

Enterocolitis necrotizante experimental con lipopolisacárido oral y función protectora de la leche materna

M. Gómez Cervantes¹, P. Luengo Batres², N. Huertos Soto², C. Rodríguez Bobada², M.J. Fernández Aceñero³, C. Soto Beauregard¹

¹Servicio de Cirugía Pediátrica, Instituto del Niño y del Adolescente (INA); ²Servicio de Cirugía Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria (IdISSC); ³Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínico San Carlos. Madrid.

RESUMEN

Introducción. La enterocolitis necrotizante (ECN) es una enfermedad potencialmente mortal que afecta a los neonatos, y frente a la que la leche materna ha demostrado tener un papel protector. Administrando lipopolisacáridos (LPS) por vía oral en ratas recién nacidas (RRN), hemos desarrollado un modelo experimental para inducir un daño intestinal similar al que provoca la ECN con objeto de evaluar el aspecto macroscópico y microscópico del intestino, y de ese modo, analizar la presencia de ECN y estudiar el papel que desempeña la leche materna (LM).

Material y métodos. Las RRN se dividieron en tres grupos: el grupo A (control, n= 10) permaneció con su madre; el grupo B (LPS, n=25) fue aislado tras el nacimiento, alimentado por sonda con una fórmula especial para ratas y LPS oral, y sometido a estrés (hipoxia tras sonda); y el grupo C (LM, n= 12) fue alimentado con leche materna tras el nacimiento y posteriormente aislado y sometido a estrés al igual que el grupo B. El día 4 se sacrificó a las RRN y se recuperaron sus intestinos para su posterior evaluación.

Resultados. En el grupo de control, no se observó ECN ni macroscópica ni histológicamente, mientras que los dos grupos sometidos a estrés (B y C) presentaron una incidencia global de la ECN del 73%. La mayoría de los sujetos del grupo B desarrollaron signos histológicos de ECN (85%), y los del grupo C registraron una incidencia de la ECN estadísticamente menor (50%, p= 0,04), lo que significa que la LM desempeña una función protectora frente a la ECN (OR= 0,19; IC 95%: 0,40-0,904).

Conclusión. Nuestro modelo reveló una incidencia significativa de la ECN en RRN (73%), desempeñando la LM la misma función protectora que en el caso de los humanos recién nacidos, lo que significa que este modelo experimental de ECN es fiable y reproducible. Gracias a dicho logro, podremos investigar nuevos y potenciales objetivos terapéuticos para una peligrosa enfermedad que, a día de hoy, carece de tratamiento.

PALABRAS CLAVE: Enterocolitis necrotizante; Experimentación animal; Animales; Recién nacido; Leche materna.

DOI: 10.54847/cp.2024.02.04

Correspondencia: Dr. Manuel Gómez Cervantes. Hospital Clínico San Carlos. Calle del Prof. Martín Lagos, s/n. 28040 Madrid
E-mail: dr.cervantes@gmail.com

Recibido: Febrero 2024

Aceptado: Marzo 2024

EXPERIMENTAL NECROTIZING ENTEROCOLITIS USING ORAL LIPOPOLYSACCHARIDE AND PROTECTIVE ROLE OF BREASTMILK

ABSTRACT

Introduction. Necrotizing enterocolitis (NEC) is a life-threatening condition that afflicts neonates. Breastfeeding has demonstrated to play a protective role against it. By administering lipopolysaccharides (LPS) orally in newborn rats (NBR), we have developed an experimental model to induce NEC-like gut damage. Our aim was to assess the macroscopic and microscopic appearance of the gut, to evaluate the presence of NEC and study the role of breast milk (BM).

Material and methods. NBR were divided into 3 groups: Group A (control, n= 10) remained with the mother, group B (LPS, n= 25) was isolated after birth, gavage-fed with special rat formula and oral LPS, then submitted to stress (hypoxia after gavage) and group C (BM, n= 12) was breastfed once after birth, then isolated, and submitted to stress like group B. On day 4, NBR were sacrificed, and intestine was harvested and assessed.

