embargo, no existen datos concluyentes sobre la cadena de mediadores y factores iniciales lo que impide el diseño racional de estrategias de intervención eficaces.

Además, existe evidencia creciente que el síndrome inflamatorio fetal (FIRS) está asociado con una mayor morbimortalidad neonatal siendo la Interleuquina (IL) -6 la citoquina más frecuentemente relacionada con esta complicación clínica [18]. Es un dato interesante que en los últimos años diferentes grupos han podido demostrar por un parte la inducción de esta sustancia por neuropeptidos tales como la sustancia P, y por otra la presencia de este neuropeptido en la placenta [18-20]. Además en un modelo animal se ha observado una asociación significativa entre el síndrome inflamatorio fetal y la parálisis cerebral [21] y en estudios tipo metanálisis se concluyó que la corioamnionitis estaba relacionada con la parálisis cerebral infantil [22].

No obstante, faltan estudios de suficiente tamaño muestral para poder conocer las complejas interrelaciones que pudieran existir entre corioamnionitis, FIRS, inducción de parto prematuro, sepsis precoz o tardía y morbilidad neonatal asociada.

Aunque en los últimos años se han conseguido bajar las cifras de mortalidad neonatal, el fallecimiento en estas edades sigue siendo uno de los mayores retos de los sistemas sanitarios a nivel global [4,5]. La **Figura 3** muestra que en el año 2010 fallecieron 7.6 millones de niños menores de 5 años, de los cuales 3.1 millones fallecieron en los primeros 28 días de vida lo que constituye un 40% de la mortalidad infantil en niños menores de 5 años [23].

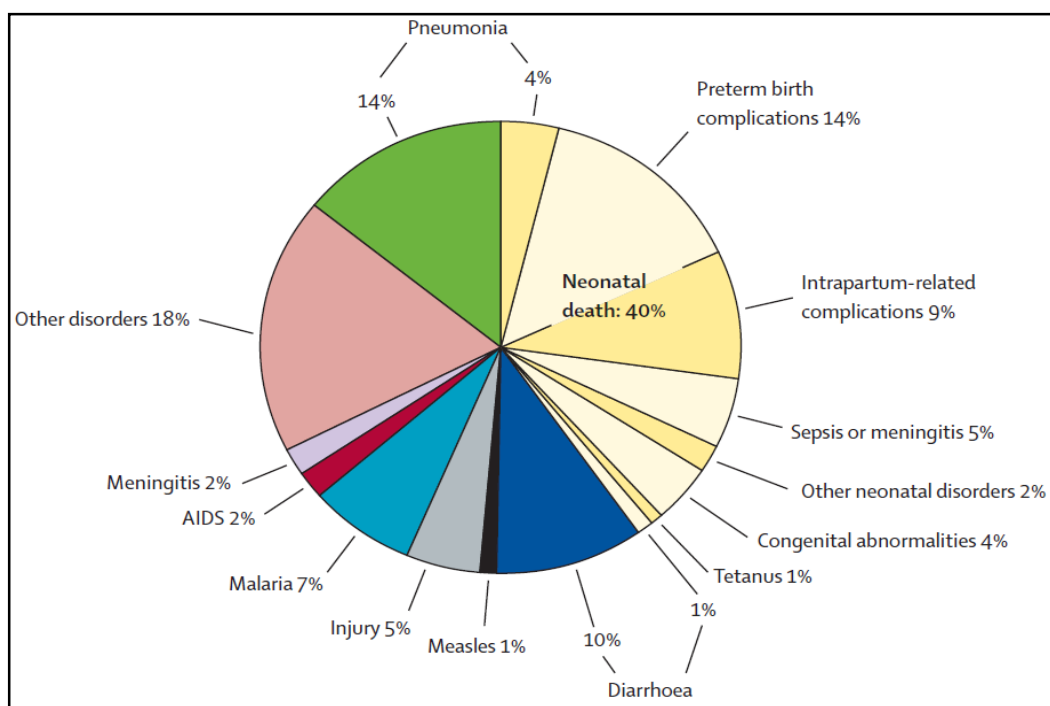


Figura 3: Causas de muerte a nivel global en el año 2010 [23].

De manera similar se identificó al parto prematuro y sus complicaciones como eventos relacionados con un 27% de la mortalidad neonatal, tal y como se puede apreciar en la **Figura 4** [5].

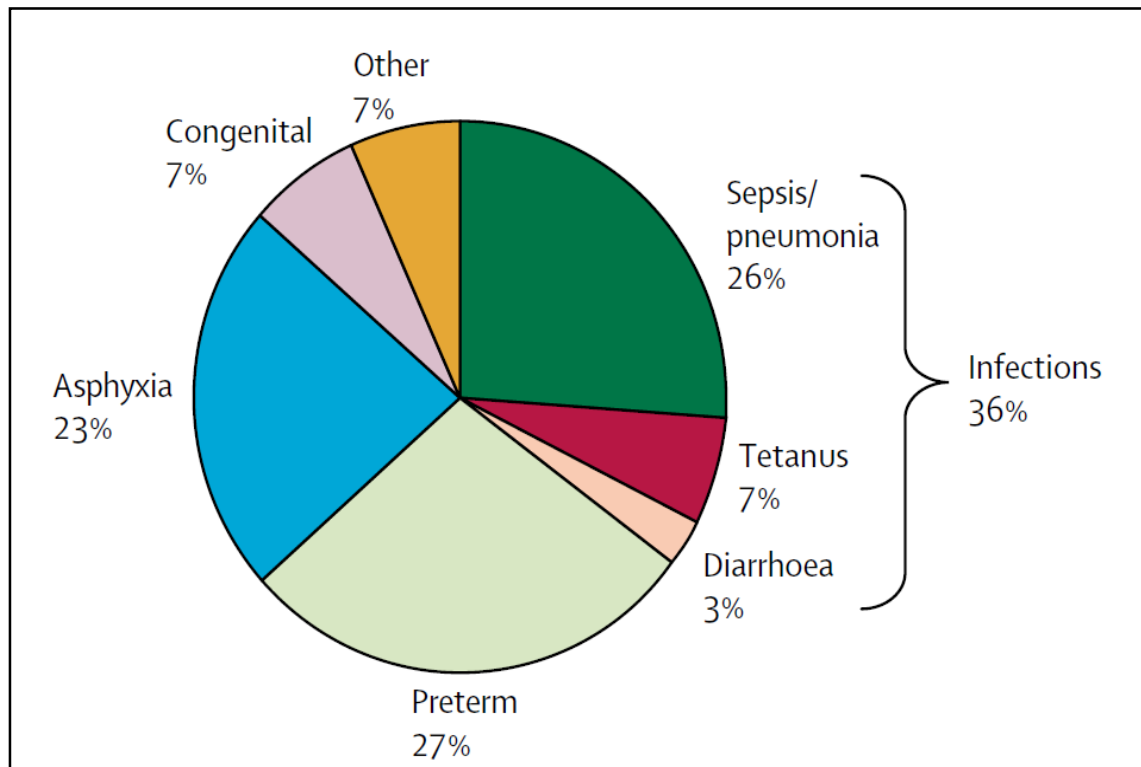


Figura 4: Estimación de la distribución de las causas directas de los 4 millones de fallecimientos neonatales [5].

Además de contribuir en una proporción considerable a la mortalidad infantil, el parto prematuro se asocia con complicaciones importantes que implican un alto riesgo de secuelas a largo plazo. Así, neonatos con una edad gestacional de 23 y 27 semanas presentan un riesgo relativo (RR) de 80 de padecer parálisis cerebral, un RR de 10 de presentar retraso mental y un RR de 7,5 de recibir una pensión de discapacidad en comparación con niños nacidos a término [24].

Afortunadamente, la mejora continua en los campos de la Obstetricia y Neonatología han permitido aumentar la supervivencia de los prematuros y su pronóstico a largo plazo [6,7] aunque sigue siendo una realidad reconocida que la disponibilidad y el consumo de estos recursos avanzados se transcribe en un elevado gasto económico [6,24-27]. Este gasto no se limita solamente a la estancia hospitalaria, sino también durante el seguimiento extrahospitalario [24] debido a su elevado riesgo de sufrir secuelas neurosensoriales y

comorbilidad crónica [24,28-32]. Los datos epidemiológicos del año 2009 en España recabados en el grupo de niños con un peso menor de 1500 g permiten estimar la magnitud del impacto del parto prematuro. En este registro nacional se observa una mortalidad del 17,2% de un total de 1968 individuos. El alta hospitalaria se realizó por término medio a los 49 días de edad y en este momento el 45,9% de los supervivientes presentaba algún tipo de morbilidad asociada. Además, se pudo demostrar que muchas de estas complicaciones (29%) estaban directamente relacionadas con patologías infecciosas con especial importancia de la corioamnionitis y de la sepsis neonatal [33].

1.2 Sepsis neonatal

Definición, epidemiología y datos demográficos

La sepsis neonatal se define como la bacteriemia con signos de infección sistémicos en los primeros 28 días de vida [34].

A nivel mundial se estima que las infecciones neonatales invasivas causan un 36% de los 4 millones de fallecimientos neonatales [35]. Del mismo modo, la sepsis neonatal representa una de las causas más frecuentes de muerte en las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCI-NN) que puede alcanzar, dependiendo del patógeno y de la edad gestacional de los recién nacidos, cifras de mortalidad entre el 10-40% [36-38]. Además de estar asociada con una morbilidad significativa, la septicemia es también causa de aumento de la estancia hospitalaria y de los costes hospitalarios [39,40]. Según el momento de aparición, los patógenos implicados y la patogénesis, se puede diferenciar la sepsis neonatal en dos entidades: la sepsis precoz o vertical y la sepsis tardía o nosocomial [34].

Sepsis precoz o Sepsis vertical

La incidencia de sepsis precoz o vertical es de 0.98-11/1000 neonatos vivos de forma global, siendo esta tasa superior en el subgrupo de neonatos prematuros [41]. Se define como la presentación de sintomatología compatible con una sepsis en las primeras 72 horas de vida, y la vía de transmisión de la infección suele ser ascendente [34,41].

Sepsis tardía o Sepsis nosocomial

La sepsis tardía o nosocomial es la infección sistémica a partir de 72 horas de vida y continúa siendo un problema de extraordinaria importancia, debido a su elevada morbilidad, a pesar de los avances y esfuerzos realizados en el campo de los cuidados neonatales [42-44]. La tasa de complicaciones graves y mortalidad es más frecuente en el recién nacido con muy bajo peso al nacer (RNMBPN, menor de 1.500 g) [45]. Además de su morbilidad significativa, un estudio realizado en EEUU concluyó que cada episodio de septicemia en la edad neonatal se traduce en una prolongación de la estancia hospitalaria de

aproximadamente dos semanas y un coste adicional de 25.000 \$ [46,47].

Los neonatos hospitalizados en una UCI-NN, en particular los recién nacidos prematuros, presentan altas tasas de sepsis nosocomial con cifras variando entre las distintas UCI-NNs (de un 7 a un 24.5%), en función de factores ambientales, intrínsecos y debido a diferencias en la práctica clínica [48,49].

En España un 21% de todos los RNMBPN y hasta el 43% de los recién nacidos de extremo bajo peso al nacer (RNEBPN, menor de 1000 g) desarrollan una sepsis demostrada [50].

Esta complicación clínica grave se presenta habitualmente entre la segunda y tercera semana de vida. De los gérmenes aislados en un 70% son Gram positivos, 25% Gram negativos y un 5% hongos [51]. Aunque los staphylococcus coagulasa negativos como por ejemplo *Staphylococcus epidermidis* son los gérmenes que se aíslan con mayor frecuencia [52] las infecciones causadas por gérmenes Gram negativos o cándida presentan una mortalidad de 2 a 3 veces mayor [37,53].

Infecciones invasivas en la edad neonatal y afectación broncopulmonar y neurológica

Aunque el pronóstico de los supervivientes de sepsis en la edad neonatal ha mejorado de forma global, con menores tasas de mortalidad y complicaciones respiratorias y neurológicas, las secuelas broncopulmonares y neurológicas siguen siendo de gran importancia, afectando la calidad de vida de los pacientes y de sus familias [54-57].

Se ha comprobado daño cerebral, determinado como alteraciones significativas en la resonancia magnética a nivel de la sustancia blanca, en un 36% de niños con antecedentes de más de un episodio de sepsis durante el periodo neonatal, comparados con un 5% en niños con no más de un episodio (OR 10.9; IC 95% 2.5-47.6) [57].

A nivel clínico esto se traduce en mayores tasas de parálisis cerebral infantil y menor rendimiento escolar en el grupo de niños con sepsis [58,59].

Presentación clínica y métodos diagnósticos de sepsis neonatal

La presentación clínica de una sepsis neonatal puede ser indistinguible de otras complicaciones comunes en la edad neonatal e incluye:

1. Signos de distrés respiratorio
2. Inestabilidad térmica

3. Hipotensión arterial
4. Bradicardia o taquicardia
5. Letargia o irritabilidad
6. Distensión abdominal
7. Intolerancia nutricional

Sin embargo, en un estudio reciente se ha comprobado el muy bajo valor predictivo de estos criterios, 61% (Intervalo de confianza al 95%: 52-70%) [60]. En general, dado por hecho que una vez establecida la sintomatología clínica la mortalidad aumenta de forma inaceptable, muchos clínicos comienzan de forma empírica un tratamiento antibiótico de amplio espectro [59]. Por estos motivos muchos estudios buscan herramientas para poder establecer el diagnóstico de sepsis de forma precoz, y con la mayor precisión posible (idealmente durante la fase asintomática), con el objetivo de evitar tratamientos innecesarios e identificar a aquellos neonatos que se beneficiarían de un manejo diagnóstico y terapéutico más agresivo [61,62].

En este escenario es probable que un mayor conocimiento sobre las funciones y características de los mediadores solubles de sistema inmune innato podrían ser de utilidad. Sin embargo en la actualidad no disponemos de datos suficientes para conocer la importancia del sistema inmune innato en los prematuros extremos, bien en el momento de nacer o posteriormente en el periodo neonatal en situaciones de estrés.

En este sentido, la presente tesis doctoral busca aumentar los conocimientos sobre esta rama del sistema inmunitario en esta población tan vulnerable para infecciones y/o secuelas inflamatorias.

1.3 El sistema inmune en la edad neonatal

A lo largo de la evolución, el sistema inmunitario se ha adaptado para proporcionar los mecanismos de defensa más eficaces frente a los microorganismos, siendo a la vez los menos lesivos para el huésped [63,64]. Los cambios en el espectro de microorganismos a los que se enfrenta el ser humano en las diferentes épocas de su vida hacen necesario que el sistema de defensa se encuentre en proceso de adaptación continuo [64].

En la edad adulta, el sistema inmune adaptativo tiene fundamental relevancia mientras que en la edad neonatal su aportación como mecanismo de defensa es mucha más limitada. En el útero el feto se encuentra aislado de estímulos antigénicos lo que se refleja en un recuento muy disminuido de células T y B de memoria [65,66]. Del mismo modo, la respuesta inmune en neonatos se caracteriza por cierto grado de parálisis a la hora de activar el compartimento pro-inflamatorio, incluyendo las células T helper (Th) 1 y las correspondientes citoquinas tipo Interleuquina (IL-) 2, Interferon (IFN) alfa e IFN-gamma en contexto de infecciones perinatales [66].

La dominancia resultante de Th17 (células T helper que inducen la producción del citoquina pro inflamatoria IL-17) y Th2 en estos procesos, en conjunto con niveles disminuidos de las T y B de memoria, condicionan una susceptibilidad elevada frente a múltiples patógenos [64-66].

En el recién nacido prematuro coinciden otras características que agravan esta predisposición a encontrar infecciones. En el neonato menor de 32 semanas de gestación, el traspaso de anticuerpos maternos por vía placentaria (predominantemente Inmunoglobulina G), como el dirigido contra el estreptococo del grupo B, es muy inferior en comparación con la cantidad de anticuerpos en recién nacidos a termino [67]. Debido a estas insuficiencias “fisiológicas” del sistema inmunitario adaptativo, es probable que los recién nacidos, y más aún los preterminos, dependen en gran parte del sistema inmune innato. Sin embargo sigue siendo incierto de qué parte de esta rama de la inmunidad dependen estos neonatos, ya que muchas partículas del sistema inmunitario innato presentan niveles mayores en la edad adulta (**Tabla 1**) [68,69]. Encontrar moléculas con

niveles mayores en los recién nacidos prematuros en comparación con neonatos a término, apoyaría la hipótesis de un mayor grado de dependencia del sistema inmune innato cuanto más inmaduro sea el recién nacido. Estos conocimientos pueden ser cruciales para entender mejor el funcionamiento de la respuesta inmunitaria global en estas poblaciones específicas.

Comparación de niveles de mediadores solubles con capacidad reguladora sobre el sistema inmune en función de la edad			
Categoría	Molécula	Neonato/Adulto	Pretérmino/Término
Citoquinas (tras estimulación)	IL-6	↑↑	↓
	IL-10	↓	≈
	IL-12p70	↓	↓
	IFN γ	↓	↓
	TNF α	↓	↓
Complemento	C1q	↓	↓
	C1r	↓	↓
	C1s	↓	↓
	C2	↓	↓
	C3	↓	↓
	C4	↓	↓
	Factor B	↓	↓
	Factor D	↓	↓
	Properdina	↓	↓
	MBL	≈	↓
	MASP	≈	≈
	C5	↓	↓
	C6	↓	↓
	C7	≈	↓
C8	↓	≈	
C9	↓	↓	
Péptidos Antimicrobianos	Lactoferrina	↓	↓
	BPI	↓	↓
	Catelicidina	↓	ND
	α Defensinas	≈	≈
	β Defensinas 2	↓	↓
Anticuerpos	IgM	↓	↓
	IgA	↓	↓
	IgG	≈	↓
Purinas	Adenosina	↑	ND

Tabla 1: Modificado de [68]. Mediadores solubles del sistema inmune innato con efecto regulador en las edades tempranas. *IL: Interleuquina, IFN: Interferon, TNF: Factor de necrosis tumoral, MBL: Léctina de unión a la manosa, MASP: serina-proteasas asociadas a la proteína de unión a la manosa, BPI: proteína-bactericida-incrementadora-de-la-permeabilidad, Ig: Inmunoglobulina.*

El sistema inmune innato incluye los siguientes factores: mecanismo de barrera como piel y mucosa, receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) como por ejemplo los receptores toll-like (TLR), fagocitos como neutrofilos y macrófagos, células dendríticas, células NK (*natural killer*) y finalmente las partes solubles del sistema

inmune innato como los factores de complemento, MBL (*mannose-binding lectin*), y peptidos antimicrobianos como por ejemplo las defensinas [70,71].

El sistema inmune innato representa la primera línea de defensa y se activa inmediatamente después de un estímulo, habitualmente infeccioso, para conseguir un control rápido de la replicación y eliminación de un patógeno mediante la secreción de citoquinas [72,73]. Aunque el sistema de inmunidad innata sea menos específico que la inmunidad adquirida, tiene capacidad de proporcionar protección inmediata contra una amplia variedad de microorganismos sin precisar estímulos antigénicos previos [74]. Del mismo modo es importante recordar que el concepto de la separación entre el sistema inmune innato y adaptativo no describe la realidad, ya que en muchos sentidos existen interacciones entre ambos [74,75].

En los últimos años varios trabajos han analizado el papel del sistema inmune innato en el contexto de las infecciones invasivas en el periodo neonatal [73,76].

En condiciones de estrés (p.ej. sepsis) los recién nacidos disponen de un almacenamiento de granulocitos y monocitos inmaduros insuficientes lo que puede resultar en recuentos disminuidos en sangre periférica durante procesos infecciosos graves [77]. Del mismo modo, se han descrito defectos de reclutamiento, migración, activación y capacidad antimicrobiana de los neutrófilos en la edad neonatal siendo estos defectos aún más aparentes en los recién nacidos y específicamente en prematuros [78,79]. Aunque los recién nacidos prematuros disponen de recuentos menores de neutrófilos y macrófagos, no hay diferencias en su capacidad de fagocitosis en comparación con neonatos a término [80].

La disminución de repuesta (pro-inflamatoria) Th1 en la edad neonatal facilita la tolerancia entre feto y madre pero al mismo tiempo altera el reclutamiento y activación de los monocitos y de las células presentadoras de antígeno (APC) en las primeras semanas de vida [81,82].

Neonatos prematuros (25-37 semanas de edad gestacional) presentan niveles de expresión de receptores de toll-like (TLR) disminuidos en comparación con adultos [83,84]. Los TLRs facilitan el reconocimiento de patógenos muy relevantes en la edad neonatal tales como: *Streptococcus grupo B*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacteriaceae*, citomegalovirus, virus

respiratorio sinticial, lo cual puede explicar al menos en parte su mayor susceptibilidad y gravedad de niños prematuros para este tipo de infecciones [84].

Dado que la respuesta inmune innata representa una primera línea de defensa fundamental como mecanismo contra estímulos inflamatorios en los recién nacidos, es probable que variaciones en su desarrollo tengan una relevancia importante en la modulación de la respuesta inflamatoria en las primeras semanas de vida.

Esta tesis se centra en el estudio de mediadores solubles de la inmunidad innata en la edad neonatal, aunque centrándonos en los pacientes de alto riesgo como los grandes prematuros. El plasma contiene una gran variedad de mediadores solubles con capacidad reguladora sobre el sistema inmune. Sus concentraciones y modo de actividad dependen en gran medida de la edad [68,69]. En la edad neonatal y aún más en recién nacidos prematuros, los niveles de muchas moléculas solubles y relevantes para la inmunidad innata son inferiores a los que se hallan en adultos [68,69,85].

Factores como por ejemplo el complemento y la MBL regulan y coordinan la respuesta inmunitaria adaptativa e innata pero también poseen actividad antimicrobiana directa. En la edad neonatal los factores de complemento muestran niveles más bajos (aproximadamente 10-70%) y una capacidad funcional subóptima [86].

Concretamente se ha podido demostrar que el déficit de la MBL es un factor de riesgo independiente para sufrir infecciones graves en la edad neonatal [87-89].

Los neonatos presentan un déficit de activación y de función de las células NK que en parte justifica las alteraciones en el control de infecciones víricas [90]. Así mismo, se observan en edades muy tempranas respuestas insuficientes a estímulos infecciosos en la producción de citoquinas tales como IFN- γ , lo cual aumenta el riesgo de padecer infecciones intracelulares. Esta falta de producción es todavía más aparente en los recién nacidos prematuros [91]. Péptidos o proteínas antimicrobianas a nivel del cérvix uterino, líquido amniótico, placenta y también en el recién nacido (piel, tracto respiratorio y sangre) ayudan a controlar el impacto de la invasión bacteriana y son activados durante una infección, bien por reconocimiento directo de estructuras conservadas en la superficie de los patógenos o de forma indirecta a través de los TLR (toll-like-receptors) [86,92,93]. Ejemplos para estas sustancias son las defensinas, catelecidinas, la lactoferrina y la proteína bactericida y aumentadora de la permeabilidad (BPI) [68,69]. A nivel experimental y clínico una serie de trabajos han señalado el posible papel de estas sustancias para el recién nacido. Sus funciones parecen

estar no solamente relacionados con su actividad antimicrobiana, sino que también con su capacidad inmunomoduladora [69,70,85,93,94].

Es un hecho preocupante que los recién nacidos y con mayor intensidad las recién nacidos preterminos padecen y fallecen con mayor frecuencia a causa de infecciones graves en comparación con los adultos [95], siendo la inmadurez fisiológica de la respuesta inmune adaptativa e innata una de los principales factores de riesgo en las infecciones neonatales [3,67,75-79,85,89].

En esta tesis se van a evaluar dos mediadores solubles (MBL y HBD2), que son parte del sistema inmune innato, en niños prematuros y en el contexto de procesos infecciosos invasivos como la sepsis nosocomial. De esta manera se podría entender mejor su implicación en el desarrollo del sistema inmune, así como su regulación durante procesos infecciosos y otros relacionados con una reacción pro-inflamatoria.

1.4 Las Beta Defensinas Humanas 2

Las defensinas pertenecen al grupo de los péptidos endógenos antimicrobianos (PAMs) que juegan un papel importante dentro de la inmunidad innata [96]. Son ricos en aminoácidos catiónicos que les confieren una carga iónica positiva. Tienen tres funciones principales: acción antimicrobiana rápida y mediador de la respuesta proinflamatoria, principalmente por su capacidad de reclutar y activar leucocitos [97]. Los representantes más relevantes provienen del grupo de las proteínas: la lactoferrina [98] y la proteína bactericida y aumentadora de permeabilidad (BPI) [99]. En el grupo de los péptidos las catelicidinas (principalmente LL-37) [100] y finalmente las defensinas [101,102] son las sustancias más destacadas.

Las defensinas, por su estructura molecular y lugar de expresión, se dividen en tres categorías denominadas: α -, β - y θ - Defensinas.

La **Figura 5** muestra la estructura terciaria de estos péptidos. Mientras las α -defensinas se estabilizan con tres puentes intramoleculares de cisteína, las β -defensinas tienen dos de estos puentes. En cambio las θ -defensinas presentan una estructura cíclica y no se encuentra en humanos [101,102].

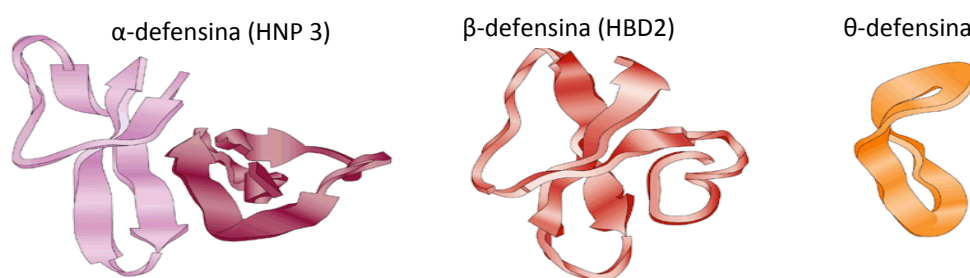


Figura 5: Representación gráfica de la estructura terciaria de las defensinas. Modificado de [102] *HNP3: péptido neutrofílico humano 3; HBD2: Beta Defensina Humana 2.*

Todas ellas han demostrado, *in vitro* y en modelos animales, que poseen propiedades antimicrobianas de amplio espectro frente a bacterias, virus, hongos y protozoos [101-103].

Como se detalla a continuación las defensinas humanas se hallan en muchos tejidos del cuerpo humano. En la **Tabla 2** y **Figura 6** se recogen las localizaciones y mecanismos de actividad más frecuentes de estas moléculas [101].

Defensinas Humanas en la edad pediátrica				
Defensina	Clasificación	Localización	Gen asociado	Actividad
HNP 1-4	α - Defensina	Neutrófilos	DEFA1 DEFA3 DEFA4	Antimicrobiana Antitoxina (1-3) Quimiotaxis (1-2)
HD 5 y 6	α - Defensina	Epitelio reproductivo	DEFA5 DEFA6	Antimicrobiana Antitoxina (5) Homeostasis de microbiota
HBD1	β - Defensina	Tracto urinario respiratorio/digestivo	DEFB1	Antimicrobiana Quimiotaxis
HBD2	β - Defensina	Piel, tracto digestivo/ respiratorio	DEFB4	Antimicrobiana Quimiotaxis
HBD3	β - Defensina	Piel, tracto respiratorio/digestivo	DEFB103	Antimicrobiana Quimiotaxis
HBD4	β - Defensina	Piel, tracto digestivo	DEFB104	Antimicrobiana Quimiotaxis

HNP (Human neutrophil peptides); HD (Human defensins); HBD (human β defensin)

Tabla 2: Localización y función de las defensinas humanas. Modificado de [101].

Las α -Defensinas se encuentran en gránulos en el interior de los neutrófilos y en las células de Paneth del intestino delgado [96,101,102], mientras las β -defensinas humanas (HBD) se producen en células epiteliales, incluyendo los queratinocitos de la piel, tracto genitourinario, enterocitos colónicos y en las células del epitelio respiratorio tanto a nivel pulmonar como de senos paranasales y oído medio [104]. Además, se encuentran en monocitos, macrófagos y células dendríticas [101,102,105]. Aunque solamente están presentes en los primates, las θ -Defensinas constituyen actualmente una clase de antimicrobianos prometedoras para su uso farmacéutico [106].

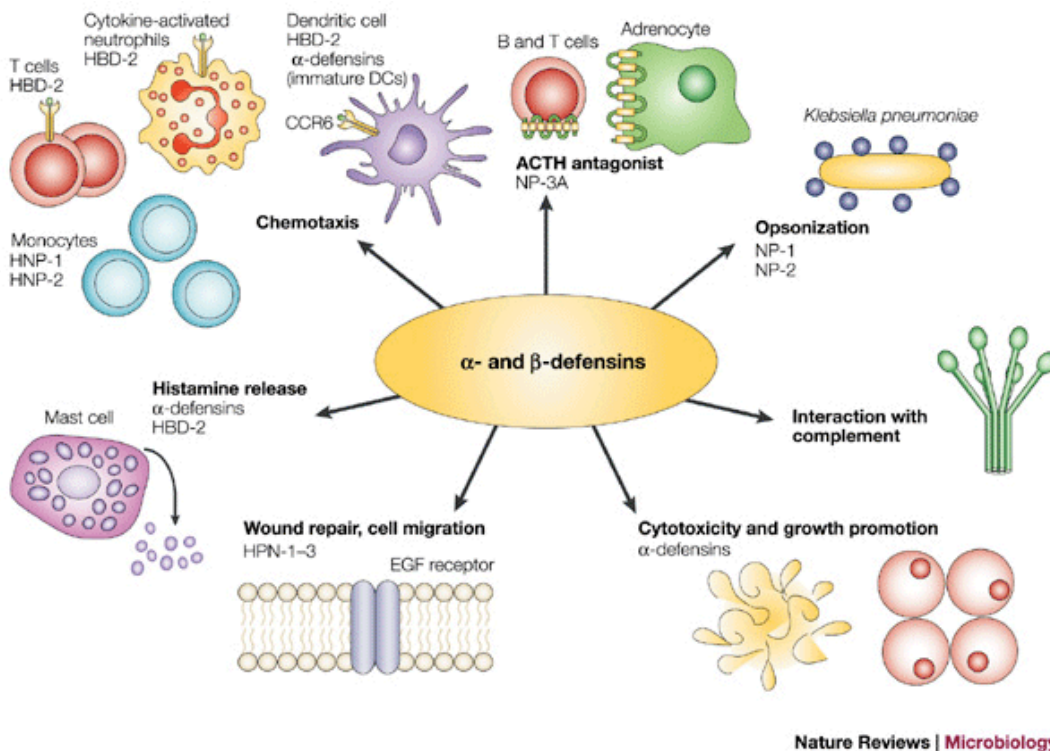


Figura 6: Papel de las defensinas como péptido antimicrobiano y otras funciones asociadas a la defensa del huésped. *ACTH*: hormona adrenocorticotropa; *CCR6*: receptor de quimioquina 6; *EGF receptor*: receptor del factor de crecimiento epidérmico; *HBD2*: beta defensina humana 2; *DC*: células dendríticas; *NP*: péptido de neutrofílico; *HPN1-3*: péptido de neutrofilos humano Modificado de [107].

