



**CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI**

**HOSPITAL DE PEDIATRIA**

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACION ENTERAL DE ÁCIDO  
DOCOSAHEXAENOICO EN LA EXPRESIÓN DE CD69 DE LINFOCITOS CD4 Y  
SU ASOCIACIÓN EN EL DESARROLLO DE COMPLICACIONES DE NEONATOS  
SOMETIDOS A CIRUGÍA”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TITULO DE POSTGRADO EN NEONATOLOGÍA**

**PRESENTA**

**DRA LILIA ESPINOZA GARCÍA**

**RESIDENTE DE 2º AÑO DE NEONATOLOGIA**

**TUTORES:**

**DRA. MARIELA BERNABE GARCIA**

**Unidad de Investigación Médica en Nutrición**

**DR. FRANCISCO ANTONIO BLANCO FAVELA <sup>1</sup>**

**COLABORADORA:**

**DRA. ADRIANA KARINA CHAVEZ RUEDA <sup>1</sup>**

**<sup>1</sup> Unidad de Investigación Médica en Inmunología**

**MEXICO, DF**

**MARZO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud

**Dictamen de Modificación Autorizada**

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN EN SALUD 3603  
HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, D.F. SUR

FECHA 22/02/2013

**DRA. MARIELA BERNABE GARCÍA****PRESENTE**

Tengo el agrado de notificarle, que la modificación al protocolo de investigación en salud con número de registro **R-2005-3603-72** y con título: **EFFECTO MODULADOR DEL ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA y LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE NEONATOS SOMETIDOS A CIRUGÍA** que consiste en:

--&gt;

<b>Cambio de alumnos</b>
--------------------------

que usted sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **MODIFICACION AUTORIZADA.**

ATENTAMENTE

**DR. HERMILO DE LA CRUZ YÁÑEZ**

PRESIDENTE DEL COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA EN INVESTIGACIÓN EN SALUD No.3603

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

## INDICE

	Pág.
1. Antecedentes	7
1.1 Papel de la molécula CD69	9
1.2 Efecto de los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga n-3 (LC-PUFAs n-3) y su relación con la respuesta inflamatoria aguda secundaria a cirugía	11
1.2.1 Efectos sobre la síntesis de eicosanoides	12
1.2.2 Efecto sobre la expresión de genes	12
1.2.3 Microdominio de la membrana celular (Lipid Raft)	13
1.2.4 Efecto de los ácidos grasos omega 3 en CD69, respuesta inflamatoria y en el desarrollo de complicaciones en pacientes operados	14
2. Planteamiento del problema	16
3. Justificación	17
4. Objetivos	18
5. Hipótesis	19
6. Material y métodos	20
6.1 Diseño del estudio	20
6.2 Lugar de estudio	20
6.3 Población o universo de estudio	20
6.4 Criterios de selección	20
6.4.1 Criterios de inclusión	20
6.4.2 Criterios de eliminación	21
6.5 Tipo de muestreo	21
6.6 Tamaño de la muestra	21
6.7 Definición operativa de variables	22

6.8 Procedimientos	27
6.8.1 Aleatorización de la intervención	27
6.8.2 Administración de la dosis	27
6.8.3 Cegamiento	28
6.8.4 Toma de muestra	28
6.9 Mediciones	30
6.9.1 Molécula CD69	30
6.9.2 Porcentaje de ácidos grasos	30
6.9.3 Ingestión de leche humana	30
6.9.4 Gravedad de la enfermedad	31
6.9.5 Datos demográficos	31
6.9.6 Efectos adversos	31
6.10 Aspectos éticos	32
6.11 Análisis estadístico	33
6.12 Financiamiento	33
7. Resultados	34
7.1 Variables demográficas	34
7.2 Moléculas CD69 en linfocitos CD4 positivos	36
7.3 Deltas en células CD69 de linfocitos CD4 entre el tiempo basal y 24h postcirugía, y entre 24h a 7 días postcirugía	37
7.4 Asociación de la expresión de células CD69 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> y el número de complicaciones	39
7.5 Covariables	40
7.6 Identificación de eventos adversos	43
8. Discusión	44
9. Conclusiones	49

10. Recomendaciones y futuras investigaciones	50
11. Referencias bibliográficas	51
12. Anexos	59
Anexo1. Certificado de análisis del contenido de nutrimentos del suplemento alimenticio que contiene el DHA (Neuromins)	59
Anexo 2. Carta de consentimiento informado	60
Anexo 3. Obtención de eritrócitos	62
Anexo 4. Separación de lípidos y determinación del perfil de ácidos grasos	63
Anexo 5. Registro de ingestión de leche humana durante el estudio	65
Anexo 6. Expediente de estudio	66
Anexo 7. Escala de gravedad SNAP-II	70

## 1. ANTECEDENTES

Después de una cirugía mayor la función inmune puede estar suprimida por el estrés quirúrgico debido a la respuesta inflamatoria sistémica durante la cual se liberan citocinas como mediadores de la inflamación. Éstas son sintetizadas durante la activación de la inmunidad innata y adquirida y son los principales medios para la comunicación intercelular, las principales citocinas secretadas que juegan un papel importante en la iniciación de la respuesta inmune innata y que son fundamentales para la propagación de la respuesta inmune adquirida son el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa ( $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 beta( $\beta$ ) e IL-6 las cuales son sintetizadas por fagocitos mononucleares.<sup>1,2</sup>

En diversos estudios se ha demostrado que la elevación de los niveles plasmáticos de citocinas pro-inflamatorias (respuesta inflamación exacerbada), incrementa el riesgo de complicaciones como infecciones y un alto porcentaje de mortalidad.<sup>3</sup>

Varios autores han sugerido que la función de linfocitos se deteriora después de la anestesia y la cirugía: Puede disminuir la capacidad de respuesta de los linfocitos, posterior a una cirugía, la producción de IL-2 a partir de las células mononucleares y se atenúa la actividad de las células Natural Killers.

En los casos de cirugía mayor existen defectos graves en la proliferación linfocitaria<sup>2,4</sup> Paradójicamente, aunque hay una activación del sistema inmune innato, también hay una depresión de la inmunidad mediada por células, lo que

altera los mecanismos de defensa del huésped, causando una importante predisposición de las complicaciones infecciosas y sepsis, que pueden conducir a la sepsis y el shock séptico<sup>5,6</sup> .

Éstos a su vez predisponen al desarrollo de falla orgánica múltiple aumentando el riesgo de muerte en un 40 a 80% <sup>3,7,8</sup>

En resumen, la inflamación excesiva o inadecuada y la inmunosupresión son componentes de la respuesta a la cirugía, trauma, lesiones o infección, y en algunos individuos y éstos pueden conducir, de manera progresiva, a la sepsis y el shock séptico y predisponer al desarrollo de falla orgánica múltiple aumentando el riesgo de muerte en un 40 a 80% <sup>3,7</sup>

Por lo tanto lo más adecuado es que ocurra un equilibrio entre SIRS y CARS, para que se alcance la homeostasis y se logre la recuperación del paciente sin complicaciones pero si una de las dos predomina, se presentan la falla orgánica múltiple en presencia de SIRS o una elevada susceptibilidad a infecciones que lleva a hiperinflamación, SIRS y falla orgánica múltiple <sup>9</sup>.

Existen moléculas de superficie que actúan como marcadores de activación, ante un proceso inflamatorio agudo o crónico. La molécula CD69 es una de las primeras proteínas expresadas después de la activación de leucocitos y su participación es indispensable en el control de la respuesta inmune innata y adaptativa<sup>11</sup>.

## 1.1 Papel de la molécula CD69 en la respuesta inflamatoria aguda

El CD69 es la primera glicoproteína de superficie que se induce de forma temprana durante la activación linfocítica, tanto *in vitro* como *in vivo* bajo condiciones fisiológicas y de inflamación<sup>12</sup>.

El CD69 es un receptor de la membrana de la familia de lectinas de tipo II y tipo C. Se induce rápidamente después de la activación celular en todas las células derivadas de la médula ósea, excepto los eritrocitos. La expresión *in vivo* se limita a los timocitos y leucocitos sometidos a activación, en particular en los sitios inflamatorios<sup>13</sup>.

El CD69 es indetectable en el resto de las células mononucleares, se expresa de forma temprana después de la activación de células T por fitohemaglutinina (PHA) y activadores de la proteína quinasa C<sup>11</sup>.

Se han realizado estudios en animales para evaluar la función del CD69 en la respuesta inmune. Wang y cols. sugirió que el CD69 puede estar implicado en el desarrollo o regulación de subseries de células T, para ello se analizó el virus de inmunodeficiencia en simios Rhesus macaco y se comparó la expresión de CD69 de células T de intestino, bazo y ganglios linfáticos comparado con macacos normales. Además expresaron una depleción marcada de las células CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, y concluyen que CD69 es un importante regulador de la respuesta inmune, la pérdida selectiva de las células CD4 que expresan CD69 pueden tener consecuencias profunda para la regulación inmune local en tejidos específicos<sup>14</sup>

Un estudio realizado por Feng y cols., examinaron la expresión de CD69 en todas las fases de desarrollo de las células T en ratones transgénicos, concluyendo que

el CD69 tiene un papel importante en el control de la exportación de células maduras del timo y en la activación transitoria inducida por CD69, con lo que se regula el tráfico de células T a otros tejidos<sup>15</sup>.

En humanos, un estudio realizado en adultos evaluó la expresión de CD69 en pacientes con carcinoma de esófago y cirugía cardiaca. Se encontró que la proporción de células CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> después de 4 h de estimulación *in vitro* con un mitógeno tuvo un incremento significativo al día 1, 2, 3, 5 y 7 del postoperatorio<sup>2</sup>.

En otro estudio de humanos con edades entre 6.1 a 21.2 años de edad, se reportó que la expresión de CD69 fue mayor en aquellos con evidencia histológica concurrente de rechazo de trasplante cardiaco y mostrando una asociación positiva, concluyendo que la medición de la expresión de CD69 por citometría de flujo puede proporcionar un medio para evaluar la activación inmune y que éste puede ser un marcador temprano de posible rechazo en receptores de trasplante cardiaco<sup>16</sup>.

