



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD CON CAMPO PRINCIPAL EN  
EPIDEMIOLOGIA CLINICA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ACIDO  
DOCOSAHEXAENÓICO SOBRE LA RESPUESTA  
INFLAMATORIA Y LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE NEONATOS  
SOMETIDOS A CIRUGÍA CARDIOVASCULAR**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

M. en C. MARIELA BERNABE GARCÍA

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARDIA GUADALUPE LÓPEZ ALARCÓN**

Financiado por el Fondo para la Investigación en Salud, IMSS N° FIS/IMSS/PROT  
094, 095, 516 y 727.

**MÉXICO, D.F.**

**FEBRERO, 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **COMITÉ TUTORAL**

Doctor en Ciencias Javier Mancilla Ramírez

Director del Instituto Nacional de Perinatología

Doctor en Ciencias José Luis Arredondo García

Responsable de la Unidad Operativa del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias  
Médicas, Odontológicas y de la Salud del Instituto Nacional de Pediatría.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN NUTRICIÓN EN COLABORACIÓN CON LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATALES, LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA, C.M.N. DEL IMSS, CON EL DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGIA E INMUNOLOGIA DEL INPer Y CON LA UNIDAD OPERATIVA DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEL INP.**

*DEDICATORIA A*

*DIOS*

*MI MADRE*

*MI HIJO*

*COLABORADORES*

*CARLOS ADRIAN*

## INDICE

	Pág.
Resumen	4
Introducción	7
1. Antecedentes	10
1.1 Respuesta inflamatoria al trauma quirúrgico. Citocinas	10
1.2 Efectos de los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (LC-PUFAS) sobre la modulación de la respuesta inflamatoria.	10
1.2.1 Efectos sobre la síntesis de eicosanoides	11
1.2.2 Efectos sobre la expresión de genes	12
1.2.3 Microdominio de la membrana celular (Lipid Raft).	12
1.2.4 Resolvinas	13
1.3 Estudios sobre la administración de LC-PUFAS n-3 a pacientes sometidos a cirugía	13
1.3.1 Efecto sobre citocinas	13
1.3.2 Efecto sobre evolución clínica	16
2. Planteamiento del problema	19
3. Justificación	20
4. Objetivos	21
5. Hipótesis	22
6. Material y métodos	23
6.1 Diseño del estudio	23
6.2 Lugar de estudio	23
6.3 Población de estudio	23
6.4 Criterios de selección	23
6.4.1 Criterios de inclusión	23
6.4.2 Criterios de eliminación	23

	Pág.
6.5 Tipo de muestreo	24
6.6 Tamaño de muestra	24
6.7 Definición operativa de variables	27
6.8 Procedimientos	29
6.8.1 Aleatorización de la intervención	29
6.8.2 Administración de la dosis	29
6.8.3 Cegamiento	29
6.8.4 Toma de muestra	30
6.9 Mediciones	31
6.9.1 Citocinas	31
6.9.2 Porcentaje de ácidos grasos en los tejidos	31
6.9.3 Ingestión de leche humana	31
6.9.4 Gravedad de la enfermedad	32
6.9.5 Datos demográficos	32
6.9.6 Efectos adversos	32
6.10 Aspectos éticos	32
6.11 Análisis estadístico	33
6.12 Financiamiento	34
7. Resultados	35
7.1 Estudio piloto en adultos	35
7.1.1 Variables demográficas de los adultos	35
7.1.2 Citocinas intracelulares en adultos	36
7.1.3 Evolución clínica en adultos	39
7.1.4 Covariables en adultos	40
7.2 Resultados en neonatos	42
7.2.1 Variables demográficas	43

	Pág.
7.2.2 Citocinas intracelulares en neonatos	44
7.2.3 Evolución clínica en neonatos	53
7.2.4 Covariables en neonatos	57
8. Discusión	60
9. Conclusiones	66
10. Recomendaciones y futuras investigaciones	67
11. Referencias bibliográficas	68
12. Anexos	
12.1 Anexo 1. Anexo 1. Comprobantes de otorgamiento de financiamientos	74
12.2 Anexo 2. Carta de consentimiento informado	75
12.3 Anexo 3. Procesamiento de la muestra de sangre total para determinación de citocinas intracelulares por citometría de flujo.	77
12.4 Anexo 4. Obtención de eritrocitos	79
12.5 Anexo 5. Separación de lípidos y determinación del perfil de lípidos en eritrocitos	80
12.6 Anexo 6. Expediente de estudio	81
12.7 Anexo 7. Escala de gravedad SNAP II	86
12.7 Anexo 8. Comprobantes de aprobación de Comités de Investigación	87
12.8 Anexo 9. Comprobantes de otorgamiento de financiamientos	92

# EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ACIDO DOCOSAHEXAENÓICO SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE NEONATOS SOMETIDOS A CIRUGÍA CARDIOVASCULAR

## RESUMEN

**Antecedentes.** Una intervención quirúrgica puede desencadenar una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) que involucra mediadores como la interleucina (IL)-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-6; La SIRS además se relaciona con un riesgo mayor de desarrollar falla orgánica múltiple y muerte si no se alcanza el equilibrio entre citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias como la IL-10 y el antagonista de IL-1 (IL-1ra). Debido a que los neonatos son una población vulnerable a las infecciones, la sepsis es la principal complicación en las salas de cuidados intensivos neonatales, condición que también predispone al desarrollo de fallas orgánicas. Si a esto agregamos las lesiones orgánicas producidas por la hipoxemia de los tejidos en un paciente con cardiopatía congénita, los pacientes que en la etapa neonatal necesitan cirugía podrían encontrarse en mayor riesgo de desarrollar SIRS y complicaciones durante su evolución clínica como la falla orgánica múltiple.

De forma característica, la respuesta inflamatoria sistémica descontrolada, además de involucrar una producción exacerbada de citocinas inflamatorias, también involucra otros mediadores inflamatorios derivados de los lípidos como los eicosanoides. Debido a las propiedades de los ácidos grasos de cadena larga omega 3 (n-3 LC-PUFAS) como el ácido docosahexaenoico (DHA) para atenuar la respuesta inflamatoria, han surgido investigaciones sobre los efectos de estos ácidos grasos en el paciente críticamente enfermo. Entre sus efectos benéficos se ha demostrado la disminución de citocinas circulantes y la mejoría de la evolución clínica en adultos sometidos a cirugía abdominal. Estudios realizados por nuestro grupo en neonatos, han demostrado que el DHA administrado durante un episodio de sepsis, se incorpora a las membranas de leucocitos, lo cual resultó en menor elevación de IL-1 $\beta$  y menor deterioro del estado nutricional, pero a la

fecha no hay reportes de su efecto sobre la evolución clínica. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la administración enteral de DHA sobre la respuesta inflamatoria y la evolución clínica de neonatos sometidos a cirugía cardiovascular.

**Material y métodos.** Se realizó un ensayo clínico controlado doble ciego. Se captaron neonatos programados a cirugía cardiovascular, quienes recibieron aleatoriamente por vía enteral 75 mg de DHA/kg/día (grupo DHA) ó aceite de girasol para el grupo placebo, desde 2 días previos a la cirugía y durante 6 días post-cirugía. Se analizó el efecto del DHA sobre la respuesta inflamatoria (porcentaje de células positivas para IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-1ra) antes de la cirugía, a las 24 h y 7 días post cirugía, así como sobre la evolución clínica (frecuencia de sepsis grave; fallas respiratoria, cardiovascular, hematológica, hepática y renal). También se analizó la estancia en cuidados intensivos neonatales (UCIN). Para la comparación de variables entre grupos se utilizó t de Student ó bien U-Mann-Whitney, mientras que para la comparación intra-grupo se utilizó t pareada o prueba con signos de Wilcoxon. Las variables nominales se compararon con la prueba Exacta de Fisher y se estimó el riesgo relativo (RR) con su intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Para analizar el efecto del DHA ajustando por factores confusores se utilizaron modelos de ANOCOVA para mediciones repetidas y de regresión logística.

**Resultados.** Se estudiaron 33 pacientes, 15 en el grupo DHA y 18 en el grupo placebo. En el análisis bivariado, el grupo DHA comparado con el grupo placebo mostró menor porcentaje de células IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> a las 24 h postcirugía (0.29%  $\pm$  6.2% vs. 0.74%  $\pm$  2.3%, p= 0.045), y al día 7 post-cirugía, menos células TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (3.46%  $\pm$  2.2% vs. 6.82%  $\pm$  3.3%, p= 0.046) y e IL-10<sup>+</sup> (0.89%  $\pm$  2.2% vs. 2.07%  $\pm$  3.5%, p= 0.025). Además, el análisis multivariado indicó que el grupo DHA tuvo menos células positivas que el grupo placebo durante el estudio en IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> ( p< 0.001), IL-6<sup>+</sup> (p= 0.002), IL-1ra<sup>+</sup> ( p= 0.01) e IL-10<sup>+</sup> (p= 0.03) después de ajustar por presencia de sepsis, duración de la administración de anti-

inflamatorios, sangrado durante la cirugía y el consumo de leche humana; no se encontró efecto en TNF- $\alpha$  ( $p= 0.78$ ). En el mismo sentido, el grupo DHA comparado con el grupo placebo presentó menor número de complicaciones (eventos de sepsis + fallas orgánicas: 3 vs. 21,  $p < 0.001$ ) y menor número de fallas orgánicas (2 vs. 17,  $p < 0.001$ ), así como menor número de pacientes que presentaron una falla orgánica o más (1/15 vs. 11/18,  $p= 0.001$ ), lo que se tradujo en un menor riesgo de desarrollo de falla orgánica para el grupo DHA (RR= 0.11; IC 95% 0.02-0.75). Además, la probabilidad de desarrollar al menos una falla orgánica en los pacientes del grupo DHA fue de (OR= 0.031; IC 95% 0.002 a 0.528) después de ajustar por gravedad pre-cirugía, anti-inflamatorios y consumo de leche humana. Los días de estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales también fue menor en el grupo DHA comparado con el placebo ( $6.9 \pm 2.1$  vs.  $11.5 \pm 2.2$ ,  $p= 0.035$ ), aunque en el análisis multivariado, el DHA no fue un buen predictor del egreso.

**Conclusión.** Los resultados demostraron que la administración peri-operatoria del DHA por vía enteral, disminuye la respuesta inflamatoria y mejora la evolución clínica de neonatos sometidos a cirugía cardiovascular.

## **ABSTRACT**

**Background:** Surgery triggers a systemic inflammatory response (SIR) that results in increased proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-1 beta, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and IL-6. An imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-10 and the receptor antagonist of IL-1, IL-1ra) increases the risk for sepsis and multiorgan dysfunction. Because of immature immune system, neonates in intensive care units (NICU) are particularly vulnerable. Docosaheaxaenoic acid (DHA) modulates the SIR and improves the clinical course of surgical adults, but its effect on neonates is unknown. **Objective:** To evaluate the effect of DHA on SIR and clinical course of surgical neonates. **Methods:** In a randomized double-blind design, 33 neonates were randomly assigned to received

75mg/kg/day DHA (G-DHA) or sunflower oil (G-SO) by enteral pathway, from two days before and throughout six days after cardiovascular surgery. The proportion of leucocytes producing intracytoplasmic cytokines IL-1beta, IL-6, TNF-alpha, IL-10 and IL-1ra was determined by flow cytometry before surgery, and at 24h and 7d after surgery. Severe sepsis, organ dysfunction, and length of hospitalization at the NICU were assessed. **Results:** Fifteen neonates received DHA and eighteen SO. G-DHA showed lower percentage of positive cells to IL-1beta (0.29%±6% vs. 0.74%±2%, p=0.045) 24h-postsurgery; and TNF-alpha (3.46%±2% vs. 6.82%±3%, p=0.046) and IL-10 (0.89%±2% vs. 2.07%±3%, p=0.025) at 7-d post-surgery as compared to G-SO. Likewise, G-DHA presented fewer organ dysfunctions (2 vs. 17, p<0.001) and shorter length of hospitalization at NICU (6.9±2d vs. 11.5±2d, p=0.035) than G-SO. **Conclusion:** DHA administration reduced SIR and improved clinical outcomes in neonates suffering cardiovascular surgery

## INTRODUCCION

Aunque la respuesta inflamatoria secundaria a una intervención quirúrgica es consecuencia del trauma y no de una infección, en algunos pacientes esta inflamación puede exacerbarse por una alta producción por citocinas como interleucina (IL)-1beta ( $\beta$ ), IL-6, y factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa ( $\alpha$ ), los cuales pueden ser factores que predisponen a la adquisición de sepsis y de fallas orgánicas, que a su vez se consideran dentro de las principales causas de muerte en pacientes sometidos a cirugía. Al mismo tiempo que se dispara la respuesta inflamatoria, se sintetizan citocinas anti inflamatorias como la IL-10 y el antagonista de IL1 (IL-1ra) realizando un efecto de contención de las citocinas inflamatorias mencionadas para alcanzar un equilibrio entre éstas y lograr la homeostasis. Así, se puede esperar que la respuesta anti inflamatoria sea de la misma magnitud que la inflamatoria. Las complicaciones como sepsis y falla orgánica resultantes del predominio de una de las dos respuestas se consideran las principales complicaciones en terapia intensiva. Esto es trascendente si consideramos que el tratamiento quirúrgico para corregir malformaciones congénitas en neonatos es frecuente en hospitales de tercer nivel y que el sistema inmune inmaduro del neonato lo hace más vulnerable.

Se ha propuesto que los ácidos grasos omega 3 pueden modular la respuesta inflamatoria y mejorar la evolución clínica de pacientes adultos que se someten a un procedimiento quirúrgico, pero no tenemos información si producen el mismo efecto en neonato. Los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga omega 3 (LC-PUFAS n-3) tienen un efecto modulador de la inflamación, actuando de las siguientes formas: i) compiten por la misma vía

enzimática que los LC-PUFAS n-6 para la síntesis de eicosanoides, y los eicosanoides sintetizados a partir de estos ácidos grasos tienen menor potencia biológica que los producidos por los n-6, lo que cambia el balance hacia una inflamación atenuada, ii) inhiben la actividad del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) que es un factor de transcripción en las vías de señalización de citocinas inflamatorias y, iii) el ácido docosahexaenoico (DHA), un LC-PUFA n-3, participa directamente como sustrato para la síntesis de resolvinas, cuya principal función es limitar rápidamente la respuesta inflamatoria; estos mecanismos también pueden atenuar la producción de citocinas.

El efecto antiinflamatorio de los LC-PUFAS n-3 es ampliamente conocido por estudios en animales o humanos cuando se administran por períodos prolongados (semanas o meses) antes de la exposición a un proceso inflamatorio. En la última década se han realizado estudios en adultos en los que se demuestra el efecto antiinflamatorio aún cuando se administran pocos días antes de la exposición a un procedimiento de cirugía mayor; sin embargo, el ácido graso se ha administrado por vía parenteral por lo que su efecto no depende de un proceso de digestión, absorción y transporte. En estos estudios se ha demostrado que los pacientes presentan menor elevación de citocinas, menor estancia hospitalaria y en cuidados intensivos, menor uso de ventilación mecánica, menor tasa de infección y de mortalidad.

A nuestro conocimiento, no existen estudios en donde se evalúe el efecto de los LC-PUFAS n-3 en la respuesta inflamatoria y evolución clínica de pacientes en edad pediátrica sometidos a cirugía. En la Unidad de Investigación Médica en Nutrición (UIMN) se han realizado varios estudios que

exploran el efecto benéfico de la suplementación con LC-PUFAS n-3 en neonatos y lactantes enfermos. En un primer estudio se observó que la producción de IL-1 $\beta$  posterior a la aplicación de la vacuna tetravalente (DPTH) tendió a ser menor en lactantes alimentados con una fórmula suplementada con DHA que en lactantes alimentados con un fórmula estándar; los niños que recibieron el DHA presentaron elevaciones de IL-1 $\beta$  plasmática similares a las de un grupo control que recibió solamente leche de la propia madre sugiriendo una respuesta inflamatoria más adecuada. Posteriormente se determinó que los niños que recibieron la fórmula con DHA y los alimentados con leche materna no redujeron la ingestión de energía en la misma magnitud que los que recibieron la fórmula sin DHA, demostrando que además atenúa la anorexia inducida por citocinas. Este resultado se repitió en otro modelo de infección en el que un grupo de lactantes hospitalizados con neumonía que recibieron DHA mostraron una respuesta inflamatoria atenuada y una menor disminución en el consumo de alimentos. En otro estudio se analizó la administración de 100 mg de DHA/día a neonatos con sepsis desde el momento del diagnóstico y durante 14 días; estos pacientes mostraron una ganancia significativa de peso y de masa grasa preservando la masa libre de grasa, mientras que el grupo control presentó deterioro en todos los compartimentos afectando negativamente su estado nutricional. En estos mismos pacientes se demostró que el DHA administrado se incorporó rápidamente a la membrana de los leucocitos y que la elevación de las concentraciones plasmáticas de IL-1 $\beta$  e IL-6 fue menor en este grupo que en un grupo control.

En resumen, los estudios en niños demuestran que los LC-PUFAS n-3 tienen un efecto atenuante de la respuesta inflamatoria y consecuentemente un menor efecto catabólico cuando el reto inmunológico es intenso como en el caso de la neumonía o la sepsis. Es indispensable analizar si este efecto se encuentra presente en procesos inflamatorios menos graves como es la exposición a un procedimiento quirúrgico y si el efecto protector resulta en una mejor evolución clínica de estos pacientes. El reconocimiento de un efecto benéfico del DHA en neonatos sometidos a cirugía es de gran trascendencia ya que se podría utilizar como una estrategia para acortar el tiempo de hospitalización y disminuir el riesgo de nuevas infecciones que tienen los pacientes al permanecer mas tiempo en hospitalización; secundariamente se esperaría se puedan reducir los costos de atención. Por lo anterior, en el presente estudio se evaluó el efecto de la administración de DHA por vía enteral sobre la respuesta inflamatoria y la evolución clínica de neonatos sometidos a cirugía cardiovascular.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Respuesta inflamatoria al trauma quirúrgico. Citocinas

Durante la respuesta inflamatoria sistémica por estrés quirúrgico se liberan mediadores de la inflamación como las citocinas. Éstas se definen como moléculas proteicas solubles sintetizadas durante la activación de la inmunidad innata y adquirida, y son los principales medios para la comunicación intercelular. Dentro de las principales citocinas secretadas durante esta respuesta se encuentran la interleucina (IL)-1beta ( $\beta$ ), la IL-6, y el factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa ( $\alpha$ ), las cuales se sintetizan principalmente por fagocitos mononucleares.<sup>1-3</sup> En modelos animales se ha reportado que existe una relación causal entre el daño quirúrgico y la predisposición a complicaciones sépticas y/o falla orgánica múltiple, ya que la administración *in vivo* de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  indujo un síndrome parecido al choque séptico.<sup>2</sup> De forma similar, en humanos se ha reportado que los pacientes con sepsis quienes presentaron las más altas concentraciones circulantes de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1ra e IL-6 tuvieron mayor probabilidad de morir;<sup>3</sup> por lo que se ha sugerido que estas citocinas pueden jugar un papel importante en el desarrollo de falla orgánica múltiple que predispone a la muerte.<sup>2,3</sup>

Cuando se presenta una respuesta inflamatoria exacerbada, es decir un aumento excesivo de citocinas denominado síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), se predispone al desarrollo de alguna falla orgánica, la cual a su vez aumenta el riesgo de muerte en un 40-80%.<sup>4</sup> Por otro lado, si la hiperinflamación persiste, ocurre un cambio hacia un estado de anti inflamación e inmunosupresión llamado efecto compensatorio o síndrome de respuesta anti inflamatoria compensatoria (CARS), caracterizado por una liberación de

citocinas anti-inflamatorias como la IL-10, y el antagonista de IL-1 (IL-1ra), entre otras. De esta manera, la gravedad de la respuesta inflamatoria depende de un equilibrio entre las respuestas pro y antiinflamatorias; si esto ocurre, se puede restaurar la homeostasis, pero si una de las dos predomina, se presenta la falla orgánica múltiple en presencia de SIRS o una elevada susceptibilidad a infecciones que lleva nuevamente a hiper inflamación, SIRS y falla orgánica múltiple.<sup>1-4</sup>

En neonatos se ha reportado que la IL-6 muestra una elevación significativa desde el final de la cirugía hasta el día 1 post-cirugía,<sup>5</sup> mientras que la IL-10 se mantiene elevada desde los 30 min hasta los 3 días post-cirugía con relación al basal,<sup>6</sup> por lo que este periodo es crítico en su recuperación.

