

# Fisiopatología de la enterocolitis necrotizante (ECN)

Carlos Alberto Fustiñana

La enterocolitis necrotizante (ECN) es la emergencia gastrointestinal más frecuente en recién nacidos (RN) de pretérmino; pese a ello su patogenia es aún motivo de investigación; el tratamiento es difícil y frecuentemente ha probado no ser el más adecuado y hasta el momento no se ha encontrado una estrategia de prevención realmente eficaz.<sup>1</sup> A pesar de que el uso de corticoides prenatales podría disminuir su incidencia,<sup>2</sup> como observamos en nuestro laboratorio, no tendría la misma acción en los seres humanos. En este contexto de comprensión de las bases biológicas de la génesis de la entidad enmarcamos la presente revisión bibliográfica.

Los neonatos de pretérmino constituyen el grupo de mayor riesgo en el desarrollo de ECN. En gran medida esto sucede por la falta de madurez del desarrollo de algunas funciones clave como: motilidad intestinal, capacidad de digestión, función madura de la barrera intestinal, regulación circulatoria y enteroinmunidad. Desempeñan también un papel importante los factores ambientales perinatales, como la lesión hipóxico-isquémica, la alimentación con leche de fórmula, así como la colonización bacteriana patógena.

La incidencia de esta entidad es variable; sin embargo, los informes de las bases de datos de las redes de Estados Unidos y Canadá refieren una prevalencia del 7% en recién nacidos con peso al nacer entre 500 y 1500 gramos. En nuestro medio, la red NEOCOSUR, que agrupa 21 Unidades Neonatales de Latinoamérica, refiere una incidencia mayor (11%) en el mismo intervalo de peso. En ambas redes, la prevalencia entre Unidades es variable y muestra que determinadas prácticas o características de los pacientes pueden marcar estas diferencias. Nuestra unidad, por ejemplo, tiene una prevalencia que es casi la mitad (6,5%) de la red latinoamericana. Asimismo esta entidad se asocia a alta mortalidad (20 a 30%), especialmente en aquellos niños que requieren cirugía.

Este proceso inflamatorio, si bien se inicia en un intestino altamente inmunorreactivo, presenta una extensión sistémica, con compromiso multiorgánico, y afecta incluso el sistema nervioso central, lo que condiciona en estos pacientes mayor riesgo de retraso neuromaturo. Muchos centros, para intentar disminuir su incidencia, retardan el inicio de la alimentación enteral, prolongando la alimentación parenteral, lo que implica mayores costos e incluso prolongación de la estadía. La resección intestinal

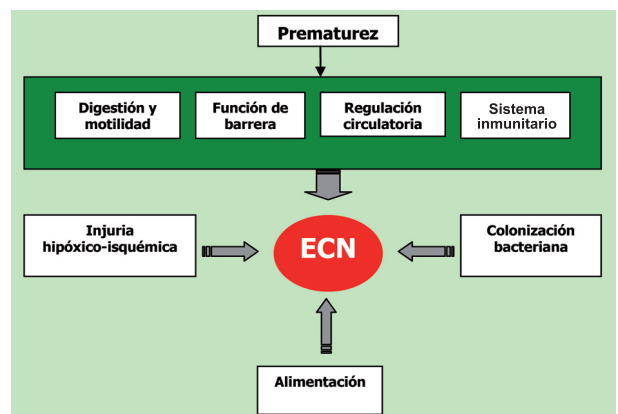
es la complicación más frecuente; la indicación se asocia a perforación intestinal y/o necrosis. Además, la ECN es la causa más frecuente de síndrome de intestino corto en la infancia. Esta entidad multifactorial constituye uno de los desafíos más inquietantes del cuidado intensivo neonatal; el recorrido de sus características fisiopatológicas, que revisaremos en el presente artículo, se muestra en la figura 1.<sup>3,4</sup>

## INMADUREZ DE LA MOTILIDAD Y LA CAPACIDAD DIGESTIVA

Los estudios en fetos tanto de animales como de seres humanos muestran que la motilidad intestinal comienza a aparecer durante el segundo trimestre y alcanza algún grado de madurez a lo largo del tercer trimestre de la gestación (en los seres humanos). Esta motilidad alterada puede ser uno de los factores predisponentes para el desarrollo de ECN en neonatos prematuros.<sup>4</sup> Los estudios sobre motilidad intestinal muestran un patrón de motilidad anormal o inmaduro en comparación con los niños de término.<sup>6,7</sup> Este patrón inmaduro, sin embargo, se revierte en respuesta al inicio de la alimentación enteral.

