



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SXXI
U.M.A.E. HOSPITAL DE PEDIATRÍA**

**“Efecto del ácido docosahexaenóico sobre las
concentraciones de citocinas de neonatos con sepsis.”**

T E S I S

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:
ESPECIALISTA EN PEDIATRIA MÉDICA**

PRESENTA:

Dra. Francisca Olivia Del Valle Martínez

TUTOR:

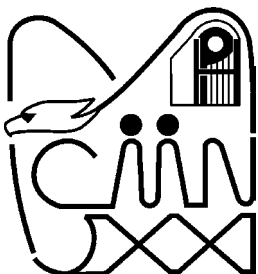
M. en C. Mariela Bernabe García

CO -TUTOR:

Dra. Mardia López Alarcón

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

**Financiamiento otorgado por el Fondo para el Fomento de la
Investigación
IMSS - 2005/1FI/85**



MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

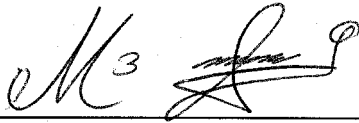


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

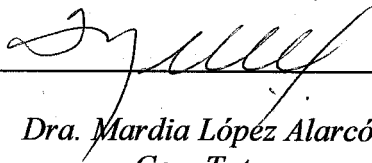
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.



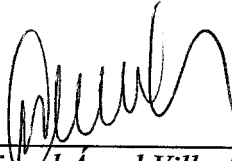
M. en C. Mariela Bernabe Garcia
Tutor

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

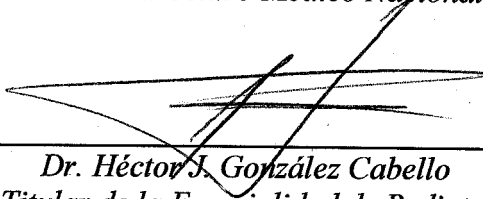


Dra. Mardia López Alarcón
Co - Tutor

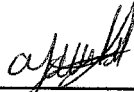
Unidad de Investigación Médica en Nutrición
Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI



Dr. Miguel Ángel Villasís Kever
Director de Educación e Investigación en Salud
Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI



Dr. Héctor J. González Cabello
Profesor Titular de la Especialidad de Pediatría Médica
Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI



Dra. Guadalupe Miranda Novales
Médico Infectólogo Pediatra y Sinodal
Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI



Dra. Héléadia J. García
Médico Neonatólogo Pediatra y Sinodal
Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI



Dra. Rocío Cárdenas Navarrete
Médico Pediatra y Sinodal
Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la M. en C. Mariela Bernabe García y la Dra. Mardia López Alarcón, en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición y la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Agradecimientos.

A Dios, por estar presente en cada segundo de mi vida, por darme la fortaleza para seguir siempre adelante.

A mi hijo, Miguel Ángel:

Gracias por ser mi inspiración y el mayor estímulo para realizar este trabajo. Cada minuto que hemos pasado lejos uno del otro esta reflejado en el TE AMO.

A mi esposo, Héctor:

Gracias por tu amor, comprensión, confianza y apoyo para salir siempre adelante, sobre todo en los momentos difíciles, por tu granito de arena que esta presente en este trabajo.

Mamá, Papá, Sol y Edgar:

Gracias por su amor, por estar a mi lado en cada paso que doy, por su apoyo, por enseñarme a luchar, a lograr mis objetivos y a tener siempre entusiasmo. Gracias porque por ustedes he llegado hasta donde me encuentro ahora.

Sra. Oly:

Gracias por su cariño y apoyo incondicional durante todo este tiempo, porque sin su ayuda no lo habría logrado.

A David, Jasiel, Jai y todos los pequeñitos que hicieron realidad este proyecto:

Gracias porque por los niños como ustedes, los médicos seguimos trabajando con esmero.

A la M. en C. Mariela Bernabe Garcia por su apoyo, confianza, tiempo, paciencia y dedicación, por el gran ejemplo de disciplina y perseverancia, pero sobre todo por su amistad.

A la Dra. Mardia López Alarcón, por el apoyo otorgado siempre, por sus conocimientos para enriquecer este trabajo y por darme la confianza de participar en él y salir adelante. Gracias por su amistad.

Al Dr. Raúl Villegas Silva por su apoyo durante todo este tiempo de trabajo y por enriquecerlo con sus conocimientos, por sus consejos y su amistad.

A mis amigos: Anita, Ara, Claus, Karen, Yaya, Alejandro, Aarón, Fidel, Marco y Pedro Miguel, por enseñarme el significado de la verdadera amistad, por su cariño y apoyo constante.

A Yola, Oti y Gabriel, así como a todas las personas que integran la Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Hospital de Pediatría, por su amistad, su cariño, sus consejos y su apoyo incondicional.

RESUMEN

“EFECTO DEL ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE CITOCINAS DE NEONATOS CON SEPSIS.”

Del Valle-Martínez Francisca Olivia¹, Bernabe-García Mariela², López-Alarcón Mardía², Villegas-Silva Raúl³, González-Moreno Gabriel². ¹Residente de cuarto año de Pediatría Médica, ²Unidad de Investigación Médica en Nutrición y ³Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Antecedentes. La sepsis es considerada como la primera causa de muerte entre la población neonatal; ésta se define como la respuesta inflamatoria sistémica que ocurre durante la infección, se caracteriza por elevación de citocinas inflamatorias como factor de necrosis tumoral (TNF) α , interleucina (IL) 1 β , IL-6 y eicosanoides, entre otras. Su elevación exagerada provoca falla orgánica y muerte. Las citocinas pueden ser reducidas con la administración de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (LC-PUFAS) omega 3 (n-3) como el docosahexaenoico (DHA). Los LC-PUFAS pueden generar una reducción de la respuesta inflamatoria mediante la producción de eicosanoides de menor potencia biológica. Esto podría acelerar la remisión de la infección, incidir en una menor gravedad de las infecciones e incluso una menor mortalidad. En un estudio realizado en lactantes en la Unidad de Investigación en Nutrición del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, quienes recibieron por primera vez la vacuna cuádruple, mostró que los niños que recibieron una fórmula suplementada con DHA tuvieron una producción de IL-1 β similar a los niños que se alimentaron con leche humana, pero los niños que recibieron una fórmula estándar presentaron mayores concentraciones de ésta. En otro estudio efectuado en la misma Unidad se observó que la administración de DHA protegió el estado nutricional al preservar las reservas de masa magra y aumentar significativamente la masa grasa, mientras que el grupo que recibió aceite de oliva (AO) presentó deterioro en ambas. En resumen la evidencia sugiere que los n-3 LC-PUFAS como el DHA modifican el tipo de eicosanoides y disminuyen las concentraciones de citocinas proinflamatorias favoreciendo una respuesta inflamatoria atenuada por lo que pueden favorecer la remisión de la infección.

Objetivo. Evaluar si el DHA administrado por vía enteral durante la sepsis disminuye las concentraciones plasmáticas de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en neonatos que reciban DHA comparadas con las concentraciones de los que reciban aceite de oliva.

Material y métodos. Se realizó un ensayo clínico controlado doble ciego en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición y en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Se captaron neonatos con sospecha de sepsis intrahospitalaria, quienes recibieron aleatoriamente 100 mg de DHA/día o 100 mg/día de aceite de oliva (AO) por vía enteral durante 14 días desde el día de diagnóstico. El efecto de estos se midió sobre las concentraciones plasmáticas de TNF- α , IL-1 β e IL-6 al diagnóstico de sepsis, al día 7 y al 14 de estudio. Para realizar las comparaciones de citocinas entre grupos se aplicó la prueba U de Mann-Whitney; para analizar las diferencias de citocinas entre el diagnóstico y día 7, y entre el diagnóstico y día 14, controlando por confusores potenciales se aplicó la prueba de ANOVA para mediciones repetidas.

Resultados. Completaron el estudio 63 neonatos, 29 recibieron DHA y 34 AO. Se observó que el patrón de disminución al día 7 y al día 14 en las concentraciones de TNF- α , IL-1 β e IL-6 fue similar en ambos grupos. Las concentraciones plasmáticas de TNF- α en el grupo DHA vs. el grupo AO fueron (mediana y rango) 14.42, 8.30 - 49.15 vs. 14.55, 10.68 - 31.24, ($p = 0.814$) al día 7; y de 12.56, 9.03 - 41.85 vs. 15.26, 10.23 - 34.35, ($p = 0.403$) al día 14. En el caso de IL-1 β los valores fueron 2.64, 0.85 - 10.07 vs. 2.49, 1.06 - 8.27, $p = 0.988$ al día 7; y de 2.77, 0.68 - 8.15 vs. 2.68, 0.64 - 10.36, $p = 0.438$ al día 14. Para IL-6, al día 7 las concentraciones fueron de 11.67, 3.17 - 84.08 vs. 17.08, 1.74 - 287.81, $p = 0.282$; y 13.89, 2.87 - 304.51 vs. 9.19, 1.14 - 89.71, $p = 0.492$ al día 14; no hubo diferencias entre los grupos. En el análisis de mediciones repetidas, ajustando por las variables confusoras, se encontró una reducción de citocinas en el tiempo, y una mayor reducción en el grupo DHA comparado con el grupo AO. La reducción fue significativa para IL-1 β al día 7 (coeficiente = -3.426, $p = 0.0289$) y al día 14 (coeficiente = -3.933, $p = 0.0275$); en este modelo el grupo DHA disminuyó más que el grupo AO (coeficiente = -3.124, $p = 0.0224$). El mismo modelo se repitió para IL-6, en el que se observó de manera similar una reducción en relación al tiempo, $p = 0.0174$ al día 7 y $p = 0.0060$ al día 14, la reducción en el grupo DHA tendió a ser mayor que en el grupo AO ($p = 0.0822$). Para el TNF- α no se encontró efecto del tiempo ($p = 0.2660$) ni del tratamiento ($p = 0.8459$).

Conclusión. En el presente estudio la administración del DHA por vía enteral durante la sepsis disminuyó las concentraciones plasmáticas de IL-1 β en neonatos.

INDICE GENERAL

Contenido	No. Página
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Sepsis	2
2.2 Susceptibilidad del neonato a infecciones	3
2.3 Citocinas	4
2.3.1 Factor de necrosis tumoral alfa	4
2.3.2 Interleucina 1	5
2.3.3 Interleucina 6	6
2.4 Estudios del comportamiento de las citocinas durante la sepsis	7
2.5 Ácidos grasos	8
2.5.1 Mecanismos postulados de los efectos antiinflamatorios de los n-3 LC-PUFAS sobre los leucocitos	11
2.5.2 Efectos de n-3 LC-PUFAS sobre concentraciones de citocinas en modelos experimentales de sepsis	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. OBJETIVO	18
6. HIPOTESIS	19
7. MATERIAL Y METODOS	20
7.1 Diseño del Estudio	20
7.2 Lugar donde se realizó el Estudio	20
7.3 Población de Estudio	20
7.4 Criterios de selección	20
7.5 Tamaño de la muestra	21
7.6 Calculo de Poder	22
7.6.1 Calculo de Poder para TNF- α	22
7.6.2 Calculo de Poder para IL-1 β	23
7.6.3 Calculo de Poder para IL-6	24
7.7 Operacionalización de las Variables	26
7.8 Procedimientos	28
7.8.1 Captación de pacientes	28
7.8.2 Asignación aleatoria	28
7.8.3 Toma de muestra sanguínea	28
7.8.4 Calculo de dosis de DHA	28
7.8.5 Administración DHA y aceite de oliva	29
7.8.6 Cegamiento	29
7.8.7 Tipo de muestreo	29
7.8.8 Procesamiento de las muestras	30
8. PLAN DE ANALISIS ESTADISTICO	31

	Página
9. ASPECTOS ETICOS	32
10. RESULTADOS	33
10.1 Variables demográficas	35
10.2 Microorganismos aislados	37
10.3 Citocinas	38
10.3.1 TNF- α	39
10.3.2 IL-1 β	40
10.3.3 IL-6	41
10.4 Análisis de Intención a tratar	42
10.5 Variables confusoras	43
10.6 ANOVA para mediciones repetidas para controlar potenciales confusores	45
11. DISCUSION	49
12. CONCLUSION	53
13. RECOMENDACIONES	54
14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55
15. ANEXOS	63

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Contenido	No. página
1	Pacientes eliminados por defunción	34
2	Características de la población	36
3	Principales microorganismos aislados por grupo	37
4	Concentraciones plasmáticas de citocinas	38
5	Análisis de intención a tratar	42
6	Variables confusoras	44
7	ANOVA para mediciones repetidas variable dependiente IL-1 β	46
8	ANOVA para mediciones repetidas variable dependiente IL-6	47
9	ANOVA para mediciones repetidas variable dependiente TNF - α	48
10	SNAP II (simplified newborn illness severity and mortality risk score)	69

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica	Contenido	No. página
1	Concentraciones plasmáticas de TNF- α .	39
2	Concentraciones plasmáticas de IL-1 β .	40
4	Concentraciones plasmáticas de IL-6.	41

INDICE DE ANEXOS

Anexo No.	Contenido	Página
1	Inmuno-ensayo para determinación cuantitativa de concentraciones de TNF- α , IL-1 β e IL-6 humana en cultivos celulares, suero y plasma	64
2	DHA en eritrocitos. Separación de lípidos y determinación del perfil de lípidos.	67
3	SNAP II (Simplified newborn illness severity and mortality risk score)	69
4	Técnicas antropométricas	70
5	Consentimiento informado	77
6	Hoja de recolección de datos	78
7	Hoja de enfermería.	79

1. INTRODUCCION

La sepsis es la principal causa de mortalidad en el mundo. Los neonatos tienen una mayor susceptibilidad condicionada por su respuesta inflamatoria aguda inadecuada, debido a inmadurez inmunológica. Recientemente se ha propuesto como terapia coadyuvante la administración de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (LC-PUFAS n-3), la cual puede influir positivamente en los procesos inflamatorios e inmunológicos. Diversos ensayos clínicos han mostrado que la suplementación con LC-PUFAS n-3, tiene un efecto inmunomodulador al atenuar la síntesis de citocinas como factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$), interleucina 1 beta ($IL-1\beta$) e interleucina 6 ($IL-6$) y beneficio terapéutico en diversas enfermedades inflamatorias en modelos animales y humanos.¹

2. ANTECEDENTES

2.1 Sepsis.

La sepsis es considerada como la primera causa de muerte entre la población neonatal, la cual se establece cuando los agentes causales, principalmente bacterias y hongos, alcanzan la circulación y se diseminan a diferentes órganos.²

La sepsis se define como la respuesta inflamatoria sistémica resultante de la sospecha de infección o de una infección probada. La respuesta inflamatoria sistémica tiene diferentes puntos de corte para sus criterios de acuerdo a la edad del paciente pediátrico, considerando recién nacido a pacientes cuya edad se encuentra entre el día cero y los 7 días de vida, mientras que se considera neonato a pacientes con edad de una semana a un mes.