## **1.2 Efectos de los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (LC-PUFAS) sobre la modulación de la respuesta inflamatoria.**

**1.2.1 Efecto sobre la síntesis de eicosanoides.** El ácido araquidónico (AA) de la serie omega 6 (n-6) es el principal sustrato para la síntesis de eicosanoides como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos quienes participan como mediadores de la respuesta inflamatoria regulando la producción de citocinas, la permeabilidad vascular, la quimiotaxis de leucocitos, la vasopresión y dolor, entre otros. El AA predomina en las membranas celulares debido a la abundancia de su precursor, el ácido linoleico en las dietas occidentales y en la leche humana en comparación con los ácidos grasos de la serie omega 3 (n-3). Los LC-PUFAS n-3 como el DHA y el ácido eicosapentaenoico (EPA) contenidos en el aceite de pescado, también son precursores lipídicos alternativos para la síntesis de eicosanoides y su

relevancia radica en que se ha reportado que los eicosanoides derivados de los LC-PUFAS n-3 son biológicamente menos potentes, por lo que poseen propiedades inflamatorias reducidas comparados con los eicosanoides derivados de ácidos grasos n-6. Además, el EPA y el DHA compiten con el AA por la misma vía enzimática como ciclooxigenasa (COX) y 5-Lipooxigenasa (5-LOX), pero las enzimas muestran mayor afinidad hacia los LC-PUFAS n-3 cuando están disponibles simultáneamente, lo que conduce a una mayor formación de derivados de los LC-PUFAS n-3 a expensas de los derivados del AA. Por lo que la administración de LC-PUFAS n-3 como el DHA puede cambiar el balance hacia una inflamación atenuada.<sup>7-11</sup>

**1.2.2 Efecto sobre la expresión de genes.** Muchos de los efectos de los LC-PUFAS n-3 y n-6 son ejercidos a través de la alteración de la expresión de genes. El factor nuclear kB (NFkB) es un factor de transcripción que juega un importante papel en varias vías de señalización inflamatoria. Éste controla la síntesis de varias citocinas como IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , quimiocinas, moléculas de adhesión y enzimas efectoras inducibles como COX-2. Los LC-PUFAS n-3 inhiben directamente la actividad de NFkB. El EPA bloquea el NFkB a través de la disminución de la degradación de la subunidad inhibitoria del NFkB (I $\kappa$ B) en monocitos humanos y en células pancreáticas cultivadas, por lo tanto se considera que los LC-PUFAS n-3 tienen un papel inhibitorio de la vía NFkB. Otro mecanismo reportado es a través de la activación de los Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPARs).<sup>11-12</sup> Los PPARs son factores de transcripción nuclear activados por ligando que se unen en la región reguladora de los genes blanco y por lo tanto influyen su

expresión. En ratones se ha reportado que el PPAR bloquea la expresión de citocinas inflamatorias como interferón gamma, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  en lesiones ateroscleróticas. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, especialmente los n-3 son ligandos naturales de los PPARs. Sin embargo, el EPA y el DHA son más potentes como activadores *in vivo* que los n-6. Por lo anterior, los LC-PUFAS n-3 disminuyen la señalización inflamatoria vía inhibición de NF $\kappa$ B y pueden atenuar o disminuir varios procesos inflamatorios.<sup>9-11</sup>

**1.2.3 Microdominio de la membrana celular (Lipid Raft).** Los cambios en la composición de la membrana de las células inmunes debido a la incorporación de LC-PUFAS n-3 también pueden afectar la estructura de los microdominios funcionales relacionados al inicio y propagación de los eventos de señalización en estas células, conocido por su nombre en inglés como “the lipid raft”. Varios receptores de las células inmunes se encuentran en este microdominio y lo usan para su agregación, la cual es necesaria para la activación y proliferación celular. Debido a que el lipid raft consiste principalmente de colesterol, esfingolípidos y fosfolípidos ricos con alto contenido de ácidos grasos saturados, permanece como una estructura rígida en la membrana. Estas características pueden ser influenciadas al incorporarse los LC-PUFAS n-3 afectando el tamaño, la estabilidad y composición de las proteínas de señalización. Estudios *in vitro* con LC-PUFAS n-3 demostraron una significativa reducción en la formación de “lipid rafts” y desplazamiento de proteínas de señalización, esta desorganización parcial podría mediar la función de las células inmunes como linfocitos, monocitos y neutrófilos, incluyendo su activación.<sup>12</sup>

**1.2.4 Resolvinas.** Se definen como mediadores locales bioactivos o autocoides que requieren de la generación enzimática a partir de ácidos grasos omega 3 como EPA o DHA. Estos fueron identificados por primera vez durante el estudio de la resolución de exudados inflamatorios *in vivo* y realizan potentes acciones biológicas estereoselectivas. Las resolvinas derivadas del EPA se denominan resolvinas de la serie E (RvE) y las derivadas del DHA son resolvinas de la serie D (RvD). A diferencia de los eicosanoides derivados de los LC-PUFAS n-3 que poseen menor potencia biológica que los derivados de los n-6, las resolvinas tienen potentes acciones biológicas agonistas de la anti inflamación endógena en un rango de nanogramos *in vivo*. Por lo que estos compuestos se sintetizan en la fase de resolución de la inflamación realizando acciones como la reducción del tráfico de neutrófilos, regulación de la producción de citocinas y especies oxígeno reactivas, que se traduce en la disminución de la magnitud de la respuesta inflamatoria, acortando su tiempo de resolución.<sup>13</sup>

### **1.3 Estudios sobre la administración de LC-PUFAS n-3 en pacientes sometidos a cirugía**

**1.3.1 Efecto en citocinas.** Wachtler administró una mezcla estándar de Nutrición Parenteral Total (NPT) con triacilglicerol de cadena media (TCM) y aceite de soya (50:50) en el grupo control y una mezcla de éstos más aceite de pescado (50:30:20) al grupo experimental en adultos que se sometieron a una cirugía gastrointestinal durante 5 días postcirugía. Las concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$  fueron menores en el grupo que recibió aceite de pescado al día 6 y 10 postcirugía, mientras que en IL-6 tendieron a ser menores en este último (P=0.06).<sup>14</sup> En otro estudio, Weiss administró 10 g/día de aceite de pescado por NPT a adultos desde el día previo a una cirugía

abdominal y durante 5 días postcirugía. Las concentraciones plasmáticas de IL-6 fueron menores el día 1 y 3 postcirugía en el grupo que recibió aceite de pescado comparado con el grupo control,<sup>15</sup> ambos estudios mostraron que la respuesta inflamatoria fue atenuada por los LC-PUFAS n-3 en sujetos con respuesta inflamatoria secundaria a cirugía. En otro estudio realizado en adultos con síndrome de dificultad respiratoria aguda (que consideramos como modelo de respuesta inflamatoria aguda), quienes recibieron EPA y DHA por 4-7 días, mostraron una tendencia a menores concentraciones de IL-6 al día 4 de estudio comparados con el grupo control y una tendencia a menores concentraciones en TNF- $\alpha$  al día 7 de estudio. A diferencia de los estudios anteriores, en este último estudio, los LC-PUFAS n-3 se administraron por vía enteral y las citocinas fueron determinadas en líquido de lavado alveolar y no en plasma, lo que muestra que aún cuando ya está instalada la respuesta inflamatoria, la administración de éstos ácidos grasos por vía enteral también pueden tener efecto benéfico en la modulación de citocinas.<sup>16</sup>

Existen escasos reportes de la administración de LC-PUFAS n-3 en lactantes. Field y cols. reportaron que neonatos pretérmino clínicamente estables que se alimentaron con un fórmula suplementada con DHA + AA y el grupo alimentado con leche humana expresaron más antígenos maduros (CD45R0<sup>+</sup>), menos antígenos inmaduros (CD45RA<sup>+</sup>) y más IL-10 comparados con el grupo que se alimentó con fórmula estándar después de 4 semanas de intervención. Los niños pretérmino alimentados con la fórmula suplementada tuvieron un estado de maduración de células T y una respuesta de citocinas que fue similar a los alimentados con leche humana, por lo que se consideró una respuesta inmune más adecuada.<sup>17</sup> En otro estudio más reciente de la

misma autora pero en neonatos de término con la misma intervención, reportaron que las células de los niños alimentados con fórmula suplementada DHA + AA produjeron menos TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> comparados con los alimentados con fórmula estándar, pero similares a los del grupo alimentado con leche humana.<sup>18</sup> Sin embargo, son escasos los reportes donde se evalúe el efecto de ácidos grasos omega 3 en niños enfermos.

En la Unidad de Investigación Médica en Nutrición (UIMN) se han realizado varios proyectos evaluando el efecto del DHA en lactantes y neonatos. En un primer estudio se evaluó el efecto de la alimentación con una fórmula suplementada con DHA (administrada un mes antes del reto inmunológico), de leche humana y de una fórmula estándar sobre las concentraciones de IL-1 $\beta$  de lactantes que fueron inmunizados por primera vez con la vacuna tetravalente. Los niños que recibieron la fórmula estándar presentaron la mayor elevación en las concentraciones IL- 1 $\beta$  de los tres grupos; los niños que recibieron la fórmula suplementada presentaron elevaciones de IL-1 $\beta$  menores a las del grupo de fórmula estándar y más similares a las del grupo que recibió leche humana, lo que indicó una respuesta inflamatoria más adecuada en el grupo de fórmula suplementada.<sup>19</sup>

En otro estudio realizado en la UIMN y en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) del Hospital de Pediatría, se capturaron neonatos que recibieron 100 mg de DHA/día por vía enteral durante la fase aguda de la sepsis, durante 14 días a partir del diagnóstico y se compararon con un grupo que recibió aceite de oliva (AO); se observó que desde el día 7 hubo una menor concentración de IL-1 $\beta$  plasmática en los neonatos del grupo DHA comparados con el grupo AO. En este mismo grupo de niños se observó que la

incorporación de DHA y de ácidos grasos n-3 totales a la membrana de los leucocitos fue mayor a los 7 días comparada con el basal y con el grupo AO. Lo mismo se observó a los 14 días de suplementación.<sup>20</sup> Lo que sugirió que si el DHA se administra durante la respuesta inflamatoria aguda se puede incorporar a los leucocitos en su fase de proliferación celular, ejerciendo un efecto modulador en la síntesis de citocinas. En resumen, la administración de LC-PUFAS n-3 a pacientes con respuesta inflamatoria aguda puede modular la producción de citocinas.

### **1.3.2. Efecto sobre evolución clínica.**

**Administración de LC-PUFAS n-3 por NPT.** En el estudio de Weiss mencionado anteriormente, también se observó que en el grupo que recibió aceite de pescado, la estancia hospitalaria fue más corta (17.8 vs. 23.5 días) y la estancia en cuidados intensivos tendió a ser más corta (4.1 d vs. 9.1 d) comparado con el grupo control.<sup>15</sup> En otro reporte de adultos con cirugía abdominal se administró entre 8-10 g de aceite de pescado 2 días antes de la cirugía y durante 7 días post-cirugía comparados con pacientes que recibieron NPT estándar sin LC-PUFAS n-3. Hubo una menor frecuencia de necesidad de ventilación mecánica (17% vs. 31%), menor estancia hospitalaria (22 vs. 29 días) y menor mortalidad (3 vs. 15%).<sup>21</sup> En un estudio multicéntrico, Heller demostró que al administrar 0.11 g/kg/día de aceite de pescado durante 8 días a adultos sometidos a cirugía abdominal también se redujo la estancia en cuidados intensivos (de 25 a 9 días), la mortalidad predicha con la escala SAPS de 18.9% a 12%, y también disminuyeron las tasas de infección (de 95% a 67%).<sup>22</sup>

**Administración de LC-PUFAS n-3 por vía enteral.** Gadek y cols. también reportaron menos días con ventilación mecánica (12.8 vs. 17.5 días), menor estancia hospitalaria en cuidados intensivos (11 vs. 16.3 días) y menor frecuencia de nuevas fallas orgánicas (8% vs. 28%) en pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda que recibieron 15.6 g de LC-PUFAS n-3 al día durante 4 a 7 días comparados con el grupo control.<sup>24</sup> En otro estudio similar en pacientes que requerían ventilación mecánica secundaria a sepsis grave se reportó que el grupo que recibió 11.7 g de LC-PUFAS n-3 al día tuvo menor mortalidad (33% vs 55%), más días sin ventilador (13.4 vs 5.8), más días sin cuidados intensivos (10.8 vs 4.6) y menos fallas orgánicas nuevas (38 vs 81%) comparados con grupo control.<sup>24</sup>

Por lo anterior, hay evidencia de los efectos benéficos de los LC-PUFAS n-3 en la evolución clínica de los adultos sometidos a cirugía o con respuesta inflamatoria aguda, pero estos efectos no se han evaluado en neonatos. En esta población, nuestro grupo evaluó el efecto del DHA sobre el estado nutricional (medido con un isótopo estable) de neonatos con sepsis administrando 100 mg de DHA/día a un grupo y aceite de oliva (AO) al grupo control desde el diagnóstico de la sepsis hasta 14 días post diagnóstico. Los niños del grupo DHA tuvieron un menor deterioro nutricional evaluado por mayor masa grasa (70g, P= 0.03), mayor peso corporal (50 g, P=0.03) y preservó su masa libre de grasa, mientras que el grupo AO disminuyó su peso y masa grasa.<sup>25</sup> Por lo que este estudio sugirió que el efecto catabólico mediado por citocinas fue atenuado por el DHA, lo que también podría incidir en una mejor evolución clínica del niño. En otro estudio de nuestro grupo, se determinó que los niños

que recibieron la fórmula con DHA y los alimentados con leche materna no redujeron la ingestión de energía en la misma magnitud que los que recibieron la fórmula sin DHA, demostrando que además atenúa la anorexia inducida por citocinas.<sup>19</sup> Este resultado fue similar al encontrado en otro modelo de respuesta inflamatoria secundaria a infección en el que un grupo de niños hospitalizados con neumonía que recibieron DHA mostraron una respuesta inflamatoria atenuada y una menor disminución en el consumo de alimentos.<sup>26</sup>

En resumen, aunque hay reportes del efecto de los LC-PUFAS n-3 sobre la evolución clínica en pacientes sometidos a cirugía, éstos provienen de adultos; además, estos ácidos grasos se administraron como aceite de pescado (EPA + DHA). Existen escasos reportes que evalúen el efecto de los LC-PUFAS n-3 sobre las citocinas en los neonatos y no existen estudios que evalúen la evolución clínica, por lo que no sabemos si estos niños respondan de la misma forma que los adultos cuando se someten a una cirugía y al utilizar el DHA por vía enteral. Por lo que en este estudio se evaluó el efecto del DHA sobre la respuesta inflamatoria y la evolución clínica de neonatos sometidos a cirugía cardiovascular.



## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En un procedimiento quirúrgico, el trauma provoca una respuesta inflamatoria que puede generar manifestaciones sistémicas por la producción de citocinas inflamatorias.<sup>1-4</sup> Una excesiva producción de estas citocinas ocasiona inestabilidad sistémica y hemodinámica, conocida como Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS) cuyo desenlace más grave es la falla orgánica de uno o varios órganos. Al mismo tiempo, se activa un mecanismo de contención denominado respuesta anti-inflamatoria compensatoria, pero si éste es ineficiente y la hiperinflamación persiste, puede generarse la falla orgánica múltiple (FOM), lo que a su vez aumenta considerablemente su riesgo de muerte. De esta manera, la homeostasis depende del equilibrio entre las respuestas pro y anti-inflamatorias.<sup>2,4,6</sup>

Por otro lado, se conoce que la falla orgánica múltiple es más frecuente en los neonatos por la mayor vulnerabilidad de las barreras naturales y por la inmadurez del sistema inmune.<sup>27</sup>

Si a esto agregamos las lesiones orgánicas producidas por la hipoxemia de los tejidos en un paciente con cardiopatía congénita, los pacientes que en la etapa neonatal necesitan cirugía podrían encontrarse en mayor riesgo de desarrollar SIRS, sepsis y falla orgánica.<sup>28</sup>

Por otra parte, la evidencia científica reporta que los LC-PUFAS n-3 administrados por vía parenteral a pacientes sometidos a cirugía puede favorecer una producción atenuada de las citocinas inflamatorias, permitiendo lograr la homeostasis y secundariamente una menor frecuencia de complicaciones.<sup>3,10-15, 21-24</sup> Sin embargo, no se sabe si la administración de estos ácidos grasos n-3 por vía enteral tendrá el mismo efecto benéfico sobre

la evolución clínica de neonatos con respuesta inflamatoria aguda por cirugía cardiovascular.

Por lo anterior nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto de la administración del DHA por vía enteral en la proporción de leucocitos positivos a citocinas inflamatorias y anti inflamatorias y en la evolución clínica de neonatos sometidos a cirugía cardiovascular en el periodo post-quirúrgico?

### 3. JUSTIFICACION

Se conoce que los pacientes que se someten a cirugía tienen un alto riesgo de desarrollar complicaciones como infecciones, sepsis grave y falla orgánica, estas últimas aumentan el riesgo de muerte en un 40-80%.<sup>2,4</sup> La sepsis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales. En países en desarrollo como el nuestro, el índice de mortalidad por infecciones neonatales es un problema preocupante ya que se ha reportado que 1.6 millones de niños fallecen anualmente.<sup>29</sup> En la UCIN del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, la sepsis se presentó en 35-45 casos por cada 100 niños hospitalizados durante 2005-2009.<sup>30</sup>

Por otro lado, la cardiopatía congénita es la primera causa de ingreso a este servicio del Hospital de Pediatría, lo que representa el 25% de los ingresos. De 389 niños con cardiopatía que ingresaron en un periodo de cuatro años, el 31% (121) falleció y de éstos, 75 niños (62%) habían sido sometidos a cirugía.<sup>31</sup> Por lo que además de ser un problema frecuente, consideramos que la cirugía cardiovascular es un buen modelo de respuesta inflamatoria aguda.

La alta frecuencia de las intervenciones quirúrgicas y de infecciones nosocomiales neonatales hacen que éstas se consideren un problema prioritario en las instituciones de salud, por lo que es importante encontrar una estrategia que disminuya las complicaciones como la sepsis grave y fallas orgánicas, lo cual nos ayudará a diseñar intervenciones dirigidas a mejorar la evolución clínica, y secundariamente disminuir desde la estancia en cuidados intensivos hasta la mortalidad.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la administración enteral de DHA en la respuesta inflamatoria y la evolución clínica de neonatos sometidos a cirugía cardiovascular.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

4.1.1 Comparar la respuesta inflamatoria post-quirúrgica (en términos de porcentaje de células positivas a IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-1 $_{ra}$ ) de un grupo de niños sometidos a cirugía cardiovascular que reciban DHA por vía enteral con la de un grupo de niños que reciban placebo.

4.1.2 Comparar la evolución clínica (en términos de frecuencia de sepsis grave y de fallas orgánicas, así como estancia en UCIN) de un grupo de niños sometidos a cirugía cardiovascular que reciban DHA por vía enteral con la de un grupo de niños que reciban placebo.

## **5. HIPOTESIS GENERAL**

La administración de DHA por vía enteral mejora la modulación de citocinas y la evolución clínica en los neonatos que reciben el DHA comparados con los neonatos que reciben el placebo.

### **5.1 HIPOTESIS ESPECÍFICAS**

5.1.1 El porcentaje de células positivas a IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-1 $_{ra}$  es mejor modulada en los niños que reciben el DHA que en los niños que reciben placebo.

5.1.2 La frecuencia de sepsis grave, la frecuencia y duración de las fallas orgánicas, así como la estancia en UCIN son menores en los niños que reciben el DHA comparados con los niños que reciben el placebo.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 *Diseño de estudio*: Ensayo clínico aleatorio, controlado, doble ciego.

6.2 *Lugar de estudio*: Se realizó en la Unidad de Investigación en Nutrición del Hospital de Pediatría, C. M. N. Siglo XXI. Los pacientes se captaron en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital de Pediatría, C. M. N. Siglo XXI del IMSS.

6.3 *Población de estudio*: Niños menores de un mes de edad postnatal que requieran de una cirugía cardiovascular como fístula sistémico pulmonar (tipo Blalock-Taussig modificada) ó coartectomía que son las intervenciones quirúrgicas más frecuentes en esta población y que tienen un grado similar de estrés quirúrgico.

### 6.4 *Criterios de selección*

#### 6.4.1 *Criterios de inclusión*

- Que sus padres aceptaran participar después de explicarles de forma verbal y escrita el objetivo y procedimientos de la investigación.
- Edad gestacional mayor de 32 semanas.
- Peso adecuado para su edad postnatal de acuerdo a Lubchenco si tuvo menos de 2 semanas de edad;<sup>32</sup> si tuvo más de dos semanas, se utilizaron las curvas de "National Center of Health Statistics" (NCHS).<sup>33</sup> Para niños pretérmino se utilizaron las curvas de Marks.<sup>34</sup>
- Tracto gastrointestinal funcional que le permitiera tolerar al menos el estímulo enteral mínimo para recibir el DHA o placebo.
- Que no presentaran datos de respuesta inflamatoria antes de la cirugía (temperatura central  $> 38^{\circ}\text{C}$  o  $< 36^{\circ}\text{C}$  y un conteo de leucocitos  $> 19.5 \times 10^3/\text{mm}$  ó  $< 5 \times 10^3/\text{mm}$ ).<sup>35</sup>

#### 6.4.2 *Criterios de eliminación.*

- Que permaneciera en ayuno por más de dos días posteriores a la cirugía.
- Que fuera trasladado a otro hospital fuera del D. F.
- Que los padres decidieran que su hijo abandonara el estudio.