A nuestro conocimiento, no se ha evaluado cuál es el efecto en la expresión de CD69 neonatos y si ésta se asocia a las complicaciones en el periodo postquirúrgico en neonatos sometidos a cirugía cardiovascular.

## **1.2 Efectos de los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (LC-PUFAs) y su relación con la respuesta inflamatoria aguda secundaria a cirugía.**

Los ácidos grasos poliinsaturados linoleico (LA) y el alfa linolénico (ALA) son considerados como ácidos grasos indispensables, debido a que las células de los mamíferos son incapaces de sintetizarlos por la ausencia de las desaturasas  $\Delta$ -15 y  $\Delta$ -12, por lo que el ALA y LA deben obtenerse de fuentes externas como la dieta o suplementos<sup>17,18</sup>.

El ALA y LA son los precursores de otros ácidos grasos de las familias n-3 y n-6, respectivamente, los cuales son convertidos en sus metabolitos de cadena larga a través de la elongación y desaturación; estos metabolitos son llamados colectivamente ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (long-chain polyunsaturated fatty acids, LC-PUFAs) que se caracterizan por contener  $\geq 20$  átomos de carbono y  $\geq 3$  dobles ligaduras. El LC-PUFAs derivado del LA es el ácido araquidónico (AA, 20:4n-6) y predomina en las membranas celulares de los mamíferos y en la leche humana, mientras que los productos derivados del ALA son el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3), el ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5 n-3), y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3).<sup>17,18</sup>

Los mecanismos de acción que actúan en la atenuación de la respuesta inflamatoria aguda reportados son:

**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, (PGs), tromboxanos y leucotrienos (LTs), éstos están involucrados en la modulación, la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria. 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 materna en comparación con los ácidos grasos de la serie omega 3 (n-3). Los LC-PUFAs n-3 como el DHA y el ácido eicopentaenoico (EPA), que se encuentran contenidos en el aceite de pescado, también son precursores lípidicos 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 omega n-6. Además, el EPA y DHA compiten con el AA por la misma vía enzimática como la ciclooxigenasa (COX) y 5-Lipooxigenasa (5-LOX), sin embargo 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 la inflamación atenuada<sup>19-21</sup>.

**1.2.2 Efecto sobre la expresión de genes** Los LC-PUFAs n-3 también reducen la respuesta inflamatoria mediante la alteración de la expresión de genes inflamatorios a través de la inactivación del factor de transcripción nuclear kB (NFkB), que juega un papel importante 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. 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 células pancreáticas cultivadas, por lo tanto se considera que los LC-PUFAs n-3 tienen un papel inhibidor de la vía NFkB. Otro mecanismo reportado es a través de la activación de los Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas (PPARs). Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, especialmente n-3 son ligandos naturales de los PPARs. Sin embargo el EPA y DHA son más potentes como activadores *in vivo* que los n-6. Es por ello que los LC-PUFAS n-3 disminuyen la señalización inflamatoria vía inhibición de NFkB y pueden atenuar o disminuir varios procesos inflamatorios<sup>22,23</sup>.

### **1.2.3 Microdominio de la membrana celular (Lipid Raft)**

Existen cambios en la membrana celular debido a la incorporación de los LC-PUFAs n-3 que también afectan la estructura de los microdominios que son sitios donde se inician y se propagan los eventos de señalización. Esto es mediante la modificación de la organización de la membrana, la cual es rica en esfíngolipidos y colesterol, que al incorpora el DHA causa desorganización de los complejos y esto conlleva a la inhibición de las proteínas de señalización, necesarias para la activación linfocitaria, que al final regula la respuesta inmune y de inflamación <sup>24,25</sup>.

#### **1.2.4 Efecto de los ácidos grasos omega 3 en CD69, respuesta inflamatoria y en el desarrollo de complicaciones en pacientes operados**

Sólo hay un estudio que ha reportado el efecto de DHA sobre CD69 en adultos voluntarios, quienes después de recibir 4.91 g DHA/d más 0.85 g EPA/d ingeridas por 4 semanas mostraron una menor expresión y por tanto de un marcador temprano de activación de linfocitos T<sup>26</sup>.

En pacientes sometidos a cirugía de abdomen, quienes recibieron aceite de pescado como fuente de ácidos grasos omega 3 por vía parenteral durante 5 días mostraron menor respuesta inflamatoria en términos de menores concentraciones plasmáticas de TNF- $\alpha$  y de IL-6 comparados con el grupo control que recibió aceite de soya, lo que indicó menor respuesta inflamatoria <sup>27,28</sup>.

Existen escasos estudios de la administración de DHA sobre respuesta inflamatoria en neonatos. En la Unidad de Investigación Médica en Nutrición (UIMN), la administración enteral de DHA en neonatos durante 14 días a partir del diagnóstico de sepsis mostró una menor concentración de IL-1 $\beta$  plasmática<sup>29</sup>.

En otro estudio en neonatos (del que se derivan parte de los resultados de este trabajo), donde la administración del DHA se adelantó al inicio de la respuesta inflamatoria (2 días precirugía) y se continuó tan pronto se mejoraron las condiciones abdominales (durante 6 días post-cirugía), los niños que recibieron el DHA mostraron menor porcentaje de IL- $\beta$  e IL-6 comparados con el grupo que recibió aceite de girasol. Ambos estudios en neonatos demostraron que el grupo que recibió el DHA tuvo una menor respuesta inflamatoria aguda<sup>30</sup>.

En resumen, no hay reportes del efecto de los LC-PUFAs n-3 sobre la expresión de CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, y los estudios que evalúan el efecto del DHA sobre complicaciones en pacientes sometidos a cirugía provienen de adultos, y tampoco se conoce si esta expresión se asocia a complicaciones en el periodo postquirúrgico.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante un procedimiento quirúrgico mayor como una cirugía cardiovascular, la lesión tisular provoca un estado de inflamación aguda que induce la activación celular, pero si la respuesta inflamatoria se exagera puede conducir a sepsis, choque séptico y fallas orgánicas, que son las complicaciones postquirúrgicas más frecuentes en estos pacientes<sup>1,3</sup>.

Se conoce que la expresión de CD69 aumenta con el trauma quirúrgico y su elevada expresión se ha propuesto como factor pronóstico para el rechazo de trasplante cardíaco<sup>16</sup>, pero no se ha evaluado su asociación a otras complicaciones.

Cuando la respuesta inflamatoria sistémica exacerbada es persistente, se ha asociado al desarrollo de complicaciones potencialmente mortales, que pueden dar lugar a complicaciones como sepsis y falla orgánica múltiple, favorecidas por la producción excesiva de citocinas inflamatorias y daños a órganos<sup>31</sup>.

El DHA ha demostrado tener efectos antiinflamatorios en estudios en neonatos con sepsis y sometidos a cirugía cardiovascular<sup>29,30</sup>, pero no se conoce cuál es el efecto en la expresión de CD69 y si éste se asocia a las complicaciones en el periodo postquirúrgico en neonatos sometidos a cirugía cardiovascular. Por lo anterior nos planteamos la siguiente pregunta:

**¿Cuál es el efecto de la administración de DHA por vía enteral en la expresión de CD69 en leucocitos CD4 y si ésta se asocia al desarrollo de complicaciones de neonatos sometidos a cirugía cardiovascular?**

### 3. JUSTIFICACIÓN

En el Hospital de Pediatría la cardiopatía congénita es la primera causa de ingreso a la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales, que representa el 25% de los ingresos. De 389 niños con cardiopatía que ingresaron en un periodo de 4 años, el 31% (n=121) falleció y de éstos, 75 niños (62%) habían sido sometidos a cirugía<sup>32</sup>. Se conoce que los procedimientos quirúrgicos generan un estado de hiperinflamación y esto favorece el desarrollo de complicaciones como sepsis y/o falla orgánica múltiple en un 40 a 80 %, lo que puede condicionar la muerte<sup>3</sup>.

Existen escasos estudios que evalúen la administración de DHA sobre la respuesta inflamatoria en neonatos<sup>29,30,33</sup> y no se conoce cuál es su efecto en la expresión de CD69 en pacientes y la relación de esta expresión con las complicaciones en neonatos sometidos a cirugía.

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, lo que nos ayudará a diseñar intervenciones dirigidas a mejorar la evolución clínica y en consecuencia disminuir la estancia hospitalaria y la mortalidad.

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

Evaluar el efecto de la administración enteral de DHA en la expresión de CD69 en linfocitos CD4 y su asociación con el desarrollo de complicaciones de neonatos sometidos a cirugía cardiovascular

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

4.1.1 Comparar la respuesta inflamatoria post-quirúrgica (en porcentaje de linfocitos CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) de un grupo de niños sometidos a cirugía cardiovascular que reciban DHA por vía enteral con la de un grupo control.

4.1.2 Determinar si existe asociación entre los leucocitos CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y las complicaciones (en términos de sepsis y fallas orgánicas) de neonatos operados durante su estancia en UCIN.

## **5. HIPOTÉISIS GENERAL**

La administración enteral de DHA por vía enteral reduce la activación exacerbada de linfocitos CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en neonatos operados comparados con los neonatos que reciban aceite de girasol y la menor activación se asocia a menor número de complicaciones en neonatos operados.

### **5.1 HIPOTESIS ESPECÍFICAS**

5.1.1 La expresión de CD69 en los linfocitos CD4 es menor en los niños que reciben DHA que los niños que reciben aceite de girasol.

5.1.2 La menor expresión de CD69 en los linfocitos CD4 se asocia a menor número de complicaciones

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

*6.1 Diseño del estudio:* Ensayo clínico controlado, aleatorizado, doble ciego. Los resultados fueron captados.

*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 de Neonatales del Hospital de Pediatría, C.M.N. Siglo XXI del IMSS. El periodo de estudio comprendido del estudio fue de marzo de 2007 a junio de 2011.

*6.3 Universo de estudio:* Niños menores de un mes de edad postnatal programado a cirugía cardiovascular como fístula sistémico pulmonar (Blalock-Taussig modificada) o coartectomía que son las intervenciones quirúrgicas más frecuentes en esta población.