En humanos se han descrito cuatro clases de beta defensinas, cada una sintetizada y regulada por un tipo celular diferente [108-109]. Mientras la HBD1 se expresa de forma constitutiva y constante, las HBD2 y HBD3 pueden ser inducidos por estímulos infecciosos o inflamatorios [109-111]. Del mismo modo, los niveles de HBD2 están influenciados genótipicamente por polimorfismos y por el número de copias de los genes implicados [112] pudiendo existir una variabilidad interindividual importante [113].

Al igual que la HBD3, la síntesis de HBD2 es inducida por bacterias o por sus productos (lipopolisacáridos) y por citoquinas proinflamatorias como TNF (*tumor necrosis factor*) - α e IL-1 β [114]. La transcripción de los genes de HBD está regulada a través de factores de transcripción como NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [114,115] Por otra parte, varios trabajos usando modelos *in vitro* describen la inducción y actividad de HBD2 en contexto de infecciones bacterianas como p.ej. *Streptococcus*

pneumoniae, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, gérmenes todos muy relevantes en la edad neonatal [116-118]. Además, se ha demostrado que en los pacientes sépticos, tanto en la edad adulta [111] como en la edad pediátrica [119], los niveles plasmáticos de HBD2 se halla significativamente más elevados, y también que existe una disminución de la capacidad de inducción *in vitro* de mRNA HBD2. Esto lleva a postular que un déficit de HBD2 aumentaría la predisposición individual a sufrir de infecciones graves.

En la edad neonatal, los péptidos antimicrobianos se han descrito en diferentes tejidos y en diversos contextos clínicos. A nivel pulmonar, en aspirados traqueales de neonatos pretérminos, se han encontrado concentraciones basales bajas de HBD 1-3 y LL-37, y probablemente esta característica aumenta el riesgo de una infección pulmonar precoz [120]. En cambio se ha descrito una regulación positiva de la concentración de HBD y LL-37 en caso de ventilación mecánica, neumonía o infección sistémica [121,122].

En el tracto gastrointestinal el papel de las beta defensinas sigue siendo controvertido. Por un lado existen datos mostrando niveles menores de estos péptidos antimicrobianos en los niños prematuros en comparación con neonatos a término, lo que en parte podría explicar el elevado riesgo de esta población de sufrir complicaciones como la enterocolitis necrotizante [123]. En cambio, un trabajo reciente realizado en recién nacidos ha analizado los niveles de HBD2 en el meconio en función de la edad gestacional y la patología intestinal, incluyendo la enterocolitis necrotizante y el modo de alimentación, sin hallar relación significativa [124].

Determinando los niveles de LL-37, un péptido antimicrobiano, en muestras de sangre obtenidas del cordón umbilical, se han detectado correlaciones con los niveles hallados en sangre materna en el momento del parto [125]. Del mismo modo, se ha demostrado que de forma general aumentan los péptidos antimicrobianos con la edad gestacional [68,69,85]. La **Figura 7** demuestra como, de forma progresiva, los niveles de los péptidos antimicrobianos (BPI, Calprotectina, LL-37, sPLA2 y HNP1-3) aumentan según la edad gestacional aunque sin alcanzar los niveles de adultos. Es interesante resaltar la evolución de los niveles de BPI y Calprotectina, puesto que no siguen estrictamente este patrón progresivo [69,85]. En la actualidad no se dispone de datos sobre el comportamiento de los HBD2 en este sentido.

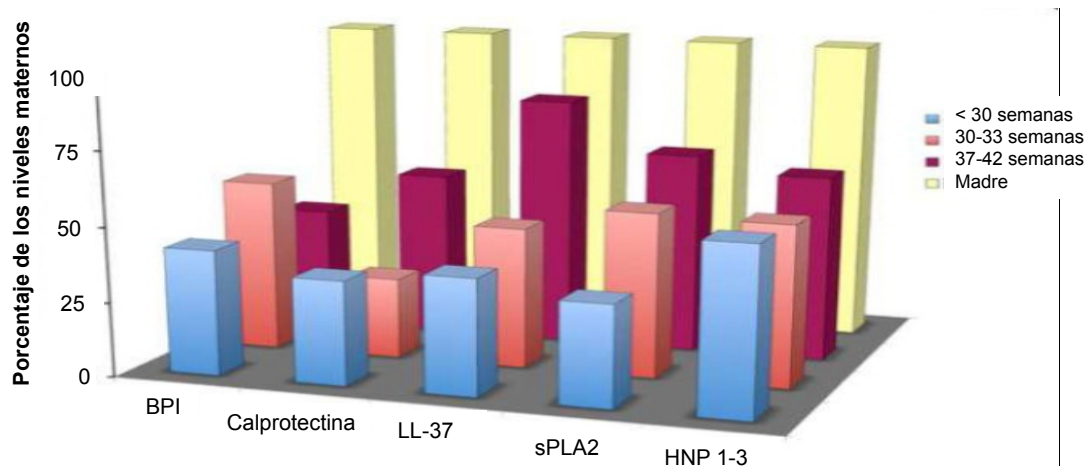


Figura 7. Niveles de APPs en suero en neonatos preterminos, términos en relación con niveles hallados a nivel materno. *BPI: proteína-bactericida-incrementadora-de-la-permeabilidad; LL-37: catelicidina LL-37; sPLA2: Fosfolipasa A2 soluble; HNP: péptido neutrofílico humano* [85].

Hasta la fecha se desconocen los niveles fisiológicos y patológicos de la HBD2 en suero o plasma en la población neonatal. De momento todos los valores de referencia a nivel sanguíneo provienen de estudios realizados en adultos [111,119]. En la **Figura 8 A** se pueden observar los resultados obtenidos de un estudio realizado en voluntarios adultos sanos, pacientes críticamente enfermos sin sepsis, y pacientes sépticos en una unidad de cuidados intensivos, hallando niveles de HBD2 en plasma de 339 pg/ml, 295 pg/ml y 541 pg/ml, respectivamente [111]. Los niveles de HBD2 en plasma encontrados en otro trabajo fueron más bajos con valores de 47,6 pg/ml en adultos sanos y 167,6 pg/ml en adultos con una patología pulmonar determinada [110]. Estos datos son probablemente un reflejo de las diferentes metodologías empleadas pero también demuestran el posible papel de este péptido antimicrobiano en los estados clínicos de inflamación e infección.

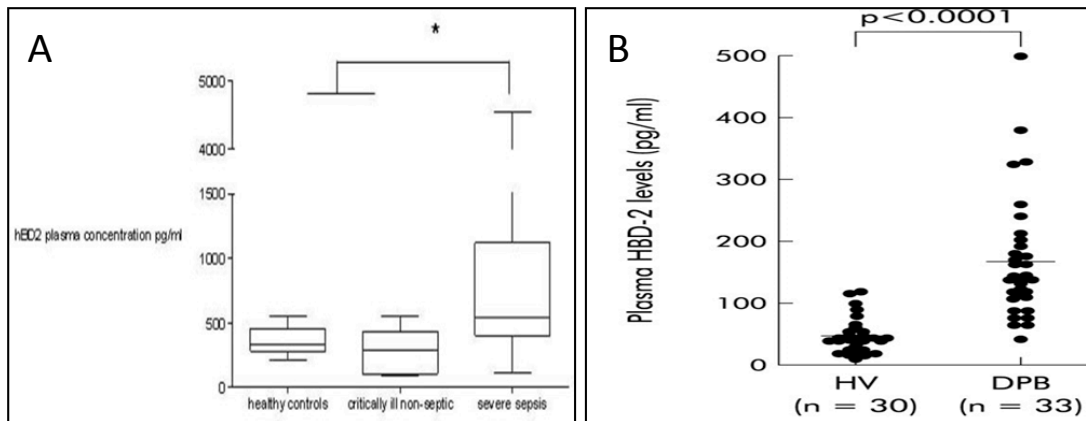


Figura 8: Estudios realizados en adultos con determinación de niveles plasmáticos. **A)** Voluntarios sanos y pacientes precisando cuidados intensivos con y sin sepsis; **B)** Voluntarios sanos y pacientes con broncodisplasia pulmonar. *HBD2*: human beta defensin 2; *HV*: voluntarios sanos; *DPB*: panbronquiolitis difusa [110;111].

En este contexto, ante el cada vez más evidente incremento de gérmenes multiresistentes, es un dato prometedor que estos péptidos conserven su actividad antimicrobiana, incluso frente microorganismos resistentes a múltiples tratamientos antibióticos habituales [118,126].

En esta tesis doctoral se evaluará en más profundidad a la beta defensina humana 2 (HBD2) y se estudiarán los niveles de esta molécula en el periodo neonatal en diferentes ámbitos clínicos, analizando sus posibles relaciones con determinadas variables demográficas, clínicas y analíticas.

1.5 LA LECTINA DE UNIÓN A LA MANOSA (MBL)

Dentro de la respuesta inmune innata, la lectina de unión a manosa (MBL) representa un factor importante, ya que varios trabajos han relacionado niveles bajos de dicha proteína con un aumento en la susceptibilidad a infecciones en neonatos prematuros [87-89].

La MBL es producida en el hígado y forma parte de la vía de las lectinas. Esta vía se activa a través del reconocimiento de carbohidratos, manosa, N-acetil glucosamina y residuos de fucosa y glucosa presentes comúnmente en las membranas de los microorganismos [127-131].

La MBL reconoce estas moléculas en la superficie de un amplio rango de microorganismos clínicamente relevantes [128,129,131], facilitando así la fagocitosis de patógenos. Otro mecanismo de acción de la MBL es la iniciación de la cascada del complemento sin precisar la presencia de anticuerpos [132]. Los mecanismos de acción mas relevantes se muestran en la **Figura 9**.

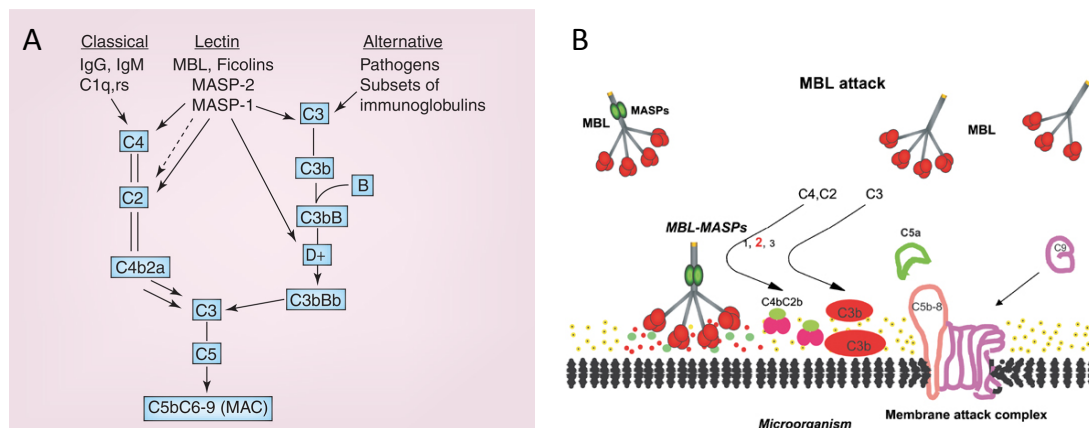


Figura 9 modificado de [134,135]: **(A)** Visión simplificada del sistema de complemento. Se muestran las cascadas de las tres vía de complemento. La vía clásica, la vía de las lectinas y la vía alternativa. La vía de lectinas incluye la MBL, las Ficolinas, y las MASP que interactúan con las la vía alternativa y la vía clásica. **(B)** Se muestran los diferentes mecanismos de acción de la MBL, especialmente su función antimicrobiana opsonizando a los microorganismos susceptibles, induciendo la activación e interacción con componentes

principales de las vías de complemento para formar finalmente el complejo de ataque de membranas.

B: Factor B; D: Factor D; MAC: complejo ataque membrana; MASP: serina-proteasas asociadas a la proteína de unión a la manosa; MBL: Léctina de unión a la manosa; IgG: Inmunoglobulina G.

Los niveles de MBL se hallan determinados genéticamente, [134,136] y se correlacionan con variaciones genéticas tanto en regiones estructurales como del promotor del gen MBL-2, [137]. Tres polimorfismos de un solo nucleótido en los codones 52, 54 y 57 (variantes D, B y C, respectivamente) en el exón 1 del gen MBL-2, dan lugar a una reducción de la concentración plasmática de esta proteína. Polimorfismos en el promotor del gen MBL-2 en las regiones 221 (variantes X/Y) y 550 (variantes H/L), también modulan las concentraciones de MBL circulantes, [138,139]. En la **Figura 10** se representa el gen *MBL2*, su polipeptido resultante y también el producto final que se halla en plasma. La forma de MBL que se encuentra con más frecuencia en el plasma de humanos es una combinación de cuatro subunidades de MBL que forman una unidad tetramérica [135].

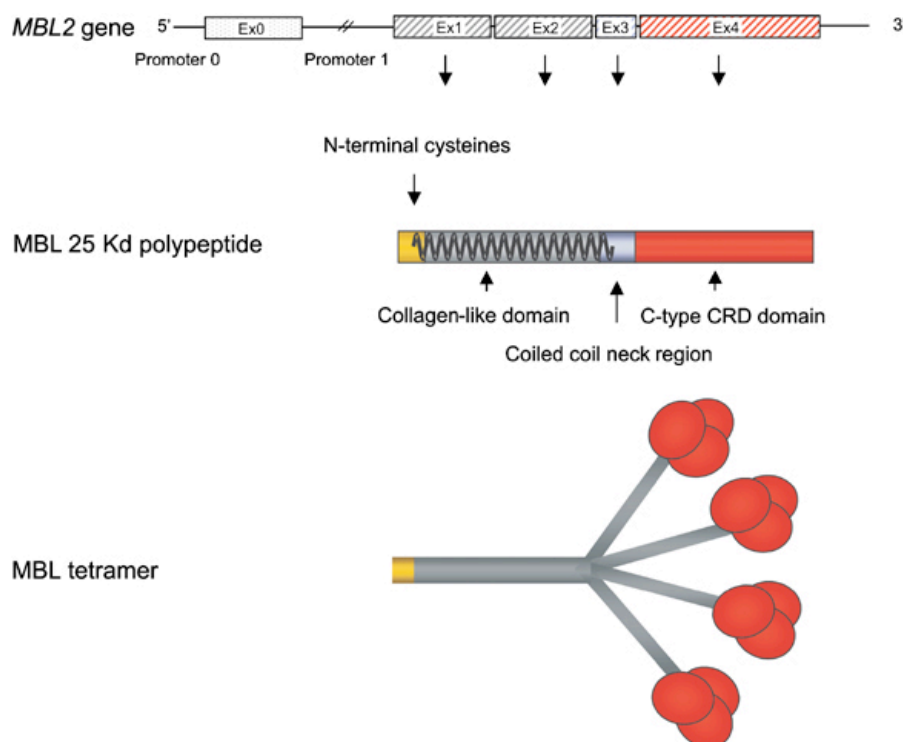


Figura 10 modificado de [135]: La estructura del gen MBL2 y de la Lectina de unión a la manosa. De arriba hacia abajo se hallan la estructura del gen MBL2 con su polipéptido correspondiente que consiste de cuatro regiones. En la parte inferior de la figura se muestra la forma oligomérica predominante de MBL que contiene cuatro subunidades de triple hélices de polipéptidos de MBL.

MBL: Lectina de unión a la manosa; CRD: dominio rico en cisteína; Kd: kilodalton.

Variantes genotípicas del gen MBL-2 asociadas a niveles séricos muy reducidos de esta proteína (< 400 ng/ml) se pueden encontrar en aproximadamente el 12 % de la población europea [136,138,139]. Los niveles de MBL muestran una notable variabilidad interindividual, existiendo una fuerte correlación entre el genotipo y el fenotipo. Sin embargo existen todavía dudas sobre la variabilidad de la MBL a nivel intraindividual. Varios trabajos han asociado las deficiencias de MBL con una mayor susceptibilidad a infecciones, especialmente en situaciones de inmunosupresión, como ocurre en los pacientes oncológicos y neonatos prematuros [87-89,140-142].

Debe destacarse en este último grupo, que los niveles reducidos de MBL dependen de la propia prematuridad además del genotipo [88]. A este respecto, se ha demostrado que la proporción de neonatos con niveles de MBL menor de 400 ng/ml es el doble de la encontrada en otras edades de la vida, y que esto se debe a que pacientes heterocigotos pueden presentar cifras inusualmente bajas de forma fisiológica durante el periodo neonatal [87,88]. Es interesante mencionar que un trabajo reciente cuestiona el impacto del genotipo sobre los niveles séricos de MBL en una cohorte amplia de neonatos [143].

Solamente un pequeño número de estudios han analizado muy recientemente el papel de la MBL en el ámbito neonatal, y estas investigaciones se han desarrollado en poblaciones diferentes a las que en esta tesis se pretende estudiar, evaluando sus niveles de forma puntual, no seriada [87-89,143]. *Frakking et al.* Demostraron en un grupo de neonatos pretérminos una asociación entre niveles bajos de MBL y la presentación durante el primer mes de vida de sepsis y neumonía [89]. Con posterioridad se han corroborado estos hallazgos en estudios realizadas en Reino Unido y Polonia, estableciendo que un peso inferior a 1000 gramos o una edad gestacional menor de 28 semanas eran factores asociados a niveles reducidos de MBL [87,88].

La importancia de conocer posibles asociaciones entre la deficiencia de MBL, el riesgo de padecer infecciones y/o una respuesta lenta al tratamiento con antibióticos en el periodo neonatal, viene dada por la disponibilidad de una terapia de reemplazo con MBL (ensayo clínico; fase II) [144]. Esta terapia abre nuevas vías para el tratamiento de los procesos infecciosos en esta población tan desfavorecida, de tal manera que permitirían en un futuro aumentar la supervivencia y/o disminuir la tasa de secuelas en esta población.

Además, en este escenario resultaría muy recomendable conocer la capacidad de regulación positiva durante los procesos infecciosos. Este último aspecto posibilitaría no solamente conocer con mayor profundidad el funcionamiento de la MBL durante los procesos infecciosos neonatales, sino valorar el posible papel de las determinaciones de MBL como marcador de infecciones, el momento adecuado para una posible terapia de reemplazo con MBL, la necesidad de un tratamiento empírico antimicrobiano, así como su duración.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis 1.

Es posible determinar niveles del péptido HBD2 en la sangre obtenida al nacimiento del cordón umbilical. Además, los niveles de este péptido son estables durante un tiempo suficiente para su procesamiento.

Hipótesis 2.

Los niveles del péptido HBD2 en muestras obtenidas de sangre de cordón umbilical se relacionan con variables demográficas y clínicas relevantes tales como la edad gestacional, corioamnionitis y sepsis.

Hipótesis 3.

Los neonatos prematuros extremos con bajos niveles séricos de MBL y/o HBD2, presentan mayor susceptibilidad de padecer complicaciones infecciosas graves durante el primer mes de vida.

Hipótesis 4.

En los neonatos prematuros extremos los valores de la MBL y/o HBD2 están regulados durante los procesos sépticos. Los niveles de estos mediadores solubles se relacionan con variables demográficas, analíticas y clínicas relevantes.

Objetivo 1.

Comprobar en el recién nacido prematuro y a término la presencia del péptido HBD2 en el suero extraído del cordón umbilical, así como estudiar su estabilidad.

Objetivo 2.

Analizar en el recién nacido prematuro y a término los niveles del péptido HBD2 en el suero extraído del cordón umbilical en relación con variables demográficas y clínicas relevantes.

Objetivo 3.

Determinar la capacidad predictiva de MBL y/o HBD2 en estos pacientes para complicaciones infecciosas.

Objetivo 4.

Determinar si las concentraciones de MBL y/o β -defensina 2 se hallan reguladas durante los procesos sépticos y estudiar la presencia de posibles asociaciones entre estos mediadores solubles con datos demográficos, analíticos y clínicos relevantes.

III. MÉTODOS

En esta Tesis Doctoral se han empleado dos enfoques diferentes con el fin común de generar nuevas hipótesis y aumentar los conocimientos sobre la fisiología y fisiopatología de componentes del sistema inmune innato en prematuros, neonatos a término y adultos.

Para alcanzar estos objetivos se realizaron dos proyectos independientes:

- El primer proyecto (P1) realizado fue un estudio observacional retrospectivo comparando los niveles de HBD2 en sangre de cordón umbilical en prematuros, neonatos a término y adultos en relación con variables demográficas y clínicas seleccionadas.
- El segundo proyecto (P2) resultó como consecuencia del proyecto anterior. Este proyecto se diferencia por su diseño prospectivo observacional combinando determinaciones seriadas de HBD2 y MBL en sangre de neonatos pretérminos durante un episodio de sospecha de sepsis nosocomial.

La metodología aplicada en estos dos proyectos se detalla a continuación. Debido los diferentes diseños se describe, cuando sea apropiado, la metodología de forma separada.

3.1 Ámbito de los estudios:

El reclutamiento de todos los sujetos se realizó en la Unidad de Neonatología del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla. Esta unidad es centro de referencia terciario, que admite pacientes de la maternidad adyacente y de otros centros del área sanitaria correspondiente, así como de otras áreas, especialmente pacientes de muy bajo peso o con problemas quirúrgicos de diversa índole. El trabajo de laboratorio se ha realizado en el laboratorio de la Unidad de infectología e inmunopatología pediátrica, adscrito al Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS).

3.2 Diseño de los estudios:

El diseño de P1 fue retrospectivo, observacional, descriptivo y analítico, mientras para el P2 se optó por un diseño prospectivo de cohorte, observacional descriptivo y analítico.

3.3 Población de estudio:

Las muestras analizadas en esta tesis provienen de neonatos nacidos o tratados en el H.U. Virgen del Rocío. El reclutamiento de sujetos para el P1 se realizó desde enero 2008 hasta diciembre 2009 en el área del paritorio del Hospital maternal del centro. Las muestras incluidas de adultos se obtuvieron de voluntarios sanos, trabajando como personal sanitario en el Hospital Infantil Virgen del Rocío en el mismo periodo de estudio. El reclutamiento de sujetos para el P2 se realizó desde junio 2010 hasta junio 2014 en el mismo centro sanitario en la unidad de cuidados intensivos neonatales.

3.4 Criterios de inclusión e exclusión en los dos proyectos (P1,P2):

Proyecto 1- Criterios de inclusión:

Recién nacidos a término:

- Neonatos nacidos en el periodo de estudio cuyo parto se haya producido entre las 37 y 42 semanas de gestación, sanos y sin aparentes malformaciones, y que sus padres hayan otorgado previamente su consentimiento.

Recién nacidos pretérmino:

- Recién nacidos durante el periodo del estudio, cuyo parto se haya producido antes de las 32 semanas de gestación, y cuyos padres hayan otorgado previamente su consentimiento.

Proyecto 1- Criterios de exclusión:

Grupo de los neonatos a término “sanos”:

8. Antecedentes obstétricos de abortos espontáneos repetidos y muerte fetal
9. Amenaza de aborto o parto prematuro, haya sido o no tratado farmacológicamente
10. Diabetes materna, tratada o no con insulina, e hipertensión
11. Existencia de cualquier enfermedad materna significativa
12. Gestación no controlada por personal sanitario especializado
13. No disponibilidad de serología prenatal o positividad para alguno de los siguientes: virus de la hepatitis B, VIH, toxoplasma, lúes, y rubeola.
14. Cultivo vaginal-rectal para el estreptococo del grupo B negativo, tomado antes de cuatro semanas del parto.
15. Presencia de cualquier signo clínico que sugiera corioamnionitis: fiebre mayor de 37,8°C, leucocitosis mayor de 15.000/mm³, frecuencia cardíaca mayor de 100/min o frecuencia cardíaca fetal mayor de 160/min, útero doloroso a la palpación, fetidez del líquido amniótico.
16. Amniorrexis más de 12 horas anteparto
17. Presencia de oligoamnios y/o polihidramnios
18. Líquido amniótico teñido de meconio
19. Test de Apgar menor de 8 al minuto y menor de 10 a los cinco minutos
20. Peso para la edad gestacional mayor o menor a dos desviaciones estándar
21. Presencia de cualquier patología neonatal, distinta de la hiperbilirrubinemia indirecta no patológica, antes de la primera semana de vida.

Grupo de los pretérminos:

- Presencia de malformaciones mayores, por motivos éticos o rechazo de participación en el estudio por parte de los tutores legales.

Proyecto 2- Criterios de inclusión:

Neonatos nacidos en el periodo de estudio con una edad gestacional menor de 32 semanas y/o un peso al nacer menor de 1500 gramos con sospecha de sepsis nosocomial en los primeros 30 días de vida y cuyos padres hayan otorgado previamente su consentimiento.

Proyecto 2- Criterios de exclusión:

Presencia de malformaciones mayores, por motivos éticos o rechazo de participación en el estudio por parte de los tutores legales.

3.5 Recogida de variables epidemiológicas y clínicas:

Proyecto 1:

Se realizó la recogida de los datos epidemiológicos y clínicos de forma retrospectiva utilizando el sistema informático del hospital (SIDCA). Se recogieron y analizaron las siguientes variables:

- 1 Edad materna (años)
- 2 Tipo de finalización del parto (natural, instrumentado, cesárea)
- 3 Edad gestacional (semanas)
- 4 Sexo
- 5 Peso al nacimiento (gramos)
- 6 Peso de la placenta (gramos)
- 7 Incidencia de patologías de embarazo como diabetes mellitus gestacional, hipertensión arterial, amenaza de parto prematuro
- 8 Valoración de la escala *Apgar* a los 5 minutos de vida y/o intubación orotraqueal
- 9 Administración de esteroides y antibióticos antenatales
- 10 Presencia de corioamnionitis histopatológica
- 11 Niveles séricos de HBD2 (pg/ml) en suero de cordón umbilical
- 12 Valores de PCR (mg/L) y recuento de neutrófilos (células/mm³) en primeras 24 horas de vida

(pretérminos)

- 13 Presencia de sepsis tardía (pretérminos)
- 14 Necesidad de ventilación mecánica convencional mayor de 24 horas; necesidad de ventilación a alta frecuencia (pretérminos).
- 15 Mortalidad neonatal (pretérminos).

Proyecto 2:

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron seguidos longitudinalmente hasta los 30 días de vida. Aparte de las variables demográficas detalladas para el proyecto 1 se recogieron las siguientes variables:

- 16 Microorganismos identificados en hemocultivo
- 17 Incidencia de sepsis (No/sepsis confirmada/sepsis clínica o presunción de sepsis)
- 18 Valores de HBD2 y MBL determinados en los días 1 (día sospecha de sepsis), 4 y 7.
- 19 Variables analíticas y clínicas necesarias para el diagnóstico de sepsis

Definición de la variable sepsis y de sus categorías [36,37]:

Sepsis confirmada:

Presencia de al menos dos síntomas clínicos y/o biológicos sugestivos de infección con aislamiento de microorganismo(s) en hemocultivo.

Sepsis clínica o presunción de sepsis:

Los neonatos con evidencia clínica y/o de laboratorio de infección con resultados microbiológicos negativos.

Se consideraron los siguientes signos clínicos como sugestivos para un proceso séptico:

- (1) Inestabilidad térmica ($<37^{\circ}\text{C}$ o $>38,5^{\circ}\text{C}$)
- (2) Dificultad respiratoria: disnea, taquipnea mayor de 60 resp/min, apnea, necesidad de ventilación asistida y/o aumento en los requerimientos de oxígeno.
- (3) Disfunción cardiovascular: taquicardia (>160 latidos/min), bradicardia (<100 latidos/min), disminución del relleno capilar, hipotensión (presión arterial sistólica <40 mmHg), necesidad de asistencia vasopresora o medicación inotrópica
- (4) Irregularidades neurológicas como hipotonía, letargia, irritabilidad.

(5) Problemas gastrointestinales: vómitos, intolerancias o distensión abdominal.

Las anormalidades de laboratorio incluyen leucopenia (<5000 cél/mm³) o leucocitosis (>20.000 cél/mm³), recuento plaquetario bajo (<100.000 cél/mm³), niveles de proteína-C reactiva (> 10mg/L, o acidosis metabólica.

3.6 Obtención, procesamiento y análisis de muestras de placenta

Las placentas se fijaron inmediatamente después del parto en una solución neutra de formol. Se tomaron muestras para el estudio histológico del borde de las membranas en el lugar de su rotura, de los extremos fetal y maternal y de la inserción del cordón; muestras en su caso representativas del punto que macroscópicamente se valore como patológico. Para la evaluación histológica, se prepararon bloques de parafina de los que se realizaron cortes de 5µm teñidos con hematoxilina-eosina. Se procedió a realizar una lectura histopatológica sistematizada, valorando el infiltrado de polimorfonucleares como indicativo de corioamnionitis y los posibles defectos en la perfusión, tales como villis con escasa vascularización, aumento del volumen intervilloso y disminución del lecho capilar viloso total [145]. Todos los estudios histológicos se realizaron por dos investigadores independientes y sin conocimiento previo de los detalles clínicos.

3.7 Obtención y procesamiento de las muestras:

Sangre del cordón umbilical

La determinación de los niveles de HBD2 se realizó a partir de muestras de suero. Las muestras de sangre de cordón se extrajeron inmediatamente después de proceder a su ligadura y depositándolas en *vacutainers* para bioquímica. Las muestras se centrifugaron a 4°C a 3.200 r.p.m durante 10 minutos y se almacenaron en un congelador a -80°C.

Extracción sanguínea durante la sospecha de sepsis

MÉTODOS

Aprovechando las extracciones sanguíneas realizadas de forma rutinaria en la práctica clínica el día de la sospecha de sepsis (día 1) y a ser posible en dos momentos posteriores (día 4 y día 7), se obtuvieron 500 µl de sangre para determinación de niveles de MBL y β-defensina 2. Las muestras se almacenaron hasta su procesamiento a 4°C. Durante el mismo día o el día posterior a su extracción se centrifugaron a 4°C a 3.200 r.p.m durante 10 minutos y se almacenaron en un congelador a -20°C hasta la realización de la determinación de MBL y HBD2.