- Que requiera circulación extracorpórea durante la cirugía.

### 6.5 Tipo de muestreo.

No probabilístico. Se capturaron a todos los niños que ingresaron a la UCIN y cumplieron los criterios de inclusión.

### 6.6 Tamaño de muestra

Se calculó inicialmente considerando las medias y desviación estándar de la estancia hospitalaria y las concentraciones de IL-6 en suero de adultos con cirugía abdominal quienes recibieron aceite de pescado como fuente de LC-PUFAS n-3 por nutrición parenteral;<sup>15</sup> se utilizó una prueba de hipótesis de una cola con un poder de 80%.

Donde:

$$\alpha = 0.05 \quad n = \frac{[(\delta) (Z\alpha - (-Z\beta))]^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

$$\beta = 0.20$$

$\delta$  = Desviación estándar

$\mu_1$  y  $\mu_2$  = media del grupo control y experimental, respectivamente.

Considerando una diferencia de medias de 5 días en la variable estancia hospitalaria, la muestra estimada fue de 30 niños por grupo.<sup>15</sup>

$$n = \frac{[(11) (1.645+0.84)]^2}{(9.1-4.1)^2}$$

Estimando una diferencia de medias de 25 % en las concentraciones plasmáticas de IL-6 al las 24 horas post-cirugía se estimó una muestra de 28 niños por grupo.<sup>15</sup> Sin embargo, se conoce que la dispersión de las citocinas circulantes es alto, por lo que podría haberse sobreestimado el tamaño de muestra.

$$n = \frac{[(200) (1.645+0.84)]^2}{(380-285)^2}$$

Considerando un 20% en las pérdidas al seguimiento, el tamaño de muestra estimado al inicio del estudio fue de 34 niños por grupo.

Por lo anterior, el tamaño de muestra se recalculó con los datos de 10 neonatos por grupo estudiados debido a que en este proyecto las citocinas se determinaron como porcentaje de células positivas en lugar de concentraciones circulantes, y a que no existen reportes de citocinas por citometría en neonatos con respuesta inflamatoria aguda a quienes se les administre DHA.

Los criterios para establecer las variables de evolución clínica en adultos difieren de los criterios para neonatos, por lo que no se había estimado un tamaño de muestra para sepsis grave y fallas orgánicas. Estas estimaciones se recalcularon con datos colectados en este estudio con una n de 10 neonatos por grupo, con una prueba de hipótesis de una cola y un poder del 80%.

La fórmula utilizada para la estimación de tamaño de muestra de sepsis grave y fallas orgánicas fue la siguiente:

Donde:

$$n = \left[ \frac{Z_{\alpha} \sqrt{2\pi_c(1 - \pi_c)} - Z_{\beta} \sqrt{(1 - \pi_t) + \pi_c(1 - \pi_c)}}{(\pi_t - \pi_c)} \right]^2$$

$\pi_t$  = Proporción en grupo de tratamiento.

$(\pi_t - \pi_c)^2$

$\pi_c$  = Proporción en el grupo control

n = Número de sujetos necesarios en cada grupo

- Para sepsis grave se consideró que ocurrió en 1/10 neonatos del grupo DHA y 4/10 del grupo placebo, lo que dio una n= 13 niños por grupo.
- Para pacientes con falla orgánica se presentó el mismo número de eventos que para sepsis grave, por lo que también se estimó que se requerían 13 niños por grupo.
- Para el cálculo de estancia en UCIN se utilizó la fórmula para medias considerando que el promedio de los días de estancia del grupo DHA fue de 9.3 y el del grupo

placebo fue de 16.7, con una desviación estándar de 4.4 días, por lo que la n estimada fue de 22 niños por grupo.

## Definición operativa de las variables

Variables Independiente	Definición operativa de las variables	Tipo de variable y unidades
Administración de DHA	Administración de 75 mg de DHA/kg/día dividido en 2 dosis (entre 0.2 y 0.4 mL/dosis) del producto Neuromins, marca Martek, Inc. (anexo 1) ó placebo (aceite de girasol). La administración fue peri operatoria, iniciando desde 2 días previos a la cirugía hasta 6 días post-cirugía.	Cualitativa nominal. 1 = DHA 0 = Placebo
<b>Dependientes</b>		
1. <i>Respuesta inflamatoria</i>		
Citocinas	Determinación de citocinas intracelulares de monocitos y linfocitos en sangre total antes de la cirugía (basal), 24 h y 7 días post-cirugía por citometría de flujo.	Cuantitativa. Porcentaje de células positivas al anticuerpo de la citocina, del total de monocitos y linfocitos seleccionados
1.1 IL-1 beta		
1.2 TNF-alfa		
1.3 IL-6		
1.4 IL-10		
1.5 IL-1ra		
2. <i>Evolución clínica</i>		
2.1 Sepsis grave	La sepsis se definió por consenso internacional como respuesta inflamatoria sistémica, resultado de una infección probada o de la sospecha de ésta donde deben estar presentes al menos 2 de cuatro criterios: 1) Temperatura >38.5°C o <36°C. 2) Taquicardia, >180 latidos/min, Bradicardia, <100 latidos/min. 3) Frecuencia respiratoria > 40 respiraciones/min. o ventilación mecánica por proceso agudo. 4) Conteo de leucocitos >19.5 x 10 <sup>3</sup> /mm o <5 leucocitos x 10 <sup>3</sup> /mm), ó >10% de neutrófilos inmaduros. También se registró el microorganismo aislado. La sepsis grave se definió como la sepsis más uno de los siguientes datos: falla cardiovascular o síndrome de dificultad respiratoria aguda, ó 2 o más fallas orgánicas. <sup>35</sup>	Cualitativa dicotómica: frecuencia
2.2 Fallas orgánicas		
2.2.1 Respiratoria	Debe incluir un PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> < 300 en ausencia de enfermedad pulmonar preexistente ó necesidad probada por > 50 % de FiO <sub>2</sub> para mantener una saturación aceptable > 70 según cardiopatía. <sup>35</sup> Cuando se encontraban bajo asistencia mecánica a la ventilación previa al estudio, se consideró el incremento de ésta en más de 20%. En cada paciente se consideró la variación de su condición basal de saturación de O <sub>2</sub> , FiO <sub>2</sub> y presión positiva.	Cualitativa dicotómica: frecuencia.

*Definición de las variables (continuación)*

## 6.8 Procedimientos

Variables	Definición operativa de las variables	Tipo de variable y unidades
2.2.2 Cardiovascular	Falla a pesar de la administración de bolos de solución intravenosa $\geq 40$ mL/kg en 1 hora. Hipotensión, presión sistólica sanguínea $< 75$ mmHg ó necesidad de medicamentos vasoactivos para mantener la presión sanguínea normal (dopamina $> 5$ ug/kg/min o bien dobutamina, epinefrina ó norepinefrina en cualquier dosis) ó Dos de los siguientes datos: Acidosis metabólica inexplicable, déficit de base $> 5.0$ mEq/L, Lactato arterial elevado $> 2$ veces el límite superior normal, Oliguria: orina $< 0.5$ mL/kg/h Llenado capilar prolongado: $> 5$ segundos. Diferencia entre temperatura periférica y central $> 3^{\circ}\text{C}$ . <sup>35</sup>	Cualitativa dicotómica: frecuencia.
2.2.3 Hematológica	Conteo de plaquetas menor a 80,000/mm <sup>3</sup> o una disminución del 50% del conteo de plaquetas del valor más alto registrados los 3 días previos. <sup>35</sup>	Cualitativa dicotómica: frecuencia.
2.2.4 Renal	Elevación de la creatinina sérica $\geq 2$ veces el límite superior normal para la edad o un incremento del doble en la creatinina basal. <sup>35</sup>	Cualitativa dicotómica: frecuencia.
2.2.5 Hepática	Incremento de la bilirrubina total $> 2$ mg/dl o elevación de alanino transaminasa dos veces por arriba del límite superior normal para la edad. <sup>35</sup>	Cualitativa dicotómica: frecuencia.
2.7 Tiempo de estancia en la UCIN	Duración de la estancia en la UCIN entre el día de la cirugía y el egreso de este servicio.	Cuantitativa: días.

### De confusión

1. Porcentaje de ácidos grasos tisular	Proporción de PUFAS en los fosfolípidos de membrana de los eritrocitos al ingreso del estudio como indicador de las reservas de ácidos grasos en tejidos, entre ellos el DHA. <sup>36</sup>	Cuantitativa. proporción relativa de lípidos totales.
2. Ingestión de leche humana	Aporte de leche de la propia madre durante el estudio.	Cuantitativa. Kcal/kg/día
3. Tratamiento con anti-inflamatorios.	Tipo de anti-inflamatorios: esteroideo (dexametasona y metilprednisolona) y no esteroideo (ketorolaco y ácido acetilsalicílico), así como la duración de su administración.	Cualitativa esteroideo/no esteroideo, si/no y cuantitativa: duración en días
4. Gravedad del padecimiento	Estimación del estado de gravedad del padecimiento del niño en las 24 h pre-cirugía por medio de la escala Score for Neonatal Acute Physiology, versión II (SNAP-II). <sup>37</sup> Ésta evalúa la presión arterial media, temperatura, relación $\text{PO}_2/\text{FiO}_2$ , pH sérico, presencia de crisis convulsivas y uresis horaria.	Cuantitativa discontinua.
5. Edad gestacional corregida	Es la suma de la edad gestacional determinada al nacer más la edad posnatal.	Cuantitativa. Semanas

Se realizó visita diaria al servicio de Cuidados Intensivos Neonatales para identificar a

los candidatos de estudio. Una vez identificados, se explicó a los padres el objetivo,

procedimientos, posibles beneficios y riesgos del estudio para solicitarles el consentimiento escrito (anexo 2).

*6.8.1 Aleatorización de la intervención.* Se realizó mediante sobres opacos cerrados con números de expedientes consecutivos sin reemplazo.

*6.8.2 Administración de la dosis.* El DHA o placebo se administró desde 2 días antes de la cirugía y 6 días post-cirugía, antes de la toma de leche del neonato dividido en 2 dosis (mañana y noche para mantenerlo disponible en circulación por un mayor tiempo). Para administrar el DHA o placebo se utilizó una jeringa estéril y la sonda orogástrica que se utilizaba para su alimentación; si no tenía sonda, se administró por vía bucal colocando la jeringa en el carrillo. Por otro lado, la dosis de DHA se calculó siguiendo las recomendaciones de la Comisión Europea que estableció como recomendación máxima el 1% del total de ácidos grasos como LC-PUFA n-3 ó DHA para el contenido de sucedáneos de leche humana, imitando las concentraciones reportadas para la leche humana.<sup>38</sup>

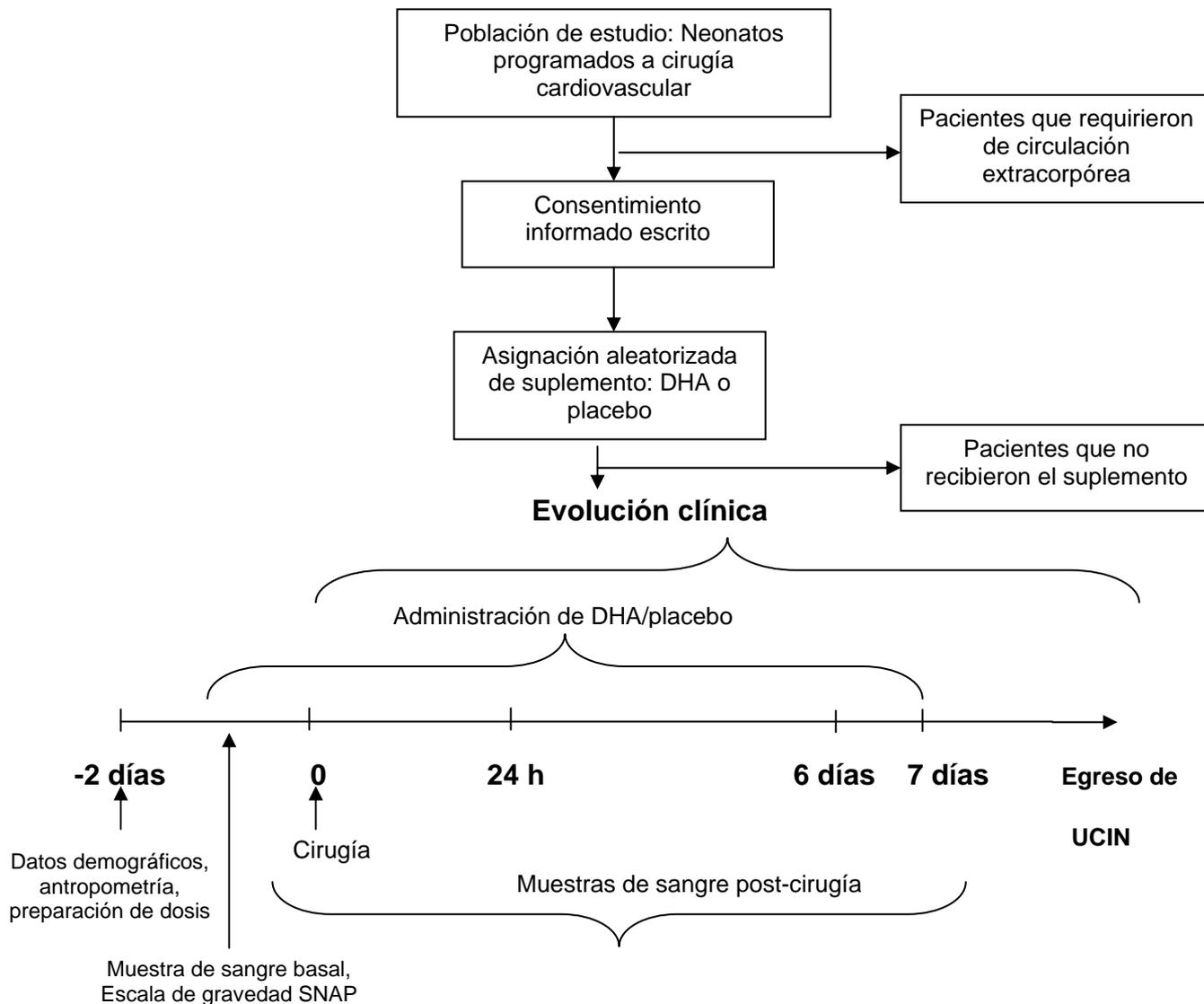
Recientemente se reportó que la ingestión diaria de DHA en niños alimentados al pecho depende del contenido en la leche y del volumen ingerido. Si consideramos que un niño recibe aproximadamente 765 mL/día de leche humana entre el mes y los 6 meses de edad, con un contenido de lípidos promedio de 41.3 g/L, los niños que consumen leche con un contenido alto normal (~ 1% de los ácidos grasos totales) consumirían aproximadamente 315 mg de DHA al día.<sup>39</sup> Con la dosis calculada en el presente estudio los niños de 3 kg recibieron 225 mg de DHA al día.

*6.8.3 Cegamiento.* El estudio fue doble ciego porque para la evolución clínica, el neonatólogo tratante y el neonatólogo que evaluó los eventos (Dr. Villegas) no conocieron el tipo de intervención que recibieron los niños; para el análisis de las citocinas, los porcentajes se obtuvieron sin conocer el tipo de intervención por la Dra. Chávez.

*6.8.4 Toma de muestra.* Se tomó una muestra de 1 mL de sangre venosa con heparina de sodio antes de la cirugía, a las 24 horas y al día 7 posteriores a la cirugía. Sólo en la medición basal se colectaron 1.5 mL de sangre venosa en EDTA para medir el

porcentaje de ácidos grasos en las membranas de los eritrocitos, entre ellos el DHA. Se solicitó la muestra al residente de neonatología un día antes para colectarla cuando se puncionara para otras determinaciones de rutina.

### Procedimientos del estudio.



## 6.9 Mediciones

*6.9.1 Citocinas.* Se determinaron por una microtécnica donde se hizo una dilución 1:1 de la sangre total con RPMI 1640. Esta se dividió en dos pozos, uno se estimuló con phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) e Ionomicina. Después de una incubación de 5 horas con CO<sub>2</sub> al 5%, se marcaron las citocinas intracelulares con fluorocromos FITC, APC, y PE (marca BD-Pharmingen) en sangre total, las cuales que se determinaron mediante el citómetro de flujo Facs Aria marca BD del Centro de Instrumentos del Centro Médico Nacional Siglo XXI (Anexo 3). Aunque este método tiene una duración de procesamiento aproximada de 8 horas a partir de la punción, permite la determinación de citocinas en un volumen de sangre pequeño (0.5 mL de sangre por tiempo de medición) y evita la degradación de la citocina.

También se ha reportado que el método de la determinación de citocinas intracelulares en cultivo celular de sangre total es considerado superior al cultivo de células mononucleares sanguíneas periféricas, ya que el procedimiento de la separación puede estresar o dañar a los leucocitos ocasionando una depleción selectiva o enriquecimiento de cierta población de linfocitos o monocitos y pueden conducir incluso a una pre-activación. Además, el cultivo de células de sangre total requiere de una menor cantidad de sangre en comparación con la de células mononucleares y puede permitir una mejor reproducibilidad de los resultados.<sup>40</sup>

*6.9.2 Porcentaje de ácidos grasos en los tejidos.* En la muestra de sangre basal los eritrocitos se separaron y lavaron por medio de centrifugado con solución salina al 0.9% para congelarlos a -70°C y determinar el perfil de ácidos grasos contenidos en los fosfolípidos de la membrana celular, entre ellos el DHA mediante un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 series II (Anexo 4 y 5).<sup>36</sup>

*6.9.3 Ingestión de leche humana.* Se registró diariamente el volumen ingerido del paciente durante el tiempo de estancia en UCIN (anexo 6). Para la estimación del contenido energético de la leche humana se consideró que cada mililitro aporta 0.67 kcal en promedio.

6.9.4 *Gravedad de la Enfermedad.* Se midió a través de la escala Score for Neonatal Acute Physiology, versión II (SNAP-II). Esta escala mide la gravedad de la enfermedad, a mayor valor, mayor es la gravedad del neonato. Este sistema considera 6 variables: presión arterial media, temperatura, relación  $PO_2/FiO_2$ , pH sérico, crisis convulsivas y uresis horaria, y establece puntos de corte asignando una puntuación (anexo 7).<sup>37</sup>

6.9.5 *Datos demográficos.* Al ingreso al estudio se registró el género, el apgar, edad gestacional al nacer medida por la escala de Ballard o en su defecto, por fecha de última regla materna y la edad posnatal. También se midió el peso, la longitud y el perímetro cefálico para determinar el estado nutricional del paciente como se mencionó en los criterios de inclusión. El resto de los datos se colectaron del expediente clínico o por encuesta a la madre (anexo 6).

6.9.6 *Efectos adversos.* Una revisión sobre toxicología del DHA indicó que a dosis de hasta 315 mg/día parece ser seguro para niños de 1 a 6 meses,<sup>39</sup> que excede a las utilizadas en el presente estudio, por lo que se consideraron como eventos adversos la necesidad de circulación extracorpórea durante la cirugía, la suspensión del aporte enteral por gravedad extrema y fallecimiento durante su estancia en la UCIN.

#### 6.10 Aspectos éticos

Este proyecto tiene un riesgo mayor al mínimo. Los investigadores declaramos que se respetaron estrictamente los principios contenidos en el Código de Nuremberg, la Declaración de Helsinki, la enmienda de Tokio, el informe Belmont y el Código de Reglamentos Federales de Estados Unidos, y que este proyecto se apega a la Ley General de Salud de México, entre los que se incluyen lo siguiente:

- ◆ Se solicitó el consentimiento escrito de los padres explicando los objetivos, procedimientos, posibles beneficios y riesgos de la investigación, incluyendo la firma de dos testigos y del médico tratante.

- ◆ Se aseguró la confidencialidad de la identificación del paciente.
- ◆ El niño no continuó en el estudio si el médico tratante consideró que su estabilidad clínica se encontraba en riesgo.
- ◆ El niño pudo abandonar el estudio en el momento que los padres lo desearan sin que se afectara su atención médica, informándose verbalmente al ingreso del estudio y en la carta de consentimiento.
- ◆ Este proyecto fue aprobado por el Comité Local de Investigación del Hospital de Pediatría con el N° 2005-3603-72 y por la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS con el N° 2006-785-069 (anexo 8).

### *6.11 Análisis estadístico*

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS versión 16 y Minitab versión 14. Las variables cuantitativas se transformaron a logaritmos y se comprobó que mostraran una distribución normal. Esto no se demostró en algunas covariables por lo que se reportaron como mediana e intervalo. Para comparar el efecto del DHA sobre las citocinas y la estancia en UCIN entre grupos y en cada tiempo de medición, se usó la prueba de t de Student. Para algunas covariables sin distribución normal se utilizó la prueba de Mann-Whitney. Para comparar el cambio de las variables cuantitativas entre la medición basal y los tiempos post-cirugía para cada grupo se utilizó la prueba de t pareada, mientras que para analizar el efecto del DHA entre grupos durante el seguimiento, así como ajustar por variables de confusión, se utilizaron modelos de ANCOVA para medidas repetidas, mientras que para el ajuste por confusores en la estancia en terapia intensiva se utilizaron modelos de regresión lineal múltiple. La identificación de factores confusores en citocinas y estancia en UCIN se realizó mediante matrices de correlaciones con pruebas de Pearson y Spearman.