### *6.4 Criterios de selección*

#### *6.4.1 Criterios de inclusión*

- Que los padres aceptaran participar después de explicarles de forma verbal y escrita el objetivo y procedimiento de la investigación.
- Edad gestacional mayor de 32 semanas.
- Peso adecuado para edad postnatal de acuerdo a Lubchenco si tuvo menos de 2 semanas de edad <sup>34</sup> ; si tuvo más de dos semanas, se utilizaron las curvas de “National Center of Health Statistics” (NCHS)<sup>35</sup>. Para niños pretérmino se utilizaron las curvas de Marks <sup>36</sup>.

- Tracto gastrointestinal funcional que le permitiera tolerar al menos el estímulo enteral mínimo para recibir el DHA o aceite de girasol.
- 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  $> 19.5 \times 10^3/\text{mm}^3$  ó  $< 5 \times 10^3/\text{mm}^3$ )<sup>37</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 sus hijos abandonaran el estudio
- Que requiriera circulación extracórporea durante la cirugía

### **6.5 TIPO DE MUESTREO**

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

### **6.6 TAMAÑO DE LA MUESTRA**

El tamaño de la muestra para el proyecto completo se estimó en 21 pacientes por grupo, considerando el porcentaje de las células positivas de interleucina 1 beta, como indicador de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas antes de alcanzar dicha muestra y por lo que se suspendió la captación, debido que la molécula CD69 fue objetivo secundario, no se calculó un tamaño de la muestra

## 6.7 DEFINICIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable y Unidades
<b>Independiente</b>			
Administración de DHA	Administración de ácido docosahexaenoico (DHA), es un ácido graso poliinsaturado de la serie omega-3 <sup>38</sup>	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 aceite de girasol. La administración fue peri operatoria, iniciando desde 2 días previos a la cirugía hasta 6 días postcirugía.	Cualitativa Nominal 1= DHA 0= Control
<b>Dependientes</b>			
CD69 en linfocitos CD4+	Molécula coestimuladora que se expresa en la superficie de linfocitos T en cuanto ocurre la activación celular. <sup>13</sup>	Determinación de CD69 con anticuerpo monoclonal marcado con PE en sangre total antes de la cirugía, 24 h y día 7 post cirugía por Citometría de flujo	Cuantitativa - Porcentaje de linfocitos CD4+/CD69+
Número de complicaciones	Frecuencia de eventos relacionados con la cirugía, como sepsis y fallas orgánicas.	Se evaluará el numero de evento ocurridos durante el periodo postquirúrgico  Sepsis: se definió por consenso internacional como respuesta inflamatoria sistémica, resultado de una infección probada o de la sospecha de ésta donde deben de 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 inflamatorio agudo. 4) Conteo de leucocitos >19.5x10 <sup>3</sup> /mm o <5 leucocitos x10 <sup>3</sup> /mm', ó >10% de neutrófilos inmaduros. También se registró el microorganismo aislado. <sup>37</sup>	Cualitativa Nominal Frecuencia y porcentaje

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable y Unidades
		<p>Falla orgánicas:</p> <p>Orgánica: número de eventos por grupo de pacientes que desarrollaron fallas orgánicas como: falla respiratoria, cardiovascular, hematológica, renal y hepática<sup>37</sup>.</p> <p>1) Respiratoria: debe de incluir uan <math>PaO_2/FiO_2 &lt; 300</math> en ausencia de enfermedad pulmonar preexistente ó necesidad probada por <math>&gt; 50\%</math> de <math>FiO_2</math> para mantener una saturación aceptable <math>&gt; 70</math> según cardiopatía.<sup>37</sup></p> <p>2) Cardiovascular falla a pesar de la administración de bolos de solución intravenosa <math>\geq 40\text{ml/kg}</math> en 1 hora. Hipotensión: presión sistólica sanguínea <math>&lt; 75</math> mmHg ó necesidad de medicamentos vasoactivos para mantener la presión sanguínea normal (dopamina <math>&gt; 5</math> mcg/kg/min o bien dobutamina, epinefrina o norepinefrina en cualquier dosis) ó dos de los siguientes datos: acidosis metabólica inexplicable, déficit de base <math>&gt; 5.0\text{mEq/L}</math>, lactato arterial elevado <math>&gt; 2</math> veces el límite superior normal. Oliguria: orina <math>&lt; 0.5</math> ml/kg/h. Llenado capilar prolongado <math>&gt; 5</math> segundos. Diferencia entre temperatura periférica central <math>&gt; 3^\circ\text{C}</math>.<sup>37</sup></p> <p>3) Hematológica: Conteo de plaquetas <math>&lt; 80,000/\text{mm}^3</math> o una disminución del 50% del conteo de plaquetas del valor más alto registrados los 3 días previo<sup>37</sup>.</p> <p>4) Renal: Elevación de la Creatinina sérica <math>&gt; 2</math> veces el límite superior normal para la edad o un incremento del doble en la creatinina basal<sup>37</sup>.</p> <p>5) Hepática: incremento de la bilirrubina total <math>&gt; 2</math> mg/dl o elevación de alanino transferasa dos veces por arriba del límite superior normal para la edad<sup>37</sup>.</p>	<p>Nominal</p> <p>Frecuencia y porcentaje</p>

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable y Unidades
<b>Demográficas</b>			
Sexo	Género de persona <sup>39</sup>	Femenino o masculino	Cuantitativa dicotómica
Edad gestacional al nacer	Duración del embarazo calculada desde el primer día de la última menstruación normal hasta el nacimiento o hasta el evento gestacional en estudio. <sup>40</sup>	Edad en semanas	Cuantitativa continua
Apgar a los 5 minutos	Fórmula de riesgo que sirve para evaluar al recién nacido en el primer minuto de vida y 5 minutos	Puntuación de 7 a 10 ausencia de depresión Puntuación 4 y 6 depresión moderada Puntuación inferior a 3 en el primer minuto o 5 los cinco minutos indica depresión grave,	Cuantitativa
Edad postnatal	Edad cronológica a partir del nacimiento	Número de días a partir del nacimiento hasta el ingreso al estudio	Cuantitativa Días
Peso	Medición de la masa corporal <sup>41</sup>	Se pesó previo a la toma de las 10:00 h en báscula pesa bebés capacidad de 10 kg, precisión de +/- 1 g marca Sartorius Mod. EB15DCE-L, Gottingen, Alemania, al ingreso del estudio.	Cuantitativa continua Kg
Longitud	Medición de la longitud corona-talón de un individuo <sup>41</sup>	Se utilizó infantómetro marca SECA mod. 207, Hamburgo, Alemania), en el mismo tiempo que el peso, al ingreso del estudio.	Cuantitativa continua Cm
Perímetro cefálico	Es la medición del diámetro de la cabeza que estima el crecimiento del cerebro <sup>41</sup>	Se midió colocando una cinta de fibra de vidrio entre la porción más prominente de occipucio y las gibas frontales: la cinta empleada fue de la marca SECA mod. 212, Hamburgo, Alemania), al ingreso del estudio.	Cuantitativa continua Cm

<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de variables y Unidades</b>
Tipo de cirugía	Evento quirúrgico al que somete un paciente como tratamiento que puede ser de tipo paliativo o curación	Niños menores de un mes de edad postnatal que requirieron de una cirugía cardiovascular como fistula sistémico pulmonar (Blalock-Taussig modificada) o coartectomía.	Cualitativa dicotómica
<b>De confusión</b>			
Porcentaje de ácidos grasos tisulares	Indicador tisular de las reservas de ácidos grasos, entre ellos el DHA	Proporción de PUFAS en los fosfolípidos de membrana de los eritrocitos al ingreso del estudio <sup>42</sup>	Cuantitativa Proporción relativa de lípidos totales
Edad gestacional corregida	La edad que tendría un niño si hubiera nacido a las 40 semanas de gestación.	Es la suma de la edad gestacional determinada al nacer más la edad postnatal por Ballard o por fecha de última regla	Cuantitativa Semanas
Escala SNAP II	Escala de gravedad de enfermedades de los recién nacidos, que ingresan a la Unidad de cuidados intensivos neonatales, validado en estudio multicéntrico, mediante variables clínicas (presión arterial media, temperatura, relación PO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> , pH sérico, presencia de crisis convulsivas y uresis horaria) <sup>43</sup>	Se evaluará el estado de gravedad del padecimiento del niño 24 h antes de la cirugía mediante la escala de Score fr Neonatal Acute Physiology, versión II (SNAP-II), asignando el puntaje que corresponde a los puntos de cohorte de variables clínicas  A mayor puntaje mayor gravedad.	Cuantitativa Discontinua
Tratamiento con antibióticos	Uso de antimicrobianos sintéticos o quimioterapéuticos con propiedades antibióticas.	Administración de antibióticos durante el periodo postquirúrgico. Ejemplo: cefalotina, amikacina, vancomicina, cefotaxima, imipenem, en la UCIN.	Cualitativa mg/kg acumulados en días

<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de variables y Unidades</b>
Tratamiento antiinflamatorio	<p>Esteroides: son aquellos derivados de los corticoides.</p> <p>No esteroides: sustancias químicas con efecto antiinflamatorio, no derivadas de los corticoides</p>	<p>Administración de antiinflamatorios durante el periodo postquirúrgico en UCIN.</p> <p>Esteroides: dexametasona</p> <p>NO esteroides: ketorolaco o ácido acetilsalícilico</p>	<p>Cualitativa</p> <p>Si /no y duración de días</p>
Consumo de leche humana	Ingestión de leche obtenida de la madre	Se registró diariamente el volumen ingerido del paciente durante el tiempo de estancia en UCIN. Para la estimación del contenido energético de leche humana se consideró que cada mililitro aporta 0.67 kcal en promedio.	<p>Cuantitativa</p> <p>Kcal/kg/día</p>
Saturación de oxígeno	Es una medida que hace referencia a la cantidad de oxígeno que transportan los vasos sanguíneos en un momento concreto.	Se midió a través de la oximetría de pulso.	<p>Cuantitativa</p> <p>Porcentaje</p>
Acidosis metabólica	Alteración clínica en la que existe un pH arterial bajo, como consecuencia de una reducción en la concentración plasmática de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .	Se tomó como punto de cohorte déficit de base >5.0mEq/L, lactato arterial elevado > 2 veces el límite superior normal (2 mmol/L) <sup>37</sup> .	<p>Dicotómica</p> <p>Si / No</p>

## 6.8 PROCEDIMIENTOS

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 opaco cerrados con números de expedientes consecutivos sin reemplazo

6.8.2 *Administración de la dosis.* El DHA o aceite de girasol 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 aceite de girasol se utilizó una jeringa estéril y la sonda orogástrica que se utilizaba para su alimentación, si no tenía sonda orogástrica, se administró por vía bucal colocando la jeringa en el carrillo.

