



Universidad
de Alcalá

Programa de Doctorado en CIENCIAS DE LA SALUD

(D420)

Departamento de Medicina y Especialidades Médicas

TESIS DOCTORAL

“Estudio de la eficacia del tratamiento a largo plazo con ácido docosahexaenoico (DHA) sobre la inflamación pulmonar, sistémica e intestinal en pacientes con fibrosis quística”

Autor: Alejandro López Neyra

Directora de la Tesis: Dra. Adelaida Lamas Ferreiro

Tutor de la Tesis: Dr. Miguel Juan García González

Alcalá de Henares, año 2020

*“If you can fill the unforgiving minute
With sixty seconds' worth of distance run,
Yours is the Earth and everything that's in it,
And - which is more - you'll be a Man, my son!”*

*«Si llenas el minuto inolvidable y cierto
de sesenta segundos que te lleven al cielo...
todo lo de esta Tierra será de tu dominio,
y mucho más aún, ¡serás Hombre, hijo mío!»*

Rudyard Kipling, “If”

A mi padre.

AGRADECIMIENTOS

Es evidente que un trabajo de la magnitud de una Tesis es imposible sin la ayuda y la colaboración de muchas personas. Tanto a nivel personal como profesional, es imprescindible dejar constancia de mi más sincero agradecimiento:

A Nines, mi mujer, por estar siempre a mi lado, suplir mis ausencias y apoyarme en los momentos más difíciles.

A Gonzalo, Gabriel y Carlota, que nunca me han reprochado el tiempo que no he podido estar con ellos mientras elaboraba esta Tesis.

A mis padres, Isabel y Ramón, por sentar las bases de los que soy. Por ayudar siempre sin preguntar por qué. Por transmitirme valores que, sin duda, me han convertido en mejor médico y persona.

A Adelaida Lamas, directora de la tesis, por su trabajo, su apoyo y su crítica constructiva y siempre acertada. Por confiar en mí para hacer este trabajo. Por el desarrollo del proyecto y su constancia para que llegara a término. Por lo que he aprendido de ella, y no sólo durante el desarrollo de esta Tesis.

A Lucrecia Suárez, por sus sabios y prácticos consejos, y por saber dar un empujón cuando hacía falta. Y a su inseparable Héctor, cuya presencia siempre he sentido cercana a pesar de no haber coincidido laboralmente con él.

A Miguel García, tutor de la Tesis, por su ayuda en la relación con la Universidad y su excelente disposición.

Al magnífico equipo investigador que ha colaborado en el desarrollo de este trabajo. A Marta Muñoz y al resto de profesionales de la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Ramón y Cajal que han participado de manera directa en el proyecto: Ana de Blas, Marta Ruiz de Valbuena, María Garriga y Luis Máiz. A las enfermeras y auxiliar de la Unidad: Concha, Diana y Susana. A los investigadores colaboradores del resto de centros implicados en el proyecto: Joaquim Calvo y Carmen Ribes, del Hospital Universitario La Fe (Valencia), Rosa Girón, del Hospital Universitario La Princesa (Madrid), David González y Carlos Bousoño, del Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo) y Javier Manzanares, del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). Sin ellos, simplemente, no

hubiese sido posible llevar un proyecto de esta envergadura a término. Y a todo el personal, facultativos, residentes y de enfermería, anónimo para mí, que sin duda les han ayudado en sus respectivos centros a sacar este trabajo adelante.

Al resto de investigadores del Hospital Universitario Ramón y Cajal que han colaborado con los aspectos técnicos de la investigación: Óscar Pastor, por el análisis de los ácidos grasos; Rosa del Campo, por los análisis microbiológicos y la determinación de la actividad de elastasa de neutrófilo, y Rafael Cantón, por su colaboración en todos los aspectos relacionados con la microbiología; Garbiñe Roy, por su análisis de marcadores inflamatorios; Carmen Bayón y Miriam Menacho, por sus análisis bioquímicos; David Arroyo y Javier Zamora, por su ayuda en la elaboración del plan estadístico y análisis posterior. Son un ejemplo de dedicación y buen trabajo, y la prueba de que los grandes proyectos necesitan de la colaboración de grandes profesionales.

A Joan Soriano, por su impulso, ayuda y buenos comentarios para la elaboración de un manuscrito para publicar los resultados de este estudio.

A May Gálvez e Itziar de Pablo, de la Unidad de Investigación Clínica y Ensayos Clínicos, por su inestimable ayuda en el complicado mundo de “los estudios y ensayos clínicos”, y el personal del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Ramón y Cajal (IRYCIS), cuyo apoyo también han hecho posible el desarrollo y finalización de este trabajo.

Sin relación directa con el proyecto, pero muy relacionados con el camino que me ha llevado hasta aquí: A José Ramón Villa, por transmitirme la pasión por la neumología pediátrica. A Verónica Sanz, compañera de residencia primero, de trabajo después y amiga siempre. A mis compañeros de neumología pediátrica del Hospital Universitario Niño Jesús, porque a todos les debo algo de lo que soy: Maribel, Adolfo, Javier, Paqui, Esmeralda, Blanca y María Jesús.

Por último, a todos los pacientes que han participado en este proyecto y sus familias. Y al resto de pacientes de la Unidad de Fibrosis Quística que, día a día, nos dan lecciones sobre la constancia, el trabajo y la superación.

ÍNDICE

Índice general

Abreviaturas.....	27
Introducción	
1.- La fibrosis quística.....	33
2.- La inflamación en la fibrosis quística.....	39
2.1.- Desequilibrio entre mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios.....	41
2.2.- Papel de las células epiteliales.....	43
2.3.- Papel de los neutrófilos.....	44
2.4.- Otros tipos celulares implicados.....	46
2.5.- Tratamiento de la inflamación en la fibrosis quística.....	48
3.- Importancia de la nutrición en la fibrosis quística.....	53
4.- Los ácidos grasos esenciales en la fibrosis quística.....	55
5.- La suplementación con omega-3 en la fibrosis quística.....	59
6.- Resumen.....	65
Hipótesis y objetivos.....	67
1.- Objetivos del estudio.....	71
Material y Métodos	
1.- Diseño del estudio.....	75
2.- Participantes.....	77
2.1.- Criterios de inclusión.....	77
2.2.- Criterios de exclusión.....	77
2.3.- Criterios de retirada y análisis.....	78
3.- Aleatorización y enmascaramiento.....	79
4.- Intervención.....	81
5.- Variables de estudio.....	83
5.1.- Variables principales.....	83
5.2.- Variables secundarias.....	83
6.- Cronograma del estudio.....	85
7.- Procedimientos del estudio.....	87
7.1.- Definiciones.....	87
7.2.- Antropometría.....	87
7.3.- Función pulmonar.....	88
7.4.- Recogida y procesamiento de muestras.....	88
7.5.- Determinaciones analíticas.....	90
7.5.1.- Marcadores inflamatorios.....	90