Para comparar entre grupos la frecuencia de sepsis grave y fallas orgánicas se utilizó la prueba exacta de Fisher, y se estimaron los riesgos con un intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Además, se calculó el riesgo relativo recíproco del grupo placebo dividiendo 1

entre el RR de grupo DHA, mientras que la reducción del riesgo se calculó mediante la resta del la tasa de incidencia (TI) del grupo placebo menos la TI del grupo DHA, dividido entre la TI del grupo placebo. Para controlar por potenciales confusores, se utilizaron modelos de regresión logística binaria.

#### *6.12 Financiamiento*

Este trabajo cuenta con cuatro financiamientos por concurso. Uno fue otorgado al proyecto de neonatos con el número Fofoi FIS/IMSS/PROT/094; el segundo fue para el estudio en adultos con número Fofoi FIS/IMSS/PROT/095 y los dos últimos fueron financiamientos complementarios para Tesis de Doctorado con avances con número FIS/IMSS/PROT/516 y FIS/IMSS/PROT/MD09/727. Los fondos fueron aportados por el Fondo para la Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social (anexo 9).

## **7. RESULTADOS**

### *7.1 Estudio piloto en adultos.*

Se realizó un estudio piloto en adultos que permitiera estandarizar la técnica de determinación de citocinas, identificar los tiempos de colección de muestra sanguínea más representativos de los cambios de las citocinas y establecer la logística del estudio. Para realizar el estudio piloto se elaboró un protocolo en adultos que fue registrado en el Comité de Investigación Local del Hospital de Cardiología, C. M. N. Siglo XXI (anexo 1).

En el estudio piloto se captaron 23 adultos que se sometieron a revascularización miocárdica programada, de los cuales 12 pacientes recibieron 6 g de aceite de pescado, que contenían 1600mg de EPA y 800 mg de DHA al día, al que se denominó grupo omega 3, y once pacientes recibieron placebo; ambos grupos recibieron 2 cápsulas por la mañana y 2 cápsulas por la tarde. Las variables relacionadas a la hipótesis de evolución clínica se estudiaron en los 23 pacientes, mientras que la determinación de las citocinas fue factible realizarlas en 9 pacientes del grupo omega 3 y en 10 pacientes del grupo placebo en 5 tiempos: basal (antes de la cirugía), al egreso de quirófano, tiempo al que se denominó cierre de la herida quirúrgica (Hx Qx), a las 24 h postcirugía, 48 h y 7 días postcirugía. No hubo fallecimientos durante el seguimiento hasta el egreso del hospital. Con este estudio piloto se determinó que en los neonatos se evaluaran solamente los tiempos: basal, 24 h y 7d post-cirugía, lo que disminuyó el número de punciones y de volumen sanguíneo colectado en neonatos.

#### *7.1.1 Variables demográficas de los adultos*

Al ingreso del estudio, la edad tendió a ser menor en el grupo omega 3 comparado con el grupo placebo, mientras que el índice de masa corporal fue menor en el grupo omega 3 comparado con el grupo placebo. Sin embargo, en ambos grupos la mediana del índice de masa corporal nos indicó que los sujetos presentaron sobrepeso. El resto de las variables demográficas fueron similares al ingreso del estudio (cuadro 1)

**Cuadro 1. Variables demográficas de los adultos**

	GRUPO		Valor P
	OMEGA 3 n = 12	PLACEBO n = 11	
Sexo			
Masculino:Femenino	11:1	11	0.522 <sup>†</sup>
Edad, años <sup>™</sup>	57.5 ± 1.1	65.5 ± 1.2	<b>0.065<sup>‡</sup></b>
Peso, kg <sup>™</sup>	73.5 ± 1.0	79.4 ± 1.1	0.182 <sup>‡</sup>
Talla, m <sup>™</sup>	1.68 ± 1.0	1.66 ± 1.0	0.472 <sup>‡</sup>
IMC, kg/mts <sup>™</sup>	25.7 ± 1.0	28.7 ± 1.0	<b>0.040<sup>‡</sup></b>

Proporción<sup>™</sup> Media ± error estándar

IMC: Índice de masa corporal

<sup>†</sup> Prueba exacta de Fisher

<sup>‡</sup> Prueba de t de Student

### 7.1.2 Citocinas intracelulares en adultos.

Las citocinas se expresaron como porcentaje de células positivas al anticuerpo del total de monocitos y linfocitos seleccionados. El porcentaje de células fue similar entre los grupos al ingreso. El grupo omega 3 mostró menor porcentaje de células positivas a citocinas inflamatorias IL-1 $\beta$  y a IL-6 comparado con el grupo placebo a las 24 h postcirugía, aunque sólo IL-1 $\beta$  fue menor al cierre de la herida quirúrgica (cuadro 2), mientras que las citocinas antiinflamatorias IL-1ra e IL-10 mostraron menor porcentaje en el grupo omega 3 comparado con el placebo al cierre de herida quirúrgica (cuadro 3).

**Cuadro 2. Citocinas inflamatorias de adultos durante el seguimiento.**

Citocina*	Tiempo	GRUPO		Valor P <sup>‡</sup>
		Omega 3 n = 9	PLACEBO n = 10	
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Basal	1.45 $\pm$ 1.69	2.92 $\pm$ 1.29	0.260
	Hx Qx	0.82 $\pm$ 0.1.58	2.57 $\pm$ 1.41	<b>0.033</b>
	24 h	0.92 $\pm$ 1.66	4.25 $\pm$ 1.55	<b>0.017</b>
	48 h	0.93 $\pm$ 1.82	2.32 $\pm$ 1.86	0.150
	Día 7	0.40 $\pm$ 2.0	0.85 $\pm$ 1.58	0.190
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Basal	26.5 $\pm$ 1.5	34.7 $\pm$ 1.29	0.610
	Hx Qx	10.42 $\pm$ 1.55	19.50 $\pm$ 1.26	0.130
	24 h	9.38 $\pm$ 1.66	18.45 $\pm$ 1.17	0.130
	48 h	9.55 $\pm$ 2.0	26.18 $\pm$ 1.19	0.110
	Día 7	20.89 $\pm$ 1.48	53.32 $\pm$ 1.15	0.130
<b>IL-6</b>	Basal	4.48 $\pm$ 1.25	3.84 $\pm$ 1.45	0.720
	Hx Qx	2.76 $\pm$ 1.17	3.85 $\pm$ 1.45	0.220
	24 h	3.13 $\pm$ 1.18	4.88 $\pm$ 1.26	<b>0.076</b>
	48 h	1.83 $\pm$ 1.24	2.93 $\pm$ 1.35	0.110
	Día 7	2.38 $\pm$ 1.29	1.97 $\pm$ 1.26	0.300

\* Porcentaje de células positivas a la citocina  
Hx Qx : Herida quirúrgica

‡ Comparaciones entre grupos con prueba de t de Student

**Cuadro 3. Citocinas antiinflamatorias de adultos durante el seguimiento.**

Citocina*	Tiempo	GRUPO		Valor
		Omega 3 n = 9	PLACEBO n = 10	P <sup>‡</sup>
<b>IL-1ra</b>	Basal	4.13 ± 1.26	4.80 ± 1.16	0.610
	Hx Qx	1.74 ± 1.35	3.89 ± 1.29	<b>0.029</b>
	24 h	6.98 ± 1.22	9.42 ± 1.38	0.220
	48 h	3.61 ± 1.55	6.38 ± 1.48	0.180
	Día 7	2.52 ± 1.51	3.94 ± 1.21	0.170
<b>IL-10</b>	Basal	2.48 ± 1.38	2.94 ± 1.29	0.680
	Hx Qx	1.24 ± 1.66	2.92 ± 1.41	<b>0.096</b>
	24 h	2.74 ± 1.48	4.20 ± 1.70	0.260
	48 h	3.08 ± 1.55	3.17 ± 1.59	0.480
	Día 7	2.90 ± 1.70	4.21 ± 1.55	0.300

\* Porcentaje de células positivas a la citocina  
Hx Qx : Herida quirúrgica

‡ Comparaciones entre grupos con prueba de t de Student

El análisis multivariado indicó que los pacientes que recibieron los ácidos grasos omega 3 mostraron menor porcentaje de células positivas a citocinas comparados con el grupo que recibió el placebo durante el estudio; la diferencia promedio del grupo omega 3 comparado con el placebo fue de -3.9%, P= 0.010 para IL-1β<sup>+</sup>, -2.1%, P= 0.017 para IL-1ra<sup>+</sup>, -5.0%, P= 0.0000 para TNF-α<sup>+</sup>; -1.9%, P=0.025 para IL-6<sup>+</sup> y de -3.7%, P=0.004 para IL-10<sup>+</sup> después de controlar por edad, índice de masa corporal como indicador de estado nutricional y gravedad estimada por APACHE II, lo que se interpretó como una menor producción de citocinas durante el seguimiento, después de ajustar por factores confusores. No se observó efecto del tiempo de estudio en los valores de citocinas y tampoco de la interacción entre la suplementación con ácidos grasos n-3 y el tiempo de estudio (P >0.50)

### *7.1.3 Evolución clínica en adultos.*

Se observó menor frecuencia de complicaciones en términos de infecciones y de falla respiratoria en el grupo omega 3 comparada con el grupo placebo, aunque al analizarlas individualmente no alcanzaron la significancia estadística. En relación a las infecciones, en el grupo placebo hubo un caso de sepsis con germen aislado en hemocultivo, un caso de neumonía con germen aislado en esputo, una infección en vías urinarias bajas (cistitis) y una infección de herida quirúrgica, mientras que en el grupo omega 3 se presentó una infección de vías urinarias. En el mismo sentido, el grupo omega 3 mostró menor estancia hospitalaria en piso y menor estancia total comparado con el grupo placebo.

No hubo diferencia en la duración de la estancia en terapia post quirúrgica entre el grupo omega 3 y el grupo placebo, respectivamente (cuadro 4).

El análisis multivariado mostró que los pacientes del grupo omega 3 tuvieron un menor riesgo de desarrollar complicaciones comparados con el grupo placebo después de ajustar por edad, índice de masa corporal y gravedad estimada por APACHE II. Cuando se analizaron los indicadores de evolución clínica individualmente (infecciones y falla cardiovascular) no alcanzaron la significancia estadística (cuadro 5).

#### Cuadro 4. Evolución clínica en adultos

	GRUPO		Valor de P
	OMEGA 3 N = 12	PLACEBO n = 11	
Complicaciones (infecciones+sepsis + fallas)	4 <sup>a</sup>	9 <sup>a,b,c,d</sup>	<b>0.026</b> <sup>†</sup>
Falla orgánica			
Cardiovascular	3	4	0.444 <sup>†</sup>
Respiratoria	0	1	0.478 <sup>†</sup>
Estancia hospitalaria total, días <sup>‡</sup>	8.3 ± 1.1	10.3 ± 1.1	<b>0.038</b> <sup>‡</sup>
Estancia en piso, días <sup>‡</sup>	4.5 ± 1.1	6.8 ± 3.5	<b>0.037</b> <sup>‡</sup>
Estancia en TPQ, días <sup>‡</sup>	3.2 ± 1.1	3.2 ± 1.1	0.440 <sup>‡</sup>

Frecuencia<sup>‡</sup> Promedio ± error estándar TPQ: Terapia post-quirúrgica

<sup>‡</sup> Comparaciones entre grupos con prueba de t de Student <sup>a</sup> Sin aislamiento/IVU <sup>b</sup> *Enterobacter cloacae/sepsis*

<sup>†</sup> Comparaciones entre grupos con prueba de Fisher. <sup>c</sup> *E. epidermidis/neumonía.* <sup>d</sup> *E. aureis+Rautella ornitolítica/HxQx*

#### Cuadro 5. Riesgo relativo de variables de evolución clínica en adultos.

Variable dependiente	Ajustado <sup>†</sup>		
	OR*	IC 95%	
Total complicaciones (Infecciones + falla cardiovascular y respiratoria)	<b>0.031</b>	<b>0.001</b>	<b>0.669</b>
Infecciones + sepsis	0.13	0.000	1.752
Falla cardiovascular	0.427	0.044	4.178

OR: Razón de momios del modelo de regresión logística

\* Grupo omega 3 comparado con grupo placebo

<sup>†</sup>Ajustado por edad, estado nutricional y gravedad

##### 7.1.4 Covariables en adultos.

Los grupos fueron comparables en las covariables de uso y duración de antiinflamatorios o de antibióticos, gravedad o contenido tisular de ácidos grasos. Como anti-inflamatorio esteroideo se utilizó hidrocortisona, mientras que los no esteroideos fueron el ácido acetil salicílico, metamizol, diclofenaco, etofenamato y paracetamol. Los antibióticos utilizados fueron cefalotina, ciprofloxacina, cefotaxima, amikacina, clindamicina y vancomicina (cuadro 6).

#### Cuadro 6. Covariables en adultos

	GRUPO		Valor P
	OMEGA 3	PLACEBO	
	n = 12	n = 11	
Uso de anti-inflamatorios			
a) Esteroides	0	1	0.478 <sup>†</sup>
Duración, días <sup>‡</sup>	0	1	--
b) No esteroides	12	11	1.000 <sup>†</sup>
Duración, días <sup>‡</sup>	4.8 ± 1.2	6.5 ± 1.1	0.172 <sup>‡</sup>
Uso de antibióticos			
Duración, en días <sup>‡</sup>	2.3 ± 1.3	2.8 ± 1.4	0.628 <sup>‡</sup>
Gravedad (APACHE II)* <sup>‡</sup>	5.1 ± 1.1	4.7 ± 1.2	0.681 <sup>‡</sup>

Frecuencia      <sup>‡</sup> Promedio ± error estándar      \* APACHE II, a mayor gravedad mayor calificación.

<sup>‡</sup> Comparaciones entre grupos con prueba de t de Student      <sup>†</sup> Comparaciones entre grupos con prueba de Fisher

### Cuadro 6. Covariables en adultos (continuación)

Ácidos grasos al ingreso, % de ácidos grasos totales	GRUPO		Valor P <sup>‡</sup>
	OMEGA 3	PLACEBO	
	n = 11	n = 10	
Linoléico (LA, 18:2 n-6)	11.5 ± 0.36	10.7 ± 0.37	0.146
α- Linolénico (LNA, 18:3 n-3)	0.41 ± 1.1	0.44 ± 1.1	0.561
Araquidónico (AA, 20:4 n-6)	17.3 ± 1.0	17.3 ± 1.0	0.859
Eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3)	0.67 ± 1.1	0.60 ± 1.1	0.511
Docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3)	6.04 ± 0.31	6.01 ± 0.53	0.205
Ac. Grasos n-6 (LA + AA)	29.2 ± 0.44	28.2 ± 0.50	0.161
Ac. Grasos n-3 (LNA+EPA+DHA)	7.2 ± 0.33	7.9 ± 0.53	0.284
n-6/n-3	4.1 ± 0.19	3.8 ± 0.30	0.285
AA/DHA	2.9 ± 0.14	2.7 ± 0.23	0.345

Promedio ± error estándar

<sup>‡</sup> Comparaciones entre grupos con prueba de t de student

## 7.2 Resultados en neonatos

Se captaron 47 neonatos y se analizaron 33, de los cuales 15 recibieron DHA y 18 recibieron placebo. Catorce pacientes no se incluyeron en el análisis de resultados por las siguientes razones: ocho no terminaron el estudio debido a que requirieron circulación extracorpórea durante la cirugía (grupo DHA n= 4; grupo placebo, n= 4); en dos pacientes (grupo DHA) se suspendió el aporte enteral por gravedad extrema y cuatro pacientes fallecieron antes de terminar el estudio (grupo DHA n= 1; grupo placebo n= 3).

La frecuencia de eventos adversos fue igual en ambos grupos (DHA n= 7; placebo, n= 7), por lo que el análisis de intención a tratar no fue diferente (cuadro 7).

Si se considera como evento adverso la variable sepsis grave más los sujetos que no terminaron el estudio, la distribución de los casos queda como se describe en el cuadro 7:

**Cuadro 7. Eventos adversos para el análisis de intención a tratar**

	Mejoría	No mejoría	
Grupo DHA	14	8	22
Grupo placebo	14	11	25
	28	19	

---

Comparación con prueba Exacta de Fisher, p= 0.767

### 7.2.1 Variables demográficas de neonatos.

Las características de los 33 niños al nacimiento, al ingreso del estudio y el tipo de cirugía cardiovascular fueron comparables entre los grupos (cuadro 8).

**Cuadro 8. Variables demográficas de neonatos**

	GRUPO		Valor P
	DHA n = 15	PLACEBO n = 18	
<b>Al nacer</b>			
Edad gestacional, semanas <sup>π</sup>	38.7 ± 1.1	38.0 ± 1.0	0.334 <sup>‡</sup>
Género			
Masculino: femenino	9:6	8:10	0.491 <sup>†</sup>
Apgar			
Minuto 5, < 8	0	2	
≥ 8	15	16	0.485 <sup>†</sup>
<b>Al ingreso del estudio</b>			
Edad postnatal, días <sup>π</sup>	18.2 ± 1.7	14.4 ± 2.4	0.316 <sup>‡</sup>
Peso, g <sup>π</sup>	2 813 ± 603	2 889 ± 511	0.532 <sup>‡</sup>
Longitud, cm <sup>π</sup>	50.0 ± 1.1	50.2 ± 1.5	0.925 <sup>‡</sup>
Perímetro cefálico, cm <sup>π</sup>	33.8 ± 1.1	33.9 ± 1.3	0.824 <sup>‡</sup>
<b>Tipo de cirugía</b>			
Fístula sistémico pulmonar	7 (47)	12 (67)	
Coartectomía	8 (53)	6 (33)	1.000 <sup>†</sup>

Frecuencia (porcentaje) <sup>π</sup> Promedio ± desviación estándar

<sup>‡</sup> Comparaciones entre grupos con prueba t de Student

<sup>†</sup> Comparaciones entre grupos con prueba de Fisher.

## 7.2.2 Citocinas intracelulares en neonatos.

### Comparaciones entre grupos.

El análisis del porcentaje de células positivas a citocinas mostró que los grupos fueron comparables en el tiempo basal en todas las citocinas analizadas. Sin embargo, a las 24 h post-cirugía, el grupo placebo mostró mayor proporción de IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> comparado con el grupo DHA ( $p= 0.045$ , cuadro 9). No se encontraron diferencias entre los grupos en TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> e IL-6<sup>+</sup> a las 24 h post cirugía (cuadro 9). Al día 7 post cirugía hubo una menor presencia de TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> ( $p= 0.046$ ) en el grupo DHA comparado con el placebo. En el caso de las citocinas anti-inflamatorias, la proporción de IL-10<sup>+</sup> fue menor en el grupo DHA que en el placebo a los 7 días post cirugía ( $p= 0.025$ ). No se encontraron diferencias para IL-1ra (cuadro 10).

### Deltas de citocinas entre los tiempos de estudio.

Tomando en cuenta el período completo de observación, desde el tiempo basal hasta el día 7 post cirugía, la proporción de células positivas para IL-1 $\beta$  tendió a disminuir un 89%  $\pm$  70% en el grupo placebo ( $p= 0.11$ ), mientras que no mostró ningún cambio en el grupo DHA ( $p= 0.60$ ). Con relación a la proporción de células TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> no se modificó en el grupo DHA (- 11% $\pm$  30,  $p= 0.61$ ), pero tendió a aumentar un 28%  $\pm$  17% en el grupo placebo ( $p= 0.11$ ). En cambio, la proporción de células IL-6<sup>+</sup> tuvieron un comportamiento similar, el grupo DHA tendió a disminuir un 30%  $\pm$  6% ( $p= 0.15$ ), y un 12%  $\pm$  40% en el placebo ( $p= 0.22$ ). Con respecto a las citocinas anti inflamatorias, IL-1ra e IL-10, no se observó ningún cambio en los grupos.

El análisis de acuerdo a los diferentes tiempos de observación mostró que el grupo placebo a las 24 h incrementó su proporción de células IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> en 59%  $\pm$  13% ( $p= 0.03$ ) presentando luego una disminución del 53%  $\pm$  147% a los 7 días post cirugía ( $p= 0.02$ ). En forma similar, las células IL-6<sup>+</sup> se incrementaron en un 38%  $\pm$  11% a las 24 h ( $p= 0.056$ ) y luego disminuyó en 49%  $\pm$  72% a los 7 días ( $p= 0.07$ ) en el grupo placebo. En el grupo DHA, no se observó ningún cambio en la proporción de células IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> del basal a las 24 h ni de las

24 h a los 7 días post cirugía, pero sí mostró el mismo comportamiento que el grupo placebo en IL-6<sup>+</sup>, presentando un incremento del 39% ± 4% (p= 0.09) a las 24 h y luego una disminución del 69% ± 6% a los 7 días (p= 0.02).