Esta respuesta, maduración frente a la confrontación con los nutrientes, se altera en presencia de situaciones asociadas a la prematuridad como: retardo del crecimiento intrauterino, asfisia o hipoxia,<sup>8</sup> antenatal o posnatal, que

**Figura 1.** Factores implicados en el desarrollo de la enterocolitis necrotizante en prematuros.



retrasan la maduración de la motilidad intestinal. Frente al síndrome de hipomotilidad se retrasa la capacidad digestiva del intestino y las moléculas parcialmente digeridas contribuyen a la lesión intestinal. Esta combinación altera la función de barrera del intestino.

### INMADUREZ DE LA CIRCULACIÓN ENTERAL

Clásicamente se ha supuesto que la lesión hipóxico-isquémica desempeña un papel fundamental en la patogenia de la ECN. El mecanismo llamado “circuito de ahorro”, que prioriza la perfusión de los órganos nobles: cerebro y corazón, por sobre el intestino y el riñón, ha sido invocado como un condicionante fisiológico en la ECN; sin embargo, está muy desarrollado en niños de término más que en prematuros, dado que requiere un sistema de autorregulación vascular maduro. Es posible que los trastornos en la microcirculación enteral estén relacionados con los casos de ECN descritos en niños de término que padecen cardiopatías congénitas cianóticas y en postoperatorios de anastomosis aortopulmonares.

Otro hecho que ha generado muchas hipótesis fisiopatológicas sobre el origen vascular fue que los primeros modelos experimentales en animales de ECN usaron la lesión hipóxica o isquémica (o ambas simultáneamente) para obtener lesiones similares a la ECN. Pese a ello no es convincente la hipótesis de que ese sea el factor desencadenante.<sup>9</sup> De hecho la progresión rápida de la alimentación, la translocación bacteriana y la colonización patógena con mediadores inflamatorios parecen desempeñar un papel más importante que el trastorno circulatorio per se.

La circulación inmadura favorece la isquemia-hipoxia amplificando la respuesta a otros agentes de daño como la alimentación o el sobrecrecimiento bacteriano. Un factor importante es la reducción de la producción endotelial de óxido nítrico (déficit de óxido nítrico sintetasa) en prematuros, con la consiguiente dificultad de realizar la adaptación de la circulación fetal a neonatal.<sup>10</sup> Sin embargo, faltan estudios (nuevos modelos animales) que establezcan precisamente el papel de la circulación y su regulación en la fisiopatología de la ECN.

### INMADUREZ DE LA FUNCIÓN DE LA BARRERA INTESTINAL

Se entiende como barrera intestinal el conjunto anatómico y funcional que impide o modula la entrada de gérmenes, toxinas y otras macromoléculas desde el lumen intestinal a la sangre o la linfa, pero permite selectivamente el pasaje de algunos iones, la absorción de nutrientes y el flujo bidireccional de fluidos. Existen relaciones entre las alteraciones de dicha barrera y la translocación de gérmenes o toxinas y la sepsis secundaria a esos fenómenos.<sup>11</sup> Los componentes principales de la barrera son, entonces, la

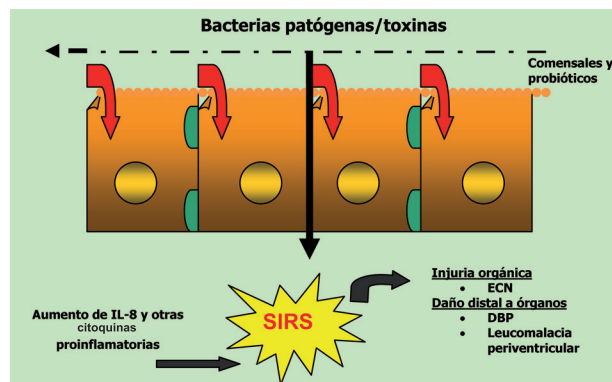
misma peristalsis, la secreción de moco e IgA y la integridad de las uniones estrechas.