7.5.2. Ácidos grasos poliinsaturados.....	91
7.6.- Calidad de vida.....	92
8.- Estadística.....	93
8.1.- Cálculo del tamaño muestral.....	93
8.2.- Análisis estadístico.....	93
9.- Financiación del estudio.....	97
Resultados	
1.- Población del estudio.....	101
2.- Resultados de las variables principales	
2.1.- Inflamación respiratoria: IL-8 en secreciones respiratorias.....	105
2.2.- Inflamación sistémica: IL-8 en suero.....	106
2.3.- Inflamación intestinal: calprotectina en heces.....	108
3.- Resultados de las variables secundarias	
3.1.- Otros marcadores de inflamación en secreción respiratoria.....	111
3.2.- Otros marcadores de inflamación en suero.....	115
3.3.- Variables clínicas relacionadas con la afectación respiratoria en la fibrosis quística.....	118
3.4.- Variables clínicas relacionadas con la afectación digestiva/nutricional en la fibrosis quística.....	122
3.5.- Calidad de vida.....	127
3.6.- Perfil de ácidos grasos poliinsaturados en plasma y membrana de eritrocito.....	130
3.7.- Seguridad.....	138
4.- Análisis de sensibilidad.....	141
Discusión.....	145
1.- Resultados sobre la inflamación respiratoria.....	149
2.- Resultados sobre la inflamación sistémica.....	151
3.- Resultados sobre la inflamación intestinal.....	155
4.- Resultados clínicos.....	157
4.1.- Variables clínicas relacionadas con la afectación respiratoria en la fibrosis quística.....	157
4.2.- Variables clínicas relacionadas con la afectación digestiva/ nutricional en la fibrosis quística.....	159
4.3.- Calidad de vida.....	161

4.4.- Perfil de ácidos grasos poliinsaturados en plasma y membrana de eritrocito.....	161
4.5.- Seguridad.....	164
5.- Fortalezas del estudio.....	167
6.- Limitaciones del estudio.....	169
Conclusiones.....	171
Consideraciones finales	175
Bibliografía.....	177
Anexos.....	197

Índice de Anexos, Tablas y Figuras

Anexos

Anexo 1. Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Anexo 2. Modelo de consentimiento informado para pacientes adultos (mayores de 18 años).

Anexo 3. Modelo de consentimiento informado para padre, madre o tutor del menor.

Anexo 4. Modelo de consentimiento informado para paciente menor mayor de 12 años.

Anexo 5. Listado de alimentos permitidos, limitados y prohibidos durante el estudio.

Anexo 6. Publicación derivada del Proyecto de Tesis (En prensa). doi.org/10.1016/j.plefa.2020.102186

Tablas

Tabla 1. Clases de mutaciones del gen CFTR.

Tabla 2. Mediadores inflamatorios presentes en la fibrosis quística.

Tabla 3. Productos liberados por los neutrófilos y sus consecuencias patológicas.

Tabla 4. Fármacos antiinflamatorios empleados o en estudio en la fibrosis quística.

Tabla 5. Composición cuantitativa de ácidos grasos poliinsaturados del producto DHA-Basic®.

Tabla 6. Criterios de exacerbación pulmonar del estudio (criterios de Fuchs modificados).

Tabla 7. Cronograma del estudio.

Tabla 8. Características basales de la población de estudio. Comparación de variables cualitativas.

Tabla 9. Características basales de la población de estudio. Comparación de variables cuantitativas.

Tabla 10. Comparación de los valores de IL-8 en secreciones respiratorias entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control a lo largo del estudio.

Tabla 11. Comparación de los valores de IL-8 en suero entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control a lo largo del estudio.

Tabla 12. Comparación de los valores de calprotectina en heces entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control a lo largo del estudio.

Tabla 13. Comparación de los valores de marcadores inflamatorios secundarios en secreciones respiratorias entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control al final del estudio.

Tabla 14. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para las variables inflamatorias secundarias en secreciones respiratorias (ajustado por el valor basal).

Tabla 15. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para las variables inflamatorias secundarias en secreciones respiratorias (ajustado por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización).

Tabla 16. Comparación de los valores de marcadores inflamatorios secundarios en suero entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control al final del estudio.

Tabla 17. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para las variables inflamatorias secundarias en suero (ajustado por el valor basal).

Tabla 18. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para las variables inflamatorias secundarias en suero (ajustado por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización).

Tabla 19. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para las variables relacionadas con la afectación digestiva/nutricional (ajustado por el valor basal).

Tabla 20. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para las variables relacionadas con la afectación digestiva/nutricional (ajustado por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización).

Tabla 21. Comparación de las puntuaciones en los diferentes dominios del cuestionario CFQ-R de la versión para adolescentes >14 años y adultos entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control a lo largo del estudio.

Tabla 22. Comparación de las puntuaciones en los diferentes dominios del cuestionario CFQ-R de la versión para padres/cuidadores entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control a lo largo del estudio.

Tabla 23. Comparación de las puntuaciones en los diferentes dominios del cuestionario CFQ-R de la versión para niños 6-13 años entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control a lo largo del estudio.

Tabla 24. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para la puntuación agrupada de los diferentes dominios del cuestionario CFQ-R (ajustado por el valor basal).

Tabla 25. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para la puntuación agrupada de los diferentes dominios del cuestionario CFQ-R (ajustado por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización).

Tabla 26. Comparación de los valores de ácidos grasos poliinsaturados entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control en las visitas 3 y 4 del estudio.

Tabla 27. Efectos secundarios en el periodo de estudio.

Tabla 28. Análisis de sensibilidad mediante el modelo de regresión lineal de efectos mixtos tras la transformación logarítmica de las variables inflamatorias (ajustado por el valor basal).

Tabla 29. Análisis de sensibilidad mediante el modelo de regresión lineal de efectos mixtos tras la transformación logarítmica de las variables inflamatorias (ajustado por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización).

Tabla 30. Análisis de sensibilidad mediante el modelo de regresión lineal de efectos mixtos tras eliminar los pacientes sin inflamación detectable en la visita basal (ajustado por el valor basal).

Tabla 31. Análisis de sensibilidad mediante el modelo de regresión lineal de efectos mixtos tras eliminar los pacientes sin inflamación detectable en la visita basal (ajustado por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización).