La proporción de células TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> presentó una disminución en ambos grupos, que tendió a ser mayor en el grupo DHA de 34% ± 20% (p= 0.08) comparado con el placebo de 26% ± 4%, (p= 0.17) a las 24 h post cirugía, mientras que de las 24 h a los 7 días el grupo placebo mostró un incremento de 54% ± 30% (p= 0.01) y el grupo DHA no presentó cambios (22% ± 36%, p= 0.32).

En relación a las citocinas anti-inflamatorias, en IL-1ra ambos grupos mostraron un incremento, pero el grupo DHA aumentó la mitad de su basal a las 24 h (52% ± 4%, p= 0.032), mientras que el grupo placebo aumentó un tercio de su basal a las 24 h (37% ± 12%, p= 0.054). Aunque de las 24 h a los 7 días el porcentaje de células IL-1ra<sup>+</sup> disminuyó en ambos grupos, esta disminución fue menor en el grupo DHA en un 45% ± 30%, p= 0.06 que la disminución del grupo placebo (-55 ± 20%, p= 0.077) con relación a su basal.

Por otro lado, el porcentaje de células IL-10<sup>+</sup> tendió a incrementarse más en el grupo DHA que en el placebo a las 24 h post cirugía (60% ± 45% vs 3% ± 15%, respectivamente p= 0.12), y entre las 24 h y el día 7 siguió incrementándose en el grupo placebo (hasta 27% ± 35%), mientras que disminuyó 64% ± 45% en grupo DHA, por lo este comportamiento fue diferente entre los grupos (p= 0.04).

En resumen, los cambios en la proporción de células positivas sugieren que el DHA suplementado favoreció el retorno a la homeostasis en forma más temprana. Esto se sustenta en que a pesar de que los pacientes ingresaron al estudio con el mismo grado de inflamación en ambos grupos, el grupo que recibió el suplemento con DHA no mostró incrementos posteriores a las 24 horas en TNF- $\alpha$  y en que la IL-1ra e IL-10, ambas anti inflamatorias, se elevaron en mayor intensidad y en forma más temprana en el grupo DHA (figura 4).

Por otra parte, se calcularon las razones entre las citocinas inflamatorias y su respectiva citocina antagonista para determinar si había un predominio de la inflamación o anti-inflamación con un comportamiento diferente entre los grupos y entre los tiempos de estudio, pero no hubo diferencias significativas ( $p > 0.200$ ).

#### Análisis multivariado para citocinas.

El grupo DHA mostró un menor porcentaje de células IL-1 $\beta$ +, IL-6+, IL-1ra+ e IL-10+ comparado con el grupo placebo durante el seguimiento de 7 días, después de ajustar por la presencia de sepsis, duración de la administración de antiinflamatorios no esteroideos, sangrado durante la cirugía, consumo de leche humana y razón entre ácidos grasos n6/n3. Este último fue un predictor significativo sólo para IL-6+ e IL-10+. No hubo interacción entre la suplementación con DHA y el tiempo de administración en ninguna citocina,  $p > 0.10$ . Por lo anterior, el efecto del DHA sobre las citocinas no sólo se mantuvo para IL-1 $\beta$  e IL-10, también alcanzó la significancia para IL-6 e IL-1ra con el ajuste de confusores. En este análisis, el TNF- $\alpha$ + no fue diferente entre los grupos (cuadro 11).

**Cuadro 9. Citocinas inflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en neonatos por citometría de flujo**

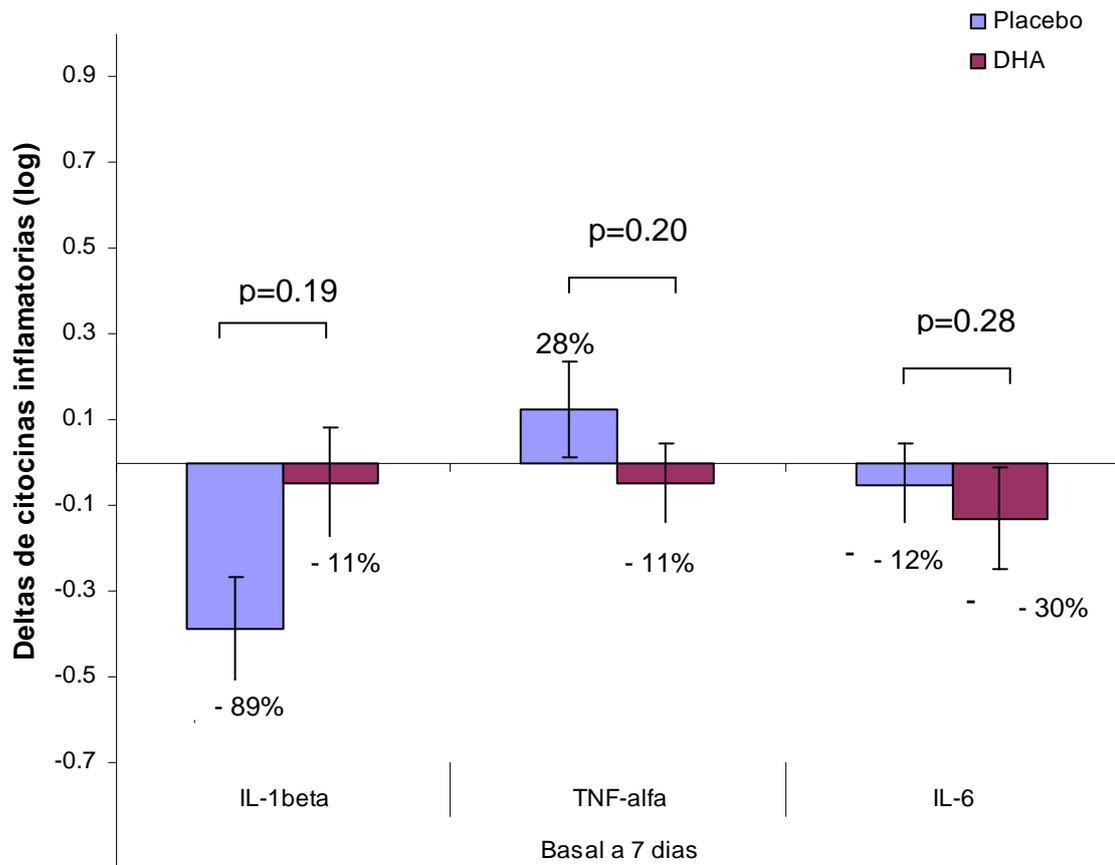
Citocina %	Tiempo	GRUPO		Valor
		DHA <sup>††</sup> n = 15	PLACEBO <sup>††</sup> n = 18	P <sup>‡</sup>
IL-1 $\beta$	Basal	0.27 $\pm$ 5.4	0.41 $\pm$ 3.5	0.458
	24 h	0.29 $\pm$ 6.2	0.74 $\pm$ 2.3	<b>0.045</b>
	7 días	0.16 $\pm$ 12.3	0.24 $\pm$ 12.3	0.656
TNF- $\alpha$	Basal	3.88 $\pm$ 2.7	5.14 $\pm$ 2.0	0.397
	24 h	2.78 $\pm$ 2.7	3.98 $\pm$ 2.4	0.163
	7 días	3.46 $\pm$ 2.2	6.82 $\pm$ 3.3	<b>0.046</b>
IL-6	Basal	4.74 $\pm$ 2.7	5.54 $\pm$ 2.2	0.640
	24 h	7.01 $\pm$ 2.0	8.07 $\pm$ 2.1	0.303
	7 días	3.52 $\pm$ 2.9	4.92 $\pm$ 2.8	0.197

Los datos son porcentaje de células positivas a la citocina de 10,000 células. Promedio  $\pm$  desviación estándar  
<sup>‡</sup> Comparaciones entre grupos con t de Student, prueba de hipótesis unilateral

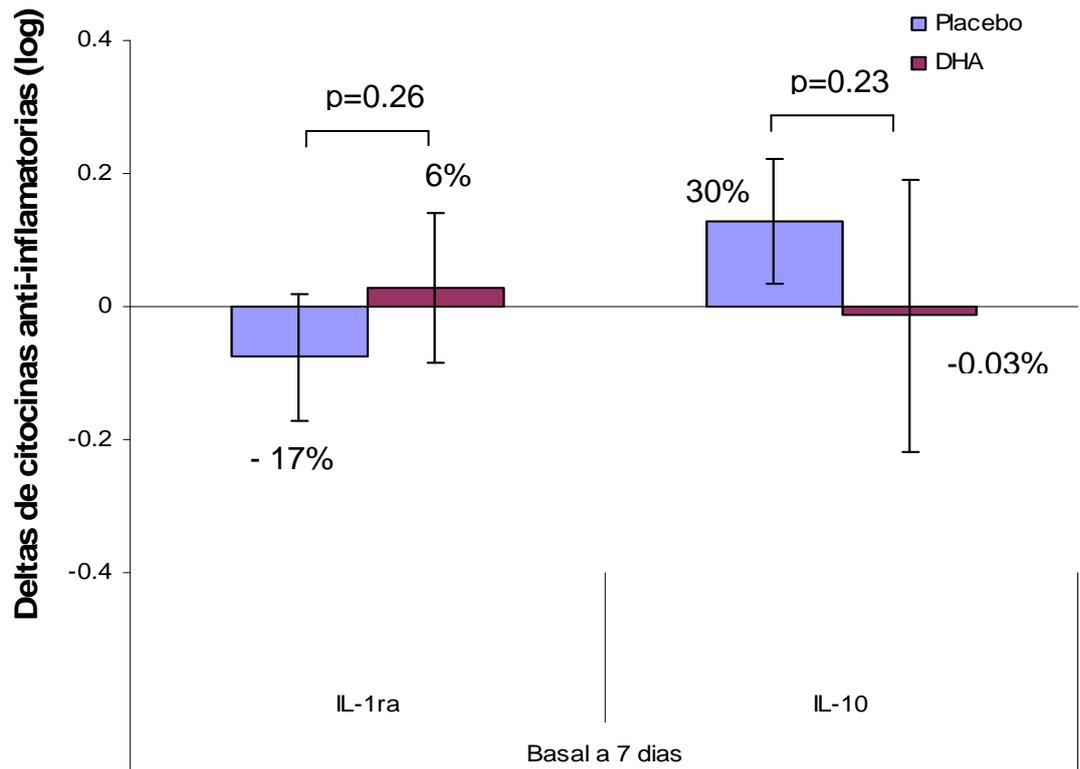
**Cuadro 10. Citocinas anti-inflamatorias IL-1ra e IL-10 en neonatos por citometría de flujo**

Citocina %	Tiempo	GRUPO		Valor
		DHA <sup>††</sup> n = 15	PLACEBO <sup>††</sup> n = 18	P <sup>‡</sup>
IL-1ra	Basal	5.46 $\pm$ 2.5	6.51 $\pm$ 2.3	0.581
	24 h	9.46 $\pm$ 2.0	9.46 $\pm$ 2.1	0.452
	7 días	5.47 $\pm$ 2.1	5.82 $\pm$ 2.1	0.555
IL-10	Basal	0.92 $\pm$ 3.78	1.54 $\pm$ 2.79	0.258
	24 h	1.70 $\pm$ 3.76	1.59 $\pm$ 4.73	0.547
	7 días	0.89 $\pm$ 2.2	2.07 $\pm$ 3.5	<b>0.025</b>

Los datos son porcentaje de células positivas a la citocina de 10,000 células. Promedio  $\pm$  desviación estándar  
<sup>‡</sup> Comparaciones entre grupos con t de Student, prueba de hipótesis unilateral

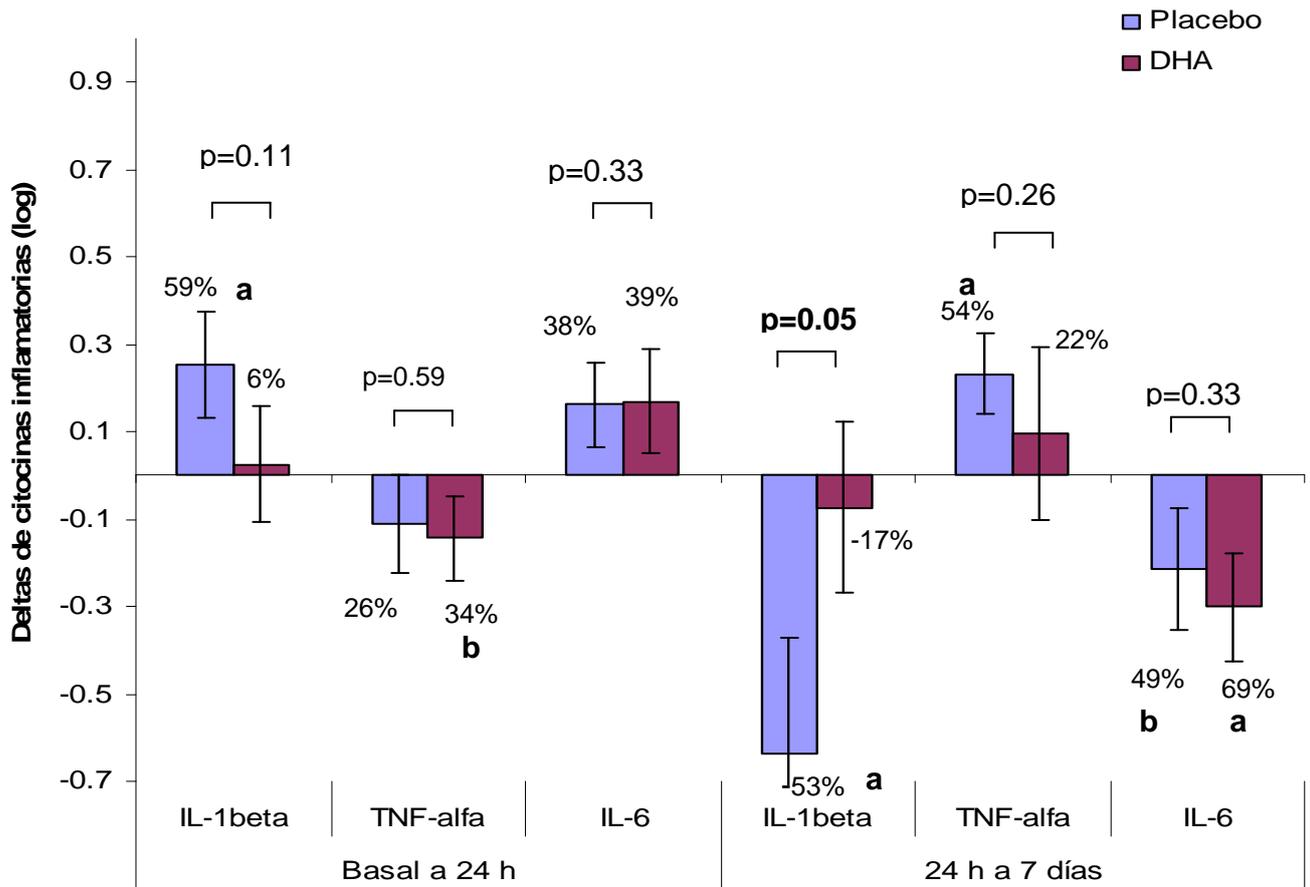


**Figura 1.** Deltas de citocinas inflamatorias entre el basal y 7 días postcirugía. Además se indica el porcentaje de cambio en cada barra. Los grupos se compararon con t de Student, indicándose la significancia sobre ambas barras.



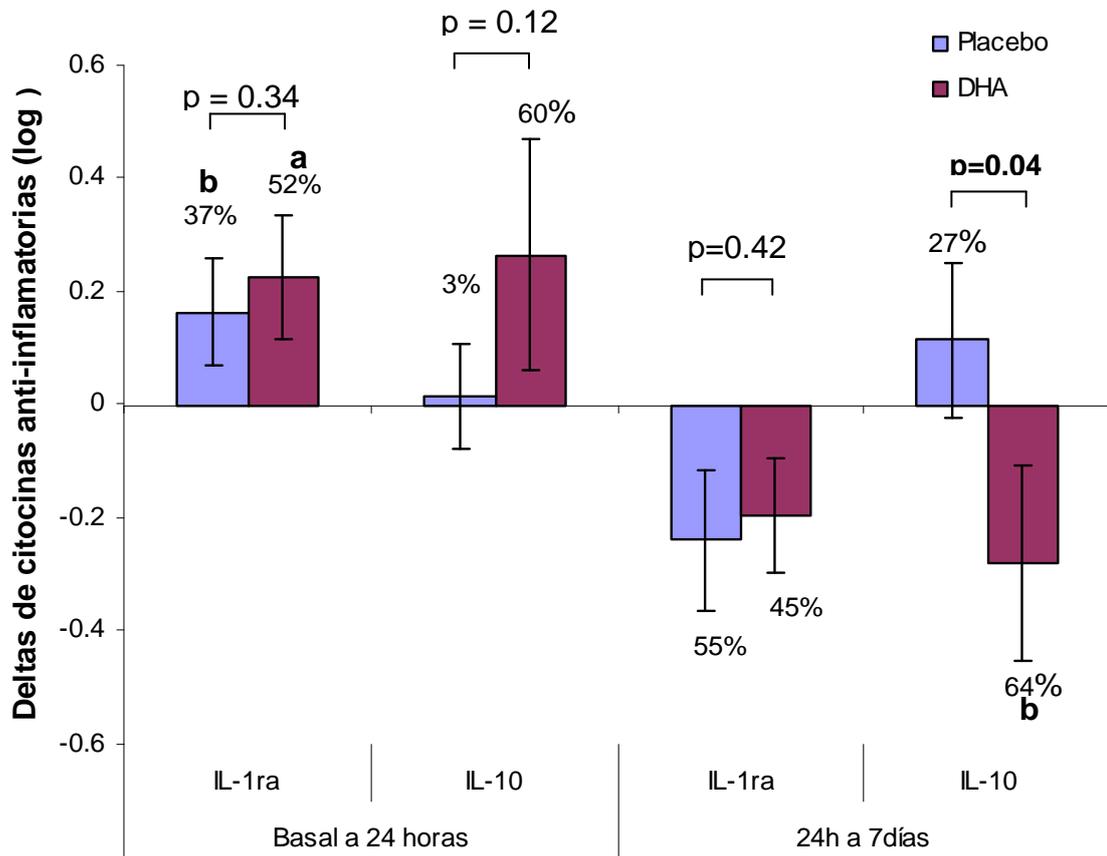
**Figura 2.** Deltas de citocinas anti-inflamatorias entre el basal y 24 postcirugía. Además se indica el porcentaje de cambio en cada barra.

Los grupos se compararon con t de Student, indicándose la significancia sobre ambas barras.



**Figura 3.** Deltas de citocinas inflamatorias entre el basal y 24 postcirugía, y entre 24h postcirugía y 7 días. También se indica el porcentaje de cambio en cada barra.

Los grupos se compararon con t de Student indicándose la significancia sobre ambas barras. Las deltas intra-grupo se compararon con t pareada y su significancia se muestra con superíndice **a** para  $p < 0.05$  y **b** para  $p$  entre 0.05 y 0.09.



**Figura 4.** Deltas de citocinas anti-inflamatorias entre el basal y 24 postcirugía, y entre 24h postcirugía y 7 días. También se indica el porcentaje de cambio en cada barra. Los grupos se compararon con t de Student indicándose la significancia sobre ambas barras. Las deltas intra-grupo se compararon con t pareada y su significancia se muestra con superíndice **a** para  $p < 0.05$  y **b** para  $p$  entre 0.05 y 0.09.

**Cuadro 11. Análisis de mediciones repetidas de células positivas para cada citocina, ajustado por confusores**

Citocina %	Factores	Diferencia promedio	P ajustada	R <sup>2</sup> %	
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	24 h	1.12	0.7642	43.60	
	7 días		0.0247		
	Grupo DHA		0.38		<b>0.0005</b>
			0.05		
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	24 h		0.2295	17.88	
	7 días	0.77	0.8353		
	Grupo DHA		1.13		0.7763
			1.46		
<b>IL-6</b>	24 h		0.9913	45.51	
	7 días	1.45	0.2352		
	Grupo DHA		0.80		<b>0.0016</b>
			0.27		
<b>IL-1ra</b>	24 h		0.9876	22.20	
	7 días	1.46	0.4300		
	Grupo DHA		0.88		<b>0.0129</b>
			0.37		
<b>IL-10</b>	24 h		0.8077	31.27	
	7 días	1.15	0.7329		
	Grupo DHA		1.06		<b>0.0255</b>
			0.10		

Los datos son porcentaje de células positivas a la citocina determinados en 10,000 células.

Comparación con ANOVA para mediciones repetidas y postprueba de Dunnet.

El tiempo control fue el basal y el grupo control fue el placebo.

Ajustado por presencia de sepsis, duración de la administración de anti-inflamatorios, sangrado durante la cirugía y el consumo de leche humana.