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 o DHA para el contenido de sucedáneos de leche humana, imitando las concentraciones reportadas para la leche humana<sup>44</sup>.

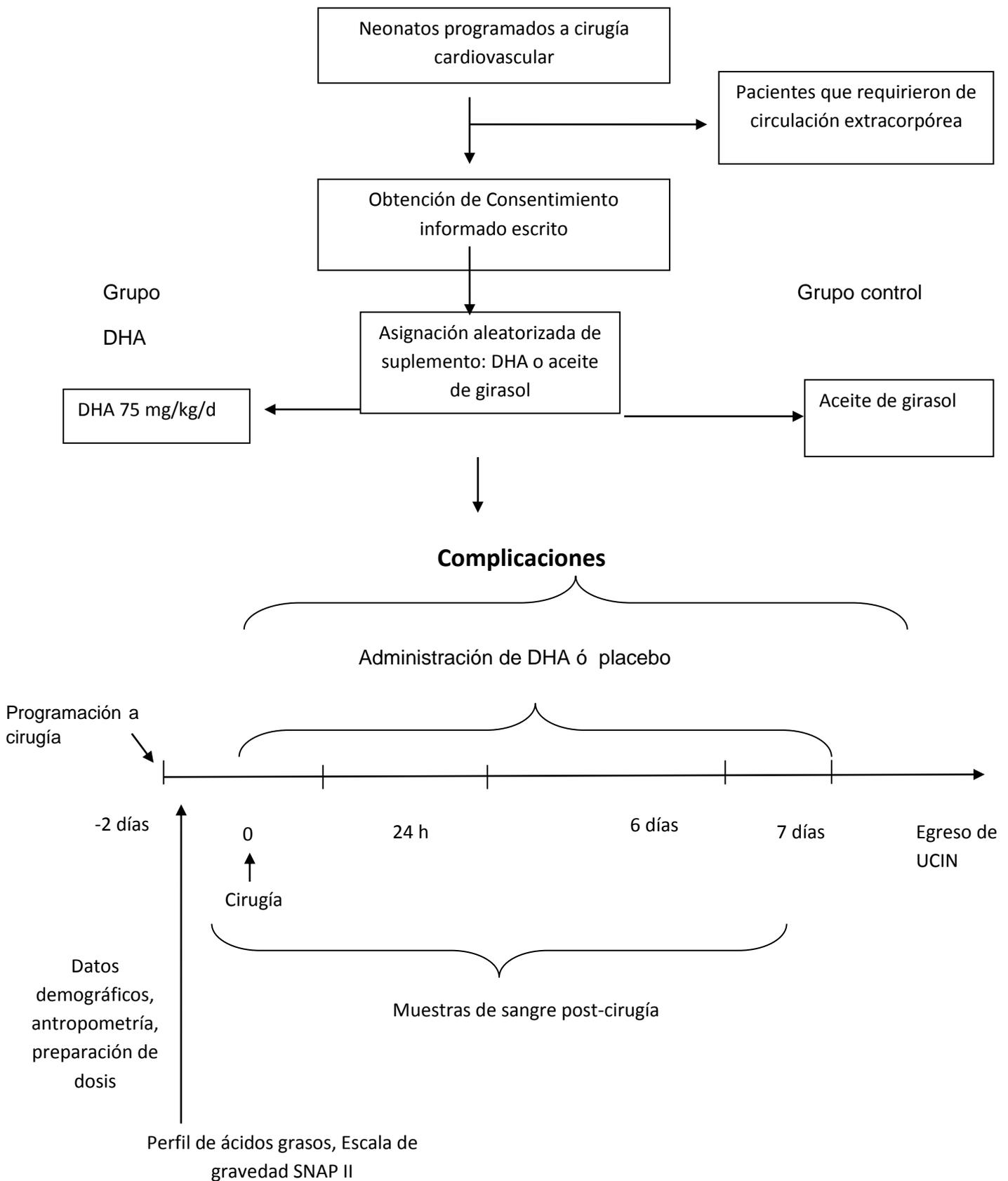
Recientemente se reportó que la ingestión diaria de DHA en niños alimentados depende del contenido en la leche y del volumen ingerido. Si consideramos que un niño recibe aproximadamente 765 ml/día de leche humana entre el mes y los 6 meses de edad, con un contenido de lípidos promedio de 41.3 g/L, los niños que

consumen leche con un contenido alto normal (~ 1% de los ácido grados totales), consumirían aproximadamente 315 mg de DHA al día <sup>44</sup>. Con la dosis calculada en el presente estudio los niños de 3 kg recibirán 225 mg de DHA al día<sup>45</sup>.

6.8.3 *Cegamiento*: El estudio fue doble ciego porque para la evolución clínica, el neonatólogo tratante y el neonatólogo que evaluó los eventos no conocieron el tipo de intervención que recibieron los niños; para el análisis de las células CD69/CD4, 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 colectaran 1.5 mL de sangre venosa en EDTA para medir porcentaje de ácidos grados en las membranas de los eritrocitos, entre ellos el DHA. La muestra se tomó cuando se puncionó para otras determinaciones de rutina, siempre que fue posible.

## Procedimientos del estudio



## 6.9 MEDICIONES

6.9.1 *CD69: CD69 en linfocitos CD4*: Se determinó por una microtécnica en una muestra de 25 microlitros de sangre total, sin activar con mitógenos. Se marcaron los linfocitos CD4 con un fluorocromo APC mientras que el CD69 se marcó con PE (marca Invitrogen). Posteriormente se incubó 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Luego se agregó paraformaldehído (Intrastain, marca DAKO) para fijar la célula, incubando durante 15 minutos en oscuridad. Al final del plazo, se lavó con una solución de PBS, agitando con vórtex y centrifugando el tubo a 2500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. La solución se decantó y se dejaron suspendidas las células en un volumen de 100 uL de solución de PBS para su determinación mediante el citómetro de flujo Facs Aria marca Beckton Dickinson del Centro de Instrumentos del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

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 posteriormente 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 3 y 4)

6.9.3 *Ingestión de leche humana*. Se registró diariamente el volumen ingerido del paciente durante el tiempo de estancia en UCI (Anexo 5). Para la estimación del contenido energético de 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 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<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, pH sérico, crisis convulsivas y uresis horaria y establece puntos de corte asignando una puntuación (anexo 7)<sup>43</sup>

6.9.5 *Datos demográficos.* Al ingreso del estudio se registra el género, el apgar, edad gestacional al nacer medida por la escala por la escala Ballard o en su defecto por fecha de última regla materna y la edad postnatal. También se medirá 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 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>45</sup>, que excede a las utilizadas en el presente estudio, por lo que se consideraron como eventos adversos a los pacientes que requirieron de circulación extracorpórea durante la cirugía, la suspensión del aporte enteral por gravedad extrema y fallecimiento durante su estancia en UCIN.

## 6. 10 ASPECTOS ÉTICOS

Esta investigación se clasifica como riesgo mayor al mínimo. Se respetaron estrictamente los principios contenidos en el Código de Nuremberg, la Declaración de Helsinki, la enmienda de Tokio, e 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 consentimiento escrito de los padres explicando los objetivos, procedimiento, posibles beneficios 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 considera que su estabilidad clínica es encontraba en riesgo.
- El niño podía abandonar el estudio en el momento que los padres lo desearán sin que se afectará su atención médica, informándose verbalmente al ingreso del estudio y en la carta de consentimiento.
- El proyecto completo fue aprobado por el Comité Local de Investigación del Hospital de Pediatría con el No. 2005-3603-72 y la enmienda que corresponde a la inclusión de la Tesista se encuentra en el anexo 8.

El beneficio del estudio para los neonatos fue el posible efecto inmune modulador y antiinflamatorio que se especula que tenga el DHA y que en forma secundaria esto pudiera reducir las complicaciones postquirúrgicas

## **6.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS versión 16 y Minitab versión 14. Las variables cuantitativas se reportan como promedio y desviación estándar; cuando las variables no mostraban distribución normal se transformaron a logaritmos y se comprobó que mostraran una distribución normal. Si aún así, no se distribuyeron normalmente, se reportaron como mediana e intervalo. Las variables cualitativas dicotómicas se reportan como frecuencia y proporciones.

Para comparar el efecto del DHA entre grupos se usó la prueba de t de Student o U –Mann-Whitney. Para comparar los cambios intra-grupo entre el basal y las 24h post-cirugía, o bien entre las 24 h y el día 7 postcirugía, se utilizó la prueba de t pareada. Para identificar hay asociación entre el porcentaje de CD69 en linfocitos CD4 y el número de complicaciones se utilizó la correlación de Spearman. Para comparar las variables cualitativas entre grupos se utilizó la prueba Exacta de Fisher. Para analizar el efecto del DHA sobre la expresión de moléculas CD69 ajustado por potenciales confusores, se utilizó la prueba de ANOVA para mediciones repetidas.

## **6.12 FINANCIAMIENTO**

Este trabajo fue financiado por el Fondo para el Fomento para la Investigación en salud, No FIS/IMSS/PROT/MD09/727 del IMSS.

## 7. RESULTADOS

Se analizaron 29 neonatos quienes tuvieron mediciones de la molécula CD69 en linfocitos CD4, de los cuales 16 recibieron DHA y 13 recibieron aceite de girasol en el grupo control.

### *7.1 Variables demográficas de neonatos sometidos a cirugía.*

Las características de los neonatos al nacimiento, al ingreso del estudio en términos de edad, estado nutricional y el tipo de cirugía fueron similares entre los grupos (cuadro 1).