Tabla 32. Características de los estudios incluidos en la discusión.

Figuras

Figura 1. Respuesta inflamatoria en la fibrosis quística.

Figura 2. Transformación biológica de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y 6.

Figura 3. Diagrama de flujo de la población del estudio. Aleatorización y seguimiento.

Figura 4. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de IL-8 en secreciones respiratorias en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 5. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de IL-8 en suero en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 6. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de calprotectina en heces en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 7. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de IL-1 β en secreción respiratoria en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 8. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de IL-6 en secreción respiratoria en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 9. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de elastasa de neutrófilo en secreción respiratoria en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 10. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de lactato en secreción respiratoria en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 11. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de calprotectina en secreción respiratoria en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 12. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de IL-1 β en suero en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 13. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de IL-6 en suero en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 14. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de neutrófilos (%) en sangre en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 15. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de proteína C reactiva en suero en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 16. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores del flujo espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁) en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 17. Curva de supervivencia (Kaplan-Meyer) de las exacerbaciones pulmonares.

Figura 18. Curva de supervivencia (Kaplan-Meyer) de las exacerbaciones pulmonares graves.

Figura 19. Curva de supervivencia (Kaplan-Meyer) de la infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 20. Gráfico de cajas y bigotes que representan el peso expresado como *z-score* en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 21. Gráfico de cajas y bigotes que representan el índice de masa corporal (IMC) expresado como *z-score* en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 22. Gráfico de cajas y bigotes que representan la dosis de enzimas pancreáticos en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 23. Gráfico de cajas y bigotes que representan el coeficiente de reabsorción de grasas en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

Figura 24. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de ácido eicosapentaenoico (EPA) en $\mu\text{g/mL}$ y porcentaje en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0) a lo largo del estudio.

Figura 25. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de ácido docosahexaenoico (DHA) en $\mu\text{g/mL}$ y porcentaje en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0) a lo largo del estudio.

Figura 26. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de ácido alfa-linolénico (ALA) en $\mu\text{g/mL}$ y porcentaje en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0) a lo largo del estudio.

Figura 27. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de ácido araquidónico (AA) en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y porcentaje en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0) a lo largo del estudio.

Figura 28. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de ácido linoleico (LA) en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y porcentaje en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0) a lo largo del estudio.

Figura 29. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de ácido gamma-linolénico (GLA) en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y porcentaje en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0) a lo largo del estudio.

Figura 30. Curva de supervivencia (Kaplan-Meyer) de abandono del estudio.

ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico

ABPA: aspergilosis broncopulmonar alérgica

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADUME: alimento para usos médicos especiales

AGE: ácidos grasos esenciales

ALA: ácido alfa-linolénico

α1-AT: α1-antitripsina

AMC: aclaramiento mucociliar

ANF: aspirado nasofaríngeo

BCC: complejo *Burkholderia cepacia*

CFQ-R: Cuestionario de fibrosis quística-revisado

CFTR: regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística

CRD: cuaderno de recogida de datos

CRG: coeficiente de reabsorción de grasas

DEM: diferencia estandarizada de medias

DGLA: ácido dihomo-gamma-linolénico

DHA: ácido docosahexaenoico

DPA: ácido docosapentaenoico

DRFQ: diabetes relacionada con fibrosis quística

DTA: ácido docosatetraenoico

EHRFQ: enfermedad hepática relacionada con la fibrosis quística

EI: esputo inducido

EN: elastasa de neutrófilo

ENaC: canal epitelial de sodio

EP: exacerbación pulmonar

EPA: ácido eicosapentaenoico

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

FAME: metilésteres de ácidos grasos

FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo

FMLP: N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (péptido quimiotáctico)

FP: función pulmonar

FQ: fibrosis quística

FVC: capacidad vital forzada

GC-MS: cromatógrafo de gases con detector de masas

GLA: ácido gamma-linoleico

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos

HR: Hazard Ratio

HMGB1: grupo proteico de alta movilidad B1

HURyC: hospital Universitario Ramón y Cajal

ICAM: molécula de adhesión intercelular

Ig: inmunoglobulina

IHC: intolerancia a los hidratos de carbono

IL: interleucina

IMC: índice de masa corporal

INF- γ : interferón-gamma

IP: insuficiencia pancreática

LA: ácido linoleico

LBA: lavado broncoalveolar

LPS: lipopolisacárido

LT: leucotrieno

LX: lipoxina

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MEC: matriz extracelular

MMP: metaloproteínasa de la matriz

NETs: trampas extracelulares de neutrófilos

NF- κ B: factor nuclear kappa-B

OA: ácido oleico

ON: óxido nítrico

PCR: proteína C reactiva

PG: prostaglandinas

PGP: prolina-glicina-prolina

PPAR: receptor activado de la proliferación de peroxisomas

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

Rv: resolvina

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SP: suficiencia pancreática

SR: secreciones respiratorias

SLE: superficie líquida del epitelio

SSH: suero salino hipertónico

TG: triglicéridos

TGF: factor de crecimiento transformante

TNF: factor de necrosis tumoral

Treg: linfocitos T reguladores

TSE: terapia de sustitución enzimática

UL: unidades de lipasa

VSG: velocidad de sedimentación globular

INTRODUCCIÓN

1.- La fibrosis quística

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva con una incidencia de aproximadamente 1 de cada 5000 recién nacidos vivos, y una prevalencia de portadores heterocigotos estimada en 1 de cada 40-50 personas de raza caucásica^{1, 2}. La incidencia de enfermos de FQ en la Comunidad de Madrid, según los datos del programa de cribado neonatal, es de 1,9 por cada 10 000 recién nacidos vivos (datos propios no publicados del programa de cribado neonatal de la Comunidad de Madrid).

La FQ está causada por mutaciones en el gen *CFTR* (regulador de la conductancia transmembrana de la FQ, traducción de *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), localizado en el brazo largo del cromosoma 7, que codifica para una proteína del mismo nombre (CFTR) de 1480 aminoácidos. Esta proteína se comporta como un canal de cloro e indirectamente controla los movimientos del sodio, bicarbonato y agua a través de la membrana celular². Hasta el momento, se han identificado más de 2000 mutaciones diferentes agrupadas en 7 clases funcionales³ (**Tabla 1**). La mutación Phe.508del (clase II), que se expresa con la pérdida del aminoácido fenilalanina en la posición 508 de la proteína, es la más frecuente (aproximadamente el 65% de los pacientes en todo el mundo presentan esta mutación en al menos 1 de los dos alelos)^{2, 4}.

