

EFFETTI DELLA NUTRIZIONE SULLA CRESCITA E SULLO SVILUPPO NEUROPSICOMOTORIO DEL NEONATO PRETERMINE

1. INTRODUZIONE

Le modalità di nutrizione del neonato possono influenzare la crescita e lo sviluppo neuro-psicomotorio del bambino. La gran parte dei neonati pretermine sviluppano nelle prime ore di vita un ritardo di crescita, dovuto, in parte, agli apporti nutrizionali relativamente scarsi considerata la peculiare condizione clinica. Il principale obiettivo della nutrizione del neonato prematuro è quello di garantire una crescita simile a quella di un feto di pari età gestazionale. Partendo da questo principio è stato ipotizzato che gli apporti proteici e calorici dovessero essere simili a quelli ricevuti dal feto attraverso la placenta durante l'ultimo trimestre di gestazione. Studi relativamente recenti hanno dimostrato che un elevato apporto di proteine e calorie migliora l'efficienza del metabolismo azotato nel neonato pretermine. In base a questi risultati le linee guida più recenti raccomandano un apporto di proteine pari a circa 4 g/Kg/die associato alla somministrazione di circa 110-140 kcal/Kg/die. Tuttavia, non sono disponibili al momento dati per stabilire con certezza se questo approccio nutrizionale può migliorare la crescita post-natale o lo sviluppo neurologico. Inoltre, studi recenti suggeriscono un aumento del numero di complicanze metaboliche associate all'implementazione di recenti linee guida sulla nutrizione precoce nei neonati pretermine senza un reale vantaggio in termini di crescita o sviluppo neuro-psico-motorio. Pertanto, resta ancora da stabilire quale sia il supporto nutrizionale ottimale nei primi giorni di vita nel neonato di basso peso al fine di migliorare la crescita e ottimizzare lo sviluppo cerebrale.

Vista l'impossibilità di impiegare la via enterale nei primi giorni di vita, la principale via utilizzata per la nutrizione del neonato pretermine è quella parenterale. Per quanto sia una pratica salvavita, la nutrizione parenterale si associa ad un numero elevato di complicanze ed effetti indesiderati. Al contempo non sono disponibili indici di laboratorio affidabili per verificare l'adeguatezza degli apporti nutrizionali somministrati attraverso la via parenterale. È auspicabile dunque il ricorso precoce alla nutrizione enterale, che tuttavia non è sempre possibile. D'altra parte, vista l'imaturità dell'intestino del neonato pretermine, un impiego troppo precoce della nutrizione enterale può aumentare il rischio di danno intestinale e favorire l'insorgenza dell'enterocolite necrotizzante. L'enterocolite necrotizzante (NEC) è una malattia infiammatoria dell'intestino, spesso complicata da perforazione intestinale con conseguente peritonite e morte del paziente. Nonostante i significativi progressi nell'assistenza neonatale la mortalità associata alla NEC resta particolarmente elevata. Pertanto la strategia migliore possibile è quella preventiva. Tuttavia, non esistono al momento indici di maturità intestinale, né marcatori precoci della NEC. Da studi recenti su modelli animali, è emerso un ruolo centrale della composizione del microbioma intestinale e dell'immunità innata nella patogenesi della NEC. Tuttavia il rapporto *in vivo* tra queste due componenti è ancora poco conosciuto. In particolare, l'espressione di un determinato tipo di toll like receptor (TLR-4) da parte di enterociti e cellule del sistema immunitario indica un certo grado di immaturità intestinale e può, conseguentemente aumentare il rischio di sviluppare la NEC.

Sulla base di queste considerazioni è stato definito un progetto di ricerca che vede coinvolti neonatologi, immunologi, microbiologi ed esperti del neurosviluppo infantile dei Dipartimenti di Pediatria e Microbiologia dell'Università La Sapienza di Roma. Gli obiettivi del progetto sono di seguito indicati:

1. Valutare l'impatto dell'apporto proteico e calorico nei primi giorni di vita su morbilità, crescita corporea e sviluppo neuro-psicomotorio del bambino

2. Identificare marcatori precoci di tossicità di nutrizione parenterale nel neonato pretermine,
3. Studiare la relazione tra composizione del microbioma intestinale e attivazione del segnale TLR nei neonati a rischio di sviluppare NEC
4. Identificare marcatori precoci di NEC nei soggetti a rischio.