3.8 Análisis de estabilidad del péptido HBD2

En la primera fase de la tesis se realizó un experimento para comprobar la estabilidad del péptido HBD2 en sangre total obtenido del cordón umbilical. Para este fin se recogieron muestras de sangre umbilical de un recién nacido a término y se procesaron las muestras en cinco momentos diferentes: de forma inmediata, a las dos horas, a las 12 horas, a las 24 horas y a las 48 horas. Del mismo modo se comprobó el efecto de añadir un inhibidor de proteínasa *Aprotinina* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 500KIU/ml; dilución 1:10) a las muestras extraídas. Posteriormente se determinaron las concentraciones de HBD2 en las muestras procesadas con y sin adición del inhibidor de proteínasa.

3.9 Cuantificación de niveles de HBD2

La cuantificación de los niveles de HBD2 en suero se realizó mediante técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), empleando el kit comercial β-defensin 2, Human, ELISA Kit, EK-072-37 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Burlingame, CA).

Los reactivos se atemperaron antes de realizar el ensayo. A continuación, los pocillos se lavaron con 300 µl de tampón de ensayo. Se añadieron las muestras de suero diluidas en relación 1:10 en tampón de ensayo por duplicado en los pocillos designados, así como los estándares de cuantificación. La placa se selló y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. A continuación, los pocillos se lavaron 4 veces con 300 µl de tampón de ensayo y se añadieron a cada pocillo 100 µl de anti-β-defensina 2 biotinilado y se incubó la placa durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Seguidamente, los

MÉTODOS

pocillos se lavaron 4 veces con 300 µl de tampón de ensayo y se añadieron a cada pocillo 100 µl de estreptavidina peroxidasa (SA-HRP) y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación continua. Los pocillos se lavaron cuatro veces con 300 µl de tampón de ensayo y se añadieron a cada pocillo 100 µl de solución de sustrato (TMB) incubando la placa durante 20-30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de solución de parada (CIH 2N) y se leyó la absorbancia en un lector de placas a 450nm (ThermoScientific, Multiscan Go, Winooski, VT). Los resultados mostrados corresponden a la media de densidad óptica (OD) por duplicados. El cálculo de los resultados se realizó empleando el programa informático KaleidaGraph (v.3.0.2, Abelbeck Software).

3.10 Determinación de los niveles séricos de MBL:

La cuantificación de los niveles de MBL en suero se realizó mediante técnica de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), empleando el kit comercial MBL oligomer ELISA kit-029 (BIOPORTO, Gentofte, Denmark).

Los reactivos se atemperaron antes de realizar el ensayo. Se añadieron 100 µl de las muestras de suero diluidas en relación 1:150 en tampón de ensayo por duplicado en los pocillos designados, así como los estándares de cuantificación. La placa se selló y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. A continuación, los pocillos se lavaron 3 veces con 300 µl de solución de lavado y se añadieron a cada pocillo 100 µl de anti-MBL biotinilado y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Seguidamente, los pocillos se lavaron 3 veces con 300 µl de solución de lavado de ensayo y se añadieron a cada pocillo 100 µl de estreptavidina peroxidasa (SA-HRP) y se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua. Los pocillos se lavaron 3 veces con 300 µl de solución de lavado y se añadieron a cada pocillo 100 µl de solución de sustrato (TMB) incubando la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de solución de parada (CIH 2N) y se leyó la absorbancia en un lector de placas a 450nm (Bio-Tek instruments, Winooski, VT). Los resultados enseñados corresponden a la media de densidad óptica (OD) por duplicados. El

cálculo de los resultados se realizó empleando el programa informático KaleidaGraph (v.3.0.2, Abelbeck Software).

3.11 Análisis de datos

En el grupo de los recién nacidos prematuros se categorizaron variables cuantitativas de la siguiente manera: Peso al nacimiento: menor de 1000 gramos y mayor o igual de 1000 gramos y la edad gestacional menor de 28 semanas o mayor o igual de 28 semanas.

Para facilitar el análisis de los datos, se ha realizado su adecuada tabulación y recogida de los mismos en base de datos informatizada. Se realizó un análisis descriptivo y analítico. Se expresaron los resultados de las variables cuantitativas de los diferentes subgrupos como media con su desviación estándar correspondiente y la mediana incluyendo los rangos intercuartílicos (percentil 25 y percentil 75).

En el proyecto 1 se realizó una transformación logarítmica de la variable HBD2 con el fin de controlar la variabilidad interna de esta variable. Las variables con asociación significativa o con relevancia conocida para la variable resultado, fueron introducidas en un modelo de regresión logística. Odds ratio (OR) e intervalo de confianza de 95% fueron calculados usando el método de bootstrap (para 1000 muestras). Para comprobar la capacidad predictiva del modelo se realizó el cálculo del área debajo de la curva (AUC), con sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y el índice de Youden.

Para el análisis de correlaciones entre las variables continuas se realizó el test de correlación de *Pearson* o el *Spearman* dependiendo de la distribución de las variables analizadas y se calcularon los coeficientes de correlación correspondientes (*r*: *Pearson*, *Rho*: *Spearman*). Se utilizó el test de *U-Mann-Whitney* para las variables continuas, y el χ^2 para las variables categóricas.

Para todos los cálculos realizados se asumió la hipótesis bilateral y se consideró un error alfa de menos de 0.05 como estadísticamente significativo. Se utilizaron para los análisis la versión 19.0 del programa estadístico SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) y el programa Graph Pad Prisms (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA) en la versión 5.0

3.12 Aspectos éticos

Todos los trabajos realizados contaron con la aprobación del comité ético del H.U. Virgen del Rocío y se respetaron las normas de la Declaración de Helsinki para seres humanos. De los individuos incluidos se obtuvo el consentimiento informado firmado por los tutores legales.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

ESTABILIDAD Y CARACTERÍSTICAS DE LAS BETA DEFENSINA HUMANA EN MUESTRAS DE SUERO

Como primer objetivo marcado se recogieron muestras de sangre de cordón de un recién nacido a término con el fin de determinar su estabilidad en el tiempo antes de procesar la muestra sanguínea, y de un modo similar evaluar la necesidad de añadir un inhibidor de proteínasa (dilución 1:10). En la **Figura 11** se observa que no se hallaron diferencias en los niveles de HBD2 en suero al procesar las muestras con o sin el inhibidor de proteínasa *Aprotinina*.

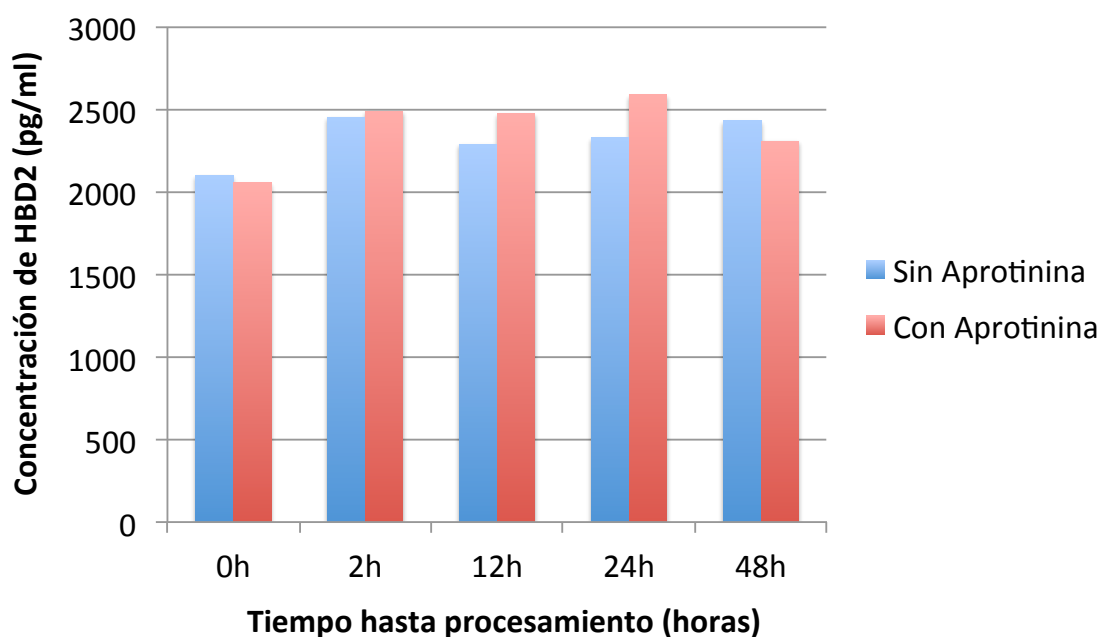


Figura 11: Efecto del tiempo de procesamiento e inhibidores de proteínasa sobre los niveles de HBD2 en suero. HBD2: *human beta defensin2*, h: horas

De un modo similar, se analizaron muestras de suero y plasma obtenidos del cordón umbilical de cuatro neonatos diferentes para conocer las posibles diferencias entre los niveles de HBD2 en suero y plasma. Se hallaron valores más elevados en suero en comparación con el plasma (589 vs 421 pg/ml) aunque sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas ($p=0.068$).

PROYECTO 1

DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

En la primera parte de la tesis se presentan los datos procedentes del estudio retrospectivo analizando muestras de sangre de cordón umbilical en recién nacidos prematuros (n=31), neonatos nacidos a término (n=42) y muestras obtenidas de voluntarios adultos sanos (n=7).

	RN preterminos (n=31)	RN a término (n=42)	Valor p
Edad gestacional (semanas)	30 (RIQ 29-31)	39 (RIQ 38-40)	< 0,001
Peso al nacer (gramos)	1298 (DS 338,4)	3247 (DS 378,2)	< 0,001
Sexo (n, %)			
- Mujer	11 (35,5%)	28 (66,7%)	0,008
- Varón	20 (64,5%)	14 (33,3%)	
Edad materna (años)	32 (29-34)	30,5 (22,7-35,2)	0,151
Finalización embarazo (n, %)			< 0,001
- Eutócico	9 (29%)	27 (64,3%)	
- Instrumentado	0 (0,0%)	10 (23,8%)	
- Cesárea	22 (71%)	5 (11,9%)	

Tabla 3: Comparación de datos demográficos y clínicos entre los grupos según edad gestacional. RIQ: rango intercuartil, DS: desviación estándar, RN: recién nacidos.

En la **Tabla 3** se presentan características seleccionadas de los dos grupos en estudio. Se identificaron diferencias significativas comparando las variables: “Sexo” y “modo de finalización del parto”.

NIVELES DE HBD2 EN RELACIÓN CON LAS VARIABLES EN ESTUDIO

Del mismo modo se analizaron las posibles diferencias entre la variable cuantitativa continua “Niveles de HBD2 en sangre de cordón” con variables demográficas y clínicas de la cohorte analizada tal como se detalla en la **Tabla 4**. Se observa que los neonatos pretérminos presentaron niveles de HBD2 más bajos que neonatos a término. Para la variable peso al nacer se hallaron resultados similares.

	Neonatos (n=73)	Niveles de (mediana, RIQ)	HBD2Valor p
Edad gestacional (semanas)			
- Prematuro (28-32s)	31	918 (556-2331)	0,003
- A término (37-41s)	42	1882 (1204-3364)	
Peso al nacer (gramos)			
- <1500g	20	880 (524 -2645)	0,038
- ≥1500g	53	1748 (956-2969)	
Sexo			
- Mujer	39	1639 (691-2969)	0,812
- Varón	34	1661 (842-2579)	
Finalización del embarazo			
- Prematuros			0,862
- Cesárea	22	1020 (546-2385)	
- Eutócico	9	707 (488-2423)	
- A término			0,522
- Cesárea	5	1602 (762-3588)	
- Eutócico	37	1888 (1257-3398)	
Corioamnionitis			
- Si	25	1639 (869-3591)	0,754
- No	48	1662 (740-2775)	
Prematuros			
- Sepsis tardía*	7	513 (98-557)	0,006

Tabla 4: Comparación de niveles de HBD2 en suero en relación con variables demográficas y clínicas. RIQ: rango intercuartíl, s: semanas; g: gramos. * *S. epidermidis* (n=5); *K. pneumonia* (n=2); *S. warnerii* (n=1); *E. faecalis* (n=1). Un paciente con 3 episodios de sepsis tardía, no meningitis, ni neumonías nosocomiales

** Se excluyeron del análisis 2 neonatos con sepsis precoz.

RESULTADOS

En la **Figura 12a** se resumen los resultados obtenidos analizando la variable HBD2 en función de la edad gestacional. Los niveles de HBD2 fueron más bajos en el grupo de los prematuros que en los recién nacidos a término (mediana, 918 vs 1,883 pg/mL; $p = 0.003$). Del mismo modo neonatos con un peso al nacer menor de 1500 gramos presentaron niveles inferiores a los neonatos con un peso mayor de 1500 gramos (mediana, 880 vs 1,749 pg/mL; $p = 0.038$).

Se calcularon también las posibles correlaciones hallando resultados significativos para las variables: edad gestacional y peso al nacer: $r = 0.364$, $p = 0.002$ y $r = 0.359$, $p = 0.002$, respectivamente. Sin embargo se encontraron niveles más altos en la población neonatal que en un grupo de adultos sanos con igualdad de procesamiento de muestras. En la **Figura 12b** se representan los resultados encontrados analizando la variable sepsis tardía en relación con los valores obtenidos de HBD2. La edad gestacional de los pacientes con sepsis tardía fue más baja (28 semanas, RIQ, 28–30 versus 30 semanas, RIQ 29–31, $p = 0,016$). El momento diagnóstico fue el décimo día (RIQ 6–15). Los niveles de HBD2 en suero fueron significativamente inferior en el subgrupo de neonatos con sepsis tardía (513 vs 1,411 pg/mL; $p = 0.006$).

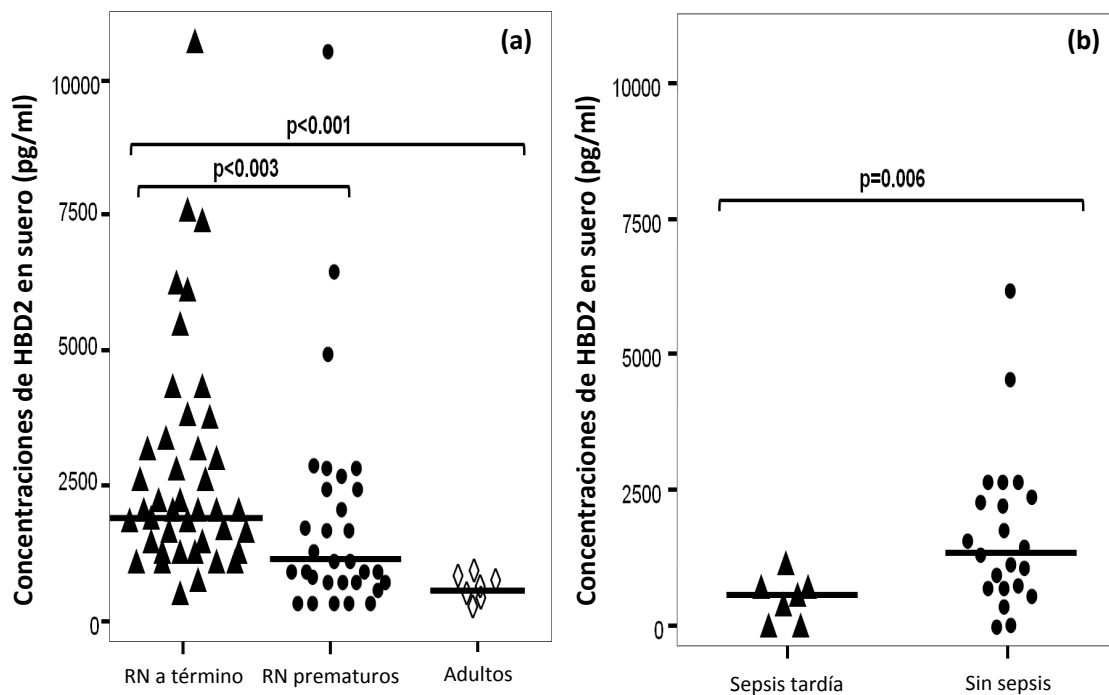


Figura 12: Niveles de HBD2 a) en función de la edad gestacional y b) la presencia de sepsis tardía en el grupo de los prematuros. HBD2: *human beta defensin 2*; RN: *recién nacidos*.

RESULTADOS

Las variables que habían mostrado asociaciones significativas con el evento de sepsis tardía fueron incluidas en un modelo de regresión logística (método Bootstrap). En este modelo los niveles de HB2 (OR, 0,34 [95% CI, 0,01–0,60]; $p = 0,008$) y edad gestacional (OR, 0,31 [95% CI, 0,01–0,71]; $p = 0,013$) fueron factores de riesgo independientes, mientras las variables peso al nacer, corioamnionitis, sexo y modo de finalización del embarazo no mostraron tal asociación. Para comprobar la capacidad predictiva del modelo se realizó el cálculo de AUC para la asociación HBD2 y Sepsis tardía (AUC, 0,85 [95% CI, 0,68–1]; $p = 0,005$). Con este cálculo se determinó el punto de corte más adecuado para esta estimación ($=880$ pg/ml) con una sensibilidad de 71,4%; especificidad, 95,8%; valor positivo predictivo, 83,3%; valor negativo predictivo, 92% e índice de Youden de 0,7. Introduciendo este punto de corte en un modelo de regresión logística junto con la variable edad gestacional, se determinó que los neonatos prematuros con valores de HBD2 <880 pg/ml tienen mayor riesgo de desarrollar una sepsis tardía independientemente de la edad gestacional (OR 14,2, IC 1,65- 1.07×10^{16} ; $p=0,037$).

PROYECTO 2

DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

En la segunda parte de la tesis se reclutaron de forma prospectiva a 84 neonatos prematuros que cumplieron con los criterios de inclusión. Siguiendo el protocolo del estudio se recogieron 402 muestras y del mismo modo se recogieron variables demográficas, clínicas y datos analíticos seleccionados.

Las características generales de los 84 neonatos incluidos en este trabajo se representan en la **Tabla 5** y en la Tabla 6 se detallan las características maternas.

	Media (DS)	Mediana (RIQ)
Edad gestacional (semanas)	28.4 (\pm 2.48)	28 (27- 30)
Peso al nacer (gramos)	1072 (\pm 323.4)	968.5 (835.8- 1288)
Género (n, %)		
- Varón	44 (52.4%)	
- Mujer	40 (47.6%)	

Tabla 5: Características generales de la población (n=84). DS, desviación estándar; RIQ: rango intercuartílico

Edad materna (años), media (\pmDS)	32.2 (\pm 6.16)*
Parto múltiple (n,%)	
- No	57 (67.9%)
- Gemelar	25 (29.8%)
- Trillizos	2 (2.4%)
Patologías gestacionales (n, %)	
Hipertensión arterial	
- Si	26 (31)
- No	57 (67,9)
Diabetes mellitus	
- Si	4 (4,8)
- No	80 (95,2)
Rotura de membranas (> 24horas)	
- Si	14 (16,7)
- No	65 (77,4)
- Desconocido	5 (6,0)

Tabla 6: Características maternas y resultado de anatomía patológica. DS: desviación estándar

RESULTADOS

En la siguiente tabla se resumen los datos relacionados con el evento del parto.

Modo finalización del parto (n, %)	
- Eutócico	24 (28.6%)
- Cesárea	59 (70.2%)
- Desconocido	1 (1.2%)
APGAR (Mediana, RIQ)*	
- 1 minutos	6.0 (5.0-8.0)
- 5 minutos	0.0 (0.0-9.0)
Intubación en el paritorio	
- Si	52 (61.9%)
- No	32 (38.1%)

Tabla 7: Características del parto en la población general. RIQ: rango intercuartil * Intubación= Apgar 0

Todos los sujetos reclutados en este estudio, debido a su prematuridad y la necesidad de soporte que conllevan, ingresaron en los primeros minutos de vida. En la **Tabla 8** se detallan los valores de las variables recogidas en este momento.

Corioamnionitis (n,%)	
- No	73 (88.0%)
- Sospecha clínica	6 (7.2%)
- Confirmada en AP	4 (4.8%)
Hemograma y bioquímica (media, \pmDS)	
- Leucocitos	12999 (\pm 11393)
- Neutrófilos	6357 (\pm 6961)
- Plaquetas (x1000)	186,2 (\pm 74,5)
- Proteína C reactiva	4.99 (\pm 14.29)
Sospecha de infección vertical	
- No	71 (85.5%)
- Si	12 (14.5%)
Hemocultivo	
- Negativo	81 (97.6%)
- Positivo*	2 (2.4%)

Tabla 8: Características clínicas y analíticas en la población general en el momento del ingreso. AP: anatomía-patológica, DS: derivación estándar; * *Serratia* (n=1); *Streptococcus anginosus* (n=1); no extraído (n=1).

Una de las variables respuestas de este estudio es la presencia y/o el desarrollo de la variable “sepsis nosocomial”. En la siguiente tabla se describe dicha variable, y posibles parámetros relacionados en la muestra analizada.

	n, (%)
Días de vida	
Síntomas (n=116)	
- Respiratorias	38 (32,8%)
- Inestabilidad hemodinámica	27 (23,3%)
- Sospecha de corioamnionitis	18 (15,5%)
- Gastrointestinales	8 (6,9%)
- Datos analíticos	8 (6,9%)
- Fiebre	6 (5%)
- Neurológicos	3 (2,5%)
- Otros	8 (6,9%)
Marcadores biológicos	
- Leucocitos (media, DS)	12908 (\pm 11346)
- Leucocitosis	
- Leucopenia	
- Neutrófilos (media, DS)	6326 (\pm 6921)
- Neutrofilia	
- Neutropenia	
- Plaquetas (x1000), (media, DS)	188 (\pm 75)
- Trombopenia	
- Trombocitosis	
- Proteína C reactiva	
- > 5mg/L	47 (56%)
- \leq 4mg/L	34 (40,5%)
- Desconocido	3 (3,6%)
Hemocultivo	
- Negativo	44 (52,4%)
- Positivo	40 (46,5%)
- Stafilococcus coagulasa negativo	30 (35,7%)
- Bacilo gram negativo	9 (10,7%)
- Otros	1 (1,2%)

Tabla 9: Variables de la población general relacionadas con la sospecha de sepsis. DS: derivación estándar; RIQ: rango intercuartílico; ECN: estafilococos coagulosa negativo, BGN: bacilos Gram negativo.

VARIABILIDAD DE LOS NIVELES DE LA BETA DEFENSINA HUMANA 2 (HBD2) Y DE LA LÉCTINA DE LA UNIÓN A LA MANOSA (MBL) DURANTE LA SOSPECHA DE UN EPISODIO SÉPTICO

Los niveles de HBD2 y MBL, cuando se sospechó el proceso infeccioso, se determinaron los días 0, 4 y 7 desde el inicio (**Tabla 10 y 11**).

Niveles de HBD2 (pg/ml) población general		
	Media (DS)	Mediana (RIQ)
Día 0	8562 (\pm 11263)	5940 (2598-9490)
Día 4	7372 (\pm 6155)	5839 (3094-9787)
Día 7	7202 (\pm 6256)	5645 (3078-9402)

Niveles de MBL (ng/ml) población general		
	Media (DS)	Mediana (RIQ)
Día 0	1680 (\pm 1583)	1512 (95-2915)
Día 4	1904 (\pm 1623)	2041 (216-3045)
Día 7	1745 (\pm 1523)	1441 (258-3002)

Tabla 10: Niveles de HBD2 en diferentes momentos de extracción en la población general. HBD2: *human beta defensin 2*; DS: *desviación estándar*; RIQ: *rango intercuartil*.

Tabla 11: Niveles de MBL en diferentes momentos de extracción en la población general. MBL: *mannose binding lectin*; DS: *desviación estándar*; RIQ: *rango intercuartil*.

No se hallaron diferencias significativas entre los niveles de HBD2 y MBL en los diferentes momentos de recogida.

NIVELES DE LA BETA DEFENSINA HUMANA EN RELACIÓN CON LAS VARIABLES EDAD GESTACIONAL Y PESO AL NACER

Los niveles de HBD2 mostraron una correlación negativa con la edad gestacional en el momento de sospecha de sepsis (Tabla 12 y Figura 13).

HBD2 (pg/ml) \ Edad gestacional (s)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	VALOR P
DÍA 0	Rho: -0,417	p< 0,001
DÍA 4	Rho: -0,567	p< 0,001
DÍA 7	Rho: -0,395	p= 0,002
MEDIA	Rho: -0,314	p= 0,004

Tabla 12: Correlaciones entre la edad gestacional y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción. HBD2: human beta defensin 2; s: semanas. Rho: Rho de Spearman

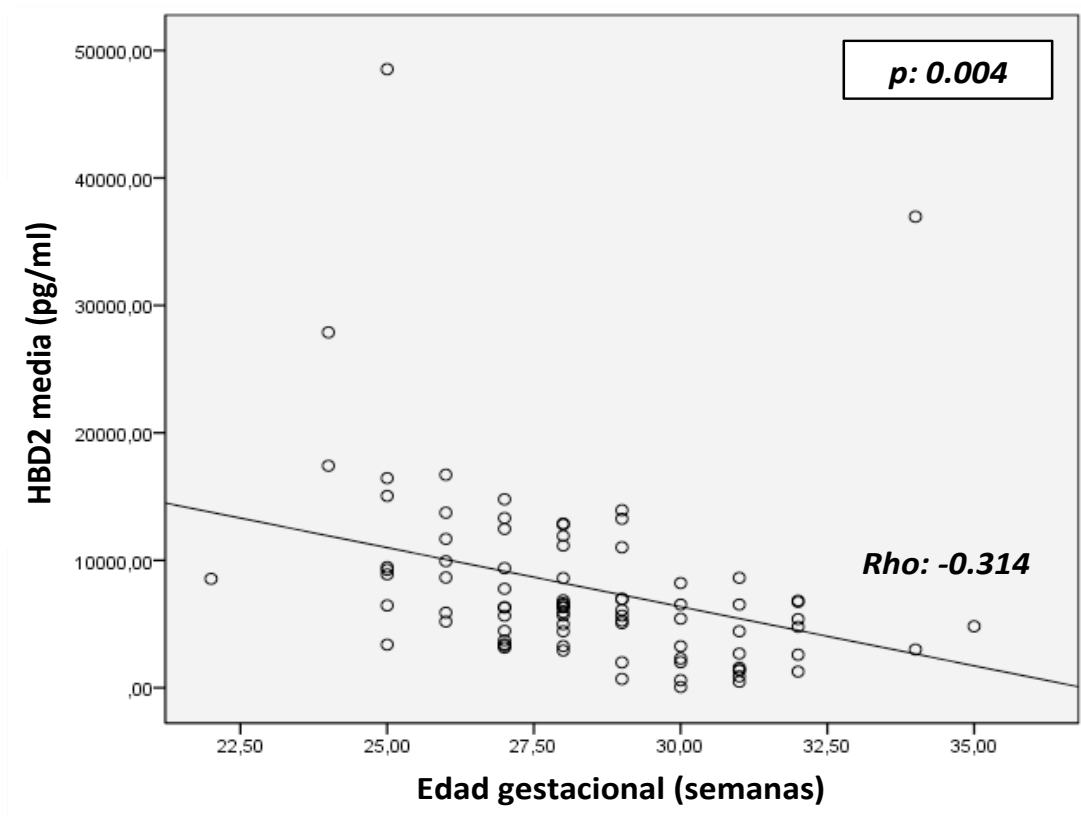


Figura 13: Correlación entre la edad gestacional y la media de los niveles de HBD2 en suero obtenido los días 0, 4 y 7 de sospecha de sepsis nosocomial. HBD2: human beta defensin 2; Rho: Rho de Spearman.

HBD2 Y LA EDAD GESTACIONAL DICOTOMIZADA:

En este análisis se calcularon las posibles asociaciones entre la variable cuantitativa continua “niveles de HBD2 (pg/ml)” y la variable “edad gestacional” dicotomizada (< 28 semanas vs ≥ 28 semanas).

En la muestra estudiada 31 neonatos (36,9%) presentaron una edad gestacional menor de 28 semanas y 53 (63,1%) una edad gestacional mayor o igual a 28 semanas.

Los niveles de HBD2 en suero fueron significativamente más elevados en neonatos con una edad gestacional menor de 28 semanas (**Tabla 13, Figura 14**).

Niveles de HBD2 (pg/ml) en población general			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 28 semanas	11842 (±11844)	9422 (5302-16944)	0,001
≥ 28 semanas	6649 (±10569)	3911 (1675-7861)	
Día 4			
< 28 semanas	11066 (±7662)	9397 (5274-15298)	0,001
≥ 28 semanas	5156 (±3626)	5020 (1992-7164)	
Día 7			
< 28 semanas	8880 (±6368)	7899 (4169-12986)	0,038
≥ 28 semanas	6187 (±6046)	4752 (2969-8206)	
Media			
< 28 semanas	10876 (±8877)	8894(5653-13740)	<0,001
≥ 28 semanas	6091(±5590)	5417 (1045-6904)	

Tabla 13: Asociación entre la variable edad gestacional y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción. HBD2: *human beta defensin 2*; DS: *desviación estándar*; RIQ: *rango intercuartíl*. *Prueba de Mann-Whitney.

RESULTADOS

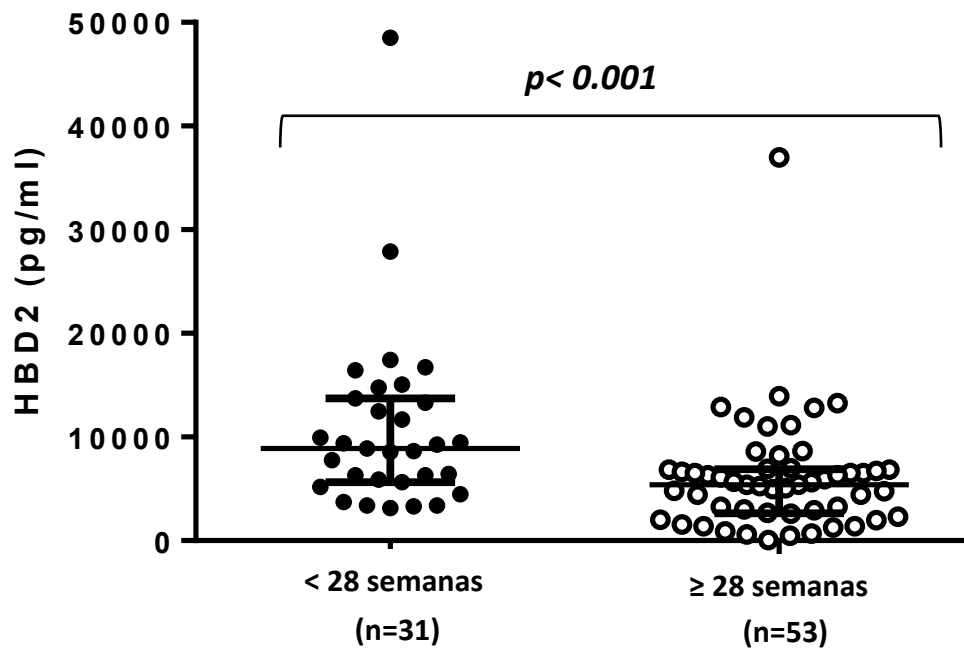


Figura 14: Asociación entre las variables edad gestacional y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción. HBD2: *human beta defensin 2*.