Tabla 1. Clases de mutaciones del gen <i>CFTR</i> *,							
	Clase I	Clase II	Clase III	Clase IV	Clase V	Clase VI	Clase VII
Defecto en <i>CFTR</i>	Síntesis (<i>Codon-stop</i>)	Maduración (<i>Trafficking</i>)	Apertura (<i>Gating</i>)	Conductancia (<i>Conductance</i>)	Disminución cantidad (<i>Splicing</i>)	Estabilidad	Síntesis (mRNA)
Ejemplos	Gly542X Trp1282X	Phe.508del Asn1303Lys Ala561Glu	Gly551Asp Ser549Arg Gly1349Asp	Arg117His Arg334Trp Ala455Glu	Ala455Glu 3272-26A→G 3849+10kgC→T	c.120del23 rPhe.508del	dele2,3(21kb) 1717-1G→A
CFTR: regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística; mRNA: ácido ribonucleico mensajero. *Adaptado de De Boeck K (2016) ³ .							

Para realizar el diagnóstico de FQ deben existir características fenotípicas compatibles con la enfermedad, o antecedentes familiares de FQ en hermanos o primos, o un resultado positivo en una prueba de cribado neonatal; asociado a una prueba de laboratorio que objetive la disfunción de la

proteína CFTR: concentración de cloro en sudor superior a 60 mEq/L, detección de dos mutaciones reconocidas de FQ o demostración de alteraciones en la diferencia de potencial transepitelial nasal⁵. En la mayor parte de los países desarrollados, incluida España, la mayoría de los pacientes se diagnostican a través de los programas de cribado neonatal para esta enfermedad⁶.

La fisiopatología de la FQ está condicionada por el insuficiente o nulo funcionamiento de CFTR. La alteración del transporte de cloro determina una reabsorción elevada de sodio y agua, lo que da lugar a una secreción espesa, deshidratada y gruesa en la superficie de las células epiteliales de los lugares donde se expresa: pulmón, tubo digestivo, hígado, glándulas sudoríparas, conductos deferentes o senos paranasales, entre otros^{2, 7}. En los pulmones, las secreciones espesas alteran los mecanismos naturales de aclaramiento mucociliar (AMC) y favorecen la obstrucción bronquial, con lo que se modifican las defensas naturales del huésped y aumenta la susceptibilidad a infecciones pulmonares crónicas por patógenos como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) o *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), entre otros muchos. Además de la infección, en esta enfermedad se produce una respuesta inflamatoria excesiva y mal regulada⁸. Los procesos de obstrucción, infección e inflamación crónicas producen un círculo vicioso que, en última instancia, provocan destrucción tisular, obstrucción al flujo aéreo y aparición de bronquiectasias y otras complicaciones. La destrucción progresiva del tejido pulmonar conduce finalmente al fallo respiratorio, responsable de la mayor parte de la morbimortalidad en esta enfermedad⁹.

Los síntomas del malfuncionamiento de CFTR no se limitan al aparato respiratorio, ya que CFTR se expresa en otros muchos tejidos. El espectro de síntomas de la FQ suele incluir la insuficiencia pancreática (IP), la enfermedad hepática relacionada con la FQ (EHRFQ), la diabetes relacionada con la FQ (DRFQ) o la infertilidad masculina por agenesia de los conductos deferentes; entre las complicaciones extrapulmonares más frecuentes se encuentran la obstrucción intestinal distal, el íleo meconial o los cuadros de deshidratación por la pérdida excesiva de electrolitos por el sudor, entre otros^{10, 11}.

El fenotipo final de cada paciente con FQ está determinado no sólo por el defecto genético de CFTR, sino que se ve influido por otros factores, tanto ambientales como del propio enfermo. Entre

ellos, destacan los denominados genes modificadores de la enfermedad, cuya expresión puede modificar la gravedad del fenotipo del paciente¹². Estos factores explican que en la FQ no exista una buena correlación entre el genotipo y el fenotipo de los pacientes, sobre todo en relación con la afectación respiratoria.

El tratamiento de la FQ debe ser multidisciplinar y abarcar todos los aspectos de la enfermedad^{13, 14}, por lo que precisa de la colaboración de distintos especialistas y debe centralizarse en unidades especializadas. Desde el punto de vista digestivo, es imprescindible mantener un adecuado estado nutricional, para lo que es fundamental la terapia de sustitución enzimática (TSE) en caso de existir IP. Es necesario asegurar un adecuado aporte calórico y aportar suplementos de vitaminas liposolubles¹⁵. El tratamiento de la enfermedad pulmonar se basa en la mejoría del AMC, para lo que es imprescindible la hidratación de la vía aérea y la fisioterapia respiratoria, y el tratamiento antibiótico de la infección bronquial que, junto con el diagnóstico precoz mediante el cribado neonatal, son responsables de la mejoría del pronóstico de esta enfermedad en los últimos años^{11, 16}.

El tratamiento antibiótico es uno de los pilares fundamentales en el manejo de los pacientes con FQ, ya que la infección bronquial, aguda o crónica, tiene un efecto deletéreo sobre la función pulmonar (FP)². El tratamiento antibiótico inhalado permite la disminución o el control del inóculo bacteriano en la infección bronquial crónica, lo que determina la disminución del número de exacerbaciones pulmonares (EP) y estabiliza la FP y los síntomas respiratorios¹⁴. El microorganismo más característico que infecta de forma crónica la vía aérea de los pacientes con FQ es *P. aeruginosa*, que, además de un marcador de gravedad, tiene un papel activo en la progresión de la enfermedad pulmonar asociada a la FQ¹⁷. El tratamiento precoz de la infección por *P. aeruginosa* ha demostrado mejorar el pronóstico de la enfermedad¹⁸, por lo que existen protocolos específicos tanto para su erradicación como para el tratamiento de la infección bronquial crónica¹⁹.

Las EP, descritas como un empeoramiento de los síntomas respiratorios habituales, con un incremento de la tos y la expectoración, pero sin una definición de consenso, tienen también un impacto negativo sobre la FQ. Aunque los antibióticos son fundamentales en su tratamiento, no se ha definido claramente cuál debe ser la duración del tratamiento ni cuál es la mejor estrategia para

seleccionar el antibiótico más apropiado²⁰. Además del deterioro agudo que producen, las EP provocan una pérdida de función pulmonar²¹ e impactan de manera negativa sobre la calidad de vida de los pacientes²², por lo que son fundamentales las estrategias de prevención y tratamiento adecuado.