2. METODOLOGIA

2.1. Criteri di inclusione ed esclusione

Saranno inclusi nello studio, neonati con età gestazionale inferiore a 32 settimane e/o peso inferiore <1500 grammi, consecutivamente osservati presso la TIN del Policlinico Umberto I. Saranno esclusi neonati con le seguenti condizioni: pH del sangue <6.8 alla nascita, malformazioni fetali, storia materna di infezioni e disordini immunologici.

2.2. Classificazione dei neonati arruolati

I neonati arruolati saranno divisi in due gruppi: Gruppo A) neonati pretermine asintomatici, Gruppo B) neonati con sospetta NEC (sintomatici).

2.3. Raccolta dati clinici relativi al periodo neonatale

Per ogni soggetto arruolato saranno raccolte informazioni riguardo la storia prenatale (rischio di infezioni, flussimetria, IUGR, disturbi della pressione, distacco della placenta, steroidi) e perinatale (EG, peso alla nascita, parto, punteggio di Apgar, punteggio CRIB II, temperatura, pH e BE dal sangue cordone), informazioni significative sociodemografiche, inizio della nutrizione enterale, tempo per raggiungere la nutrizione enterale esclusiva, uso del latte materno, nutrizione parenterale. Verranno inoltre registrati dati sul supporto respiratorio, accesso intravascolare, terapia farmacologica, insorgenza e valutazione delle principali patologie di prematurità (es. NEC, IVH, PVL, PDA, ROP, BPD, sepsi), morte e modalità della dimissione (a casa o trasferito ad altri ospedali).

2.4. Apporto nutrizionale

L'apporto di nutrienti enterali e parenterali effettivi verranno registrati in tutti i neonati fino al compimento della 40[°] settimana di età post-concezionale. L'apporto medio di proteine e calorie sarà calcolato per le prime quattro settimane basandosi sull'apporto reale, quindi per le prime 2 settimane sulla composizione del latte materno transitorio prematuro (65 kcal e 1.5 g di proteine /100 mL) e successivamente sulla composizione del latte materno maturo (72 kcal e 1.4 g di proteine /100 mL). Saranno registrati gli episodi di intolleranza alimentare che richiedono sospensione della nutrizione enterale per almeno 12 ore.

2.5. Studio delle complicanze metaboliche della nutrizione parenterale

Misureremo a 1, 2, 4 e, quando possibile, a 8 e 12 settimane di età postconcezionale i livelli sierici di glucosio, trigliceridi, urea, creatinina, sodio, potassio, cloro, calcio, fosforo, magnesio, fosfatasi alcalina, emoglobina, pH, eccesso di base, pCO₂.

2.6. Definizione de tasso di morbilità

La morbilità è stata definita come il verificarsi di almeno una delle seguenti condizioni durante il ricovero: enterocolite necrotizzante, emorragia intraventricolare, leucomalacia periventricolare, retinopatia della prematurità, displasia broncopolmonare, sepsi e anemia. La diagnosi di queste condizioni sarà eseguita secondo criteri standardizzati.

2.7. Studio della crescita corporea

La crescita verrà stabilita in base alla misurazione del peso da 0 a 14 giorni di vita, a 28 giorni, a 36 e 40 w; della lunghezza e della circonferenza cranica a 0 e 28 giorni di vita, a 36 e 40 w.

I parametri di crescita utilizzati durante lo studio saranno:

Recupero peso nascita

Z score a 36 e 40 settimane

La velocità di crescita sarà calcolata con il metodo Patel.