Se observaron resultados similares comparando los niveles de HBD2 en suero con el peso al nacer en esta situación clínica. (Tabla 14, Figura 14).

HBD2 (pg/ml)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	VALOR P
Peso al nacer (g)		
DÍA 0	Rho: -0,165	p= 0,155
DÍA 4	Rho: -0,292	p= 0,019
DÍA 7	Rho: -0,243	p= 0,059
MEDIA	Rho: -0,332	p= 0,002

Tabla 14: Correlaciones entre el peso al nacer y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción. HBD2: *human beta defensin 2*; g: gramos; Rho: *Rho de Spearman*.

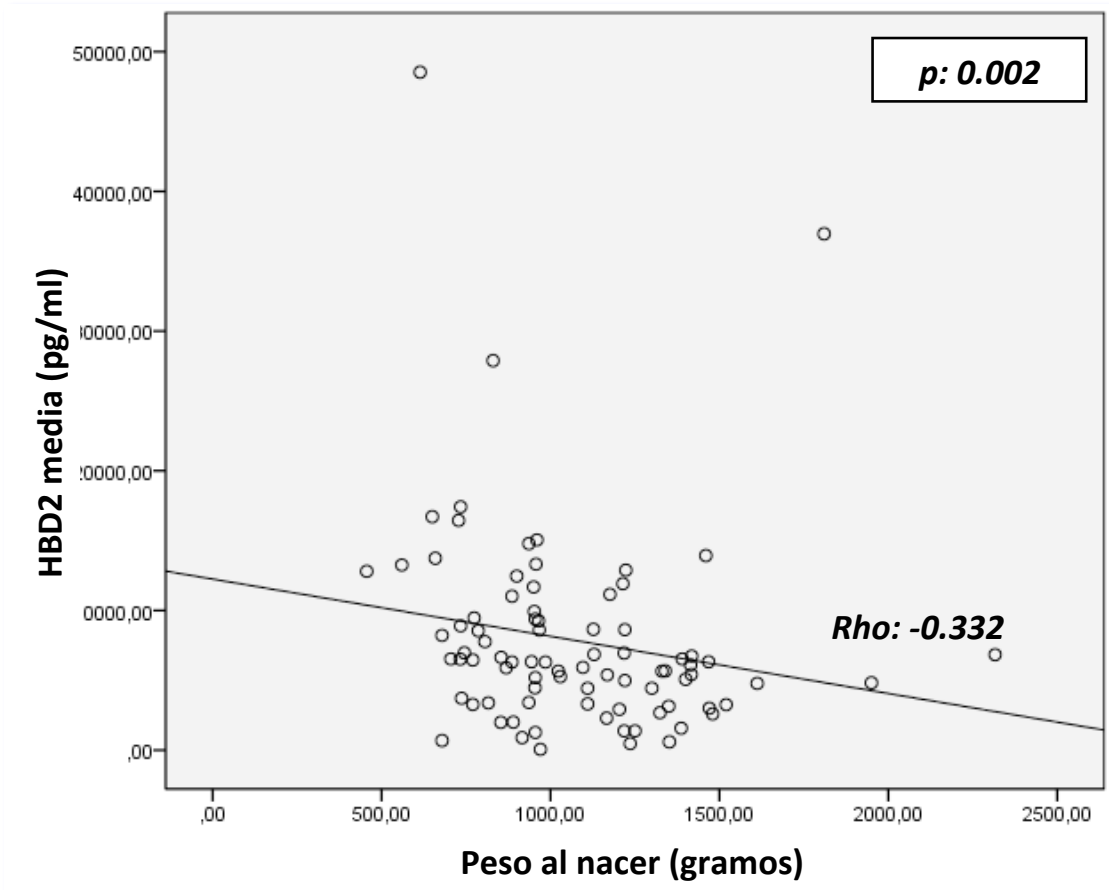


Figura 15: Correlación entre el peso al nacer y la media de los niveles de HBD2 en suero obtenido los días 0, 4 y 7 de sospecha de sepsis nosocomial. HBD2: human beta defensin 2; Rho: *Rho de Spearman*.

HBD2 Y EL PESO AL NACER COMO VARIABLE DICOTOMIZADA:

En este análisis se calcularon las posibles asociaciones entre la variable cuantitativa continua “niveles de HBD2 (pg/ml)” y la variable “Peso al nacer” dicotomizada (< 1000g vs ≥ 1000 g).

En la muestra estudiada 44 neonatos (52,4%) presentaron un peso al nacer menor de 1000 g y 40 (47,6%) con peso mayor o igual a 1000 g.

Los neonatos con un peso al nacer menor de 1000 g presentaron niveles séricos de HBD2 significativamente más elevados que neonatos con un peso mayor de 1000 g (Tabla 15, Figura 16).

RESULTADOS

Niveles de HBD2 (pg/ml) población general			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 1000g	9487 (\pm 10971)	7335 (2564-15100)	0,255
\geq 1000g	7587 (\pm 11634)	5074 (2545-8864)	
Día 4			
< 1000g	9096 (\pm 7300)	8067 (3651-12353)	0,028
\geq 1000g	5156 (\pm 3204)	5074 (2796-6828)	
Día 7			
< 1000g	8264 (\pm 6541)	7540 (4217-11530)	0,073
\geq 1000g	5951 (\pm 5768)	4414 (2999-8245)	
Media			
< 1000g	9397 (\pm 8156)	7991 (4649-12717)	0,005
\geq 1000g	6164 (\pm 5900)	5326 (3041-6810)	

Tabla 15: Asociación entre la variable peso al nacer y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción. HBD2: *human beta defensin 2*; DS: *desviación estándar*; RIQ: *rango intercuartil*; g: *gramos*. * Prueba de Mann-Whitney.

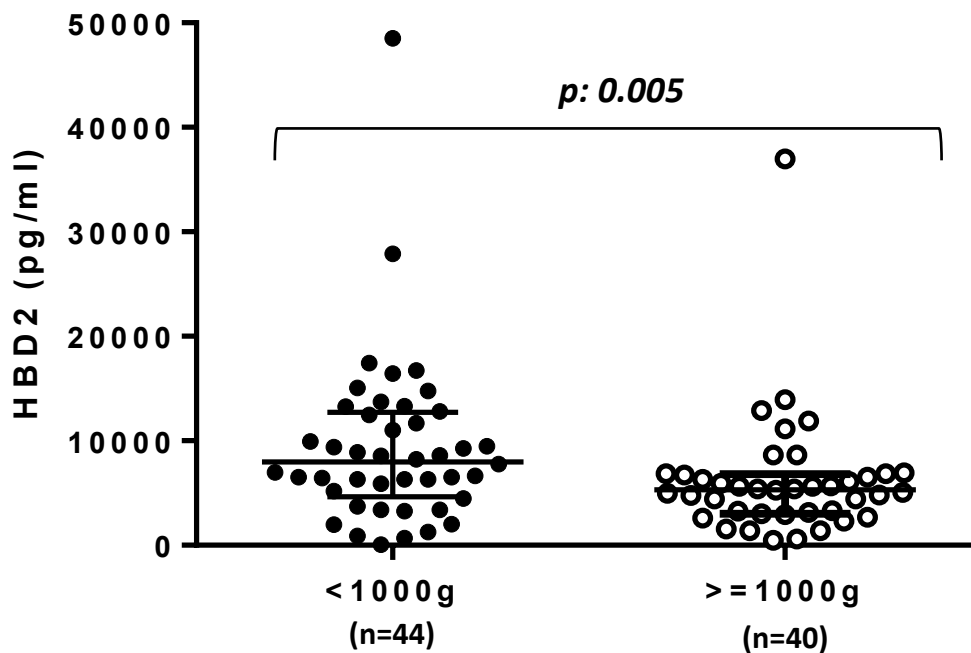


Figura 16: Asociación entre la variable peso al nacer y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción. HBD2: *human beta defensin 2*.

NIVELES DE LA MBL EN RELACIÓN CON LAS VARIABLES EDAD GESTACIONAL Y PESO AL NACER

En cambio no se ha encontrado tal comportamiento al analizar las correlaciones de la variable MBL en suero con la edad gestacional y el peso al nacer en el momento de sospecha de sepsis (**Tablas 16 y 17**).

MBL (ng/ml)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	VALOR P
Edad gestacional (semanas)		
DÍA 0	Rho: -0,016	p= 0,889
DÍA 4	Rho: -0,157	p= 0,217
DÍA 7	Rho: 0,023	p= 0,860
MEDIA	Rho: -0,069	p= 0,534

Tabla 16: Correlaciones entre la edad gestacional y niveles de MBL en suero en los diferentes momentos de extracción. MBL: *mannose binding lectin*; Rho: *Rho de Spearman*.

MBL (ng/ml)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	VALOR P
Peso al nacer (gramos)		
DÍA 0	Rho: -0,030	p= 0,796
DÍA 4	Rho: -0,000	p= 0,998
DÍA 7	Rho: 0,013	p= 0,920
MEDIA	Rho: -0,048	p= 0,661

Tabla 17: Correlaciones entre la variable peso al nacer y niveles de MBL en suero en los diferentes momentos de extracción. MBL: *mannose binding lectin*; Rho: *Rho de Spearman*.

MBL Y LA EDAD GESTACIONAL:

En este análisis se calcularon las posibles asociaciones entre la variable cuantitativa continua “niveles de MBL (ng/ml)” y la variable “Edad Gestacional” dicotomizada (< 28 semanas vs ≥ 28 semanas).

RESULTADOS

En la muestra estudiada 31 neonatos (36,9%) presentaron una edad gestacional menor de 28 semanas y 53 (63,1%) una edad gestacional \geq 28 semanas.

Los neonatos con una edad gestacional menor de 28 semanas no presentaron niveles de MBL en suero diferentes del grupo de neonatos mayores de esta edad gestacional (Tabla 18).

Niveles de MBL (ng/ml) población general			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 28 semanas	1660 (\pm 1867)	764 (65-3245)	0,636
\geq 28 semanas	1691 (\pm 1414)	1834 (114-2880)	
Día 4			
< 28 semanas	2046(\pm 1675)	2257 (409-3285)	0,441
\geq 28 semanas	1819 (\pm 1606)	1758 (204-2828)	
Día 7			
< 28 semanas	1692 (\pm 1430)	1491 (327-2829)	0,911
\geq 28 semanas	1777 (\pm 1595)	1405 (191-3095)	
Media			
< 28 semanas	1676 (\pm 1670)	1058 (97-3002)	0,945
\geq 28 semanas	1676 (\pm 1418)	1863 (141-2768)	

Tabla 18: Asociación entre la variable edad gestacional y niveles de MBL en suero en los diferentes momentos de extracción. MBL: *mannose binding lectin*; DS: *desviación estándar*; RIQ: *rango intercuartil*; * Prueba de Mann-Whitney.

MBL Y EL PESO AL NACER DICOTOMIZADO:

En este análisis se calcularon las posibles asociaciones entre la variable cuantitativa continua “niveles de MBL (ng/ml)” y la variable “Peso al nacer” dicotomizada (< 1000g vs \geq 1000g).

En la muestra estudiada 44 neonatos (52,4%) presentaron un peso al nacer menor de 1000 g y 40 (47,6%) un peso mayor o igual a 1000 g.

Los niveles séricos de MBL no fueron diferentes en el grupo de los neonatos con un peso inferior a 1000 g (**Tabla 19**).

Niveles de MBL (ng/ml) y durante la sospecha de sepsis			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 1000g	1596 (\pm 1656)	867 (100-2867)	0,681
\geq 1000g	1768 (\pm 1521)	1879 (92-2995)	
Día 4			
< 1000g	1755 (\pm 1544)	1479 (373-2986)	0,626
\geq 1000g	2096 (\pm 1728)	2589 (182-3113)	
Día 7			
< 1000g	1617 (\pm 1369)	1369 (462-2604)	0,745
\geq 1000g	1895 (\pm 1700)	1863 (136-3275)	
Media			
< 1000g	1619 (\pm 1504)	1534 (162-2851)	0,851
\geq 1000g	1739 (\pm 1524)	1905 (103-2979)	

Tabla 19: Asociación entre la variable peso al nacer y niveles de MBL en suero en los diferentes momentos de extracción. MBL: *mannose binding lectin*; DS: *desviación estándar*; RIQ: *rango intercuartíl*; * Prueba de Mann-Whitney.

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE HBD2 , PROTEÍNA C REACTIVA Y RECUENTO DE NEUTRÓFILOS

En este apartado se estudiaron las posibles relaciones entre los valores de variables continuas obtenidas de la sangre de los pacientes en diferentes momentos de extracción.

Correlación de la pareja de variables HBD2 y proteína C reactiva (PCR):

No se han observado correlaciones entre las variables de PCR (mg/L) y HBD2 (pg/ml) en los días 0, 4, y 7 (media Rho -0.129; p=0,250).

Correlación de la pareja de variables HBD2 y recuento de neutrófilos:

Se han observado correlaciones significativas entre las variables de recuento de neutrófilos (células/mm³) y HBD2 (pg/ml, **Tabla 20 y Figura 17**)

HBD2 (pg/ml) \ Neutrófilos (mm ³)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	VALOR P
DÍA 0	Rho: 0,183	p= 0,118
DÍA 4	Rho: 0,307	p= 0,024
DÍA 7	Rho: 0,381	p= 0,014
MEDIA	Rho: 0,375	p= 0,001

Tabla 20: Correlaciones entre el recuento de neutrófilos y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción. HBD2: *human beta defensin 2*; mm³: células/mm³; Rho: *Rho de Spearman*.

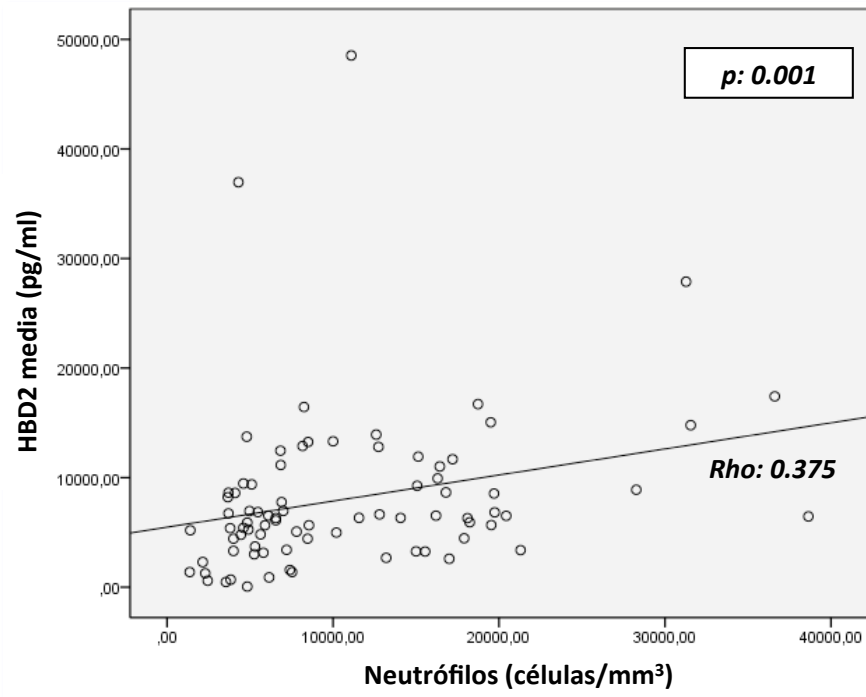


Figure 17: Correlación entre las medias del recuento de neutrófilos con los niveles de HBD2 en suero de sospecha de sepsis nosocomial. HBD2: *human beta defensin 2*.

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MBL, PROTEÍNA C REACTIVA Y RECUENTO DE NEUTRÓFILOS

Correlación de la pareja de variables MBL y proteína C reactiva (PCR):

No se han observado correlaciones entre las variables de PCR (mg/L) y HBD2 (pg/ml) en los días 0, 4 y 7 (media Rho -0.103; $p=0,357$).

Correlación de la pareja de variables MBL y recuento de neutrófilos:

No se han observado correlaciones entre las variables de PCR (mg/L) y HBD2 (pg/ml) en los días 0, 4 y 7 (media Rho 0.167; $p=0,136$).

RESULTADOS

Estratificación de la muestra en función de la variable sepsis nosocomial

Se realizó un estratificación de la variable sepsis en los tres subgrupos: no sepsis, sepsis clínica y sepsis confirmada (**Tabla 21**) con análisis posterior de las variables predictoras (edad gestacional, peso al nacer).

	Frecuencia	Porcentaje
No sepsis	28	32.5
Sepsis Clínica	16	19.0
Sepsis Confirmada	40	47.6
Total	84	100

Tabla 21: Distribución de frecuencias de la presencia de las diferentes categorías de sepsis en la población general.

Se realizaron las pruebas de contraste correspondientes para el análisis inter-grupos. No se han hallado diferencias entre los tres grupos tal y como se detalla en las **Tablas 22 y 23**.

	Mediana (RIQ)	Valor p*
Sepsis		
- No sepsis	29 (28-31)	0,293
- Sepsis clínica	27 (26,3-30)	
- Sepsis comprobada	28 (26,3-32)	

Tabla 22: Edad gestacional (semanas) para las categorías de la variable sepsis. RIQ: rango intercuartil; * Mann-Whitney

	Mediana (RIQ)	Valor p*
Sepsis		
- No sepsis	1110 (886-1390)	0,270
- Sepsis clínica	948 (812-968)	
- Sepsis comprobada	1062,5 (774-1336)	

Tabla 23: Peso al nacer (gramos) para las categorías de la variable sepsis. RIQ: rango ntercuartil; * Mann-Whitney

ANÁLISIS DEL ESTRATO DE “NEONATOS SIN DATOS DE SEPSIS”

Asociación entre niveles de HBD2 y edad gestacional y peso al nacer (dicotomizados) en neonatos sin datos de sepsis

No se encontraron asociaciones entre la variable HBD2 en suero y las variables edad gestacional y peso al nacer (ambas dicotomizadas) analizando el subgrupo de “no signos de sepsis” (Tablas 24 y 25).

Niveles de HBD2 (pg/ml) en estrato de “no sepsis”			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 28 semanas (n=6)	7484 (±5929)	7132 (2032-11792)	0,543
≥ 28 semanas (n=20)	9074 (±15663)	4446 (1596-9138)	
Día 4			
< 28 semanas (n=4)	8144 (±2715)	7546 (5915-10971)	0,368
≥ 28 semanas (n=15)	6081 (±4046)	5863 (1869-9857)	
Día 7			
< 28 semanas (n=5)	10161 (±4519)	11415 (6302-13394)	0,092
≥ 28 semanas (n=12)	7335 (±8192)	5221 (2234-8452)	
Media (0,4,7)			
< 28 semanas (n=6)	8672 (±2970)	9075 (7317-10211)	0,080
≥ 28 semanas (n=21)	7387 (±7674)	6514 (2508-8614)	

Tabla 24: Asociación entre los niveles de HBD2 y la edad gestacional en el estrato “no sepsis”. HBD2: *human beta defensin 2*; DS: *desviación estándar*; RIQ: *rango intercuartílico*; * *Mann-Whitney*.

RESULTADOS

Niveles de HBD2 (pg/ml) en estrato de “no sepsis”			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 1000 g (n=12)	5792 (±6231)	3191 (853-9247)	0,258
≥ 1000 g (n=14)	11206 (±18043)	7092 (2671-10622)	
Día 4			
< 1000 g (n=9)	5954 (±4765)	7030 (1084-10705)	0,683
≥ 1000 g (n=10)	7019 (±2938)	6038 (5047-9382)	
Día 7			
< 1000 g (n=9)	6997 (±5136)	7540 (1272-12200)	0,773
≥ 1000 g (n=8)	9483 (±9341)	6501 (4235-10232)	
Media (0,4,7)			
< 1000 g (n=12)	6474 (±4214)	7621 (1452-9411)	0,845
≥ 1000 g (n=15)	8631 (±8466)	6533 (4430-8653)	

Tabla 25: Asociación entre los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “no sepsis”. HBD2: *human beta defensin 2*; DS: *desviación estándar*; RIQ: *rango intercuartil*; g: *gramos*. * Mann-Whitney.

Correlación entre los niveles de HBD2, recuento de neutrófilos y valor de PCR en estrato de “neonatos sin datos de sepsis”

En los neonatos sin signos de sepsis (con datos disponibles n=25) se observó una correlación positiva no significativa entre HBD2 y neutrófilos (Tabla 26, Figura 18)

HBD2 (pg/ml) \ Neutrófilos (mm ³)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	VALOR P
DÍA 0	Rho: -0,027	p= 0,898
DÍA 4	Rho: 0,329	p= 0,231
DÍA 7	Rho: 0,680	p= 0,011
MEDIA	Rho: 0,384	p= 0,058

Tabla 26: Correlaciones entre el recuento de neutrófilos y niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de extracción para el estrato de “No sepsis”. HBD2: *human beta defensin 2*; mm³: *células/mm³*; Rho: *Rho de Spearman*.

RESULTADOS

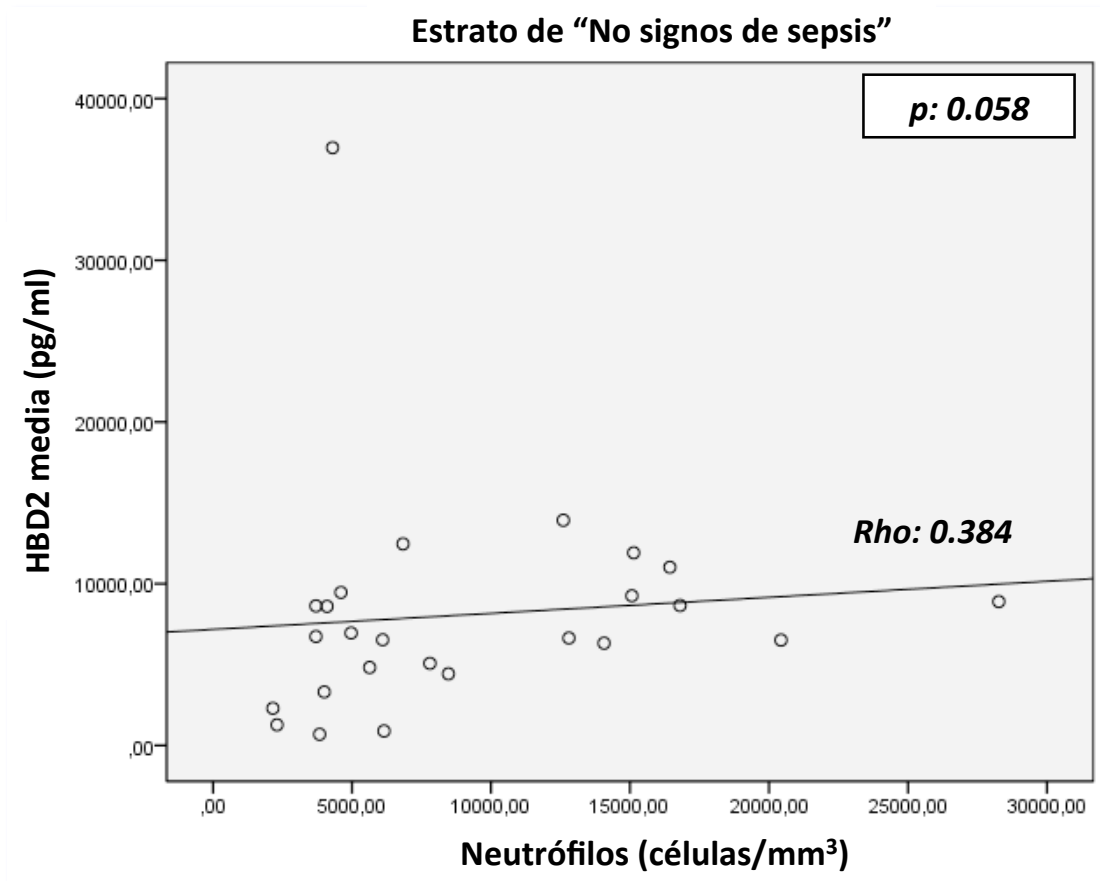


Figura 18: Correlación entre las medias del recuento de neutrófilos con las medias de los niveles de HBD2 en suero para el estrato de "No sepsis". HBD2: *human beta defensin 2*; Rho: *Rho de Spearman*.

Así mismo los niveles de HBD2 en suero y los valores de la proteína C reactiva se correlacionaron de manera negativa sin alcanzar significación estadística (media Rho: -0.354, $p= 0,076$).

RESULTADOS

Asociación entre MBL, edad gestacional y peso al nacer

No se hallaron asociaciones entre la variable “MBL en suero” y las variables “edad gestacional” y “peso al nacer” (ambas dicotomizadas) analizando el subgrupo de “no signos de sepsis” (Tablas 27 y 28).

Niveles de MBL (ng/ml) en estrato de “no sepsis”			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 28 semanas (n=6)	2109 (±2462)	1342 (16-4559)	0,903
≥ 28 semanas (n=20)	1465 (±1329)	1464 (105-2326)	
Día 4			
< 28 semanas (n=4)	1639 (±1674)	1694 (102-3120)	0,764
≥ 28 semanas (n=15)	1504 (±1419)	1242 (84-2860)	
Día 7			
< 28 semanas (n=5)	1859 (±1586)	2077 (238-3373)	0,673
≥ 28 semanas (n=12)	1542 (±1621)	1361 (180-2467)	
Media (0,4,7)			
< 28 semanas (n=6)	1712 (±1833)	1315 (17-3715)	0,861
≥ 28 semanas (n=21)	1460 (±1284)	1549 (117-2063)	

Tabla 27: Asociación entre los niveles de MBL y la edad gestacional en el estrato “no sepsis”. MBL: *mannose binding lectin*, DS: *derivación estándar*; RIQ: *rango intercuartílico*. * Mann-Whitney.

Niveles de MBL (ng/ml) en estrato de “no sepsis”			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 1000 g (n=12)	1502 (±1744)	1022 (81-2440)	0,719
≥ 1000 g (n=14)	1709 (±1571)	1629 (106-2694)	
Día 4			
< 1000 g (n=9)	1108 (±1147)	714 (148-2352)	0,288
≥ 1000 g (n=10)	1914 (±1600)	2089 (47-3085)	
Día 7			
< 1000 g (n=9)	1494 (±1390)	1369 (320-2633)	0,923
≥ 1000 g (n=8)	1795 (±1832)	1397 (75-3360)	
Media (0,4,7)			
< 1000 g (n=12)	1306 (±1333)	1058 (122-2197)	0,591
≥ 1000 g (n=15)	1684 (±1879)	1879 (96-2652)	

Tabla 28: Asociación entre los niveles de MBL y el peso al nacer en el estrato “no sepsis”. MBL: *mannose binding lectin*, DS: *derivación estándar*; RIQ: *rango intercuartílico*; g: *gramos*. * Mann-Whitney.

RESULTADOS

Correlación entre los niveles de MBL, recuento de neutrófilos y valor de PCR en estrato de “neonatos sin datos de sepsis”

Los niveles de MBL en suero no mostraron correlaciones con la variable “recuento de neutrófilos” (media Rho: 0,105, $p=0,619$). Tampoco se observaron correlaciones significativas evaluando la pareja de variables MBL y PCR en este estrato (media Rho: -0,083, $p= 0,688$).

ANALISIS DEL ESTRATO DE “NEONATOS CON SEPSIS CLÍNICA”

Asociación entre HBD2, edad gestacional y peso al nacer

Los neonatos prematuros extremos (edad gestacional <28 semanas) y neonatos con muy bajo peso al nacer (<1500g) presentaron niveles de HBD2 en suero significativamente más elevados (Tablas 29, 30 y Figuras 19, 20).

Niveles de HBD2 (pg/ml) en estrato de “sepsis clínica”			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 28 semanas (n=8)	9860 (±5570)	9817 (5406-15653)	0,020
≥ 28 semanas (n=6)	3344 (±3944)	1445 (375-7829)	
Día 4			
< 28 semanas (n=6)	12559 (±7195)	11051 (7138-17465)	0,068
≥ 28 semanas (n=5)	4500 (±3989)	5863 (251-8068)	
Día 7			
< 28 semanas (n=7)	11466 (±10013)	11645 (2855-15233)	0,153
≥ 28 semanas (n=6)	5075 (±4281)	5696 (112-9403)	
Media (0,4,7)			
< 28 semanas (n=9)	11007 (±7500)	9381 (5424-14919)	0,050
≥ 28 semanas (n=7)	4165 (±3602)	6329 (468-6964)	

Tabla 29: Asociación entre los niveles de HBD2 y la edad gestacional en el estrato “sepsis clínica”. HBD2: *human beta defensin 2*; DS: *desviación estándar*; RIQ: *rango intercuartil*. * Mann-Whitney.

RESULTADOS

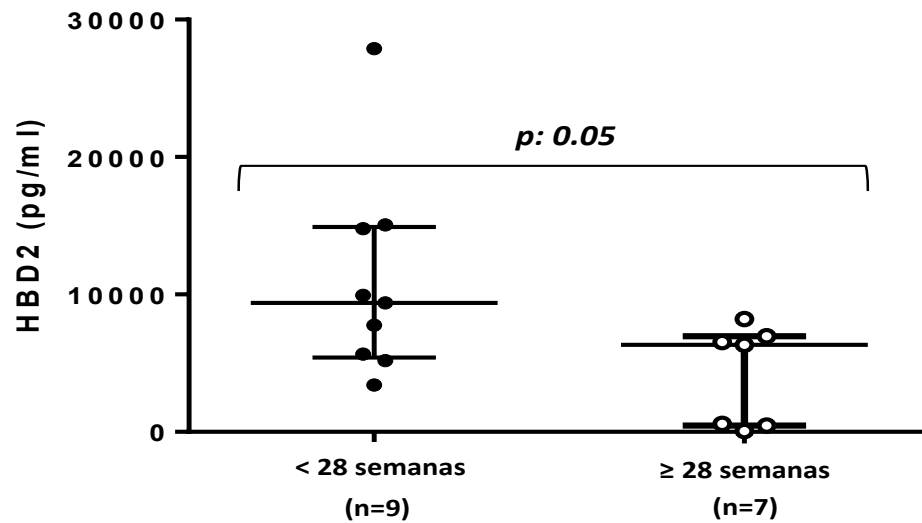


Figura 19: Asociación entre la media de los niveles de HBD2 y la edad gestacional en el estrato “sepsis clínica”. HBD2: *human beta defensin 2*. * Mann-Whitney.