### 7.2.3 Evolución clínica en neonatos.

Los microorganismos aislados en cada grupo de estudio se describen en el cuadro 12. El grupo DHA mostró una tendencia a una menor frecuencia de sepsis grave (cuadro 13) y de sepsis en general, comparado con el grupo placebo (3/15 vs. 9/18,  $p= 0.077$ ). Los riesgos relativos para el desarrollo de sepsis grave  $RR= 0.3$  (IC 95% 0.04 – 2.4) y de sepsis  $RR= 0.4$  (IC 95% 0.13 - 1.22) tendieron a ser menores en el grupo DHA comparados con en el grupo placebo, pero no alcanzaron la significancia estadística.

**Cuadro 12. Aislamiento de microorganismos en los casos de sepsis estratificado por grupo**

Grupo	Microorganismo aislado	Sepsis	Sepsis grave
DHA	<i>Staphylococcus epidermidis</i> +	Sí	Sí
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>		
	<i>Staphylococcus hominis</i>	Sí	
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Sí	
Placebo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sí	
	Sepsis clínica	Sí	Sí
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Sí	Sí
	<i>Staphylococcus hominis</i> +	Sí	Sí
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sí	
	<i>Bacteremia asociada a catéter</i>	Sí	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sí	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Sí	Sí
Sepsis clínica	Sí		

Las fallas orgánicas en orden de frecuencia fueron: respiratoria, cardiovascular, hematológica, renal y hepática. En el grupo DHA comparado con el grupo placebo, el número de fallas orgánicas por grupo fue menor, así como el número de pacientes que desarrollaron al menos una falla orgánica (cuadro 13). El riesgo de desarrollar fallas orgánicas en los pacientes que recibieron el DHA fue menor  $RR= 0.11$  (IC 95% 0.02-0.75) que el de los pacientes del grupo placebo, es decir que el grupo placebo tuvo nueve veces más riesgo de desarrollar al menos una falla orgánica (Riesgo relativo recíproco= 9.1; IC 95% 1.33-63.10). Por lo anterior, la reducción del riesgo de falla orgánica en el grupo DHA fue de 89%.

La estancia en UCIN fue menor en el grupo DHA comparado con el grupo placebo de forma clínica y estadísticamente significativa; el grupo DHA se hospitalizó un promedio de 4.6 días menos en la UCIN comparado con el grupo placebo (cuadro 13).

**Cuadro 13. Evolución clínica en neonatos**

	GRUPO		Valor P
	DHA n = 15	PLACEBO n = 18	
<b>Sepsis grave*</b>	1 (7)	4 (22)	0.229 <sup>†</sup>
Falla orgánica*			
Respiratoria	1 (6.7)	6 (33.3)	0.073 <sup>†</sup>
Cardiovascular	1 (6.7)	4 (22.2)	0.229 <sup>†</sup>
Hematológica	0	3 (16.7)	0.150 <sup>†</sup>
Renal	0	3 (16.7)	0.150 <sup>†</sup>
Hepática	0	1 (6.2)	0.516 <sup>†</sup>
<b>Total de fallas orgánicas*</b>	2	17	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>
<b>Paciente con una falla o más</b>	1	11	<b>0.001</b>
<b>Complicaciones (sepsis grave + fallas orgánicas)*</b>	3	21	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>
Estancia en UCIN, días <sup>‡</sup>	6.9 ± 2.1	11.5 ± 2.2	<b>0.035<sup>¶</sup></b>

\*Frecuencia (%)

‡Promedio ± desviación estándar

† Prueba exacta de Fisher

¶ t de Student

El análisis multivariado de las variables de evolución clínica mostró que el grupo DHA tuvo una tendencia hacia un menor desarrollo de sepsis y de sepsis grave comparado con el grupo que recibió placebo, ajustando por la ingestión de leche humana, el uso de antiinflamatorios esteroideos y la gravedad previa a la cirugía, aunque no alcanzaron la significancia estadística (cuadro 14). No obstante, el riesgo para desarrollar al menos una falla orgánica fue menor en el grupo DHA comparado con el placebo después de ajustar por los confusores mencionados (cuadro 14).

**Cuadro 14. Variables de evolución clínica en neonatos ajustado por confusores**

Variable dependiente	Ajustado <sup>†</sup>			Modelo	
	OR*	IC 95%		R <sup>2</sup>	Valor p
Paciente con sepsis	0.429	0.071	2.604	0.38	0.031
Paciente con sepsis grave	0.434	0.03	5.45	0.22	0.362
Paciente con al menos una falla orgánica	<b>0.031</b>	<b>0.002</b>	<b>0.528</b>	<b>0.67</b>	<b>&lt; 0.001</b>

OR: Razón de momios de modelo de regresión logística

\*Comparado con grupo placebo IC: Intervalo de confianza 95%

<sup>†</sup>Ajustado por ingestión de leche humana, antiinflamatorios esteroideos y gravedad pre-cirugía

Con relación al análisis multivariado para la estancia en la UCIN, se utilizó una matriz de correlaciones donde se identificaron como predictores al consumo de leche humana, edad gestacional corregida, duración de la cirugía, de antibióticos y de antiinflamatorios no esteroideos. La leche humana tuvo una asociación negativa, mientras que el resto de las variables mostró una asociación positiva con la estancia en UCIN. La edad gestacional corregida no se incluyó en el modelo debido a que mostró colinealidad con leche humana, a que no tuvo un efecto significativo ( $p= 0.546$ ) y a que tampoco modificó el coeficiente de determinación.

En el presente estudio, los mejores predictores de la estancia en UCIN fueron el consumo de leche humana, la duración de la cirugía, de antibióticos y de antiinflamatorios no esteroideos, mientras que la administración de DHA no tuvo un efecto significativo (cuadro 15). Lo que sugirió que el egreso dependió más de las covariables mencionadas en este estudio.

**Cuadro 15. Modelo de regresión lineal múltiple de estancia en UCIN ajustada por confusores.**

Termino	Coefficiente	SE Coeficiente	T	Valor de P
Constante	1.22518	2.72709	0.20	0.841
Consumo de leche humana, kcal/kg/día	-0.97054	1.00865	-3.47	0.002
Duración de antibiótico	1.95299	1.2113	3.49	0.002
Duración de AINEs	1.77869	1.29688	2.21	0.038
Duración de la cirugía	2.24905	1.685	1.55	0.135
Grupo DHA*	-0.87382	1.22191	-0.67	0.508
				0.000

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

$R^2 = 71.1\%$

\*Comparado con grupo placebo

#### 7.2.4 Covariables en neonatos.

No hubo diferencias entre grupos en el uso o la duración de antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, de antibióticos durante su estancia en UCIN, en la gravedad de los pacientes al ingreso del estudio, en la duración de la cirugía o del pinzamiento aórtico, ni en el volumen de sangre perdido durante la cirugía (cuadro 16). Tampoco hubo diferencias en los ácidos grasos tisulares al ingreso del estudio (continuación del cuadro 16). Cabe mencionar que hubo menor cantidad de muestras para determinar el porcentaje de ácidos grasos en los eritrocitos debido a que éste no se determinó en los niños que tuvieron transfusiones de paquete globular antes del estudio, ya que esto no representaría sus reservas de ácidos grasos tisulares.

Los antiinflamatorios esteroideos utilizados fueron dexametasona, mientras que los no esteroideos fueron ketorolaco y ácido acetilsalicílico. Cuatro niños del grupo placebo no recibieron antiinflamatorio no esteroideo debido a que recibieron un antiinflamatorio

esteroideo. Los antibióticos que se administraron fueron cefalotina, amikacina, cefuroxima, imipenem, ciprofloxacina, cefotaxima, ceftazidima y vancomicina.

**Cuadro 16. Covariables en neonatos**

	GRUPO		Valor P
	DHA n = 15	PLACEBO n = 18	
Uso de antiinflamatorios			
a) Esteroideos <sup>1</sup>	5 (33)	7 (39)	1.000 <sup>†</sup>
Duración, días <sup>¶</sup>	1 [1,2]	3 [1,10]	0.123 <sup>§</sup>
b) No esteroideos <sup>1</sup>	15 (100)	14 (82)	0.229 <sup>†</sup>
Duración, días <sup>2</sup>	4.1 ± 2.1	5.2 ± 3.4	0.520 <sup>‡</sup>
Uso de antibióticos <sup>1</sup>	15 (100)	18 (100)	1.000 <sup>†</sup>
Duración, en días <sup>¶</sup>	2.0 [1,19]	4.5 [1,34]	0.204 <sup>§</sup>
Gravedad pre-cirugía (SNAP II) <sup>*2</sup>	2.29 ± 14.1	0.69 ± 29.5	0.248 <sup>‡</sup>
Ingestión de leche humana, kcal/kg/d			
Durante intervención <sup>¶</sup>	8.9 [0, 36]	1.9 [0, 37]	0.115 <sup>§</sup>
Durante seguimiento <sup>¶</sup>	7.8 [0, 32]	5.9 [0, 42]	0.500 <sup>§</sup>
Edad gestacional corregida, semanas <sup>2</sup>	40.9 ± 1.1	40.8 ± 1.1	0.890 <sup>‡</sup>
Gravedad pre-cirugía (SNAP II) <sup>¶¶</sup>	2.29 ± 14.1	0.69 ± 29.5	0.248 <sup>‡</sup>
Pinzamiento aórtico, min <sup>¶¶</sup>	12.1 ± 18	9.1 ± 13	0.567 <sup>‡</sup>
Sangrado quirúrgico, mL <sup>¶¶</sup>	10 [0.1, 100]	10 [0.1, 50]	0.958 <sup>§</sup>
Duración de cirugía, min <sup>¶¶</sup>	106.4 ± 37	117.8 ± 44	0.452 <sup>‡</sup>

<sup>1</sup> Frecuencia <sup>2</sup> Promedio ± desviación estándar ¶ Mediana [mínimo, máximo]

<sup>†</sup> Prueba de Fisher <sup>‡</sup> t de Student <sup>§</sup> Prueba de U-Mann-Whitney

**Cuadro 16. Covariables en neonatos (continuación)**

Ácidos grasos al ingreso, % de ácidos grasos totales	GRUPO		Valor P <sup>‡</sup>
	DHA n = 12	PLACEBO n = 14	
Linoléico (LA, 18:2 n-6)	8.9 ± 1.2	8.8 ± 1.2	0.954
α- Linolénico (LNA, 18:3 n-3)	0.67 ± 1.8	0.51 ± 1.9	0.274
Araquidónico (AA, 20:4 n-6)	10.2 ± 1.7	12.0 ± 1.7	0.264
Eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3)	0.56 ± 2.0	0.38 ± 1.7	0.117
Docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3)	3.3 ± 1.9	3.4 ± 1.9	0.870
EPA + DHA	4.3 ± 1.6	4.0 ± 1.6	0.703
Ac. Grasos n-3 (LNA+EPA+DHA)	5.0 ± 1.5	4.7 ± 1.5	0.649
Ac. Grasos n-6 (LA + AA)	20.0 ± 1.3	21.5 ± 1.3	0.492
AA/DHA	3.1 ± 1.4	3.6 ± 1.3	0.252
n-6/n-3	3.9 ± 1.3	4.6 ± 1.3	0.124

Promedio ± desviación estándar

<sup>‡</sup> Prueba t de Student

## 8. DISCUSIÓN.

Los resultados demostraron un menor porcentaje de células positivas a citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$ <sup>+</sup>, IL-6<sup>+</sup> y menor porcentaje de citocinas anti-inflamatorias como IL-1ra<sup>+</sup> en leucocitos (linfocitos y monocitos) de neonatos sometidos a cirugía cardiovascular que recibieron DHA comparados con el grupo placebo después de controlar por potenciales confusores, así como una menor frecuencia de complicaciones y del desarrollo de fallas orgánicas.

Gottrand señaló que a pesar de la evidencia experimental de los beneficios de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 en animales y en adultos, son escasos los estudios sobre el efecto de los LCPUFAS n-3 en el tratamiento y/o prevención de las infecciones en la población pediátrica.<sup>41</sup> Por lo anterior, este estudio es novedoso, ya que a nuestro conocimiento, es el primer trabajo que evalúa el efecto de un ácido graso omega 3 sobre la evolución clínica (incluyendo eventos infecciosos) en neonatos con respuesta inflamatoria aguda.

La disminución de TNF- $\alpha$  e IL-10 de los neonatos que recibieron DHA comparados con el grupo placebo es consistente con otros reportes de adultos sometidos a cirugía intestinal para ambas citocinas,<sup>14</sup> y en adultos con síndrome de dificultad respiratoria aguda para TNF- $\alpha$ .<sup>16</sup> Sin embargo, en nuestro estudio después del controlar por confusores como la presencia de sepsis, el TNF- $\alpha$  perdió la significancia estadística, por lo que es probable que los mayores valores de TNF- $\alpha$  estuvieran relacionados al mayor número de eventos infecciosos en el grupo placebo. No obstante, la diferencia entre grupos en IL-6 sin diferencia de TNF- $\alpha$  también ha sido reportada en adultos sometidos a cirugía de abdomen.<sup>15</sup> Por otro lado, se conoce que las citocinas son moléculas muy variables que presentan una alta dispersión en los sujetos, por lo que es posible que se requiera de

tamaños de muestra más grandes para probar diferencias entre los grupos en tiempos como a las 24 h postcirugía para TNF e IL-6.<sup>42</sup>

La diferencia en TNF- $\alpha$  entre grupos en adultos se han reportado en etapas tempranas, como 1 a 4 días después del inicio de la administración de LC-PUFAS n-3 con NPT, mientras que en los neonatos observamos diferencias a los 7 días para esta citocina; esto probablemente se debió a que el neonato posee un sistema inmune “virgen” o no estimulado, por lo que la expansión clonal podría responder más lentamente y por tanto, los niños se toman más tiempo para responder.

En un estudio realizado en nuestra unidad en neonatos con sepsis también se observó una menor concentración circulante de IL-1 $\beta$  y de IL-6 en el grupo que recibió DHA, sin diferencia en TNF- $\alpha$  comparado con el grupo control, después de controlar por las variables confusoras;<sup>20</sup> por lo que los resultados del presente estudio son consistentes con los obtenidos en un modelo de respuesta inflamatoria aguda en neonatos de un estudio previo.

En un reporte de neonatos pretérmino clínicamente estables señalaron que el grupo que recibió una fórmula estándar tuvo menos células IL-10<sup>+</sup> comparado con el grupo que recibió fórmula suplementada con DHA+AA durante 4 semanas,<sup>17</sup> resultado que es contrario a nuestros datos. Sin embargo, estos niños eran prematuros sanos y recibieron tanto ácidos grasos n-3 como n-6, mientras que el 95% de nuestra población fueron niños de término, enfermos y sólo recibieron DHA, por lo que la respuesta de las células inmunes podría no ser comparable. Estudios en sujetos sanos que recibieron un suplemento con ácidos grasos n-3 han demostrado no tener efecto en las citocinas a pesar de utilizar dosis altas, mientras que los sujetos críticamente enfermos sí muestran una disminución, lo que sugiere que el efecto podría asociarse al estado clínico o a la respuesta inflamatoria de los sujetos de estudio.<sup>43</sup>

Una respuesta inflamatoria excesiva o inapropiada e inmunosupresión son componentes de la respuesta a cirugía, trauma e infección en algunos individuos, y estas respuestas pueden conducir a sepsis, choque séptico y falla orgánica. La hiperinflamación se caracteriza por una alta producción de citocinas inflamatorias y eicosanoides derivados del AA, entre otros lo que indica el predominio de la respuesta inflamatoria; mientras que la inmunosupresión es caracterizada por elevación exacerbada de IL-10 circulante, por daño en la presentación de antígenos, etc., como datos del predominio de la respuesta anti-inflamatoria compensatoria; sin embargo, el equilibrio entre ambas resuelve la inflamación y restaura la homeostasis.<sup>41</sup> En el presente estudio, el menor porcentaje de IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> a las 24 horas y de TNF- $\alpha$  a los 7 días en el grupo DHA indicó una menor respuesta inflamatoria. Esto a su vez pudo haber inducido una menor necesidad de contención por la principal citocina anti-inflamatoria, la IL-10 que también fue menor al día 7 entre grupos, con una mayor disminución entre las 24 h y el día 7 postcirugía, lo que apoya la hipótesis de que presentaron una menor respuesta inflamatoria y un regreso a la homeostasis, que a su vez posiblemente incidió en una mejoría en la evolución clínica comparado con el grupo que recibió placebo.

Con relación a las variables de evolución clínica, la menor frecuencia de infecciones ha sido reportada en dos meta análisis recientes que mostraron que los pacientes quirúrgicos adultos que recibieron aceite de pescado como fuente de ácidos grasos omega 3 por vía parenteral. En el primero tuvieron menor riesgo de complicaciones infecciosas (RR= 0.49; IC 95% 0.26 – 0.93, p= 0.03) comparados con el grupo placebo<sup>44</sup>; de forma similar en el segundo meta análisis se reportó un OR de 0.56 (IC 95% 0.32 – 0.98, p= 0.04),<sup>45</sup> mientras que los neonatos presentaron para sepsis un RR= 0.4 (IC 95% 0.13 - 1.22) y para sepsis grave RR= 0.3 (IC 95% 0.04 – 2.4), por lo que es probable que al aumentar el tamaño de muestra se alcance la significancia estadística.

Adicionalmente, la menor frecuencia de desarrollo de fallas orgánicas en el grupo que recibió el DHA fue consistente con estudios en adultos que recibieron ácidos grasos n-3 sometidos a cirugía abdominal,<sup>21</sup> con síndrome de dificultad respiratoria aguda<sup>23</sup> y con adultos con apoyo mecánico a la ventilación secundario a sepsis grave.<sup>24</sup> También se ha reportado un menor tiempo en la necesidad de uso de ventilación mecánica en adultos que recibieron dicha suplementación.<sup>23,46</sup> En los neonatos observamos una tendencia a requerir menor tiempo de ventilación: en el grupo DHA un caso requirió 8 h, mientras que el grupo placebo (n=6) tuvo una mediana de 44 h (7 - 93 h), pero la diferencia no alcanzó significancia estadística. De forma similar ocurrió para la falla cardiovascular, donde el grupo placebo tuvo una mediana de 43.5 h (22 - 93 h) y un caso del grupo DHA tuvo 11 h; la reducción en la frecuencia de esta falla en el grupo que recibió ácidos grasos n-3 fue consistente con el único reporte que ha evaluado el desarrollo de las posibles fallas orgánicas en forma individual.<sup>24</sup>

En el mismo sentido se observó que el menor tiempo de estancia promedio en UCIN en el grupo que recibió el DHA fue consistente con el menor tiempo de estancia en cuidados intensivos en adultos sometidos a cirugía de abdomen,<sup>15,21</sup> en adultos con síndrome de dificultad respiratoria aguda<sup>23</sup> y en adultos con apoyo mecánico a la ventilación secundario a sepsis grave,<sup>24</sup> quienes recibieron ácidos grasos por vía parenteral<sup>15,21</sup> y enteral<sup>23,24</sup>. En los dos meta-análisis mencionados, el grupo omega 3 mostró una reducción de 1.8 días<sup>45</sup> y 2.07 días<sup>44</sup> en su estancia en terapia intensiva, mientras que los neonatos del grupo DHA redujeron 4.6 días su estancia en terapia intensiva. Esto tiene un fuerte impacto en la atención del niño, ya que reduce el número de punciones, de procedimientos invasivos, los riesgos de adquirir infecciones nosocomiales resistentes y secundariamente, también reduce los costos de atención, que en el caso de la terapia neonatal son de \$19,000 pesos por día por paciente.

En relación a la estancia en UCIN ajustada por confusores, la suplementación con DHA no fue un predictor significativo, probablemente debido al mayor peso de los otros factores como la leche humana, factor ampliamente conocido por su papel protector contra las infecciones y también fuente de DHA para el neonato.<sup>47</sup> No obstante, el coeficiente siguió mostrando una relación inversa entre la administración de DHA y el tiempo de estancia en UCIN. Por lo anterior, sería ideal que todos los neonatos críticamente enfermos recibieran la leche de su propia madre durante su hospitalización. Sin embargo, los periodos de ayuno prolongados y el estrés entre otros factores también redujeron la disponibilidad de este valioso recurso para alimentarlos, como se observó en el bajo aporte que recibieron durante su estancia de 10 kcal/kg/día para el grupo DHA y de 2 kcal/kg/día para el grupo placebo (cuadro 14); por lo que el uso de la suplementación enteral con DHA podría aportar un soporte sustancial en la evolución clínica del neonato cuando no se dispone de leche de la propia madre.

Cabe mencionar como fortalezas del estudio que se aplicaron pruebas paramétricas después de transformar los datos de las citocinas a logaritmos, ya que se conoce que si se cumplen los supuestos son más robustas que las no paramétricas;<sup>48</sup> por lo que a pesar del tamaño de muestra pequeño, fue posible cumplir el supuesto de distribución normal y ajustar por confusores. Otra fortaleza es la captación de pacientes con características uniformes ya que se captó a pacientes que requirieron procedimientos quirúrgicos con estrés similar, sin desnutrición y que no se sometieron a circulación extracorpórea durante la cirugía.

Por otro lado, la falta de significancia estadística los indicadores individuales de la evolución clínica en los niños (sepsis y sepsis grave) se debió al tamaño de muestra limitado de pacientes, aunque la gran variabilidad de las citocinas, así como de las características de los pacientes por diferentes motivos de ingreso, gravedad, resultados de la cirugía y complicaciones agregadas hizo compleja la captación.