Crescita staturponderale, e composizione corporea (BMI) a 24 mesi di vita

2.8. Definizione dello sviluppo neuro-psico-motorio

La valutazione dello sviluppo neurologico e neurocomportamentale sarà effettuata in epoca neonatale (fino al compimento di 36-40 settimane di età postconcezionali) mediante la scala di NNSS, nei primi 2 anni di vita mediante la scala di Bayley-III (Bayley Scales of Infant and Toddler Development), e dal secondo al 4 anno vita mediante scala di Griffith. I dati relativi alla necessità di linguaggio e terapia del linguaggio, fisioterapia, terapia occupazionale, terapia del neurosviluppo, intervento precoce dell'insegnante e follow-up della dieta saranno raccolti da esperti dello studio dello sviluppo neuropsicomotorio del bambino. La paralisi cerebrale o la compromissione motoria saranno definite dai neurologi con il punteggio di classificazione della funzione motoria lorda (GMFCS).

2.9. Misurazione indici di laboratorio

2.9.1 Raccolta e conservazione campioni biologici

2.9.1a. Campioni di sangue.

Tempi di raccolta. Nel gruppo A: i campioni saranno prelevati alla nascita dal cordone (T0), da 0 a 7 giorni (T1a: 0-3 giorni; T1b: 4-7 giorni), al 28 ° giorno (T2) e a 36 settimane di età gestazionale (T3). Nel gruppo B i campioni saranno prelevati all'insorgenza dei sintomi di sepsi o NEC (Ti) e 1 settimana dopo (Tii). I campioni saranno prelevati quali aliquote di prelievi ematici routinari, senza ulteriori prelievi aggiuntivi. Ogni prelievo consisterà in 0,5 ml di sangue intero che sarà suddiviso in quote uguali per la valutazione della risposta immunitaria, per gli studi microbiologici.

Conservazione. Il sangue sarà lasciato a coagulare per 30 minuti e centrifugato per 20 minuti a 2000 rpm. Il plasma e il siero saranno divisi in aliquote da 250 µl e congelati a -20 ° C in provette sterili prive di pirogeni.

2.9.1b. Campioni fecali

Tempo di raccolta. Nel gruppo A: i campioni saranno ottenuti a T0, T1, T2 e T3. Nel gruppo B: i campioni saranno ottenuti a Ti e Tii. Per ciascun neonato verranno raccolti almeno 4 campioni di feci per studi immunologici e microbiologici. Conservazione. I campioni di feci verranno conservati a -80 ° C in provette sterili.

2. 10. Analisi indici di laboratorio

2. 10.1 Studio di marcatori di tossicità della nutrizione parenterale

La determinazione dei livelli di aminoacidi plasmatici verrà effettuata, a partire dalla raccolta di campioni ematici su cartoncino di Guthrie, a 7, 14 e 28 giorni di vita mediante spettrometria di massa tandem. Studieremo tra questi la citrullina ed i suoi metaboliti come marcatori di funzionalità intestinale nel neonato pretermine al fine di valutare la tolleranza della nutrizione parenterale ed enterale.

2.10.2 Studio della risposta immune

2.10.2.1 Misura delle citochine fecali. Le concentrazioni fecali di interleuchina-8 (IL-8), IL-1β, fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-α), gamma interferone (IFN-γ) e immunoglobulina A (IgA) saranno determinate mediante ELISA quantitativo (Sistemi R & S , Minneapolis, MN).

2.10.2.2 Misura di proteine TLR4 e A20. I campioni fecali saranno utilizzati per rilevare il livello di espressione delle proteine TLR4 e A20. Una curva di calibrazione verrà utilizzata per

determinare la sensibilità di rilevamento immunoblot (numero di cellule). La curva di calibrazione sarà ottenuta utilizzando la linea cellulare Caco2.

Studi microbiologici

I campioni fecali verranno immediatamente conservati a + 4 ° C e la composizione microbiologica sarà determinata utilizzando procedure diagnostiche standard. I valori CFU verranno calcolati per valutare il carico batterico per grammo di campione (CFU / g). La presenza di agenti patogeni batterici e di virus intestinali comuni verrà rilevata mediante PCR qualitativa (Azienda Biomerieux). L'identificazione delle specie batteriche verrà effettuata sequenziando la regione di codifica del 16S rDNA. Le sequenze saranno confrontate con le sequenze disponibili nella GenBank utilizzando il software BLAST, e le specie corrispondenti saranno assegnate in base al punteggio di allineamento.