Niveles de HBD2 (pg/ml) en estrato de “sepsis clínica”			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 1000 g (n=11)	7851 (±5905)	7335 (2209-10252)	0,484
≥ 1000 g (n=3)	4194 (±5490)	1598 (483-NO)	
Día 4			
< 1000 g (n=9)	10817 (±6293)	8326 (6829-13670)	0,034
≥ 1000 g (n=2)	251 (±284)	251 (50-NO)	
Día 7			
< 1000 g (n=11)	9979 (±8197)	9370 (4427-14200)	0,076
≥ 1000 g (n=2)	469 (±479)	469 (130-NO)	
Media (0,4,7)			
< 1000 g (n=13)	9346 (±6901)	7766 (5762-12358)	0,051
≥ 1000 g (n=3)	2238 (±2959)	593 (468-NO)	

Tabla 30: Asociación entre los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “sepsis clínica”. HBD2: *human beta defensin 2*; DS: *derivación estándar*; RIQ: *rango intercuartílico*; g: *gramos*. * Mann-Whitney.

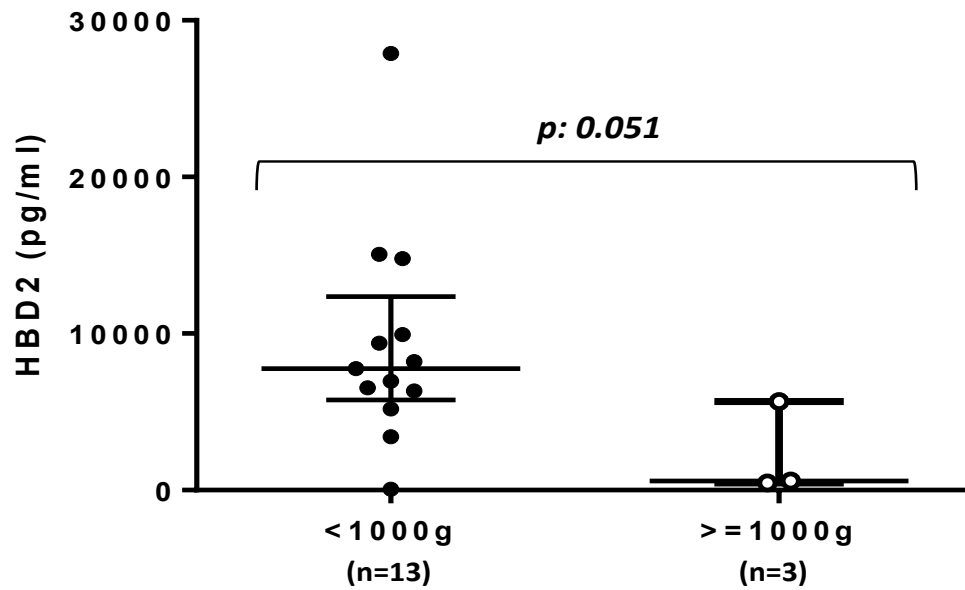


Figura 20: Asociación entre las medias de los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “sepsis clínica”. HBD2: human beta defensin 2, DS: desviación estándar; RIQ: rango intercuartíl; g: gramos. * Mann-Whitney.

Correlación entre HBD2, recuento de neutrófilos y valor de PCR

En pacientes con sepsis clínica (con datos disponibles n=16) se ha observado una correlación positiva y significativa entre los niveles de HBD2 y el recuento de los neutrófilos (Tabla 31, Figura 21).

HBD2 (pg/ml) \ Neutrófilos (mm ³)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	VALOR P
DÍA 0	Rho: 0,310	p= 0,281
DÍA 4	Rho: 0,745	p= 0,008
DÍA 7	Rho: 0,628	p= 0,070
MEDIA	Rho: 0,694	p= 0,003

Tabla 31: Correlación entre el recuento de neutrófilos y los niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de su extracción para el estrato “Sepsis clínica”. HBD2: human beta defensin 2; mm³: células/mm³; Rho: Rho de Spearman.

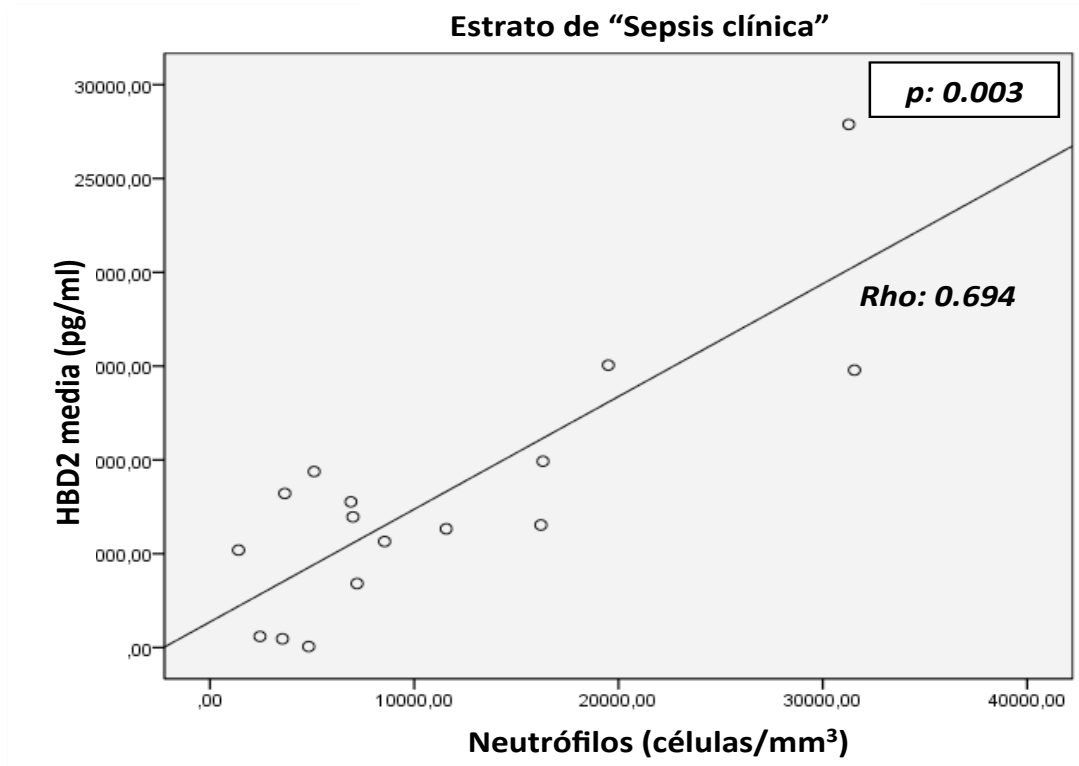


Figura 21: Correlación entre la medias del recuento de neutrófilos con los niveles de HBD2 en suero para el estrato de “Sepsis clínica”. HBD2: *human beta defensin 2*; Rho: *Rho de Spearman*.

En cambio no se detectó una correlación analizando los niveles de HBD2 y los valores de la proteína C reactiva en este estrato (media Rho: 0,238, $p= 0,374$).

Asociación entre los niveles de MBL, edad gestacional y peso al nacer

Los neonatos prematuros extremos con una edad gestacional menor de 28 semanas mostraron niveles de MBL más bajos que aquellos con una edad gestacional mayor o igual a ≥ 28 semanas. Sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Analizando los subgrupos de neonatos (Peso al nacer $<1000g$ versus $\geq 1000g$) no se mantuvo esta observación (Tablas 32,33).

RESULTADOS

Niveles de MBL (ng/ml) en estrato de "Sepsis clínica"			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 28 semanas (n=8)	484 (±652)	108 (16-4559)	0,093
≥ 28 semanas (n=6)	2098 (±1483)	2738 (105-2326)	
Día 4			
< 28 semanas (n=6)	1123 (±1214)	840 (102-3120)	0,465
≥ 28 semanas (n=5)	1788 (±1127)	2176 (84-2860)	
Día 7			
< 28 semanas (n=7)	792 (±760)	490 (238-3373)	0,086
≥ 28 semanas (n=6)	2065 (±1516)	1855 (180-2467)	
Media (0,4,7)			
< 28 semanas (n=9)	705 (±870)	181 (17-3715)	0,125
≥ 28 semanas (n=7)	1783 (±1279)	1927 (117-2063)	

Tabla 32: Asociación entre los niveles de HBD2 y la edad gestacional en el estrato "sepsis clínica". MBL: mannose binding lectin; DS: desviación estándar; RIQ: rango intercuartil; * Mann-Whitney.

Niveles de MBL (ng/ml) en estrato de "Sepsis clínica"			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 1000 g (n=11)	1209 (±1296)	663 (72-2411)	0,484
≥ 1000 g (n=3)	1055 (±1740)	93 (8-NO)	
Día 4			
< 1000 g (n=9)	1443 (±1122)	1392 (322-2429)	0,637
≥ 1000 g (n=2)	1344 (±1891)	1344 (7-NO)	
Día 7			
< 1000 g (n=11)	1323 (±1220)	1042 (327-2049)	0,844
≥ 1000 g (n=2)	1694 (±2253)	1694 (101-NO)	
Media (0,4,7)			
< 1000 g (n=13)	1208 (±1100)	1058 (152-2077)	0,459
≥ 1000 g (n=3)	1038 (±1709)	97 (8-NO)	

Tabla 33: Asociación entre los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato "sepsis clínica". MBL: mannose binding lectin; DS: desviación estándar; RIQ: rango intercuartil; g: gramos; * Mann-Whitney

Correlación entre MBL, recuento de neutrófilos y valor de PCR

Los niveles de MBL en suero no mostraron correlaciones significativas con las variables recuento de neutrófilos (media Rho: 0,112, p=0,880) y proteína C reactiva (media Rho: 0,303, p= 0,254) en el estrato de sepsis clínica.

ANÁLISIS DEL ESTRATO DE “NEONATOS CON SEPSIS CONFIRMADA”

Asociación entre los niveles de HBD2, edad gestacional y peso al nacer

Los neonatos con una edad gestacional menor de 28 semanas o un peso al nacer inferior a 1000 gramos mostraron niveles de HBD2 significativamente más elevados en comparación con neonatos de mayor edad gestacional o peso al nacer (Tablas 34, 35 y Figuras 22,23).

Niveles de HBD2 (pg/ml) en estrato de “sepsis confirmada”			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 28 semanas (n=14)	14842 (±15499)	9287 (6249-17443)	0,005
≥ 28 semanas (n=21)	5464 (±1521)	4720 (3049-6693)	
Día 4			
< 28 semanas (n=14)	11260 (±8863)	9410 (3856-17928)	0,029
≥ 28 semanas (n=19)	4734 (±3292)	4192 (2217-6579)	
Día 7			
< 28 semanas (n=11)	6653 (±3151)	6577 (4169-8205)	0,355
≥ 28 semanas (n=19)	6106 (±5101)	4779 (3009-7259)	
Media (0,4,7)			
< 28 semanas (n=16)	11629 (±11050)	7503 (4824-15769)	0,009
≥ 28 semanas (n=24)	5690 (±3534)	5326 (3068-6650)	

Tabla 34: Asociación entre los niveles de HBD2 y la edad gestacional en el estrato “sepsis confirmada”. HBD2: *human beta defensin 2*; DS: *desviación estándar*; RIQ: *rango intercuartil*; * *Mann-Whitney*.

RESULTADOS

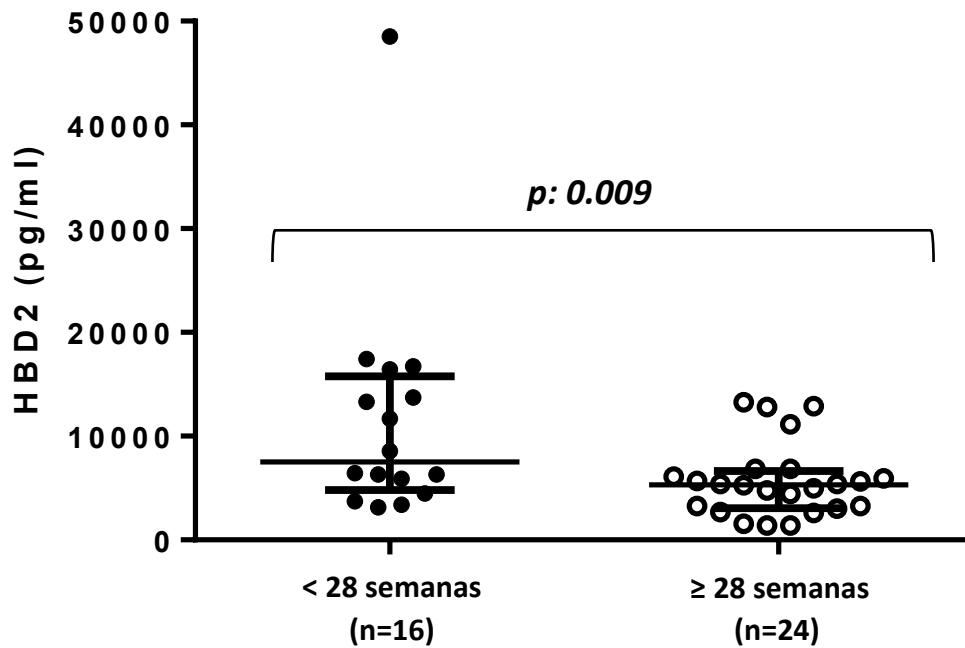


Figure 22: Asociación entre las medias de los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “sepsis confirmada”. HBD2: human beta defensin 2; DS: desviación estándar; RIQ: rango intercuartíl; g: gramos.

Niveles de HBD2 (pg/ml) en estrato de “sepsis confirmada”			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 1000 g (n=15)	14087 (±15219)	9074 (5626-17029)	0,012
≥ 1000 g (n=20)	5562 (±3838)	4771 (2976-6706)	
Día 4			
< 1000 g (n=17)	10231 (±8612)	9244 (3695-16638)	0,098
≥ 1000 g (n=16)	4604 (±2729)	4392 (2393-6331)	
Día 7			
< 1000 g (n=12)	8280 (±5886)	7201 (4380-9176)	0,075
≥ 1000 g (n=18)	4991 (±2554)	4590 (3005-7072)	
Media (0,4,7)			
< 1000 g (n=18)	11792 (±10394)	10117 (5538-14416)	0,001
≥ 1000 g (n=22)	5017 (±2846)	5125 (2924-5965)	

Tabla 35: Asociación entre los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “sepsis confirmada”. HBD2: human beta defensin 2; DS: desviación estándar; RIQ: rango intercuartílico; g: gramos; * Mann-Whitney.

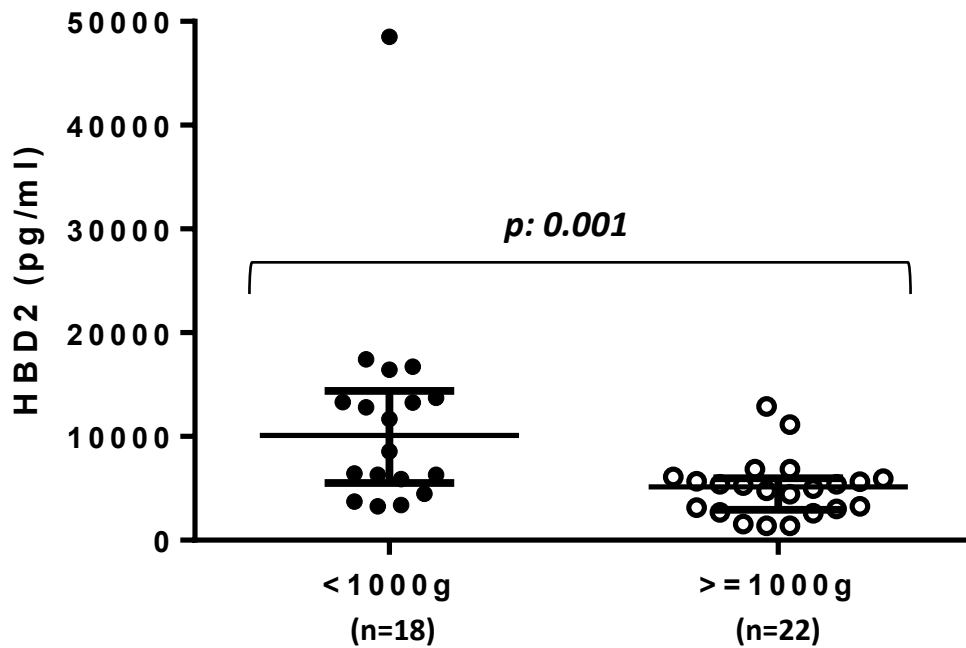


Figure 23: Asociación entre las medias de los niveles de HBD2 y el peso al nacer en el estrato “sepsis confirmada”. HBD2: human beta defensin 2; DS: desviación estándar; RIQ: rango intercuartílico; g: gramos.

Correlación entre los niveles de HBD2, neutrófilos y proteína C reactiva

En pacientes con sepsis confirmada (con datos disponibles n=40) no se ha observado una correlación entre HBD2 y neutrófilos o PCR (Tablas 36, 37).

HBD2 (pg/ml) \ Neutrófilos (mm ³)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	VALOR P
DÍA 0	r: 0,041	p= 0,814
DÍA 4	r: 0,153	p= 0,437
DÍA 7	r: 0,400	p= 0,090
MEDIA	r: 0,125	p= 0,442

Tabla 36: Correlación entre el recuento de neutrófilos y los niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de su extracción para el estrato “Sepsis confirmada”. HBD2: human beta defensin 2; mm³: células/mm³; r: coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS

HBD2 (pg/ml) \ PCR (mg/L)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	VALOR P
DÍA 0	r: -0,294	p= 0,086
DÍA 4	r: -0,012	p= 0,952
DÍA 7	r: 0,465	p= 0,039
MEDIA	r: -0,139	p= 0,392

Tabla 37: Correlación entre el valor de PCR y los niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de su extracción para el estrato "Sepsis confirmada". HBD2: *human beta defensin 2*; PCR: *Proteína C reactiva*; r: *coeficiente de correlación de Pearson*.

Asociación entre los niveles de MBL, edad gestacional y peso al nacer

Los neonatos con una edad gestacional menor de 28 semanas o un peso al nacer inferior a 1000 gramos mostraron niveles de MBL similares a neonatos de mayor edad gestacional o mayor peso al nacer (Tablas 38, 39).

Niveles de MBL (ng/ml) en estrato de "sepsis confirmada"			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 28 semanas (n=14)	2139 (±1867)	2148 (249-3563)	0,711
≥ 28 semanas (n=21)	1830 (±1521)	1993 (102-3225)	
Día 4			
< 28 semanas (n=14)	2558 (±1738)	2804 (541-3635)	0,512
≥ 28 semanas (n=19)	2152 (±1851)	2572 (202-3563)	
Día 7			
< 28 semanas (n=11)	2187 (±1516)	2599 (460-2990)	0,636
≥ 28 semanas (n=19)	1888 (±1688)	2285 (136-3218)	
Media (0,4,7)			
< 28 semanas (n=16)	2209 (±1785)	2450 (201-3692)	0,544
≥ 28 semanas (n=24)	1876 (±1597)	2229 (137-3218)	

Tabla 38: Asociación entre los niveles de MBL y la edad gestacional en el estrato "sepsis confirmada". MBL: *mannose binding lectin*; DS: *desviación estándar*; RIQ: *rango intercuartil*; g: *gramos*; * *Mann-Whitney*.

Niveles de MBL (ng/ml) en estrato de “sepsis confirmada”			
	Media (DS)	Mediana (RIQ)	Valor p*
Día 0			
< 1000 g (n=15)	2004 (±1873)	1703 (113-3342)	0,947
≥ 1000 g (n=20)	1915 (±1507)	2138 (97-3270)	
Día 4			
< 1000 g (n=17)	2344 (±1775)	2675 (473-3553)	0,914
≥ 1000 g (n=16)	2303 (±1860)	2589 (209-3983)	
Día 7			
< 1000 g (n=12)	2051 (±1524)	2491 (512-2950)	0,882
≥ 1000 g (n=18)	1962 (±1702)	2363 (152-3369)	
Media (0,4,7)			
< 1000 g (n=18)	2178 (±1771)	2450 (333-3633)	0,625
≥ 1000 g (n=22)	1871 (±1593)	2229 (130-3193)	

Tabla 39: Asociación entre los niveles de MBL y el peso al nacer en el estrato “sepsis confirmada”. MBL: *mannose binding lectin*; DS: *desviación estándar*; RIQ: *rango intercuartil*; g: *gramos*; * *Mann-Whitney*.

Correlación entre los niveles de MBL y proteína C reactiva y neutrófilos en estrato de “neonatos con sepsis confirmada”

Los niveles de MBL en suero no mostraron correlaciones con las variables recuento de neutrófilos (media $r=0,187$; $p=0,248$) y PCR (media $r: -0,294$, $p= 0,066$) en el estrato de sepsis confirmada.

Estratificación de la muestra en función de la variable hemocultivo

En más de la mitad de los recién nacidos prematuros no se hallaron datos compatibles con una sepsis confirmada. Los microorganismos mas frecuentemente aislados fueron gérmenes Gram positivos (35%), mientras en aproximadamente 11% se identificaron bacterias Gram negativas (Tabla 40).

	Frecuencia	Porcentaje
HC negativo	44	52,4
Germen Gram positivo	30	35,7
Germen Gram negativo	10	11,9
Total	84	100

Tabla 40: Distribución de frecuencias de la presencia de las diferentes categorías de resultado de cultivos en la población general. HC: Hemocultivo

Análisis de las variables HBD2 y MBL en los estratos de la variable hemocultivos

Los niveles de HBD2 en suero mostraron una correlación positiva con los recuentos de neutrófilos en los niños prematuros con hemocultivo negativo, tal como se detalla en la Tabla 41 y la Figura 24.

HBD2 (pg/ml)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN	VALOR P
Neutrófilos (mm ³)		
DÍA 0	r: 0,029	p= 0,862
DÍA 4	r: 0,768	p< 0,001
DÍA 7	r: 0,733	p< 0,001
MEDIA	r: 0,476	p= 0,002

Tabla 41: Correlación entre el recuento de neutrófilos y los niveles de HBD2 en suero en los diferentes momentos de su extracción para el estrato “Hemocultivo negativo”. HBD2: human beta defensin 2; mm³: células/mm³; r: coeficiente de correlación de Pearson.

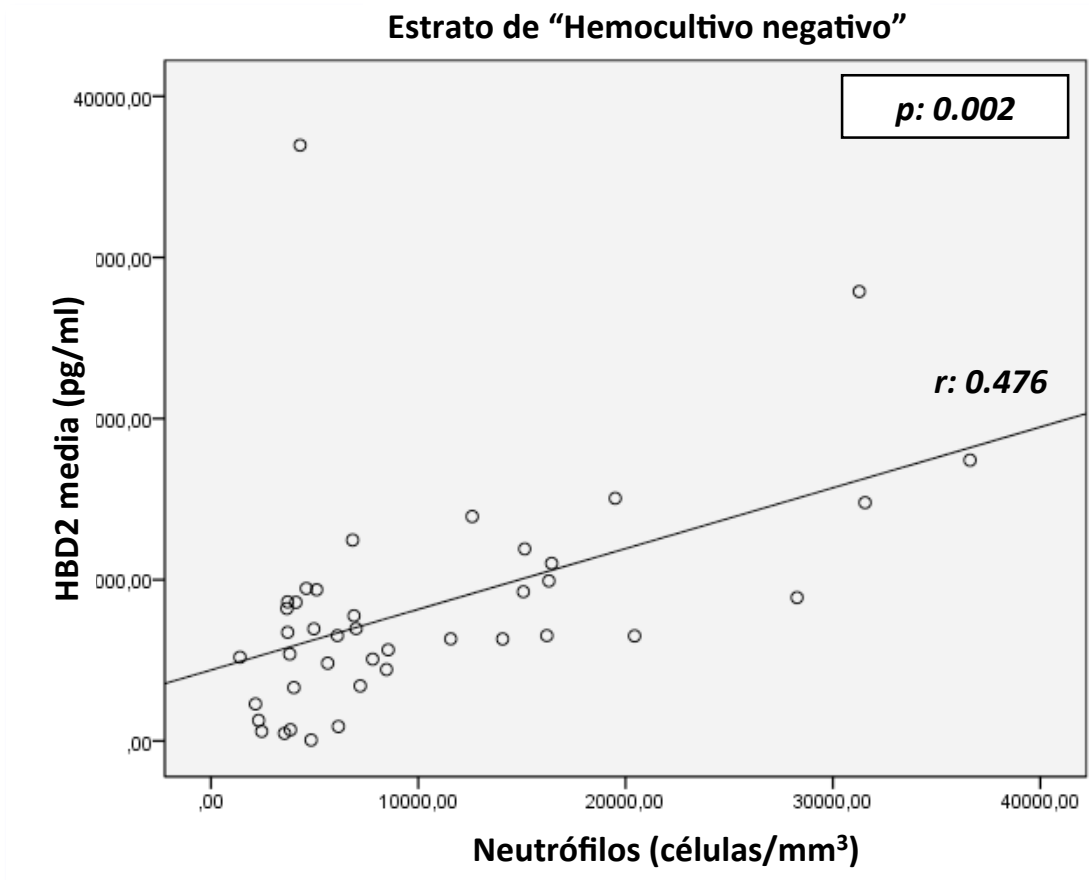


Figura 24: Gráfica de correlación entre las medias de los recuentos de neutrófilos con las medias de los niveles de HBD2 en suero para el estrato de "Hemocultivo negativo". HBD2: *human beta defensin 2*; r: coeficiente de correlación de Pearson.

No se hallaron correlaciones entre los niveles de MBL en suero con el recuento de neutrófilos en el grupo de neonatos con hemocultivo negativo (media $r=0,211$; $p=0,185$)

De la misma manera tampoco se detectaron correlaciones significativas entre las variables HBD2 o MBL la de recuentos de neutrófilos, analizando los subgrupos de neonatos con aislamiento en el hemocultivo de gérmenes Gram positivos (media $r=0,104$; $p=0,584$) y (media $r=-0,111$; $p=0,559$) o Gram negativos (media $r=0,358$; $p=0,310$) y (media $r=-0,370$; $p=0,293$).

V. DISCUSIÓN

Los recién nacidos y especialmente los pretérminos son sujetos en riesgo de sufrir infecciones graves y de desarrollar complicaciones importantes, sean causadas directamente por la agresividad del germen o por la respuesta inflamatoria del huésped. Por otro lado los neonatos prematuros constituyen un modelo natural interesante para estudiar el funcionamiento del sistema inmune innato, ya que estos individuos todavía carecen, casi en su totalidad, de los mecanismos propios del sistema inmune adaptativo. Por lo tanto, generar nuevos conocimientos sobre el sistema inmunitario en estas edades extremas tiene el potencial no solamente de mejorar el manejo diagnóstico y terapéutico de estos pacientes tan vulnerables, sino también entender con mayor profundidad las características de sustancias prometedoras tales como los péptidos antimicrobianos y las lectinas en situaciones fisiológicas y también fisiopatológicas.

Los objetivos de esta tesis doctoral se han centrado en aumentar nuestros conocimientos en el área del sistema inmune innato en recién nacidos a término y prematuros. Para este fin se han realizado dos proyectos relacionados entre sí.

Niveles de HBD2 en función de su procesamiento y procedencia de las muestras

En primera estancia se recogieron muestras de sangre total, obtenidas del cordón umbilical de recién nacidos sanos, para comprobar la estabilidad en el tiempo del péptido HBD2 antes de su procesamiento. Para este fin, una vez obtenida la muestra, esta se procesó de forma secuencial en diferentes momentos. Del mismo modo también se evaluó la necesidad de añadir a las muestras en el momento de su recogida un inhibidor de proteinasa. Pues bien, no se observaron diferencias entre los momentos del procesamiento ni con el aporte de un inhibidor de proteinasa. Estos resultados demuestran la estabilidad de HBD2 en sangre completa sin necesidad de procesamiento inmediato ni de añadir un inhibidor de proteinasas. Este hallazgo es importante, novedoso y alentador, ya que facilitará la realización de estudios clínicos en un futuro.

Por otro lado, en la mayoría de estudios publicados los niveles de HBD2 se han medido en muestras de plasma [110,111], mientras que nuestros datos provienen de muestras de suero. Para valorar posibles diferencias, se compararon los valores de HBD2 medidos tanto

en la fracción plasmática como en el suero de la sangre obtenida del cordón umbilical de cuatro neonatos diferentes. El experimento demostró valores superiores en el suero, aunque sin alcanzar la significación estadística posiblemente debido al bajo número de muestras analizadas. En plasma muchos de los factores de coagulación presentes son proteasas de serina. Estas proteasas, presentes en el plasma y no en el suero, tienen capacidad de degradar péptidos con características bioquímicas similares a HBD2 [146] y por tanto es presumible que con su acción harían descender los niveles de HBD2. Aunque esto puede ser una explicación, se requieren estudios más específicos para comprobar esta hipótesis.

Proyecto 1:

Variables demográficas y clínicas, y su relación con las HBD2 en la población

Una vez comprobada la estabilidad de este péptido antimicrobiano y su comportamiento en muestras de suero, se realizó un estudio observacional y retrospectivo usando muestras recogidas en nuestro centro de neonatos prematuros y a término. Este trabajo ha sido el primero en investigar los niveles de HBD2 en suero obtenido del cordón umbilical [147]. La distribución de las variables sexo y finalización del embarazo fue significativamente diferente. El parto prematuro y la corioamnionitis fue más frecuente en los recién nacidos prematuros que en los nacidos a término. Estos datos concuerdan con la literatura existente [7,8]. Tal y como se demuestra en el apartado correspondiente de los resultados, las características mencionadas y la mayor frecuencia del sexo femenino no influyeron de manera significativa en los niveles de HBD2 .

Niveles de HBD2 en neonatos a término y adultos sanos

Los datos obtenidos en nuestro trabajo muestran por primera vez en la población neonatal valores de referencia del péptido HBD2 en el momento del nacimiento [146]. Resulta interesante que los valores hallados en nuestro estudio hayan sido más altos que los valores

publicados previamente en controles de adultos sanos [110,111]. Con el fin de determinar si estas diferencias se debían a haber empleado técnicas diferentes, se analizaron muestras de suero obtenidas de adultos jóvenes sanos en paralelo con muestras obtenidas del cordón umbilical de recién nacidos a término normales. Se observó que efectivamente los neonatos a término normales presentan valores de HBD2 más altos en el momento de nacer que los adultos sanos. Si se comparan los valores obtenidos en los adultos en nuestro estudio con los de Book *et al.* [111], observamos que seguirán mostrándose niveles de HBD2 más elevados en nuestra cohorte aún después de considerar las diferencias que pudieran deberse a la distinta medición plasma *versus* suero.