Otros tratamientos, además de los mencionados con anterioridad, que se emplean en la FQ, son los antiinflamatorios (ibuprofeno, corticoides inhalados, azitromicina...) y los tratamientos inhalados para mejorar el AMC (DNasa recombinante, N-acetilcisteína, suero salino hipertónico –SSH-) ^{3, 14, 23}. El trasplante pulmonar es la última opción terapéutica en los pacientes que tienen una enfermedad pulmonar crónica avanzada de acuerdo con los criterios actuales de trasplante pulmonar para los pacientes con FQ²⁴.

En los últimos años hemos asistido al desarrollo de una nueva generación de fármacos, conocidos como moduladores de CFTR que, por primera vez, son capaces de corregir el funcionamiento de CFTR y, con ello, modificar la fisiopatología de la enfermedad²⁵. El primer fármaco desarrollado fue ivacaftor, un potenciador capaz de aumentar las probabilidades de apertura del canal CFTR en pacientes con mutaciones de clase III²⁶. Los estudios con ivacaftor^{27, 28} han mostrado importantes mejorías en el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁, del inglés *forced expiratory volumen in one second*), aumento de peso y mejoría de los síntomas respiratorios, así como una reducción del número de EP en los pacientes portadores, al menos, en un alelo de la mutación de clase III G551D. El estudio KIWI²⁹ demostró seguridad y efectividad en niños de 2-5 años, lo que ha permitido que ivacaftor sea el primer fármaco disponible para pacientes con FQ a partir de los 6 meses de edad.

La siguiente generación de fármacos, los correctores, son capaces de corregir el defecto de plegamiento y transporte de la proteína. Esto determina que se expresen canales CFTR en la superficie de la célula epitelial que, aunque tengan defectos de apertura y estabilidad, son parcialmente funcionantes. La combinación del potenciador ivacaftor con los correctores lumacaftor y tezacaftor ha demostrado, en los ensayos clínicos realizados, mejorías del FEV₁ y ganancia de peso, aunque mucho más modestas que la obtenidas previamente con ivacaftor en los pacientes con una mutación de clase II³⁰⁻³². La siguiente combinación de fármacos incluye la combinación de ivacaftor y tezacaftor con un

tercer corrector (elexacaftor), cuya efectividad ha sido demostrada en pacientes FQ mayores de 12 años con una sola mutación Phe.508del^{33, 34} y que ha sido recientemente aprobada para su uso en paciente con FQ mayores de 12 años en Estados Unidos.

El desarrollo de estos fármacos ha abierto una nueva era en el tratamiento de la FQ. Además de los moduladores descritos, están en desarrollo nuevos correctores y potenciadores, así como estabilizadores y amplificadores de CFTR, que ampliarán el escaso arsenal terapéutico que disponemos para el tratamiento de esta enfermedad³⁵. A estos tratamientos hay que sumar agentes para el tratamiento de otras clases de mutaciones, así como la tecnología de edición genética, que tendría el potencial de corregir el defecto genético y dar una solución definitiva a la enfermedad³⁵.

El desarrollo de las unidades multidisciplinares y la mejora del tratamiento nutricional, de la fisioterapia y del control de la infección bronquial han determinado una disminución progresiva de la morbilidad de los pacientes con FQ en las últimas décadas, así como un aumento de la media de esperanza de vida, que actualmente se sitúa por encima de los 40 años³⁶. El impacto de los nuevos tratamientos moduladores sobre la enfermedad todavía está por ver, aunque las expectativas son, lógicamente, muy altas.

2.- La inflamación en la fibrosis quística

La inflamación en la FQ, sobre todo a nivel pulmonar, es una parte fundamental de la fisiopatología de la enfermedad³⁷. Se ha demostrado que la inflamación ya está presente en los primeros años de vida, es persistente, excesiva y está mal regulada en relación con la infección existente en el pulmón. Todo esto determina una alteración de los mecanismos de defensa del huésped; empeora la obstrucción bronquial, causa daño estructural en la vía aérea y, en última instancia, contribuye a la pérdida progresiva de la FP³⁸. Durante mucho tiempo se ha discutido si esta respuesta inflamatoria exagerada estaba relacionada con el defecto primario de CFTR o era secundaria al ambiente generado en la vía aérea. Estudios recientes en modelos animales de FQ sugieren que la respuesta inflamatoria se puede producir en ausencia de infección, por lo que se relacionaría directamente con el defecto en CFTR y se pondría en marcha en el paciente nada más nacer³⁹. Por otro lado, la deshidratación de la vía aérea y la obstrucción con moco contribuyen a la infección bacteriana y pueden, por sí mismas, desencadenar y/o perpetuar la respuesta inflamatoria⁴⁰. Además, aunque el tratamiento con correctores de CFTR, como ivacaftor, produce una mejoría en la FP, la clínica y la concentración de cloro en sudor, su efecto sobre la inflamación no es tan evidente^{41, 42}. Todos los estudios nos indican que la inflamación en la FQ es muy compleja y está influida por múltiples factores; independientemente del factor que la inicie, existen muchos elementos que favorecen su perpetuación.

En los próximos epígrafes se explicarán algunas de las características de la inflamación en la FQ, que muestran la complejidad de esta y su papel fundamental en la fisiopatología de la enfermedad. La **Figura 1** resume de manera esquemática la respuesta inflamatoria en la FQ con algunos de los mediadores y tipos celulares implicados, como complemento a la información proporcionada en el texto.