En neonatos inmaduros, los componentes de la barrera epitelial no están completamente desarrollados, así como la colonización bacteriana por gérmenes patógenos altera la simbiosis que impide el acceso de dichos gérmenes a tejidos subyacentes y su posterior reacción inflamatoria.<sup>12</sup> La extensa superficie intestinal es recubierta solo por un epitelio simple. Es fácil imaginar, entonces, que en esta gran superficie, de solo una capa celular, podrían ocurrir alteraciones que lleven a su debilitamiento, facilitando así la translocación de gérmenes o toxinas desde el lumen intestinal (Fig. 2).

Las uniones estrechas entre los enterocitos aparecen tempranamente en la etapa embrionaria (semana 10). Sin embargo, la función de barrera comienza a desarrollarse a partir de la semana 26 de gestación, con la ingesta de líquido amniótico por el feto, y alcanza su madurez al término de la gestación. Es así como el control selectivo de flujo de iones a través de la monocapa de enterocitos, que usa iones de Cl y secreción de agua, es ineficaz para producir el lavado de patógenos indeseables.<sup>13,14</sup>

Normalmente la secreción de mucina (una glucoproteína) por las células caliciformes funciona como una gruesa capa protectora del epitelio intestinal, pero la prematuridad impide la función madura del sistema.<sup>15</sup> De tal modo, al no producirse la unión del mucus con las bacterias y posibilitar su “barrido” y remoción, la permeabilidad del epitelio se incrementa y también la adhesión bacteriana y la potencial ruptura de la barrera, posibilitando la susceptibilidad a la lesión por bacterias tanto patógenas como no patógenas. La experiencia en animales apoya esta hipótesis, pues el ayuno produce una rápida atrofia de la mucosa intestinal,

**Figura 2.** Esquema que muestra los efectos de barrera de los microorganismos comensales sobre la producción intestinal de mediadores proinflamatorios como IL-8 y TNF y la prevención de la reacción inflamatoria sistémica tanto en forma proximal (intestino) como alejada (pulmón y cerebro).



SIRS, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; ECN, enterocolitis necrotizante; DBP, displasia broncopulmonar.

lo que se agrava en situaciones de estrés. Estas condiciones se acompañan frecuentemente de translocación bacteriana. La IgA es la inmunoglobulina más abundante en el ser humano, asimismo es el mayor efector del sistema inmunitario de la mucosa. En el intestino, la IgA es sintetizada por los plasmocitos de la lámina propia. Un dímero de dos moléculas de IgA ligados mediante molécula encadenante "J" es translocado desde las células epiteliales para ser transferido hacia el lumen intestinal. Otras fuentes de IgA son la secreción biliar y la transferencia pasiva a través de la leche humana en neonatos amamantados.<sup>16</sup> La presencia de IgA secretoria en el intestino es capaz de neutralizar toxinas bacterianas e infecciones por virus (rotavirus e influenza).

Otro aspecto de la barrera epitelial en el neonato inmaduro es la disfunción de la barrera bioquímica. Las células de Paneth son enterocitos especializados, se localizan en el fondo de las criptas del intestino delgado y secretan lisozima y fosfolipasa A2 y otros pequeños péptidos (también secretados por enterocitos absortivos); mediante estos mediadores se controla no solo la composición sino también la distribución de las poblaciones bacterianas. Los péptidos más significativos con actividad antibacteriana son las  $\alpha$ -defensinas, homólogas de los péptidos mediadores de los linfocitos T CD8 citotóxicos, y las angiogeninas (potente péptido antibacteriano liberado después del destete). La mayor parte de las células epiteliales secretan  $\beta$ -defensina y muchas de ellas son capaces de sobrerregular la expresión en respuesta a estímulos proinflamatorios.<sup>17,18</sup> Estos péptidos antimicrobianos tienen actividad biológica sobre un amplio espectro de microorganismos (bacterias, hongos y virus).