Results. In the control group NEC was not present either macroscopically or histologically. Both groups submitted to stress (B and C) presented a global incidence of NEC of 73%. Most of group B developed histologic signs of NEC (85%) and group C showed a statistically lower incidence of NEC (50%, p= 0.04), playing the BM a protective role against NEC (OR= 0.19; 95% CI: 0.40- 0.904)

Conclusion. Our model showed a significant incidence of NEC in NBR (73%) with the same protective role of BM as in newborn humans, achieving a reliable and reproducible experimental NEC model. This will allow us to investigate new potential therapeutic targets for a devastating disease that currently lacks treatment.

KEY WORDS: Enterocolitis, necrotizing; Animal experimentation; Animals, newborn; Breastfeeding.

INTRODUCCIÓN

La enterocolitis necrotizante (ECN) es una enfermedad frecuente y potencialmente mortal que afecta a los neonatos prematuros y con un peso inferior a los 1.500 g^(1,2). Sus consecuencias a corto y largo plazo pueden ser clínicamente

significativas, con elevadas tasas de mortalidad que oscilan entre el 15% y el 30%⁽³⁾.

Con las actuales líneas de tratamiento (reposo intestinal, antibióticos intravenosos de amplio espectro, cirugía), la evolución de la enfermedad continúa siendo incierta en la mayoría de los casos, por lo que su prevención resulta fundamental. La leche materna ha demostrado desempeñar una función protectora frente a la ECN gracias a los oligosacáridos y los componentes inmunitarios que posee, además de disminuir el pH gástrico, incrementar la motilidad y reducir la permeabilidad epitelial. Así pues, en la actualidad, el empleo de la leche humana (incluso de donantes) cuenta con el apoyo y la recomendación de diversas guías pediátricas internacionales como primera opción de nutrición enteral para recién nacidos, especialmente los prematuros y con bajo peso⁽⁴⁻⁶⁾.

El desarrollo de modelos experimentales válidos puede resultar una herramienta eficaz a la hora de entender su fisiopatología y explorar nuevas rutas que puedan llevarnos a encontrar objetivos terapéuticos novedosos^(7,8).

Hoy en día existen diversos modelos diseñados para replicar la ECN en recién nacidos, uno de los cuales emplea RRN⁽⁹⁻¹³⁾. En el contexto de ese modelo, la utilización de hipoxia y fórmulas hiperosmolares conduce a una situación isquémica en la que se aprecia un daño intestinal similar al que provoca la ECN⁽¹⁴⁾. Sin embargo, la reproducibilidad de esta patología a partir del citado modelo aún varía entre los distintos estudios, con una prevalencia que oscila entre el 35% y el 71%^(9,10). Para superar este problema y reducir la variabilidad, se ha introducido el uso de lipopolisacárido oral (LPS) con objeto de hacer aumentar la incidencia de la ECN y su gravedad^(2,9), además de reproducir la carga bacteriana que se observa en los bebés humanos afectados de ECN⁽¹⁵⁾.

Según nuestra experiencia, el empleo de hipoxia y fórmulas hiperosmolares per se no resulta suficiente para desarrollar ECN en RRN. Por ello, el objetivo de nuestro estudio consistía en evaluar la eficacia del LPS oral, así como de la hipoxia y la fórmula hiperosmolar, a la hora de inducir un daño intestinal similar al que provoca la ECN analizando el aspecto macroscópico (dilatación, neumatosis, necrosis...) y microscópico del intestino. También se pretendía investigar el papel que desempeña la leche materna en RRN sometidas a estrés con un daño intestinal parecido al que induce esta enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

El protocolo experimental se desarrolló conforme a las directrices éticas sobre investigación en ciencia animal (directrices ARRIVE y normativa europea: directiva 2010/63/EU), y el proyecto recibió la aprobación del Comité de Ética de Experimentación con Animales del Hospital Clínico San Carlos (#280790000088; PROEX 196.4/21; CEEA 21/0 04-III).

Se emplearon RRN Wistar nacidas a término. Nada más nacer, los sujetos fueron pesados y asignados a uno de estos tres grupos: grupo A (control, n= 10), en el que las RRN

permanecieron con su madre para ser alimentadas con leche materna *ad libitum* y no fueron sometidas a estrés; grupo B (LPS, n= 25), en el que las RRN fueron separadas de su madre nada más nacer y recibieron inducción por sonda de daño intestinal similar al que provoca la ECN con fórmula especial para ratas, seguido de 10 minutos de hipoxia (5% O₂, 95% N₂) cada 6 horas, y de LPS oral que se añadió a la primera ingesta los días 1 y 2, mezclado con la fórmula; y grupo C (LM, n= 12), en el que las RRN permanecieron con su madre para ser alimentadas por ella (de forma que la primera ingesta oral fuera de leche materna), tras lo cual se les separó de su progenitora y se les indujo ECN de modo similar al grupo B.