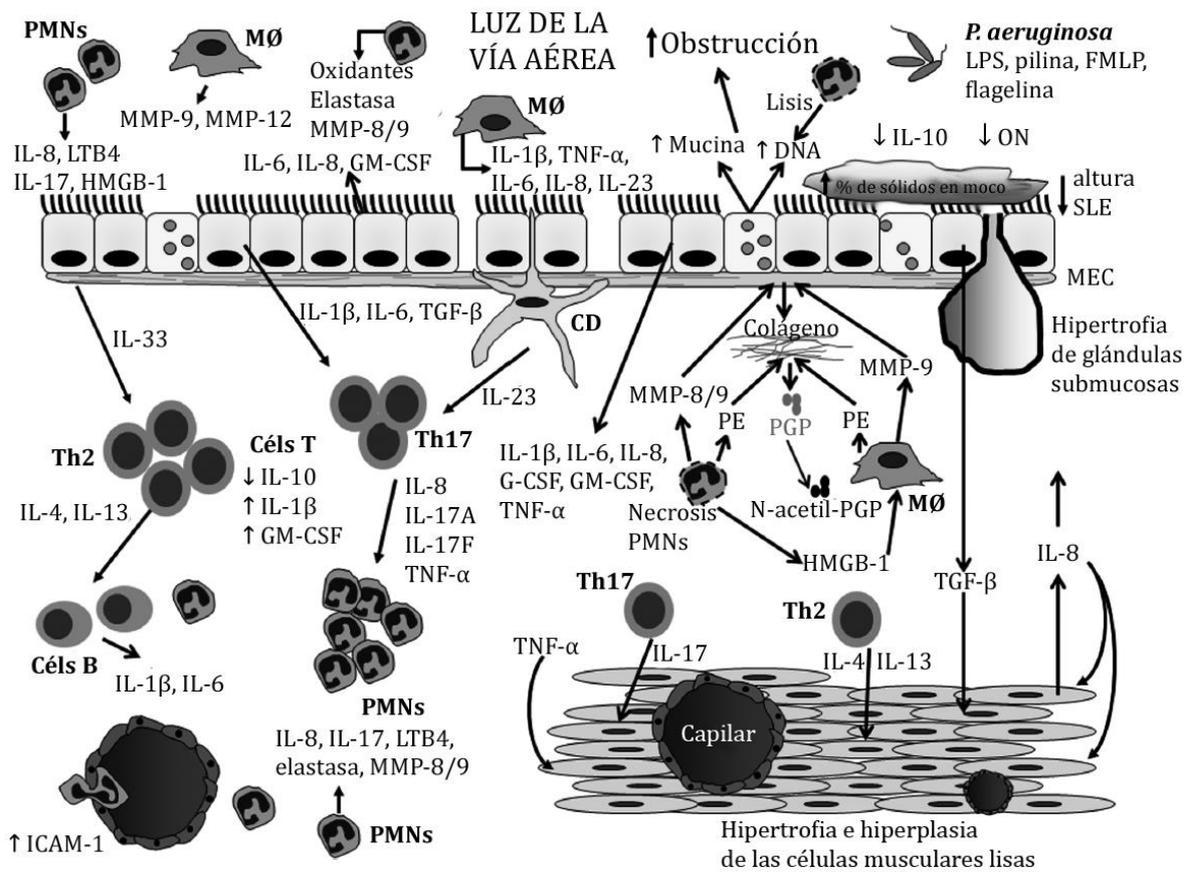


Figura 1. Respuesta inflamatoria en la fibrosis quística. Esquema simplificado de la respuesta inflamatoria de la vía aérea de los pacientes con fibrosis quística (FQ), y algunos de los hallazgos patológicos derivados de la misma. La infección bacteriana, entre las cuales la infección por *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es la más típica en la FQ, induce una respuesta inflamatoria exagerada. Los neutrófilos infiltran la vía aérea y liberan proteasas y oxidantes que la dañan, así como sustancias que estimulan la llegada de nuevos neutrófilos. Además de los neutrófilos y las células epiteliales, y sus mediadores, están implicados otros tipos celulares y mediadores, entre los que se encuentran las células dendríticas, los linfocitos T y B, los macrófagos y las células musculares lisas. En la figura se muestran solo algunos de estos tipos celulares y mediadores. CD: célula dendrítica; Céls: células; FMLP: N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (péptido quimiotáctico); G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos; GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos; HMGB1: grupo proteico de alta movilidad B1; ICAM: molécula de adhesión intercelular; IL: interleucina; LPS: lipopolisacárido; SLE: superficie líquida del epitelio; LT: leucotrieno; MEC: matriz extracelular; MMP: metaloproteinasas de la matriz; MØ: macrófago; ON: óxido nítrico; PGP: prolina-glicina-prolina; PMN: neutrófilo; TGF: factor de crecimiento transformante; TNF: factor de necrosis tumoral. Adaptado de Nichols DP (2015)³⁷.

2.1.- Desequilibrio entre mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios

Una de las características de la inflamación en la FQ es su mala regulación. Muestra de ello es el desequilibrio existente en la vía aérea entre los mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios. En la vía aérea de los pacientes con FQ se encuentran una gran cantidad de neutrófilos y mediadores proinflamatorios, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las interleucinas(IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-17 e IL-33, el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y el grupo proteico de alta movilidad B1 (HMGB1; *High Mobility Group Box 1*)³⁷. La presencia de estos mediadores no siempre se relaciona con la presencia de infección; en comparación con sujetos sanos y en ausencia de infección, el lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con FQ muestra niveles más elevados de IL-8⁴³, por ejemplo. Estos mediadores no sólo contribuyen al efecto deletéreo de la inflamación, sino que, además, actúan como quimiotácticos para algunas células inflamatorias y contribuyen al mantenimiento del estado inflamatorio crónico. Algunos de los efectos que estos mediadores tienen en la persistencia de la inflamación en la FQ se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Mediadores inflamatorios presentes en la vía aérea en la fibrosis quística	
Molécula	Papel
IL-8	Promueve la afluencia de neutrófilos. Es muy abundante en la vía aérea en la FQ, su concentración se relaciona directamente con la cantidad de neutrófilos y sus productos en la vía aérea ⁴⁴
TNF-α	Potencia las respuestas secretora y oxidativa de los neutrófilos ^{45, 46} . Podría promover la caquexia ⁴⁷
IL-1β	Induce fiebre, estimula la respuesta inflamatoria aguda y promueve el catabolismo muscular ³⁷
GM-CSF	Entre otras, retrasa la apoptosis de neutrófilos e inhibe su aclaramiento del pulmón ⁴⁸
IL-17	Promueve la afluencia de neutrófilos ³⁸

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; IL: interleucina; GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos.