El hecho de haber hallado niveles de HBD2 más elevados en neonatos en comparación con los adultos va en el sentido contrario de lo encontrado en estudios previos. Estos trabajos comunicaron niveles de péptidos antimicrobianos (p.ej. Lactoferrina, alfa-defensinas, LL-37 etc) inferiores en la población neonatal en comparación con los hallados en adultos [68,69,85]. No se conocen los motivos que pueden explicar estas diferencias encontradas en nuestra cohorte, aunque pueden sugerirse un posible aumento de producción de HBD2 debido al estado de estrés generado en el periparto o una mayor dependencia del recién nacido en las primeras semanas de vida de esta parte del sistema inmunitario.

Niveles de HBD2 en neonatos a término y prematuros

En nuestra muestra de recién nacidos se han observado diferencias significativas de los valores de HBD2 con respecto a la edad gestacional y al peso al nacer. Los recién nacidos a término y con peso mayor de 1500 gramos presentan al nacimiento niveles de HBD2 más altos que los recién nacidos pretérminos [147]. Estas diferencias podrían ser explicadas por la propia inmadurez del sistema inmune innato en los recién nacidos pretérminos. Es posible que en parte esta inmadurez o deficiencia de la respuesta inmunitaria y especialmente de mediadores solubles tales como los HBD2, condicione el aumento de susceptibilidad de esta población frente infecciones invasivas [85,87,122].

HBD2 y susceptibilidad frente infecciones

En este trabajo hemos observado que prematuros con valores más bajos de HBD2 presentaban un mayor riesgo de sufrir una sepsis tardía [147].

Dado que nuestro estudio es el primero en analizar los valores séricos de HBD2 en la edad neonatal se desconocen los valores “normales” de HBD2 en la población de recién nacidos. No obstante, sería útil poder establecer puntos de corte para HBD2 a fin de diferenciar valores normales de aquellos patológicos que podrían ser utilizados para predecir la susceptibilidad a infecciones en la edad neonatal. Hemos realizado estos cálculos en nuestra muestra para identificar el punto de corte más adecuado que predeciría el riesgo de sepsis tardía, hallándolo este valor en 880 pg/ml, y con aceptables valores de sensibilidad y especificidad, e incluso teniendo en cuenta otro factor de riesgo importante como la edad gestacional. Aunque los resultados de este modelo fueron significativos, estos deben ser comprobados en futuros trabajos ya que el intervalo de confianza fue muy amplio debido al bajo número de individuos incluidos en el estudio.

Para la interpretación de nuestros resultados es importante recordar que el desarrollo de una sepsis tardía es un proceso multifactorial, y por lo tanto incluye una serie de variables, conocidas y no conocidas, que no han podido ser controladas por las características de nuestro estudio, ni en el diseño ni en el análisis estadístico.

No obstante nuestros resultados concuerdan con la literatura en el sentido que el déficit de componentes del sistema inmune innato aumenta el riesgo de sufrir infecciones graves [68,87-89] y que la expresión de APPs como LL-37 y HBD1-2 está aumentado en diferentes edades en un proceso infeccioso [111,122].

Hasta la fecha no hay datos sobre los mecanismos exactos de este “efecto protector” de la HBD2 frente infecciones en la edad neonatal. A nivel genético existe ya un número considerable de estudios que relacionan niveles bajos de HBD2 con ciertos polimorfismos genéticos [113,148,149]. Sin embargo sigue siendo incierto si estas alteraciones genéticas finalmente se traducen en una mayor susceptibilidad para infecciones invasivas y/o persistentes [149,150]. Hasta la fecha, no existen estudios que hayan analizado el posible impacto de los polimorfismos genéticos de las beta defensinas con el riesgo de infecciones invasivas en la edad neonatal.

HBD2 y la presencia de corioamnionitis

En nuestra muestra de pacientes hemos observado que los niveles de HBD2 en suero eran más altos en los neonatos prematuros con corioamnionitis que en los prematuros sin corioamnionitis [147]. Aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas, es de esperar que esta tendencia observada sea importante, puesto que concuerda con trabajos previos que han estudiado la respuesta inflamatoria del feto (FIRS) frente a un estímulo intenso como una corioamnionitis [151-153]. Del mismo modo se ha demostrado que estímulos inflamatorios (p.ej. corioamnionitis) inducen citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 [18,114], siendo los dos primeros inductores de la producción de APPs como la HBD2 [154].

En la población estudiada en este proyecto, la elevación de los niveles de HBD2 no alcanza significación estadística, probablemente causado por el reducido número de individuos incluidos en el estudio. Para estudiar en un futuro con mayor profundidad la cadena causal de la presencia de corioamnionitis, elevación de citoquinas inflamatorias y finalmente el aumento de las HBD2 en los recién nacidos, sería recomendable incluir las siguientes variables: estudio histopatológico de la placenta y de las membranas, los niveles de citoquinas pro y anti-inflamatorias y la determinación de los niveles de HBD2 en sangre materna, cordón umbilical y en el mismo recién nacido.

A modo de resumen de este proyecto se puede concluir:

1. El péptido HBD2 es estable al menos durante 48 horas en muestras de suero.
2. Los niveles de HBD2 medidos al nacimiento en los recién nacidos pretérminos son inferiores a los hallados en los nacidos a término.
3. Existe una asociación entre niveles bajos de HBD2, medidos al nacimiento en neonatos prematuros, y un mayor riesgo de desarrollar sepsis tardía.
4. Existe una probable relación entre corioamnionitis y niveles elevados de HBD2 medidos en el momento del nacimiento.

Los conocimientos derivados del proyecto 1 resultaron en una publicación en una revista prestigiosa de pediatría en el año 2013 [147] con dedicación de una editorial [155]. Desde entonces este artículo ha sido citado por tres diferentes grupos [68,117,156].

Con los datos obtenidos de este estudio retrospectivo se diseñó un segundo proyecto prospectivo en el que se recogieron muestras en recién nacidos pretérminos extremos en situación de estrés (sospecha de sepsis).

Proyecto 2:

Datos clínicos y demográficos

En la cohorte analizada destacan una elevada incidencia de hipertensión arterial materna y un alto porcentaje de embarazos múltiples. Estos datos se deben posiblemente a la asociación de estas condiciones clínicas con un mayor de riesgo de parto prematuro [7,8].

En aproximadamente un 15% de los recién nacidos se detectaron signos clínicos y analíticos compatibles con una infección vertical. De estos pacientes solamente dos hemocultivos fueron positivos, siendo uno de ellos posiblemente contaminado (*S. anginosus*). Esta discordancia entre sospecha y confirmación biológica en estas circunstancias son posiblemente el resultado de la práctica clínica de iniciar el tratamiento antibiótico empírico materno en caso de presencia de amniorexis precoz [157] o necesidad de cesárea no electiva [158].

La sepsis nosocomial es una de las variables respuestas de este proyecto. La presentación clínica de esta complicación clínica puede ser muy variable, siendo las manifestaciones respiratorias y la inestabilidad hemodinámica las más frecuentes en nuestra cohorte. Los gérmenes más frecuentemente aislados son los *Estafilococcus* coagulasa negativos, seguidos de los bacilos gram negativos. Estos datos coinciden con la literatura reciente [51-53]. No se ha observado ningún episodio de sepsis debido a hongos tipo *Candida albicans* en nuestra cohorte. Una de las causas para esta observación, es la instauración en nuestro centro desde el año 2010 del tratamiento profiláctico con fluconazol en recién nacidos de alto riesgo (< 1000 gramos), que ha demostrado disminuir la tasa de sepsis causadas por estos patógenos no solamente en nuestra unidad sino también en otras unidades de cuidados neonatales [159].

Regulación de HBD2 y MBL durante la sospecha de sepsis

En la situación clínica de sospecha de sepsis no se observaron en la población total diferencias significativas entre los diferentes momentos de recogida de muestras. Tal y como se detallará más adelante no se detectaron tampoco diferencias en los subgrupos de la variable de sepsis (no sepsis, sepsis clínica, sepsis confirmada). Con los datos obtenidos podemos intuir una leve disminución de los niveles de HBD2 mientras los niveles de MBL se mantienen estable durante todo el proceso. Esta disminución de HBD2 podría ser debido a una situación de alto gasto de este péptido o también ser reflejo de transfusiones de sangre o plaquetas que en muchas ocasiones forman parte del manejo médico en las situaciones de gravedad en la UCI-NN. No se han observado diferencias entre los niveles de MBL en los diferentes días de recogida. En un trabajo realizado por Dzwonek *et al.* en recién nacidos prematuros se observó un aumento de MBL a lo largo del primer mes de vida. Esta elevación fue más marcada comparando los días 1-3 con las determinaciones posteriores (7-10, 14-18, 27-30 días de vida). Sin embargo una vez alcanzado el día 7-10 no se modificaron los niveles de MBL de forma significativa [87]. El motivo de no haber detectado este aumento de MBL en los primeros días de vida en nuestro proyecto es posiblemente atribuible a la recogida “tardía” de muestras, generalmente a partir del día 7-9 de vida coincidiendo con el pico de mayor riesgo de sepsis nosocomial.

Influencia de la edad gestacional y peso al nacer en los niveles de HBD2

Analizando las variables continuas de edad gestacional con los niveles de HBD2 hallamos una correlación negativa significativa. A menor edad gestacional se detectan mayores niveles de HBD2. Como es de esperar, ya que la edad gestacional y el peso al nacer son variables que se condicionan entre ellos, se ha observado también una correlación similar (aunque menos pronunciada) para la variable peso al nacer. Esto refleja que los niveles de HBD2 están posiblemente más relacionados con la inmadurez de los individuos que con el peso. Para simplificar el análisis se realizó una transformación de las variables edad gestacional y peso al nacer en variables dicotómicas (<28 semanas *versus* ≥28 semanas,

<1000g *versus* ≥1000g). Con este procedimiento se confirmaron los resultados anteriores, detectando unas asociaciones significativas entre las variables edad gestacional, peso al nacer y los niveles de HBD2 en suero. Esta observación es muy interesante, puesto que habitualmente los niveles de mediadores solubles del sistema inmune innato y adaptativo aumentan con la edad gestacional y maduración [68,69]. Un trabajo realizado por Strunk *et al.* determinando los niveles de diferentes péptidos antimicrobianos en sangre de cordón umbilical en diferentes edades gestacionales, detectó niveles de Calprotectina más elevados en los neonatos menores de 30 semanas en comparación con los de una edad gestacional entre 30 y 33 semanas (116,9 *versus* 90,7 ng/ml). Sin embargo en este artículo los autores no discutieron este resultado posiblemente debido al reducido tamaño muestral [69].

Es importante recordar que encontramos estas diferencias comparando las medidas en las tres determinaciones de HBD2 (día 0, 4 y 7) lo cual aumenta la consistencia de nuestros resultados. El hecho de haber detectado niveles más elevados de HBD2 en los neonatos más inmaduros nos permite formular la hipótesis que estos péptidos pueden tener una mayor importancia en estas edades extremas. Si su función es solamente antimicrobiana o relacionado con sus actividades inmunomoduladores debería ser objetivo de futuros estudios.

En cierto modo estos resultados del proyecto 2 pueden parecer contradictorios con los datos obtenidos en el proyecto 1, donde se hallaron valores de HBD2 más bajos en los recién nacidos pretérminos en comparación con neonatos a término. En este sentido parece importante destacar dos diferencias en el diseño de ambos proyectos. Mientras que en el proyecto 1 se determinaron los niveles de HBD2 en el momento de nacimiento, en el proyecto 2 estas determinaciones se realizaron habitualmente a partir de la primera semana de vida y en el contexto de sospecha de un proceso infeccioso. Por otra parte en el proyecto 2 se compararon los niveles de HBD2 dentro del propio grupo de recién nacidos prematuros. Estas diferencias entre ambos proyectos pueden ser importantes y servir al menos en parte como explicación de los resultados comentados.

Influencia de la edad gestacional y peso al nacer en los niveles de MBL

En cambio no se observaron correlaciones significativas entre las variables de edad gestacional y peso al nacer con la variable MBL en suero. La relación de los niveles de MBL con la edad gestacional sigue siendo un debate continuo. Varios trabajos han mostrado un aumento de los niveles de MBL en función de la edad gestacional [160,161].

Sin embargo algunos trabajos recientes, realizados a nivel poblacional en Polonia, mostraron resultados similares a las obtenidas en nuestra población [143,162]. En este contexto es importante recordar que en nuestro estudio solamente se analizaron muestras obtenidas de recién nacidos prematuros en una situación clínica muy concreta y con recogida de las muestras habitualmente entre los días 7-28 días de vida, lo cual limita su extrapolación a otras circunstancias. Del mismo modo se han demostrado diferencias geográficas para los niveles de MBL debido a la distribución genotípica [163]. Nuestro estudio es el primero realizado en la edad neonatal en España. Por lo tanto, para evaluar los datos obtenidos en nuestra cohorte en el contexto adecuado y facilitar así su interpretación, serán necesarios estudios poblacionales en la península ibérica y en diferentes circunstancias clínicas.

Correlación entre los niveles de HBD2 y recuento de neutrófilos en la población general

Se detectó una correlación positiva entre los niveles de HBD2 y el recuento de neutrófilos. Similar a lo previamente comentado, estas correlaciones se demostraron analizando las medias de los valores obtenidos en los días 0, 4 y 7, aumentando de esta manera la fortaleza de esta correlación. Las HBD2 son producidas principalmente en células epiteliales y su impacto en patologías dermatológicas, respiratorias, oftalmológicas y gastrointestinales están bien descritos [101,102]. Solamente unos pocos trabajos previos han analizado los valores de HBD2 en muestras de sangre, y hasta la fecha ninguno ha evaluado las posibles relaciones entre los niveles de HBD2 y el número de neutrófilos. Para interpretar esta correlación positiva se ofrecen varias explicaciones. Por un lado es posible que los HBD2 sean producidas en los neutrófilos. Algunos trabajos previos han demostrado la presencia de este péptido antimicrobiano en el interior de células como monocitos, macrófagos y

células dendríticas [101,102,105]. Otra hipótesis sería que el número de neutrófilos en sangre periférica y los niveles de HBD2 en suero son el resultado de estímulos inflamatorios comunes. En este sentido varios trabajos han demostrado que la síntesis de HBD2 es inducida por bacterias o por sus productos (lipopolisacáridos) y por citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β [114,115]. Estas mismas sustancias a nivel sistémico inducen también una respuesta inflamatoria general con un aumento de los niveles de neutrófilos en sangre [164,165]. La HBD2 y HBD3 han demostrado interactuar con el CCR2, un receptor de quimioquinas con expresión en macrófagos, monocitos y también neutrófilos, resultando en un efecto de atracción química (*chemoattractant*) [166,167] para estas células.

También es interesante mencionar que la HBD3, que comparte características funcionales con la HBD2, ha demostrado inducir la expresión de la quimioquina CXCR2 que es una de las moléculas claves para el paso de los neutrófilos de la medula ósea a la periferia. Aunque en este mismo trabajo se analizaron también los efectos de otros péptidos antimicrobianos, no se analizó el papel de las HBD2 [168].

Correlación entre los niveles de HBD2 y los valores de la proteína C reactiva

No se hallaron asociaciones significativas entre el péptido HBD2 y PCR en las muestras extraídas. Este dato es importante ya que indica que la HBD2 responde a estímulos de una manera diferente a como lo hace este reactante de fase aguda. Muchos trabajos han estudiado el valor de la proteína C reactiva para el diagnóstico de complicaciones infecciosas en la edad neonatal [169-171]. Para analizar si este comportamiento se debe a la presencia de patógenos o situaciones clínicas compatibles con sepsis se analizaron los diferentes estratos de la variables "sepsis" tal y como se describe en el apartado correspondiente más adelante.

Correlación entre los niveles de MBL, recuento de neutrófilos y los valores de la proteína C reactiva

En nuestra cohorte no se observaron relaciones entre estas variables. Las explicaciones para esta ausencia de asociación pueden ser diferencias a nivel de los genotipos que pueden facilitar o inhibir la regulación de la producción de MBL durante procesos inflamatorios [134,136]. El hecho de no disponer de datos sobre la presencia de los genotipos ni de su distribución en nuestra cohorte, representa una debilidad de nuestro estudio e imposibilita evaluar la influencia del genotipo sobre los resultados o la estratificación según los genotipos.

Estratificación de la cohorte según las variables: sepsis y hemocultivos

Para evaluar el efecto de la edad gestacional y el peso al nacer sobre el riesgo de presentar una sepsis nosocomial se analizaron los tres subgrupos sin hallar diferencias significativas. La inmadurez y el bajo peso son factores de riesgo conocidos para sufrir complicaciones infecciosas graves en la edad neonatal [39]. El hecho de no haber encontrado estas diferencias en nuestra cohorte, se debe posiblemente a las características de la misma con una muy baja variabilidad de la variable edad gestacional, distribuyéndose la mayoría de los recién nacidos en el rango de 28-32 semanas. Para la homogeneidad de la cohorte en esta variable el número de pacientes no era suficiente para detectar diferencias significativas.

Niveles de HBD2 en relación con la edad gestacional y el peso al nacer en los estratos de la variable sepsis

Para profundizar en el análisis de las variables HBD2 en función de las variables edad gestacional, peso al nacer y los datos provenientes de las analíticas (neutrófilos y proteína C reactiva) se realizó la estratificación de la cohorte en función de la clasificación de la variable sepsis en las tres categorías: no signos de sepsis, sepsis clínica y sepsis confirmada.

A diferencia de la cohorte general no se encontraron asociaciones significativas entre las variables analizadas en estrato de “neonatos sin signos de sepsis”.

Sin embargo para los estratos de “sepsis clínica” y “sepsis confirmada” se observaron asociaciones significativas para las parejas de variables HBD2 *versus* edad gestacional y HBD2 *versus* peso al nacer, siendo esta asociación más significativa en el estrato de “sepsis confirmada”. Una posible lectura de esta observación es que el péptido HBD2 es el mecanismo de defensa fundamental en los neonatos más inmaduros ante un proceso infeccioso, mientras que en neonatos con mayor edad gestacional y peso al nacer otras partes del sistema inmunitario innato, sean mediadores solubles o de predominio celular como por ejemplo receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors*), ganan en importancia y potencialmente sustituyen a la HBD2. Tal y como previamente ha sido comentado, no se han descrito niveles solubles del sistema inmune innato más elevados en los recién nacidos más inmaduros durante procesos infecciosos lo cual aumenta el impacto de esta observación [68]. Naturalmente son necesarios estudios con mayor tamaño muestral y con el objetivo concreto de describir esta asociación para confirmar nuestros resultados.

Niveles de MBL en relación con la edad gestacional y el peso al nacer en los estratos de la variable sepsis

Al igual que en el análisis de la cohorte completa, no se encontraron correlaciones o asociaciones significativas para la variable MBL con la edad gestacional y el peso al nacer para los tres diferentes estratos de la sepsis. Tal y como ha sido comentado previamente, sigue siendo objeto de debate si existen asociaciones entre los niveles de MBL y estas dos variables demográficas [161,162]. Los datos de esta tesis no apoyan la hipótesis de que exista tal relación, teniendo en cuenta las características específicas de nuestra cohorte (prematuridad extrema, recogida de muestras en entre el 7-14 días de vida, estado crítico del paciente en el momento de la extracción de la muestra, población española) y las limitaciones del análisis al no disponer de genotipaje [137]. El análisis por estratos de sepsis nos permite postular que la presencia de sepsis clínica o sepsis confirmada no modifica de manera significativa los resultados observados en la cohorte general, lo cual reduce la posibilidad que la ausencia de asociación entre niveles de MBL y edad gestacional y peso al nacer este relacionada con los diferentes estratos de la variable sepsis.

Correlación entre los niveles de HBD2, recuento de neutrófilos y los valores de la proteína C reactiva en los estratos de la variable sepsis y hemocultivos

Se ha encontrado una correlación positiva para el estrato de sepsis clínica entre los niveles del péptido HBD2 y el recuento de neutrófilos. Sin embargo no se confirmaron estos resultados para el estrato de la sepsis confirmada. Posibles explicaciones para estas diferencias en ambos estratos pueden ser el diferente grado de gravedad de los pacientes. Es un hecho conocido que estados de sepsis en la edad neonatal no solamente cursan con neutrofilia, sino también con neutropenia debido al gasto de estas células durante procesos infecciosos graves, lo que afectaría a la relación entre HBD2 y neutrófilos [77,78]. Debido al bajo número de pacientes, no fue posible comparar los niveles de HBD2 en pacientes con proceso séptico y neutrofilia con aquellos pacientes con sepsis y leucopenia. Por otro lado, también es posible que la asociación entre los niveles de HBD2 y recuento de neutrófilos se mantenga sobre todo en condiciones fisiológicas o al menos no relacionados con procesos infecciosos. Esta hipótesis esta avalada con el análisis de la correlación para el estrato de “hemocultivo negativo” mostrando una correlación para las variables HBD2 y neutrófilos. Aunque la practica ausencia de trabajos en este campo dificulta la interpretación concluyente de estos datos, las diferencias encontradas en los estratos analizados aumentan nuestros conocimientos sobre este péptido antimicrobiano en los prematuros extremos.

Para estudiar el comportamiento del péptido HDB2 en relación con la PCR durante procesos infecciosos, se analizaron sus posibles correlaciones en los diferentes estratos de sepsis. Como previamente ha sido mencionado la PCR es un reactante de fase aguda que se eleva en el contexto de infecciones invasivas también en la edad neonatal [169-171]. En ninguno de estos subgrupos se encontraron asociaciones significativas para los niveles de HBD2 y PCR, indicando que los niveles de HBD2 no son regulados de la misma manera como la PCR durante procesos infecciosos en la edad neonatal. Es importante recordar que ante un proceso infeccioso la PCR es menos específica y presenta un ascenso más tardío que otros reactantes de fase aguda, como por ejemplo la procalcitonina [172]. Sería interesante

evaluar por qué la HBD2 y la PCR, ambas posiblemente relacionadas con procesos infecciosos, se comportan de una manera tan diferente en los recién nacidos prematuros extremos. En este contexto los resultados de un trabajo realizado *in vitro* utilizando células del tracto respiratorio pueden servir de explicación para las discordancias encontradas en nuestra cohorte. Se trata del único trabajo que analiza estas tres citoquinas en relación con HBD2, y concluye que TNF- α e IL-1 β pero no la IL-6 induce la producción de HBD2 [114]. Un posible enfoque para futuros proyectos, que aumentaría nuestros conocimientos acerca de este péptido antimicrobiano y de su regulación, podría ser estudiar, de forma simultánea en estos escenarios los niveles de citoquinas inductoras de HBD2 (p.ej. TNF- α e IL-1 β) y del inductor principal de la PCR (IL-6).

Correlación entre los niveles de MBL, recuento de neutrófilos y los valores de la proteína C reactiva en los estratos de la variable sepsis y hemocultivos

El análisis de correlaciones de la MBL con el recuento de neutrófilos y PCR en los diferentes estratos no mostró asociaciones significativas. Tal como previamente ha sido comentado, el impacto de las diferencias genotípicas sobre los niveles intra e interindividuales pueden haber contribuido a la ausencia de asociación entre las variables analizadas [134,136]. Sería recomendable para futuros estudios incluir la determinación secuencial de los niveles de MBL durante un proceso infeccioso y/o inflamatorio, además de la determinación y clasificación de los individuos según genotipo MBL2, para de esta manera caracterizar las propiedades de esta molécula en los prematuros extremos.

En resumen este segundo proyecto proporciona datos novedosos sobre el sistema inmune innato en los recién nacidos prematuros. Al parecer los niveles de HBD2 y de MBL permanecen estables durante la segunda y cuarta semana de vida independiente de la presencia o no de un estímulo infeccioso. Existe una correlación negativa entre los niveles de HBD2 y la edad gestacional indicando un papel importante de este péptido antimicrobiano en los recién nacidos más inmaduros. El hecho de haber encontrado esta asociación en los estratos de sepsis (clínica y confirmada) pero no para aquellos neonatos sin datos de sepsis, hace pensar que este papel puede estar relacionado con procesos infecciosos. En este contexto es importante recordar las correlaciones positivas halladas

DISCUSIÓN

entre los niveles de HBD2 y el recuento de neutrófilos y la ausencia de esta correlación al analizar la pareja de variables cuantitativas HBD2 y PCR. Estos datos podrían ser punto de partida para estudios dirigidos a identificar cuales son los estímulos y las sustancias que aumentan y/o mantienen los niveles de HBD2 y neutrófilos de forma simultánea sin influir en los niveles de PCR. En cambio no se han observado tales asociaciones para la MBL en nuestra población. La presencia de polimorfismos genéticos afectando de forma considerable los niveles de MBL pueden haber contribuido a esta observación.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El péptido humano β defensina 2 (HBD2) es medible en el suero derivado de la sangre de cordón umbilical.
2. El péptido HBD2 es estable al menos durante 48 horas en muestras de suero.
3. Los recién nacidos presentan niveles más elevados de HBD2 en el suero que los adultos sanos.
4. Se describe una asociación entre niveles bajos del péptido HBD2 al nacimiento y riesgo de sufrir una sepsis nosocomial.
5. En el recién nacido prematuro extremo los niveles del péptido HBD2 se correlacionan de manera negativa con la edad gestacional.
6. En el contexto de sepsis clínica en el recién nacido prematuro extremo, los niveles del péptido HBD2 se correlacionan con el recuento de neutrófilos pero no con los valores de la proteína C reactiva.
7. En el recién nacido prematuro extremo los niveles de la lectina ligada a la manosa no se asocian con la edad gestacional, el riesgo de sufrir una sepsis nosocomial, el recuento de neutrófilos o los valores de la proteína C reactiva.

CONCLUSIONS

1. The human β defensin 2 peptides were stable for at least 48 hours in serum samples.
2. The HBD2 peptides were detectable in serum samples derived from human cord blood.
3. Newborns showed higher HBD2 levels in serum compared to healthy adult volunteers.
4. Low HBD2 levels in preterm neonates were associated with an increased risk of late-onset sepsis.
5. HBD2 levels were negatively correlated with the gestational age in extreme preterm neonates.
6. During clinical sepsis episodes HBD2 levels were positively correlated with the neutrophil count but not with C-reactive protein levels in extreme preterm neonates.
7. In our cohort, mannose binding lectin levels were not associated with the variables gestacional age, risk to develop nosocomial sepsis, neutrophil counts and C-reactive protein concentrations.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. **WHO.** WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1977; 56: 247–53.
2. **Goldenberg RL,** Gravett MG, Iams J, et al. The preterm birth syndrome: issues to consider in creating a classification system. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206: 113–18.
3. **Lawn JE,** Blencowe H, Pattinson R, et al. Stillbirths: Where? When? Why? How to make the data count? *Lancet* 2011; 377: 1448–63.
4. **Rajaratnam JK,** Marcus JR, Flaxman AD, et al: Neonatal, postneonatal, childhood, and under-5 mortality for 187 countries, 1970-2010: a systematic analysis of progress towards millennium development goal 4. *Lancet.* 2010; 375:1988-2008.
5. **Lawn JE,** Blencowe H, Oza S, You D, Lee AC, Waiswa P, Lalli M, Bhutta Z, Barros AJ, Christian P, Mathers C, Cousens SN; Lancet Every Newborn Study Group. Every Newborn: progress, priorities, and potential beyond survival. *Lancet.* 2014; 384:189-205.
6. **Blencowe H,** Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Vera Garcia C, Rohde S, Say L, Lawn JE. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet.* 2012; 379:2162-72.
7. **Goldenberg RL,** Culhane JF, Lams JD, et al: Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008; 371:75-84.
8. **Henderson JJ,** McWilliam OA, Newnham JP, Pennell CE. Preterm birth aetiology 2004-2008. Maternal factors associated with three phenotypes: spontaneous preterm labour, preterm pre-labour rupture of membranes and medically indicated preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012; 25:642-7.
9. **Agarwal V,** Hirsch E. Intrauterine infection and preterm labor. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012; 17:12-9.
10. **McElrath TF,** Hecht JL, Dammann O, et al. Pregnancy disorders that lead to delivery before the 28th week of gestation: an epidemiologic approach to classification. *Am J Epidemiol.* 2008; 168:980-9.
11. **Mendz GL,** Kaakoush NO, Quinlivan JA. Bacterial aetiological agents of intra-amniotic infections and preterm birth in pregnant women. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 3(58):1-7.
12. **Cunnington M,** Kortsalioudaki C, Heath P. Genitourinary pathogens and preterm birth. *Curr Opin Infect Dis.* 2013; 26:219-30.
13. **Martinez-Lopez DG,** Funderburg NT, Cerissi A, et al. Lipopolysaccharide and soluble CD14 in cord blood plasma are associated with prematurity and chorioamnionitis. *Pediatr Res.* 2014; 75:67-74.
14. **Goldenberg RL,** Culhane JF, Johnson DC. Maternal infection and adverse fetal and neonatal outcomes. *Clin Perinatol* 2005; 32: 523–59.
15. **Cotch MF,** Pastorek JG 2nd, Nugent RP, et al. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *Sex Transm Dis* 1997; 24: 353–60.
16. **Sweet RL,** Landers DL, Walker C, et al. Chlamydia trachomatis infection and pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 824–33.
17. **Goldenberg RL,** Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000.