Statistica

Il test del chi-quadro sarà applicato in caso di variabili categoriche. Le variabili continue saranno espresse come media e intervallo di confidenza (CI) al 95%. L'analisi di regressione lineare con metodo graduale, verrà utilizzata per studiare il possibile effetto confondente delle diverse variabili sugli outcome dello studio. Un valore di $p < 0.05$ sarà considerato significativo. L'analisi statistica verrà effettuata utilizzando il pacchetto software SPSS per Windows (versione 16.0.0, SPSS Inc., Chicago, Ill, USA) e StatsDirect (release 2.6.6).

3. Eticità

Lo studio sarà eseguito in conformità con gli standard internazionali di "good clinical practice". Il consenso informato verrà richiesto a tutti i genitori dei neonati arruolati nello studio con apposita scheda.

4. BIBLIOGRAFIA essenziale

- Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):379-90.
- Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med.* 2011;364(3):255-64.
- Hackam DJ, Good M, Sodhi CP. Mechanisms of gut barrier failure in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis: Toll-like receptors throw the switch. *Semin Pediatr Surg.* 2013 May;22(2):76-82.
- Leaphart CL, Cavallo J, Gribar SC, Cetin S, Li J, Branca MF, Dubowski TD, Sodhi CP, Hackam DJ. A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J Immunol.* 2007;179(7):4808-20.
- Neal MD, Sodhi CP, Dyer M, Craig BT, Good M, Jia H, Yazji I, Afrazi A, Richardson WM, Beer-Stolz D, Ma C, Prindle T, Grant Z, Branca MF, Ozolek J, Hackam DJ. A critical role for TLR4 induction of autophagy in the regulation of enterocyte migration and the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Immunol.* 2013;190(7):3541-51.
- Morowitz MJ, Poroyko V, Caplan M, Alverdy J, Liu DC. Redefining the role of intestinal microbes in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Pediatrics.* 2010;125(4):777-85.
- Stewart C, Marrs E, Magorrian S, Nelson A, Lanyon C, Perry JD, Embleton ND, Cummings SP, Berrington JE. The preterm gut microbiota: changes associated with necrotizing enterocolitis and infection. *Acta Paediatr.* 2012;101(11):1121-7.
- Ibrahim ZA, Armour CL, Phipps S, Sukkar MB. RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours? *Mol Immunol.* 2013;56(4):739-44.
- Vitali R, Stronati L, Negroni A, Di Nardo G, Pierdomenico M, del Giudice E, Rossi P, Cucchiara S. Fecal HMGB1 is a novel marker of intestinal mucosal inflammation in pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(11):2029-40.

- Belderbos M, Levy O, Bont L. Neonatal innate immunity in allergy development. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21(6):762-9.
- Lisciandro JG, van den Biggelaar AH. Neonatal immune function and inflammatory illnesses in later life: lessons to be learnt from the developing world? *Clin Exp Allergy.* 2010;40(12):1719-31.
- Tronick EZ, Lester BM. The NICU Network Neurobehavioral Scale: a comprehensive instrument to assess substance-exposed andahigh-risk infants. *NIDA Res Monogr.* 1996; 166:198-204
- Spittle AJ, Walsh JM, Potter C, McInnes E, Olsen JE, Lee KJ, Anderson PJ, Doyle LW, Cheong JL. Neurobehaviour at term-equivalent age and neurodevelopmental outcomes at 2 years in infants born moderate-to-late preterm. *Dev Med Child Neurol* 2016 Oct 24
- Spittle AJ, Walsh JM, Olsen JE, McInnes E, Eeles AL, Brown NC, Anderson PJ, Doyle LW, Cheong JL. Neurobehaviour and neurological development in the first month after birth for infants between 32-42 week's gestation. *Early Hum Dev.* 2016 Mar 7;96:7-14.