Las RRN fueron alimentadas por sonda a través de un catéter de silicona de 2 Fr cuatro veces al día con sustitutivo especial de leche de rata preparado con 10 ml de fórmula de leche humana 60:40 (Blemil plus 1[®], ratio suero-caseína 60:40) en 30 ml de complemento para perros Esbilac[®], tal y como describen Barlow *et al.*⁽¹⁷⁾. En el primer y segundo días de vida, se administró 4 mg/kg/día de LPS oral (lipopolisacárido de *Escherichia coli*, 0127: B8-Bioxtra -1 mg/ml-) mezclado con la fórmula alimenticia a los sujetos de los grupos LPS y LM.

Los grupos sometidos a estrés (LPS y LM) fueron expuestos durante 10 minutos tras cada ingesta a estrés hipóxico sistémico, respirando una mezcla de gas compuesta por un 5% de O₂ y un 95% de N₂, tal y como relatan Nadler *et al.*⁽¹⁶⁾. La fracción de oxígeno inspirado se comprobó mediante un monitor de oxígeno.

Las RRN aisladas de sus madres permanecieron en incubadora, dotadas de un espacio adecuado para su desarrollo, y con una temperatura controlada por termómetro de 30°C⁽¹⁸⁾.

Cada seis horas, las ratas de los grupos B y C fueron sometidas a controles antes de la alimentación por sonda utilizando un sistema de gravedad basado en la exploración física (aspecto de la piel, peso...) y su comportamiento para asegurar su bienestar (Tabla I), siguiendo el marco de evaluación de la gravedad de la Unión Europea⁽¹⁹⁾. Si la RRN recibía una puntuación mayor que 2, se procedía a una exploración más detallada, mientras que si la puntuación era superior a 5, el animal era sacrificado para evitarle cualquier tipo de dolor o sufrimiento.

Todas las RRN (grupos A, B y C) fueron sacrificadas el día 4, excepto las que murieron o fueron sacrificadas por padecer signos relacionados con la ECN antes de la finalización del estudio. Nada más sacrificarlas, se recuperó el tracto gastrointestinal y se inspeccionó visualmente para encontrar signos típicos de la ECN. Se llevó a cabo un análisis macroscópico del intestino delgado y el colon mediante un sistema de puntuación basado en el color intestinal, el grado de dilatación y la consistencia del intestino, tal y como sugieren y validan Zani *et al.*⁽⁹⁾ (Tabla II).

Para la evaluación microscópica, se fijó todo el intestino en formaldehído durante 3 días, y el tejido se procesó con deshidratación hasta ser envuelto en parafina. Los cortes histológicos se realizaron con microtomo (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania) a 4 micrones, y se llevó a cabo tinción

Tabla I. Puntuación del grado de anomalía clínica para la evaluación del estado clínico de las ratas recién nacidas.

<i>Aspecto</i>
0 = Tónica y bien hidratada
1 = Más delgada, pero igualmente tónica e hidratada
2 = Delgada, flácida y deshidratada
3 = Ahogándose y agonizando
<i>Actividad natural</i>
0 = Movimiento normal
1 = Capaz de retorcerse de un lado a otro si se le coloca en posición supina
2 = Incapaz de retorcerse de un lado a otro si se le coloca en posición supina
3 = Incapaz de mover las extremidades e inmóvil
<i>Respuesta al tacto</i>
0 = Alerta
1 = Respuesta a estimulación leve
2 = Respuesta a estimulación vigorosa
3 = Sin respuesta pese a recibir estimulación vigorosa
<i>Color corporal</i>
0 = Rosa
1 = Pálido (solo las extremidades)
2 = Pálido (todo el cuerpo)
3 = Gris

Tabla II. Sistema de puntuación para la evaluación macroscópica intestinal validada por Zani *et al.*⁽⁹⁾

<i>Consistencia intestinal</i>
0 = Normal
1 = Moderadamente friable
2 = Extremadamente friable (como gelatina)
<i>Color intestinal</i>
0 = Normal
1 = Decoloración desigual
2 = Decoloración extensa
<i>Dilatación intestinal</i>
0 = Sin dilatación
1 = Dilatación desigual
2 = Dilatación extensa

con hematoxilina-eosina. A continuación, se empleó el sistema de puntuación modificado de Nadler *et al.*^(9,16) para clasificar el daño histológico, tal y como se muestra en la figura 1.