**Cuadro 1. Variables demográficas de neonatos sometidos a cirugía.**

	GRUPO		Valor P
	DHA n = 16	CONTROL n = 13	
Al nacer			
Edad gestacional, semanas <sup>π</sup>	38.5 ± 2.1	37.5 ± 1.8	0.178 <sup>‡</sup>
Género			
Masculino: femenino	10 (62.5%)	5 (38.5%)	0.272 <sup>†</sup>
Femenino	6 (37.5%)	8 (61.5%)	
Apgar			
Minuto 5, < 8	0	1 (9.1%)	0.440 <sup>†</sup>
≥ 8	14(100%)	10 (90.9%)	
Al ingreso del estudio			
Edad postnatal, días <sup>π</sup>	20.4 ± 10.1	17.3 ± 12.5	0.462 <sup>‡</sup>
Peso, g <sup>π</sup>	2 849 ± 546	2 959 ± 521	0.601 <sup>‡</sup>
Longitud, cm <sup>π</sup>	49.6 ± 3.1	49.5 ± 1.9	0.934 <sup>‡</sup>
Perímetro cefálico, cm <sup>π</sup>	33.7 ± 1.1	33.5 ± 1.1	0.864 <sup>‡</sup>
Tipo de cirugía			
Fístula sistémico pulmonar	7 (43.8%)	8 (61.5%)	0.462 <sup>†</sup>
Coartectomía	9 (56.2%)	5 (38.5%)	

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 Exacta de Fisher.

### 7.2 Moléculas CD69 en linfocitos CD4 positivos.

Las moléculas CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> se obtuvieron de células que fueron positivas a estas dos condiciones: que expresaran la molécula co-estimuladora CD69 y en linfocitos CD4 de 10,000 células (ó eventos) por citometría de flujo; este resultado se reporta como porcentaje de células CD69 CD4 positivas.

Los grupos fueron comparables en la medición basal; sin embargo, a las 24 h, el grupo DHA tendió a mostrar menor porcentaje de células positivas comparado con el grupo control, pero esta diferencia no alcanzó la significancia estadística (cuadro 2). A los 7 días postcirugía, el porcentaje de células CD69 CD4 positivas fue similar entre los grupos.

**Cuadro 2. Moléculas CD69 en linfocitos CD4 positivos**

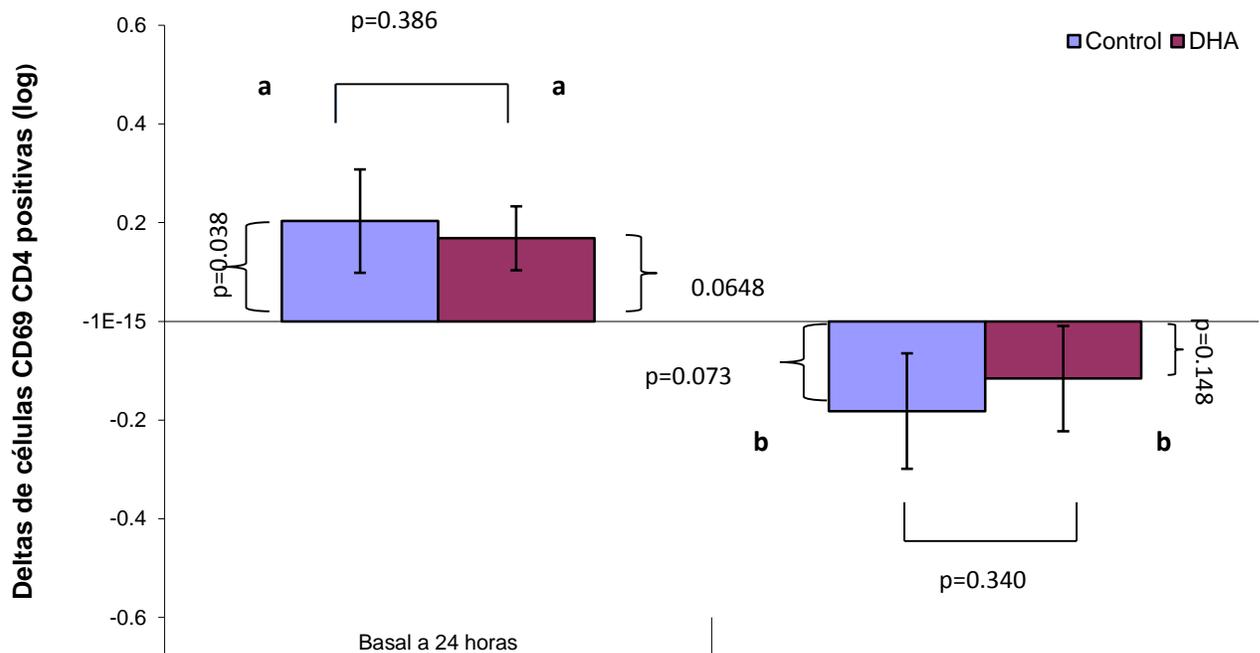
Tiempo	GRUPO		Valor
	DHA <sup>†</sup> n = 16	CONTROL <sup>†</sup> n = 13	P <sup>‡</sup>
Basal	1.49 ± 2.25	1.88 ± 2.86	0.507
24 h	2.19 ± 2.08	3.0 ± 2.45	0.155
7 días	1.74 ± 3.66	1.97 ± 3.53	0.401

Los datos son porcentaje de células positivas a la citocina de 10,000 células. Promedio ± desviación estándar

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

7.3 Deltas en células CD69 de linfocitos CD4 entre el tiempo basal y 24 h postcirugía y entre 24 h a 7 días postcirugía.

Ambos grupos incrementaron significativamente la expresión de CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> entre el basal y las 24 h ( $p < 0.05$ ). Entre la medición de 24 h postcirugía y 7 días postcirugía, también se observó que ambos grupos disminuyeron su expresión de CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, pero el grupo control mostró una disminución que tendió a ser significativa ( $p = 0.073$ ), mientras que el grupo DHA no mostró dicha tendencia ( $p = 0.148$ ) (figura 1). Los cambios no fueron diferentes entre los grupos.



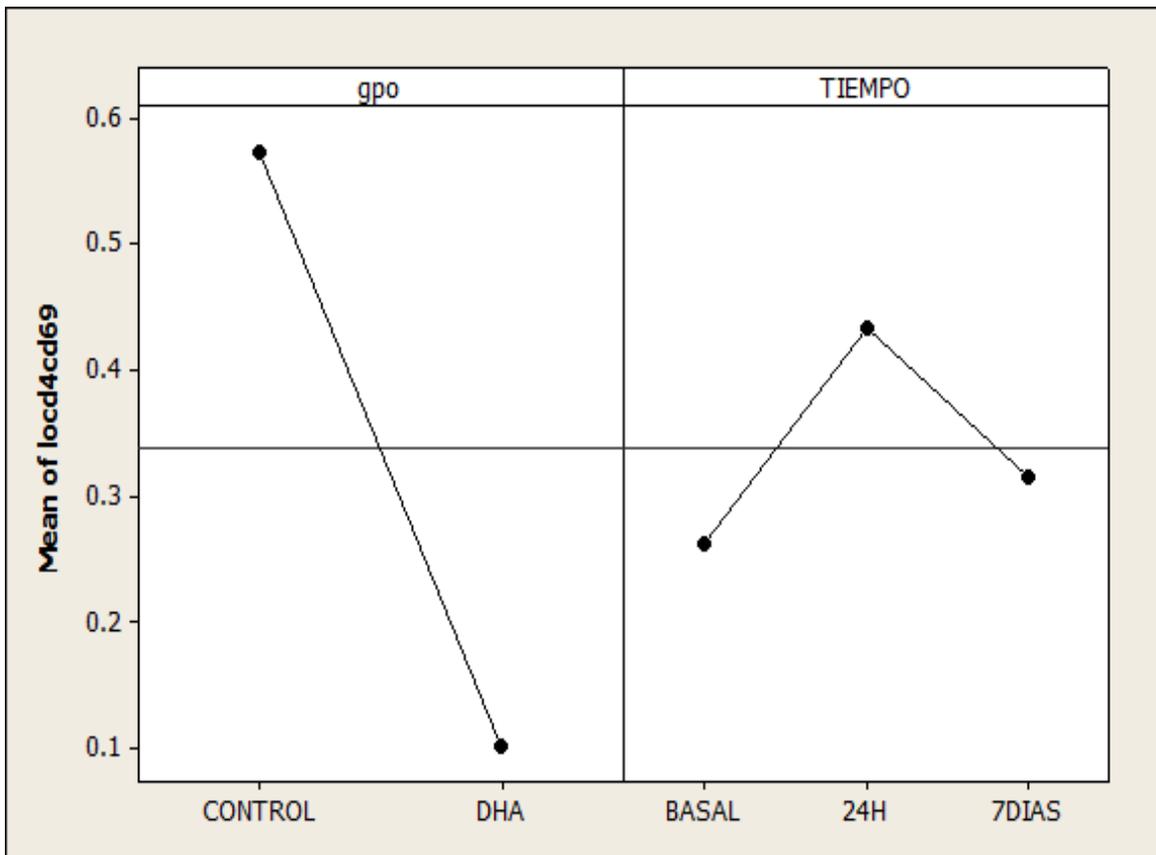
**Figura 1.** Cambios del porcentaje de células CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> entre el basal y las 24 h post-cirugía y entre las 24 h postcirugía y el día 7 postcirugía. Las deltas intra-grupo se compararon con t pareada y su significancia se muestra con superíndice **a** para  $p < 0.05$  y **b** para  $p = 0.073$

El análisis multivariado con ANOVA para mediciones repetidas mostró que el grupo DHA tuvo 5.33% menos expresión de CD69+ en linfocitos CD4+ comparado con el grupo control, después de ajustar por el uso de esteroides, consumo de leche humana durante la intervención y si presentaron sepsis ( $p$  ajustado =0.0107, Cuadro 3). También se evaluó la posible interacción entre grupo y tiempo, pero ésta no fue significativa.