BIBLIOGRAFÍA

- 342: 1500–07.
18. **Gotsch F**, Romero R, Kusanovic JP, et al. The fetal inflammatory response syndrome. *Clin Obstet Gynecol.* 2007; 50:652-83.
 19. **Delgado AV**, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides.* 2003; 37:355-61.
 20. **Muñoz M**, Pavón A, Rosso M, Salinas MV, Pérez A, Carranza A, González-Ortega A. Immunolocalization of NK-1 Receptor and Substance P in Human Normal Placenta. *Placenta* 2010; 31:649-651.
 21. **Burd I**, Balakrishnan B, Kannan S. Models of fetal brain injury, intrauterine inflammation, and preterm birth. *Am J Reprod Immunol.* 2012; 67:287-94.
 22. **Wu YW**, Escobar GJ, Grether JK, et al. Chorioamnionitis and cerebral palsy in term and near-term infants. *JAMA.* 2003; 290:2677-84.
 23. **Liu L**, Johnson H, Cousens S, et al, for the Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 2012; 379: 2151–61.
 24. **Moster D**, Lie RT, Markestad T. Long-term medical and social consequences of preterm birth. *N Engl J Med* 2008; 359: 262–73
 25. **Peters KL**, Rosychuk RJ, Hendson L, et al. Improvement of short- and long-term outcomes for very low birth weight infants: Edmonton NIDCAP trial. *Pediatrics.* 2009; 124:1009-20.
 26. **Tommiska V**, Tuominen R, Fellman V, et al. Economic costs of care in extremely low birthweight infants during the first 2 years of life. *Pediatr Crit Care Med.* 2003; 4:157-63.
 27. **Clements KM**, Barfield WD, Ayadi MF, et al. Preterm birth-associated cost of early intervention services: an analysis by gestational age. *Pediatrics.* 2007; 119:e866-74.
 28. **Leviton A**, Fichorova RN, O'Shea TM, et al. Two-hit model of brain damage in the very preterm newborn: small for gestational age and postnatal systemic inflammation. *Pediatr Res.* 2013; 73:362-70.
 29. **Parikh NA**, Lasky RE, Kennedy KA, et al. Perinatal factors and regional brain volume abnormalities at term in a cohort of extremely low birth weight infants. *PLoS One.* 2013; 8:e62804.
 30. **Potharst ES**, van Wassenaer AG, Houtzager BA, et al. High incidence of multi-domain disabilities in very preterm children at five years of age. *J Pediatr.* 2011; 159:79-85.
 31. **de Jong M**, Verhoeven M, van Baar AL. School outcome, cognitive functioning, and behaviour problems in moderate and late preterm children and adults: a review. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012; 17:163-9.
 32. **Farooqi A**, Hägglöf B, Sedin G, et al. Impact at age 11 years of major neonatal morbidities in children born extremely preterm. *Pediatrics.* 2011; 127:e1247-57.
 33. **Moro M**, Pérez-Rodríguez J, Figueras-Aloy J, et al. Predischarge morbidities in extremely and very low-birth-weight infants in Spanish neonatal units. *Am J Perinatol.* 2009; 26:335-43.
 34. **Wynn JL**, Wong HR, Shanley TP, Bizzarro MJ, Saiman L, Polin RA. Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. *Pediatr Crit Care Med.* 2014;15:523-8.
 35. **Qazi SA**, Stoll BJ. Neonatal sepsis: a major global public health challenge. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28:S1-

- 2.
36. **Shane AL**, Stoll BJ. Neonatal sepsis: progress towards improved outcomes. *Journal of Infection* 2014; 68, S24-S32.
 37. **Hornik CP**, Fort P, Clark RH, et al. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev*, 2012;88 S2:S69-74.
 38. **Makhoul IR**, Sujov P, Smolkin T, Lusky A, Reichman B, Pathogen-specific early mortality in very low birth weight infants with late-onset sepsis: a national survey. *Clin Infect Dis*. 2005; 40:218-24.
 39. **Weston EJ**, Pondo T, Lewis MM, Martell-Cleary P, Morin C, Jewell B, Daily P, Apostol M, Petit S, Farley M, Lynfield R, Reingold A, Hansen NI, Stoll BJ, Shane AL, Zell E, Schrag SJ. The burden of invasive early-onset neonatal sepsis in the United States, 2005–2008. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30:937-41.
 40. **Smith PB**, Morgan J, Benjamin JD, Fridkin SK, Sanza LT, Harrison LH, Sofair AN, Huie-White S, Benjamin DK J. Excess costs of hospital care associated with neonatal candidemia. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26:197–200.
 41. **Stoll BJ**, Hansen NI, Sanchez PJ, et al. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics* 2011;127:817–26.
 42. **Bartels DB**, Schwab F, Geffers C, Poets CF, Gastmeier P. Nosocomial infection in small for gestational age newborns with birth weight <1500 g: a multicentre analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2007; 92:449–453.
 43. **Bizzarro MJ**, Gallagher PG. Antibiotic-resistant organisms in the neonatal intensive care unit. *Semin Perinatol*. 2007; 31:26–32.
 44. **Ligi I**, Arnaud F, Jouve E, Tardieu S, Sambuc R, Simeoni U. Iatrogenic events in admitted neonates: a prospective cohort study. *Lancet*. 2008; 371:404-410.
 45. **Clark R**, Powers R, White R, Bloom B, Sanchez P, Benjamin DK Jr. Nosocomial infection in the NICU: a medical complication or unavoidable problem? *J Perinatol*. 2004; 24:382–3887.
 46. **Payne NR**, Carpenter JH, Badger GJ, Horbar JD, Rogowski J. Marginal increase in cost and excess length of stay associated with nosocomial bloodstream infections in surviving very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2004; 114:348-55.
 47. **Mireya UA**, Martí PO, Xavier KV, Cristina LO, Miguel MM, Magda CM. Nosocomial infections in paediatric and neonatal intensive care units. *J Infect*. 2007; 54:212–2208.
 48. **Aziz K**, McMillan DD, Andrews W, Pendray M, Qiu Z, Karuri S, Lee SK; Canadian Neonatal Network. Variations in rates of nosocomial infection among Canadian neonatal intensive care units may be practice-related. *BMC Pediatr*. 2005; 5:22.
 49. **Wirtschafter DD**, Powers RJ, Pettit JS, Lee HC, Boscardin WJ, Ahmad Subeh M, Gould JB. Nosocomial infection reduction in VLBW infants with a statewide quality-improvement model. *Pediatrics*. 2011; 127:419-26.
 50. **López Sastre JB**, Pérez Solís D. [Definitions of neonatal sepsis: a long way to go]. *An Pediatr*. 2006; 65:525-8.
 51. **Stoll BJ**, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK.

BIBLIOGRAFÍA

- Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med.* 2002; 347:240-7.
52. **Marchant EA**, Boyce GK, Sadarangani M, Lavoie PM. Neonatal sepsis due to coagulase-negative staphylococci. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:586076.
 53. **Dong Y**, Speer CP. Late-onset neonatal sepsis: recent developments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2014 Nov 25. pii: fetalneonatal-2014-306213.
 54. **Adams-Chapman I**. Long-term impact of infection on the preterm neonate. *Semin Perinatol.* 2012;36:462-70.
 55. **Strunk T**, Inder T, Wang X, Burgner D, Mallard C, Levy O. Infection-induced inflammation and cerebral injury in preterm infants. *Lancet Infect Dis.* 2014; 14:751-62.
 56. **Glass HC**, Bonifacio SL, Chau V, Glidden D, Poskitt K, Barkovich AJ, Ferriero DM, Miller SP. Recurrent postnatal infections are associated with progressive white matter injury in premature infants. *Pediatrics.* 2008; 122:299-305.
 57. **Schlapbach LJ**, Aebischer M, Adams M, Natalucci G, Bonhoeffer J, Latzin P, Nelle M, Bucher HU, Latal B; Swiss Neonatal Network and Follow-Up Group. Impact of sepsis on neurodevelopmental outcome in a Swiss National Cohort of extremely premature infants. *Pediatrics.* 2011; 128:e348-57.
 58. **van der Ree M**, Tanis JC, Van Braeckel KN, Bos AF, Roze E. Functional impairments at school age of preterm born children with late-onset sepsis. *Early Hum Dev.* 2011; 87:821-6.
 59. **Lutsar I**, Chazallon C, Carducci FI, Trafojer U, Abdelkader B, de Cabre VM, Esposito S, Giaquinto C, Heath PT, Ilmoja ML, Katragkou A, Lascoux C, Metsvaht T, Mitsiakos G, Netzer E, Pagni L, Roilides E, Saidi Y, Sarafidis K, Sharland M, Usonis V, Aboulker JP; NeoMero Consortium. Current management of late onset neonatal bacterial sepsis in five European countries. *Eur J Pediatr.* 2014; 173:997-1004.
 60. **Camacho-Gonzalez A**, Spearman PW, Stoll BJ. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60:367-89.
 61. **Srinivasan L**, Harris MC. New technologies for the rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Curr Opin Pediatr.* 2012; 24:165-71.
 62. **Buhimschi CS**, Bhandari V, Han YW, Dulay AT, Baumbusch MA, Madri JA, Buhimschi IA. Using proteomics in perinatal and neonatal sepsis: hopes and challenges for the future. *Curr Opin Infect Dis.* 2009; 22:235-43.
 63. **Medzhitov R**, Janeway CA Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* 2002; 296(5566):298-300.
 64. **Dowling DJ**, Levy O. Ontogeny of early life immunity. *Trends Immunol.* 2014; 35:299-310.
 65. **Adkins B**. Heterogeneity in the CD4 T Cell Compartment and the Variability of Neonatal Immune Responsiveness. *Curr Immunol Rev.* 2007; 3:151-159.
 66. **Adkins B**, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4:553-64
 67. **Baker CJ**, Carey VJ, Rench MA, Edwards MS, Hillier SL, Kasper DL, Platt R. Maternal antibody at delivery protects neonates from early onset group B streptococcal disease. *J Infect Dis.* 2014; 209:781-8.

BIBLIOGRAFÍA

68. **Pettengill MA**, van Haren SD, Levy O. Soluble mediators regulating immunity in early life. *Front Immunol.* 2014; 5:457.
69. **Strunk T**, Doherty D, Richmond P, Simmer K, Charles A, Levy O, Liyanage K, Smith T, Currie A, Burgner D. Reduced levels of antimicrobial proteins and peptides in human cord blood plasma. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2009; 94:F230-1.
70. **Levy O**. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:379-90
71. **Janeway CA Jr**, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:197-216.
72. **Akira S**, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; 124:783-801.
73. **Cuenca AG**, Wynn JL, Moldawer LL, Levy O. Role of innate immunity in neonatal infection. *Am J Perinatol.* 2013; 30:105-12.
74. **Gasteiger G**, Rudensky AY. Interactions between innate and adaptive lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14:631-9.
75. **Levy O**, Wynn JL. A prime time for trained immunity: innate immune memory in newborns and infants. *Neonatology.* 2014; 105:136-41.
76. **Kenzel S**, Henneke P. The innate immune system and its relevance to neonatal sepsis. *Curr Opin Infect Dis.* 2006; 19:264-70.
77. **Maheshwari A**. Neutropenia in the newborn. *Curr Opin Hematol.* 2014;21:43-9.
78. **Cuenca AG**, Cuenca AL, Gentile LF, Efron PA, Islam S, Moldawer LL, Kays DW, Larson SD. Delayed emergency myelopoiesis following polymicrobial sepsis in neonates. *Innate Immun.* 2014. pii: 1753425914542445.
79. **Björkqvist M**, Jurstrand M, Bodin L, Fredlund H, Schollin J. Defective neutrophil oxidative burst in preterm newborns on exposure to coagulase-negative staphylococci. *Pediatr Res.* 2004; 55:966-71
80. **Prosser A**, Hibbert J, Strunk T, Kok CH, Simmer K, Richmond P, Burgner D, Currie A. Phagocytosis of neonatal pathogens by peripheral blood neutrophils and monocytes from newborn preterm and term infants. *Pediatr Res.* 2013; 74:503-10.
81. **Jones CA**, Holloway JA, Warner JO. Phenotype of fetal monocytes and B lymphocytes during the third trimester of pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2002; 56:45-60
82. **Belnoue E**, Fontannaz P, Rochat AF, Tougne C, Bergthaler A, Lambert PH, Pinschewer DD, Siegrist CA. Functional limitations of plasmacytoid dendritic cells limit type I interferon, T cell responses and virus control in early life. *PLoS One.* 2013; 8:e85302.
83. **Förster-Waldl E**, Sadeghi K, Tamandl D, Gerhold B, Hallwirth U, Rohrmeister K, Hayde M, Prusa AR, Herkner K, Boltz-Nitulescu G, Pollak A, Spittler A. Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging. *Pediatr Res.* 2005; 58:121-4.
84. **Glaser K**, Speer CP. Toll-like receptor signaling in neonatal sepsis and inflammation: a matter of orchestration and conditioning. *Expert Rev Clin Immunol.* 2013; 9:1239-52
85. **Wynn JL**, Levy O. Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol.* 2010; 37:307-37.

BIBLIOGRAFÍA

86. **McGreal EP**, Hearne K, Spiller OB. Off to a slow start: under-development of the complement system in term newborns is more substantial following premature birth. *Immunobiology*. 2012; 217:176-86.
87. **Dzwonek AB**, Neth OW, Thiébaud R, Gulczynska E, Chilton M, Hellwig T, Bajaj-Elliott M, Hawdon J, Klein NJ. The role of mannose-binding lectin in susceptibility to infection in preterm neonates. *Pediatr Res*. 2008; 63:680-5.
88. **Israëls J**, Frakking FN, Kremer LC, Offringa M, Kuijpers TW, van de Wetering MD. Mannose-binding lectin and infection risk in newborns: a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2010; 95:F452-61.
89. **Frakking FN**, Brouwer N, Zweers D, Merkus MP, Kuijpers TW, Offringa M, Dolman KM. High prevalence of mannose-binding lectin (MBL) deficiency in premature neonates. *Clin Exp Immunol*. 2006; 145:5-12.
90. **Tissières P**, Ochoda A, Dunn-Siegrist I, Drifte G, Morales M, Pfister R, Berner M, Pugin J. Innate immune deficiency of extremely premature neonates can be reversed by interferon- γ . *PLoS One*. 2012; 7:e32863.
91. **Saito S**, Kato Y, Maruyama M, Ichijo M. A study of interferon-gamma and interleukin-2 production in premature neonates and neonates with intra uterine growth retardation. *Am J Reprod Immunol*. 1992; 27:63-8.
92. **Kollmann TR**, Levy O, Montgomery RR, Goriely S. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity*. 2012; 37:771-83.
93. **Kai-Larsen Y**, Gudmundsson GH, Agerberth B. A review of the innate immune defence of the human foetus and newborn, with the emphasis on antimicrobial peptides. *Acta Paediatr*. 2014; 103:1000-8
94. **Iliodromiti Z**, Anastasiadis A, Varras M, Pappa KI, Siristatidis C, Bakoulas V, Mastorakos G, Vrachnis N. Monocyte function in the fetus and the preterm neonate: immaturity combined with functional impairment. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:753752.
95. **Hostetter MK**. What we don't see. *N Engl J Med*. 2012;366:1328-34 .
96. **Lehrer RI**, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol*. 1999; 11:23-7.
97. **Choi KY**, Chow LN, Mookherjee N J Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation. *Innate Immun*. 2012; 4:361-70.
98. **Legrand D**. Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes. *Biochem Cell Biol*. 2012; 90:252-68.
99. **Balakrishnan A**, Marathe SA, Joglekar M, Chakravorty D. Bactericidal/permeability increasing protein: a multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization. *Innate Immun*. 2013; 19:339-47.
100. **Wong JH**, Ye XJ, Ng TB. Cathelicidins: peptides with antimicrobial, immunomodulatory, anti-inflammatory, angiogenic, anticancer and procancer activities. *Curr Protein Pept Sci*. 2013; 14:504-14.
101. **Underwood MA**, Bevins CL. Defensin-barbed innate immunity: clinical associations in the pediatric population. *Pediatrics*. 2010; 125:1237-47.
102. **Ganz T**. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3:710-20.
103. **Krishnakumari V**, Rangaraj N, Nagaraj R. Antifungal activities of human beta-defensins HBD-1 to HBD-3 and their C-terminal analogs Phd1 to Phd3. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53:256-60.
104. **Doss M**, White MR, Teclé T, Hartshorn KL. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J Leukoc Biol*.

- 2010; 87:79-92.
105. **Duits LA**, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology*. 2002; 106:517-25.
106. **Lehrer RI**, Cole AM, Selsted ME. θ -Defensins: cyclic peptides with endless potential. *J Biol Chem*. 2012; 287:27014-9.
107. **Lehrer RI**. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2:727-38.
108. **Yang D**, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 1999;286:525-8.
109. **Hazlett L**, Wu M. Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res*. 2011; 343:175-88.
110. **Hiratsuka T**, Mukae H, Iiboshi H, Ashitani J, Nabeshima K, Minematsu T, Chino N, Ihi T, Kohno S, Nakazato M. Increased concentrations of human beta-defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis. *Thorax*. 2003; 58:425-30.
111. **Book M**, Chen Q, Lehmann LE, Klaschik S, Weber S, Schewe JC, Luepertz M, Hoeft A, Stuber F. Inducibility of the endogenous antibiotic peptide beta-defensin 2 is impaired in patients with severe sepsis. *Crit Care*. 2007; 11:R19.
112. **Hollox EJ**, Barber JC, Brookes AJ, Armour JA. Defensins and the dynamic genome: what we can learn from structural variation at human chromosome band 8p23.1. *Genome Res*. 2008; 18:1686-97.
113. **Abu Bakar S**, Hollox EJ, Armour JA. Allelic recombination between distinct genomic locations generates copy number diversity in human beta-defensins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:853-8.
114. **Harder J**, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, Schröder JM. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 22:714-21.
115. **Joly S**, Organ CC, Johnson GK, McCray PB Jr, Guthmiller JM. Correlation between beta-defensin expression and induction profiles in gingival keratinocytes. *Mol Immunol*. 2005; 42:1073-84.
116. **Scharf S**, Zahlten J, Szymanski K, Hippenstiel S, Suttrop N, N'Guessan PD. *Streptococcus pneumoniae* induces human β -defensin-2 and -3 in human lung epithelium. *Exp Lung Res*. 2012; 38:100-10.
117. **Boldenow E**, Hogan KA, Chames MC, Aronoff DM, Xi C, Loch-Caruso R. Role of cytokine signaling in group B streptococcus-stimulated expression of human Beta defensin-2 in human extraplacental membranes. *Am J Reprod Immunol*. 2015; 73:263-72.
118. **Routsias JG**, Karagounis P, Parvulesku G, Legakis NJ, Tsakris A. In vitro bactericidal activity of human beta-defensin 2 against nosocomial strains. *Peptides*. 2010; 31:1654-60.
119. **Thomas NJ**, Carcillo JA, Doughty LA, Sasser H, Heine RP. Plasma concentrations of defensins and lactoferrin in children with severe sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2002; 21:34-8.
120. **Starner TD**, Agerberth B, Gudmundsson GH, McCray PB Jr. Expression and activity of beta-defensins and LL-37 in the developing human lung. *J Immunol*. 2005; 174:1608-15.
121. **Nathe KE**, Parad R, Van Marter LJ, Lund CA, Suter EE, Hernandez-diaz S, Boush EB, Ikonomu E, Gallington L, Morey JA, Zeman AM, Mcnamara M, Levy O. Endotoxin-directed innate immunity in tracheal aspirates of

- mechanically ventilated human neonates. *Pediatr Res.* 2009; 66:191-6.
122. **Schaller-Bals S**, Schulze A, Bals R. Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165:992-5.
123. **Jenke AC**, Zilbauer M, Postberg J, Wirth S. Human β -defensin 2 expression in ELBW infants with severe necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res.* 2012; 72:513-20.
124. **Campeotto F**, Baldassarre M, Laforgia N, Viallon V, Kalach N, Amati L, Butel MJ, Dupont C, Kapel N. Fecal expression of human β -defensin-2 following birth. *Neonatology.* 2010; 98:365-9.
125. **Mandic Havelka A**, Yektaei-Karin E, Hultenby K, Sørensen OE, Lundahl J, Berggren V, Marchini G. Maternal plasma level of antimicrobial peptide LL37 is a major determinant factor of neonatal plasma LL37 level. *Acta Paediatr.* 2010; 99:836-41.
126. **Vila-Farres X**, Garcia de la Maria C, López-Rojas R, Pachón J, Giralt E, Vila J. In vitro activity of several antimicrobial peptides against colistin-susceptible and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18:383-7.
127. **Turner MW**. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol.* 2003; 40:423-9.
128. **Jack DL**, Turner MW. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31:753-7.
129. **Gadjeva M**, Takahashi K, Thiel S. Mannan-binding lectin--a soluble pattern recognition molecule. *Mol Immunol.* 2004; 41:113-21.
130. **Ezekowitz RA**, Shi L, Fraser I, Takahashi K. The mannose-binding lectin: an infection susceptibility gene. *Adv Exp Med Biol.* 2005; 560:99-103.
131. **Neth O**, Jack DL, Dodds AW, Holzel H, Klein NJ, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun.* 2000; 68:688-93.
132. **Petersen SV**, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol Immunol.* 2001; 38:133-49.
133. **Takahashi K**. Mannose-binding lectin and the balance between immune protection and complication. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9:1179-90
134. **Garred P**, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun.* 2006; 7:85-9432.
135. **Brouwer N**, Dolman KM, van Zwieten R, Nieuwenhuys E, Hart M, Aarden LA, Roos D, Kuijpers TW. Mannan-binding lectin (MBL)-mediated opsonization is enhanced by the alternative pathway amplification loop. *Mol Immunol.* 2006; 2051-60.
136. **Turner MW**, Lipscombe RJ, Levinsky RJ, Lau YL, Hill AV, Summerfield JA, Sumiya M. Mutations in the human mannose binding protein gene: their frequencies in three distinct populations and relationship to serum levels of the protein. *Immunodeficiency.* 1993; 4:285-7.
137. **Madsen HO**, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol.* 1995; 155:3013-20.
138. **Madsen HO**, Satz ML, Høgh B, Svejgaard A, Garred P. Different molecular events result in low protein

- levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol.* 1998; 161:3169-75.
139. **Crosdale DJ**, Ollier WE, Thomson W, Dyer PA, Jensenius J, Johnson RW, Poulton KV. Mannose binding lectin (MBL) genotype distributions with relation to serum levels in UK Caucasoids. *Eur J Immunogenet.* 2000; 27:111-7.
140. **Frakking FN**, Israëls J, Kremer LC, Kuijpers TW, Caron HN, van de Wetering MD. Mannose-binding lectin (MBL) and the risk for febrile neutropenia and infection in pediatric oncology patients with chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer.* 2011; 57:89-96.
141. **Neth O**, Hann I, Turner MW, Klein NJ. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. *Lancet.* 2001; 25;358:614-8.
142. **Schlapbach LJ**, Mattmann M, Thiel S, Boillat C, Otth M, Nelle M, Wagner B, Jensenius JC, Aebi C. Differential role of the lectin pathway of complement activation in susceptibility to neonatal sepsis. *Clin Infect Dis.* 2010; 51:153-62.
143. **Swierzko AS**, Szala A, Cedzynski M, Domzalska-Popadiuk I, Borkowska-Klos M, Jopek A, Szczapa J, Szemraj J, Atkinson AP, MacDonald SL, Turner ML, Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin genotypes and genotype-phenotype relationships in a large cohort of Polish neonates. *Hum Immunol.* 2009; 70:68-72.
144. **Frakking FN**, Brouwer N, van de Wetering MD, Budde IK, Strengers PF, Huitema AD, Laursen I, Houen G, Caron HN, Dolman KM, Kuijpers TW. Safety and pharmacokinetics of plasma-derived mannose-binding lectin (MBL) substitution in children with chemotherapy-induced neutropaenia. *Eur J Cancer.* 2009; 45:505-12.
145. **Redline RW**, Faye-Petersen O, Heller D, Qureshi F, Savell V, Vogler C; Society for Pediatric Pathology, Perinatal Section, Amniotic Fluid Infection Nosology Committee. Amniotic infection syndrome: nosology and reproducibility of placental reaction patterns. *Pediatr Dev Pathol.* 2003;6:435-48.
146. **Hedstrom L**. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev.* 2002; 102:4501-24.
147. **Olbrich P**, Pavón A, Rosso ML, Molinos A, de Felipe B, Sanchez B, Praena-Fernández JM, Jimenez F, Obando I, Neth O. Association of human beta-defensin-2 serum levels and sepsis in preterm neonates*. *Pediatr Crit Care Med.* 2013; 14:796-800.
148. **Linzmeier RM**, Ganz T. Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23. *Genomics.* 2005; 86:423-30.
149. **Fode P**, Larsen AR, Feenstra B, Jespersgaard C, Skov RL, Stegger M, Fowler VG Jr; Danish SAB Study Group Consortium, Andersen PS. Genetic variability in beta-defensins is not associated with susceptibility to *Staphylococcus aureus* bacteremia. *PLoS One.* 2012; 7:e32315.
150. **Hardwick RJ**, Amogne W, Mugusi S, Yimer G, Ngaimisi E, Habtewold A, Minzi O, Makonnen E, Janabi M, Machado LR, Viskaduraki M, Mugusi F, Aderaye G, Lindquist L, Hollox EJ, Aklillu E. β -defensin genomic copy number is associated with HIV load and immune reconstitution in sub-saharan Africans. *J Infect Dis.* 2012; 206:1012-9.
151. **Chaiworapongsa T**, Romero R, Berry SM, Hassan SS, Yoon BH, Edwin S, Mazor M. The role of granulocyte colony-stimulating factor in the neutrophilia observed in the fetal inflammatory response syndrome. *J*

- Perinat Med. 2011; 39:653-66
152. **Gantert M**, Been JV, Gavilanes AW, Garnier Y, Zimmermann LJ, Kramer BW. Chorioamnionitis: a multiorgan disease of the fetus? *J Perinatol*. 2010; 30 Suppl:S21-30.
 153. **Zanardo V**, Vedovato S, Cosmi E, Litta P, Cavallin F, Trevisanuto D, Chiarelli S. Preterm premature rupture of membranes, chorioamnion inflammatory scores and neonatal respiratory outcome. *BJOG*. 2010; 117:94-8.
 154. **Selsted ME**, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol*. 2005; 6:551-7.
 155. **Mariscalco MM**. Human beta 2 defensin-is it about prediction or is it about the science? A tale of innate immunity*. *Pediatr Crit Care Med*. 2013; 14:824-6.
 156. **Xie GH**, Chen QX, Cheng BL, Fang XM. Defensins and sepsis. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:180109.
 157. **Pierson RC**, Gordon SS, Haas DM. A retrospective comparison of antibiotic regimens for preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol*. 2014; 124:515-9.
 158. **Mackeen AD**, Packard RE, Ota E, Berghella V, Baxter JK., Timing of intravenous prophylactic antibiotics for preventing postpartum infectious morbidity in women undergoing cesarean delivery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 5; 12:CD009516.
 159. **Aliaga S**, Clark RH, Laughon M, Walsh TJ, Hope WW, Benjamin DK, Kaufman D, Arrieta A, Benjamin DK Jr, Smith PB. Changes in the incidence of candidiasis in neonatal intensive care units. *Pediatrics*. 2014; 133:236-42.
 160. **Hilgendorff A**, Schmidt R, Bohnert A, Merz C, Bein G, Gortner L. Host defence lectins in preterm neonates. *Acta Paediatr*. 2005; 94:794-910.
 161. **Sallenbach S**, Thiel S, Aebi C, Otth M, Bigler S, Jensenius JC, et al. Serum concentrations of lectin-pathway components in healthy neonates, children and adults: mannan-binding lectin (MBL), M-, L-, and H-ficolin, and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2). *Pediatr Allergy Immunol*. 2011; 22:424–3010.
 162. **Grumach AS**, Ceccon ME, Rutz R, Fertig A, Kirschfink M. Complement profile in neonates of different gestational ages. *Scand J Immunol*. 2014; 79:276-81.
 163. **Verdu P**, Barreiro LB, Patin E, Gessain A, Cassar O, Kidd JR, Kidd KK, Behar DM, Froment A, Heyer E, Sica L, Casanova JL, Abel L, Quintana-Murci L. Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of MBL2 deficiency alleles. *Hum Mol Genet*. 2006; 15:2650-8.
 164. **Ueda Y**, Cain DW, Kuraoka M, Kondo M, Kelsoe G. IL-1R type I-dependent hemopoietic stem cell proliferation is necessary for inflammatory granulopoiesis and reactive neutrophilia. *J Immunol*. 2009; 182:6477-84
 165. **Manz MG**, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14:302-14.
 166. **Röhl J**, Yang D, Oppenheim JJ, Hehlhans T. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *J Immunol*. 2010; 184:6688-94
 167. **Suarez-Carmona M**, Hubert P, Delvenne P, Herfs M. Defensins: "Simple" antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014. pii: S1359-6101(14)00169-5.
 168. **Petrov V**, Funderburg N, Weinberg A, Sieg S. Human β defensin-3 induces chemokines from monocytes

BIBLIOGRAFÍA

- and macrophages: diminished activity in cells from HIV-infected persons. *Immunology*. 2013; 140:413-20.
169. **Benitz WE**, Han MY, Madan A, Ramachandra P. Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatrics*. 1998; 102:E41.
170. **Laborada G**, Rego M, Jain A, Guliano M, Stavola J, Ballabh P, Krauss AN, Auld PA, Nesin M. Diagnostic value of cytokines and C-reactive protein in the first 24 hours of neonatal sepsis. *Am J Perinatol*. 2003; 20:491-501.
171. **Ng PC**, Cheng SH, Chui KM, Fok TF, Wong MY, Wong W, Wong RP, Cheung KL. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1997; 77:F221-7.
172. **Jekarl DW**, Lee SY, Lee J, Park YJ, Kim Y, Park JH, Wee JH, Choi SP. Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 75:342-7.

VIII. ANEXOS

Association of Human Beta-Defensin-2 Serum Levels and Sepsis in Preterm Neonates

Peter Olbrich, MD¹; Antonio Pavón, MD, PhD²; Maria Luisa Rosso, MD, PhD²; Agueda Molinos, MD³; Beatriz de Felipe, PhD¹; Berta Sanchez, PhD⁴; Juan Manuel Praena-Fernández⁵; Francisco Jimenez, MD, PhD²; Ignacio Obando, MD, PhD¹; Olaf Neth, MD, PhD¹

Objectives: To determine human beta-defensin-2 levels in term and preterm neonates at birth and to evaluate its impact on sepsis.

Design: Observational study.

Setting: Single tertiary care hospital.

Patients: Term neonates and preterm neonates were recruited and divided in groups according to important clinical events.

Interventions: Cord blood samples were drawn from all newborns immediately after birth. Human beta-defensin-2 levels were determined using enzyme-linked immunosorbent assay technology. All neonates were followed clinically during the first 30 days of life.

Measurements and Main Results: Forty-two term and 31 preterm neonates were enrolled. Human beta-defensin-2 levels in term neonates were higher compared with preterm infants (median, 1,882 vs 918 pg/mL; $p = 0.003$) and correlated with gestational age and birth weight. Of 31 preterm neonates, seven suffered from late-onset sepsis, and this was associated with lower human beta-defensin-2 levels (median, 513 vs 1,411 pg/mL; $p = 0.006$).

Conclusion: Preterm neonates show lower human beta-defensin-2 levels in cord blood compared with term neonates. Low human beta-defensin-2 levels in preterm neonates might be associated with an increased risk of late-onset sepsis. (*Pediatr Crit Care Med* 2013; 14:00–00)

Key Words: antimicrobial peptides; defensins; innate immunity; neonates; prematurity; sepsis

Preterm neonates are at risk of suffering from severe infections particularly in the first month of life. Neonatal sepsis is an important cause of morbidity and mortality in this population. Risk factors include low birth weight (BW), low gestational age (GA), invasive procedures, and immaturity of the immune system (1, 2). In this setting, the innate immune system as first-line defense mechanism may play an important role. Antimicrobial peptides (AMPs), such as human beta-defensins (HBDs), are primarily expressed by epithelial cells and have proinflammatory, chemotactic, and direct antimicrobial activity (3). To date, no data exist regarding HBD2 level in cord blood of healthy term and preterm neonates and the possible clinical implication of HBD2 level in the susceptibility to infections. In this study, HBD2 serum levels of term and preterm neonates were determined at birth and were correlated with clinical events, including chorioamnionitis and sepsis.