Diversos estudios en ratones evidencian cómo la regulación madurativa (inmadurez) altera la expresión de las  $\alpha$ -defensinas por las células de Paneth. Tanto el número de células de Paneth como la expresión de  $\alpha$ -defensina son menores en el intestino del niño prematuro (24 semanas) comparado con el del adulto. Un estudio realizado en piezas quirúrgicas de resecciones intestinales por ECN muestra un gran número de células de Paneth y transcritos de  $\alpha$ -defensinas; pese a ello, los transcritos de  $\alpha$ -defensinas son menores que en los controles. La cuestión subyacente en este hallazgo es: ¿la baja expresión de  $\alpha$ -defensinas es consecuencia de la ECN o es una muestra de susceptibilidad a padecerla?

Las prostaglandinas cumplen un importante papel en la integridad de la barrera intestinal, medido por el incremento de la resistencia de las uniones estrechas. Esta acción podría explicar la asociación entre el uso de indometacina y la perforación aislada y espontánea del intestino en prematuros extremos.

La evidencia muestra, además, que la excesiva producción de óxido nítrico (ON) se asocia a fallas en la barrera y aumento de la susceptibilidad a la ECN.<sup>19</sup> Recordamos

aquí que el ON es en extremo soluble; este radical libre es una potente molécula de comunicación intercelular e intracelular. El ON se forma por la conversión de arginina a citrulina mediada por la ON sintetasa (ONs) en sus tres isoformas. Estas isoformas están presentes en las neuronas (nONs Tipo I), la forma inducible (iONs o Tipo II) y la endotelial (eONs o Tipo III) que es la más abundante (90%). Cerca del 90% de la ONs del intestino es de Tipo III y el resto está constituido por la forma inducible. Estas formas reaccionan produciendo superóxido que, con su alto poder oxidante, lleva a mucho del daño citopático producido por el ON.

La producción de iONs está suprarregulada en niños críticamente enfermos, con resección intestinal por ECN. Esto ha sido demostrado por hibridación in situ y por estudios inmunohistoquímicos en enterocitos de piezas quirúrgicas, sugiriendo un papel del ON en la ruptura de la barrera intestinal. Los mecanismos para esto son varios: lesión epitelial directa por peroxidación de la membrana, apoptosis a través de la activación (proapoptótica) de la procaspasa 3 y daño mitocondrial por liberación del citocromo C, que llevan a la fragmentación del ADN.<sup>20</sup>

## DESARROLLO ANORMAL DEL ECOSISTEMA INTESTINAL

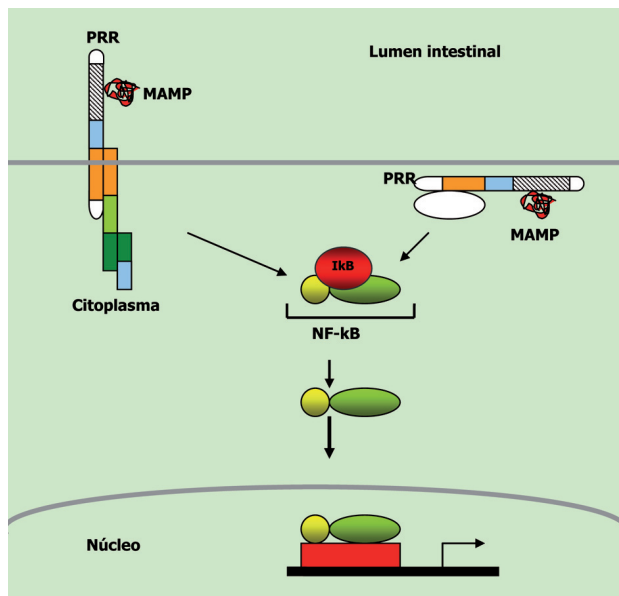
La microflora intestinal se encuentra primariamente en el colon y en el íleon distal y consiste en más de 1013 microorganismos. La denominada microbiota comprende cerca de 500 especies con aproximadamente 2 millones de genes: el "microbioma". El beneficio de esta relación de mutualismo comprende la colaboración de las bacterias comensales en la nutrición, la angiogénesis y la inmunidad en la mucosa.<sup>21</sup>

El papel nutricional está ejemplificado por la fermentación de la lactosa en el intestino distal (baja concentración de lactasa), expresado por las deposiciones de transición. Además, como resultado de ella, los ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato son usados como fuente energética en el proceso de síntesis, estimulando el flujo intestinal al afectar la proliferación y diferenciación intestinal y alterando la estructura interepitelial madurando la eficacia de las uniones estrechas. Otros beneficios de la microbiota incluyen la hidrólisis lipídica, la degradación proteica en péptidos y aminoácidos y la producción de vitaminas.