**Cuadro 3 y figura 1. Análisis de mediciones repetidas de células CD69 en linfocitos CD4 ajustado por confusores**

Termino	Coefficiente	SE Coeficiente	T	Valor de P
Constante	-2.216	2.280	-0.97	0.334
Uso de antiinflamatorio esteroideo	3.784	1.169	3.24	<b>0.002</b>
Consumo de leche humana, Kcal/kg/día	-0.2667	0.4466	-0.60	0.552
Presencia de sepsis	0.284	1.338	0.21	0.833
Grupo control*	2.665	1.134	2.35	<b>0.021</b>
*Comparado con grupo DHA				R <sup>2</sup> = 24.17%
Grupo DHA	<b>-5.330</b>	2.268	-2.350	<b>0.011</b>

Figura 1.



*7.4. Asociación de la expresión de células CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y el número de complicaciones en neonatos sometidos a cirugía.*

El número de complicaciones en el grupo DHA fue de 3 en dos pacientes, mientras que el grupo control desarrolló 14 eventos en 8 pacientes ( $p= 0.002$ ).

La expresión de células CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> se asoció positivamente con el número de complicaciones (cuadro 4).

**Cuadro 4. Correlación de la expresión de CD69+ CD4+ con el número de complicaciones**

Correlations			Número de complicaciones	CD69+CD4 24h postcirugía
Spearman's rho	Número de complicaciones	Correlation Coefficient	1.000	.303
		Sig. (1-tailed)		.058
		N	28	28
	CD69+CD4 24h postcirugía	Correlation Coefficient	.303	1.000
		Sig. (1-tailed)	.058	
		N	28	28

*7.5. Covariables en neonatos sometidos a cirugía.*

Los grupos fueron similares en el uso y duración de antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, antibióticos, en la gravedad antes de la cirugía medido por la escala SNAP-II, en la ingestión de leche humana durante la intervención con DHA y durante el seguimiento durante su estancia en UCIN, en la edad gestacional corregida al momento de la cirugía, en el tiempo de pinzamiento aórtico en los pacientes sometidos a plastía aórtica, en el volumen de sangrado y duración de la cirugía, y tampoco hubo diferencias en el porcentaje de ácidos grasos tisulares que podrían modificar la respuesta inflamatoria (cuadro 5). Por lo anterior, no se espera que estos factores modifiquen la expresión del porcentaje de células CD69+ CD4+.

**Cuadro 5. Covariables en neonatos sometidos a cirugía**

	<b>GRUPO</b>		<b>Valor P</b>
	<b>DHA n = 16</b>	<b>CONTROL n = 13</b>	
<b>Uso de antiinflamatorios</b>			
a) Esteroides	5 (33.3)	4 (38.8)	1.000 <sup>†</sup>
Duración, días <sup>¶</sup>	1 [1, 2]	1 [1,10]	0.737 <sup>§</sup>
b) No esteroides	15 (100)	10 (83.3)	0.188 <sup>†</sup>
Duración, días <sup>¶¶</sup>	4 [1, 13]	6.5 [1, 29]	0.521 <sup>§</sup>
Uso de antibióticos	15 (100)	13 (100)	1.000 <sup>†</sup>
Duración, en días <sup>¶</sup>	2 [1, 19]	2 [1, 34]	0.348 <sup>§</sup>
<b>Ingestión de leche humana, kcal/kg/d</b>			
Durante intervención <sup>¶</sup>	9.2 [0, 36.4]	2.7 [0, 37.6]	0.250 <sup>§</sup>
Durante seguimiento <sup>¶</sup>	12.1 [0, 32]	5.9 [0, 18.3]	0.301 <sup>§</sup>
Edad gestacional corregida, semanas <sup>¶¶</sup>	40.9 [36.6, 47]	40.7 [34.7, 45.5]	0.614 <sup>§</sup>
Gravedad pre-cirugía (SNAP II) <sup>¶</sup>	5 [0, 20]	5 [0, 16]	0.418 <sup>§</sup>
Pinzamiento aórtico, min <sup>¶¶</sup>	20 [5, 35]	25 [2, 38]	0.567 <sup>§</sup>
Duración de cirugía, min <sup>¶¶</sup>	115 [45, 180]	132.5 [30,1 80]	0.303 <sup>§</sup>

Frecuencia (%)

<sup>†</sup> Prueba Exacta de Fisher<sup>¶</sup> Promedio ± desviación estándar<sup>‡</sup> t de Student<sup>¶¶</sup> Mediana [mínimo, máximo]<sup>§</sup> Prueba de U-Mann-Whitney

	GRUPO		Valor P
	DHA n = 16	CONTROL n = 13	
Ácidos grasos totales al ingreso, % de ácidos grasos totales			
Oleico (OO, 18:1, n-9)	20.9 [2, 31.4]	24.8 [20.4, 26.6]	0.306 <sup>§</sup>
Linoléico (LA, 18:2 n-6)	9.1 [5.5, 11.8]	9.1 [6.4, 11.9]	0.817 <sup>§</sup>
α- Linolénico (LNA, 18:3 n-3)	0.63 [0.23, 1.26]	0.62 [0.19, 1.42]	0.665 <sup>§</sup>
Araquidónico (AA, 20:4 n-6)	10.88 [0.41, 19.68]	15.59 [4.81, 20.68]	0.453 <sup>§</sup>
Eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3)	0.51 [0.15, 1.55]	0.38 [0.24, 1.41]	0.795 <sup>§</sup>
Docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3)	3.08 [1.23, 1.52]	4.43 [1.05, 7]	0.817 <sup>§</sup>
EPA + DHA	3.66 [1.94, 8.75]	4.78 [2.15, 7.28]	0.729 <sup>§</sup>
Ac. Grasos n-3 (LNA+EPA+DHA)	4.78 [2.81, 9.34]	5.24 [2.52, 7.66]	0.817 <sup>§</sup>
Ac. Grasos n-6 (LA + AA)	20.03 [12.22, 28.2]	25.69 [12.01, 29.17]	0.326 <sup>§</sup>
AA/DHA	3.1 ± 1.4	3.6 ± 1.3	0.252 <sup>§</sup>

Frecuencia (%)

† Prueba Exacta de Fisher

‡ Promedio ± desviación estándar

‡ t de Student

¶ Mediana [mínimo, máximo]

§ Prueba de U-Mann-Whitney

### 7.6 Identificación de eventos adversos

No hubo diferencias en el volumen de sangrado durante la cirugía y tampoco en los eventos de sangrado gástrico durante su estancia en UCIN (cuadro 6).

**Cuadro 6. Eventos adversos**

	GRUPO		Valor P
	DHA n = 16	CONTROL n = 13	
Sangrado quirúrgico, mL <sup>†</sup>	10 [0.1, 100]	12.5 [0.1, 50]	0.620 <sup>s</sup>
Eventos de sangrado	0	2(15.4)	0.192 <sup>†</sup>

<sup>†</sup> Prueba Exacta de Fisher

También se analizaron otros confusores como acidosis metabólica precirugía y saturación de oxígeno pre y postcirugía. En relación a la acidosis metabólica, se presentó en un paciente del grupo control (8.3%) y cero pacientes en el grupo DHA previo a la cirugía, por lo que no fue significativo ( $P=0.429$ ). El promedio de la saturación de oxígeno precirugía en el grupo control fue de  $74\% \pm 19.1$ , mientras que el grupo DHA tuvo  $86.8\% \pm 9.1$ , ( $P=0.041$ ) y 24 horas posterior a la cirugía fue similar en ambos grupos. Debido a que sólo la saturación de oxígeno precirugía fue diferente entre grupos, se incluyó en un modelo multivariado para evaluar su efecto en el desarrollo de complicaciones, pero no fue significativo ( $\beta= -0.027$ ,  $P=0.222$ ).

## 8. DISCUSIÓN.

Este estudio es novedoso, ya que a nuestro conocimiento, es el primer trabajo que reporta el comportamiento de la expresión de células CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en neonatos sometidos a cirugía. Los estudios en modelos animales han reportado que las células CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> son un marcador temprano de activación celular<sup>46,47</sup>.

Por tanto, el incremento significativo de la expresión de células CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> a las 24 horas, es consistente con la mayor respuesta inflamatoria en los pacientes operados y también es consistente con estudios como el de Shimaoka en 14 adultos operados por carcinoma esofágico y por cirugía cardiovascular<sup>2</sup> así como con el estudio de Kenneth en 22 pacientes (edad de 6.1 a 21.2) quienes recibieron un trasplante de corazón<sup>16</sup>. Sin embargo, en ambos estudios se requirió la estimulación *in vitro* con un mitógeno para identificar la expresión de células CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, mientras que los resultados del presente trabajo muestran la expresión de dicha molécula sin estimulación con mitógeno, lo que representa la respuesta del neonato al trauma quirúrgico. Esto sugiere que el neonato podría estar presentando una mayor activación celular temprana y que podría estar en mayor riesgo de presentar una respuesta inflamatoria exacerbada, secundaria a una cirugía mayor.

Los niños que recibieron el DHA en forma peri-operatoria tuvieron una expresión de células CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> que tendió a ser menor comparado con el grupo control. Aunque esta diferencia no alcanzó la significancia estadística, probablemente fue debido al limitado tamaño de muestra y a la alta variabilidad de los datos de expresión celular. No obstante, lo anterior sugiere que estos pacientes podrían

tener una activación celular menos exacerbada a las 24 h postcirugía comparados con el grupo control. En el mismo sentido, aunque ambos grupos aumentaron su expresión de células CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> del tiempo basal a las 24 h postcirugía, y disminuyeron de las 24 h a los 7 días postcirugía, se observó que la magnitud del cambio en promedio tendió a ser mayor en el grupo control comparado con el grupo DHA.

Es difícil comparar el efecto del DHA sobre la expresión de CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> con otros estudios de la literatura, debido a sólo se ha evaluado en adultos sanos quienes recibieron una dosis de 4.91 g/día de DHA más 0.85 g de EPA/día durante 4 semanas y cuyas células mononucleares se estimularon *ex vivo* con concanavalina A, mostrando una expresión dosis respuesta a la concentración del mitógeno, pero con una reducción de la expresión con relación a la basal cuando se expuso al DHA en el cultivo celular<sup>26</sup>.