Los criterios de la respuesta inflamatoria sistémica son la presencia de al menos dos de los siguientes, uno de los cuales debe ser alteración en la temperatura o en la cuenta de leucocitos.³

- Frecuencia cardiaca >180 o <100 latidos/minuto
- Frecuencia respiratoria > 50 respiraciones/minuto en el recién nacido o bien > 40 respiraciones/minuto en el neonato
- Temperatura $> 38.5^{\circ} \text{C}$ o $< 36^{\circ} \text{C}$
- Cuenta de leucocitos $> 34 \times 10^3$ células/mm³ en el recién nacido mientras que en el neonato $>19.5 \times 10^3$ o $< 5 \times 10^3$ células/mm³ o $>10\%$ de bandas

2.2 Susceptibilidad del neonato a infecciones

Se conoce en el recién nacido que los linfocitos T tienen un reducido potencial para proveer ayuda y supresión para la producción de anticuerpos por los linfocitos B, ocasionando que éstos no se desarrollen en linfocitos T citotóxicos. El neonato sintetiza sólo el 50% del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos, 10% del interferón gamma (IFN- γ) y de IL-4 comparadas con las cantidades de un adulto. Esto no parece ser un efecto de una inadecuada señalización, sino de una inmadurez intrínseca de las células T. La deficiencia en el desarrollo de memoria inmunológica puede ser resultado de la inmadurez de la producción de IFN- γ . Las consecuencias de estas características son un retraso en la respuesta inmune inducida por un antígeno, una pobre memoria inmunológica, una producción disminuida de células T citotóxicas y una inadecuada protección contra infecciones debido a una producción insuficiente de IFN- γ . Por lo anterior, el neonato puede tener una mayor predisposición a la adquisición de infecciones.^{4,5}

Se ha sugerido que la sepsis también se puede desarrollar debido una respuesta anti-inflamatoria compensatoria generada para regular a los mediadores pro-inflamatorios, como las citocinas, para restaurar el balance inmune. La incapacidad para restaurar este balance puede causar falla orgánica múltiple y defunción, ya sea por una respuesta inflamatoria o anti-inflamatoria descontrolada y una inmuno-supresión sostenida.^{6,7} En animales, se ha reportado que la administración *in vivo* de citocinas como interleucina (IL)-1 e IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF)- α inducen un síndrome parecido al choque, y similar al

observado como consecuencia de sepsis, por lo que se ha considerado que estas citocinas pueden jugar un papel importante en el inicio de la respuesta inflamatoria que pueden conducir al desarrollo de falla orgánica múltiple.⁸

2.3 Citocinas

Las citocinas son proteínas solubles que tienen la capacidad de modular la función y respuesta secretoria de otras células al interactuar con receptores de membrana específicos.⁹ El inicio de dicha interacción ocurre cuando el receptor proteico del huésped reconoce un antígeno CD14, que se encuentra en las membranas celulares de los macrófagos. La unión del antígeno con el CD14 inicia la producción y liberación de la cascada de la respuesta inmune. La interacción citocina-membrana celular, por ejemplo de un macrófago, produce quimiotaxis, y con ello migración de más fagocitos al sitio de infección que culmina con la liberación sistémica de citocinas inflamatorias como el TNF, IL-1 e IL-6 entre otras, cuyas funciones se describen a continuación.¹⁰

2.3.1 Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

El TNF- α es una proteína no glucosilada de 17 kDa y 157 aminoácidos, su nueva nomenclatura es TNF ligando de la superfamilia del miembro 2. Se produce por macrófagos, monocitos, neutrófilos, células T, células Natural Killer (NK) en respuesta a estimulación de polisacáridos bacterianos. Su síntesis es inducida por interferones, IL-2, sustancia P, bradikininas, complejos inmunes, inhibidores de ciclooxigenasa y factor activador de plaquetas. Su producción se inhibe por IL-6, vitamina D₃, prostaglandina E₂, dexametasona, ciclosporina y antagonistas del

factor activador de plaquetas. El TNF- α es un pirógeno endógeno que actúa directamente sobre las neuronas del hipotálamo, también produce elevación de hormona adrenocorticotrópica y del cortisol. Puede identificarse en sangre poco tiempo después de iniciada la respuesta inflamatoria (aproximadamente 72 hrs.), causa proteólisis y liberación de aminoácidos desde el músculo esquelético, contribuyendo al balance nitrogenado negativo y al estado catabólico, causando a su vez anorexia y contribuyendo al desarrollo de caquexia. Este factor puede producir daño directo a la célula endotelial, mientras que a nivel sistémico causa coagulación intravascular diseminada al inhibir los mecanismos de anticoagulación, favorece la trombosis venosa, arteriosclerosis, vasculitis, isquemia, aumento de la permeabilidad capilar, edema y fiebre. Promueve la síntesis de colágena y prostaglandina E₂ en fibroblastos; también actúa como modulador del crecimiento autócrino en el humano en células en leucemia linfocítica crónica; además estimula la fagocitosis y la síntesis de superóxido dismutasa en los macrófagos, activa los osteoclastos induciendo la resorción de hueso y es un potente estimulador de la producción de otros mediadores de la inflamación como IL-1 e IL-6. Puede detectarse mediante inmunoensayo, inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA) e inmunoradiometría. Intracelularmente se detecta mediante citometría de flujo.^{11, 12, 13, 14}

2.3.2 Interleucina 1 (IL-1).

Se produce por monocitos, macrófagos, linfocitos B y T, células NK, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células de Langerhans y del músculo liso, osteoclastos, astrocitos, células epiteliales del timo y la córnea. Existen dos formas

bioquímicas: la IL-1 α intracelular de la cual expresan grandes cantidades los queratinocitos con 17kDa, 159 aminoácidos e IL-1 β , de 17kDa y 153 aminoácidos, esta última es cuantificable en sangre. Su síntesis se regula por retroalimentación, al elevarse sus concentraciones se disminuye su síntesis. Se ha identificado como pirógeno endógeno que media la fiebre a través de su acción en la síntesis de prostaglandinas a nivel del hipotálamo al estimular el núcleo preóptico. Es responsable de la neutrofilia, del incremento en la síntesis de proteínas de fase aguda a nivel hepático, anorexia, sueño y liberación de hormona adrenocorticotrópica, glucocorticoides e insulina; puede inducir hipotensión, leucopenia y daño tisular y estimula la síntesis de otras citocinas como TNF- α , interferón α , β y γ . Se detecta mediante ELISA y radioinmunoensayo, mientras que la forma intracelular se detecta mediante citometría de flujo.^{9, 11, 15,16}

2.3.3 Interleucina 6 (IL-6).

También es conocida como interferón β_2 , es una proteína de 185 aminoácidos glucosilados en las posiciones 73 y 172. Es sintetizada por estímulo de los linfocitos T, macrófagos, linfocitos B, fibroblastos, granulocitos, eosinófilos, osteoblastos, queratinocitos, células: endoteliales, gliales, del parénquima gastrointestinal, del estroma endometrial y malignas. Es también producida por el lóbulo anterior de la hipófisis, al igual que el péptido intestinal vasoactivo y puede secretarse en respuesta a endotoxinas bacterianas y a la elevación de sustancias intracelulares como prostaglandina E₂ y toxina colérica. Algunos antimicrobianos macrólidos como espiramicina y eritromicina estimulan su síntesis, mientras que los glucocorticoides inhiben su producción; también participa en la mediación de la

respuesta en la fase aguda, ya que es un mediador primario que afecta la función de síntesis de proteínas del hepatocito, mediador común al final de la cascada de las citocinas. Además estimula la síntesis de corticotropina por la hipófisis, induce la proliferación de timocitos, juega un papel importante en el desarrollo de las células T en el timo e induce la maduración de megacariocitos. También se ha sugerido que regula el crecimiento y el desarrollo del trofoblasto y células madre en el embrión. Puede detectarse mediante inmunoensayo, reacción en cadena de polimerasa (PCR) y ELISA.^{11, 17,18}

2.4 Estudios del comportamiento de las citocinas durante la sepsis.

Algunas citocinas inflamatorias se elevan en diversos líquidos biológicos y secreciones de manera consistente y durante tiempo suficiente para ser consideradas como indicadores de infección; tal es el caso de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y de IL-8.²

Existen varios estudios que han intentado establecer la asociación entre las concentraciones circulantes de citocinas (IL-1 β , TNF- α e IL-6) con la gravedad de las infecciones neonatales así como la mortalidad. En un estudio con 49 recién nacidos sépticos y 40 controles, Atici y cols, encontraron un aumento de 2-3 veces las concentraciones en suero de TNF- α en neonatos infectados (61 vs. 154 pg/mL) y estas concentraciones fueron aún mayores en los recién nacidos que desarrollaron choque séptico (243 pg/mL).¹⁹ Weeks y cols., también reportaron que las concentraciones plasmáticas de IL-6 por arriba de 145 pg/ml en sangre de cordón umbilical de neonatos de término se correlacionaron con sepsis, neumonía,

enterocolitis necrosante o hemorragia intraventricular. Este estudio indicó que la IL-6 es un marcador de inflamación sistémica y puede ser un predictor de la mortalidad.²⁰ Similarmente Kurtoglu y cols., en un estudio efectuado en 20 neonatos con sepsis y 6 neonatos sanos como grupo control determinaron las concentraciones en suero de TNF- α e IL-6 mediante ELISA, confirmando que las concentraciones en suero de TNF- α fueron mayores en los neonatos con sepsis (159.7 pg/ml) que en el grupo control (39 pg/ml), aunque sin una diferencia significativa entre grupos ($p > 0.05$), mientras que las concentraciones de IL-6 fueron significativamente mayores en el grupo de estudio respecto al grupo control (291.7 pg/ml vs 16.7 pg/ml, $p < 0.005$), por lo que concluyeron que el incremento de dichas citocinas reflejó la magnitud del proceso inflamatorio durante la infección.²¹

En resumen una vez establecida la sepsis, la producción de citocinas proinflamatorias en los neonatos se eleva significativamente, correlacionándose de manera directa con la gravedad o aparición de complicaciones. Esto último fortalece la necesidad de agregar coadyuvantes de manera temprana al tratamiento de los neonatos con sepsis que puedan regular la producción de citocinas hacia una inflamación atenuada como es el caso de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

2.5 Ácidos grasos.

Existen dos tipos de ácidos grasos indispensables: el ácido linoléico y el ácido alfa linolénico, considerados así debido a que los mamíferos no pueden incorporar dobles enlaces en las posiciones 3 y 5, y por tanto, no pueden sintetizarlos. El

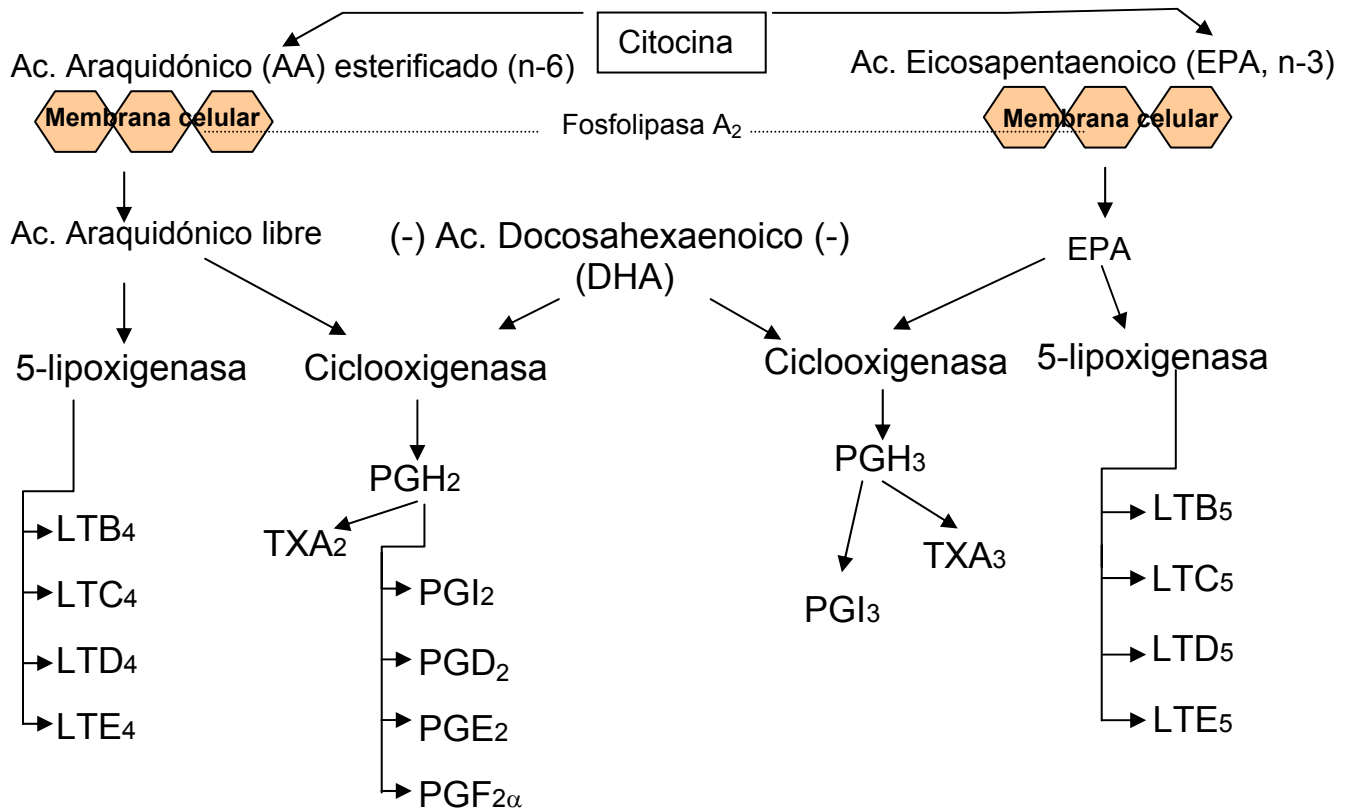
ácido docosahexanoico (DHA) es un ácido graso de la serie omega-3 (n-3), al igual que el ácido eicosapentaenoico (EPA), porque su primer doble enlace se ubica en el carbono 3 contando desde el extremo más alejado del grupo metilo, estos ácidos grasos son considerados como los más importantes de la familia n-3. Otras de las familias de ácidos grasos poliinsaturados, es la omega-6 (n-6), en la cual el primer doble enlace se ubica en el carbono 6 contando a partir del grupo metilo. El ácido linoléico, el ácido araquidónico (AA) y el ácido docosapentaenoico (DPA), son los ácidos grasos más importantes de esta familia.²²

El AA representa el ácido graso predominante en los fosfolípidos de las membranas celulares debido a que su precursor el ácido linoléico, predomina en las dietas occidentales y en la leche humana en comparación con los ácidos grasos de la serie n-3. Los ácidos grasos participan en la respuesta inflamatoria como sustrato para la síntesis de mediadores químicos de las citocinas denominados eicosanoides, por lo que cuando las citocinas se unen al receptor de las células inmunes como macrófagos o neutrófilos, activan la fosfolipasa A, que libera los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana para sintetizar prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y leucotrienos (LT) mediante las enzimas 5-lipooxigenasa o ciclooxigenasa- (esquema 1).^{23,24}

El AA se considera como un ácido graso pro-inflamatorio debido a las funciones pro-inflamatorias de los eicosanoides derivados de éste. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega 3 (n-3 LC-PUFAS) como el DHA y el EPA contenidos principalmente en el aceite de pescado y algas marinas son precursores lipídicos alternativos para la síntesis de eicosanoides y forman

prostaglandinas y tromboxanos de la serie 3 (en vez de la serie 2 derivados del AA) y leucotrienos de la serie 5 (en vez de la serie 4 derivados del AA). Estos eicosanoides (de las series 3 y 5) son biológicamente menos potentes en comparación a los de la serie 2 y 4, respectivamente, por lo que poseen propiedades inflamatorias reducidas. Por otro lado, el EPA y el DHA compiten con el AA por la misma vía enzimática, pero las enzimas muestran una mayor afinidad hacia los n-3 LC-PUFAS cuando se encuentran disponibles ambos tipos de ácidos grasos simultáneamente, lo que conduce a una mayor formación de productos derivados de los n-3 LC-PUFAS a expensas de los metabolitos del AA, por lo que la administración de n-3 LC-PUFAS puede cambiar el balance hacia una inflamación atenuada.²⁵ Por lo anterior, se considera que los n-3 LC-PUFAS son nutrimentos que pueden utilizarse como anti-inflamatorios en procesos donde la hiperinflamación puede generar daño tisular.

Esquema 1. Síntesis de eicosanoides.



2.5.1 Mecanismos postulados de los efectos anti-inflamatorios de los n-3 LC-PUFAS sobre los leucocitos.

La disponibilidad del EPA y la subsecuente generación del LTB₅ ocasionan la reducción/supresión de la síntesis del leucotrieno pro-inflamatorio LTB₄. El efecto anti-inflamatorio también puede ocurrir por un mecanismo independiente de eicosanoides relacionado a la transducción señales.¹ Los ácidos grasos y sus metabolitos regulan la función del factor de transcripción a través de la fosforilación, el estado redox, la modificación proteolítica ó a través de su unión a un ligando activado por el factor de transcripción.^{26, 27}

2.5.2 Efecto de los n-3 LC-PUFAS sobre las concentraciones de citocinas en modelos experimentales de sepsis.

En animales, Tomobe y cols., evaluaron el efecto inmunomodulador del DHA y EPA comparado con aceite de maíz (4.8% de la dieta) sobre la respuesta inflamatoria durante la fase de contacto en la reacción de hipersensibilidad en orejas de ratones sensibilizadas con el antígeno 2,4- dinitro1-fluorbenzeno, y observaron que el DHA redujo tanto la inflamación local, como la expresión de IL-6, IL-1 β e IL-2.²⁸

Recientemente Schaefer y cols., investigaron el efecto de la administración durante 7 días de aceite de pescado y aceite de soya (1g/kg/día), sobre la respuesta inflamatoria sistémica en ratas neonatos, inducida mediante administración lipopolisacáridos por vía intraperitoneal o pulmonar, se midieron las concentraciones de TNF- α en plasma mediante ELISA encontrando una reducción significativa en aquellas que recibieron aceite de pescado, con un incremento en las que recibieron aceite de soya.²⁹ De lo anterior podemos concluir que la inclusión de ácidos grasos n-3 en la dieta mostró un efecto inmunomodulador sobre la producción de citocinas inflamatorias y de eicosanoides, reduciendo la gravedad de la sepsis y la mortalidad en ratas.

En humanos, Caughey y cols., reportaron una intervención en adultos sanos quienes recibieron 1.08g de DHA al día por 4 semanas en cápsulas de aceite de pescado, encontrando una inhibición en la síntesis de TNF- α e IL-1 β de 77 y 81%, respectivamente.³⁰ Mayer y cols., realizaron un ensayo clínico controlado en

pacientes con sepsis e intolerancia a la vía enteral, administrando aleatoriamente 350 ml de una infusión de ácidos grasos n-3 al 10% con aceite de pescado a un grupo y de ácidos grasos n-6 al 10% con nutrición parenteral estándar al grupo placebo por 5 días. En monocitos estimulados con 1 ng/mL de lipopolisacáridos *ex vivo*, encontraron que el grupo que recibió ácidos grasos n-3 LC-PUFAS mostró una reducción de 28% comparado con el basal en la liberación de TNF- α y una reducción de 30% en la liberación de IL-1 β . Mientras que no encontraron ningún efecto en la liberación de IL-6 debido a que los resultados mostraron una gran dispersión. El grupo que recibió ácidos grasos n-6, incrementó al doble los valores de IL-1 β , IL-6, TNF- α al igual que la cuenta de leucocitos requiriendo apoyo con aminas y mayor tiempo de ventilación, respecto al grupo que recibió ácidos grasos n-3. Estos resultados indicaron que los sujetos que recibieron los ácidos grasos n-3 tuvieron una respuesta inflamatoria atenuada.³¹ En otro reporte del mismo autor realizado en pacientes con sepsis/choque séptico y con intolerancia a la vía enteral, se administró una infusión de ácidos grasos n-3 con aceite de pescado (400 ml al 10%) a un grupo y de ácidos grasos n-6 con nutrición parenteral estándar (400 ml al 10%) al grupo placebo. El grupo que recibió ácidos grasos n-3, presentó una tendencia hacia la disminución en las concentraciones de proteína C reactiva (PCR) comparado con el grupo que recibió ácidos grasos n-6. Por otro lado, el grupo que recibió los ácidos grasos n-3 también mostró una mayor secreción de LTB₅ comparado con la secreción de LTB₄, mientras que en el grupo que recibió los ácidos grasos n-6, el LTB₅ no fue detectable, agregando evidencia del efecto de los n-3 LCUFAS sobre la reducción de marcadores de inflamación.³²

En la Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, se evaluó el efecto de una fórmula suplementada con DHA, de la leche humana y de una fórmula estándar sobre las concentraciones plasmáticas de citocinas de lactantes inmunizados por primera vez con vacuna tetravalente. Los niños que recibieron fórmula suplementada con DHA mostraron concentraciones de IL-1 β similares a las del grupo de niños alimentados con leche humana, mientras que el grupo que recibió fórmula estándar presentó concentraciones mayores de IL-1 β . Lo que sugirió que el DHA puede atenuar la respuesta inflamatoria en lactantes.³³ Por otro lado, los efectos catabólicos observados durante la respuesta inflamatoria se han atribuido a citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6.³⁴ Con este antecedente, en la misma Unidad de Investigación se realizó un estudio donde se observó que la administración de 100 mg de DHA al día durante 14 días a neonatos que desarrollaron sepsis, preservó las reservas de masa magra y aumentó significativamente la masa grasa (p = 0.03), mientras que el grupo placebo presentó deterioro en ambas, lo que sugirió que la modulación de citocinas podría ser el mecanismo por el cual se protegió el estado nutricional.³⁵ El presente trabajo se deriva del mencionado previamente, por lo que se midieron el TNF- α , IL-1 β e IL-6.

En resumen, podemos decir que la administración de n-3 LC-PUFAS administrado a modelos experimentales de sepsis en animales mostró una atenuación de las citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. De manera análoga, en adultos con sepsis, se observó que la administración de n-3 LC-PUFAS permitió la atenuación de la respuesta inflamatoria evaluada a través de citocinas pro-inflamatorias, PCR y de

la producción de LTB₄. Sin embargo, no existen estudios realizados en neonatos que evalúen el efecto de la administración por vía enteral de los ácidos grasos n-3 durante la sepsis sobre las concentraciones de citocinas. Por lo anterior, en este estudio se determinó si el ácido docosahexaenoico administrado en la fase aguda de la infección lograba atenuar la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en neonatos con sepsis.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Durante la sepsis se genera una respuesta inflamatoria sistémica mediada por eicosanoides y citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 entre otros mediadores. Por otro lado, los recién nacidos tienen una alta predisposición al desarrollo de sepsis por lo que es un problema frecuente en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales.³⁶

Los ácidos grasos n-3 tienen efectos anti-inflamatorios, ya que son sustrato para la síntesis de eicosanoides con menor potencia biológica por lo que generan un efecto inflamatorio atenuado y pueden reducir la producción de citocinas durante la respuesta inflamatoria aguda como la sepsis.²³ Por lo que planteamos la siguiente pregunta

¿El DHA administrado por vía enteral durante la sepsis reducirá las concentraciones plasmáticas de TNF- α , IL-1 β e IL-6 de los neonatos que reciban DHA comparadas con las concentraciones de los que reciban aceite de oliva?

4. JUSTIFICACIÓN

La sepsis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales. En Estados Unidos, la tasa de incidencia en neonatos es de 1 a 5 casos por 1000 nacidos vivos, mientras que en los países en desarrollo 34 casos por 1000 nacidos vivos, lo que ocasiona 1.6 millones de muertes anualmente.³⁶ En México se han reportado 4 a 15.4 casos por 1000 nacidos vivos con una mortalidad de 44%.^{1,37} En la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital de Pediatría la tasa por 100 egresos es de 35 a 45 y la densidad de incidencia por 1000 días estancia es de 19 a 25.

Es importante determinar si el DHA disminuye las concentraciones de citocinas, en neonatos con sepsis, lo que podría reducir el daño inducido por la respuesta inflamatoria exacerbada y favorecer la remisión de la infección. Esta podría ser una estrategia para reducir las complicaciones en la evolución clínica como el choque séptico, mortalidad, así como el costo por estancia hospitalaria que en nuestro hospital es de aproximadamente 19,000.00 pesos/día/niño.

5. OBJETIVO.

Evaluar si el DHA administrado por vía enteral durante la sepsis disminuye las concentraciones plasmáticas de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en neonatos que reciban DHA comparadas con las concentraciones de los que reciban aceite de oliva.

6. HIPÓTESIS:

Las concentraciones plasmáticas de TNF- α , IL-1 β e IL-6 de los neonatos que reciban el DHA por vía enteral durante la sepsis serán menores comparadas con las citocinas de los neonatos que reciban aceite de oliva.

7. Material y Métodos.

7.1 Diseño de estudio:

Ensayo clínico controlado, aleatorizado, doble ciego.

7.2 Lugar donde se realizó el estudio:

Unidad de Investigación Médica en Nutrición y Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

7.3 Población de estudio:

Neonatos de término y pretérmino con sospecha de sepsis.

7.4 Criterios de selección:

De inclusión

- Que los padres aceptaran por escrito que su hijo participara después de conocer los posibles beneficios y riesgos de la investigación.
- Que tuvieran un tracto gastrointestinal funcional tolerando al menos estímulo enteral.
- Que cumplieran al menos dos de los criterios establecidos para respuesta inflamatoria sistémica resultado de una sospecha de infección:
 - Frecuencia cardíaca >180 o <100 latidos/minuto
 - Frecuencia respiratoria > 50 respiraciones/minuto en el recién nacido o bien > 40 respiraciones/minuto en el neonato
 - Temperatura >38.5° C o < 36° C

- Cuenta de leucocitos $>34 \times 10^3$ células/mm³ en el recién nacido mientras que en el neonato $>19.5 \times 10^3$ o $< 5 \times 10^3$ células/mm³ o $>10\%$ de bandas

De eliminación

- Que se trasladara a otro hospital fuera del D.F.
- Que los padres del niño decidieran que abandone el estudio.
- Que el niño presentara inestabilidad hemodinámica (hipotensión, necesidad de medicamentos vasoactivos, acidosis metabólica, oliguria y llenado capilar retardado) diagnosticada por el neonatólogo y que decidiera que su paciente abandonara el estudio.
- Que el niño requiriera más de 48 horas de ayuno.

7.5 Tamaño de muestra:

El tamaño de muestra se calculó utilizando los datos de la interleucina 1- β de lactantes que recibieron una vacuna tetravalente y que se alimentaron con una fórmula suplementada con DHA y AA realizado en la Unidad de Investigación Médica en Nutrición.³⁸

Nivel de α : 0.05

Diferencia entre medias esperada: 25%

Nivel de β : 0.20

Desviación estándar: 1.140

$$n = \frac{[Z\alpha - Z\beta (\theta)]^2}{(\mu H_0 - \mu H_a)^2}$$

Sustituyendo

$$\frac{(1.645 + 0.84)^2(1.140)^2}{(0.558)^2} = 26 \text{ niños por grupo.}$$

Agregando un 15% por pérdidas al seguimiento, el tamaño de muestra calculado es igual a 30 neonatos con sospecha de sepsis por grupo.

Al encontrar que las pérdidas excedieron el 15 % de la muestra calculada, se decidió incrementar la captación de pacientes y se calculó nuevamente el poder estadístico, con la finalidad de identificar si los resultados observados en los datos crudos eran reales o si el poder estadístico era insuficiente.

7.6 Cálculo de poder estadístico por citocina

7.6.1 TNF- α

n_1 (DHA) = 27 basal, 27 día 7, 25 día 14

n_2 (AO) = 34 basal, 32 día 7, 30 día 14

\bar{X} DHA TNF- α : 38.5958 basal, 17.7169 día 7, 17.1664 día 14

D. E. DHA TNF- α : 95.2373 basal, 8.6957 día 7, 8.7857 día 14

\bar{X} AO TNF- α : 28.0787 basal, 17.2522 día 7, 17.1954 día 14

D. E. AO TNF- α : 40.1276 basal, 5.8488 día 7, 6.3955 día 14

$$n = \frac{[Z\alpha - Z\beta (\theta)]^2}{(\mu H_0 - \mu H_a)^2}$$

Despejando $Z\beta = [(\sqrt{n}) d / \Theta] - Z\alpha$

Día 7

$$Z\beta = [(\sqrt{27}) (17.2522 - 17.7169)] / 8.6957 - 1.645$$

$$Z\beta = [5.1962 (-0.4647)] / 8.6957 - 1.645 = (-2.4167 / 8.6957) - 1.645$$

$$= -0.2777 - 1.645 = -1.9227 = \text{área bajo la curva} = 0.027$$

$$\text{Poder} = 1 - 0.027 = 0.973$$

$$\approx 97\%$$

Día 14

$$Z\beta = [(\sqrt{27})(17.1954 - 17.1664)]/8.7857) - 1.645$$

$$Z\beta = [5.1962 (-0.029)]/8.7857) - 1.645 = (-0.1507/8.7857) - 1.645 \\ = 0.0172 - 1.645 = -1.6278 = \text{área bajo la curva} = 0.052$$

$$\text{Poder} = 1 - 0.052 = 0.948$$

$$\approx 95\%$$

7.6.2 IL-1 β

$$n_1 (\text{DHA}) = 29 \text{ basal, } 29 \text{ día } 7, 27 \text{ día } 14$$

$$n_2 (\text{AO}) = 33 \text{ basal, } 32 \text{ día } 7, 30 \text{ día } 14$$

$$\bar{x} \text{ IL-1}\beta \text{ para DHA} = 4.3471 \text{ basal, } 3.0218 \text{ día } 7, 3.3894 \text{ día } 14$$

$$\text{D. E. IL-1 } \beta \text{ para DHA} = 2.6574 \text{ basal, } 1.9906 \text{ día } 7, 1.9425 \text{ día } 14$$

$$\bar{x} \text{ IL-1 } \beta \text{ para AO} = 8.2415 \text{ basal, } 3.0820 \text{ día } 7, 3.0312 \text{ día } 14$$

$$\text{D. E IL-1 } \beta \text{ para AO} = 15.7155 \text{ basal, } 1.8797 \text{ día } 7, 2.0414 \text{ día } 14$$

$$n = \frac{[Z\alpha 0 - Z\beta (\theta)]^2}{(\mu H_0 - \mu H_a)^2}$$

$$\text{Despejando } Z\beta = [(\sqrt{n}) d / \Theta] - Z\alpha$$

Día 7

$$Z\beta = [(\sqrt{29})(3.0820 - 3.0218)]/1.9906) - 1.645$$

$$Z\beta = [(5.3852)(0.0602)]/1.9906) - 1.645 = (0.3242 / 1.9906) - 1.645 \\ = 0.1629 - 1.645 = -1.4821 = \text{área bajo la curva } 0.069$$

$$\text{Poder} = 1 - 0.069 = 0.931$$

$$= \approx 93\%$$

Día 14

$$Z\beta = [(\sqrt{29})(3.0312 - 3.3894)]/2.0414 - 1.645$$

$$Z\beta = [(5.3851)(-0.3582)/2.0414] - 1.645 = (1.9289/2.0414) - 1.645$$

$$= -0.9449 - 1.645$$

$$= -2.5899 = \text{área bajo la curva} = 0.005$$

$$\text{Poder} = 1 - 0.005 = 0.995$$

$$= \approx 99\%$$

7.6.3 IL-6

$$n_1 (\text{DHA}) = 29 \text{ basal}, 25 \text{ día 7}, 24 \text{ día 14}$$

$$n_2 (\text{AO}) = 33 \text{ basal}, 29 \text{ día 7}, 30 \text{ día 14}$$

$$\bar{x} \text{ IL-6 para DHA} = 57.4877 \text{ basal}, 20.7511 \text{ día 7}, 36.2496 \text{ día 14}$$

$$\text{D. E. IL-6 para DHA} = 65.5060 \text{ basal}, 20.8958 \text{ día 7}, 63.9619 \text{ día 14}$$

$$\bar{x} \text{ IL-6 para AO} = 88.2091 \text{ basal}, 40.2595 \text{ día 7}, 17.8982 \text{ día 14}$$

$$\text{D. E. IL-6 para AO} = 94.4858 \text{ basal}, 71.1035 \text{ día 7}, 21.4122 \text{ día 14}$$

$$n = \frac{[Z\alpha - Z\beta(\theta)]^2}{(\mu_{H0} - \mu_{Ha})^2}$$

$$\text{Despejando } Z\beta = [(\sqrt{n}) d / \Theta] - Z\alpha$$

Día 7

$$Z\beta = [(\sqrt{25})(40.2595 - 20.7511)]/71.1035 - 1.645$$

$$Z\beta = [5.3852(19.5084)]/71.1035 - 1.645 = (97.542/71.1035) - 1.645$$

$$= 1.3718 - 1.645 = -0.2732 = \text{área bajo la curva} = 0.394$$

$$\text{Poder} = 1 - 0.394 = 0.61$$

$$\approx 61\%$$

Día 14

$$Z_{\beta} = [(\sqrt{25})(17.8982 - 36.2496)]/63.9619 - 1.645$$

$$Z_{\beta} = [5.3852(-18.3514)]/63.9619 - 1.645 = (-91.757/63.9619) - 1.645$$
$$= -1.4346 - 1.645 = -3.0796 = \text{área bajo la curva} = 0.001$$

$$\text{Poder} = 1 - 0.001 = 0.999$$

$$\approx 99\%$$

7.7 Operacionalización de las Variables:

Variables	Operacionalización	Tipo de variable y unidades
1) Demográficas		
a) Género	Definido como hombre o mujer de acuerdo al fenotipo observado.	Nominal: frecuencia
b) Edad gestacional	Establecida al nacimiento por la escala de Capurro o Ballard y registrada en el expediente.	Cuantitativa: semanas
c) Calificación de Apgar	Al minuto uno y al minuto cinco, clasificando como < 8 o ≥8	Nominal: frecuencia
d) Edad posnatal	Tiempo cronológico transcurrido desde el nacimiento hasta el ingreso del estudio.	Cuantitativa: días
e) Peso	Masa corporal medida al ingreso del estudio	Cuantitativa: gramos
f) Longitud	Estatura medida en posición supina al ingreso del estudio	Cuantitativa: cm
g) Perímetro cefálico	Circunferencia de cráneo medida en porciones más prominentes del hueso parietal y occipital al ingreso del estudio	Cuantitativa: cm
h) Patología de base	Clasificación de la enfermedad de acuerdo al sistema afectado al ingreso del estudio	Nominal: frecuencia
2) Independientes		
a) Administración de DHA ó aceite de oliva	Administración de 100 mg de DHA o 200 µL de aceite de oliva una vez al día por vía enteral por 14 días a partir del día de diagnóstico de sospecha de sepsis.	Nominal 0 = aceite de oliva 1 = DHA
3) Dependientes		
a) citocinas TNF-α, IL-β e IL-6	Concentraciones plasmáticas de TNF-α, IL-β e IL-6; al momento del diagnóstico de sepsis (basal), a los 7 y 14 días por el método de ELISA. (anexo 1)	Cuantitativa pg/mL

Variables	Operacionalización	Tipo de variable y unidades
4) De confusión		
a) Ingestión de leche humana	Aporte de energía proveniente de la leche humana.	Cuantitativa continua Kcal/kg/día
b) Tratamiento con antiinflamatorios	Esteroides (dexametasona e hidrocortisona) o no esteroides (ketorolaco, paracetamol, ácido acetilsalicílico)	Nominal: frecuencia Cuantitativa continua: Duración en días
c) Gravedad del padecimiento al ingreso del estudio	Estimación el estado de gravedad del padecimiento del neonato al ingreso del estudio por medio de la escala de SNAP-II (Presión arterial media, temperatura, relación PO ₂ /FiO ₂ , pH en suero, crisis convulsivas y uresis horaria ml/kg/hr). Calificación máxima 115 (Anexo 3)	Cuantitativa discreta
d) DHA tisular	Determinación de la proporción de DHA tisular al ingreso	Cuantitativa %
e) Ácidos grasos n-3 tisulares	Determinación de la proporción de ácidos grasos al momento del ingreso	Cuantitativa %
f) Cuenta leucocitaria	Determinación de la cuenta de leucocitos al momento del ingreso, a los 7 y 14 días.	Cuantitativa células/mm ³
g) Intervención quirúrgica	Intervención quirúrgica durante el estudio	Nominal: frecuencia
h) Sobreinfección o reinfección	Presencia de un nuevo evento infeccioso durante el tiempo de estudio por un microorganismo diferente o por el mismo microorganismo.	Nominal: frecuencia

7.8 Procedimientos:

7.8.1 Captación de pacientes.

Se pasó visita diariamente en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI para la identificación de los candidatos que cumplieran con los criterios de inclusión. Una vez identificados, se informó a los padres acerca de los objetivos y procedimientos del estudio incluyendo los posibles riesgos y beneficios, solicitando por escrito su consentimiento informado para la participación del su hijo. Anexo 5

7.8.2 Asignación aleatoria.

Los pacientes se asignaron en forma aleatoria a recibir DHA (grupo DHA) o aceite de oliva (grupo AO) mediante tablas de números aleatorios dispuestos en sobres cerrados por un investigador no involucrado en el trabajo de campo.

7.8.3 Toma de muestra sanguínea.

Se tomó una muestra de 2.5 ml de sangre venosa periférica en un tubo con EDTA por la mañana del día en que se presentaron datos de respuesta inflamatoria sistémica, posteriormente a los 7 y 14 días. Siempre que fue posible se colectó la muestra cuando se obtenía sangre para otras determinaciones.

7.8.4 Cálculo de dosis de DHA

La dosis de DHA se calculó siguiendo las recomendaciones de la Unión Europea que estableció como recomendación máxima el 1% del total de ácidos grasos como n-3 LC-PUFA ó DHA imitando las concentraciones reportadas para la leche humana. Si la leche humana contiene entre 3-5 g de lípidos/dL, para un niño de

término que consume 60 mL/8 veces al día equivale a 240 mg de DHA/día y a 100 mg de DHA/día para un niño pretérmino que consume 25 mL/8 veces al día.³⁹

7.8.5 Administración de DHA y AO

El día de la primera toma de muestra se inició la administración de 100 mg de DHA/día o de aceite de oliva cada 24 hrs durante 14 días, ésta fue proporcionada mediante una jeringa de insulina por sonda orogástrica (SOG) o por vía bucal a nivel de los carrillos inmediatamente antes de la alimentación del neonato para favorecer el arrastre completo de la dosis. El costo por cada cápsula de DHA de 100 mg es de 0.33 dólares incluyendo IVA.

7.8.6 Cegamiento.

Este estudio fue doble ciego. El médico tratante desconocía el tipo de intervención que recibía su paciente, para evitar ser susceptible de sesgos en el manejo médico. La persona que procesó las muestras también ignoró la intervención ya que la muestra sólo se identificó como número de expediente.

7.8.7 Tipo de muestreo.

No probabilístico consecutivo, es decir, se captaron a todos los pacientes que ingresaron a la UCIN y que cumplieron los criterios de inclusión.

7.8.8 Procesamiento de las muestras.

La muestra fue centrifugada para separar el plasma donde se determinaron las citocinas en los primeros 30 minutos de recolección, posteriormente se almacenaron hasta su determinación.

Las citocinas se descongelaron a temperatura ambiente y se determinaron por inmunoanálisis ligado a enzimas (ELISA) basado en fase sólida con estuches comerciales (Quantikine Human Immunoassay, R&D systems inc Mineapolis USA) con un lector de placas FL 600 Microplate fluorescente reader (Bio-tekistruments Inc. Winooski, VT USA). Anexo 1

8. Análisis estadístico:

Análisis estadístico descriptivo.

Los datos se capturaron y analizaron en el programa SPSS versión 11 y en MINITAB versión 14. Los datos cuantitativos se muestran como medianas, mínimo y máximo, debido a que no mostraron distribución normal. Los datos nominales se muestran como frecuencias y proporciones.

Análisis estadístico inferencial.

a) Bivariado

Para realizar las comparaciones entre el grupo DHA y AO se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney. Para analizar las variables nominales se aplicó la prueba de Fisher bilateral. Cuando se incluyó en las comparaciones al grupo de niños que fallecieron se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para las variables cuantitativas y χ^2 para variables nominales. Además, se realizó un análisis de intención a tratar donde se incluyeron los decesos.

b) Multivariado

Para analizar las diferencias de citocinas entre el diagnóstico y día 7, y entre el diagnóstico y día 14, controlando por potenciales confusores se aplicó la prueba de ANOVA para mediciones repetidas.

La significancia estadística se estableció con $p < 0.05$.

9. Aspectos éticos

Se explicó ampliamente los procedimientos en forma verbal y escrita a los padres de familia como:

1. El objetivo del estudio.
 2. Posibles riesgos
 3. Derecho a abandonar el estudio en cualquier momento sin que ello afectara su atención médica en el servicio.
 4. Se aseguró la confidencialidad de la identificación del paciente en el estudio.
 5. Se les dio el tiempo suficiente a los padres para tomar su decisión no excediendo del mismo día.
 6. Se les explicó quien era el responsable a quien podían dirigirse y quien les explicaría todas sus dudas en el momento de ingreso y durante el estudio.
 7. Se solicitó la firma de dos testigos
- La carta de consentimiento fue redactada de acuerdo a las disposiciones de la Declaración de Helsinki y el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación. (Anexo 16.6) ^{40, 41, 42}
 - Este proyecto fue autorizado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI con el número: 2005/3603/038.

10. Resultados:

Se estudiaron 78 neonatos con sospecha de sepsis. Sesenta y tres neonatos completaron el estudio, de los cuales 29 recibieron DHA y 34 aceite de oliva. Fueron eliminados 15 neonatos, 2 de ellos por ayuno mayor de 48 horas y otros 2 neonatos por muestra de sangre insuficiente en dos tiempos de estudio. Los otros 11 neonatos se separaron del análisis de citocinas, 10 por defunción en la primera semana de estudio y uno de ellos en la segunda semana de estudio. La principal causa de defunción fue choque séptico (72.8%), seguido de choque cardiogénico (27.2%) (Cuadro1). La gravedad evaluada por SNAP II fue mayor en estos pacientes respecto a los pacientes que completaron el estudio (decesos 24, 5 – 35 vs. Grupo DHA 16, 0-35 y grupo AO 16,0-35, $p = 0.008$). Completaron el estudio cuarenta y un neonatos en la UCIN del Hospital de Pediatría, 20 en el servicio de lactantes del mismo hospital y 2 de ellos en su Hospital General de Zona (Troncoso y Hospital de Ginecoobstetricia “Luis Castelazo Ayala”).

Cuadro 1. Pacientes eliminados por defunción

Expediente	Grupo	Sexo	Diagnóstico ingreso	Diagnóstico defunción	Días estudio	SNAP II
4	DHA	Masculino	Conexión anómala total de venas pulmonares	Choque cardiogénico	14	29
16	DHA	Masculino	Estenosis válvula pulmonar	Choque séptico	2	5
18	AO	Femenino	Doble vía salida ventrículo derecho	Choque séptico	6	16
23	AO	Masculino	Hernia de Bochdaleck	Choque séptico	2	35
30	AO	Masculino	Salida única de ventrículo derecho	Choque séptico	3	24
38	AO	Femenino	Ventrículo derecho hipoplásico	Choque cardiogénico	5	24
54	DHA	Femenino	Conducto arterioso persistente	Choque séptico	7	35
56	DHA	Masculino	Coartación aórtica	Choque séptico	1	24
58	AO	Femenino	Hipoplasia arco aórtico	Choque séptico	2	32
61	DHA	Masculino	Comunicación ínter auricular, hipertensión arterial pulmonar grave	Choque cardiogénico	2	35
62	AO	Masculino	Displasia bronco pulmonar	Choque séptico	4	24

10.1 Variables demográficas. Predominó el sexo masculino en los tres grupos. La calificación de Apgar al minuto uno en los tres grupos tendió a ser menor de 8 mientras que al minuto cinco hubo una recuperación observando una calificación mayor o igual a 8, sin diferencia entre grupos. Al ingreso del estudio, la edad gestacional, el peso, longitud y perímetro cefálico fueron similares entre los grupos. La patología de base más frecuente en los grupos de estudio fue cardiovascular, solo se reportó un caso de neoplasia, sin diferencias significativas entre los grupos. Dentro de la patología cardiovascular se incluyen tanto cardiopatías de flujo pulmonar aumentado, como disminuido, entre ellas se encontraron: conexión anómala de venas pulmonares, ventrículo derecho hipoplásico, doble vía de salida de ventrículo derecho, tetralogía de Fallot, enfermedad de Ebstein, ventrículo único, tronco arterioso, valvulopatías, comunicación interventricular y transposición de grandes vasos. Se clasificó como patología pulmonar a aquellas que afectan no sólo la estructura anatómica sino que comprometen la función respiratoria, entre ellas se encontraron la secuencia de Pierre Robin, hernia de Bochdaleck, estenosis de bronquio, estenosis traqueal y parálisis diafragmática. Dentro de la patología gastrointestinal se clasificó a la Enfermedad de Hirschprung, la asociación VACTER porque su principal afección es la atresia esofágica y la enfermedad por reflujo gastroesofágico. A nivel neurológico se consideró como principal patología la asfixia perinatal y sus complicaciones como hemorragia intraventricular e hidrocefalia; así como a la enfermedad de Chiari. La neoplasia reportada corresponde a un tumor mixoide que requirió de derivación ventrículo-peritoneal por hidrocefalia (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características de la población

	DHA n = 29	AO n = 34	Valor de P [‡]	Decesos n = 11	Valor de P [†]
Al nacer					
Género ¹					
Masculino	16 (55.2)	21 (61.8)		8 (72.7)	
Femenino	13 (44.8)	13 (38.2)	0.596 ³	3 (27.3)	0.590 ³
Edad gestacional, semanas ²	37, 28 - 41	37, 27 - 40	0.337 ⁴	37, 30 - 42	0.664 ⁶
Apgar ¹					
Min. 1, < 8	16 (66.7)	19 (65.5)	0.930 ³	9 (100)	
≥ 8	8 (33.3)	10 (34.5)		0	0.116 ³
Min. 5, < 8	5 (20.8)	7 (24.1)		3 (33.3)	
≥ 8	19 (79.2)	22 (75.9)	0.775 ³	6 (66.7)	0.757 ³
Al ingreso					
Edad postnatal, días ²	23, 7 - 56	22, 1 - 65	0.934 ⁴	21, 8 - 60	0.981 ⁶
Peso, gramos ²	2 800, 1 200 - 4 300	2 800, 1 100 - 3 700	0.994 ⁴	2 800, 1 400 - 3 900	0.994 ⁶
Longitud, cm ²	47.9, 40 - 56	47.9, 41 - 54	0.573 ⁴	49.4, 38 - 59	0.957 ⁶
Perímetro cefálico, cm ²	32.7, 25 - 36	32.8, 27 - 38	0.882 ⁴	32, 27 - 36	0.682 ⁶
Patologías de base ¹					
Cardiovascular	16 (55.2)	18 (52.9)	1.000 ⁵	9 (81.8)	0.097 ³
Pulmonar	4 (13.8)	5 (14.7)	1.000 ⁵	2 (10.2)	0.941 ³
Gastrointestinal	5 (17.2)	5 (14.7)	0.721 ⁵	0	0.349 ³
Neurológica	3 (10.3)	6 (17.6)	0.488 ⁵	0	0.277 ³
Neoplasias	1 (3.4)	0	0.460 ⁵	0	0.455 ³

¹Frecuencia (%) ²Mediana e Intervalo ³X² ⁴U- Mann Whitney ⁵Fisher ⁶Kruskal Wallis

[‡] Comparaciones entre grupo DHA y AO [†] Comparaciones entre el grupo DHA, AO y decesos

10.2 Microorganismos aislados. Se confirmó sepsis con aislamiento de microorganismo en hemocultivo en 43 neonatos, en uno de ellos además del aislamiento en sangre se confirmó también en líquido cefalorraquídeo (*Serratia marcescens*). El principal microorganismo aislado fue *Estafilococo coagulasa negativo* (SNC), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). En 20 neonatos no se logró aislamiento, únicamente se realizó el diagnóstico de sepsis clínica (Cuadro 3).

Cuadro 3. Principales microorganismos aislados por grupo

Microorganismo	DHA ¹	AO ¹	Valor de P ²
	n = 29	n = 34	
<i>Estafilococo coagulasa negativo</i>	7 (24.1)	11 (32.4)	0.580
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7 (24.1)	1 (2.9)	0.019
<i>Enterobacter cloacae</i>	2 (6.9)	1 (2.9)	0.590
<i>Citrobacter freundii</i>	0	1 (2.9)	1.000
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (10.3)	1 (2.9)	0.326
<i>Serratia marcescens</i>	1 (3.4)	2 (5.9)	1.000
<i>Candida parapsilosis</i>	1(3.4)	0	0.460
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 (3.4)	2 (5.9)	1.000
<i>Escherichia coli</i>	0	2 (5.9)	0.495
Sin aislamiento	7 (24.1)	13 (38.2)	0.284

¹Frecuencia (%) ²Fisher

10.3 Citocinas

En el cuadro 4 se describen las concentraciones plasmáticas (datos crudos) de cada una de las citocinas en el tiempo basal (día del diagnóstico), al día 7 y día 14, respectivamente.

Cuadro 4. Concentraciones plasmáticas de citocinas

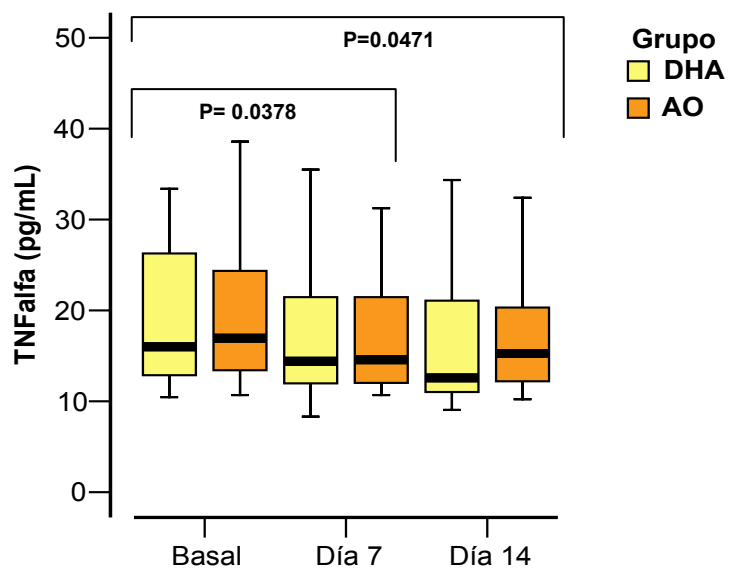
Citocina	Día de estudio	Grupo		Valor de P ²
		DHA ¹	AO ¹	
TNF- α	Basal	15.98, 10.46 - 511.65	16.95, 10.68 - 241.85	0.862
	7	14.42, 8.30 - 49.15	14.55, 10.68 - 31.24	0.814
	14	12.56, 9.03 - 41.85	15.26, 10.23 - 34.35	0.403
IL-1 β	Basal	3.00, 1.18 - 10.07	3.46, 0.80 - 81	0.611
	7	2.64, 0.85 - 10.07	2.49, 1.06 - 8.27	0.988
	14	2.77, 0.68 - 8.15	2.68, 0.64 - 10.36	0.438
IL-6	Basal	31.84, 4.46 - 304.51	48.60, 5.94 - 328.83	0.117
	7	11.67, 3.17 - 84.08	17.08, 1.74 - 287.81	0.282
	14	13.89, 2.87 - 304.51	9.19, 1.14 - 89.71	0.492

¹ Mediana, intervalo

² Prueba de U-Mann Whitney

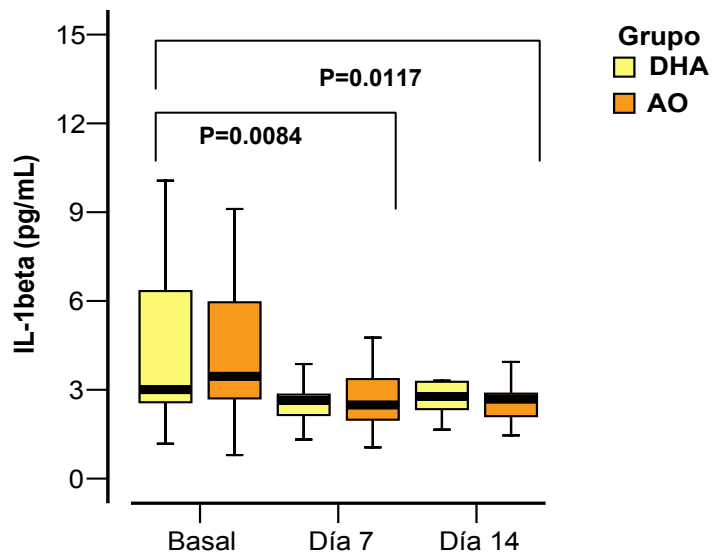
10.3.1 Factor de necrosis tumoral- α : Se observó en ambos grupos una reducción significativa de las concentraciones plasmáticas de TNF- α de la determinación basal al día 7, y de la determinación basal al día 14, sin encontrar diferencias entre ellos (Gráfica 1; cuadro 4).

Gráfica 1. Concentraciones plasmáticas de TNF- α



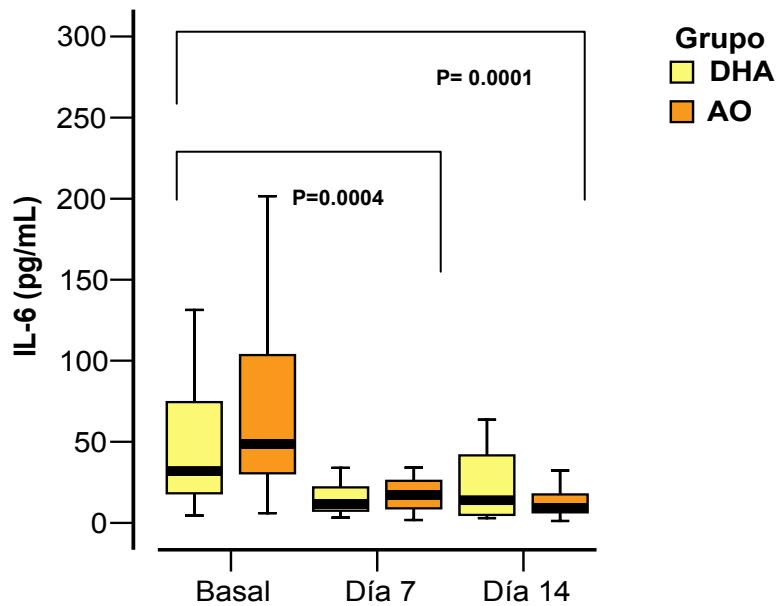
10.3.2 Interleucina 1 β . El comportamiento fue similar al de TNF- α ya que las concentraciones plasmáticas de IL-1 β en ambos grupos disminuyeron significativamente de la determinación basal al día 7 y de la determinación basal al día 14, sin diferencia entre grupos (Gráfico 2; cuadro 4).

Gráfica 2. Concentraciones plasmáticas de IL-1 β



10.3.3 Interleucina 6. El patrón de las citocinas mencionadas también se presentó en las concentraciones plasmáticas de IL-6, las cuales se redujeron durante la primera semana, observándose en concentraciones similares en la segunda semana en ambos grupos, sin mostrar diferencias significativas entre ellos (Gráfica 3; cuadro 4).