En este complejo panorama, la presencia de bacterias patógenas desencadena interacciones que han sido bien caracterizadas, como se puede observar en la figura 3.

Los PRR (*pattern recognition receptors*) son los encargados de transmitir las señales de patrones moleculares de dichas bacterias (MAMP, siglas en inglés de *microbial associated molecular patterns*) e inducir en la célula respuestas inflamatorias, proapoptóticas y antiapoptóticas. Este se-

**Figura 3.** Vía de señalamiento NF- $\kappa$ B en las células del epitelio intestinal. El PRR transmite una señal y activa el complejo NF- $\kappa$ B liberándolo de su inhibidor (I $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B ingresa en el núcleo e induce a la transcripción de genes proinflamatorios y antiapoptóticos.



PRR, patrón de reconocimiento de receptores (*Pattern recognition receptors*); MAMP, patrón molecular asociado a microbios (*Microbial associated molecular patterns*).

ñalamiento induce una cascada de activación, mediada por la liberación de un inhibidor, conocida como la vía NF- $\kappa$ B. El intestino del feto no tiene contacto con los MAMP, sino que es desde el momento del nacimiento cuando se producen los primeros pasos de la colonización bacteriana y progresivamente se instaura la flora normal.

Dado que no se han descrito casos de ECN intrauterina, se supone que las bacterias o sus genes desempeñan un papel significativo en la patogénesis de la enfermedad y especialmente cuando la colonización se realiza con gérmenes patógenos. Si bien no se conoce en profundidad el estado funcional del sistema inmunitario intestinal y sus vías de señalamiento durante el desarrollo prenatal, es de suponer que la colonización anómala afecte la maduración.

Las bacterias comensales normales inhiben la vía inflamatoria y contribuyen al mantenimiento de la homeostasis. Varios estudios *in vitro* muestran que un amplio espectro de comensales reducen la respuesta inflamatoria del epitelio intestinal por inhibición de una vía denominada NF- $\kappa$ B.

### INMADUREZ DE LA INMUNIDAD INNATA

La hipótesis que plantea que “la hipersensibilidad inflamatoria del intestino de pretérmino a la presencia de antígenos bacterianos por colonización con patógenos produce frac-

turas en la integridad del epitelio intestinal” ha llevado a la búsqueda de estrategias que mejoren la calidad de dicha colonización mediante el uso de prebióticos y priorizando la alimentación con leche humana.

En este sentido, la colonización duodenal con *Enterobacteriaceae* en RN de muy bajo peso al nacer (MBPN) o la presencia en coprocultivos de *Clostridium perfringens* se ha correlacionado con el desarrollo de ECN. La colonización anormal está condicionada por la exposición del niño a la flora presente en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN). Además, ciertas enterobacterias patógenas, como *Salmonella* y *Escherichia coli*, producen respuestas inflamatorias exageradas al estar en contacto con los PRR de los enterocitos.<sup>21</sup>

En estudios realizados con ratas, las células del intestino producen una sobreexpresión del PRR cuando reconocen antígenos bacterianos o MAMP, induciendo la producción de factor activador de plaquetas (PAF, en sus siglas en inglés) que explica en parte el desarrollo de ECN en este animal.<sup>22</sup>

La serie de eventos que induce la secuencia inflamatoria de la ECN lleva al edema de mucosa, la necrosis y la hemorragia que caracterizan el cuadro clínico de la ECN.