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demostraron que la administración enteral de DHA en el período peri operatorio a neonatos sometidos a cirugía cardiovascular atenúan la respuesta inflamatoria y mejoran la evolución clínica esto se manifestó por:

1. La disminución en el porcentaje de células positivas a IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-1ra e IL-10 después de ajustar por confusores.
2. La disminución en la frecuencia de complicaciones (suma de sepsis grave más fallas orgánicas), así como del riesgo de desarrollar al menos una falla orgánica, después de ajustar por confusores.
3. La disminución en los días de estancia en cuidados intensivos neonatales.

Esta investigación es original porque no existen reportes en la literatura que apoyen la hipótesis de que la administración de DHA en neonatos con respuesta inflamatoria aguda mejora la evolución clínica, pero sobre todo es trascendente porque se podría mejorar la evolución clínica de una población cuya inmadurez del sistema inmune la hace más vulnerable al desarrollo de complicaciones.

## 10. RECOMENDACIONES Y FUTURAS INVESTIGACIONES

La administración de DHA por vía enteral en forma peri-operatoria puede disminuir la respuesta inflamatoria y las complicaciones en los neonatos durante su evolución clínica, por lo que podría emplearse como estrategia profiláctica en pacientes pediátricos.

Sería útil la aplicación de esta intervención en otras unidades de cuidados intensivos neonatales y con un mayor número de pacientes para valorar si existe consistencia en los resultados.

Hace falta determinar las citocinas circulantes que podrían representar el estado inflamatorio del paciente y asociarlas a las citocinas medidas en los leucocitos para determinar si hay consistencia entre las citocinas intracelulares y las citocinas circulantes.

Los datos del consumo de leche humana de los niños del grupo DHA sugirieron que estos niños podrían haber recibido más leche humana, pero también podría ocurrir que el DHA favoreciera una mejor tolerancia, y por esa razón recibir más leche de la propia madre. Esto a su vez podría mejorar la velocidad de crecimiento y el estado nutricional en los niños, por lo que esto sería tema para continuar la línea de investigación.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling-regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med* 2000;28:N3-N12.
2. Angele MK, Faist E. Clinical review: Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Critical Care* 2002;6:298-305.
3. Calder PC. n-3 fatty acids, inflammation, and immunity-relevance to postsurgical and critically ill patients. *Lipids*. 2004;39:1147-1161.
4. Calder PC. Immunonutrition in surgical and critically ill patients. *Br J Nutr* 2007;98 (suppl 1):S133-S139.
5. Bölke E, Jehle PM, Trautmann M, Götz I, Krebs B, Steinbach G, Orth K. Different acute-phase response in newborns and infants undergoing surgery. *Pediatr Res* 2002;51:333-338.
6. Alcaraz AJ, Manzano L, Sancho L, Vigil MD, Esquivel F, Maroto E, Reyes E, Alvarez-Mon M. Newborns patients exhibit an unusual pattern of interleukin 10 and interferon gamma serum levels in response to cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;123:451-458.
7. Linder M. Nutrition and metabolism of fats En: Linder M, ed. *Nutritional biochemistry and metabolism*. 2<sup>nd</sup> edition. New York: Elsevier Science Publishing Company, 1991: 52-85.
8. Muskiet FAJ, Fokkema MR, Schaafsma A, Boersma ER, Crawford MA. Is docosahexaenoic acid (DHA) essential? Lessons from DHA status regulation, our ancient diet, epidemiology and randomized controlled trials. *J Nutr* 2004; 134:183-186.
9. Mayer K, Seeger W, Grimminger F. Clinical use of lipids to control inflammatory disease. *Curr Op Clin Nutr Metab Care* 1998;1:179-184.
10. Grimm H, Mayer K, Mayser P, Eigenbrodt E. Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *Br J Nutr* 2002; 87:S59-S67.

11. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of the n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* 2008;47:147-55.
12. Waitzberg DL, Torrinhas RS. Fish oil lipid emulsions and immune response: what clinicians need to know. *Nutr Clin Pract* 2009;24:487-99.
13. Serhan ChN. Resolution phase of inflammation: Novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev immunol* 2007;25:101-137.
14. Wachtler P, König W, Senkal M, Kernen M, Soller M. Influence of a total parenteral nutrition enriched with  $\omega$ -3 fatty acids on leukotriene synthesis of peripheral leukocytes and systemic cytokine levels in patients with major surgery. *J Trauma* 1997;42:191-198.
15. Weiss G, Meyer F, Matthies B, Pross M, Koenig W, Lippert H. Immunomodulation by perioperative administration of n-3 fatty acids. *Br J Nutr* 2002;87:S89-S94.
16. Pacht ER, DeMichele SJ, Nelson JL, Hart J, Wennberg AK, Gadek JE. Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid,  $\gamma$ -linolenic acid, and antioxidants reduces alveolar inflammatory mediators and protein influx in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2003;31:491-500.
17. Field CJ, Thompson CA, Van Aerde JE, Parrot A, Euler A, Lien E, Clandinin MT. Lower proportion of CD45R0+ cells and deficient interleukin-10 production by formula –fed infants, compared with human-fed, is corrected with supplementation of long chain polyunsaturated fatty acids. *JPGN* 2000; 31:291-299.
18. Field CJ, Van Aerde JE, Robinson LE, Clandinin MT. Effect of providing a formula supplemented with long chain polyunsaturated fatty acids on immunity in full-term neonates. *Br J Nutr* 2008;99:91-99.
19. López-Alarcón M, Garza C, Del Prado M, García-Zúñiga PA, Barbosa L. Breastfeeding's protection against illness-induced anorexia is mediated partially by docosahexaenoic acid. *Eur J Clin Nutr.* 2008;62:32-8.

20. López-Alarcón M, Bernabe-García M, Del Valle O, González-Moreno M, Villegas R. The orogastric administration of docosahexaenoic acid to septic neonates attenuates the interleukin-1 $\beta$  response and the clinical course of the disease. Enviado a la revista *Nutrition*
21. Tsekos E, Reuter C, Stehle P, Borden G. Perioperative administration of parenteral fish oil supplements in a routine clinical setting improves patient outcome after major surgery. *Clin Nutr* 2004;23:325-330
22. Heller A, Rössler S, Linz RJ, Stehr SN, Heller SC, Koch R, Koch T. Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome. *Crit Care Med* 2006;24:972-979.
23. Gadek JE, DeMichele SJ, Karlstad MD, Pacht ER, Donahoe M, Albertson TE, Hoozen Ch V, Wennberg AK, Nelson JL, Noursalehi M. Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1999;27:1409-1420.
24. Pontes-Arruda A, Albuquerque AM, Deusdará J. Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid,  $\gamma$ -linolenic acid, and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2006;34:2325-2333.
25. Lopez-Alarcon M, Bernabe-Garcia M, Del Prado M, Rivera D, Ruiz G, Maldonado J, Villegas R. Docosahexaenoic acid administered in the acute phase of infection protects the nutritional status of septic neonates. *Nutrition* 2006;22:731-737. .
26. López Alarcón M. Efecto del ácido docosahexaenoico sobre la pérdida del apetito en pacientes pediátricos con neumonía. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2006;44: 5-11.
27. Despond O, Proulx F, Carcillo JA, Lacroix J. Pediatric sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13:247-253.

28. Hovels-Gürich HH, Schumacher K, Vazquez-Jimenez JF, Quing M, Hüffmeier U, Buding B, Messmer BJ, Bernuth GU, Seghaye M. Citokine balance in infants undergoing cardiac operation. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 601-609.
29. Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo C, Heah PT. Neonatal sepsis: an international perspective. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90: F220-F224.
30. Reporte del Comité de Infecciones Nosocomiales 2005 - 2009 del Hospital de Pediatría, C. M. N. Siglo XXI, IMSS.
31. Kitaoka CY. Prevalencia y letalidad de las cardiopatías congénitas en una unidad de cuidados intensivos neonatales de tercer nivel. México. 2005. Tesis de subespecialidad en Neonatología. Facultad de Medicina. UNAM.
32. Lubchenco LO, Hansman Ch, Dressler M, Boyd E. Intrauterine growth as estimated from liveborn birth-weight data at 24 to 42 weeks of gestation. *Pediatrics* 1963;32:793-800.
33. Growth charts of National Center of Health Statistics in collaboration with the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Published on may 30, 2000. Head circumference for age, length for age and weight for age. <http://www.cdc.gov/growthcharts>.
34. Marks KH, Maisels JM, Moore E, Gifford K, Friedman Z. Growth in sick premature infants –a longitudinal study. *J Pediatr* 1979;94:282-285.
35. Goldstein B, Giroir B, Randolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6:2-8.
36. Evershed RP. Gas chromatography of lipids. En: Hamilton RJ, Hamilton S, eds. *Lipid analysis. A practical approach*. Oxford, NY USA: Oxford University Press; 1992.
37. Richardson D, Corcoran J, Escobar G, Lee S. SNAP II and SNAPPE-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr* 2001;138:92-100.

38. European Commission. Scientific Committee on Food. Report of Scientific Committee on Food on the Revision of Essential Requirements of infant formulae and follow-on formulae. May 18, 2003: 1-211.
39. Lien EL. Toxicology and safety of DHA. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2009; 81:125–132.
40. Granot E, Golan D, Berry EM. Breast-fed and formula-fed infants do not differ in immunocompetent cell cytokine production in spite differences in cell membrane fatty acid composition. Am J Clin Nutr 2000;72:1202-1205.
41. Gottrand F. Long-chain polyunsaturated fatty acids influence the immune system of infants. J Nutr 2008;138:1807S-1812S.
42. Albers R, Antoine JM, Bourdet-Sicard R, Calder PC, Gleeson M, Lesourd B, Samartin S, Sanderson IR, Van Loo J, Vas Dias FW, Watzl B. Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. Br J Nutr 2005; 94:452-481.
43. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. Am J Clin Nutr 2006;83 suppl: 1505S-1519S.
44. Wei C, Hua J, Bin C, Klassen K. Impact of lipid emulsion containing fish oil on outcomes of surgical patients: systematic review of randomized controlled trials from Europe and Asia. Nutrition 2010;26:474-81.
45. Chen B, Zhou Y, Yang P, Wan HW, Wu XT. Safety and efficacy of fish oil-enriched parenteral nutrition regimen on postoperative patients undergoing major abdominal surgery: A meta-analysis of randomized controlled trials, JPEN J Parenter Enteral Nutr 2010;34:387-94.
46. Singer P, Theilla M, Fisher H, Gibstein L, Grozovski E, Cohen J. Benefit of an enteral diet enriched with eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid in ventilated patients with acute lung injury. Crit Care Med 2006;34:1033-1038.

- 47.. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr* 2005; 135:1-4.
48. Lyman Ott R. Inferences about  $\mu_1 - \mu_2$  En: Lyman Ott R (ed). *An introduction to statistical methods and data analysis*. Belmont:Duxbury Press,1993:260-329.



# Martek®

Martek Biosciences Corporation

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

**NEUROMINS® Capsules**

Lot Number **4802002272A**

### Physical Description

Appearance: 500 mg translucent capsules containing DHASCO<sup>®</sup> providing 200 mg DHA  
 Antioxidants: 0.025% ascorbyl palmitate, 0.025% tocopherols

Chemical Analyses	Units	Results
Docosahexaenoic Acid	mg/capsule	267.9
Docosahexaenoic Acid	mg/g oil	411.1
Capsule Fill Weight	mg	505.8
Peroxide Value	meq/kg	0.65

Fatty Acid Profile	Units	Results
6:0	%	<0.1
8:0	%	0.32
10:0	%	1.04
12:0	%	4.30
14:0	%	14.00
14:1	%	0.13
16:0	%	12.20
16:1	%	1.92
17:1	%	<0.1
18:0	%	0.66
18:1n-7	%	18.94
18:1n-7	%	<0.1
18:2n-6	%	1.29
18:3n-3	%	<0.1
20:0	%	0.11
20:1n-9	%	<0.1
20:5n-3	%	<0.1
22:0	%	0.17
22:5n-3	%	0.29
22:6n-3	%	44.26
24:0	%	<0.1
Others	%	0.47

Analysis Completed By: Central Analytical Laboratories  
 Analytical Review By: [Signature]  
 Released By: [Signature]  
 Date: 8/31/2004

(rev. 08/31/2004)



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL**

**Centro Médico Nacional Siglo XXI. Hospital de Pediatría**

**Unidad de Investigación Médica en Nutrición y Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales**

Carta de consentimiento informado para participar en el proyecto: "Efecto de la administración del ácido docosahexaenoico sobre la respuesta inflamatoria y la evolución clínica de neonatos sometidos a cirugía cardiotorácica"

Señores Padres de Familia:

Solicitamos su permiso para incluir a su hijo en un proyecto de Investigación Médica.

*Posibles beneficios.* El objetivo de esta investigación es saber si administrando un nutrimento llamado ácido docosahexaenoico (DHA) a su niño cuando va a someterse a una cirugía, este nutrimento disminuye la inflamación y tiene una evolución clínica menos grave y se recupera más pronto. En adultos se ha reportado que la administración de este nutrimento disminuyó la inflamación cuando que se sometieron a cirugías y los ayudó a tener menores complicaciones con una recuperación más rápida.

Para llevar a cabo esta investigación es necesario administrar a su niño el nutrimento en forma de aceite por la boca o sonda durante 8 días. Si probamos que este nutrimento también beneficia a los niños, se propondrá como parte de la terapia que reciban los niños cuando se someten a cirugía.

*Posibles riesgos.* Para realizar las mediciones, tomaremos una muestra de 1 mL de sangre antes de la cirugía, a las 24 y a los 7 días post-cirugía para la medición de sustancias indicadoras de inflamación, procurando que se tome cuando se requiera sangre para otros estudios de rutina. Si lo anterior no es posible, se le "picará" nuevamente y le puede ocasionar "moretes" en el sitio del piquete. La cantidad de sangre que se le extraerá a su hijo no es motivo para alterar sus niveles de hemoglobina en sangre; sin embargo, en ocasiones por la necesidad de los estudios que su hijo requiere para su atención médica, es posible que requiera de una transfusión para recuperar la sangre extraída.

El DHA se encuentra normalmente en la leche materna, utilizaremos las cantidades de DHA reportadas en la leche materna, por lo que si no se obtiene el beneficio, tampoco esperamos que tenga efectos adversos. Por otro lado, la realización del estudio requiere que se comparen los resultados de los niños que reciben el suplemento con los resultados de los niños que no lo reciban, y la asignación del tratamiento se hace al azar, por lo que sabremos quién recibió el suplemento hasta el final del estudio.

La participación de su niño en este estudio no tiene costo para usted. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética de este Hospital con el N° 2005/3603/72. Nos comprometemos a darle información actualizada obtenida durante el estudio, aunque ésta pudiera afectar su voluntad para continuar participando en el mismo; también nos comprometemos a manejar sus datos en forma confidencial y a responder cualquier pregunta acerca del proyecto. Para lo anterior, deberá dirigirse con la M en C. Mariela Bernabe García Matrícula 11111852, al Tel. 56 27 69 00 Ext. 22483 de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición ubicada en el 4° piso de este Hospital.

Si usted está de acuerdo en que su niño participe en el proyecto, por favor firme esta forma. Si no está de acuerdo, por favor firme y marque NO. En caso de que acepte participar pero después decida ya no hacerlo, tendrá la libertad de abandonar el estudio sin que por eso se afecte la atención y el tratamiento que su niño está recibiendo.

Agradecemos su participación y contribución en el mejoramiento del manejo de los niños enfermos.

ACEPTO PARTICIPAR  SI  NO Lugar: México, D. F, Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nombre del niño(a) \_\_\_\_\_ Cama N° \_\_\_\_\_

Nombre y firma de la madre/ tutor \_\_\_\_\_

Nombre y firma del padre/tutor \_\_\_\_\_

Nombre del testigo 1 y relación con el niño(a): \_\_\_\_\_

Dirección del testigo 1 \_\_\_\_\_

Nombre del testigo 2 y relación con el niño(a): \_\_\_\_\_

Dirección del testigo 2 \_\_\_\_\_

Nombre y firma del médico tratante en UCIN: \_\_\_\_\_

Nombre y firma del investigador \_\_\_\_\_

### Anexo 3. Procesamiento de la muestra de sangre total para determinación de citocinas

#### intracelulares por citometría de flujo.

1. Para diluir 1:1 en cada pozo de la placa estéril, tomar 250 uL de sangre + 250 uL de RPMI 1640 para cada pozo de sangre no activada (NA) y 250 uL de sangre + 220 uL de RPMI para el pozo de sangre que se va a activar (A)
2. Una vez que la BFA se encuentre líquida a Temp. Amb., se homogeniza con los dedos y se agregan 0.5 uL de BFA a cada pozo (NA y A) (Golgiplug BD Pharmingen), y se homogeniza con pipeta.

#### Activación.

3. 10 minutos después de agregar la BFA, para el pozo de la sangre activada se usa 20 uL de PMA + 10 uL de Ionomicina, y homogenizar primero con pipeta y homogenizar agitando de forma circular.
4. Tapar e incubar las células a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 5 horas en REVCO.
5. De la sangre BASAL refrigerada sin incubar, diluir 1:1 con RPMI.
6. Homogenizar sangre
7. Transferir 25 uL de sangre total/tubo de cada pozo.

N°	TIEMPO:_____ Tubos sangre NA	N°	Tubos sangre Activada
1	Blanco	2	Blanco
3	Isotipos FITC, PE, APC: 5 uL	4	Isotipos FITC, PE, APC: 5 uL
5	CD14Cy5, 5 uL /IL-1-FITC,15 uL, /IL-1ra-PE, 15 uL	6	CD14Cy5, 5 uL /IL-1-FITC,15 uL, /IL-1ra-PE, 15 uL
7	CD14Cy5, 5 uL /TNF-FITC 2.5 uL/IL-6-PE 3.5 uL/ IL-10, 5 uL APC	8	CD14Cy5, 5 uL /TNF-FITC 2.5 uL/IL-6-PE 3.5 uL/ IL-10, 5 uL APC

8. A cada tubo agregar anticuerpos monoclonales anti-humanos conjugados con un fluorocromo para marcar Monocitos (CD14)
9. Incubar 15 min. en oscuridad a temperatura ambiente.
10. Agregar 50 uL para 25 de sangre del **reactivo A** del kit Intrastain (DAKO) para fijar a cada tubo
11. Agitar c/tubo en vórtex para asegurar que las células estén en suspensión.
12. Incubar por 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
13. Agregar 2 mL de PBS por pared del tubo
14. Vortex

15. Centrifugar a 2500 rpm por 5 min a temp ambiente (25°C)
  16. Decantar sobrenadante
  17. Resuspender con dedos ó agitar en vórtex.
  18. Agregar 50 uL para 25 de sangre de **reactivo B** del kit intrastain para permeabilizar a cada tubo.
  19. Agregar isotipos (NA y A): FITC, PE, APC
  20. Agregar citocinas intracelulares: IL-1B, IL-1ra, TNF, IL-6, IL-10
  21. Mezclar SUAVEMENTE
  22. Incubar por 15 min. en oscuridad a temperatura ambiente.
  23. Agregar 2 mL de PBS-BSA-AZ, por pared del tubo
  24. Vórtex
  25. Centrifugar a 2500 rpm por 5 min. a temp. Ambiente (25°C)
  26. Decantar
  27. Agregar 50 uL/tubo de para-formaldehído al 2% para fijar (EL REACTIVO EN FRIO Y CUBIERTO CON PAPEL ALUMINIO).
  28. Agitar en vórtex.
  29. Incubar por 5 min. a temperatura ambiente. Cortar papel aluminio
  30. SIN DECANTAR, lavar con 1 mL de PBS.
  31. Centrifugar a 2500 rpm x 5 min.
  32. Decantar.
  33. Finalmente, estas células se resuspenderán en 100 µL de PBS.
  34. Vórtex
  35. Análisis en el citómetro de flujo BD FASC Aria™ Cell Sorter (Becton & Dickinson).
- Fecha de análisis en citómetro: \_\_\_\_\_

#### **Anexo 4. Obtención de eritrocitos**

- Centrifugar la sangre completa a 2000 rpm durante 15 minutos para separar plasma y paquete celular.
- Se separan el plasma y los leucocitos dejando en el tubo solo el resto del paquete celular.
- Colocar el paquete celular en un tubo de ensaye de 10 ml y aforar con solución salina al 0.9%.
- Mezclar el paquete globular y la solución salina suavemente para evitar la ruptura de las células.
- Se colocan los tubos en las camisas de la centrífuga y se equilibran para centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos.
- Una vez centrifugado se observa en el fondo del tubo el paquete de eritrocitos. Se retira el sobrenadante procurando no perder las células.
- Se vuelve agregar solución salina al 0.9% y se repiten los lavados hasta que se aclare el sobrenadante y se observen los eritrocitos limpios en el fondo del tubo.
- Ya obtenido el botón de eritrocitos; se recuperan, de ser necesario, con la menor cantidad de solución salina al 0.9%.
- Se pasan los eritrocitos a tubos eppendorf de 1.5 ml.
- Una vez en los tubos eppendorf estos se protegen de la luz con papel aluminio y se almacena la muestra a  $-70^{\circ}$  C

## Anexo 5. Separación de lípidos y determinación del perfil de lípidos

- Para su determinación, los eritrocitos se descongelan lentamente y los ácidos grasos se extraen con isopropanol y hexano (4.5 y 6 mL, respectivamente). Se agrega una solución antioxidante (hidroxitolueno butilado 20 mg en 10 mL de hexano) y se mezclan con un vortex por 10 min. Posteriormente se centrifuga a 2000 rpm (1200 g) x 5 min. a 4°C. Después se usa un flujo de nitrógeno para acelerar la extracción. Posteriormente se metilarán los ácidos grasos.
- La metilación de ácidos grasos se realiza de la siguiente manera: Por cada 20 mg de lípidos, se agrega 1 mL de metanol (MeOH) y 1 mL de ácido clorhídrico 3 Normal en metanol (Ácido Clorhídrico Metanólico) + 50 µl de una solución de hexano con C17 (ácido margárico) como estándar interno, la cual se prepara con 1.33 mg de C17/mL de hexano.
- Se incuba en el termoblock a 90°C durante 1 hora y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se agrega poco a poco una mezcla en polvo de cloroformo, metanol, y sulfuro (2:2:1) hasta observar el desprendimiento de bióxido de carbono (se observan burbujas).
- Se agrega 1 mL de hexano, se agita y luego se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos para separar la fase orgánica (fase superior), la cual se coloca en otro tubo.
- La fase orgánica se evapora con nitrógeno y se agrega 1 mL de hexano.
- Para identificar cada ácido graso, se separan con una columna de 100 mm empacada con CP-Sil 88% después de 2 días en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890 series II. Avondale, PA).