Igual o más importante que la activación excesiva de la respuesta inflamatoria es la incapacidad de los pacientes con FQ para resolver la misma de manera satisfactoria. Junto con el exceso de mediadores proinflamatorios descrito con anterioridad, en la vía aérea de los pacientes con FQ existe un déficit de moléculas antiinflamatorias como la IL-10^{49, 50}, el óxido nítrico (ON)^{51, 52} y los derivados de los ácidos grasos esenciales (AGE): lipoxinas (LX) como la LXA₄⁵³ y resolvinas (Rv) como la RvD₁⁵⁴. Entre las funciones de la IL-10 se incluyen la finalización de la respuesta inflamatoria aguda, la disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias, la inhibición de factores de transcripción proinflamatorios y la inducción de la apoptosis de neutrófilos³⁷. Las células epiteliales cultivadas de pacientes con FQ no son capaces de secretar cantidades detectables de IL-10⁵⁰, y los linfocitos T de individuos con FQ producen menos IL-10 tras ser estimulados, en comparación con los linfocitos T de sujetos sanos⁵⁵. Por su parte, la reducción de ON podría contribuir a la disminución de la altura de la superficie líquida del epitelio (SLE)⁵⁶, a disminuir la relajación del músculo liso bronquial aumentando la obstrucción bronquial⁵⁷, a promover la supervivencia de algunas bacterias en la vía aérea⁵⁸ y, por último, a favorecer la llegada de neutrófilos al pulmón, perpetuando la inflamación⁵⁹. La LXA₄ es un metabolito del leucotrieno (LT)A₄, derivado a su vez del ácido araquidónico (AA), que ayuda a la resolución de la inflamación neutrofílica aguda⁵³. La infección por *P. aeruginosa*, que como se ha comentado tiene un papel principal en la evolución de la enfermedad pulmonar en la FQ, contribuye a disminuir los niveles de LXA₄ en la vía aérea de estos pacientes⁶⁰, y su función está, además, alterada debido a la disminución de la expresión de su receptor⁶¹. La RvD₁ es un metabolito del ácido docosahexaenoico (DHA) presente tanto en el plasma como en el esputo en los pacientes con FQ, aunque las concentraciones en plasma son 10 veces mayores. Su concentración en esputo no guarda proporción con el aumento existente de IL-8, y la relación RvD₁/IL-8 se ha correlacionado positivamente con el FEV₁ en pacientes FQ⁶². La RvD₁ tiene también la capacidad de aumentar la altura de la SLE, disminuir la secreción de IL-8 inducida por TNF- α e incrementar la capacidad fagocítica y bactericida de los macrófagos alveolares en la FQ⁶³.

En resumen, en la vía aérea de los pacientes FQ se encuentra una cantidad excesiva de mediadores proinflamatorios y una disminución o ausencia de moléculas antiinflamatorias. La

expresión de este desequilibrio es una respuesta inflamatoria compleja, excesiva y mal regulada, como ya se ha comentado.

2.2.- Papel de las células epiteliales

Además de los mediadores inflamatorios, los diferentes tipos celulares presentes en la vía aérea también participan en el proceso inflamatorio en la FQ. El papel de las células epiteliales, que expresan CFTR, es quizás de los más estudiados. La inhibición o disminución de función de CFTR en líneas celulares epiteliales de la vía aérea se ha relacionado *per se* con un aumento de la activación del factor nuclear kappa-B (NF-kB)^{64, 65}, que se vería aún más incrementada por la presencia de *P. aeruginosa*⁶⁵ o TNF- α ⁶⁶, dos elementos muy presentes en la FQ. Esta activación de NF-kB inicia la síntesis de mediadores proinflamatorios como TNF- α , GM-CSF, IL-1 β , IL-6 e IL-8, además de actuar como un regulador central de otros factores de transcripción cuyo efecto también es proinflamatorio: activadores de proteínas 1 y 2, MAPK/ERK (proteína quinasa activada por mitógenos, del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase*/quinasa regulada por señales extracelulares, del inglés *Extracellular signal-Regulated Kinase*) o NFAT (factor nuclear de células T activadas, del inglés *Nuclear Factor of Activated T-cell*)³⁷. Por otra parte, las células epiteliales en la FQ tienen una producción deficiente de interferón-gamma (INF- γ) en respuesta a *P. aeruginosa*⁶⁷, lo que provocaría un aumento de IL-33 en respuesta a estímulos infecciosos y, en última instancia, la producción de citoquinas implicadas en la quimiotaxis de neutrófilos⁶⁸. A estos efectos proinflamatorios, hay que añadir un déficit en las vías de señalización antiinflamatorias, como PPAR- α y γ (receptor activado de la proliferación de peroxisomas alfa y gamma, del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*), Nrf2 (factor nuclear derivado de eritroide 2 similar al 2, del inglés *Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2*) o STAT-1 (transductoras de señales y activadoras de la transcripción-1, del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*), lo que en su conjunto favorecería la respuesta inflamatoria exagerada que encontramos en la vía aérea de los pacientes FQ³⁷.

2.3.- Papel de los neutrófilos

Los neutrófilos son las células inflamatorias más abundantes en la FQ y tienen un papel central en el inicio y la persistencia de la inflamación. Su exceso en la vía aérea responde tanto a un aumento de su flujo de llegada como a una disminución de su aclaramiento³⁷. Como se ha expuesto anteriormente, la vía aérea de los pacientes con FQ contiene una gran cantidad de mediadores proinflamatorios con un efecto quimiotáctico sobre los neutrófilos: IL-8, LTB₄, C5a, HMGB1, IL-17, prolina-glicina-prolina (PGP), N-acetil-PGP y productos bacterianos como N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (FMLP)^{49, 69-71}. De todas ellas, la IL-8 es, probablemente, la más importante ya que su concentración se ha relacionado de manera directa con la cantidad de neutrófilos y sus productos en la vía aérea⁴⁴. Los neutrófilos participan de manera muy activa en la respuesta inmunitaria frente a la infección bacteriana. Sin embargo, en la FQ tienen alterados algunos de los mecanismos que emplean para el control de la infección. En condiciones normales, los neutrófilos expresan CFTR en sus fagolisomas^{72, 73}. En la FQ, los neutrófilos tienen alterada su capacidad de matar bacterias una vez fagocitadas^{73, 74}, lo que contribuiría a la infección pulmonar crónica característica de estos pacientes. Otro de los mecanismos antimicrobianos que poseen los neutrófilos es la liberación de las llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, del inglés *Neutrophil Extracellular Traps*), a través de un proceso de necrosis denominado NETosis⁷⁵. Estas NETs son un complejo de cromatina, histonas, mediadores proinflamatorios y sustancias presentes en los gránulos de los neutrófilos⁷⁶, y suponen el origen de la mayoría del ácido desoxirribonucleico (ADN) presente en la vía aérea de los pacientes con FQ⁷⁷. Aunque las NETs son un importante mecanismo de defensa frente a la infección aguda, su efectividad en la FQ probablemente es escasa, y su efecto global en la enfermedad es deletéreo, ya que suponen un estímulo proinflamatorio persistente para los macrófagos³⁸. Finalmente, la elastasa de neutrófilo (EN) es un enzima proteolítica de la familia de las serin-proteasas necesaria para la función bactericida de los neutrófilos⁷⁸, pero que puede tener efectos deletéreos sobre la vía aérea degradando estructuras proteicas, entre las que se incluyen el colágeno y la elastina⁷⁹. Para evitar el daño tisular existen unos inhibidores de las proteasas, entre los que destaca la alfa-1-antitripsina (α 1-