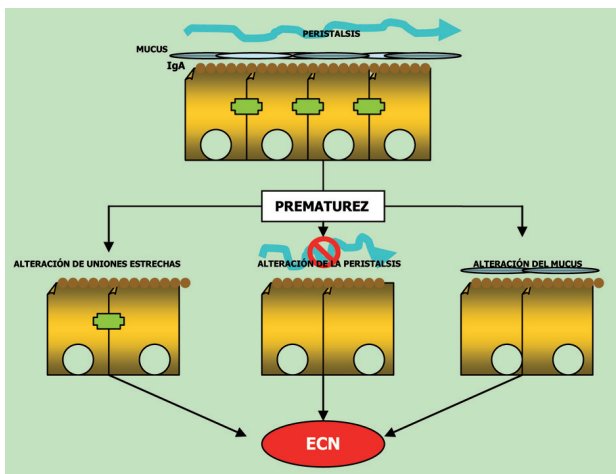
Los mediadores inflamatorios implicados en su patogénesis incluyen PAF, factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) e interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e IL-18). La respuesta inflamatoria es fuertemente regulada así como programada para reclutar leucocitos en la defensa frente a potenciales patógenos, así como en la reparación de los tejidos dañados.<sup>23</sup> Esta respuesta comienza cuando la presencia de un daño potencial induce la liberación de sustancias mediadoras y quimiotáxicas que permiten la permeabilidad capilar y atraen a los macrófagos y leucocitos.

La supervivencia del individuo requiere un ajustado sistema inmunitario intestinal para controlar la rica microbiota intestinal. Pese a esto, en ocasiones, la respuesta inflamatoria deriva en daño colateral del individuo. Los desequilibrios en la barrera intestinal por presencia de proteasas y agentes oxidantes producen rupturas que permiten el acceso de gérmenes oportunistas que normalmente no pueden atravesar la barrera.<sup>24</sup> Su presencia induce mayor respuesta inflamatoria e incrementa el daño intestinal y de otros tejidos (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; SIRS) (Fig. 4).

Algunos estudios *in vitro* sugieren que los enterocitos inmaduros presentan una hiperrespuesta inflamatoria frente a estímulos patógenos, con una expresión deficiente del inhibidor de la vía NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), que lleva a una actividad descontrolada de esta en respuesta al estímulo de los receptores PRR y TLR4 (véase Fig. 4) con la consiguiente inflamación celular y el potencial daño tisular.<sup>25</sup>

La hipótesis de la hiperrespuesta (*up regulation*) de estos receptores a la hipoxia y la alimentación enteral con la colonización intestinal nos han llevado a realizar experimentos en ratas tratadas prenatalmente con corticoides como una

**Figura 4.** Efectos de barrera de los microorganismos comensales sobre la producción intestinal de mediadores proinflamatorios como IL-8 y TNF y la prevención de la reacción inflamatoria sistémica tanto en forma proximal (intestino) como alejada (pulmón y cerebro).



ECN, enterocolitis necrotizante

forma de atenuar el efecto de la cascada inflamatoria, con resultados positivos en las ratas tratadas.

Si bien la excesiva respuesta es uno de los mecanismos en juego, es posible que simultáneamente exista una reducción del señalamiento inflamatorio que condicione simultáneamente translocación bacteriana.

La falla en la vía inflamatoria se ha desarrollado en ratones condicionados para no tener respuesta de la activación de la vía NF- $\kappa$ B; esta deriva en apoptosis de las células epiteliales frente al daño hipóxico transitorio. Es así como se produce una brecha en la barrera intestinal frente a un estímulo ambiental. La salud del huésped depende de un adecuado balance entre la exagerada actividad proinflamatoria y la inactividad de esta. Aún no sabemos cuál de las dos desempeña un papel predominante en la patogénesis de la entidad.

## MICROFLORA Y NUTRICIÓN

Los nutrientes así como las bacterias probióticas y los prebióticos —sustratos nutricionales que promueven el crecimiento de bacterias probióticas— estimulan el crecimiento de una microflora comensal<sup>26</sup> normal que interviene en la regulación de la IL-8 y la respuesta infiltrativa de neutrófilos en el intestino.

El uso de alimentación parenteral que no provee de nutrientes a través de la vía intestinal puede ser un factor coadyuvante en promover la inflamación intestinal al mantener prolongados períodos de ayuno y favorecer así el crecimiento de una flora patógena y adversa a la mucosa del intestino.