Los datos fueron analizados con el programa IBM SpSS Statistics V.29.0. El aspecto macroscópico entre los grupos se comparó mediante la prueba de Mann-Whitney, mientras que la presencia de ECN en los grupos B y C fue comparada utilizando la prueba exacta de Fisher. Asimismo, se calculó la OR para averiguar si la leche materna actúa como elemento

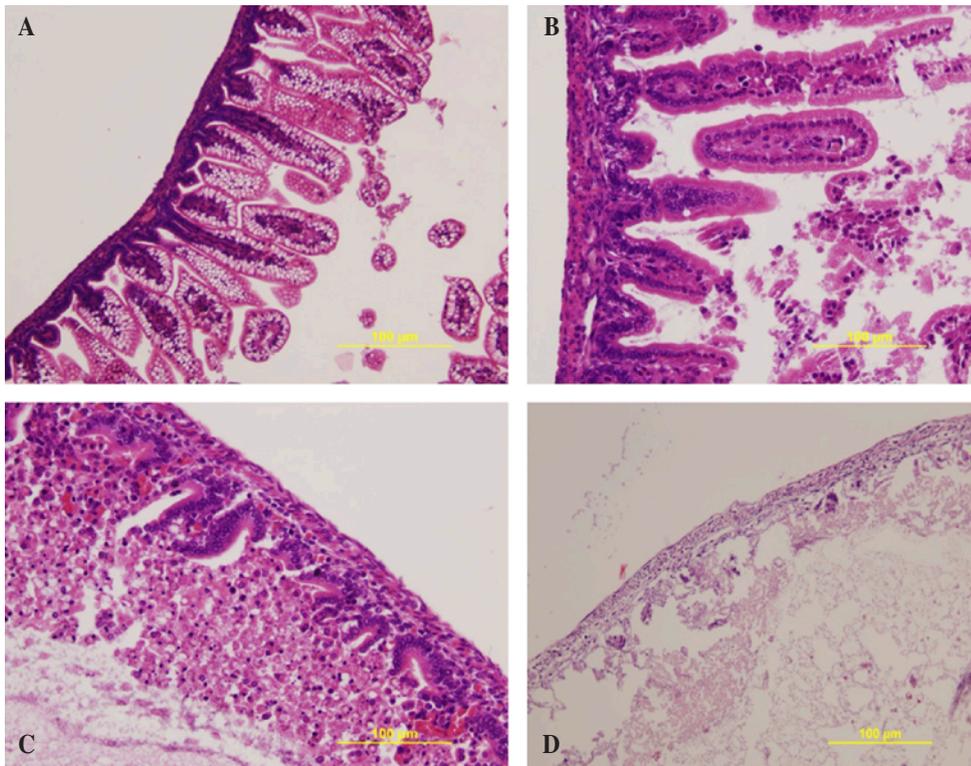


Figura 1. Hallazgos intestinales histológicos en RRN según la escala de Nadler⁽¹⁶⁾, considerándose diagnóstico de ECN grados ≥ 2 (tinción con hematoxilina-eosina): A) Grado 0-1: intestino normal, apreciándose desorganización enterocítica de las vellosidades; B) Grado 2: desorganización enterocítica de las vellosidades y grave separación del núcleo de las vellosidades; C) Grado 3: descamación epitelial de las vellosidades; D) Grado 4: necrosis/perforación intestinal.

Tabla III. Hallazgos microscópicos entre los grupos según la escala de Nadler⁽¹⁶⁾: el grupo LPS mostró una mayor incidencia y mayores lesiones graves asociadas a la ECN.

		Grupo A (Control)	Grupo B (LPS)	Grupo C (LM)
ECN	Grado 0	9	0	0
	Grado 1	1	7	6
	Grado 2	0	3	1
	Grado 3	0	10	4
	Grado 4	0	5	1
Total		10	25	12
Valor p		0,001		
		0,04 (OR= 0,19)		
		0,001		

Valores $p < 0,05$ considerados estadísticamente significativos.

de protección frente a la ECN, al igual que sucede en los neonatos humanos.

RESULTADOS

Respecto al estado clínico, las RRN de los grupos LPS y LM empezaron a mostrar signos y síntomas de ECN (paliidez, deshidratación y distensión abdominal) a las 48 horas. Los dos grupos sometidos a estrés registraron una mortalidad global del 89%. En el grupo LPS, la mortalidad fue del 92%, incluidas las RRN que fueron eutanasiadas y las que murieron antes de la última ingesta el día 4. En el grupo LM, la mortalidad fue de aproximadamente el 83%, es decir, algo menor que en el grupo LPS, pero sin que dicha diferencia alcanzara significación estadística.

Macroscópicamente hablando, en el grupo control no se observaron signos de daño intestinal. Por su parte, en el grupo LPS, el 72% de los sujetos mostraron cambios en el aspecto, consistencia y dilatación del intestino (puntuación ≥ 3), mientras que en el grupo LM, los sujetos presentaron menores daños a nivel macroscópico (58%, puntuación < 3), con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,002$). En el grupo LPS se registraron los mayores hallazgos macroscópicos potencialmente asociables al desarrollo de ECN.

En el examen histológico, el grupo control no mostró ningún cambio o anomalía a nivel intestinal, con excepción de un sujeto con ECN de grado 1 tanto en el intestino delgado como en el grueso. Sin embargo, en los dos grupos sometidos a estrés (grupos LPS y LM), la incidencia global de la ECN (grado 2 o superior) fue del 72,9%. La mayoría de las lesiones se encontraron en el intestino delgado, aunque también se hallaron signos de ECN en colon y recto.

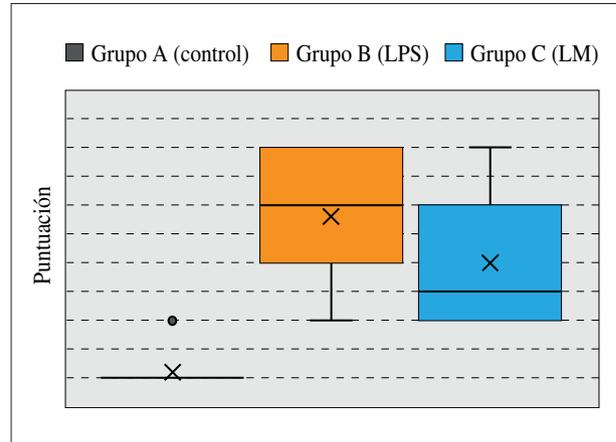


Figura 2. Hallazgos macroscópicos según el sistema de puntuación propuesto por Zani y cols.⁽⁹⁾ para la evaluación del aspecto, color y dilatación intestinales (como se muestra en la tabla II): las RRN del grupo LPS registraron una puntuación significativamente mayor en comparación con las del grupo LM.

Si comparamos los resultados de los grupos LPS y LM, la incidencia de la ECN fue significativamente menor en el grupo de leche materna ($p = 0,04$), actuando esta última como elemento de protección ($OR = 0,19$; $IC\ 95\%: 0,40-0,904$) frente a la ECN (Tabla III).

DISCUSIÓN

Una agresión inicial como pueda ser la hipoxia genera daños leves a la mucosa, con el consiguiente aumento de su permeabilidad. Pues bien, dicho aumento se considera un elemento clave en el desarrollo de la ECN, dado que posibilita la translocación bacteriana, el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares y el posterior daño a los tejidos.

Existen diversos modelos de ECN experimental basados en hipoxia, en fórmula especial para ratas o en ambos⁽¹⁶⁾, con una incidencia del daño intestinal similar al que provoca la ECN de entre el 35% y el 71%. Sin embargo, nuestro grupo no ha sido capaz de replicar estos modelos, observando una incidencia de la ECN variable y mucho menor. Es precisamente esta falta de coherencia la que hasta ahora no nos ha permitido publicar ninguno de los resultados.

Para aumentar la incidencia y gravedad de la ECN experimental, algunos autores⁽²⁾ abogan por añadir lipopolisacárido a la fórmula enteral administrada a las RRN, con el objetivo de simular la carga bacteriana que se genera en los neonatos afectados de ECN.

Con esta última modificación, y llevando a cabo una evaluación macroscópica siguiendo los criterios de Zani *et al.*⁽⁹⁾, hemos logrado una mayor y más grave incidencia de la ECN.

La mortalidad asociada a la ECN fue significativamente mayor en los grupos sometidos a estrés. Aunque la mortalidad fue superior en el grupo LPS, no se hallaron diferencias signi-

ficativas en comparación con el grupo LM, probablemente a causa del reducido tamaño muestral. No obstante, al analizar los datos macroscópicos y microscópicos, se observó un mayor daño y una mayor incidencia de la ECN en el grupo que recibió LPS oral, lo que significa que este último potencia los efectos, facilitando así que se produzcan daños intestinales similares a los que provoca la ECN.

La ECN es la enfermedad perinatal adquirida con la mayor morbi-mortalidad, llegando a afectar a órganos remotos como el cerebro y aumentando considerablemente el riesgo de que los lactantes puedan sufrir retrasos en su neurodesarrollo^(20,21). A pesar de décadas de investigación, la patogénesis de esta enfermedad sigue sin estar clara, y las estrategias de prevención son limitadas y no del todo exitosas. Una estrategia fundamental para los lactantes prematuros ha sido la administración de leche humana, tanto de la propia madre como de donantes.

Los componentes bioactivos de la leche materna colaboran entre sí para ofrecer diversos niveles de protección frente a la ECN, con efectos inmunomoduladores, antiinfecciosos, antioxidantes, colonizadores del intestino e impulsores del crecimiento⁽²²⁻²⁴⁾.

Al igual que los neonatos humanos, las RRN tienen un sistema inmunitario relativamente débil. Parte de su suministro total de IgG se recibe a través del saco vitelino, mientras que el resto debe absorberse intacto de la leche materna a través del intestino. Por tanto, no es de extrañar que la leche materna ofreciera protección frente al desarrollo de la ECN en RRN, incluso en cantidades tan modestas.

Habida cuenta de las particularidades que presentan los neonatos en términos de fisiopatología y farmacodinámica, los nuevos tratamientos que se propongan para la ECN deberán basarse en estudios específicos más que en extrapolaciones de tratamientos eficaces para niños más mayores o adultos. Así pues, es importante desarrollar modelos específicos para recién nacidos que propongan nuevos objetivos terapéuticos⁽²⁵⁻²⁷⁾ para una enfermedad que sigue sin tener cura.

El empleo combinado de LPS oral, hipoxia y fórmula especial para ratas nos permitió replicar un modelo experimental de ECN, con una incidencia significativa del 73%. El modelo parece actuar de una manera muy similar a la ECN en neonatos humanos, puesto que la LM también actúa como elemento de protección y reduce su incidencia.

El desarrollo de este modelo nos permitirá explorar nuevos objetivos terapéuticos para una gravísima enfermedad en la que la prevención es la única herramienta eficaz.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de Fisiopatología y Terapéutica del INA (Neuro-INA-EN), y especialmente al Dr. Martínez Orgado y los miembros del laboratorio 5.

Al personal de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, y especialmente a la Dra. M.^a Cruz Rodríguez-Bobada González del Campo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rich BS, Dolgin SE. Necrotizing enterocolitis. *Pediatr Rev.* 2017; 38: 552-9.
2. Feng J, El-Assal ON, Besner GE. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor decreases the incidence of necrotizing enterocolitis in neonatal rats. *J Pediatr Surg.* 2006; 41: 144-9.
3. Henry MCW, Moss RL. Neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg.* 2008; 17: 98-109.
4. Eidelman AI, Schanler RJ, Johnston M, Landers S, Noble L, Szucs K, et al. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 2012; 129: e827-41.
5. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet.* 1990; 336: 1519-23.
6. Kantorowska A, Wei JC, Cohen RS, Lawrence RA, Gould JB, Lee HC. Impact of donor milk availability on breast milk use and necrotizing enterocolitis rates. *Pediatrics.* 2016; 137: e20153123.
7. Del Pozo A, Villa M, Vargas C, Castejón D, Fernández-Valle ME, Gutiérrez-Rodríguez A, et al. Intraventricular hemorrhage induces inflammatory brain damage with blood-brain barrier dysfunction in immature rats. *Pediatr Res.* 2023; 93: 78-88.
8. Ceprián M, Jiménez-Sánchez L, Vargas C, Barata L, Hind W, Martínez-Orgado J. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery in a neonatal rat model of arterial ischemic stroke. *Neuropharmacology.* 2017; 116: 151-9.
9. Zani A, Cordischi L, Cananzi M, De Coppi P, Smith V, Eaton S, et al. Assessment of a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg.* 2008; 18: 423-6.
10. Zamora R, Bryan NS, Boyle P, Wong C, Milsom AB, Jaffe R, et al. Nitrosative stress in an animal model of necrotizing enterocolitis. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39: 1428-37.
11. Caplan MS, Sun XM, Hsueh W. Hypoxia causes ischemic bowel necrosis in rats: the role of platelet-activating factor (PAF-acether). *Gastroenterology.* 1990; 99: 979-986.
12. Akisu M, Küllahçıoğlu Girgin F, Baka M, Hüsseyinov A, Kültürsay N. The role of recombinant human erythropoietin in lipid peroxidation and platelet-activating factor generation in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg.* 2001; 11: 167-72.
13. Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Williams CS, McWilliam DL, Dominguez JA, et al. Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 282: G156-64.
14. Caplan MS, Hedlund E, Adler L, Hsueh W. Role of asphyxia and feeding in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Pathol.* 1994; 14: 1017-28.
15. Bazacliu C, Neu J. Pathophysiology of necrotizing enterocolitis: An update. *Curr Pediatr Rev.* 2019; 15: 68-87.
16. Nadler EP, Dickinson E, Knisely A, Zhang XR, Boyle P, Beer-Stolz D, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis. *J Surg Res.* 2000; 92: 71-7.
17. Barlow B, Santulli TV, Heird WC, Pitt J, Blanc WA, Schullinger JN. An experimental study of acute neonatal enterocolitis--the importance of breast milk. *J Pediatr Surg.* 1974; 9: 587-95.
18. Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. Principles of Laboratory Animal Science, Second ed. Amsterdam: Elsevier Science; 2001.
19. European Commission, Directorate-General for Environment, Caring for animals aiming for better science: Directive 2010/63/

EU on protection of animals used for scientific purposes: severity assessment framework. Publications Office; 2018. Available from: doi/10.2779/068620.

20. Hickey M, Georgieff M, Ramel S. Neurodevelopmental outcomes following necrotizing enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2018; 23: 426-32.
21. Moschopoulos C, Kratimenos P, Koutroulis I, Shah BV, Mowes A, Bhandari V. The neurodevelopmental perspective of surgical necrotizing enterocolitis: The role of the gut-brain axis. *Mediators Inflamm.* 2018; 2018: 7456857.
22. Zhou P, Li Y, Ma LY, Lin HC. The role of immunonutrients in the prevention of necrotizing enterocolitis in preterm very low birth weight infants. *Nutrients.* 2015; 7: 7256-70.
23. Hassiotou F, Hartmann PE. At the dawn of a new discovery: the potential of breast milk stem cells. *Adv Nutr* 2014; 5: 770-8.
24. Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *J Pediatr.* 2010; 156: S26-30.
25. Wang Y, Jagers RM, Mar P, Galley JD, Shaffer T, Rajab A, et al. *Lactobacillus reuteri* in its biofilm state promotes neurodevelopment after experimental necrotizing enterocolitis in rats. *Brain Behav Immun Health.* 2021; 14: 100256.
26. Shinyama S, Kaji T, Mukai M, Nakame K, Matsufuji H, Takamatsu H, et al. The novel preventive effect of Daikenchuto (TJ-100), a Japanese herbal drug, against neonatal necrotizing enterocolitis in rats. *Pediatr Surg Int.* 2017; 33: 1109-14.
27. Nakame K, Kaji T, Mukai M, Shinyama S, Matsufuji H. The protective and anti-inflammatory effects of glucagon-like peptide-2 in an experimental rat model of necrotizing enterocolitis. *Peptides.* 2016; 75: 1-7.