MATERIALS AND METHODS

An observational study of preterm and term neonates was conducted in a tertiary hospital from January 2008 to December 2009. Clinical and laboratory data were collected without reference to HBD2 phenotype. Additionally, blood samples from healthy adults were used as control. The study was performed according to the ethical standards of the Helsinki Declaration and after reception of written informed consent from the parents of neonates. Study groups with extremely different GA were defined as group A—term neonates (GA, 37–42 wk), born by mothers without clinical or laboratory alterations—and group B—preterm neonates (GA, < 32 wk).

Diagnosis of chorioamnionitis was made by histopathology findings, and late-onset sepsis (LOS) was defined as previously described (4).

Blood samples were taken arbitrarily by a dedicated neonatologist, immediately postpartum from the umbilical cord, and were

¹Department of Paediatric Infectious Diseases and Immunodeficiency, Hospital Infantil Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain.

²Department of Neonatology and Neonatal Intensive Care Unit, Hospital Infantil Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain.

³Department of Paediatric Haematology, Hospital Infantil Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain.

⁴Department of Immunology, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Seville, Spain.

⁵Statistics, Methodology and Research Evaluation Unit, Andalusian Public Foundation for Health Research Management in Seville, Seville, Spain.

The authors have disclosed that they do not have any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, E-mail: olafw.neth.sspa@juntadeandalucia.es

Copyright © 2013 by the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies

DOI: 10.1097/PCC.0b013e3182975e0f

processed and stored at -80°C . The samples were diluted 1:20, and HBD2 concentrations were measured from serum, without protein extraction procedure, using an enzyme-linked immunoassay (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA) according to the manufacturer's instructions. Extremely high values ($> 7,500$ pg/mL) that are out of the linear part of the standard curve were extrapolated. Additional cord blood samples were obtained to investigate whether HBD2 levels in plasma differ from serum and whether they are influenced by the time point of processing and/or the addition of the protease inhibitor aprotinin.

All preterm neonates (GA, ≤ 32 wk) received empirical antibiotic therapy, according to the local protocol, with ampicillin (100 mg/kg/d) and gentamicin (5 mg/kg/d), which was stopped at 48 hours, if microbial cultures were negative. In addition, antifungal prophylaxis with fluconazole (3 mg/kg/twice weekly) was initiated in preterm neonates with a BW less than 1,000 g.

Statistical Analysis

Data were tested for normal distribution. Continuous variables are expressed as means with SD or medians with interquartile ranges (IQRs). Between-group comparisons were made using chi-square test or Fisher exact test for qualitative variables and Student *t* test or Mann-Whitney *U* test for quantitative variables.

To reduce intern variability of the variable HBD2 in the preterm subgroup, log-transformation was realized. The Pearson correlation test was performed to describe associations between two quantitative variables.

Variables were included in the logistic regression model when they exhibited statistical significance. The adjusted odds ratio (OR) and corresponding 95% CI for the tested variables were calculated by Bootstrap methods (1,000 samples). For analysis of predictive ability, area under the curve (AUC), sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and Youden index were calculated. Probability values were two tailed, and statistical significance was defined as *p* value of less than 0.05. Analysis was performed using IBM SPSS Statistics 19.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Variability of HBD2 Levels Using Plasma and Serum Samples, Different Time Points of Processing, and/or the Addition of Aprotinin

HBD2 levels from four control cord blood samples were analyzed from serum and plasma; serum HBD2 levels were higher compared with corresponding HBD2 plasma levels (median, 598 vs 421 pg/mL; $p = 0.068$). The addition of aprotinin or serum sample processing at 0, 12, 24, and 48 hours did not influence HBD2 levels (data not shown).

HBD2 Levels in Term and Preterm Neonates

A total of 73 neonates (42 term and 31 preterm neonates) were enrolled. Demographic and clinical characteristics are summarized in Table 1.

HBD2 levels were lower in preterm compared with term neonates (median, 918 vs 1,883 pg/mL; $p = 0.003$), as well as in neonates with a BW less than 1,500 g compared with those with a BW more than 1,500 g (median, 880 vs 1,749 pg/mL; $p = 0.038$) (Table 2; Fig. 1A). HBD2 serum levels were positively correlated with BW and GA ($r = 0.359$, $p = 0.002$ and $r = 0.364$, $p = 0.002$, respectively). Variables heterogeneously distributed in the subgroups of preterm and term neonates as gender and mode of delivery did not influence HBD2 levels. No statistical difference was found by analyzing the variable HBD2 level and the prevalence of chorioamnionitis in term and preterm neonates (Table 2).

HBD2 Levels in Healthy Adults

HBD2 levels in the serum of seven healthy adults were lower compared with that in term and preterm neonates at birth ($p = 0.001$) (Fig 1A).

Sepsis in relation to Demographic/Clinical Variables and HBD2 Levels in Cord Blood in Preterm Subgroup

Two of the 31 preterm neonates suffered from early-onset sepsis (EOS) due to *Klebsiella pneumoniae* and seven from LOS due to *Staphylococcus epidermidis* ($n = 5$), *K. pneumoniae* ($n = 2$),

TABLE 1. Demographic and Clinical Details of the Neonatal Cohort

Variable	Preterm Neonates ($n = 31$)	Term Neonates ($n = 42$)	<i>p</i>
Gestational age (wk)	Median, 30 (IQR, 29–31)	Median, 39 (IQR, 38–40)	< 0.001
Birth weight (g)	Mean, 1,298 (sd, 338.4)	Mean, 3,247 (sd, 378.2)	< 0.001
Gender			
Female, <i>n</i> (%)	11 (35.5)	28 (66.7)	0.008
Male, <i>n</i> (%)	20 (64.5)	14 (33.3)	
Maternal age (yr)	32 (29–34)	30.5 (22.7–35.2)	0.151
Type of delivery			
Normal vaginal delivery, <i>n</i> (%)	9 (29)	27 (64.3)	< 0.001
Instrumental, <i>n</i> (%)	0 (0.0)	10 (23.8)	
Cesarean section, <i>n</i> (%)	22 (71)	5 (11.9)	
Chorioamnionitis			
Yes (%)	16 (48.4)	9 (21.4)	0.007

IQR = interquartile range.

TABLE 2. Human Beta-Defensin-2 Levels in Relation to Demographic and Clinical Data

Variable	Patients (n = 73)	Median Human Beta-Defensin-2 Levels (pg/mL) (IQR, 25–75)	p
Gestational age (wk)			
Preterm neonates (28–32)	31	918 (556–2,331)	0.003
Term neonates (37–41)	42	1,882 (1,204–3,364)	
Birth weight			
< 1,500 g	20	880 (524–2,645)	0.038
≥ 1,500 g	53	1,748 (956–2,969)	
Gender			
Female	39	1,639 (691–2,968)	0.812
Male	34	1,661 (842–2,579)	
Mode of Delivery			
Preterm neonates			
CS	22	1,020 (546–2,385)	0.862
NVD	9	707 (488–2,423)	
Term neonates			
CS	5	1,602 (762–3,588)	0.522
NVD ^a	37	1,888 (1,257–3,398)	
CA			
Yes	25	1,639 (869–3,591)	0.754
No	48	1,662 (740–2,775)	
Term neonates with CA	9	2,106 (1,639–7,187)	0.244
Term neonates without CA	33	1,813 (1,146–2,971)	
Preterm neonates with CA	16	1,046 (578–2,213)	0.268
Preterm neonates without CA	15	655 (248–2,293)	
Preterm neonates with proven LOS ^b	7	513 (98–557)	0.006
Preterm neonates without proven LOS and/or early-onset sepsis ^c	22	1,411 (609–2,579)	

IQR = interquartile range, CS = cesarean section, NVD = normal vaginal delivery, CA = chorioamnionitis, LOS = late-onset sepsis.

^aOf 37 vaginal deliveries, 10 were instrumental.

^b*Staphylococcus epidermidis* (n = 5), *Klebsiella pneumoniae* (n = 2), *Staphylococcus warneri* (n = 1), and *Enterococcus faecalis* (n = 1). Although one patient suffered from three LOS episodes, there were no cases of meningitis, line infections, or nosocomial pneumonias.

^cTwo preterm neonates suffering from early-onset sepsis were excluded from this analysis.

Staphylococcus warneri (n = 1), and *Enterococcus faecalis* (n = 1); one patient suffered from three LOS episodes. Although one patient suffered from stage 1 necrotizing enterocolitis, no cases of meningitis, line infections, or nosocomial pneumonias were observed in our study group. Median GA of patients with LOS was lower, being 28 weeks (IQR, 28–30), and it occurred at a median of 10 days (IQR, 6–15) compared with a median GA of 30 weeks (IQR, 29–31) in patients without LOS ($p = 0.016$). BW was also lower in the LOS subgroup when compared with the non-LOS group ($p = 0.047$). HBD2 serum levels were significantly lower in preterm infants suffering from LOS compared with those who did not suffer from the above (513 vs 1,411 pg/mL; $p = 0.006$) (**Fig. 1B**).

Variables with statistical significance for the event of LOS were included in a logistic regression model (Bootstrap), demonstrating that log-transformed HBD2 levels (OR, 0.34 [95% CI, 0.01–0.60]; $p = 0.008$) and GA (OR, 0.31 [95% CI, 0.01–0.71]; $p = 0.013$) were independent risk factors for LOS, whereas this was not observed with the variables BW, CA, gender, and mode of delivery. AUC calculations for the variables HBD2 and LOS confirmed the predictive ability of the model (AUC, 0.85 [95% CI, 0.68–1]; $p = 0.005$; sensitivity, 71.4%; specificity, 95.8%; positive predictive value, 83.3%; negative predictive value, 92%; Youden index, 0.7).

No consistent correlation was observed between neutrophil count, C-reactive protein, and HBD2 levels (data not shown).

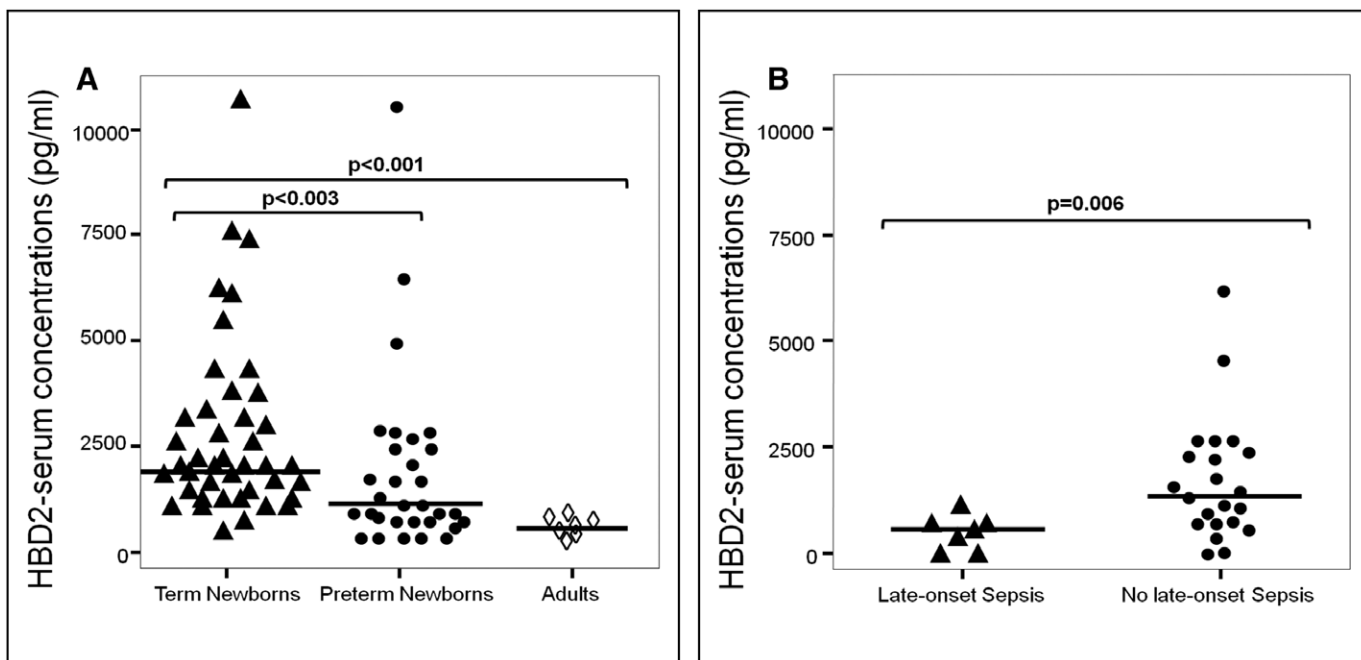


Figure 1. A, Human beta-defensin-2 (HBD2) serum levels in term newborns, preterm newborns, and healthy adults. *Filled triangle* = term newborns, *filled circles* = preterm newborns, *open diamond* = adults. **B**, HBD2 serum levels in preterm neonates with and without late-onset sepsis. Two patients with early-onset sepsis have been excluded from this analysis. *Filled triangle* = late-onset sepsis, *filled circles* = no late-onset sepsis.

DISCUSSION

In this study, HBD2 serum levels were significantly higher in term neonates compared with preterm neonates and healthy adult controls. This is in contrast to previous published data in which AMPs were found to be lower in newborns than in adult controls (2, 5). Although AMP could be important to protect newborns from infections during the first weeks of life, up-regulation of HBD2 might be reduced in preterm infants due to the immaturity of the immune system (2, 6, 7). Chorioamnionitis was more common within preterm neonates. Interestingly, no significant difference in HBD2 levels was observed, suggesting that chorioamnionitis alone might not increase HBD2 levels substantially.

As described previously, low GA was an independent risk factor in preterm neonates to develop LOS (6). In addition, low HBD2 serum levels at birth were observed to be independently associated with LOS. Although HBD2 levels in the preterm group were significantly lower than that in term neonates, preterm HBD2 levels did not seem to differ from adult controls, implying that a “relative deficiency” of HBD2 in the perinatal period of this subgroup is associated with an increased susceptibility to suffer from infections. This is an important observation and is supported by previous studies suggesting an association of “physiological” low levels of components of the innate immune system (e.g., complement proteins including mannose-binding lectin) with the susceptibility to infections in preterm neonates (2, 5–7). Up-regulation of HBD2 has been associated with severe sepsis in adult patients, further supporting a role of HBD2 in infection (8). Although two preterm neonates with very low HBD2 levels suffered from LOS (one being fatal), another patient with extremely high HBD2 levels suffered from fatal EOS. It

remains to be clarified whether very low and very high HBD2 levels may be detrimental for the clinical outcome.

All studies were performed in blood serum and HBD2 levels were found to be higher compared to those in published data (8) where plasma was used. Indeed, when HBD2 levels from control blood samples were analyzed using both plasma and serum, HBD2 levels were found to be higher in serum samples. This observation might be explained by the fact that HBD2 is a highly positively charged peptide, which binds to negatively charged proteins in plasma and serum, resulting in a reduction of free circulating HBD2. Furthermore, numerous coagulation factors in plasma are serine proteases, which may affect HBD2 levels. Finally, differences of published HBD2 levels might be due to the use of different laboratory techniques. Neither the addition of a protease inhibitor to serum samples nor its analysis at different time points did influence HBD2 levels. This is important as it may facilitate clinical studies in the future.

In summary, in this study, HBD2 serum levels were lower in preterm neonates than in term infants but were not different from the levels in adult controls, suggesting a relative deficiency at birth. Low HBD2 levels might be an independent risk factor for the susceptibility to infections in this risk group. The value of HBD2 measurements at birth and the impact of HBD2 on clinical outcome remain to be determined.

REFERENCES

- Vergnano S, Menson E, Kennea N, et al: Neonatal infections in England: The NeonIN surveillance network. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2011; 96:F9–F14
- Wynn JL, Levy O: Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 2010; 37:307–337

3. Underwood MA, Bevins CL: Defensin-barbed innate immunity: Clinical associations in the pediatric population. *Pediatrics* 2010; 125:1237–1247
4. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, et al: Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: The experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002; 110(2 Part 1):285–291
5. Strunk T, Doherty D, Richmond P, et al: Reduced levels of antimicrobial proteins and peptides in human cord blood plasma. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2009; 94:F230–F231
6. Dzwonek AB, Neth OW, Thiébaud R, et al: The role of mannose-binding lectin in susceptibility to infection in preterm neonates. *Pediatr Res* 2008; 63:680–685
7. Starner TD, Agerberth B, Gudmundsson GH, et al: Expression and activity of beta-defensins and LL-37 in the developing human lung. *J Immunol* 2005; 174:1608–1615
8. Book M, Chen Q, Lehmann LE, et al: Inducibility of the endogenous antibiotic peptide beta-defensin 2 is impaired in patients with severe sepsis. *Crit Care* 2007; 11:R19

in more detail. In one of their previous studies, the authors showed that therapeutic hypothermia resulted in altered IL-6, IL-8, IL-10, and monocyte chemoattractant protein-1 serum levels, with worse outcomes being associated with an increase in IL-8 and IL-10 (14). This may correlate with the low leukocyte counts noted in patients with poor outcomes in this study. In the same study, they also report that poor outcomes were associated with increased IL-12 and increased macrophage inhibitory protein-1 α , cytokines that can promote a Th1 response, at the time of rewarming and persisting up to 72 hours (14). Hence, it appears that suppression of WBC counts as seen in the hypothermia group may be beneficial, but too much suppression or persistent suppression leading to immune dysregulation would be harmful.

As with all thought-provoking and interesting studies, this study by Jenkins et al leaves us with several more questions that will need to be addressed in future studies. A better understanding of the temporal progression of the innate and adaptive immune response over a prolonged period following neonatal HIE, and the role of other factors that may influence the immune system such as neonatal sepsis and exposure to maternal infection/inflammation, would be crucial for optimally manipulating the immune response to achieve the desired effects of neuroprotection with therapeutic hypothermia.

REFERENCES

1. Kamel H, Iadecola C: Brain-immune interactions and ischemic stroke: Clinical implications. *Arch Neurol* 2012; 69:576–581
2. Hurn PD, Subramanian S, Parker SM, et al: T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27:1798–1805
3. Iadecola C, Anrather J: The immunology of stroke: From mechanisms to translation. *Nat Med* 2011; 17:796–808
4. Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, et al: Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood* 2012; 120:3793–3802
5. Huang Z, Meola D, Petitto JM: Dissecting the effects of endogenous brain IL-2 and normal versus autoreactive T lymphocytes on microglial responsiveness and T cell trafficking in response to axonal injury. *Neurosci Lett* 2012; 526:138–143
6. Mena H, Cadavid D, Rushing EJ: Human cerebral infarct: A proposed histopathologic classification based on 137 cases. *Acta Neuropathol* 2004; 108:524–530
7. Levy O: Innate immunity of the newborn: Basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:379–390
8. Sharma AA, Jen R, Butler A, et al: The developing human preterm neonatal immune system: A case for more research in this area. *Clin Immunol* 2012; 145:61–68
9. Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA, et al: Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol* 2011; 10:372–382
10. Chakkarapani E, Thoresen M: Use of hypothermia in the asphyxiated infant. *Perinatology* 2010; 3:20–29
11. Shankaran S, Pappas A, McDonald SA, et al; Eunice Kennedy Shriver NICHD Neonatal Research Network: Childhood outcomes after hypothermia for neonatal encephalopathy. *N Engl J Med* 2012; 366:2085–2092
12. Jenkins DD, Lee T, Chiuhan C, et al: Altered Circulating Leukocytes and Their Chemokines in a Clinical Trial of Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Pediatr Crit Care Med* 2013; 14:786–795
13. Offner H, Vandenbark AA, Hurn PD: Effect of experimental stroke on peripheral immunity: CNS ischemia induces profound immunosuppression. *Neuroscience* 2009; 158:1098–1111
14. Jenkins DD, Rollins LG, Perkel JK, et al: Serum cytokines in a clinical trial of hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32:1888–1896

Human Beta 2 Defensin—Is It About Prediction or Is It About the Science? A Tale of Innate Immunity*

M. Michele Mariscalco, MD

Department of Pediatrics

University of Kansas School of Medicine-Wichita

Wichita, KS

*See also p. 796.

Key Words: antimicrobial peptides and proteins; human beta 2 defensin; lactoferrin; premature neonates; sepsis

Supported, in part, by institutional funds.

The author has disclosed that she does not have any potential conflicts of interest.

Copyright © 2013 by the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies

DOI: 10.1097/PCC.0b013e31829b2236

In this issue of *Pediatric Critical Care Medicine*, Olbrich et al (1) examine yet another biomarker in preterm infants, to determine an association between human beta defensin 2 serum levels and sepsis. After a dizzying array of cytokines, chemokines, soluble adhesion proteins, growth factors (and so on), which have been measured in the serum or plasma of humans, few, if any, have subsequently been demonstrated to be particularly helpful when caring for patients with prematurity, sepsis, meconium aspiration syndrome, chronic lung disease, etc. (2–5). Some of the frustration occurs because all “biomarkers” are measured in isolation, in small groups of patients which subsequently do not appear to be useful when applied to larger populations, or our bias to publish positive results only. In a study of 927 births (116 very preterm, 372 moderately preterm), the relationship between 27 cord blood immune biomarkers and preterm birth was examined (2). Some immune markers were increased with preterm birth

(interleukin [IL]-2–4, -5, -8, tumor necrosis factor α), others were decreased (IL-1 β), and others were not associated (IL-6). Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM)-1 is one case in point. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 is a member of immunoglobulin gene superfamily, is found on the surface of phagocytes, and is up-regulated and released on exposure to pathogens. sTREM-1 has been suggested to be a “marker of inflammation.” Matoba et al (2) found it to be increased in the cord blood of preterm infants, suggesting “increased inflammation.” Wu et al (6) performed a systematic review and meta-analysis of studies examining plasma sTREM-1 to differentiate sepsis patients from those with systemic inflammation. Eleven studies were identified that met prespecified criteria for inclusion (total of 1,795 patients), and sTREM-1 had moderate diagnostic performance, with patient sample size and assay methods the main sources of heterogeneity. There was also publication bias. Another potential biomarker put into biomarker “limbo.”

Why would human beta 2 defensin be more specific or sensitive than other biomarkers? It may not be. The study by Olbrich et al (1) examined a small cohort of infants (42 term and 31 preterm), which is highly problematic. We are uninformed of how many families of neonates who met inclusion refused to participate (1). Study strengths are that the authors specifically define the preterm population (< 32 wk) versus term population (37–42 wk) (with enough “age” between the two groups for biological plausibility), histologically identified chorioamnionitis, and defined late onset sepsis. The authors “deal” with tissue processing issues. Serum levels are higher than plasma values, though not statistically significant, this is more likely due to small sample size, and must be dealt with more rigorously if this biomarker is to be studied further. Nonetheless all the samples are processed and analyzed in the same manner. In univariate analysis, birth weight and gestational age are correlated with human beta 2 defensin levels. Interestingly, chorioamnionitis was not associated with a difference in human beta 2 defensin level. Of those preterm infants who went on to develop late onset sepsis, cord blood human beta 2 defensin was significantly lower than those who did not develop late onset sepsis (513 pg/mL vs 1,411 pg/mL; $p = 0.006$). In multivariable analysis for the development of late onset of sepsis, human beta 2 defensin and gestational age were independent risk factors, while birth weight, chorioamnionitis, gender, and mode of delivery were not. Note that human beta 2 defensin did not correlate with other markers of inflammation or innate immunity (neutrophil count or C-reactive protein). Although this initial study is intriguing, it is very preliminary, and much more work must be done for human beta 2 defensin to be a suitable biomarker in premature infants as a predictor for late onset sepsis.

However, information that has recently been lacking in neonatal studies was included here. The authors compare term and preterm serum levels to that of healthy adults. Both term and neonatal infants have highly elevated serum human beta 2 defensin levels compared with adults (approximately 5 \times and 2 \times , respectively, Fig. 1B in [1]). It is important to highlight

that there are few biomarkers that have been identified that are increased in neonatal serum or plasma (premature or term) compared with adults, and for this reason alone, this study bears closer examination. Human beta defensins are a subgroup of antimicrobial peptides and proteins (APPs) that are an integral part of the innate immune system (5). They are present at mucosal lining and in the skin and are part of the initial antimicrobial response. Many are present in human milk and are hypothesized to be the primary reason for the immunity boost seen with ingesting breast milk (7). Human beta 2 defensin is found in neonatal dermis epithelial cells and appears equal to that found in adults, but the APP, cathelicidin, is many times up-regulated in neonate compared with adult. The combination of cathelicidin with human beta 2 defensin has strong antimicrobial activity against group B *Streptococcus* (8). Another APP lactoferrin is also dramatically up-regulated in neonatal skin, compared with adult; however, serum lactoferrin levels are increased in newborn compared with adults (unlike cathelicidin which is not increased) (9). Like human beta 2 defensins, premature infants have diminished lactoferrin plasma levels, and diminished levels were associated with clinical signs of infection (10).

Thus, the present study is an important next step in understanding innate immunity of the neonate and as critically identifying opportunities for intervention in the premature neonate. The authors demonstrate that in the premature neonate lower levels of human beta 2 defensin at birth are associated with increased prevalence of late onset of sepsis. This begs the question, would supplementation with human beta 2 defensin decrease the prevalence of late onset sepsis in pretermatures? Treatment with synthetic APP has been explored for several decades. Bacterial permeability increasing factor was found to neutralize endotoxin and improve survival in animal models of endotoxemia and bacteremia; however, it failed to improve survival in children with severe meningococemia (11). However, bovine lactoferrin given orally to very low birth weight infants decreases the prevalence of late onset sepsis and invasive *Candida* infections, in Italian neonatal ICUs (12, 13). This present study supports the biologic plausibility of human beta 2 defensin as prophylactic treatment to decrease the prevalence of late onset infections in premature infants. Thus, human beta 2 defensin may be more important in its function in the innate immune system than its role as a “predictor” of sepsis.

REFERENCES

1. Olbrich P, Pavón A, Rosso ML, et al: Association of Human Beta-Defensin-2 Serum Levels and Sepsis in Preterm Neonates. *Pediatr Crit Care Med* 2013; 14:796–800
2. Matoba N, Yu Y, Mestan K, et al: Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics* 2009; 123:1320–1328
3. Schaller-Bals S, Schulze A, Bals R: Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:992–995
4. Okazaki K, Kondo M, Kato M, et al: Serum cytokine and chemokine profiles in neonates with meconium aspiration syndrome. *Pediatrics* 2008; 121:e748–e753

5. Wynn JL, Levy O: Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 2010; 37:307–337
6. Wu Y, Wang F, Fan X, et al: Accuracy of plasma sTREM-1 for sepsis diagnosis in systemic inflammatory patients: A systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2012; 16:R229
7. Levy FH, Brilli RJ, First LR, et al: A new framework for quality partnerships in Children's Hospitals. *Pediatrics* 2011; 127:1147–1156
8. Dorschner RA, Lin KH, Murakami M, et al: Neonatal skin in mice and humans expresses increased levels of antimicrobial peptides: Innate immunity during development of the adaptive response. *Pediatr Res* 2003; 53:566–572
9. Scott PH: Enzyme immunoassay of lactoferrin in newborn term infants: Reference values and influence of diet. *Ann Clin Biochem* 1989; 26(Part 5):407–411
10. Scott PH: Plasma lactoferrin levels in newborn preterm infants: Effect of infection. *Ann Clin Biochem* 1989; 26(Part 5):412–415
11. Levin M, Quint PA, Goldstein B, et al: Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: A randomised trial. rBPI21 Meningococcal Sepsis Study Group. *Lancet* 2000; 356:961–967
12. Manzoni P, Stolfi I, Messner H, et al; Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections—The Italian Society of Neonatology: Bovine lactoferrin prevents invasive fungal infections in very low birth weight infants: A randomized controlled trial. *Pediatrics* 2012; 129:116–123
13. Manzoni P, Rinaldi M, Cattani S, et al; Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections, Italian Society of Neonatology: Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: A randomized trial. *JAMA* 2009; 302:1421–1428

Validity of Family Satisfaction Measures: An Ongoing Process*

Kathleen L. Meert, MD, FCCM

Children's Hospital of Michigan
Detroit, MI

Thomas N. Templin, PhD

Wayne State University
Detroit, MI

In today's critical care practice, increasing emphasis is placed on patient- and family-centered care (PFCC). PFCC is care that is respectful of and responsive to patient and family preferences, needs, and values (1). In pediatrics, PFCC acknowledges the family as the child's primary source of strength and support (2). To advance PFCC, tools to assess patient and family needs and priorities are necessary. Tools are also needed to evaluate patient and family outcomes in response to practice changes intended to address these needs and priorities. Family satisfaction in intensive care is the extent to which family members perceive their needs and expectations as fulfilled by healthcare providers (3). Family satisfaction is an outcome relevant to PFCC because satisfaction is expected to increase as patient and family needs are met. Several tools to assess family satisfaction have been developed for use in intensive care settings. However, few tools have been

specifically developed or adequately tested with parents of critically ill children.

In this issue of *Pediatric Critical Care Medicine*, Epstein et al (4) evaluate the internal consistency reliability and construct validity of the Family Satisfaction in the ICU (FS-ICU) survey in 50 parents of critically ill children admitted to a single cardiothoracic ICU (CTICU). The FS-ICU is a 24-item survey originally developed for use with family members of critically ill adults to assess two domains of family satisfaction, including satisfaction with care and satisfaction with medical decision making (5). FS-ICU items were generated based on the conceptual frameworks of patient satisfaction and quality end-of-life care, prior research on family needs and satisfaction with medical decision making, other validated satisfaction surveys, and a pilot study. Validation of the FS-ICU was conducted among 1,038 relatives of patients (46% spouses) of age 61 ± 18 years (6). For this study, Epstein et al (4) modified the FS-ICU slightly to reflect that parents of young children are the intended respondents (pFS-ICU) rather than relatives of critically ill adults. Scores were converted to a 1–100 scale (0 = lowest satisfaction and 100 = highest satisfaction).

Findings from the study demonstrate a total pFS-ICU score of 92.6 ± 8.3 suggesting high overall satisfaction with care and decision-making processes in the pediatric CTICU. The pFS-ICU was found to have high internal consistency reliability as reflected by Cronbach's alpha of 0.95. Construct validity was evaluated by correlation of the pFS-ICU scores with those of a 23-item satisfaction survey developed by McPherson et al (7). The McPherson survey was designed for use with parents of critically ill children and covers satisfaction with the hospital environment, patient care, and communication. Correlation between the pFS-ICU and the McPherson survey was strong ($r = 0.73$; $p < 0.01$). Correlation between the pFS-ICU

*See also p. e350.

Key Words: psychometrics; satisfaction; survey; validity

Drs. Meert and Templin have received grants from NICHD R03HD048487 Spiritual Needs of Bereaved Parents and have received funding from the National Institutes of Health.

Copyright © 2013 by the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies

DOI: 10.1097/PCC.0b013e3182975e4d