Nº de incubadora     Grupo  **A**  **B**  Nº de expediente

IV. Diagnósticos de egreso del estudio						Fecha dd/mm/aa
1. _____						_____
2. _____						_____
3. _____						_____
4. _____						_____
5. _____						_____

V. Recibió el suplemento (DHA ó placebo)						
Día de estudio	Fecha dd/mm/aa	Sí*	No*	Hora (h : min.)		Observaciones
				Dosis 1	Dosis 2	
-2						
-1						
0						
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						

\*Marque con una x

VI. Variables clínicas: tipo de Sepsis/Sepsis grave/Choque séptico (con germen aislado)	Fecha inicio dd/mm/aa	Fecha término dd/mm/aa	Duración (días)
Sepsis: _____	_____	_____	_____
Sepsis grave: _____	_____	_____	_____
Choque séptico: _____	_____	_____	_____
Falla Respiratoria (necesidad de ventilador) _____	_____	_____	_____
Falla Cardiovascular (Nombre de Aminas) _____	_____	_____	_____
Estancia Hospitalaria _____	_____	_____	_____
Tipo de cirugía _____			
Duración de la cirugía (h:min) _____ Tiempo total de bomba (min.) _____			
Tiempo con isquemia durante la cirugía (paro circulatorio)(min.) _____			
Sangrado durante cirugía (mL) _____ Tansfusión durante cirugía _____			

N° de incubadora Grupo 

A	B
---	---

N° de expediente 

VII. Complicaciones post-cirugía (dentro de los 30 días post-cirugía en UCIN): Re-intubación, neumonía, re-operación, enterocolitis, íleo, reflujo gastro-esofágico, hemorragia cerebral y mortalidad.	Fecha dd/mm/aa
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	
7.	
8.	
9.	
10.	
11.	
12.	
13.	
14.	

VIII. Estado nutricional al ingreso del estudio				
Día N°	Fecha dd/ mm/ aa	Peso (g)	Longitud (cm)	Perímetro cefálico (cm)
1.	__/__/__	_____	_____	_____
2.	__/__/__	_____	_____	_____
3.	__/__/__	_____	_____	_____
		X = _____	X = _____	X = _____

Al ingreso del estudio      Percentil peso/edad: \_\_\_\_\_      Percentil peso/talla: \_\_\_\_\_      Ref. \_\_\_\_\_

IX. Muestras de sangre	Fecha dd/mm/aa	Hora h:min	Vol. (mL)		Responsable de la toma y procesam.	Observaciones
			EDTA	Heparina		
Basal						
Cierre de Hx Qx.						
24 h post-cirugía						
48 h post-cirugía						
7 días post-cirugía						

## REGISTRO DE INGESTIÓN DE LECHE HUMANA DURANTE EL ESTUDIO

Nombre de la madre: \_\_\_\_\_ Hoja N° \_\_\_\_\_

Paciente: \_\_\_\_\_ Expediente: \_\_\_\_\_

Fecha	Cantidad de leche humana que recibió (mL)
Hora	
07:00 h	
10:00 h	
13:00 h	
16:00 h	
19:00 h	
22:00 h	
01:00 h	
04:00 h	

Fecha	Cantidad de leche humana que recibió (mL)
Hora	
07:00 h	
10:00 h	
13:00 h	
16:00 h	
19:00 h	
22:00 h	
01:00 h	
04:00 h	

Fecha	Cantidad de leche humana que recibió (mL)
Hora	
07:00 h	
10:00 h	
13:00 h	
16:00 h	
19:00 h	
22:00 h	
01:00 h	
04:00 h	

Fecha	Cantidad de leche humana que recibió (mL)
Hora	
07:00 h	
10:00 h	
13:00 h	
16:00 h	
19:00 h	
22:00 h	
01:00 h	
04:00 h	

Fecha	Cantidad de leche humana que recibió (mL)
Hora	
07:00 h	
10:00 h	
13:00 h	
16:00 h	
19:00 h	
22:00 h	
01:00 h	
04:00 h	

Fecha	Cantidad de leche humana que recibió (mL)
Hora	
07:00 h	
10:00 h	
13:00 h	
16:00 h	
19:00 h	
22:00 h	
01:00 h	
04:00 h	

Fecha	Cantidad de leche humana que recibió (mL)
Hora	
07:00 h	
10:00 h	
13:00 h	
16:00 h	
19:00 h	
22:00 h	
01:00 h	
04:00 h	

Fecha	Cantidad de leche humana que recibió (mL)
Hora	
07:00 h	
10:00 h	
13:00 h	
16:00 h	
19:00 h	
22:00 h	
01:00 h	
04:00 h	

Fecha	Cantidad de leche humana que recibió (mL)
Hora	
07:00 h	
10:00 h	
13:00 h	
16:00 h	
19:00 h	
22:00 h	
01:00 h	
04:00 h	

Fecha	Cantidad de leche humana que recibió (mL)
Hora	
07:00 h	
10:00 h	
13:00 h	
16:00 h	
19:00 h	
22:00 h	
01:00 h	
04:00 h	

Fecha	Cantidad de leche humana que recibió (mL)
Hora	
07:00 h	
10:00 h	
13:00 h	
16:00 h	
19:00 h	
22:00 h	
01:00 h	
04:00 h	

Fecha	Cantidad de leche humana que recibió (mL)
Hora	
07:00 h	
10:00 h	
13:00 h	
16:00 h	
19:00 h	
22:00 h	
01:00 h	
04:00 h	

Nombre del niño \_\_\_\_\_ Exp \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

1. Su hijo tomó fórmula? \_\_\_\_\_
2. cuál? \_\_\_\_\_
3. marca \_\_\_\_\_
4. Qué cantidad y por cuanto tiempo \_\_\_\_\_
5. Le administraron medicamentos para la maduración pulmonar antes de nacer? Si/no \_\_\_No\_\_\_ (Si la respuesta es No pase a la pregunta 9)
6. Cuál? \_\_\_\_\_
7. Cuántas ampollitas? \_\_\_\_\_
8. Cuantas semanas de gestación tenía el bebé? \_\_\_\_\_

Continúe sólo si la madre produce leche y la consume el neonato \_\_\_\_\_

9. ¿Consume pescado? \_\_\_\_\_ (si la resp. es NO pase a la pregunta 12)
10. Cuanto? \_\_\_\_\_
11. Cada cuando? \_\_\_\_\_
12. Toma suplemento (s) que contengan omega 3 como pharmathon matruelle, MOM, etc?  
\_\_\_\_\_
13. Marca \_\_\_\_\_
14. Cuanto consume? \_\_\_\_\_
15. Cada cuando? \_\_\_\_\_

**ANEXO 7.** Gravedad del padecimiento: se estimó por medio de una escala denominada SNAP-II (Score for Neonatal Acute Physiology, versión II). Este sistema considera 6 variables, establece puntos de corte y asigna una puntuación; la puntuación de cada variable se suma por lo que a mayor puntuación, mayor es la gravedad.

### Sistema para evaluar SNAP-II

Variable	Puntaje
Presión arterial media 20-29 mm Hg	9
Presión arterial media < 20 mm Hg	19
Temperatura corporal baja 35 - 35.5°C	8
Temperatura corporal baja < 35°C	15
Relación PO <sub>2</sub> /Fio <sub>2</sub> 1.0 - 2.49	5
Relación PO <sub>2</sub> /Fio <sub>2</sub> 0.3 – 0.99	16
Relación PO <sub>2</sub> /Fio <sub>2</sub> < 0.3	28
pH sérico bajo 7.10 – 7.19	7
PH sérico bajo < 7.10	16
Crisis convulsivas	19
Uresis horaria 0.1 – 0.9 (mL/kg/h)	5
Uresis horaria < 0.1 (mL/kg/h)	18

ANEXO 8

COMPROBANTES

DE APROBACIÓN POR

COMITÉS DE INVESTIGACION

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.**

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
UNIDAD DE ATENCIÓN MÉDICA  
COORDINACIÓN DE UNIDADES MÉDICAS DE ALTA ESPECIALIDAD  
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE PEDIATRÍA CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.  
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD

22 de Septiembre de 2005.

OFICIO: 37B5032500/583/05

**M. en C. MARIELA BERNABÉ GARCÍA**  
**P R E S E N T E**

Comunico a usted que su proyecto de investigación titulado: **“EFECTO MODULADOR DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA, LA EVOLUCIÓN CLÍNICA Y EL ESTADO NUTRICIONAL DE NEONATOS SOMETIDOS A CIRUGÍA”.**

Ha quedado registrado en este **Comité Local de Investigación** con el No. **2005/3603/72.**

Asimismo le informo que con objeto de tener conocimiento de los avances de su proyecto es necesario que nos envíe semestralmente el formato **“Informe Semestral de Avances de Proyectos de Investigación”**, y lo entregue al Director de Educación e Investigación en Salud de esta Unidad.

Sin otro particular aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente.  
Seguridad y Solidaridad Social



**DR. CARLOS DAVID GONZÁLEZ LARA**  
DIRECTOR DE LA UNIDAD.

CHI/bb  




**HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO**  
**FEDERICO GÓMEZ**  
 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

*Instituto de Servicio Médico, Enseñanza e Investigación Afiliado a la UNAM*  
 Tel.: 5761-0181 Fax: 5761-8974 Tel. Comutador 5228-9917 Ext. 1478 y 1499  
 Dr. Márquez N° 162 Col. Doctores, México, D.F. C.P. 06720

“2006, año del Bicentenario del Natalicio del Benemérito de las Américas, Don Benito Juárez García”

México, DF., a 10 de marzo de 2006.

1000/2014/2006

**Dra. Dina Villanueva García**  
 Departamento de Neonatología

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que su protocolo número HIM/2005/065 “Efecto modulador de la administración del ácido docosahexaenoico sobre la respuesta inflamatoria, la evolución clínica y el estado nutricional de neonatos sometidos a cirugía”, sometido a la consideración de las Comisiones de Investigación, de Ética y de Bioseguridad, ha sido revisado y discutido minuciosamente.

Nos complace comunicarle que, en atención a dicha revisión, se ha decidido:

**APROBARLO**

en términos y condiciones señaladas por dichas Comisiones y por lo tanto se le autoriza para que lo desarrolle.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente

  
 Dr. José Ignacio Santos Preciado  
 Director General



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
 UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD  
 COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

“2006, año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas,  
 Don Benito Juárez García”

**COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**

Ref. 09-B5-61-2800/02045

Agosto 07, 2006

**M. EN C. MARIELA BERNABÉ GARCÍA**

Unidad de Investigación Médica en Nutrición,  
 Unidad Médica de Alta Especialidad,  
 Hospital de Pediatría,  
 Centro Médico Nacional Siglo XXI

Informo a usted que el proyecto titulado: **“Efecto de la administración del ácido docosahexaenoico sobre la respuesta inflamatoria y la evolución clínica de neonatos sometidos a cirugía cardiotorácica”**, fue sometido nuevamente a la consideración de esta Comisión Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas éticas vigentes y la carta de consentimiento informado es suficientemente explícita, por lo cual tengo el agrado de hacerle saber que con base en las opiniones de los vocales de esta Comisión, se ha emitido dictamen de **AUTORIZADO**, con número de registro: **2006-785-069**.

De acuerdo a la normatividad institucional vigente, deberá informar semestralmente a esta Comisión, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo.

Atentamente

**DOCTORA DOLORES MINO LEÓN**

Secretario Ejecutivo  
 Comisión Nacional de Investigación Científica

Con copia:

- Doctor Carlos David González Lara, Director de la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI
- Doctora Mardya López Alarcón, Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI

DML'brs

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**DIRECCION REGIONAL SIGLO XXI**

HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA  
DIRECCIÓN

Chiapas  
Guerrero  
Morelos  
Querétaro  
3 Suroeste del D.F.  
4 Sureste del D.F.

México D.F., a 30 de Marzo del 2006.

**M.C. MARIELA BERNABÉ GARCIA**

Presente.

Estimada M.C. Bernabé,

Con relación al Proyecto de Investigación # 2006-3604-04, Titulado: "Efecto de la administración de ácidos grasos de cadena larga Omega 3 sobre la respuesta inflamatoria y la evolución clínica de pacientes sometidos a cirugía", le informamos que después de someterlo al dictamen elaborado por el Comité de Investigación de nuestro Hospital y por haber sufrido las modificaciones para el caso en cuestión, ha sido aprobado para que se lleve a cabo bajo los auspicios de nuestras instalaciones, haciendo uso de nuestros propios recursos materiales y humanos con los pacientes, que bajo pleno conocimiento de la importancia de éste estudio de investigación científica, hayan decidido aceptar su inclusión al protocolo.

De la misma manera, recalamos el compromiso que los autores adquieren para con los sujetos de investigación, así como para con nuestro Hospital y nuestro Instituto, dentro de las más estrictas normas de la ética profesional.

Haciendo votos de confianza para que éste estudio alcance las metas propuestas, quedamos a sus muy distinguidas consideraciones.

**Dr. Armando Mansilla Olivares**  
Secretario del Comité Local

**Dr. Rubén Arguero Sánchez**  
Presidente del Comité Local

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

# ANEXO 9

## COMPROBANTES DE OTORGAMIENTO DE FINANCIAMIENTOS



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS**  
 Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
 Coordinación de Investigación en Salud

**“2006, Año del Bicentenario del Natalicio del Benemérito de las Américas,  
 Don Benito Juárez García”.**

México, D.F. a 01 de marzo de 2006.

Ref: 09-B561-2800/464

**Doctora Mariela Bernabe García**  
 Unidad de Investigación Médica en Nutrición  
 Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI  
 P r e s e n t e

**No. de Folio FOFI: 2005/1/1/193**

Tengo el agrado de informarle que en los términos de la Convocatoria 2005-2, se aprobó su solicitud para recibir Apoyo Financiero, por \$163,700.00 (Ciento sesenta y tres mil setecientos pesos 00/100 M.N.) para el proyecto de investigación **“Efecto modulador del ácido docosahexaenóico sobre la respuesta inflamatoria y la evolución clínica de neonatos sometidos a cirugía”**. El financiamiento que se le ha otorgado estará vigente **del 3 de abril del 2006 al 2 de abril del 2008 (sin prórrogas)** y solo se podrá ejercer una vez que usted entregue firmada la Carta Compromiso. Anexo le envío los formatos de Informe Técnico y Financiero que deberá entregar semestralmente en la Coordinación de Investigación en Salud.

El desglose financiero autorizado y la Carta Compromiso que deberá firmar y entregar en la Coordinación de Investigación en Salud, le serán enviados a su correo electrónico.

Es importante destacar que del monto asignado se le deducirá el costo de la suscripción anual de la revista Archives of Medical Research. En una siguiente comunicación le pediremos información para que nos indique donde desea recibir los ejemplares.

Aprovecho la oportunidad para felicitarle y le invito a continuar realizando actividades de investigación de calidad y congruentes con los problemas de salud de nuestra población, procurando la difusión de sus resultados a través de la publicación en revistas indizadas.

Atentamente,

**Dr. José Dante Amato Martínez**  
 Coordinador de Investigación en Salud

Con copia para:

- Dr. Juan Pablo Méndez Blanco, Jefe de la Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud.

JDAM/KJR/aeg.

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS**  
 Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
 Coordinación de Investigación en Salud

"2006, Año del Bicentenario del Natalicio del Benemérito de las Américas,  
 Don Benito Juárez García".

México, D.F. a 25 de julio de 2006.

Ref: 09-B561-2800/01864

**Doctor(a) Mariela Bernabe Garcia**  
 Unidad de Investigación Médica en Nutrición Siglo XXI  
 UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI  
 Presente

**No. de Folio FOFI: 2006/1A)/I/066**

Tengo el agrado de informarle que en los términos de la Convocatoria 2006, se aprobó su solicitud para recibir Apoyo Financiero, por \$ 200000 (Doscientos mil pesos.) para el proyecto de investigación "**Efecto de la administración de ácidos grasos de cadena larga omega 3 sobre la respuesta inflamatoria y la evolución clínica de pacientes sometidos a cirugía.**". El financiamiento que se le ha otorgado estará vigente **del 1 de agosto del 2006 al 31 de julio del 2008 (sin prórrogas)** y solo se podrá ejercer una vez que usted entregue firmada la Carta Compromiso. Anexo le envío los formatos de Informe Técnico y Financiero que deberá entregar semestralmente en la Coordinación de Investigación en Salud.

El desglose financiero autorizado y la Carta Compromiso que deberá firmar y entregar en la Coordinación de Investigación en Salud, le serán enviados a su correo electrónico.

Es importante destacar que del monto asignado se le deducirá el costo de la suscripción anual de la revista Archives of Medical Research. En una siguiente comunicación le pediremos información para que nos indique donde desea recibir los ejemplares.

Aprovecho la oportunidad para felicitarle y le invito a continuar realizando actividades de investigación de calidad y congruentes con los problemas de salud de nuestra población, procurando la difusión de sus resultados a través de la publicación en revistas indizadas.

Atentamente,

**Dr. José Dante Amato Martínez**  
 Coordinador de Investigación en Salud

Con copia para:

- Dr. Juan Pablo Méndez Blanco, Jefe de la Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud.

JDAM/KJR/brg/van.

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS**  
**Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud**  
**Coordinación de Investigación en Salud**

*"2008, Año de la Educación Física y el Deporte"*

México, D.F. a 22 de septiembre de 2008.

Ref: 09-B5 61-61-2810/200800/1623

**Dra. Mariela Bernabe García**

Unidad de Investigación Médica en Nutrición  
 UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI  
 Presente.

**Número en el Fondo: FIS/IMSS/PROT/516**

Tengo el agrado de informarle que en los términos del "Concurso de apoyo Financiero para Protocolos de Investigación de Tesis de Maestría o de Doctorado que se llevan a cabo en el IMSS, Convocatoria 2008", se aprobó su solicitud para recibir Apoyo Financiero por la cantidad de **\$60,000.00** (Sesenta mil pesos 00/100 MN) para el protocolo de investigación "**Efecto de la administración de ácido docosahexaenoico sobre la respuesta inflamatoria y la evolución clínica de neonatos sometidos a cirugía cardiotorácica**". El financiamiento que se le ha otorgado estará vigente a partir del **1º. de Enero del 2009** y hasta por dos años más **sin prórrogas** y solo se podrá ejercer cuando haya entregado la carta compromiso, para lo cual es necesario que usted ingrese en el SIRELCIS imprima y firme la carta, la ingrese al sistema en formato digital y después entregue la original en el FIS antes del 1º. de Noviembre del 2008. Se le recuerda enviar semestralmente los Informes Técnico y Financiero en la Coordinación de Investigación en Salud.

Aprovecho la oportunidad para felicitarle y le invito a continuar realizando actividades de investigación de calidad y congruentes con los problemas de salud de nuestra población, procurando la difusión de sus resultados a través de la publicación en revistas indizadas.

Atentamente,

**Dr. César Alberto Cruz Santiago**  
 Coordinador de Investigación en Salud

Con copia para:

- Dr. Hermilo de la Cruz Yañez, Director de la Unidad Médica de Alta Especialidad, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI.
- Dra. Mardía Guadalupe López Alarcón, Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI.
- C.P. Sergio Rivera Vázquez, Secretario Administrativo del Comité Técnico del Fondo de Investigación en Salud.

CACS/KJR/BBM/BRG/aeg.

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL