

## **INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA**

### **Propuesta de tesis**

“EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO DURANTE EL EMBARAZO SOBRE LOS NIVELES DE LÍPIDOS, LIPOPROTEÍNAS, GLUCOSA E INSULINA SÉRICAS Y TENSIÓN ARTERIAL EN PRE-ESCOLARES HIJOS DE MADRES SUPLEMENTADAS”

Yareni Yunuen Gutiérrez Gómez

[yareni.gutierrez@espm.insp.mx](mailto:yareni.gutierrez@espm.insp.mx)

04455 54 72 43 02

Doctorado en Ciencias en Nutrición Poblacional  
Generación 2009

Director de Tesis

Dr. Juan Rivera Dommarco

Director del Centro de Investigación en Nutrición y Salud  
Instituto Nacional de Salud Pública

Asesores de tesis

Dra. Isabelle Romieu

Nutrition and Metabolism/Nutritional Epidemiology  
International Agency for Research on Cancer

Dr. Mario Flores Aldana

Centro de Investigación en Nutrición y Salud  
Instituto Nacional de Salud Pública

Dra. Hortensia Moreno

Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa  
Departamento de Economía

Cuernavaca, Morelos a 28 de Febrero de 2012.

## Resumen

**Antecedentes:** Evidencia epidemiológica y experimental ha mostrado que las deficiencias nutrimentales prenatales tienen implicaciones a largo plazo en la programación y desarrollo de riesgo cardiovascular en etapas posteriores de la vida. La suplementación con ácido docosahexaenoico (DHA) en adultos ha mostrado efectos cardioprotectores, sin embargo, los efectos de la suplementación prenatal en los factores de riesgo cardiometabólicos de los preescolares descendientes se desconocen. Aprovechando el ensayo clínico controlado aleatorizado doble ciego de suplementación con DHA durante el embarazo y sus efectos en el desarrollo temprano de sus hijos en México, el presente estudio tiene como **objetivo:** Evaluar los efectos de la suplementación con DHA durante el embarazo sobre los niveles de lípidos, lipoproteínas, glucosa e insulina séricas y tensión arterial en pre-escolares hijos de madres suplementadas. **Metodología.** Los participantes de este estudio son todos los pre-escolares hijos de las madres que participaron en el ensayo seguidos a los 4 y 5 años. Se evaluará el efecto de la suplementación en los niveles de lípidos, lipoproteínas, glucosa e insulina séricas en el seguimiento de los niños a los 4 años. El efecto de la suplementación en la tensión arterial se evaluará a los 5 años. Los análisis de los datos se harán tomando en cuenta la intención al tratamiento. Se correrán modelos de regresión lineal múltiple y regresión logística para estimar el efecto de la suplementación en todas las variables de respuesta. **Resultados esperados.** Los hijos de madres suplementadas tendrán menores factores de riesgo cardiometabólico.

Dada la alta prevalencia de enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición, existe una urgente necesidad de implementar acciones para prevenir los factores de riesgo cardiovasculares desde etapas tan tempranas de la vida como la etapa fetal.

## Índice de contenido

Resumen	1
Índice de contenido	2
Introducción	4
Planteamiento del problema	6
Marco teórico y conceptual	
Generalidades	8
Recomendaciones de DHA en el embarazo	8
Transferencia placentaria de ácidos grasos	9
Programación/huella metabólica	9
DHA y perfil metabólico (perfil de lípidos y metabolismo de glucosa)	11
DHA y presión arterial	14
DHA y otras asociaciones	16
Marco conceptual	17
Justificación	18
Objetivo general, objetivos específicos e hipótesis	19
Materiales y métodos	19
Diseño de estudio / Población intervenida	20
Reclutamiento y seguimiento	20
Sujetos de estudio	22
Intervención	22
Variables	22
Evaluación de factores de riesgo cardiometabólicos	23
Tamaño de muestra y análisis estadístico	26
Resultados esperados y aportes del estudio	29
Limitaciones del estudio	29
Cronograma de actividades	31
Consideraciones éticas y de bioseguridad	31
Recursos materiales y financiamiento	32
Referencias bibliográficas	33
Anexo 1. Operacionalización de variables	37
Anexo 2. Cálculo de tamaño de muestra	40
Anexo 3. Cartas de aprobación Comité de Ética, Comisión de bioseguridad y Comisión de investigación proyecto madre	43
Anexo 4. Cartas de aprobación Comité de Ética, Comisión de bioseguridad y Comisión de investigación sub-proyecto: "Omega-3 and allergic diseases in childhood"	46

Anexo 5. Carta de consentimiento informado. Seguimiento a los 4 años	49
Anexo 6. Carta de consentimiento informado. Seguimiento a los 5 años	52
Anexo 7. Autorización de uso de bases de datos (investigadores principales de los proyectos)	55
Anexo 8. Autorización de uso de bases de datos (responsables de los proyectos)	56

## Introducción

Evidencia epidemiológica y experimental ha mostrado que la nutrición en útero y durante las primeras etapas de la vida posnatal tiene grandes implicaciones en la programación de enfermedades metabólicas como obesidad, diabetes tipo 2, hipertensión y enfermedad cardiovascular en etapas posteriores de la vida (Barker, 2004; McMillian, 2005; Uauy 2008; Bouret, 2009).

En adultos se ha mostrado que la ingesta dietética de DHA está inversamente asociada a la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Hu, 2002; Djoussé, 2003; Das, 2008). Sin embargo, los efectos específicos de la suplementación con DHA durante el embarazo sobre la salud cardiometabólica de sus hijos se desconoce.

Algunos estudios en animales y humanos sugieren que la suplementación gestacional con ácido docosahexaenoico (DHA), podría: a. disminuir los niveles de tensión arterial (Begg, 2010; Jayasooriya, 2008; Forsyth, 2003); b. disminuir el IMC (Bergmann, 2007; Ailhaud, 2008) y c. modular la función inmune (estimulando la vía antiinflamatoria) (Gottrand, 2008; Field, 2008; Dunstan 2002) en sus descendientes. En estudios experimentales con ratas, se ha mostrado que la suplementación con DHA durante el embarazo podría mejorar el perfil de lípidos y la resistencia a la insulina (Sato, 2011; Mellouk, 2011; Clarke, 2004). En nuestro conocimiento sólo un estudio en humanos ha evaluado el efecto de la suplementación con aceite de pescado (con alto contenido de DHA) durante el embarazo sobre el perfil de lípidos de sus descendientes. Los resultados no mostraron efectos de la suplementación en las concentraciones de lípidos séricos. Sin embargo, cuando se restringió el análisis al pequeño grupo de participantes hijos de madres con baja ingesta de pescado, se observó una tendencia hacia un perfil de lípidos más saludable en comparación con el grupo control. La tendencia no alcanzó la significancia estadística y esto se pudo deber a la falta de poder (Rytter, 2011).

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) como el DHA podrían tener un rol en esta programación principalmente por tres vías:

- Regulación inmunológica: La participación de los AGPI-CL en la regulación inmunológica se da a través de los eicosanoides, los cuales son mediadores importantes de la inflamación y la respuesta inmune. Las células inflamatorias por lo regular tienen altas proporciones de AGPI n-6 principal sustrato de la síntesis de eicosanoides: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos derivados de las enzimas ciclo-oxigenasa y lipo-oxigenasa mediadores de la respuesta inflamatoria. Los AGPI-CL n-3 (EPA y DHA) compiten por las enzimas ciclo-oxigenas y lipo-oxigenasa promoviendo la síntesis de citocinas anti-inflamatorias y disminuyendo las pro-inflamatorias. Se sabe que las citocinas pro-inflamatorias disminuyen la sensibilidad a la insulina y podrían afectar el metabolismo de lípidos. También, tienen efectos deletéreos sobre el endotelio vascular pudiendo provocar aumentos en la tensión arterial.
- Modificación de la expresión genética de enzimas que participan en el metabolismo energético (metabolismo de glucosa y lípidos), moléculas de adhesión e inflamación. La deficiencia de DHA podría alterar este mecanismo provocando dislipidemia, resistencia a la insulina y mayor adiposidad.
- Estado de DHA en membranas: modifica la composición de fosfolípidos de las membranas celulares otorgándole mayor elasticidad, flujo y funcionalidad (Sijben, 2007) lo cual podría ser benéfico para la tensión arterial.

La nutrición juega un rol clave en el desarrollo, la regulación metabólica y en la respuesta inmune en el feto. Desviaciones tempranas en estos mecanismos podrían favorecer adaptaciones metabólicas tardías llamadas “programación metabólica” que podrían dar como resultado un incremento en el riesgo de enfermedad cardiovascular en etapas posteriores de la vida (Innis, 2011). Por lo anterior, las primeras etapas de la vida podrían ser ventanas de oportunidad para la prevención de enfermedades cardiometabólicas.

Determinar los efectos de la suplementación con DHA durante el embarazo sobre los factores de riesgo cardiovascular modificables en una población con una ingesta dietética menor a la recomendada (Ramírez-Silva, 2011) es de gran relevancia, porque 1. la enfermedad cardiovascular es una de las principales causas de mortalidad en México (INEGI, 2010) y 2. el DHA juega un rol importante en el desarrollo y funcionalidad de la salud metabólica en el feto.

## **Planteamiento del problema**

La enfermedad cardiovascular (ECV) es el principal padecimiento que contribuye a la carga global de enfermedad. La OMS atribuye una tercera parte de las muertes globales (15.3 millones) a dicha afección (WHO, 2003). Los factores de riesgo metabólicos como la hipertensión, hiperglucemia, exceso de peso, sedentarismo, hipercolesterolemia; así como, la baja ingesta de frutas y verduras dan cuenta del 19% de las muertes globales y 7% de los Años de Vida Perdidos por Discapacidad (DALYs). Más aún, los factores de riesgo antes mencionados afectan principalmente la salud cardiovascular (57% de las muertes cardiovasculares pueden ser atribuidas a uno de estos factores de riesgos) (WHO, 2009).

En México, la ECV es una de las principales causas de muerte (representando el 17.2% de la mortalidad) y los factores de riesgo atribuibles a esta enfermedad no escapan de la realidad mundial (INEGI, 2010).

Algunos estudios epidemiológicos indican que el riesgo cardiometabólico se puede desarrollar desde etapas tan tempranas de la vida como la etapa fetal (Barker, 1995).

El medio ambiente metabólico y neuroendocrino del feto y el lactante juega un rol clave en la regulación de la homeostasis energética y la expresión de genes que controlan las reservas energéticas, la oxidación y la respuesta inmune (Innis, 2011). Desviaciones tempranas en estos procesos dan como resultado adaptaciones tardías llamadas programación metabólica que se podrían combinar para aumentar el riesgo de síndrome metabólico en etapas posteriores de la vida (Innis, 2011).

La deficiencia de AGPI-n-3 durante el desarrollo fetal podría contribuir a una programación metabólica e inmunológica de riesgo cardiovascular (Innis, 20011; Sjiben, 2007).

A nivel molecular el DHA tiene efectos en: el metabolismo y control de las reservas energéticas; en la regulación del crecimiento y la función celular y en la coordinación de la comunicación inter e intracelular (Innis, 2011; Rodríguez-Cruz 2005). Se ha demostrado

además que el DHA tiene diferentes roles fisiológicos, altera la composición de las membranas celulares alterando su fluidez y regula el proceso inflamatorio a partir de las síntesis de eicosanoides (Al 2000; Cicero, 2009; Breslow, 2006). Así mismo, los AGPI n-3 regulan la expresión de genes de enzimas involucradas en la síntesis y oxidación de ácidos grasos que dan como resultado mejor perfil de lípidos (menores niveles de triacilglicéridos, VLDL-col, LDL-col y mayores niveles de HDL) y mejor composición corporal (menor porcentaje de grasa corporal) (Breslow, 20006; Innis, 2011).

De acuerdo a la información antes mencionada y dado que, la dieta materna impacta la calidad de ácidos grasos acumulados en el feto y en los tejidos del infante y la ingesta de DHA en mujeres mexicanas es bajo nos preguntamos ¿Cuáles serán los efectos de la suplementación con ácido docasaheptaenoico en el embarazo sobre los niveles de lípidos, lipoproteínas, glucosa e insulina séricas y tensión arterial en pre-escolares hijos de madres que fueron suplementadas?

## **Marco teórico y conceptual**

### **Generalidades.**

Los ácidos grasos esenciales, ácido linoléico (AL) (C18:2n-6) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) (C18:3n-3), representan las familias de ácidos grasos n-6 y n-3 y son llamados esenciales debido a que los mamíferos no pueden incorporar dobles enlaces en las posiciones 3 y 6, por lo que estos, deben estar presentes en la dieta.

Los ácidos grasos de 18 carbonos son convertidos a ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) a través de una serie de desaturaciones y elongaciones. Ambos precursores (AL y ALA) compiten por las mismas enzimas  $\Delta 5$ - y  $\Delta 6$  desaturasas en el proceso de transformación a sus respectivos derivados de mayor tamaño de cadena e insaturación. El principal producto final de la vía del AL (n-6) es el ácido araquidónico (AA), mientras que los productos principales de la vía del ALA (n-3) son el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA;22:6n-3) (Sprecher, 1999).

Las enzimas tienen mayor afinidad por los ácidos grasos n-3 que por la familia n-6. Un aporte dietético con mayor cantidad de AGPI-CL n-6, como ocurre en la dieta actual occidental, puede inhibir significativamente la formación endógena de AGPI-CL n-3, en especial de EPA y DHA (Valenzuela, 2001).

El ALA se encuentra en cantidades relativas en los aceites vegetales extraídos de semillas de soya, canola o linaza. Sin embargo, la fuente más importante de DHA son los organismos vegetales y animales de origen marino, principalmente peces grasos (jurel, atún, sardina, salmón).

### **Recomendaciones de DHA en el embarazo**

Se ha postulado que el embarazo incrementa las demandas de AGPI-CL debido a las necesidades de crecimiento y expansión de tejidos maternos y debido al crecimiento fetal. Las fuentes potenciales de estos ácidos grasos son las reservas maternas, la dieta durante el embarazo y la síntesis endógena a partir del ALA (Koletzko, 2001). El estado de AGPI-CL maternos afecta el estado de los AGPI-CL en el recién nacido, que a su vez reciben DHA a través de la leche materna (AI MD, 2000).

Hasta hace muy poco se comenzaron a discutir las recomendaciones de lípidos en el embarazo, en particular, las recomendaciones del ALA y del DHA.

En el embarazo y la lactancia, el único ácido graso que aumenta los requerimientos es el AGPI-CL n-3. De acuerdo al consenso de expertos del grupo de “trabajo de ingesta de lípidos perinatales”, publicado en el 2007, se recomienda una ingesta promedio de al menos 200 mg DHA/d durante el embarazo y la lactancia. Ingestas de hasta 1g/d de DHA y 2 g/d de ALA se han usado en ensayos clínicos y no se han presentado efectos adversos. La ingesta deseable se puede cubrir con una a dos porciones de pescado de mar a la semana (arenque, jurel, salmón, atún); con la anterior recomendación rara vez se aumenta el riesgo de toxicidad por tóxicos en el pescado (Koletzko, 2007).

### ***Transferencia placentaria de ácidos grasos***

Los AGPI-CL n-3 son incorporados en grandes cantidades en el cerebro fetal y en otros tejidos durante la segunda mitad del embarazo. El AL y el ALA son transferidos a través de la placenta para cubrir las demandas fetales. Sin embargo, debido a las altas demandas fetales en el período perinatal, el feto necesita recibir cantidades considerables de AA y DHA preformado debido a la baja actividad de las enzimas desaturasas en el feto, placenta y recién nacidos. El feto depende entonces, de la ingesta materna de AGPI-CL n-3 y de un adecuado transporte placentario (Hanebutt, 2008; Koletzko, 2007).

Los ácidos grasos son transportados al feto a través de la placenta (por proteínas unidoras de membrana y proteínas de transporte citoplasmáticas) y el intercambio fetal es especialmente alto (50 a 60 mg/día) durante el último trimestre. Aún no es claro, sin embargo, si las necesidades maternas de AGPI-CL n3 durante el embarazo, especialmente de DHA pueda ser satisfecho por la síntesis de precursores de ácidos grasos esenciales y de las reservas, debido a que la eficiencia de conversión de DHA a partir del ALA puede ser baja (Ramakrishnan U, 2010).

### **Programación/Huella metabólica**

Cada día existe mayor evidencia que muestra que el exceso o la deficiencia de diferentes nutrimentos en la etapa prenatal y postnatal temprana juegan un rol crítico en la programación/huella del circuito neuronal de regulación metabólica, lo cual podría predisponer al individuo a un mayor riesgo cardiovascular en la edad adulta (Symonds, 2009; Barker, 1995; Bruce, 2010; Nicoletto, 2011).

La huella metabólica hace referencia a la programación futura de una respuesta metabólica en un individuo, por un estímulo ocurrido durante un período crítico de desarrollo (Waterland, 1999).

Los mecanismos por los cuales los cambios tempranos se mantienen hasta la edad adulta requieren mayor investigación. Existe evidencia que muestra que las alteraciones nutrimentales durante un periodo ontogénico tan crítico e importante como lo es el desarrollo fetal podría provocar: 1. Variaciones inducidas en la estructura de los órganos; 2. Alteraciones en el número de células; 3. Selección clonal; 4. Diferenciación metabólica y 5. Poliploidización del hepatocito (Waterland, 1999). Es probable que mecanismos epigenéticos puedan jugar un rol importante en la programación. Estos consisten principalmente en metilaciones de DNA y modificaciones de histonas (Waterland, 1999; Nicoletto, 2011).

El balance inadecuado de ácidos grasos durante el desarrollo temprano podría contribuir a la programación/huella metabólica (Innis, 2011). Los ácidos grasos en especial los AGPI-CL y sus metabolitos forman parte de las membranas celulares, juegan un rol crítico en el crecimiento celular, diferenciación e integración de la respuesta celular al medio ambiente metabólico y neuroendocrino. Además, los AGPI-CL son moléculas de señalización involucradas en el apetito y metabolismo energético (son sensores metabólicos que contribuyen a la regulación de genes de reserva y oxidación) (Innis, 2011; Rodríguez-Cruz, 2005). Lo anterior proporciona un razonamiento lógico para considerar que los ácidos grasos podrían jugar un rol clave en la programación metabólica.

La alta ingesta de AGPI n-6, común en México, podría desplazar la síntesis de productos de AGPI n-3 (EPA y DHA) porque compiten por las mismas enzimas desaturasas. Lo anterior es relevante pues estos AGPI-CL son transferidos a través de la placenta al feto. Por lo anterior, existe la posibilidad de tener inadecuación en la relación de AGPI-n-6 y AGPI n-3 en el feto. Este imbalance por los motivos que se describirán a continuación podrían dar como resultado una programación fetal de riesgo cardiometabólico.

## **DHA y riesgo cardiometabólico**

### **Perfil de lípidos, metabolismo de glucosa y presión arterial**

#### **DHA y perfil de lípidos**

La suplementación con AGPI n-3 en adultos muestra beneficios en el perfil de lípidos (menores niveles de triacilglicéridos y colesterol), sin embargo; el efecto de la suplementación con este nutrimento en la etapa prenatal en etapas posteriores de la vida es inconsistente.

Estudios en animales han mostrado que la ingesta de ácidos grasos (AG) en la etapa prenatal y en la infancia temprana pueden inducir efectos a largo plazo en el metabolismo de lípidos (Chapman, 2000; Ghafoorunissa, 2008).

En humanos, la evidencia sugiere que los niños alimentados al seno materno tienen mayores concentraciones de colesterol en la infancia temprana, sin embargo estos efectos se traducen a largo plazo en menores niveles de colesterol total en adultos. Se cree que las altas concentraciones de colesterol en la leche materna disminuyen la síntesis endógena de colesterol en el niño. Sin embargo, la leche materna además tiene altas concentraciones de AGPI n-3 los cuales también podrían influir en el metabolismo lipídico (Owen, 2002).

Existen muy pocos estudios que evalúen los efectos de suplementación prenatal o postnatal con DHA sobre el metabolismo de lípidos en la infancia.

Un estudio que evaluó la suplementación por tres meses con aceite de pescado a los 9 meses de vida mostró una disminución en las concentraciones séricas de triacilglicéridos y un aumento en la concentración de LDL-col y colesterol total (Damsgaard, 2006). Es posible que el incremento de colesterol observado sea por el aumento en la ingesta de grasa dietética contenido en el aceite de pescado más que por los AGPI-CL n-3.

Por otro lado, en otro estudio se aleatorizaron recién nacidos a término a uno de dos grupos: 1. Grupo para incrementar la ingesta de AGPI n-3 y disminuir la ingesta de AGPI n-6 (razón 1:5) desde el tiempo del destete hasta los 5 años y 2. Grupo control diseñado para mantener un ingesta de AGPI n3 y AGPI-CL n-6 en un rango de 1:15-1:20 como la población general en ese país (Australia). Los niños fueron seguidos a los 8 años y no se mostró asociación entre la intervención y el perfil de lípidos (Ayer, 2009). Es probable que la programación sea más importante en la etapa prenatal.

En nuestro conocimiento un solo estudio (de muy reciente publicación) ha evaluado el efecto de la suplementación con aceite de pescado (AP) en la etapa prenatal sobre el perfil de lípidos de sus descendientes a los 19 años de vida. El estudio mostró que la suplementación con aceite de pescado no se asoció con concentraciones de colesterol (Colesterol total, LDL y HDL), triacilglicéridos y Apo-B en los adolescentes. Sin embargo, en un sub-análisis realizado con los participantes cuyas madres tenían una baja ingesta de pescado se encontró, una tendencia hacia la baja en los niveles de triacilgléridos, Apo-B y LDL-col en los participantes del grupo de AP comparado con el grupo de placebo (aceite de oliva), pero ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa (Rytter, 2011). La gran mayoría de las mujeres que participaron en este estudio tenían una buena ingesta de pescado, es probable entonces, que el buen consumo de AGPI-n3 atenuara el efecto de la suplementación y dado que el grupo de participantes con baja ingesta de pescado era muy chico (n=46) hizo falta poder para demostrar significancia estadística en la tendencia de perfil de lípidos saludables (Rytter, 2011).

Se propone que el perfil de lípidos podría verse afectando alterando su metabolismo. Los AGPI-CL n-3 afectan el metabolismo de lípidos suprimiendo la lipogénesis hepática, disminuyendo la síntesis hepática de triacilglicéridos e incrementando la oxidación de grasa en el tejido muscular y en el hígado (Clarke, 2001; Olson, 2003). Lo anterior, podría estar regulado por la interacción del AGPI-CL n-3 con factores de transcripción que regulan la expresión de genes de proteínas/enzimas reguladores del metabolismo energético a través de diferentes mecanismos:

1. AGPI-CL n-3 y proteína de unión a elementos regulatorios de esteroides (SREBP-1). Las SREBPs (por sus siglas en inglés: sterol regulatory element binding protein) son una familia de factores de transcripción involucrados en el metabolismo de lípidos. El DHA favorece la disminución de SREBP-1 un factor de transcripción de enzimas involucradas en la lipogénesis (Clarke, 2001; Rodríguez-Cruz, 2005).
2. AGPI-CL n-3 y receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR). Los PPAR (por sus siglas en inglés: proliferator peroxisome activator receptor) son receptores nucleares que pertenecen a la familia de factores de transcripción involucrados en la regulación de la homeostasis de los lípidos. El PPAR $\alpha$  incrementa la oxidación de ácidos grasos; el PPAR  $\gamma$  incrementa la lipogénesis, la sensibilidad a la insulina y la diferenciación de adipocitos y el PPAR  $\delta$  incrementa la oxidación de AG, la diferenciación

de preadipocitos y controla la expresión de PPAR y (Clarke, 2001; Rodríguez-Cruz, 2005). Los AGPI-CL n3 se unen con mayor afinidad a PPAR $\alpha$ . El PPAR $\alpha$  regula la transcripción de genes involucrados en el transporte y oxidación de lípidos, y en la termogénesis. La activación de los PPARs por los AGPI-CL n3 pueden ofrecer una explicación en la disminución de triacilglicéridos, por un aumento en la oxidación de los ácidos grasos.

### **DHA y metabolismo de glucosa**

Los AGPI n-3 han mostrado efectos benéficos en la sensibilidad de la insulina y el retraso del desarrollo de diabetes tipo 2 en los adultos (Nettleton, 2005).

En estudios animales se ha mostrado que, la modificación de ácidos grasos en la dieta prenatal potencialmente influye la acción de la insulina de sus descendientes (Siemelink, 2002; Joshi, 2003). Los ácidos grasos saturados disminuyen la sensibilidad a la insulina y los PUFAs la incrementan (Siemelink, 2002). Una suplementación prenatal con aceite de pescado y una dieta de bajo contenido proteico en ratas mostró ser benéfica en mantener los niveles de glucosa, insulina, colesterol y homocisteína en los descendientes adultos (Joshi, 2003).

En nuestro conocimiento no existen estudios de suplementación prenatal de AGPI-CL-n3 en humanos, que evalúen el metabolismo de la glucosa de sus descendientes. Sin embargo, estudios de lactancia materna y glucosa plasmática de ayuno en etapas posteriores de la vida muestran que, es posible que exista una relación negativa entre estas dos variables (Das, 2003). Posiblemente se pueda deber a los niveles de AGPI-CL contenidos en la leche materna (Das, 2003). Das, mostró una correlación inversa entre los niveles de glucosa de ayuno plasmática y el porcentaje de DHA en los fosfolípidos musculares (Das, 2003).

Los AGPI-CLn3 son potentes inhibidores de la glucólisis y lipogénesis hepática. Recientemente, se describió que el factor de transcripción ChREBP (por sus siglas en inglés: carbohydrate-response element binding protein) participa en la regulación de genes glucolíticos y lipolíticos y se ha demostrado que el DHA disminuye su actividad (Dentin, 2005). Por otro lado, se demostró que, la suplementación con DHA prenatal tiene un efecto protector contra sobrepeso y obesidad. Puesto que, el sobrepeso se ha asociado fuertemente a resistencia a la insulina, el efecto protector del DHA en los niveles de glucosa séricos podrían deberse a menor adiposidad.

Se han propuesto algunos otros mecanismos posibles: Cuando la cantidad de AGPI-CL son incorporados dentro de la membrana celular, la membrana llega a tener mayor fluidez e incrementa el número de receptores de insulina en la membrana, lo anterior mejoraría la afinidad por la insulina y su receptor (Das, 1994).

Por otro lado, los AGPI-CL n3 disminuyen los niveles de citocinas pro-inflamatorias circulantes. Las citocinas se han asociado con obesidad, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Dunger, 1996).

### **DHA y presión arterial**

Algunos estudios han mostrado que la deficiencia prenatal y a través de la vida de AGPI n-3 puede inducir hipertensión en ratas (Armitage, 2003; Weisinger, 2001; Jayasooriya, 2008).

Por otro lado, se mostró que la suplementación prenatal con AGPI-CL n-3 disminuye la hipertensión en ratas deficientes en este tipo de grasa esencial (Jayasooriya, 2008; Begg, 2010). En el estudio de Jayasooriya, estos resultados fueron mostrados a las 24 semanas de vida de las ratas. En este mismo estudio además se midieron los niveles de leptina encontrando que los animales deficientes tuvieron mayores niveles de leptina que en el grupo intervenido. Se mostró una correlación significativa entre los niveles de leptina y el % de grasa corporal ( $r=0.738$ ;  $p < 0.001$ ). Incluso se mostró una correlación significativa entre los niveles de leptina y la presión arterial sistólica  $r=0.549$ ;  $p < 0.001$ ) (Jayassoriya, 2008).

Se cree que la deficiencia de AGPI-CL n3 provoca hipertensión a través de una interacción con la angiotensina II una hormona que puede ser sintetizada en el adipocito. Altos niveles de metabolitos eicosanoides vasodilatadores provenientes del AGPI-CL n3 en la rata suplementada podrían estar causando una disminución en el efecto vasoconstrictor de la angiotensina II (Jayassoriya, 2008).

Los niveles altos de leptina y el incremento de peso podrían ser los mecanismos asociados a hipertensión en ratones deficientes de AGPI-n3 (resistencia a la leptina).

El rol de la leptina como causante de hipertensión se ha propuesto ya que se ha visto que la infusión crónica periférica de esta hormona en ratones tanto delgados como obesos provoca un aumento en la presión arterial (Jayassoriya, 2008).

En humanos, existe alguna evidencia que muestra que la suplementación prenatal de AGPI n-3 puede disminuir la presión arterial.

Además, el DHA disminuye la acción del Factor Nuclear  $\kappa\beta$  (NFK $\beta$ ) el cual disminuye: la síntesis de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión (VCAM, ICAM) lo cual podría tener un efecto positivo en la disminución de aterosclerosis y por lo tanto, en disminución de la presión arterial (Rodríguez-Cruz, 2005).

En el estudio prospectivo “The Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC)” la lactancia materna se asoció con menor presión arterial en la infancia (a los 7 años). La presión sistólica y diastólica de los niños alimentados al seno materno fue menor 1.2 mmHg y 0.9 mmHg respectivamente, comparados con los niños no alimentados al seno materno (Martin, 2004).

Forsyth, en un estudio que evaluó la suplementación de una fórmula láctea con AGPI-CL vs una fórmula sin AGPI-CL pero de igual contenido nutrimental mostró que, los niños suplementados a los 6 años, tuvieron significativamente menores niveles promedio de presión arterial (diferencia promedio de -3.0 mmHg; IC 95% - 5.4mmHg a -0.5mmHg) y presión arterial diastólica (-3.6 mmHg; IC95% -6.5mmHg a -0.6 mmHg) con respecto al grupo no suplementado (Forsyth, 2003).

Por otro lado, en un estudio de suplementación en la infancia con AGPI-n3 desde el destete y hasta los 5 años, que evaluó sus efectos sobre la presión arterial, estructura arterial y función en sus descendientes a los 8 años, no se encontraron mejoras significativas sobre esas variables. Por el contrario, un estudio evaluó por tres meses, el efecto de una suplementación con aceite de pescado a los 9 meses de edad. Este estudio encontró que los niños suplementados tuvieron menores niveles de presión arterial sistólica (diferencia promedio ajustada 6.3 mmHg; IC 95% 0.9 a 11.7) a los 12 meses de edad (Damsgaard, 2005).

La evidencia sugiere que los AGPI-CL n-3 prenatales podrían tener un rol importante en la regulación de la presión arterial en etapas posteriores de la vida. Por lo anterior, la exposición temprana a AGPI-CL n3 podrían disminuir la ECV en la edad adulta, sin embargo, se necesita mayor evidencia de este efecto.

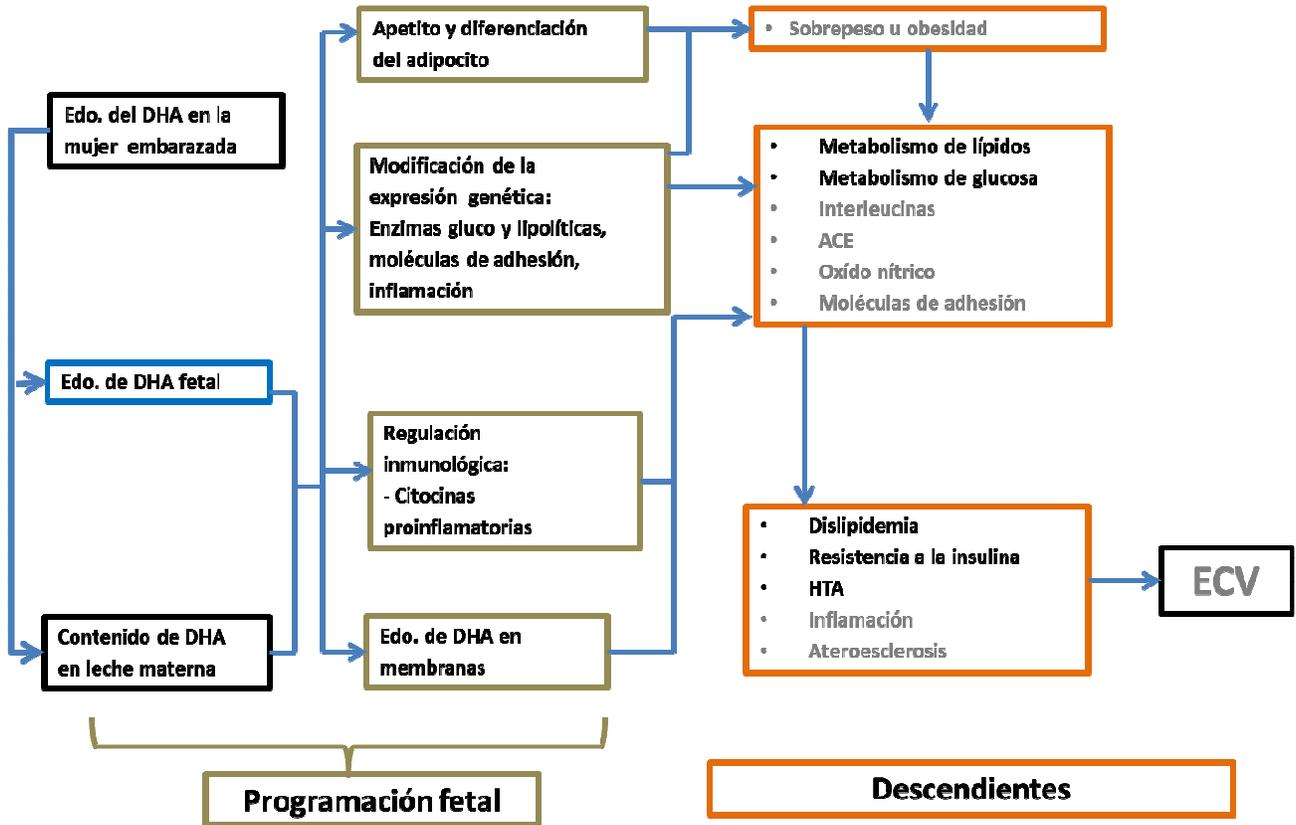
## **DHA y otras asociaciones**

Los AGPI-CL n3 inhiben la diferenciación celular del adipocito y el almacenamiento de la grasa (Ailhaud, 2008;), por lo anterior, se ha pensado en la hipótesis de que la suplementación materna de AGPI-CL n3 podría disminuir la masa grasa en sus descendientes.

Estudios en animales alimentados con dietas ricas en grasa durante el embarazo y la lactancia han mostrado mayores depósitos de grasa en el músculo, tejido adiposo y en el hígado. Además se ha encontrado alteración en la expresión genética de enzimas hepáticas, en el desarrollo de la célula B pancreática y en la secreción de insulina y leptina de sus descendientes (Chapman, 2000; McMillan, 2005; Bouret, 2009). La insulina y la leptina actúan durante períodos cortos del desarrollo como péptidos reguladores de la coordinación del desarrollo de vías hipotálamicas que regulan el comportamiento alimentario y el balance energético. Alteraciones importantes durante este proceso da como resultado la alteración del circuito neuro-regulador que controla el apetito y se cree que lo anterior podría contribuir a hiperfagia y exceso de peso corporal en sus descendientes (Sullivan, 2011; Nicoletto, 2011). Existen otros estudios en animales que han mostrado que la respuesta orexigénica (vía NPY, AgRP) y anorexigénica (vía POMC y CART) en el control del apetito también se encuentra alterada (Nicoletto, 2011; Innis, 2011).

El desarrollo de la ECV es un proceso que se da a lo largo de la vida. La hipertensión, obesidad, dislipidemia y diabetes se desarrollan con el tiempo y los factores de riesgo podrían prevenirse desde etapas tan tempranas del desarrollo como la etapa fetal (Berenson, 1998; Barker, 1997).

**Fig. 1. Marco conceptual: mecanismos regulatorios de la suplementación prenatal con DHA en factores de riesgo cardiometabólicos**



## **Justificación**

Dada la alta prevalencia de enfermedades crónicas relacionadas con la nutrición, existe una urgente necesidad de implementar acciones para prevenir los factores de riesgo cardiovasculares desde etapas tan tempranas de la vida como la etapa fetal. El DHA ha mostrado efectos de prevención de factores de riesgo cardiometabólicos (disminución de inflamación, disminución de triglicéridos, LDL, aumento en los niveles de HDL, mejoría en la sensibilidad a la insulina y disminución en la presión arterial) en estudios en animales y de humanos adultos (Kelley 2007; Gottrand, 2008; Kelley, 2009).

Poco se sabe acerca de los efectos del estado de DHA durante el embarazo sobre los factores de riesgo cardiometabólicos de preescolares hijos de madres suplementadas. Aprovechando el ensayo clínico controlado aleatorizado doble ciego, de suplementación con DHA a mujeres embarazadas y sus efectos en el desarrollo temprano de sus hijos en México, el presente estudio pretende aportar datos sobre estos efectos.

## **Objetivo general:**

Evaluar los efectos de la suplementación con ácido docosahexaenoico durante el embarazo sobre los niveles de lípidos, lipoproteínas, glucosa e insulina sérica y tensión arterial en pre-escolares hijos de madres suplementadas.

## **Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto de la suplementación con DHA durante el embarazo sobre los niveles de colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas (LDL-col, HDL-Col, Apolipoproteína B) séricas de los pre-escolares hijos de madres que fueron suplementadas.
- Evaluar el efecto de la suplementación con DHA durante el embarazo sobre los niveles de glucosa e insulina séricas en los pre-escolares hijos de las madres que fueron suplementadas.
- Evaluar el efecto de la suplementación con DHA durante el embarazo sobre los niveles de tensión arterial de los pre-escolares hijos de madres que fueron suplementadas.

**Hipótesis.** La suplementación con ácido docosahexaenoico durante el embarazo tiene un efecto protector en los niveles de lípidos, lipoproteínas, glucosa e insulina séricas y tensión arterial de los pre-escolares hijos de madres suplementadas.

## **Materiales y métodos**

**Tipo de estudio.** Este es un análisis secundario de un ensayo clínico controlado aleatorizado doble ciego, que fue diseñado originalmente para evaluar los efectos de una suplementación con DHA durante el embarazo en el desarrollo neurológico de sus hijos durante 5 años. Aprovechando el diseño del estudio se realizará un análisis de la información proveniente del seguimiento de los niños a los 4 y 5 años.

Papel del estudiante en la tesis. La concepción de esta propuesta fue personal, he sido la encargada de desarrollar la idea, realizar la revisión de la literatura, plantear la propuesta

y buscar financiamiento. Si se aprueba el presente protocolo será la encargada de realizar el análisis de los datos, así como, de escribir los resultados.

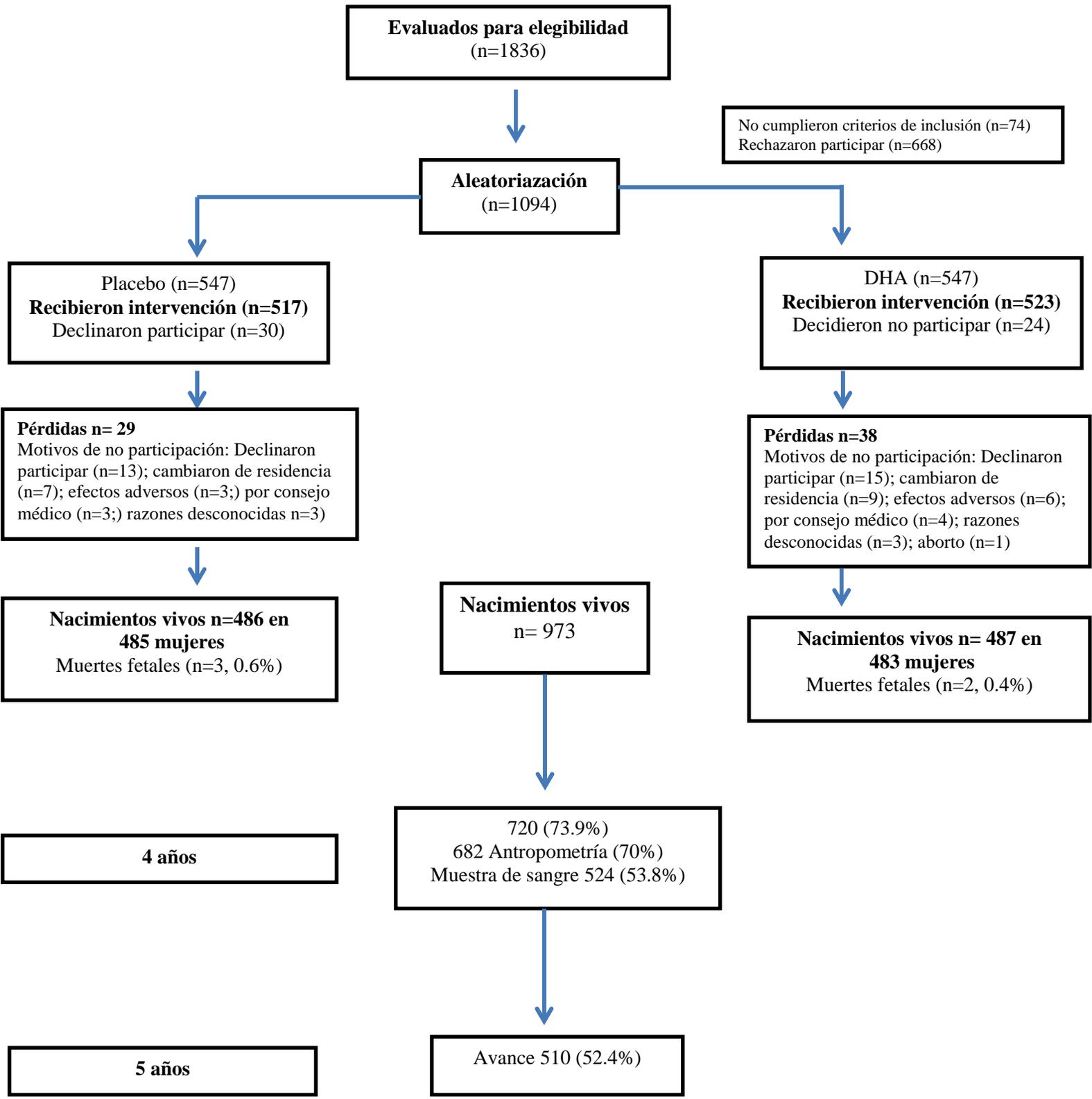
**Población intervenida.** Mujeres embarazadas desde la semana 18-22 de gestación hasta el parto. Las participantes fueron reclutadas durante las consultas médicas de cuidado prenatal en el Hospital General I y en tres Clínicas de Salud dependientes del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en la ciudad de Cuernavaca, Morelos entre Febrero 2005 y Febrero 2007.

Los criterios de inclusión de las mujeres embarazadas fueron los siguientes: tener 18-35 años de edad; estar en la semana 18 a 22 de gestación; planear tener el parto en el Hospital General I del IMSS; tener planes de lactar a su hijo con leche materna exclusivamente o predominantemente al menos 3 meses; vivir en el área al menos dos años después del parto; aceptar participar y firmar el consentimiento informado.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: embarazo de alto riesgo (este fue documentado en la historia clínica en el reclutamiento e incluyó historia de desprendimiento placentario, cualquier episodio de hemorragia en el embarazo, diabetes gestacional, hipertensión inducida por el embarazo, toxoplasmosis materna, alteraciones en la coagulación, trombocitopenia, enfermedad renal o sistémica y uso de drogas. Alteraciones del metabolismo de lípidos (hiperlipidemias y/o alteraciones de la absorción de lípidos. Ingesta regular de suplementos con DHA o aceite de pescado durante el embarazo. Uso crónico de fármacos para epilepsia.

Se reclutaron y aleatorizaron 1094 mujeres para recibir suplemento o placebo. La primera cohorte de niños nació en Julio de 2005 y actualmente se realiza el seguimiento a los 5 años de edad (Fig. 2).

**Figura 2.** Descripción de reclutamiento de mujeres embarazadas a la semana 18-22 de gestación y el seguimiento de sus hijos al nacimiento, 48 y 60 meses.



**Sujetos de estudio.** Los participantes de este estudio son todos los pre-escolares hijos de las madres que participaron en el ensayo clínico controlado aleatorizado de suplementación con DHA seguidos a los 4 y 5 años.

**Intervención.** Las mujeres embarazadas fueron asignadas aleatoriamente para recibir diariamente 400 mg de DHA (en dos tabletas de 200 mg) o placebo desde la semana 18-22 de gestación hasta el parto. Las cápsulas con DHA tenían 200 mg de DHA provenientes de algas. Las cápsulas de placebo tenían aceite de olivo y fueron similares en apariencia y sabor a las cápsulas con DHA. Se capacitó a las mujeres para que tomaran dos cápsulas juntas al día (400 mg/día), a la misma hora cada día.

**Adherencia al tratamiento y cambios en el estado de DHA materno y en el cordón umbilical.** El **apego al tratamiento** fue calculado a partir del total de cápsulas entregadas menos los remanentes y se expresa como porcentaje del total de cápsulas que se esperaba tomaran durante la intervención. El 90% del total de participantes en ambos grupos tuvieron una adherencia mayor al 76%. Para el presente proyecto se evaluará el apego al tratamiento solo en las madres de los niños participantes en ambos grupos. Las concentraciones de DHA en el plasma materno en el momento del parto y en el cordón umbilical medidos en una submuestra aleatoria fueron mayores en el grupo de intervención comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ ) (Ramakrishnan, 2010).

### **Variables (anexo 1):**

Variables dependientes:

- I. Factores de riesgo cardiometabólicos:
  1. Perfil metabólico
    - a. Lípidos y lipoproteínas: Colesterol Total, triacilglicéridos, lipoproteínas de baja densidad (LDL-col) y lipoproteínas de alta densidad (HDL-col)
    - b. Glucosa e insulina
  2. Presión arterial

Variable independiente:

- I. Suplementación con DHA

Covariables:

- Covariables maternas: IMC pre-gestacional, tabaquismo, nivel socioeconómico
- Covariables en los prescolares: sexo, edad gestacional, peso y talla al nacimiento, lactancia materna (tipo y duración), IMC de los prescolares evaluados a los 4 y 5 años, ingesta dietética de energía, hidratos de carbono, grasa total, ácidos grasos saturados, ácidos grasos poliinsaturados en los prescolares evaluados y actividad física

## **I. Evaluación de factores de riesgo cardiometabólicos.**

**1. Perfil metabólico.** El perfil de lípidos, la glucosa y la insulina serán determinadas en una alícuota de suero tomada a los 4 años por venopunción (dada la logística de la obtención de datos no fue posible obtener muestras en ayuno).

Procesamiento de las muestras: Las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm por 3 minutos en una centrifuga a 4°C. El plasma y las células rojas fueron separadas. El plasma fue almacenado en el laboratorio de Nutrición del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en alícuotas de 200 µl a -70°C.

Las determinaciones se determinarán en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Este laboratorio está certificado por el Programa de Evaluación Comparativa Externa de Laboratorios del Colegio Americano de Patólogos. Las determinaciones se realizarán con el analizador automatizado de química clínica Synchron (Beckman Coulter). El colesterol total y los triacilglicéridos se determinarán con un método enzimático; el HDL-col será medido después de precipitarlo utilizando ácido fosfotúngstic y  $Mg_{2+}$ . La concentración de LDL-col fue estimada por la fórmula Friedewald. La insulina plasmática se determinará por el ensayo MEIA (Laboratorios Abbott) y la glucosa por el método de glucosa oxidasa. El laboratorio cuenta con las referencias internacionales para cada determinación.

Se diagnóstica dislipidemia cuando uno o más parámetros del perfil de lípidos se encuentre alterado (Colesterol Total, TGL, LDL  $\geq$  Percentil 95 o HDL-col  $\leq$  Percentil 5 según la Academia Americana de Pediatría) (Daniels, 2008).

Los niveles de glucosa en sangre se evaluarán con las recomendaciones de la Asociación Americana de Diabetes (ADA, 2011). Se define glucosa alterada en cualquier momento del día (dado que las muestras no fueron tomadas en ayuno) cuando ésta sea igual o mayor de 200 mg/dl.

Para evaluar si existe resistencia a la insulina se empleará la ecuación de la Evaluación del Modelo de Homeostasis ( $HOMA = \text{Glucosa (mg/dl)} \times \text{Insulina (mg/dl)} / 405$ ). Se define resistencia a la insulina cuando el resultado sea  $\geq 3.2$  (Corvalán, 2010).

Tabla 1. Puntos de corte usados para definir estatus metabólico anormal. Factores de riesgo metabólicos en niñas y niños.

Dato	Niñas	Niños	Referencia
Colesterol total*	$\geq 197$	$\geq 186$ mg/dl	Daniels, 2008
TGL*	$\geq 120$ mg/dl	$\geq 85$ mg/dl	Daniels, 2008
LDL*	$\geq 140$ mg/dl	$\geq 129$ mg/dl	Daniels, 2008
HDL*	36 mg/dl	38 mg/dl	Daniels, 2008
Apolipoproteína B	$\geq 1.04$ g/L	$\geq 1.03$ g/L	Bachorik P, 1997 (NHANES III)
Glucosa	>200 mg/dl en cualquier momento del día		ADA, 2011
HOMA	$\geq 3.2$		Corvalán, 2010

Puntos de corte de colesterol total, triacilgléridos, LDL-col  $\geq$  Percentil 95; HDL  $\leq$  Percentil 5.

**2. Presión arterial.** Se capacitó y estandarizó al personal para realizar la medición de la presión arterial de los niños a los 5 años de edad. La presión se tomó con un aparato digital OMRON, modelos HEM-711ACINT el cual ha sido validado para su uso en niños y adolescentes. Se utilizó un brazalete de 11 cm de ancho, especial para niños. La medición se realizó 5 minutos después que el niño llegó a la oficina (considerando que estuviera en reposo), se sentó en una silla pequeña utilizando una mesa infantil (cuando el niño no quiso sentarse en la silla, se tomó con el niño sentado sobre las piernas de la madre o tutor. En cada brazo se realizaron 4 mediciones alternando los brazos para la toma. Después de que se toma la primer medición en el brazo derecho, se hace en el brazo izquierdo. Después, este procedimiento se hace tres veces más. Las mediciones se tomarán con un intervalo de 2 minutos entre cada medición. Una vez realizadas las 4 mediciones, se calculó el promedio de las 3 últimas mediciones del brazo derecho y

posteriormente del brazo izquierdo (la primera medición de ambos brazos, no se toma en cuenta).

**Evaluación de la presión arterial.** Se evaluará de acuerdo al sexo, edad y estatura con la referencia de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos. Se *diagnóstica prehipertensión*: cuando los valores se encuentren entre el percentil 90 y 95 e *hipertensión* cuando los valores sean iguales o mayores al percentil 95 de la referencia.

### **Evaluación de covariables.**

#### a. Covariables maternas

- *IMC pre-gestacional.* El primer IMC materno fue construido a partir del peso y talla de la mujer las 18-22 semanas de gestación. Para evaluar su estado nutricional se seguirá la curva de IMC para la edad gestacional (Atalah, 1997).
- *Tabaquismo.* Puesto que el tabaquismo afecta el crecimiento de los niños, se ajustará por esta covariable. Se evaluará si hay adultos que fumen en presencia del niño y la frecuencia de exposición del niño al humo de cigarro (Frecuencia: diario, 4-6 días/semana; 1-3 días/semana; <1 día/semana).
- *Nivel socioeconómico.* Las mujeres con un nivel socioeconómico bajo podrían tener menor consumo de pescado y se ha mostrado que la suplementación prenatal con DHA en este tipo de mujeres podría tener mayores efectos en el perfil metabólico en etapas posteriores de la vida (Rytter, 2011). Aunque el nivel socioeconómico de las mujeres que participaron en este estudio podría ser muy homogéneo (ya que estas son derechohabientes del IMSS), se explorará en los modelos si esta covariable podría tener influencia sobre cada una de las variables de desenlace. El nivel socioeconómico se construirá a través de un índice de componentes principales, a partir de variables sobre las características de la vivienda, servicios básicos, la posesión de enseres domésticos y otros bienes (sistema de TV por pago, reproductor de DVD, refrigerador, horno de microondas, lavadora y secadora de ropa, automóvil, moto, teléfono en casa, computadora), el número de habitaciones y habitantes en el hogar incluidas en el cuestionario de nivel socioeconómico aplicado en el contacto basal (18-22 semanas de gestación). El nivel socioeconómico se categorizará en terciles (bajo, medio, alto).

b. Covariables en los preescolares

- *El sexo, la edad gestacional y el peso al nacimiento* del niño serán determinadas a partir del cuestionario de información del parto.
- *Lactancia materna*. De acuerdo a la información recabada al primer y tercer mes se determinará si los niños recibieron leche materna (exclusiva, predominante, parcial) o fórmula.
- *IMC de los preescolares evaluados a los 4 y 5 años*. El IMC se obtendrá dividiendo el peso entre la estatura al cuadrado. El peso fue tomado con una báscula portátil electrónica con precisión de 100g y capacidad de 136 kg., el niño fue pesado con la menor cantidad de ropa posible. La talla se midió con un estadímetro de madera, con precisión de 1 milímetro. Todas las mediciones antropométricas las realizó personal capacitado y debidamente estandarizado, siguiendo la técnica antropométrica según el método de Habicht (Lohman, 1988).
- *Ingesta dietética* de energía, hidratos de carbono, grasa total, ácidos grasos saturados, ácidos grasos poliinsaturados en los preescolares evaluados. La información de ingesta dietética se obtuvo a los 4 años a partir de una frecuencia de consumo de alimentos. A los 5 años se está recabando a través de un recordatorio de 24 hrs. La ingesta será evaluada en porcentaje de macronutrientes.
- *Actividad física (AF)*. La información de AF obtenida hace referencia al número de horas por semana dedicadas a realizar algún deporte o actividad física (nunca o casi nunca; 2 horas/semana; 2 ó más horas/semana). También se recabo información del niño acerca del número de horas al día frente a pantallas (TV y videojuegos: nada, menos de una hora, 1-2 horas, 2-3 horas, 4-5 horas, 6-7 horas o más de 7 horas). Se ajustará por horas por semana dedicada a AF y a horas por semana frente a pantallas.

**Tamaño de muestra.** Puesto que no existen estudios con características similares a las que se evaluarán en este proyecto, para el cálculo del tamaño de muestra se utilizaron datos de estudios que evaluaron diferencias en factores de riesgo cardiometabólicos entre niños y adolescentes alimentados al seno materno vs. los no amamantados (Owen, 2002; Owen 2008; Plancoulain, 2000). También se utilizaron datos de estudios de

suplementación con aceite de pescado en las primeras etapas de la vida y durante el embarazo (Ayer, 2009; Rytter, 2011). El objetivo de realizar este análisis fue estimar diferencias promedio en cada una de las variables dependientes entre grupos (lactancia materna vs. fórmula o suplementación con aceite de pescado vs. aceite de oliva). De acuerdo al análisis anterior estimamos que una muestra final de 250 niños por grupo (niños cuyas madres fueron suplementadas con DHA vs. niños cuyas madres no fueron suplementadas) es suficiente para encontrar diferencias mínimas con un poder del 80% y con nivel de significancia del 0.05 para una prueba de dos-colas.

La estimación del tamaño de muestra se realizó para todas las variables de respuesta y se eligió el  $n$  más alto para encontrar diferencias mínimas (en este caso fue para encontrar una diferencia de colesterol total de 7 mg/dl) (Anexo 2).

### **Análisis estadístico.**

Para evaluar potencial sesgo de selección. Se compararán las características basales (al nacimiento) de la muestra final de niños participantes en este estudio, con aquellos que se perdieron en el seguimiento. A los 4 años, también se compararán las características de los niños que consintieron dar muestra de sangre ( $n=524$ ) con los niños que no dieron muestra ( $n=196$ ).

Las variables continuas se reportarán en promedios y desviaciones estándar cuando éstas tengan distribución normal; en caso contrario, se reportará la mediana y el rango intercuartil. Las variables categóricas se reportarán en porcentajes. Se harán comparaciones de todas las variables de desenlace entre el grupo de intervención y control. Se aplicará el test T-student cuando se cumpla con el supuesto de normalidad o bien su prueba no paramétrica (Mann-Whitney) en caso contrario; se utilizará la prueba  $\chi^2$  cuando se trate de variables categóricas.

Los análisis de los datos se realizarán tomando en cuenta el diseño del estudio -intención al tratamiento-.

Para evaluar los efectos de la suplementación materna con DHA sobre los factores de riesgo cardiometabólicos (lípidos, lipoproteínas, glucosa e insulina séricas, presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD), presión arterial media (PAM) y amplitud de pulso) se correrán modelos de regresión lineal múltiple, donde la variable independiente será una variable dummy (1= suplementado, 0= no suplementado) ajustando por covariables (IMC pre-gestacional, ganancia de peso en el embarazo, tabaquismo materno, nivel socioeconómico, sexo, peso y talla al nacimiento, lactancia materna, IMC de los preescolares evaluados a los 4 y 5 años, ingesta dietética de energía, hidratos de carbono, grasa total, ácidos grasos saturados, ácidos grasos poliinsaturados y actividad física en los preescolares evaluados). Además de controlar por las covariables antes mencionadas, en los modelos que evalúen el efecto de la suplementación prenatal con DHA sobre la PAS, PAD, PAM y amplitud de pulso se controlará por creatinina, insulina, lípidos y lipoproteínas.

Antes de ajustar por covariables se evaluará y cuidará no tener problemas de multicolinealidad.

También se estudiará la interacción entre la suplementación y variables de ajuste (en particular: sexo, peso al nacer, IMC pre-gestacional e IMC del niño a los 4-5 años (según corresponda). Se considera que existe interacción significativa con un  $P < 0.15$ .

Adicionalmente se analizarán los efectos de la suplementación con DHA materna sobre todas las variables de respuesta considerando categorías (presencia o ausencia de, dislipidemia, resistencia a la insulina e hipertensión). Se calcularán odds ratio y sus intervalos de confianza 95% utilizando análisis de regresión logística y ajustando por las mismas covariables.

Para evaluar diferencias entre los grupos en cada una de las variables de desenlace se reportarán IC 95%. Se utilizará el paquete estadístico SPSS.

## **Resultados esperados y aportes del estudio**

Se espera que los pre-escolares hijos de madres suplementadas con DHA tengan menores niveles de lípidos, lipoproteínas, glucosa e insulina sérica y tensión arterial que los hijos de madres no suplementadas.

Con este estudio se podrá: evaluar la eficacia de la suplementación con DHA durante el embarazo sobre factores de riesgo cardiometabólicos de sus descendientes a los 4 y 5 años de edad. Se abrirán nuevas preguntas de investigación. Se dará pauta para evaluar los mismos efectos en otros estudios para después evaluar la efectividad de la suplementación. Se informará a tomadores de decisiones los efectos benéficos de la suplementación (si es que hubiera) para llevar a escala. Si los efectos fueran positivos, se podrían diseñar estrategias de intervención educativa de promoción de consumo de DHA en el embarazo.

## **Limitaciones del estudio**

***Determinación de perfil metabólico:*** Las muestras de sangre no fueron tomadas en ayuno, por tal motivo los valores séricos de lípidos, lipoproteínas, glucosa e insulina podrían tener una gran variabilidad. Además, en el estudio no se recolectaron datos que indiquen si el niño estaba o no en ayuno y las horas transcurridas después de tomar el último alimento. Puesto que es un ensayo aleatorizado se espera que el número de niños que rompieron o no el ayuno se encuentren distribuidos de manera similar en ambos grupos. El HDL-colesterol, los niveles de no-HDL colesterol, la apolipoproteína B y la razón colesterol total/HDL-col difieren poco entre los estados de ayuno y no ayuno o no cambian en respuesta a la ingesta de alimentos (Mora, 2008; Langsted, 2008). Estos datos se podrían evaluar si es que existiera gran variabilidad en el perfil metabólico entre grupos.

En cuanto a la determinación sérica del perfil metabólico, el laboratorio cuenta con las referencias internacionales para cada determinación y éste se encuentra certificado por el Programa de Evaluación Comparativa Externa de Laboratorios del Colegio Americano de Patólogos.

***Pérdida de seguimiento de los niños:*** las pérdidas de niños en el seguimiento podrían afectar la validez interna del estudio si es que estos son diferentes a los evaluados en este proyecto. Hasta la fecha tenemos una tasa de seguimiento de 720 (73.9%) niños a los 4 años (sin embargo, sólo aceptaron dar muestra de sangre 524 (53.8%) y de 510 (52.4%) niños a los 5 años con respecto a los 973 niños nacidos vivos del proyecto. Aún se sigue levantando el seguimiento de los niños a los 5 años (el último niño del estudio en cumplir 5 años lo hará en Julio de 2012). Esperamos se llegue a un seguimiento de 905 niños.

***Errores de medición en antropometría:*** Las mediciones antropométricas fueron tomadas por personal capacitado y estandarizado lo cual disminuirá el error técnico de medición.

***Conocimiento del grupo de suplementación por el personal del estudio y participantes del mismo:*** Los investigadores, el personal de campo y los participantes se enmascararon en relación al grupo de pertenencia del tratamiento (DHA o placebo) para evitar sesgos de información.

***Validez externa de los resultados:*** los resultados de este estudio solo podrían aplicarse a la población derechohabiente del IMSS que reciba suplementación con DHA durante el embarazo bajo las mismas condiciones de este estudio.

## Cronograma

Actividades	2012				2013	
	Ene-Mar	Abr-Jun	Julio-Sep	Oct-Dic	Ene-Mar	Abr-Jun
Defensa de protocolo		X				
Organización y limpieza de base de datos existente	X	X				
Termina recolección de datos a los 5 años				X		
Determinación de pruebas bioquímicas	X					
Obtención de datos completos de presión arterial				X		
Organización y limpieza de base de datos a los 4 y 5 años	X	X	X	X		
Revisión de la literatura científica	X	X	X	X	X	X
Estancia en Emory			X	X		
Análisis de datos		X	X	X	X	
Escritura de artículos				X	X	X

## Consideraciones éticas y de bioseguridad

El estudio original: *“Effect of prenatal DHA supplementation on infant development”*, así como, el subestudio *“Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and allergic diseases in childhood”* de los cuales se obtendrán los datos para la presente propuesta de análisis secundario fueron aprobados por el Comité de Ética y las Comisiones de Bioseguridad e Investigación del Instituto Nacional de Salud Pública (Anexos 3 y 4 respectivamente). El estudio original además, fue aprobado por el Comité de Ética Institucional de la Universidad de Emory. Se obtuvo consentimiento informado de cada uno de los participantes después de explicar los detalles del estudio (Formatos anexos 5 y 6). Un Comité externo de monitoreo de datos y seguridad revisó el estudio periódicamente.

Los análisis séricos de este estudio se determinarán en una alícuota de sangre previamente tomada y almacenada (seguimiento a los 4 años de edad) por lo que, no se volverá a tomar una muestra de sangre venosa en los niños. La toma de muestra de

sangre venosa obtenida en el subestudio de este proyecto, representó los riesgos mínimos.

Se cuenta con las autorizaciones pertinentes de uso de base de datos por parte de los investigadores principales (anexo 7) y por parte de los responsables de los proyectos (anexo 8).

### **Recursos materiales y de financiamiento**

La Universidad de Emory y el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) obtuvieron un financiamiento de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH) para la conducción del estudio original titulado: “Efectos de la suplementación prenatal con DHA en el desarrollo infantil”, con seguimiento hasta los 5 años de edad. El financiamiento cubre los costos directos e indirectos del estudio mencionado (\$858,241 y \$67,104 dólares, respectivamente) que ascienden a un total de \$925,345 dólares. Actualmente se está levantando la información de los niños a los 5 años con fondos del NIH. Las determinaciones metabólicas séricas fueron determinadas en colaboración con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Las Instituciones Académicas involucradas en el proyecto cuentan con la infraestructura y los recursos humanos y técnicos necesarios para llevar a cabo el proyecto.

## Referencias bibliográficas

ADA (American Diabetes Association). Position Statement. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2011;34-Suppl 1.

Agostoni C, Riva E, Scaglioni S, Marangoni F, Radaelli G, Giovannini M. Dietary fats and cholesterol in Italian infants and children. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1384S-1391S.

Ailhaud G, Guesnet P, Cunnane S. An emerging risk factor for obesity: does disequilibrium of polyunsaturated fatty acid metabolism contribute to excessive adipose tissue development? *Br J Nutr* 2008;100:461-470.

Al MD, van Houwelingen AC, and Hornstra G. Long-chain polyunsaturated fatty acids, pregnancy, and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 2000;71(suppl):285S-91S.

Armitage JA, Pearce AD, Sinclair AJ, Vingrys AJ, Weisinger RS, Weisniger HS. Increased blood pressure later in life may be associated with perinatal n-3 fatty acid deficiency. *Lipids* 2003;38:459-464.

Asserhoj M, Nehammer S, Matthiessen J, Michaelsen K, Lauritzen L. Maternal fish oil supplementation during lactation may adversely affect long-term blood pressure, energy intake, and physical activity of 7-year-old boys. *J Nutr* 2009;298-304.

Ayer J, Harmer J, Xuan W, Toelle B, Webb K, Almqvist C, Marks G, Celermajer D. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids in early childhood: effects on blood pressure and arterial structure and function at age 8 y. *Am J Clin Nutr* 2009;90:438-446.

Bachorik P, Lovejoy K, Carroll M, Johnson C. Apolipoprotein B and AI distributions in the United States, 1988-1991: results of the National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III). *Clinical Chemistry* 1997;43:2364-2378.

Barker DJ. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *Br Med Bull* 1995 53:96-108.

Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1997;311:171-174.

Barker DJ. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr* 2004;Suppl93:26-33.

Begg D, Sinclair A, Stahl L, Premaratna S, Hafandi A, Jois M, Weisinger R. Hypertension induced by w-3 polyunsaturated fatty acid deficiency is alleviated by alfa-linolenic acid regardless of dietary source. *Hypertension Research* 2010;33:808-813.

Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP III, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa heart study. *N Engl J Med* 1998 338:16509-1656.

Bergmann R, Bergmann K, Haschke-Becher E, Richter R, Dudenhausen J, Barclay D, Haschke F. Does maternal docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy and lactation lower BMI in late infancy? *J Perinat Med* 2007;35:295-300.

Bouret S. Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2009;48:531-538.

Breslow J. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2006;83(suppl):1477S-1482S.

Bruce KD, Hanson MA. The developmental origins, mechanisms and implications of metabolic syndrome. *Journal of Nutrition* 2010;140:648-652.

Chapman C, Morgan L, Murphy M. Maternal and early dietary fatty acid intake: changes in lipid metabolism and liver enzymes in adult rats. *J Nutr* 2000;130:146-151.

Cicero A, Ertek S, Borthi C. Omega-3 Polyunsaturated fatty acids: their potential role in blood pressure prevention and management. *Curr Vasc Pharmacol* 2009;7:330-337.

Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr* 2001;131:1129-1132.

Clarke SD. The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:13-18.

Corvalán C, Uauy R, Kain J, Martorell R. Obesity indicators and cardiometabolic status in 4-y-old children. *Am J Clin Nutr* 2010;91:166-174.

Daamsgard C, Schack-Nielsen L, Michaelsen K, Fruekilde MB. Fish oil affects blood pressure and the plasma lipid profile in healthy Danish Infants. *J Nutr* 2006;136:94-99.

Daniels SR, Greer FR. Lipid screening and cardiovascular health in childhood. *Pediatrics* 2008;122:198–208.

Das UN. Can perinatal supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids prevent diabetes mellitus? *Eur J Clin Nutr* 2003;57:218.226

Das UN. Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective, and cardioprotective molecules. *Lipids in Health and Disease* 2008;7:37-54.

Das UN. Insulin resistance and hyperinsulinemia: Are they secondary to an alteration in the metabolism of essential fatty acids? *Med Sci Re* 1994;22:243-245.

Dentin R, Benhamed F, Pégrier J-P, Fougelle F, Voinot V, Sophie V, Girard J, Postic C. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest* 2005;115:2843-2854.

Djoussé L, Folsom A, Province M, Hunt S, Ellison C. Dietary linolenic acid and carotid atherosclerosis: the National Heart, Lung and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr* 2003;77:819-825.

Dunger A, Cunningham JM, Delaney CA et al. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inhibit insulin secretion and cause DNA damage in unweaned rat islets: Extent of nitric oxid involvement. *Diabetes* 1996;45:183-189.

Dunstan JA, Taylor AL, Mori TA, Barden A, Beilin L, Prescott SL. The effect of maternal fish oil supplementation on neonatal immune responses. *Clin Immunol Allergy Med* 2003;59:409-412.

Field CJ, Van Aerde JE, Robinson LE, Clandinin MT. Effect of providing a formula supplemented with long-chain polyunsaturated fatty acids on immunity in full-term neonates. *Br J Nutr*. 2008;99:91–99.

Forsyth JS, Willatts P, Agostoni C, Bissenden J, Casaer P, Boehm G. Long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infant formula and blood pressure in later childhood: follow up of a randomized controlled trial. *BMJ* 2003; 326:953-958.

Ghafoorunissa A, Basak S, Ehtesham N. Impact of maternal dietary fatty acid composition on glucose and lipid metabolism in male rat offspring aged 105 d. *Br J Nutr* 2009;102:233-241.

Gottrand F. Long-chain polyunsaturated fatty acids influence the immune system of infants. *J Nutr* 2008;138:1807S-2812S.

Hanebutt F, Demmelmair H, Schiessl B, Larqué E, Koletzko B. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) transfer across the placenta. *Clin Nutr* 2008;27:685-693.

Holmes V, Cardwell C, McKinley MC, Young IS, Murray LJ, Boreham CA, Woodside JV. Association between breast-feeding and anthropometry and CVD risk factor status in adolescence and young adulthood: the Young Harts Project, Northern Ireland. *Public Health Nutr* 2009;13:771-778.

Hu F, Bronner L, Manson JE, Stampfer MJ, Willett WC. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *JAMA* 2002;287:1815

Innis S. Metabolic programming of long-term outcomes due to fatty acid nutrition in early life. *Maternal and Child Nutrition* 2011;7(Suppl 2):112-123.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). *Mujeres y Hombres en México* 2010.

Jayasooriya AP, Begg DP, Chen N, Mathai ML, Sinclair AJ, Wilkinson-Berka J, Wark JD, Weisinger HS, Weisinger RS. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation reduces hypertension in TGR(mRen-2)<sup>27</sup> rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;78:67-72.

Joshi S, Rao S, Golwilkar A, et al. Fish oil supplementation of rats during pregnancy reduces adult disease risks in their offspring. *J Nutr* 2003;133:3170-3174.

Koletzko B, Agostoni C, Carlson SE, Clandinin T, Hornstra G, Neuringer M, Uauy R, Yamashiro Y, Willats P. Long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) and perinatal development. *Acta Paediatr* 2001;90:460-464.

Koletzko B, Cetin I, Brenna T, Perinatal Lipid Intake Working Group. Dietary fat intakes for pregnant and lactating women. *Br J Nutr* 2007; 98:873-877.

Martin R, Ness A, Gunnell D, Emmett P, Davey G. Does breast-feeding in infancy lower blood pressure in childhood? The Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Circulation* 2004;109:1259-1266.

McMilan Robinson J. Developmental origins of the metabolic syndrome prediction, plasticity and programming. *Physiological reviews* 2005; 85:571-633.

Mellouk Z, Hachimi I, Louchami K, Hupkens E, Sener A, Ait Y, Malaisse WJ. The metabolic syndrome of fructose-fed rats: Effects of long-chain polyunsaturated w3 and w6 fatty acids. II. Time course of changes in food intake body weight, plasma glucose and insulin concentrations and insulin resistance. *Int J Mol Med* 2011.

Nettleton JA, Katz R. n-3 Long chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. *J Am Diet Assoc* 2005;428-440.

Nicoletto S, Rinaldi A. In the womb's shadow. The theory of prenatal programming as the fetal origin of various adult diseases is increasingly supported by a wealth of evidence. *EMBO* 2011;12:30-34.

Olson RE. Nutrition and genetics: an expanding frontier. *Am J Clin Nutr* 2003;78:201-208.

Owen C, Martin R, Whincup P, Smith G, Cook D. Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence. *Am J Clin Nutr* 2006;84:1043-1054.

Owen CG, Whincup PH, Kaye SJ, Martin RM, Davey S, Cook DG, Bergstrom E, et al. Does initial breastfeeding lead to lower blood cholesterol in adult life? A quantitative review of the evidence. *Am J Clin Nutr* 2008;88(2):305-314.

Owen CG, Whincup PH, Odoki K, Gilg JA, Cook DG. Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics* 2002;110:597-608.

Plancoulaine S, Charles MA, Lafay L, Tauber M, Thibault N, Borys JM, Eschwege E, Fleurbaix Laventie Ville Santé Study group. Infant-feeding patterns are related to blood cholesterol concentration in prepubertal children aged 5-11 y: The Fleurbaix-Laventie Ville Santé study. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:114-119.

Ramakrishnan U, Stein A, Parra-Cabrera S, Wang M, Imhoff-Kunsch B, Juárez-Márquez S, Rivera J, Martorell R. Effects of docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy on gestational age and size at birth: randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Mexico. *Food and Nutrition Bulletin* 2010;31:S108-S115.

Ramírez-Silva I, Villalpando S, Moreno-Saracho J, Bernal-Medina D. Fatty acids intake in the Mexican population. Results of the National Nutrition Survey 2006. *Nutrition & Metabolism* 2011;8:33-43.

Reinehr T, Andler W. Changes in the atherogenic risk factor profile according to degree of weight loss. *Arch Dis Child* 2004;89:419-422.

Rodríguez-Cruz M, Tovar A, Nimbe M. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Revista de Investigación Clínica* 2005;57:457-472.

Rytter D, Schimidt E, Bech B, Cristensen J, Henriksen T, Olsen S. Fish oil supplementation during late pregnancy does not influence plasma lipids or lipoprotein levels in young adult offspring. *Lipids* 2011;46:1091-1099.

Sato D, Nakamura T, Tsutsumi K, Shinzawa G, Karimata T, Okawa T, Feng Z, Kusunoki M. Site dependency of fatty acid composition in adipose triacylglycerol in rats and its absence as a result of high-fat feeding. *Metabolism* 2011.

Siemelink M, Verhoef A, Dormans JA, et al. Dietary fatty acid composition during pregnancy and lactation in the rat programs growth and glucose metabolism in the offspring. *Diabetologia* 2002;45:1397-1403.

Sijben J, Calder P. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 2007;66:237-259.

Sprecher H. An update on the pathways of polyunsaturated fatty acid metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1999; 2:135-138.

Sullivan E, Smith M, Grove K. Perinatal exposure to high fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology* 2011;93:1-8.

Sweet DG, Hadden D, Halliday HL. The effect of early feeding on the neonatal blood glucose level at 1-hour of age. *Early Hum Dev* 1999;55:63-66.

Symonds ME, Sebert SP, Hyatt MA, Budge H. Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nature Reviews. Endocrinology* 2009;5:604-610.

Uauy R, Kain J, Mericq V, Rojas J, Corvalán C. Nutrition, child growth, and chronic disease prevention. *Annals of Medicine* 2008;40:11-20.

Valenzuela A, Nieto S. Ácido docosahexaenoico (DHA) en el desarrollo fetal y en la nutrición materno infantil. *Rev méd Chile* 2001;129:1203-1211.

Waterland R, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999;69:179-197

Weisinger HS, Armitage JA, Sinclair AJ, Vingrys AJ, Burns PL, Wisinger RS. Perinatal omega 3 fatty acid deficiency affects blood pressure later in life. *Nat Med* 2001;7:258-259.

## Anexo 1. Operacionalización de variables

Concepto	Variable	Tipo de variable	Definición	Unidades	Escala de medición	Instrumento de medición o fuente de datos
Factores de riesgo cardiometabólico 1. Perfil metabólico a. Perfil lipídico	Colesterol total	Dependiente	Diferencia entre grupo intervención y placebo	mg/dL	Continua	Sangre venosa
Factores de riesgo cardiometabólico 1. Perfil metabólico a. Perfil lipídico	Triacilglicéridos	Dependiente	Diferencia entre grupo intervención y placebo	mg/dL	Continua	Sangre venosa
Factores de riesgo cardiometabólico 1. Perfil metabólico a. Perfil lipídico	LDL	Dependiente	Diferencia entre grupo intervención y placebo	mg/dL	Continua	Sangre venosa
Factores de riesgo cardiometabólico 1. Perfil metabólico a. Perfil lipídico	HDL	Dependiente	Diferencia entre grupo intervención y placebo	mg/dL	Continua	Sangre venosa
Factores de riesgo cardiometabólico 1. Perfil metabólico a. Perfil lipídico	Apo B	Dependiente	Diferencia entre grupo intervención y placebo	mg/dL	Continua	Sangre venosa
Factores de riesgo cardiometabólico 1. Perfil metabólico b. Homeostasis de glucosa	Glucosa	Dependiente	Diferencia entre grupo intervención y placebo	mg/dl	Continua	Sangre venosa
Factores de riesgo cardiometabólico 1. Perfil metabólico b. Homeostasis de glucosa	Insulina	Dependiente	Diferencia entre grupo intervención y placebo	mg/dl	Continua	Sangre venosa
Factores de riesgo cardiometabólico 2. Presión arterial	a. Presión arterial sistólica (PAS), b. diastólica (PAD) y c. presión arterial media (PAM)	Dependiente	Diferencia entre grupo intervención y placebo	mmHg	Continua	
Factores de riesgo cardiometabólico 2. Presión arterial	Amplitud de pulso	Dependiente	Diferencia entre grupo intervención y placebo	mmHg	Continua	

Concepto	Variable	Tipo de variable	Definición	Unidades	Escala de medición	Instrumento de medición o fuente de datos
Suplementación	DHA	Independiente	Intervención (400 mg diarios)/placebo	mg	Categórica (con/sin intervención)	Registro grupo intervención/placebo
Covariable materna	IMC pregestacional	Covariable		Kg/m <sup>2</sup>	Continúa	Registro basal
Covariable materna	Tabaquismo	Covariable		Si/NO (fuma en presencia del niño)	Categórica Frecuencia: diario, 4-6 días/semana; 1-3 días/semana; <1 día/semana	
Covariable materna	Nivel socioeconómico (NSE)	Covariable		Terciles	Categórica (bajo, medio, alto)	Encuesta de NSE
Covariable materna	Ingesta de ácidos grasos, hidratos de carbono, proteínas.	Covariable		% de contribución a la ingesta	Continua	Recordatorio de 24 hrs.
Covariable en preescolares	Sexo	Covariable		Femenino/masculino	Categórica	Encuesta de seguimiento 4-5 años
Covariable en preescolares	Edad gestacional	Covariable		Semanas de gestación	Continua	Registro al nacimiento
Covariable en preescolares	Peso al nacimiento	Covariable		g	Continua	Registro al nacimiento
Covariable en preescolares	Talla al nacimiento	Covariable		cm	Continua	Registro al nacimiento
Covariable en preescolares. Ingesta infantil (1 y 3 mes)	Lactancia materna	Covariable		%	Continua	Recordatorio de 24 hrs.
Covariable en preescolares. Ingesta infantil (48 y 60 meses)	Ingesta de ácidos grasos, hidratos de carbono, proteínas	Covariable		g	Continua	Frecuencia de consumo de alimentos
Covariable en preescolares	IMC preescolares (4 y 5 años)	Covariable		Kg/m <sup>2</sup>	Continua/categórica	Antropometría de seguimiento a los 4 y 5 años
Covariable en preescolares	Actividad física (no. de horas dedicadas a realizar algún deporte)	Covariable		Nunca o casi nunca, 2 hrs/sem, más de 2 hrs/sem	Categórica	Cuestionario de exposición ambiental

Covariable en preescolares	Actividad física (no. de horas frente a pantallas (TV y videojuegos)	Covariable		Nada, menos de una hora, 1-2 horas, 2-3 hrs, 4-5 hrs., 6-7 hrs, >7 hrs.	Categórica	Cuestionario de exposición ambiental
----------------------------	--	------------	--	---	------------	--------------------------------------

**Anexo 2.** Cálculo de diferentes tamaños de muestra variando la diferencia mínima a encontrar en cada una de las variables dependientes.

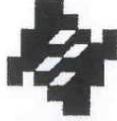
Dato	D	D <sup>2</sup>	DE	S <sup>2</sup>	N	Estudio
<b>Colesterol</b>	-1.54	2.4	27.6	761.8	5043.6	Owen, 2008. Lactancia vs. fórmula evaluación en >16 años. Se imputó la DE del promedio de Col de un estudio que evaluó el estado cardiovascular de niños Chilenos a los 4 años (Corvalán, 2010)
	3.87	15.0	27.6	761.8	798.7	Rytter, 2011. Evaluación del efecto de la Suplement. con FO vs. OO en el embarazo en los hijos de madres supl a los 19 años. Se imputó la DE del promedio de Col de un estudio que evaluó el estado cardiovascular de niños Chilenos a los 4 años (Corvalán, 2010)
	7	49.0	27.6	761.8	244.1	Owen, 2002. Lactancia vs. fórmula evaluación en >17 años. Se imputó la DE del promedio de Col de un estudio que evaluó el estado cardiovascular de niños Chilenos a los 4 años (Corvalán, 2010)
	11.6	134.6	27.6	761.8	88.9	Plancoulain, 2000. Evaluación de lactancia niños entre 5-11 años. Se imputó la DE del estudio de Corvalán, 2010)
<b>LDL</b>	3.87	15.0	26.2	686.4	719.7	Rytter, 2011. Efecto de la supl prenatal con FO vs. NO (no suppl) sobre Perfil líp a los 19 años. DE imputado de promedio de LDL del estudio de evaluación de riesgo cardiovascular (RCV) en niños de 4 años (Corvalán, 2010)
	7	49.0	26.2	686.4	220.0	Reinehr T, 2004 Changes in the atherogenic risk factor profile according to degree of weight loss. DE imputado de promedio de LDL del estudio de evaluación de RCV en niños de 4 años (Corvalán, 2010)
	-15.48	239.6	26.2	686.4	45.0	Rytter, 2011. . Efecto de la supl prenatal con FO vs. NO (no suppl) sobre Perfil líp a los 19 años. Este efecto es en el subgrupo con baja ingesta de pescado. DE imputado de promedio de LDL del estudio de evaluación de RCV en niños de 4 años (Corvalán, 2010)
	22.04	485.8	41	1681	54.3	Agostoni, 2000. Fórmula estándar vs. supl. AGPI, evaluación a los 4 meses.
<b>HDL</b>	-1.54	2.4	14.7	216.1	1430.7	Ayer, 2009. Efecto de la suplementación dietética con AGPI n-3 desde el destete y hasta los 5 años sobre la PA y perfil de lípidos a los 8 años. Se toma la DE del grupo intervenido
	-1.56	2.4	11.7	136.9	883.3	Holmes, 2009. Lactancia materna vs. fórmula en adolescentes. DE lactancia materna
	3.87	15.0	11.7	136.9	143.5	Rytter, 2011 (FO vs. OO). Efecto de la supl prenatal con FO vs. OO (aceite de oliva) sobre perfil líp a los 19 años. DE imputada de Holmes, 2009

<b>TGL</b>	-7.09	50.3	34.9	1218.0	380.5	Daamsgard, 2005. Estudio de supl con aceite de pescado en niños de 9 meses (3 meses de intervención). Puesto que Damsgard solo reporta SEM, se imputo la DE del promedio de TGL de un estudio que evaluó el estado cardiovascular de niños Chilenos a los 4 años (Corvalán, 2010)
	-26.58	706.5	67.4	4536.0	100.8	Rytter, 2011. Efecto de la supl prenatal con FO vs NO (no supl) sobre perf líp a los 19 años. Supl en submuestra de mujeres con baja ingesta de pescado. DE imputada
<b>Apo B</b>	2	4.0	16.0	256.0	1005.0	Ayer, 2009. Suplementación con AGPI-CL n3 después del destete y hasta los 5 años. DE del grupo intervención
	-10	100.0	16.0	256.0	40.2	Rytter, 2011. Suplementación con FO vs. NO (Submuestra de mujeres con baja ingesta de pescado). DE imputada de Ayer, 2009
<b>Glucosa</b>	-0.18	0.03	7.0	49.0	23747.5	Owen, 2006. Lactancia materna vs. fórmula estándar en niños y adolescentes. DE imputada Corvalán, 2010
	-3.06	10.9	7.0	49.0	70.7	Owen, 2006. Lactancia materna vs. fórmula estándar en la infancia. DE imputada Corvalán, 2010
	-3.24	10.5	7.0	49.0	73.3	Sweet, 1999. Lactancia materna vs. fórmula a 1-hrs de nacido. DE imputada Corvalán, 2010
<b>Insulina</b>	-0.41	0.2	11.2	124.8	11654.8	Owen, 2006. Lactancia materna vs. fórmula estándar en niños y adolescentes. DE imputada
<b>Presión arterial sistólica</b>	-1.7	2.89	9.6	92.16	500.7	Martin R, 2004. Efectos de lactancia materna a los 7 años de edad entre niños amamantados y no amamantados. Se tomó la DE los niños no amamantados.
	-2.3	5.29	9.7	94.09	279.3	Forysth. Suplementación de una fórmula con aceite de pescado vs. fórmula estándar. Se toma la DE del grupo alimentado al seno materno ya que no se reportan las DE de los dos grupos con fórmula
	3.8	14.44	7.1	50.41	54.8	Asserhoj, 2008. Suplementación materna con aceite de pescado (FO) durante la lactancia y sus efectos en la PA en sus hijos a los 7 años. Se tomó la DE del grupo suplementado con FO
	-4.7	22.09	9.7	94.09	66.9	Damsgaard, 2005. Estudio de suplementación con aceite de pescado en niños de 9 meses (intervención por 3 meses). Se imputa DE del artículo de Forysth ya que no se reporta la DE solo SEM
<b>Presión arterial Diastólica</b>	-0.8	0.64	6.8	46.24	1134.5	Martin R, 2004. Efectos de lactancia materna a los 7 años de edad entre niños amamantados y no amamantados. Se tomó la DE del promedio del grupo no amamantado
	-2	4	8.5	72.25	283.6	Damsgaard, 2005. Estudio de suplementación con aceite de pescado en niños de 9 meses (intervención por 3 meses). Se imputa DE del estudio de Forysth ya que este autor solo reporta SEM

	2.3	5.29	5.8	33.64	99.9	Asserhoj, 2008. Suplementación materna con aceite de pescado (FO) durante la lactancia y sus efectos en la PA en sus hijos a los 7 años. Se tomó la DE del gpo. de intervención (FO).
	-3.6	12.96	8.5	72.25	87.5	Forysth. Suplementación de una fórmula con aceite de pescado vs. fórmula estándar. Se toma la DE del grupo alimentado al seno materno ya que no se reportan las DE de los dos grupos con fórmula
<b>Presión arterial media</b>	-3	9	5.4	29.16	50.9	Forysth. Suplementación de una fórmula con aceite de pescado vs. fórmula estándar. Se imputa DE Asserhoj ya que no se reporta DE en el artículo
	2.8	7.84	5.4	29.16	58.4	Asserhoj, 2008. Suplementación materna con aceite de pescado durante la lactancia y sus efectos en la PA en sus hijos a los 7 años. Se tomo la DE del grupo intervenido.
	-0.3	0.09	5.4	29.16	5087.6	Damsgaard, 2005. Estudio de suplementación con aceite de pescado en niños de 9 meses (intervención por 3 meses). Se imputa DE de Asserhoj ya que no se reporta DE solo SEM

Nota: se sombrea en color rosa la diferencia esperada para cada variable de respuesta.

**Anexo 3.** Cartas de aprobación Comité de Ética, Comisión de bioseguridad y Comisión de investigación proyecto madre: "Effect of prenatal DHA supplementation on infant development".



**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA  
COMISIÓN DE ÉTICA**

0082/01

00338

Cuernacava, Morelos, 21 de mayo 2004

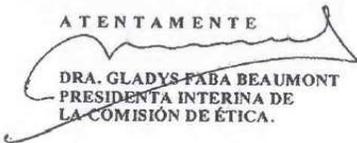
**DRA. SOCORRO PARRA  
INVESTIGADORA RESPONSABLE  
PRESENTE**

En atención al comunicado que Usted envió el 06 de abril del año en curso en el que informa que las correcciones solicitadas por esta Comisión al formato de la preguntas de la Comisión de Ética y a la carta de consentimiento informado del protocolo "EFFECT OF PRENATAL SUPPLEMENTS ON INFANT DEVELOPMENT" fueron debidamente incorporadas a la documentación del protocolo y registradas en el SIID, me es grato otorgarle el dictamen de

**APROBADO**

Con la especial solicitud de que tenga a bien atender la última sugerencia que señaló esta Comisión en relación con la pertinencia de que los datos de la Comisión de Ética sean solamente de la que opera en este Instituto, esto con la finalidad de facilitar la comunicación de los participantes den el estudio con los investigadores mexicanos. Una vez que incorpore esta sugerencia le solicito atentamente incorpore la nueva versión de la carta de consentimiento informado al SIID.

**ATENTAMENTE**



**DRA. GLADYS FABA BEAUMONT  
PRESIDENTA INTERINA DE  
LA COMISIÓN DE ÉTICA.**

c.c.p. - Dr. Mario Henry Rodríguez.- Presidente de la Comisión de Investigación.  
Dr. Carlos Conde.- Presidente de la Comisión de Bioseguridad.  
Archivo Comisión de Ética



# INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA COMISION DE BIOSEGURIDAD



Cuernavaca, Mor., a 25 de marzo del 2004.

Dra. Socorro Parra Cabrera  
Responsable de Proyecto  
Centro de Investigaciones  
en Nutrición y Salud-INSP  
P r e s e n t e

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el protocolo de investigación titulado: "Effect of prenatal DHA supplements on infant development", el dictamen de esta Comisión es: **APROBADO**; debido a que dicho proyecto establece todas las medidas de uso y manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI), por lo que desde el punto de vista de Bioseguridad no existe ninguna objeción para continuar su proceso.

Le recordamos que cuando algún proyecto de investigación haga uso de agentes infecciosos o maneje muestras clínicas de origen humano y/o animal y no sean procesadas en este Instituto, deberá enviar una carta de la Institución o Instituciones en la cual se responsabilizan del manejo y disposición final de los RPBI y los tóxicos generados durante el transcurso de la investigación.

Asimismo, si el proyecto maneja materiales radiactivos, será necesario enviar a esta Comisión la licencia del ININ del responsable encargado.

Atentamente,

Dr. Carlos J. Conde-González  
Presidente de la Comisión  
de Bioseguridad-INSP

ccp. Dr. Mario Henry Rodríguez.- Presidente de la Comisión de Investigación.-Presente.  
Dr. Humberto Lanz Mendoza.- Secretario Técnico de la Comisión de Investigación.-Presente.  
Dra. Gladys Faba Beaumont.- Presidenta Interina de la Comisión de Etica.- Presente.  
Dr. Juan Rivera Dommarco.- Director del Centro de Investigación en Nutrición y Salud.-Presente

Col. Santa María Ahuacatlán  
62508 Cuernavaca, Morelos  
México

e-mail:cjconde@correo.insp.mx

Tel: 01 (777) 1 01 29 04  
Fax: 01 (777) 3 17 54 85  
Secretaría: 2105



**Instituto Nacional de Salud Pública  
Comisión de Investigación**

Área:

No. de Ref. 418

CI-112

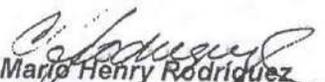
Cuernavaca, Mor., mayo 12 del 2004.

**Dra. Socorro Parra**  
Responsable del proyecto  
Presente

Por este medio le informo que la Comisión de Investigación dictaminó su proyecto "Effect of prenatal DHA supplements on infant development", como **Aprobado Definitivo**

Aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**

  
**Dr. Mario Henry Rodríguez**  
Presidente

Av. Universidad No. 655  
Col. Santa María Ahuacatitlán  
62508 Cuernavaca, Morelos  
México

e-mail: mhenry@insp3.insp.mx

Tels: 01 (777) 313 89 69  
01 (777) 329 30 71  
Fax: 01 (777) 317 54 85

**Anexo 4. Cartas de aprobación Comité de Ética, Comisión de bioseguridad y Comisión de investigación sub-proyecto: "Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and allergic diseases in childhood".**



INSTITUTO NACIONAL DE  
SALUD PÚBLICA

Avenida Universidad 655,  
Colonia Santa María Ahuecatitlán  
62100 Cuernavaca, Morelos, México

Teléfono: +52 (777) 329 30 00 Ext. 2465  
Email: jcastro@insp.mx  
web: www.insp.mx

**COMISIÓN DE ÉTICA**

Dra. Julieta Ivone Castro Romero  
Presidenta

Cuernavaca, Mor., 3 de agosto, 2010  
CI: 418, No.927  
**Proyecto secundario**

**Albino Barraza Villarreal**  
Investigador responsable  
Presente

En relación a su proyecto secundario titulado "*Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and allergic diseases in childhood*", me permito informarle que los miembros de la Comisión de ética le han otorgado el dictamen de:

**Aprobado**

Le informamos que esta aprobación tiene vigencia hasta el 2 de agosto del 2011.

**Renovación anual:** Si su estudio se extiende por un período mayor, favor de presentar el formato de *Renovación anual* con 45 días de anticipación a su fecha de vencimiento. Favor de solicitar vía electrónica el formato correspondiente a esta Comisión. *Nota: Es responsabilidad de usted como Investigador Responsable de este proyecto solicitar la renovación anual de su estudio con suficiente anticipación.*

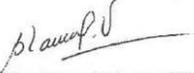
**Consentimiento:** Para obtener el consentimiento de los sujetos humanos de su estudio únicamente se deberán utilizar los materiales que han sido aprobados y sellados por esta Comisión.

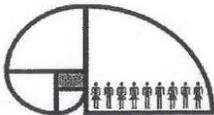
**Addenda/Modificaciones:** Le recuerdo que cualquier cambio o actualización en los procedimientos de este estudio deberá ser enviado a esta Comisión previo a su implementación, utilizando el sistema SIID.

El número de su proyecto es **418** y el de esta aprobación es **927**. Le pedimos hacer referencia a estos números para cualquier correspondencia futura.

Le agradecemos su cooperación y compromiso con la protección de los derechos de los sujetos humanos en la investigación.

Atentamente

  
Firma el presente la Dra. Blanca Pelcastre Villafuerte, con fundamento en el Artículo 44 del Estatuto Orgánico del INSP, así como en el escrito de fecha 27 de julio del 2010 en el cual se le designó como suplente para estas actividades.





# INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA COMISION DE BIOSEGURIDAD



CB10-203.

Cuernavaca, Mor., a 24 de Agosto del 2010.

CB: 414 - CI: 418

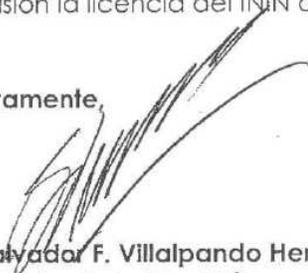
Dr. Albino Barraza Villarreal  
Responsable de Proyecto  
CISP-INSP  
Presente

Por medio del presente informo a usted que el dictamen de la Comisión de Bioseguridad a su adendum titulado: "**Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and allergic diseases in childhood**" cuyo protocolo Madre es el titulado: "**Effect of prenatal DHA supplements on infant development**"; es: **APROBADO**; debido a que dicho adendum establece todas las medidas de uso y manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI); por lo que desde el punto de vista de Bioseguridad no existe ninguna objeción para continuar su proceso.

Le recordamos que cuando algún proyecto de investigación haga uso de agentes infecciosos o maneje muestras clínicas de origen humano y/o animal y no sean procesadas en este instituto, deberá enviar una carta de la institución o instituciones en la cual se responsabilizan del manejo y disposición final de los RPBI y tóxicos generados durante el transcurso de la investigación.

Asimismo, si el proyecto maneja materiales radiactivos, será necesario enviar a esta Comisión la licencia del ININ del responsable encargado.

Atentamente,

  
Dr. Salvador F. Villalpando Hernández  
Presidente de la Comisión  
de Bioseguridad-INSP

Col. Santa María Ahuacatlilán  
62508 Cuernavaca, Morelos  
México

e-mail: [svillalp@insp.mx](mailto:svillalp@insp.mx)

Tel-Fax:01 (777) 3293000 ext 7204  
Secretaría: 7204



Instituto Nacional de Salud Pública  
Comisión de Investigación

No. de Ref. 418.

Cuernavaca, Mor., a 2 de septiembre del 2010.

**Dr. Albino Barraza Villarreal**  
**Responsable de Proyecto**  
**CISP-INSP**  
**Presente**

Por medio del presente informo a usted, que se registró la aprobación de las comisiones de Ética y Bioseguridad del proyecto secundario titulado: **"Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and allergic diseases in childhood"**; cumpliendo así con los requisitos para la aprobación definitiva de la Comisión de Investigación.

Aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Atentamente,

  
**Dr. Eduardo C. Lazcano Ponce**  
**Presidente de la Comisión**  
**de Investigación-INSP**

Ccp.- Dr. Eduardo C. Lazcano Ponce.- Director Adjunto del CISP.- Presente.  
Dr. Aurelio Cruz Valdez.- Subdirector de Apoyo Académico CISP.- Presente.  
M.E. Víctor Hugo Minor López.- Subdirector de Proyectos.- Presente.

Av. Universidad No. 655  
Col. Santa María Ahuacatlán  
62100 Cuernavaca, Morelos  
México

Tels. 01 (777) 3293003  
Tels. 01 (777) 3293078  
Tels. 01 (777) 3111148

[elazcano@insp.mx](mailto:elazcano@insp.mx)

## Anexo 5. Carta de consentimiento informado. Seguimiento a los 4 años.



Instituto Nacional de Salud Pública (INSP – Cuernavaca, Morelos México)  
Hospital Regional General No. 1 Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Delegación Morelos.  
En colaboración con la Escuela de Salud Pública, Universidad de Emory, Atlanta, GA, EUA

### FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO – 36 y 48 Meses Noviembre, 2008

**Título: Efecto de la suplementación con ácido docosahexaenóico (DHA) durante el desarrollo del infante.**

Investigadores Principales: Dra. Usha Ramakrishnan (Universidad de Emory, Atlanta)  
Dra. Lynnete Neufeld (INSP; México)  
Dra. Isabelle Romieu (INSP; México)

Co-Investigadores

Dr. Juan Rivera (INSP; México)  
Dr. Sergio Juárez -Márquez (IMSS, México)  
Dr. Reynaldo Martorell (Universidad de Emory, Atlanta)  
Dra. Ann DiGirolamo (Universidad de Emory, Atlanta)  
Dr. Albino Barraza Villarreal

#### Introducción /Propósito

Estimada Señora \_\_\_\_\_

El objetivo principal del estudio, en el cual usted ha estado participando, ha sido examinar si los ácidos grasos esenciales, llamados ácido docosahexaenóico (DHA), los cuales ingirió durante la segunda parte de su embarazo, pueden incrementar el peso de su bebé al nacer y mejorar su crecimiento y desarrollo. Los ácidos grasos esenciales no pueden ser producidos por el cuerpo humano, pero son muy necesarios para el funcionamiento adecuado del cerebro. En esta ocasión estamos solicitando su autorización para que nos permita continuar con el seguimiento de su hijo y evaluar el crecimiento y desarrollo pulmonar hasta los 48 meses de edad, ya que igualmente se ha observado que los ácidos grasos omega-3 pueden jugar un papel importante en la maduración pulmonar y disminuir el riesgo de enfermedades alérgicas de los niños.

**Procedimientos:** Si Usted acepta participar en esta fase del estudio, se evaluará el crecimiento y desarrollo de su bebé y el crecimiento y maduración pulmonar hasta los 48 meses, utilizando técnicas muy sencillas, las cuales no causarán ningún daño o molestias graves a su hijo(a).

Durante la visita que usted realice al hospital del IMSS, en primer lugar, personal especializado realizará la toma de peso y talla de su hijo(a). En segundo lugar se le aplicará un cuestionario en donde se incluyen preguntas generales relacionadas con la salud de su bebé, el cual tendrá una duración de aproximadamente 25 minutos. En tercer lugar se le solicitará su autorización para tomarle una muestra venosa de 3 ml de sangre del brazo de su niño, equivalente a 2 cucharaditas aproximadamente, la cual le ocasionará molestias mínimas y se realizará con material nuevo y estéril y por último se le realizará una prueba de función pulmonar, la cual consiste en pedirle a su hijo que respire por un tiempo de 5 segundos de manera normal en un tubo (boquilla), el cual está conectado a un aparato que mide la cantidad de aire que su hijo expulsa durante la respiración, este procedimiento no causa ninguna molestia para su hijo, no requiere de esfuerzos

por parte del niño y no significa ningún riesgo para su salud. Todas estas actividades se llevarán a cabo en la clínica 1 del IMSS de Cuernavaca, Morelos, durante su visita.

Por último, le solicitaremos nos actualice la información relacionada con dirección y teléfono, donde se le pueda localizar y permitir realizar una visita a su domicilio para tomar una muestra de polvo de su casa, tal como la realizada cuando usted estaba embarazada, esta muestra se tomara específicamente de la sala y de la recámara de su hijo, se utilizará una aspiradora, y se utilizará el mismo procedimiento y tiempo que se tomo durante la muestra anterior, esta nueva muestra de polvo la tomaremos durante los 48 meses de edad.

**Beneficios:** No existe un beneficio directo para usted, pero si usted decide participar estará colaborando con el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), y la Universidad de Emory, en su misión de investigar y encontrar soluciones a los problemas de salud de niños de nuestro país.

**Confidencialidad:** Toda la información que nos proporcione será estrictamente confidencial y únicamente se utilizará por los investigadores del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito distinto al de este estudio. Los resultados del estudio se publicarán solo con propósitos científicos, y se escribirán de tal forma que los participantes no serán identificados, ya que en lugar de mencionar sus nombres, a Usted y a su bebé se les asignará un número de participante. Los resultados del estudio no serán incluidos en su expediente médico y no afectarán la atención médica que se le proporciona en el hospital.

**Riesgos potenciales/Compensación.** Usted recibirá una compensación de \$35.00 para sus gastos de transporte por esta visita que realice con su bebé al hospital. Consideramos que no existe riesgo alguno derivado de su participación en el estudio, sin embargo si surgiera algún problema, le aclaramos que no recibirá ninguna otra compensación o pago

**Participación voluntaria/retiro del estudio:** Su participación en esta fase del estudio es completamente voluntaria. Usted es libre de aceptar participar o no. Si usted decide No participar esto no la afectará como participante del proyecto de suplementación con ácidos grasos esenciales (DHA). Tampoco la afectará en la atención o en los servicios médicos que recibe en el IMSS o en cualquier otro hospital. Asimismo, le aclaramos que usted es libre de suspender su participación en el estudio en el momento en que lo desee.

**Personas de referencia:** Si Usted tiene cualquier pregunta, comentarios o preocupaciones respecto al proyecto, favor de contactar a la Dra. Lynnete Neufeld o a la Dra. Isabelle Romieu, investigadoras principales del proyecto, en el Instituto Nacional de Salud Pública ubicado en Av. Universidad No. 655 Col Sta. Ma. Ahuacatitlan, Cuernavaca, Mor, al teléfono (777) 329 3000 Ext. 7423 de 9:00 a 17:00 hrs.

Si usted tiene preguntas generales acerca de sus derechos como participante en un estudio de investigación, puede comunicarse con la Presidente de la Comisión de Ética del INSP, Dra. Julieta Ivonne Castro, en el teléfono (777) 329 3000 ext. 7424, de lunes a viernes de 9:00 a 17:00 hrs.

**Antes de aceptar, le pedimos que nos externé cualquier pregunta o duda que tenga referente a este estudio.**

Si acepta participar en el estudio, usted recibirá una copia de este documento que le pediremos que firme.

**Consentimiento para participar en el estudio**

Su firma indica su aceptación para participar voluntariamente en el presente estudio.

Nombre y Firma de la participante:

Fecha:

\_\_\_\_\_  
Día / Mes / Año

\_\_\_\_\_  
*Testigo #1:*  
Nombre y Firma:

Fecha:

\_\_\_\_\_  
Día / Mes / Año

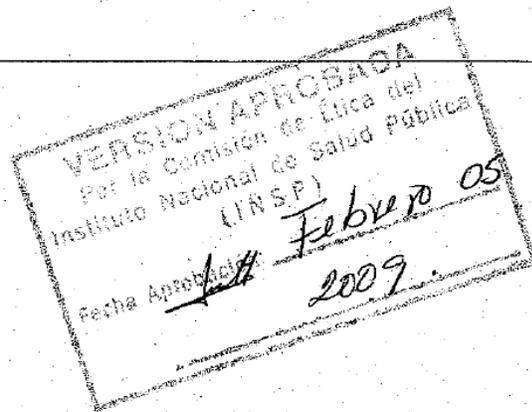
\_\_\_\_\_  
*Testigo #2:*  
Nombre y Firma

Fecha:

\_\_\_\_\_  
Día / Mes / Año

Nombre y firma del individuo que obtiene el consentimiento:

Atentamente,  
Dra. Lynnete Neufeld,  
Responsable del Proyecto.



## Anexo 6. Carta de consentimiento informado. Seguimiento a los 5 años.



Instituto Nacional de Salud Pública (INSP – Cuernavaca, Morelos México)

Regional General Hospital No. 1 Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Delegación Morelos.  
En colaboración con la Escuela de Salud Pública, Universidad de Emory, Atlanta, GA, EUA

### FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO – 5 años 2010

Título: Efecto de la suplementación con ácido docosahexaenóico (DHA) en el desarrollo del niño.

Título proyecto secundario: Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and allergic diseases in childhood

Investigadores Principales: Dra. Usha Ramakrishnan (Emory University, Atlanta)  
Dr. Juan Rivera (INSP; México)  
Dra. Isabelle Romieu (INSP; México)

Co-Investigadores: Mtra. Laura Ávila Jiménez –Márquez (IMSS, México)  
Dr. Albino Barraza Villarreal (INSP; México)

#### Introducción /Propósito

Estimada Señora

Como es de su conocimiento, usted ha estado participando con el Instituto Nacional de Salud Pública en el proyecto sobre suplementación con ácidos grasos durante su embarazo. Motivo por el cual, hoy le volvemos a invitar a participar en el nuevo seguimiento del mismo. El objetivo principal de esta parte del estudio es evaluar si los ácidos grasos esenciales, llamados ácido docosahexaenóico (DHA), tomados durante el embarazo, pueden mejorar la salud y el crecimiento durante la niñez. Los ácidos grasos esenciales no pueden ser producidos por el cuerpo humano pero son necesarios para el funcionamiento adecuado del cerebro y se piensa que pueden jugar un papel importante en el crecimiento, el desarrollo, así como, en la maduración pulmonar y disminuir el riesgo de enfermedades alérgicas de los niños a edades tempranas. En esta ocasión estamos solicitando su autorización para que nos permita continuar con el seguimiento de su hijo a los 5 años de edad y evaluar su crecimiento, el desarrollo pulmonar y neuroconductual.

**Procedimientos:** Si Usted acepta participar en esta fase del estudio se evaluará el crecimiento, desarrollo y la función de los pulmones de su hijo utilizando técnicas sencillas, las cuales no causarán ningún daño o molestias graves a su hijo(a).

#### Dado que su hijo tiene 5 años se realizarán las siguientes actividades:

1. Toma de la presión arterial del niño para lo cual se requiere que el niño esté descansando unos 10 minutos antes de que sea medida. Una prueba de función pulmonar, la cual es semejante a la que realizó a los 3 y 4 años de edad, que consiste en pedirle a su hijo(a) que respire por un tiempo de 5 segundos de manera normal en un tubo (boquilla estéril y desechable de uso único), el cual está conectado a un aparato que mide la cantidad de aire que su hijo expulsa durante la respiración, este procedimiento requiere pocos esfuerzos por parte del niño, y no significa ningún riesgo para su salud. A algunos niños no les gusta respirar en un tubo, pero no les causa ningún daño.
2. Toma de peso, talla, circunferencia de brazo, circunferencia abdominal, pliegue subescapular y tricipital; estas 2 últimas mediciones, nos permiten saber la cantidad de grasa que tiene su niño, consisten en sujetar una porción de la piel del brazo y espalda del niño, pero no genera daño alguno. Cada medida será tomada 2 veces por personal ampliamente capacitado y estandarizado.
3. Con el fin de conocer si su hijo tiene o no anemia, se realizará un piquete en el dedo, para obtener una gota de sangre y medir su concentración de hemoglobina
4. Su hijo participará en una sesión de juegos con cubos, rompecabezas, dibujos que nos permitirán observar el desarrollo de sus habilidades cognitivas y su comportamiento social. También realizara unos juegos en la computadora para medir nivel de atención del niño.

A usted le pediremos que nos apoye respondiendo los siguientes cuestionarios relacionados con su hijo:

5. Un cuestionario acerca del comportamiento de su hijo, por ejemplo, si se lleva bien con otros niños, o cómo se relaciona con mascotas u otros animales? etc.
  6. Un cuestionario relacionado con la salud de su hijo.
  7. Un cuestionario (Recordatorio de 24 horas) sobre los alimentos que comió su hijo el día anterior a la aplicación del cuestionario. Todas estas actividades serán realizadas en la Clínica No. 1 del IMSS y nos llevarán aproximadamente 2 horas ½ de su tiempo. También la visitaremos en su hogar dentro de la próximos 7 días para completar los siguientes cuestionarios, lo cuales les tomaran aproximadamente 1 hora ¼ de su tiempo.
  8. Un cuestionario sobre la historia de desarrollo del niño y las escuelas o programas de estimulación a la que ha asistido.
  9. Un cuestionario con el propósito de observar cómo se desenvuelve su niño en su hogar
  10. Se le solicitará la cartilla de vacunación para actualizar sus datos.
11. Finalmente, solo en el caso de que no podamos localizarla en su domicilio, le pedimos su autorización para revisar su expediente en el IMSS, únicamente con el fin de actualizar los datos de su dirección.

Exclusivo del punto 11. SI Acepto

No Acepto

**Lugar en el que se llevarán a cabo las actividades:**

- a) Las primeras 7 actividades que le mencionamos, se realizarán en la clínica num 1 del IMSS, en Cuernavaca, Morelos, , tomando aproximadamente 2½ hr de su tiempo
- b) Las actividades del punto 8 al 10, se realizaran, en su hogar y se estima que tomarán aproximadamente 1 ¼ hr. de su tiempo

**Beneficios:** No existe un beneficio directo para usted o su hijo, pero si usted decide participar estará colaborando con el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), y la Universidad de Emory, en su misión de investigar y encontrar soluciones a los problemas de salud de niños de nuestro país.

**Confidencialidad:** Toda la información que nos proporcione será estrictamente confidencial y únicamente se utilizará por los investigadores del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito distinto al de este estudio. Los resultados del estudio se publicarán solo con propósitos científicos, y se escribirán de tal forma que los participantes no serán identificados, ya que en lugar de mencionar sus nombres, a Usted y a su hijo(a) se les asignará un número de participante. Los resultados del estudio no serán incluidos en su expediente médico y no afectarán la atención médica que se le proporciona en el hospital, clínica o cualquier otra instancia de salud.

**Compensación:** Usted recibirá una compensación de \$35.00 para sus gastos de transporte cuando le hacemos la entrevista en el hospital.

**Riesgos potenciales:** Consideramos que existe muy poco riesgo derivado de su participación en el estudio, sin embargo si surgiera algún problema, le aclaramos que no recibirá ninguna otra compensación o pago.

**Participación voluntaria/retiro del estudio:** Su participación en esta fase del estudio es completamente voluntaria. Usted es libre de aceptar participar o no. Si usted decide no participar, esto no afectará la atención en los servicios médicos que recibe en el IMSS ni en cualquier otro hospital o instancia de salud. Asimismo, le aclaramos que usted es libre de suspender su participación en el estudio en el momento en que lo desee, está en la libertad de negarse a contestar alguna pregunta o a participar en alguna actividad específica.

**Personas de referencia:** Si Usted tiene cualquier pregunta, comentarios o preocupaciones respecto al proyecto, favor de contactar al Dr Juan Rivera o el Dr Albino Barraza Villarreal investigadores principales del proyecto, en el Instituto Nacional de Salud Pública ubicado en Av. Universidad No. 655 Col Sta. Ma. Ahuacatitlan, Cuernavaca, Mor, al teléfono (777) 329 3000 Ext. 3325 de 10:00 a 17:00 hrs. Si usted tiene preguntas generales acerca de sus derechos como participante en un estudio de investigación, puede comunicarse con la Presidente de la Comisión de Ética del INSP, Dra. Julieta Ivonne Castro, al teléfono (777) 329 3000 ext. 7424, de lunes a viernes de 9:30 a 17:30 hrs,

Antes de aceptar, le pedimos que nos externe cualquier pregunta o duda que tenga referente a este estudio.

Si acepta participar en el estudio, usted recibirá una copia de este documento que le pediremos que firme.

**Consentimiento para participar en el estudio**

Su firma indica su aceptación para que usted y su hijo participen voluntariamente en el presente estudio.

Nombre y Firma de la participante:

\_\_\_\_\_

Fecha:

\_\_\_\_\_   
 Día / Mes / Año

*Testigo #1:*

Nombre y Firma:

\_\_\_\_\_

Fecha:

Dirección

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_   
 Día / Mes / Año

\_\_\_\_\_

*Testigo # 2:*

Nombre y Firma:

\_\_\_\_\_

Fecha:

Dirección

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_   
 Día / Mes / Año

\_\_\_\_\_

Nombre y firma del individuo que obtiene el consentimiento:

\_\_\_\_\_



**Anexo 7. Autorización de uso de bases de datos (investigadores principales de los proyectos).**



Instituto Nacional  
de Salud Pública

Cuernavaca, Morelos; a 23 de febrero de 2012.

Asunto: Autorización de uso de bases de datos  
y autoría de artículos.

Dra. Julieta Ivone Castro  
Presidenta de la Comisión de Ética  
Instituto Nacional de Salud Pública  
P R E S E N T E

Por este conducto, en nuestra calidad de investigadores principales de los proyectos 1. "*Effect of prenatal DHA supplements on infant development*" ensayo clínico aleatorizado, controlado, doble ciego, cuya hipótesis original fue estudiar el efecto de la suplementación prenatal con ácido docosahexaenoico (DHA) en el crecimiento y desarrollo cognitivo de los productos de la gestación" y del proyecto (PI. Dr. Ramakrishnan) y 2. "*Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and allergic diseases in childhood*", sub- proyecto del estudio de investigación anteriormente mencionado (PI. Dr. Isabell Romieu); autorizamos a la alumna activa del Doctorado en Nutrición Poblacional: Yareni Yunuen Gutiérrez Gómez, a usar las bases de datos del proyecto para que realice sus análisis y los dos artículos de su propuesta de tesis doctoral titulada: "Efectos de la suplementación con ácido docosahexaenoico durante el embarazo sobre los niveles de lípidos, lipoproteínas, glucosa e insulina séricas, tensión arterial y composición corporal en pre-escolares hijos de madres suplementadas.

Cabe mencionar que estamos enterados y damos nuestra autorización para que la Alumna aparezca como autora principal de los dos artículos que derivarán de su propuesta de tesis. A saber:

1. Maternal DHA supplementation during pregnancy does/ does not affect blood pressure, in 5-years-old children.
2. Maternal DHA supplementation during pregnancy does/does not affect the metabolic profile (lipid profile and glucose metabolism) in 4-years-old children.

Atentamente

Dra. Usha Ramakrishna  
Investigador principal  
Proyecto DHA y desarrollo cognitivo  
Rollins School of Public Health of Emory University

Dra. Isabell Romieu  
Investigador principal  
Proyecto DHA y alergias  
Instituto Nacional de Salud Pública

## Anexo 8. Autorización de uso de bases de datos (responsables de los proyectos).



Instituto Nacional  
de Salud Pública

Cuernavaca, Morelos; a 23 de febrero de 2012.

**Asunto:** Autorización de uso de bases de datos  
y autoría de artículos.

Dra. Julieta Ivone Castro  
Presidenta de la Comisión de Ética  
Instituto Nacional de Salud Pública  
P R E S E N T E

Por este conducto, en nuestra calidad de responsables de los proyectos 1. *"Effect of prenatal DHA supplements on infant development"* ensayo clínico aleatorizado, controlado, doble ciego, cuya hipótesis original fue estudiar el efecto de la suplementación prenatal con ácido docosahexaenoico (DHA) en el crecimiento y desarrollo cognitivo de los productos de la gestación" (Pl. Dr. Ramakrishnan) y del proyecto y 2. *"Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and allergic diseases in childhood"*, sub-proyecto del estudio de investigación anteriormente mencionado (Pl. Dr. Isabell Romieu); autorizamos a la alumna activa del Doctorado en Nutrición Poblacional: Yareni Yunuen Gutiérrez Gómez, a usar las bases de datos del proyecto para que realice sus análisis y los dos artículos de su propuesta de tesis doctoral titulada: "Efectos de la suplementación con ácido docosahexaenoico durante el embarazo sobre los niveles de lípidos, lipoproteínas, glucosa e insulina séricas, tensión arterial y composición corporal en pre-escolares hijos de madres suplementadas.

Cabe mencionar que estamos enterados y damos nuestra autorización para que la Alumna aparezca como autora principal de los dos artículos que derivarán de su propuesta de tesis. A saber:

1. Maternal DHA supplementation during pregnancy does/ does not affect blood pressure, in 5-years-old children.
2. Maternal DHA supplementation during pregnancy does/does not affect the metabolic profile (lipid profile and glucose metabolism) in 4-years-old children.

Atentamente

**Dr. Juan Rivera**  
Responsable del proyecto  
Proyecto DHA y desarrollo cognitivo  
Instituto Nacional de Salud Pública

**Dr. Albino Barraza Villarreal**  
Responsable del proyecto  
Proyecto DHA y alergias  
Instituto Nacional de Salud Pública