Dado que la mayor expresión de CD69 se relaciona a estados de mayor respuesta inflamatoria <sup>49</sup> el efecto del DHA fue consistente con la menor respuesta inflamatoria determinada por un menor porcentaje de citocinas inflamatorias intracelulares IL-1 $\beta$  e IL-6 en estos mismos pacientes<sup>48</sup> y también con la menor concentración de citocinas inflamatorias plasmáticas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 del estudio de Larsen y cols., en neonatos sometidos a cirugía a corazón abierto, que recibieron ácidos grasos omega (EPA y DHA) por vía parenteral<sup>33</sup>.

Es bien conocido que los pacientes que presentan una respuesta inflamatoria exacerbada desarrollan un mayor número de complicaciones en el periodo postquirúrgico<sup>50,51</sup>.

En el presente estudio se encontró que a mayor expresión de células CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> hubo mayor número de complicaciones (en términos de eventos de sepsis y de fallas orgánicas) en neonatos sometidos a cirugía. La relación de esta molécula co-estimuladora con eventos clínicos adversos sólo se ha evaluado en niños que recibieron un trasplante de corazón, encontrando que a mayor expresión de células CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> hubo un mayor rechazo del trasplante, medido con biopsias calificadas con una escala de daño histológico<sup>16</sup>. Interesantemente, en este estudio se propuso al porcentaje de células CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> medidas por citometría de flujo como un marcador pronóstico temprano de rechazo del trasplante. Por lo que en este estudio, dicha expresión también podría comportarse como marcador pronóstico temprano de complicaciones en neonatos sometidos a cirugía.

El menor número de complicaciones en los niños que recibieron DHA también fue consistente con un meta-análisis en adultos que recibieron EPA más DHA por vía parenteral y quienes desarrollaron menos infecciones y menos estancia hospitalaria<sup>30,52</sup>.

Estudios *in vitro* han propuesto que el mecanismo de acción para que el DHA reduzca la activación temprana de células T, puede ser mediante la incorporación de éste a los fosfolípidos de las membranas celulares en regiones que participan en la cascada de señalización (en inglés "lipid raft" o microdominio), las cuales típicamente contienen ácidos grasos saturados que le confieren rigidez a la membrana. Los microdominios son regiones de membranas que parecen actuar como plataformas blanco (o "target") para co-localizar proteínas involucradas en sitios de acoplamiento para el inicio de las vías de señalización intracelular.

Existen proteínas clave que se encuentran ancladas al microdominio lipídico interno de las células T y que son desplazadas cuando las células son tratadas DHA y que también pueden evitar el acoplamiento celular<sup>48</sup> además, el DHA bloquea la producción intracelular de segundos mensajeros incluyendo el diacilglicerol y ceramida, lo anterior daña la capacidad de estas células para responder a estímulos activadores y reduce la respuesta inflamatoria<sup>25</sup>.

Interesantemente los microdominios pueden estar implicados en la regulación y activación de los complejos de señalización de los TLR. El DHA puede modular los receptores "Toll like receptor" (TLRs) y la consecuente respuesta inmune e inflamatoria debido a que actúa como pan-inhibidor de varios TLRs y Nod-like receptors (NLRs), suprimiendo la transducción de la señal relacionada con el factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), evitando su traslocación al núcleo para activar la producción de citocinas inflamatorias, y por tanto disparar la respuesta inflamatoria secundaria a trauma quirúrgico. Por otro lado, el DHA es un ligando natural de (Receptor activado del proliferador del peroxisoma) PPAR alfa, el cual inhibe la separación de NF $\kappa$ B de su inhibidor (I $\kappa$ B)<sup>22</sup>.

Estos datos proveen la relación atribuible entre DHA, el NF $\kappa$ B y la respuesta inmune<sup>25</sup>.

Se utilizó la escala de Score for Neonatal Acute Physiology, versión II (SNAPII) para medir la escala de gravedad de la enfermedad al ingreso del estudio; aunque existen otros métodos en pacientes con cardiopatías congénitas como el RACHS-1 (Risk Adjustment in Congenital Heart Surgery)<sup>53</sup> y Aristóteles,<sup>54</sup> en el caso de el RACHS-1 sirve para comparar el riesgo de muerte de pacientes en diferentes

instituciones, mientras que la de Aristóteles está encaminada a definir la complejidad de la malformación congénita y los riesgos de cada paciente, pero ninguna de las dos aporta una puntuación de la gravedad de la enfermedad como lo hace la escala de SNAP II.<sup>55</sup>

Por otro lado, cuando se analizó la acidosis metabólica previo a la cirugía de acuerdo a los criterios de Goldstein<sup>37</sup> y no encontramos diferencias entre los grupos. Aunque hubo diferencias entre grupos en la saturación de oxígeno precirugía, el modelo multivariado mostró que su efecto no fue significativo sobre el desarrollo de complicaciones.

## 9. CONCLUSIONES

La expresión de CD69+CD4+ como marcador temprano de activación celular aumenta en neonatos después de una cirugía mayor.

La administración enteral de ácido docosahexaenoico en el peri-operatorio disminuyó la expresión de CD69+CD4+ en neonatos después de ajustar su efecto por variables confusoras.

Los datos sugieren que la menor expresión en CD69 se relacionó a menor número de complicaciones en los neonatos sometidos a cirugía.

## 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 y una forma de evaluar la asociación con complicaciones en los pacientes operados en con la medición de la expresión de células CD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>.

Es importante continuar con investigaciones para evaluar que posibles implicaciones pueden existir ante los limitados estudios en neonatos, es necesario estudiar la respuesta de CD69 al trauma quirúrgico y si este tiene una traducción clínica debido a que las funciones no se conocen en su totalidad aún en modelos animales.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. Shimaoka M, Hosotsubo K, Sugimoto M, Sakaue G, Taenaka N, Yoshiya I, Kiyonno H. The Influence of Surgical Stress on T Cells: Enhancement of Early Phase lymphocyte Activation. *Anesth Analg* 1998; 87:1431-1435.
3. Calder PC. Immunonutrition in surgical and critically ill patients. *British Journal Of Nutrition* 2007;98:S133-139.
4. Hensler T, Hecker H, Heeg K, et al., Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery, *Infect. Immun* 1997;65:2283–2291.
5. Bone RC, Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we know and do not know about cytokine regulation, *Crit. Care Med* 1996;24:163–172.
6. Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H., et al., Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection, *Am. J. Surg* 1999;178: 288–292.
7. Calder PC. n-3 fatty acids, inflammation, and immunity--relevance to postsurgical and critically ill patients. *Lipids* 2004;39:1147-1161.
8. Marik PE, Flemmer M. The immune response to surgery and trauma:Implications for treatment. *J Trauma cute Care Surg* 2012 Oct;73:801-808.

9. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytocne cascade in sepsis *Scand J Infect Dis* 2003;35:535-544.
10. Vazquez BN, Laguna T, Notario L, Lauzurica P Evidence for an intronic cis-regulatory element within CD69 gene. *Genes Immun* 2012;13:356-62
11. Rutella S, Rumi C, Barberi LT, Puggioni PL, Lai M, Romano A. Induction of CD69 Antigen on Normal CD41 and CD81 Lymphocyte Subsets and Its Relationship With the Phenotype of Responding T-Cells. *Cellular Immunology* 2002;220:20-29.
12. Santi GA, Lopez-Cabrera M, Sanchez-Madrid F. Expression of the early lymphocyte activation antigen CD69, a C-type lectin, is regulated by mRNA degradation associated with AU-rich sequence motifs *European journal of immunology*. *Eur J. Immuno* 1995.25:2142-2346
13. Martin P, Sánchez Madrid F. CD69: An Unexpected Regulator of TH17 Cell–Driven Inflammatory Responses. *Science Signaling* 2011;4:1-3.
14. Wang X, Xu H, Alvarez X, Pahar B, Moroney-Rasmussen T, Lackner AA, Veazey RS. Distinct expression patterns of CD69 in mucosal and systemic lymphoid tissues in primary SIV infection of rhesus macaques. *PLoS One* 2011;6:1-10.
15. Feng Ch, Woodside KJ, Vance BAm El-Khoury D, canelles M, Lee J, Gress R. A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *International Immunology* 2002;14:535-544.

16. Schowengerdt K, Fricker FJ, Bahjat K. Increased expression of the lymphocyte early activation marker CD69 in peripheral blood correlates with histologic evidence of cardiac allograft rejection. *Transplantation* 2000;60:2102-2017..
17. De Caterina R. n-3 fatty acids in cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2011; 364: 2439-2450.
18. 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
19. . Riediger ND, Othman RA, Suh M, Moghadasian H. A systemic Review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J Am Diet Assoc* 2009;109:668-679
20. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists iin an old tale. *Biochimie* 2009;91:791-795
21. Linder M. Nutrition and metabolism of fast En: Linder M, ed. *Nutritional biochemistry and metabolism*. 2<sup>nd</sup> edition. New York: Elsevier Science Publishing Company 1991:52-85
- 22 . Singer P, Shapiro H, Theila M, Anbar R, Singer J, Cohen J. Anti-inflammatory properties of omega 3- fatty acids in critical illness: novel mechanism and an integrative perspective. *Intensive Care Med* 2008;34:1580-1592
23. Waitzberg DL, Torrinhas RS. Fish oil emulsions and immune response: what clinicians need to know. *Nutr Clin Pract* 2009;24: 487-499.

24. Drew RB Salameh M, Carraway K. n-3 PUFA improves fatty acid composition, prevents palmitate-induced apoptosis, and differentially modifies B cell cytokine secretion in vitro and ex vivo. *J Lipid Re* 2010;51:1284-97.
25. Chapkin RS, Kim W, Lupton JR. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: Emerging mediators of inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009;81:187-191
26. Kew S, D Mesa M, Tricon S, Buckley R. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2004;79:674-681.
27. Wachtler P, König W, Senkal M, Kern M, Soller M. Influence of 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
28. 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.
29. López-Alarcón M, Bernabe-García M, del Valle O, González-Moreno G, Martínez-Basilea A, Villegas R. Oral administration of docosahexaenoic acid attenuates interleukin-1 $\beta$  response and clinical course of septic neonates. *Nutrition* 2012;28:384-390.
30. Bernabe-García M. Efecto de la administración de ácido docosahexaenóico sobre la respuesta inflamatoria y la evolución clínica de neonatos sometidos a

cirugía cardiovascular. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 2011

31. 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 Nutr 2010;34:387-394

32. 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.