El uso de leche humana, aun en pequeños volúmenes,<sup>27</sup> tiene un efecto beneficioso que se ha relacionado principalmente con los siguientes aspectos:

- Mejoría de las funciones inmunitarias intestinales.
- Estímulo del proceso de digestión y de la absorción de nutrientes.
- Estímulo del tránsito gastrointestinal.

Asimismo, existen evidencias de que la administración de leche materna a los prematuros se asocia con un mejor neurodesarrollo alejado y probablemente con beneficios psicológicos.

Muchos estudios muestran que los niños alimentados con la leche de su madre presentan menos episodios de sepsis tardía, ECN, diarrea e infecciones urinarias, así como un menor uso de antibióticos comparados con niños alimentados con fórmula.<sup>28</sup>

Estos efectos estarían también asociados a una dosis-respuesta: a mayor cantidad de leche humana mayor efecto protector (> 50 mL/kg). Sin embargo, se ha observado en un 30% de la leche de “madres prematuras” una ausencia de IL-10, déficit que trepaba al 85% en la leche de madre de niños que desarrollaban ECN.

Durante los últimos años se ha propuesto el uso de probióticos como estrategia preventiva de la ECN. Varios estudios aleatorizados han evaluado la acción de estos mostrando no solo una disminución de la entidad sino, además, reducción de la incidencia de sepsis tardía,<sup>29,30</sup> asimismo dos metanálisis<sup>31,32</sup> avalan su uso. Es así como algunos autores proponen que el uso de probióticos debe considerarse un estándar de cuidado en RN de pretérmino. Sin embargo, algunos de ellos son cautelosos<sup>33</sup> por entender que no todos los probióticos tienen el mismo efecto, comparándolos con la elección de antibióticos de acuerdo con el tipo de germen y considerando que los estudios sobre su seguridad aún no son concluyentes.<sup>34,35</sup> El uso de probióticos no reemplaza el uso de leche humana en la alimentación del recién nacido. Pero incluso con sus evidentes beneficios, debemos tener en cuenta que las necesidades especiales de los prematuros muy pequeños, sobre todo los que pesan menos de 1 kg, motivan el requerimiento de algunos aportes, principalmente proteínas y minerales, en cantidades superiores a los que proporciona la leche humana. De allí surge la necesidad de adicionar esos elementos para que pueda ser apropiada a las necesidades, sobre todo en las etapas de más rápido crecimiento.

## CONCLUSIÓN

La ECN continúa planteando múltiples incertidumbres, aun cuando ha merecido una notable atención dentro del campo de la Neonatología en los últimos cuarenta años y se han realizado numerosas investigaciones, tanto en modelos animales como en recién nacidos humanos. Es

probable que el carácter multifactorial de su etiopatogenia constituya una dificultad para encontrar el mecanismo fisiopatológico principal.

En esta revisión nos referimos especialmente a los factores mejor estudiados y que con mayor frecuencia están implicados en la enfermedad. Cabe aclarar que solo

hemos abordado la ECN que se presenta en la población de RN prematuros, ya que constituyen más del 90% de los afectados. Sin embargo, se puede observar en RN de término e incluso en lactantes pequeños, aunque muy posiblemente en esos grupos los mecanismos difieran de los descriptos en los prematuros.