Gráfica 3. Concentraciones plasmáticas de IL-6



10.4 Análisis de intención a tratar. Se realizó un análisis de intención a tratar para cada paciente en relación a cada citocina. En él se incluyó a los sesenta y tres pacientes que completaron el estudio, así como a los once decesos. Se consideró como mejoría la reducción de las concentraciones plasmáticas de la determinación basal al día 14, así como de la determinación basal al día 7, y sin mejoría a los niños cuyas concentraciones de citocinas no disminuyeron o se incrementaron. En el grupo sin mejoría se agregaron a los decesos por tipo de suplementación. El resultado fue similar a lo que se observó en los pacientes que completaron el estudio; al incluir el grupo de decesos no se observaron diferencias entre los grupos.

Cuadro 5. Análisis de intención a tratar

Citocina y tiempo de estudio	GRUPO				Valor de P ²
	DHA ¹ n = 34		AO ¹ n = 40		
	Mejoría	No mejoría	Mejoría	No mejoría	
TNF- α , día 14 - 1	19 (55.9)	15 (44.1)	22 (55)	18 (45)	1.000
TNF- α , día 7 - 1	17 (50)	17 (50)	21 (52.5)	19 (47.5)	1.000
IL-1 β , día 14 - 1	20 (58.8)	14 (41.2)	25 (62.5)	15 (37.5)	0.814
IL-1 β , día 7 - 1	23 (67.6)	11 (32.4)	25 (62.5)	15 (37.5)	0.807
IL-6, día 14 - 1	20 (58.8)	14 (41.2)	30 (75)	10 (25)	0.212
IL-6, día 7 - 1	24 (70.6)	10 (29.4)	25 (62.5)	15 (37.5)	0.622

¹Frecuencia (%) ²Fisher

10.5 Variables confusoras. El grupo DHA recibió un mayor aporte de leche de la propia madre comparado con el grupo que recibió aceite de oliva. No se encontraron diferencias en el uso de anti-inflamatorios, en la gravedad del padecimiento evaluado con la escala SNAP-II, en el contenido tisular de DHA o del total de ácidos grasos omega 3 al ingreso.

Durante el estudio se presentaron nuevos eventos que pudieron desencadenar una respuesta inflamatoria adicional a la sepsis como una cirugía y sobreinfección. Diez neonatos requirieron cirugía durante la segunda semana de estudio, tres del grupo DHA (esternotomía, esofagostomía y funduplicatura-gastrostomía) y siete del grupo AO (cuatro esternotomías, una traqueostomía, una fístula sistémica pulmonar y un cierre de conducto arterioso). Las sobreinfecciones correspondieron a un caso de neumonía en el grupo DHA y a una infección de herida quirúrgica en el grupo AO ambas ocurrieron durante la segunda semana de estudio (Cuadro 6).

Cuadro 6. Variables confusoras.

	Grupo DHA	Grupo AO	Valor de P
	n = 29	n = 34	
Al ingreso del estudio:			
Gravedad del padecimiento (SNAP II) ²	16, 0 - 35	16, 0 - 35	0.785 ⁴
DHA tisular, % ²	3.3, 1 - 11.3	3.1, 1.5 - 15	0.832 ⁴
Ácidos grasos n-3 tisulares, % ²	3.6, 1 - 12.4	3.5, 1.5 - 17	0.987 ⁴
Cuenta leucocitaria ² , células/mm ³	12 300, 3 750 - 27 200	14 050, 2 080 - 37 800	0.310 ⁴
Durante el estudio:			
Anti-inflamatorios			
a) Esteroides ¹	14 (48.3)	11 (32.4)	0.198 ³
Duración, días ²	2, 1 - 4	2, 1 - 11	0.647 ⁴
b) No esteroides ¹	20 (69)	18 (52.9)	0.195 ³
Duración, días ²	4, 2 - 13	6, 2 - 13	0.119 ⁴
Ingestión de leche humana, kcal/kg/d ²			
1ª. Semana	35.5, 1.3 - 131	0.59, 0 - 43.5	< 0.001 ⁴
2ª. Semana	62.2, 0 - 146.1	0.31, 0 - 57.8	< 0.001 ⁴
Intervención quirúrgica durante estudio ¹	3 (10.3)	7 (20.6)	0.319 ⁵
Sobreinfección ¹	1 (3.4)	1 (2.9)	1.000 ⁵

¹ Frecuencia (%)

² Mediana, intervalo

³ χ^2

⁴ U-Mann Whitney

⁵ Fisher bilateral

10.6 ANOVA para mediciones repetidas para controlar por potenciales confusores

Al realizar las comparaciones con mediciones repetidas controlando por los potenciales confusores, se encontró que hubo una reducción de las concentraciones plasmáticas de IL-1 β y de IL-6 a través del tiempo en el día 7 y 14 respecto a los valores basales. Después de controlar por la gravedad del padecimiento, cuenta leucocitaria, ingestión de leche humana, intervención quirúrgica, sobreinfección y uso de antiinflamatorios hubo una reducción mayor en las concentraciones de IL-1 β en el grupo DHA (-3.124 pg/mL; $p = 0.02$), comparado con el grupo AO, mientras que para las concentraciones de IL-6 hubo una tendencia estadística hacia la reducción en el grupo DHA (-18.82 pg/mL; $p = 0.08$) comparado con el grupo AO; sin embargo, en el TNF- α no se observó ningún efecto a través del tiempo o entre grupos (Cuadro 7, 8 y 9).

En los modelos lineales generalizados para realizar la ANOVA para mediciones repetidas también se incluyeron el contenido tisular de DHA al ingreso del estudio, la relación omega6:omega3 tisular, la prematurez, el uso de ventilador y la duración de la misma sin encontrarse diferencias en el efecto en el tiempo y en las diferencias entre grupos.

Cuadro 7. ANOVA para mediciones repetidas

Variable dependiente IL-1 β

Termino	Coefficiente	SE Coeficiente	T	Valor de P
Constante	5.898	2.349	2.51	0.013
SNAP II	0.00047	0.05878	0.01	0.994
Leucocitos, cél/mm ³	-0.000092	0.000087	-1.06	0.290
Leche humana, kcal/kg	0.02132	0.02482	0.86	0.392
Uso de antiinflamatorios	-0.9030	0.8754	-1.03	0.304
Intervención quirúrgica	-1.281	1.897	-0.67	0.501
Sobreinfección	-0.854	3.453	-0.25	0.805
Con post-prueba de Dunnet				
	Diferencia medias	SE de la diferencia	T	Valor de P ajustado
Tiempo				
*Día 7	-3.426	1.575	-2.176	0.0289
*Día 14	-3.933	1.791	-2.196	0.0275
**Grupo DHA	-3.124	1.542	-2.025	0.0224

* comparado con el basal

** comparado con grupo AO

Cuadro 8. ANOVA para mediciones repetidas

Variable dependiente IL-6

Termino	Coefficiente	SE Coeficiente	T	Valor de P
Constante	14.37	20.78	0.69	0.490
SNAP II	0.0648	0.5138	-0.13	0.900
Leucocitos, cel/mm ³	0.000421	0.000764	0.55	0.582
Leche humana, kcal/kg	-0.0686	0.2133	-0.32	0.748
Uso de antiinflamatorios	-11.794	8.217	-1.44	0.154
Intervención quirúrgica	-8.85	16.18	-0.55	0.585
Sobreinfección	66.97	34.69	1.93	0.056
Con post-prueba de Dunnet				
	Diferencia medias	SE de la diferencia	T	Valor de P ajustado
Tiempo				
*Día 7	-33.31	13.96	-2.387	0.0174
*Día 14	-43.21	15.53	-2.782	0.0060
**Grupo DHA	-18.82	13.46	-1.398	0.0822

* comparado con el basal ** comparado con grupo AO

Cuadro 9. ANOVA para mediciones repetidas

Variable dependiente TNF- α

Termino	Coeficiente	SE Coeficiente	T	Valor de P
Constante	-3.24	13.36	-0.24	0.808
SNAP II	-0.2815	0.3364	-0.84	0.404
Leucocitos, cel/mm ³	0.000637	0.000504	1.26	0.208
Leche humana, kcal/kg	-0.1231	0.1479	-0.83	0.407
Uso de antiinflamatorios	-7.389	5.340	-1.38	0.169
Intervención quirúrgica	-1.63	10.85	-0.15	0.881
Sobreinfección	0.37	19.84	0.02	0.985
Con post-prueba de Dunnet				
	Diferencia medias	SE de la diferencia	T	Valor de P ajustado
Tiempo				
*Día 7	-11.71	9.172	-1.277	0.1713
*Día 14	-10.09	10.345	-0.975	0.2660
**Grupo DHA	9.033	8.832	1.023	0.8459

* comparado con el basal

** comparado con grupo AO

11. Discusión.

Los resultados de este trabajo muestran un efecto positivo de la administración enteral del DHA sobre la respuesta inflamatoria de neonatos con sepsis. Esto se aprecia por una reducción mayor de las concentraciones plasmáticas de IL-1 β en los neonatos que recibieron DHA comparados con aquellos que recibieron aceite de oliva, a los días 7 y 14 de suplementación.

Estos resultados son similares a los de Tomobe y cols., quienes reportaron la reducción en la expresión del mRNA de IL-6 e IL-1 β en orejas de ratones sensibilizadas con 2,4 dinitro-1-fluorobenceno; y con los de Mayer y cols., que encontraron una elevación 30% menor de IL-1 β y TNF- α en monocitos estimulados de adultos sépticos quienes recibieron 35 g/día de ácidos grasos n-3 por NPT comparados con los que recibieron ácidos grasos n-6.^{28,31} De manera análoga Weiss y cols., encontraron que la administración de 10 g de aceite de pescado, rico en ácidos grasos n-3, por NPT durante 5 días post-cirugía resultó en menores concentraciones de IL-6 plasmáticas que en las concentraciones determinadas en el grupo control.⁴³

Con respecto al TNF- α en nuestro estudio no encontramos ningún efecto de la suplementación con DHA, probablemente debido a que esta citocina no es un buen indicador de la respuesta inflamatoria como lo son sus receptores solubles sTNFR1 y sTNFR2; esto fue propuesto por Rumalla y cols., quienes reportaron en pacientes con falla cardiaca que las concentraciones del sTNFR2 fueron más altas en el grupo con falla cardiaca comparado con un grupo sin falla cardiaca, mientras que las concentraciones de TNF- α no fueron diferentes entre los grupos.⁴⁴

Nuestros hallazgos son también consistentes con los encontrados en otros modelos de respuesta inflamatoria, como en el estudio de Espersen y cols., quienes reportaron una disminución significativa de las concentraciones plasmáticas de IL- β mientras que no se presentaron diferencias en las concentraciones de TNF- α en pacientes con artritis reumatoide que recibieron 3.6 g de ácidos grasos n-3 durante 12 semanas.⁴⁵

Interesantemente en los estudios referidos previamente, la intervención con ácidos grasos n-3 se realizó por diferentes períodos de tiempo antes de la exposición a la infección, o bien con altas dosis por NPT. A nuestro conocimiento no existen reportes del efecto de la administración de DHA por vía enteral durante la sepsis sobre las concentraciones de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en neonatos, es decir cuando ya se había disparado la respuesta inflamatoria. Esto es sumamente trascendente porque sugiere que se puede proporcionar el efecto benéfico de los ácidos grasos n-3 incluso en aquellos sujetos quienes ya presentan cuadro infeccioso.

Dentro de las limitaciones del presente estudio consideramos que el grupo que recibió aceite de oliva no cumplió totalmente la función de placebo, por lo que reconocemos que no fue un control adecuado ya que se ha demostrado que este aceite tiene también ciertas propiedades anti-inflamatorias al inhibir la síntesis de ácido araquidónico, de prostaglandina E₂ y de tromboxano A₂; sin embargo, a pesar del efecto modulador del aceite de oliva, en nuestro estudio encontramos menores concentraciones de citocinas en el grupo DHA. Es probable que las propiedades anti-inflamatorias del aceite de oliva actúen por mecanismos

diferentes o por lo menos que la intensidad de su efecto sea menor que la de los ácidos grasos n-3.^{46, 47, 48, 49}

Nuestros resultados, obtenidos de la administración enteral de DHA durante la sepsis, son comparables con los de otros estudios en los que los ácidos grasos n-3 se administraron a sujetos con sepsis pero por NPT.^{29, 31, 32, 33} La diferencia con estos estudios es que nuestros resultados sugieren que se pueden proporcionar los beneficios de estos ácidos grasos a sujetos con cuadros infecciosos que no son candidatos a este tipo de alimentación (NPT).

En el presente trabajo no se observaron efectos colaterales que pudieran ser atribuidos a la suplementación con ácidos grasos en ninguno de los dos grupos como sangrado asociado a la inhibición de tromboxano A₂. Este eicosanoide participa en la formación del tapón plaquetario. Al respecto estudios en adultos en los que se administró 1.2 g y 1.89 g de DHA durante 1 mes han demostrado que no existen cambios en la función plaquetaria ni en el tiempo de sangrado.^{50, 51} De manera análoga se ha reportado en prematuros suplementados durante cinco semanas con una fórmula rica en aceite de pescado con alto contenido de EPA (2.7%), tiempos de sangrado más largos comparados con los niños que recibieron una fórmula estándar, aunque dentro de límites normales.⁵²

Por otro lado, tampoco se reportaron incidentes en cuanto a la administración de una sustancia oleosa, sólo se presentó un caso de sobre infección por neumonía en el grupo DHA y no correspondió a los niños que recibieron el suplemento por vía bucoenteral.

El efecto del DHA en la respuesta inflamatoria es importante porque sugiere que su suplementación favorece una respuesta inflamatoria atenuada, pero suficiente para enfrentar el reto infeccioso. Sin embargo, lo anterior tendrá que ser demostrado con un diseño apropiado.

En resumen, el presente estudio proporciona evidencias de que la administración de DHA por vía enteral en situaciones en que la respuesta inflamatoria ya se encuentra activada, disminuye las concentraciones de citocinas IL-1 β y tiende a la reducción de IL-6, lo que se puede traducir como una modulación de dicha respuesta.

12. Conclusión.

En el presente estudio la administración del DHA por vía enteral durante la sepsis disminuyó las concentraciones plasmáticas de IL-1 β en neonatos.

13. Recomendaciones.

1. Para futuros estudios, sería conveniente incluir un tercer grupo que sea un verdadero placebo, donde no se administre nada que module la respuesta inflamatoria y así determinar el efecto positivo del DHA sin la subestimación que pudo generar el aceite de oliva.
2. La determinación de receptores solubles para TNF- α en lugar de TNF- α , podría ser un mejor indicador de la respuesta inflamatoria.
3. Hacen falta más estudios epidemiológicos o ensayos clínicos fase III para confirmar el efecto benéfico de la administración del DHA a neonatos con datos de respuesta inflamatoria sistémica sugerentes de sepsis para atenuar las concentraciones de citocinas plasmáticas.

14. Referencias bibliográficas

1. Mayer K, Seeger W, Grimminger F. Clinical use of lipids to control inflammatory disease. *Curr Op Clin Nutr Metab Care* 1998; 1:179-184.
2. Mancilla J. Utilidad de las citocinas en el diagnóstico de sepsis neonatal. *Medicina basada en evidencias. Bol Med Hosp. Infant Mex* 2000; 57:581-588.
3. Goldstein B, Giroir B, Ranhdolph A. International pediatric sepsis consensus conference: Definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005; 6:2-8.
4. Falconer AE, Carr R, Edwards SW. Impaired neutrophil phagocytosis in preterm neonates: lack of correlation with expression of immunoglobulin or complement receptors. *Biol Neonate* 1995; 68: 264-9.
5. Hanson L, Hoglund A, Lundin S, Karlsson M, Dahlgren U, Ahlstedt S, Telemo E. Early determinants of immunocompetence. *Nutr Rev* 1997;55:12-20
6. Bone RC, Grdzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997; 112:235-243.
7. 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.
8. Angele MK, Faist E. Clinical review: Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 2002; 6:298-305.
9. Hotchkiss R. and Kart I. The Pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;9:138-150

10. Marchant, Aa, Bryns, C, Vandenabeele, P, Ducarme, M, Gerard, C, Delvaus, A. Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *J Immunol* 24, 1167-1171.
11. www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=19116/cytokines 2007: mayo 3; 8:56 hrs.
12. Tracey KJ and Cerami A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med* 1993; 21:S415-422.
13. Corti A et al. Antigenic regions of tumor necrosis factor alpha and their topographic relationships with structural/functional domains. *Mol Immunol* 1992; 471-499.
14. Michie II, Wilmore DW. Sepsis and tumor necrosis factor: bedfellows that cannot be ignored. *Arch Surg* 1990; 125:653-654.
15. Dinarello CA. Biologic basis for Interleukin-1 in disease. *Blood* 1996: 87:2095-2147
16. Dinarello C. Interleukin-1 β . *Crit Care Med* 2005;33:S460-S462
17. Song M, Kellum J. Interleukin- 6. *Crit Care Med* 2005; 33: S463-S465
18. Bihl MP et al. Identification of a novel IL-6 isoform binding to the endogenous IL-6 receptor. *Am J Respir Cell and Mol Biol* 2002; 27:48-56.
19. Atici A, Satar M, Cetiner S, Yaman A. Serum tumor necrosis factor alpha in neonatal sepsis. *Am J Perinatol* 1997; 14:401 - 404.

20. Weeks JW, Reynolds L, Taylor D, Lewis J, Wan T, Gal SA. Umbilical cord blood interleukin-6 levels and neonatal morbidity. *Obstet Gynecol* 1997;90:815-818
21. Kurtoglu S, Caksen H, Kurtulus I, Basri H, Uzum K, Kilic H. Serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 levels in neonatal sepsis. *Pediatr Emerg Care*. 2003;19:749-57
22. Rodríguez M, Tovar A, Prado M, Torres N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Rev Invest Clin* 2005; 57: 457-72.
23. Linder M. Nutrition and metabolism of fats En: Linder M, ed. *Nutritional biochemistry and metabolism*. 2nd edition. New York: Elsevier Science Publishing Company, 1991: 52-85.
24. 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.
25. Kelley DS. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition* 2001; 17:669-673.
26. Grimm H, Mayer K, Mayser P, Eigenbrodt E. Regulatory potencial of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. *Br J Nutr* 2002; 87:S59-S67
27. Schauder P, Rohn U, Schafer G, Korff G, Schenk HD. Impact of fish oil enriched total parenteral nutrition on DNA synthesis, cytokine release and

- receptor expression by lymphocytes in the post-operative period. *Br J Nutr* 2002; 87:S103-S110
28. Tomobe Y, Morizawa K, Tsuchida M, Hibino H, Nakano Y, Tanaka Y. Dietary Docosahexaenoic Acid Suppresses in contact Hypersensitivity Reaction in Mice. *Lipids* 2000; 35: 61-69.
29. Schaefer M, Ott J, Mohr A, Hua M, Grosz A, Weissmann N, Ishii S, Grimminger F, Seeger W, Mayer K. Immunomodulation by n-3 versus n-6 rich lipid emulsions in murine acute lung injury- Role of platelet-activating factor receptor. *Crit Care Med* 2007; 35:544-554.
30. Caughey G, Mantzioris E, Gibson R, Cleland G, James M. The effect on human tumor necrosis factor α and interleukin 1 β production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr* 1996;63:116-22
31. Mayer K, Gokorsch S, Fegbeutel C, Hattar K, Rosseau S, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F. Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1321-28.
32. Mayer K, Fegbeutel C, Hattar K, Sibelius U, Kramer HJ, Heuer KU, Temmesfeld B, Gokorsch S, Grimminger F, Seeger W. ω -3 vs. ω -6 lipid emulsions exert differential influence on neutrophils in septic shock patients: impact on plasma fatty acids and lipid mediator generation. *Intensive Care Med* 2003; 29:1472-1481.

33. López M, García P, Del Prado M, Garza C. Breastfeeding protects against the anorectic response to infection in infants. *Adv Exp Med Biol.* 2004:371-74.
34. Klasing K. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. *J Nutr* 1988; 118:1436-1446.
35. López-Alarcón M, Bernabe García 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;22:731-37
36. Vergano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo C, PT Health neonatal sepsis: an international perspective. *Arch Dis Fetal Neonatal* 2005; 90:220-224. 37
37. Reporte del Comité de Infecciones Nosocomiales del Hospital de Pediatría, C. M. N. Siglo XXI, IMSS, 2006-2007.
38. Pagano M. Hypothesis testing En: Pagano M, Gaurvreadu K. *Principles of biostatistics.* Belmont; Duxbury Press, 1193; 1:211-34.
39. Comisión of the European Communities. Commission Directive 96/a/EC of February 16, 1996 Amending Directive 91/321/EEC on infant formulae and follow on formulae. Commission of the European Communities, 1996.
40. Reglamento de la Ley General de salud en Materia de Investigación para la Salud. *Diario Oficial de la Federación de los Estados Unidos Mexicanos*, 7 de Feb de 1984.

41. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. http://www.wma.net/s/policy/17-c_s.html.
42. Rothman KJ, Michels KB, Baum M. For and against: Declaration of Helsinki should be strengthened. *BMJ* 2000; 321:442-45.
43. 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.
44. Rumalla V, Calvano S, Spotnitz A, Krause T, Hilkert R, Lin E, Lowry S. Alterations in immunocyte tumor necrosis factor receptor and apoptosis in patients with congestive Heart failure. *Ann Surg* 2002; 236:254-260.
45. Espersen G, Grunnet N, Lervang H, Nielsen G, Thomsen B, Faarvang K, Dyerberg J, Ernst E. Decreased interleukin-1 beta levels in plasma from rheumatoid arthritis patients after dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Clin Rheumatol* 1992; 11:393-395.
46. Bartolí, R; Fernández-Bañares, F; Navarro, E; Castellà, E; Mañé, J; Alvarez, M; Pastor, C; Cabré, E; Gassull, M A. Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E2 synthesis. *Gut* 2000; 46:191-199.
47. Camuesco D, Gálvez J, Nieto A, Comalada M, Rodríguez M, Concha A, Xaus J, Zarzuelo A. Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-Induced colitis. *J Nutr* 2005; 135:687-694

48. Ksiazyk, JB; Helmin, A; Kostecka, E; Michalkiewicz, J; Kubiszewska, I. Effect of olive oil-based emulsion (clin -oleic 20%) and soybean – oil based emulsion (intralipid 20%) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) activation in vitro. *JPGN* 2004; 39:Ps19.
49. Kew S, Mesa M, Tricon S, Buckley R, Miniame A, Yaqoob P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:674-81.
50. Elmadfa I, Stroh S, Brandt K, Schlotzer E. Influence of a single parenteral application of a 10% fish oil emulsion on plasma fatty acid pattern and the function of thrombocytes in young adult men. *Ann Nutr Metab* 1993; 37:8-13.
51. Nilsen DWT, Dalaker K, Norday A, Osterud B, Ingebretsen OC, Lyngmo V, Almdahl S, Vaage J, Rasmussen K. Influence of a concentrated ethylester compound of n-3 fatty acids on lipids, platelets and coagulation in patients undergoing coronary bypass surgery. *Thromb Haemost* 1991;66:195-201
52. Uauy R, Hoffman DR, Birch EE, Birch DG, Jameson DM, Tyson JE. Safety and efficacy of omega-3 fatty acids in the nutrition of very-low-birth-weight infants: Soy oil and marine oil supplementation of formula. *J Pediatr* 1994; 124:612-620.
53. 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

54. Gordon A, Chumlea W, Roche AF. Stature, recumbent length, and weight
En; Lohman T, Roche A, Martorell R ed. Anthropometric standardization
reference manual. Champaign: Human Kinetics Books, 1988:3-8.
55. Callaway W, Chumlea W, Bouchard C, Himes JH, Lohman TG, Martin AD,
Mitchel CD, Mueller WH, Roche AF, Seefeldt VD. Circumferences EN:
Lohman T, Roche A, Martorell R ed. Anthropometric standardization
reference manual, Champaign: Human Kinetics Books, 1988:39-54

15. Anexos.

1. Inmuno-ensayo para determinación cuantitativa de concentraciones de TNF- α , IL-1 β e IL-6 humana en cultivos celulares, suero y plasma
2. DHA en eritrocitos. Separación de lípidos y determinación del perfil de lípidos.
3. SNAP II (Simplified newborn illness severity and mortality risk)
4. Técnicas antropométricas
5. Consentimiento informado
6. Hoja de recolección de datos
7. Hoja de enfermería.

1. Inmuno-ensayo para determinación cuantitativa de concentraciones de TNF- α , IL-1 β e IL-6 humana en cultivos celulares, suero y plasma

Colección de muestras y almacenaje

Cultivos celulares: se remueven partículas por centrifugación y se hace el ensayo inmediatamente, o se almacenan a una temperatura ≤ -20 C. Evitar repetir ciclos de congelar-descongelar.

Suero: se utiliza un tubo separador de suero y se permite la coagulación de las muestras 30 minutos antes de la centrifugación por 15 minutos aproximadamente a 1000 por g. Se remueve el suero y se coloca en un tubo de ensaye inmediatamente o se almacena a ≤ -20 C. Evitar repetir ciclos de congelar-descongelar.

Plasma: se colecta plasma usando citrato, Heparina o EDTA como anticoagulante. Se centrifuga por 15 min. a 1000 r.p.m. en los primeros 30 minutos de colección. Se coloca en un tubo de ensaye inmediatamente o se almacena a ≤ -20 C. Evitar repetir ciclos de congelar-descongelar.

Preparación de reactivos

Tener reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

Buffer de lavado: si se forman cristales en el concentrado, se aplica calor y mezcla suavemente hasta que estos se hayan disuelto. Diluir 20 mL del Buffer concentrado en agua destilada para preparar 500 mL de solución.

Solución de substrato: se mezclan reactivos de color A y B en volúmenes iguales 15 minutos antes de usarse. Proteger de la luz. Se requiere utilizar 450 μ L para TNF- α , 350 μ L para IL-1 β y 250 μ L para IL-6 de la mezcla resultante.

TNF- α , IL-1 β e IL-6 estándar: reconstituir TNF- α , IL-1 β e IL-6 estándar con 5 mL de diluyente calibrador RD5 para cultivos celulares y RD6C para suero o plasma, esto origina 250 pg/mL de solución de almacenaje. Permitir asentamiento del estándar por 15 minutos como mínimo con agitación gentil antes de efectuar las diluciones.

Pipetear 500 μ L del calibrador diluyente correcto dentro de cada tubo. Usar la solución de almacenaje. Mezclar cada tubo antes de la siguiente transferencia. La solución no diluida de TNF- α , IL-1 β e IL-6 sirve como el estándar alto (250 pg/mL) y el calibrador correcto como estándar cero (0 pg/mL).

Procedimiento del ensayo

1. Preparar reactivos y estándares.
2. Remover exceso de tira de microplacas.
3. Para suero o plasma, agregar 50 μ L de diluyente de ensayo RD1C a cada recipiente. Mezcle antes y durante su uso.
4. Para cultivos celulares inicie en el paso tres.
5. Aspirar y lavar tres veces.

6. Agregar 200 μL conjugados en cada recipiente, para suero o plasma incubar 2 horas a temperatura ambiente, para cultivos celulares incubar 1 hora.
7. Aspirar y lavar tres veces.
8. Agregar 200 μL de solución de sustrato a cada recipiente, incubar 20 minutos y proteger de la luz.
9. Agregar 50 μL de solución de sustrato a cada recipiente. Leer a 450 nm a los 30 minutos. Corrección λ a 540 o 570 nm.

Calculo de resultados

Promedio de las lecturas duplicadas de cada estándar, control y muestra, y resta del promedio estándar cero de la densidad óptica.

Se crea una curva estándar por reducción de datos, usando un software capaz de generar 4 parámetros logísticos. Como alternativa, se puede construir una curva utilizando la media de absorción de cada estándar en el eje de las y en el eje x la concentración

2. DHA en eritrocitos. Separación de lípidos y determinación del perfil de lípidos.

- Una vez separados los leucocitos, los eritrocitos depositados en un tubo se lavan de 3-5 ocasiones con solución fisiológica aforado al volumen sanguíneo, a 2500 rpm por 15 min., posteriormente depositan en un vial eppendorf para congelarse a -70°C .
- 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 mL 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).