33. Larsen BM, Goonewardene LA, Joffe AR, Van Aerde JE, Field CJ, Olstad DL, Clandinnin MT. Pre-treatment with an intravenous lipid emulsion containing fish oil (eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid) decrease inflammatory markers after open-heart surgery in infants: A randomized, controlled trial. Clinical Nutrition 2012;31:322-329.

34. 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

35. Growth charts of National Center of Health Promotion, Published on may 30, 2000. Head circumference for age, length for age and weight for age. <http://cdc.gov./growthcharts>.

36. Marks KH, Maisels JM, Moore E, Gifford K, Friedman Z. Growth in sick premature infants-a longitudinal study. J Pediatr 1979;94:282-285

37. 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.
38. Sierra S, Lara-Villoslada F, Comada M, Olivares M, Xaus J. Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid equally incorporate as decosahexaenoic acid but differ in inflammatory effects. *Nutrition* 2008;24:245-254
39. Diccionario de la Lengua Española. 2001. Vigésima segunda edición.
40. Norma oficial Mexicana, NOM-007-SSA2-1993, Atención a la mujer durante el embarazo, parto y puerperio a recién nacidos. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio.
41. Flores-Huerta S, Villalpando S, Fajardo-Gutiérrez A. Evaluación antropométrica del estado de nutrición de los niños. Procedimientos, estandarización y significado. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1990;7:725-735
42. Evershed RP. Gas chromatography of lipids. En: Halmiton RJ, Hamilton S, eds. *Lipid analysis. A practical approach*. Oxford, NY USA:Oxford University Press;1992
43. 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.
44. 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

45. Lien EL. Toxicology and safety of DHA. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2009;81:125-132.
46. Alari-Pahissa E, Vega-Ramos J, Zhang JG, Castaño AR, Turley SJ, Villadangos JA, Lauzurica P. Differential effect of CD69 targetting on bystander and antigen-specific T cell proliferation. *J Leukoc Biol* 2012;92:145-157.
47. Martín P, Gómez M, Lamana A, Cruz-Adalia A, Ramírez-Huesca M, Ursa MA, Yañez-Mo M, Sánchez-Madrid F. CD69 Association with Jak3/Stat5 Proteins Regulates Th17 Cell Differentiation. *Mol Cell Biol* 2010.30:4877-4888.
48. Calder PC. The relationship between the fatty acid composition of immune cell and their function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;79:101-108
49. Matsushima A, Ogura H, Fujita K, Koh T, Tanaka H, Sumi Y, Yoshiya K, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H. Early activation of gammadelta T lymphocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *Shock* 2004;22:11-15.
50. 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.
51. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006;83 suppl: 1505S-1519S. Calder PC. Immunonutrition in surgical and critically ill patients. *British Journal Of Nutrition*. 2007;98:S133-139

52. Bernabe-García M, Lopez-Alarcón M, Blanco-Favela F, Mancilla-Ramírez J, Mansilla-Olivares A, Arrendondo García JL. Beneficial effects of the n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in surgical patients: Updating the evidence. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011;85:261-266.
53. Calderón-Colmenero J, Ramírez-Marroquín, S, Cervantes Salazar J. Métodos de estratificación de riesgo en la cirugía de cardiopatía congénitas. *Medigraphic*. Marzo 2008;78:60-67.
54. Kang N, Cole T, Tsang V, Elliot M, De Leval M. Does the Aristotle score predict outcome in congenital heart surgery? *Eur J Cardiothorac surg* 2006; 29:986-988.
55. Nichols, DG.2008. *Rogers' Textbook of Pediatric Intensive Care*. Capítulo 9. Severity-of-Illness Scoring System. 4a ed. Baltimore, Maryland, Lippincott Williams & Wilkins.Pag. 106-113.

## 12. ANEXOS

Anexo 1. Certificado de análisis del contenido de nutrientes del suplemento alimenticio que contiene el DHA (Neuromins)



# Martek

Martek Biochemicals Corporation

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**  
**NEUROMINS<sup>®</sup> Capsules**  
 Lot Number **4802002272A**

**Physical Description**

Appearance: 500 mg translucent capsules containing 214ASCO<sup>®</sup> grade-Bone DED mg DHA  
 Antioxidants: 0.015% ascorbyl palmitate, 0.015% tocopherols

Chemical Analysis	Units	Results
Docosahexaenoic Acid	mg/capsule	297.9
Eicosapentaenoic Acid	mg/capsule	411.1
Capsule Fill Weight	mg	525.5
Peroxide Value	mEq/kg	0.65
Fatty Acid Profile	Units	Results
6:0	%	< 0.1
8:0	%	0.52
10:0	%	1.04
12:0	%	4.30
14:0	%	14.00
14:1	%	7.11
16:0	%	12.20
16:1	%	1.02
18:0	%	< 0.1
18:1n-7	%	0.66
18:1n-9	%	18.94
18:2n-7	%	< 0.1
18:2n-6	%	1.29
18:3n-3	%	< 0.1
20:0	%	0.11
20:1n-9	%	< 0.1
20:2n-3	%	< 0.1
22:0	%	0.17
22:1n-1	%	0.29
22:1n-3	%	24.26
24:0	%	< 0.1
Others	%	0.87

Analysis Completed By: Central Analytical Laboratories

Analytical Review By: *[Signature]*

Released By: *[Signature]*

Date: 03/17/04

Lot: 08-01/2004

1000 Harding Drive, Lower  
 Wheeling, West Virginia 26061

(304) 746-0000  
 Fax: (304) 746-0004  
 www.martekbiochemicals.com

Anexo 2. Carta de consentimiento informado



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

Carta de consentimiento informado para participar en el proyecto: “Efecto modulador de la administración del ácido docosahexaenoico sobre la respuesta inflamatoria, la evolución clínica y el estado nutricional de neonatos sometidos a cirugía”

Señores Padres de Familia:

Solicitamos su permiso para incluir a su hijo en un proyecto de investigación médica.

**Beneficios.** El objetivo de esta investigación es saber si administrando un nutrimento a su niño cuando va a someterse a una cirugía mayor, este nutrimento disminuye la inflamación, tiene una evolución clínica menos grave, protege contra la desnutrición y se recupera más pronto. Este nutrimento se encuentra normalmente en la leche materna, por lo cual si lo recibe y no lo beneficia, no se espera que le cause daño a su niño. Además, se ha reportado en adultos que este nutrimento puede servir como anti-inflamatorio cuando que se someten a cirugías y los ayuda a tener menores complicaciones con una recuperación más rápida.

**Riesgos.** Para llevar a cabo esta investigación es necesario administrar a su niño el nutrimento en forma de aceite por vía oral. Para realizar las mediciones, tomaremos una muestra de 2 mL de sangre un día antes de la cirugía, y sólo 1 mL a las 24 h post-cirugía, y los días 3 y 7 post-cirugía (no más de 4 muestras), procurando que se tome cuando se requiera sangre para otros estudios de rutina. Si no es posible, se le picará nuevamente; lo anterior le puede ocasionar “moretes” en el sitio del piquete. 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.

Si usted está de acuerdo en que su niño participe en el proyecto, por favor firme esta forma. Si no está de acuerdo 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. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital de Pediatría, IMSS. Nos comprometemos a manejar sus datos en forma confidencial y a responder cualquier pregunta acerca del proyecto con la responsable M en C. Mariela Bernabe García al Tel. 56 27 69 00 Exts. 22483 y 22484 de la Unidad de Investigación

en Nutrición en el 4° piso del Hospital de Pediatría. Agradecemos su participación y contribución en el mejoramiento del manejo de los niños enfermos.

M en C. Mariela Bernabe García. Matrícula 11111852

Responsable del proyecto

ACEPTO PARTICIPAR

SI

NO

Fecha: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nombre de la madre/padre/tutor:

Firma:

Nombre del testigo 1:

Firma:

Nombre del testigo 2:

Firma:

Nombre del médico tratante:

Firma:

### Anexo 3. Obtención de eritrocitos

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

#### Anexo 4. Separación de lípidos y determinación del perfil de ácidos grasos

1. 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.
2. 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 ó Heptadecanoic acid) como estándar interno, la cual se prepara con 1.33 mg de C17/mL de hexano.
3. 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).
4. 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.
5. La fase orgánica se evapora con nitrógeno y se agrega 1 mL de hexano.
6. 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, USA) utilizando una columna (100-m x 0.2 mm inside diameter fused silica column coated with 0.2 µm CP Sil 88, Chrompack, The Netherlands).

7. Los ácidos grasos se calcularon utilizando estándares para cada uno y se expresaron como porcentaje de peso (%/total weight) de los ácidos grasos con cadenas de carbono con longitud de 14 a 24 átomos.

## Anexo 5. 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	



N° de incubadora     Grupo   N° 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

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, operación, enterocolitis, íleo, reflujo gastro-esofágico, hemorragia cerebral y mortalidad.

1.

2.

3.

4.

5.

6.

7.

8.

9.

10.

11.

12.

## VIII. Estado nutricional al ingreso del estudio

Día	Fecha	Peso	Longitud	Perímetro cefálico (cm)
N°	dd/mm/aa	(g)	(cm)	(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						
24 h post-cirugía						
7 días post-cirugía						

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? \_\_\_\_\_
9. Continúe sólo si la madre produce leche y la consume el neonato \_\_\_\_\_
10. ¿Consume pescado? \_\_\_\_\_ (si la resp. es NO pase a la pregunta 12)
11. Cuanto? \_\_\_\_\_
12. Cada cuando? \_\_\_\_\_
13. Toma suplemento (s) que contengan omega 3 como pharmathon matruelle, MOM, etc?  
 \_\_\_\_\_
14. Marca \_\_\_\_\_
15. Cuanto consume? \_\_\_\_\_
16. 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