## REFERENCIAS

1. Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med*. 2011;364(3):255-64.
2. Bortolin L, Boer M, Christiansen S, et al. [Effects of prenatal steroids in the development of necrotizing enterocolitis in Wistar rat neonates]. *Arch Argent Pediatr*. 2011;109(1):24-9.
3. Lin PW, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis. *Lancet*. 2006;368(9543):1271-83.
4. Guthrie SO, Gordon PV, Thomas V, et al. Necrotizing enterocolitis among neonates in the United States. *J Perinatol*. 2003;23(4):278-85.
5. Berseth CL. Neonatal small intestinal motility: motor responses to feeding in term and preterm infants. *J Pediatr*. 1990;117(5):777-82.
6. Berseth CL, Ittmann PI. Antral and duodenal motor responses to duodenal feeding in preterm and term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1992;14(2):182-6.
7. al Tawil Y, Berseth CL. Gestational and postnatal maturation of duodenal motor responses to intragastric feeding. *J Pediatr*. 1996;129(3):374-81.
8. Sase M, Lee JJ, Ross MG, Buchmiller-Crair TL. Effect of hypoxia on fetal rabbit gastrointestinal motility. *J Surg Res*. 2001;99(2):347-51.
9. Neu J. The 'myth' of asphyxia and hypoxia-ischemia as primary causes of necrotizing enterocolitis. *Biol Neonate*. 2005;87(2):97-8.
10. Berseth CL, McCoy HH. Birth asphyxia alters neonatal intestinal motility in term neonates. *Pediatrics*. 1992;90(5):669-73.
11. Lebenthal A, Lebenthal E. The ontogeny of the small intestinal epithelium. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1999;23(5 Suppl):S3-6.
12. Di Lorenzo M, Bass J, Krantis A. An intraluminal model of necrotizing enterocolitis in the developing neonatal piglet. *J Pediatr Surg*. 1995;30(8):1138-42.
13. Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(5):G851-7.
14. Liu Z, Li N, Neu J. Tight junctions, leaky intestines, and pediatric diseases. *Acta Paediatr*. 2005;94(4):386-93.
15. Buisine MP, Devisme L, Savidge TC, Gespach C, Gosselin B, Porchet N, Aubert JP. Mucin gene expression in human embryonic and fetal intestine. *Gut*. 1998;43(4):519-24.
16. Otte JM, Kiehne K, Herzig KH. Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. *J Gastroenterol*. 2003;38(8):717-26.
17. Eckmann L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005;21(2):147-51.
18. Salzman NH, Polin RA, Harris MC, et al. Enteric defensin expression in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res*. 1998;44(1):20-6.
19. Upperman JS, Potoka D, Grishin A, et al. Mechanisms of nitric oxide-mediated intestinal barrier failure in necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg*. 2005;14(3):159-66.
20. Hackam DJ, Upperman JS, Grishin A, et al. Disordered enterocyte signalling and intestinal barrier dysfunction in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg*. 2005;14(1):49-57.
21. Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, et al. Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *J Pediatr*. 2010;156(1):20-5.
22. Fusunyan RD, Nanthakumar NN, Baldeon ME, et al. Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: toll-like receptors on fetal enterocytes. *Pediatr Res*. 2001;49(4):589-93.
23. Harris MC, D'Angio CT, Gallagher PR, et al. Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis, necrotizing enterocolitis, or sepsis syndrome: correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. *J Pediatr*. 2005;147(4):462-8.
24. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):710-20.
25. Neish AS. Molecular aspects of intestinal epithelial cell-bacterial interactions that determine the development of intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10(2):159-68.
26. Salzman NH, Polin RA, Harris MC, et al. Enteric defensin expression in necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res*. 1998;44(1):20-6.
27. Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science*. 2000;289(5484):1560-3.
28. Claud EC, Savidge T, Walker WA. Modulation of human intestinal epithelial cell IL-8 secretion by human milk factors. *Pediatr Res*. 2003;53(3):419-25.
29. Neish AS. Bacterial inhibition of eukaryotic pro-inflammatory pathways. *Immunol Res*. 2004;29(1-3):175-86.
30. Braga TD, da Silva GA, de Lira PI, et al. Efficacy of *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus casei* oral supplementation on necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight preterm infants: a double-blind, randomized, controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(1):81-6.
31. Garland SM, Tobin JM, Pirotta M, et al. The ProPrems trial: investigating the effects of probiotics on late onset sepsis in very preterm infants. *BMC Infect Dis*. 2011;11:210.
32. Deshpande G, Rao S, Patole S, et al. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics*. 2010;125(5):921-30.
33. Alfaleh K, Anabrees J, Bassler D, et al. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;(3):CD005496.
34. Tarnow-Mordi WO, Wilkinson D, Trivedi A, et al. Probiotics reduce all-cause mortality and necrotizing enterocolitis: it is time to change practice. *Pediatrics*. 2010;125(5):1068-70.
35. Deshpande GC, Rao SC, Keil AD, et al. Evidence-based guidelines for use of probiotics in preterm neonates. *BMC Med*. 2011;9:92.
36. Neu J, Shuster J. Nonadministration of routine probiotics unethical--really? *Pediatrics*. 2010;126(3):e740-1.