3. SNAP II (Simplified newborn illness severity and mortality risk score)

Escala empleada en el recién nacido para evaluar la gravedad de la enfermedad y el riesgo de mortalidad. Las variables que la componen son: presión arterial media, temperatura, presión de oxígeno (PO₂) medida en mm/Hg. además de la fracción inspirada de oxígeno (FIO₂) expresada en porcentaje, empleada en caso de ventilación asistida; pH sérico, y la uresis horaria cuantificada en ml/hr. La calificación máxima corresponde a 115.⁵³

Cuadro 10. SNAP II (Simplified newborn illness severity and mortality risk score)

SNAP II (Simplified newborn illness severity and mortality risk score)	
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 ₂ /Fio ₂ 1.0 - 2.49	5
Relación PO ₂ /Fio ₂ 0.3 – 0.99	16
Relación PO ₂ /Fio ₂ < 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

4. Técnicas antropométricas

Peso corporal

Técnica recomendada.

Durante la infancia, se utiliza una balanza con charola, con pesos movibles. La charola debe ser de al menos 100 cm. de largo de tal forma que soporte un niño de 2 años de edad en el percentil 95 para su longitud. Se deja una cobija sobre la escala todo el tiempo y la escala es calibrada a cero y a través del rango de pesos esperados, cuando solamente la cobija está sobre la escala, se usan objetos de prueba de pesos conocidos. La calibración es realizada mensualmente y siempre que la balanza sea movida. Cuando la balanza no esté en uso, el señalador de la escala debe colocarse en cero.⁵⁴

El niño, con o sin un pañal, es colocado sobre la balanza de tal forma que el peso sea distribuido igualmente en cada lado del centro de la charola. El peso es registrado, lo más cercano a 10 g, cuando el niño está inmóvil, lo cual requiere de paciencia. Cuando un niño está inquieto, es posible pesar a la madre cuando carga al niño y pesar a la madre sin el niño; sin embargo, este procedimiento es parcialmente confiable, debido a que el peso de la madre puede ser registrado lo más cercano a 100 g. Es mejor posponer la medición y tratar más tarde. La medición es repetida 3 veces y el promedio es registrado después de excluir cualquier valor claramente erróneo. Si un pañal está usado, el peso del pañal es restado del peso observado debido a que la mayoría de los datos de las referencias para infantes están basados en pesos desnudos.⁵⁴

En una clínica, la medición del peso es registrado en una forma tabulada, para ser graficada. Esta gráfica se hace mientras el sujeto está presente: las irregularidades pueden ser notadas en los datos seriados para un sujeto o puede haber mayores discrepancias entre los niveles de percentiles por variables altamente correlacionadas. Cuando esto ocurre, el medidor verifica la exactitud de la gráfica y mide nuevamente al sujeto para verificar que la gráfica sea correcta.

En estudios para valorar pequeños cambios, los pesos deben ser registrados en tiempos estandarizados en relación a la ingestión, micción y defecación; generalmente esto no es necesario. La longitud es medida en lugar de la talla hasta los dos años de edad.⁵⁴

Propósito.

El peso es la variable antropométrica más comúnmente registrada, y generalmente es medida con suficiente exactitud. La exactitud puede mejorarse atendiendo los detalles de la técnica de medición. Estrictamente, esta medición es de masa más que de peso, pero el último término puede fácilmente ser reemplazado. El peso es una medida de composición de tamaño corporal total. Es importante la evaluación para identificar crecimiento inusual, obesidad y desnutrición.⁵⁴

Literatura.

Hay un acuerdo general de que, el peso debería ser medido usando una balanza con escala de pesos movibles y que una balanza con charola es necesaria para mediciones hechas durante la infancia. El uso de una balanza de baño no es recomendable, a pesar de su mayor movilidad, excepto en condiciones de campo donde esto puede no ser una alternativa práctica. Se pueden conseguir balanzas electrónicas exactas más ligeras que las de escalas de pesos movibles y se espera que las electrónicas reemplacen a las anteriores. Las balanzas automáticas que imprimen el peso directamente sobre un registro permanente son disponibles pero costosas. La balanza debe colocarse con un nivel de plataforma y en una posición donde el medidor pueda hacer la lectura sin tener que rodear al sujeto. Las balanzas con ruedas que facilitan el movimiento de un lugar a otro no son recomendadas, debido a que necesitan calibrarse cada vez que se mueve.

El peso es mejor medido con el sujeto desnudo, el cual es práctico durante la infancia. Si no es posible, se debe estandarizar una ropa ligera.⁵⁴

Hay variaciones diurnas en el peso de cerca de 1 Kg. en niños y de 2 Kg. en adultos. Por lo tanto, el registro del momento del día en que se hacen las mediciones se hace necesario. Usualmente no es práctico medir en un tiempo fijo, pero en un rango estrecho podría lograrse.⁵⁴

Confiabilidad.

Las diferencias intermedidor en el estudio longitudinal de Fels son de 1.2 g (DE= 3.2) de 5 a 10 años. En la encuesta de evaluación de Salud por la NCHS los errores inter e intramedidor fueron cercanos a 1.2 Kg cuando un par de

mediciones se hicieron con un tiempo de dos semanas entre una y otra medición. Cerca del 10 % del error observado podría ser debido al crecimiento.⁵⁴

Longitud corona-talón

Técnica recomendada.

Dos observadores se requieren para medir la longitud, el instrumento para medir se denomina infantómetro. El sujeto permanece en posición supina sobre una tabla. La parte superior de la cabeza (corona) debe tocar la madera vertical fija del infantómetro, y la línea central del cuerpo coincide con la línea central del infantómetro. La cabeza del sujeto es sostenida con el plano de Frankfort alineada perpendicularmente al plano del infantómetro. Los hombros y las nalgas se fijan contra la base del infantómetro, con los hombros y cadera alineados en ángulos rectos a lo largo del eje del cuerpo. Las piernas deben estar totalmente extendidas y la cadera y rodillas caen sobre la base del infantómetro, con los brazos descansando a los lados del tronco. El medidor coloca la cabeza debajo del final de la tabla para asegurar que el sujeto no cambie de posición y para verificar la alineación del cuerpo con el eje a lo largo del infantómetro. El o ella aplican una presión firme con la otra mano para mover la base móvil contra los pies. La longitud es registrada con una precisión cercana a 0.1 cm.⁵⁴

Propósito.

La longitud usualmente se mide en quienes son incapaces de permanecer erectos o para quienes la talla pudiera ser espúrea. Es una importante medición de la longitud esquelética total en infantes. La longitud total se requiere para compararla con la referencia de la NCHS del nacimiento a los 3 años.⁵⁴

Literatura.

La longitud es medida comúnmente en infantes pero no en edades mayores. Esto frecuentemente se omite en textos de antropometría. Debe ser medida sobre una tabla que tiene fija otra tabla en un extremo y en el otro una tabla móvil para llevarla hacia los pies que están perpendiculares a la superficie de la tabla base. Se necesita una cinta a lo largo de uno o ambos lados de la tabla, con el cero al final en la unión de la tabla fija y la superficie.⁵⁴

Hay solamente pequeñas diferencias entre las técnicas de medición reportadas. Para mediciones exactas de la longitud, la cabeza debe estar en firme contacto con la tabla fija. Para niños no cooperadores o niños muy pequeños, puede ser necesario aplicar control suave para asegurar una posición adecuada. Mientras más desviado de la posición estándar esté un niño, más pobre será la confiabilidad y validez de la medición.⁵⁴

Confiabilidad.

La confiabilidad para la longitud debe ser buena. No obstante, debido a que este tipo de longitud es comúnmente medido en niños pequeños, algunos de ellos no cooperadores, la confiabilidad es menor que la talla de edades mayores. La variabilidad del medidor es afectada por la cantidad de presión aplicada a la tabla móvil. La presión deberá ser suficiente para presionar los tejidos blandos de los pies pero no suficiente para alterar la longitud de la columna vertebral. En el estudio longitudinal de Fels, la media absoluta del error entre medidores para niños desde el nacimiento hasta 6 años de edad fue de 0.28 cm.⁵⁴

Perímetro cefálico

Técnica recomendada.

El niño es medido cuando se encuentra en el regazo de su madre. A edades mayores, la circunferencia cefálica se mide cuando el sujeto está sentado, pero pocos niños menores de 36 meses logran permanecer así. Se usa una cinta no elástica de alrededor de 0.6 cm. Objetos adicionales como prendedores se quitan del cabello. El medidor se ubica en el lado izquierdo de la cabeza del niño y coloca la cinta de tal forma que el cero esté sobre el lado de la cabeza. Esto involucra pasar la cinta alrededor de la cabeza y luego, transferir el final de la cinta de una mano a la otra, de tal forma que el cero marque en la cinta inferior el valor que va a ser registrado. La cinta se coloca de tal forma que grandes cantidades del cabello craneal (como trenzas) son excluidos. Anteriormente, se colocaba la cinta justo arriba de las cejas y posteriormente se media la máxima circunferencia. La cinta no necesita estar en el plano horizontal de Frankfort, pero el plano de la cinta deberá ser el mismo en ambos lados de la cabeza. La cinta se estira ligeramente para comprimir el cabello y obtener una medida que se “aproxime” a la circunferencia craneal. La medición se registra con una precisión de 0.1 cm.⁵⁵

Propósito.

La circunferencia cefálica es un componente estándar de la antropometría debido a que se relaciona cercanamente al tamaño del cerebro. Después de 36 meses, el crecimiento en la circunferencia cefálica es lento aunque el cerebro aumenta de peso alrededor de un 30% después de esta edad. La circunferencia cefálica

deberá ser medida también en los padres de los niños cuya circunferencia cefálica sea anormal, debido a que la circunferencia de los padres y la de su hijo están asociadas y existen ecuaciones de ajuste.⁵⁵

Literatura.

Existe amplio acuerdo en relación al uso de la técnica excepto por la suave presión que se usa por algunos trabajadores holandeses y en clínicas de salud suecas. Las mediciones hechas con una cinta de 0.6 cm. de amplitud son ~ 0.5 cm. más pequeñas que aquellas hechas con una cinta de 2 cm. de ancho.⁵⁵

Confiabilidad.

En el estudio longitudinal de Fels las diferencias intermedidor fueron pequeñas e independientes de la edad, con un error de técnica de 0.09 mm y coeficientes de variación de 0.2. Wilmore y Behnke reportaron una correlación de prueba-repetición de la prueba de 0.96 para mediciones en hombres jóvenes con un día de diferencia.⁵⁵

5. Consentimiento informado



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

Carta de consentimiento informado para participar en el proyecto: "Efecto del ácido docosahexaenoico sobre las concentraciones de citocinas de neonatos con sepsis."

Señores Padres de Familia:

Solicitamos su permiso para incluir a su hijo en un proyecto de investigación médica. El objetivo de esta investigación es saber si administrando un nutrimento a su niño cuando está enfermo, se incorpora este nutrimento a células que sirven de defensa contra las infecciones y se recupera más pronto. Este nutrimento se encuentra normalmente en la leche materna por lo que no le causará ningún daño a su niño. Además, tenemos motivos para pensar que éste es el que ayuda a los niños alimentados con leche humana a tener infecciones menos graves y menos frecuentes.

Para llevar a cabo esta investigación es necesario administrar a su niño el nutrimento vía oral. Para realizar las mediciones, tomaremos una muestra de sangre de 2.5 mL cada semana, 3 muestras en total, y procuraremos que se tome cuando se requiera sangre para otros estudios. La realización del estudio requiere que se comparen los resultados de los niños que reciben el suplemento con los de niños que no lo reciban, por lo que su niño puede recibirlo o no, pero lo sabremos 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. Nos comprometemos a manejar sus datos en forma confidencial y a responder cualquier pregunta acerca del proyecto.

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

Dra. Mardia López Alarcón. Mat. 5432146

Responsable del proyecto

ACEPTO PARTICIPAR	<input type="checkbox"/>	SI	<input type="checkbox"/>	NO	Fecha: ___/___/___
Nombre de la madre:	_____			Firma:	_____
Nombre del testigo 1:	_____			Firma:	_____
Nombre del testigo 2:	_____			Firma:	_____
Nombre del médico tratante:	_____			Firma:	_____

7. Hoja de enfermería



HOSPITAL DE PEDIATRIA CMN SIGLO XXI

UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATALES

Nombre _____ cédula _____ sexo _____ edad _____
 fecha _____ hoja No _____
 Diagnóstico _____ cama _____ peso anterior _____
 peso actual _____

FC	FR	T	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1	2	3	4	5	6	7	TRATAMIENTO
+	+	+																									TURNO MATUTINO
190	110	40																									Fórmula: Dextrostix
180	100																										Labstix orina heces
170	90	39																									Laboratorio:
160	80																										Rx Nebulizaciones
150	70	38																									
140	60																										
130	50	37																									
120	40																										
110	30	36																									
100	20																										
90	15	35																									
-	-	-																									
TA sistólica																											TURNO VESPERTINO
Diastólica																											Fórmula: Dextrostix
media																											Labstix orina heces
PVC																											Laboratorio:
Sat O2																											Rx Nebulizaciones
PC/PA																											
Llen cap																											
PPI																											
PPFE																											
Ciclos																											
Ti																											
PMVA																											
FiO2																											
Ingresos VO																											Laboratorio:
Medicamentos																											Rx Nebulizaciones
Sangre y der.																											TURNO NOCTURNO
Soluciones IV																											Fórmula: Dextrostix
NPT																											Labstix orina heces
Otros																											Laboratorio:
Total																											Rx Nebulizaciones
Uresis																											
Evacuación																											
SOG																											
Drenajes																											
Otros																											
Total																											

Notas de enfermería	Notas de enfermería	Notas de enfermería
Firma:	Firma:	Firma:

Gasometría	Medicamentos: dosis y horario	Soluciones parenterales, sangre y derivados. Medicamentos en infusión
-------------------	--------------------------------------	--

Hora						
PH						
PO2						
PCO2						
DB						
HCO3						
Sat O2						
NPT actual	cambios	Laboratorio	anterior	actual		
CHO		Hb				
Prot		Hto				
Lípid		Leucos				
Na		PMN				
K		Bandas				
Líqu		Linfos				
Glu/Kg /min		Plaquetas				
Con glu		Na				
		K				
		Bilirrubinas				
		TGO				
		TGP				
		TP				
		TTP				
		Creatinina				
		Urea				
		BUN				
		Albúmina				
		Cultivos				