AT), encargados de contrarrestar el efecto de la EN y otras proteasas. El desequilibrio entre proteasas e inhibidores de las proteasas condiciona el daño tisular y el remodelado después de una lesión⁸⁰. En la FQ, la importancia de la EN viene determinada por su elevada concentración en esputo y LBA, que sobrepasa la capacidad reguladora de los inhibidores de las proteasas, y se correlaciona con la pérdida de FP^{81, 82}. Además del daño tisular directo, la EN juega un papel central en la fisiopatología de la FQ porque induce la cronificación de la respuesta inflamatoria aumentando las concentraciones de mediadores proinflamatorios como IL-8 y MMP-9⁸², promueve la expresión de mucinas en el tracto respiratorio y daña el epitelio respiratorio, alterando el AMC⁸³, degrada la lactoferrina y otras glicoproteínas con función antimicrobiana y relacionadas con la opsonización⁸⁴, y altera la función de los linfocitos degradando receptores de superficie de los linfocitos T e interfiriendo en el proceso de presentación de antígeno de las células dendríticas⁸⁵. Todos estos mecanismos contribuyen a un exceso de activación de la respuesta inflamatoria que, sin embargo y como hemos comentado, es ineficaz para controlar la infección bronquial⁸⁶.

La **Tabla 3** resume las sustancias y mediadores liberados por los neutrófilos que participan tanto en la perpetuación de la inflamación como en las consecuencias patológicas de la misma.

Tabla 3. Productos liberados por los neutrófilos y sus consecuencias patológicas*	
Producto	Consecuencias
Quimiotácticos de neutrófilos (IL-8, IL-17, HMGB1, LTB₄)	Promueven la afluencia de neutrófilos a la vía aérea. HMGB1, además, activa NF- κ B y promueve la liberación de MMP9
MMP8, MMP9	Degradación de la MEC, remodelado tisular, aumento de mediadores inflamatorios, rotura de la proteína D del surfactante, alteración de la migración y movimientos celulares
Oxidantes (O₂, H₂O₂)	Daño estructural de la vía aérea, aumento de la liberación de mediadores inflamatorios, inactivación de α 1-AT
Serin proteasas (catepsina-G, proteinasa-3, EN)	Incremento de IL-8, disminución del batido ciliar, aumento de moco, daño estructural, activación de ENaC, degradación de CFTR, alteración de la fagocitosis, alteración de los mecanismos de opsonización
ADN (NETs)	Aumento de la viscosidad del moco, obstrucción de la vía aérea
Actina	Obstrucción de la vía aérea

IL: interleucina; HMGB1: grupo proteico de alta movilidad B1; NF- κ B: factor nuclear kappa-B; MMP: metaloproteinasa de la matriz; MEC: matriz extracelular; α 1-AT: alfa-1 antitripsina; EN: elastasa de neutrófilo; ENaC: canal epitelial de sodio; CFTR: regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística; ADN: ácido desoxirribonucleico; NETs: trampas extracelulares de neutrófilos.

*Adaptado de Nichols DP (2015)³⁷.

2.4.- Otros tipos celulares implicados

Además de las células epiteliales y los neutrófilos, que tienen un papel principal en la inflamación en la FQ, existen otros tipos celulares implicados cuya importancia se va dilucidando poco a poco.

Los **macrófagos** son las células encargadas de aclarar, a través de la fagocitosis, las bacterias, sus productos y los restos celulares presentes en el pulmón. Existen macrófagos implicados en la fagocitosis de microorganismos con acción predominantemente inflamatoria, que liberan mediadores como TNF- α , IL-1 β o IL-8; y otros con funciones de regulación de la inflamación y de remodelado y reparación de tejidos, que liberan IL-4, IL-13 e IL-10³⁷. En la FQ, la función de los macrófagos está mal regulada, y producen una gran cantidad de mediadores proinflamatorios cuando se estimulan con los lipopolisacáridos (LPS), aunque no está claro si es por consecuencia directa del defecto en CFTR o por

la presencia crónica de bacterias^{87, 88}. Además, los macrófagos en la FQ tienen alterada su capacidad de eliminación de *P. aeruginosa*⁸⁹, así como su capacidad para aclarar del pulmón los neutrófilos a través de la eferocitosis. La eferocitosis es un proceso de eliminación de células muertas o apoptóticas por parte de células fagocíticas que evita la rotura de la integridad de su membrana y, por tanto, disminuye la liberación de mediadores proinflamatorios (IL-17, IL-23, G-CSF). En la FQ, la eferocitosis se ve comprometida tanto por la alteración de la apoptosis de neutrófilos como por el defecto fagocítico de los macrófagos. A esta alteración de la eferocitosis contribuye seguramente la elevada concentración de HMGB1, que inhibe la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos por parte de los macrófagos⁹⁰. En situaciones de hipoxia, en comparación con la situación normal de exposición a un ambiente con oxígeno al 21%, los macrófagos alveolares del pulmón con FQ presentan un incremento de la producción de TNF- α e IL-8, lo que podría explicar por qué la afectación pulmonar en la FQ comienza en los lóbulos superiores, donde la tensión de oxígeno es menor⁹¹. Por último, la importancia del papel de los macrófagos en la inflamación en la FQ se refleja también por su elevada presencia, así como de la proteína quimiotáctica de monocitos MCP-1 (del inglés *monocyte chemoattractant protein*), en el LBA de niños con FQ⁹².

La presencia de **linfocitos** en el pulmón de los pacientes con FQ se conoce desde hace tiempo, aunque su papel está comenzando a aclararse más³⁷. Tanto los linfocitos T como B expresan CFTR, por lo que es de esperar alguna alteración de su función en la FQ: por ejemplo, los linfocitos de los pacientes FQ expresan menos IL-10 que los linfocitos normales⁵⁵, incluso en ausencia de infección⁹³. Entre los diferentes tipos de linfocitos presentes en el pulmón de los pacientes con FQ, quizás el más interesante sea el linfocito Th17⁹⁴. Estos linfocitos se estimulan por citoquinas presentes en la vía aérea en la FQ, como IL-6, IL-23 o TGF- β , y producen tanto IL-8 como IL-17, que promueven el flujo de neutrófilos hacia el pulmón perpetuando la respuesta inflamatoria. Por otra parte, en la FQ existe una disminución del número y la función de linfocitos T reguladores (Treg), encargados del control de las respuestas Th2 y Th17. Esta disminución de linfocitos Treg se ha visto tanto en ratones modificados genéticamente⁹⁵ como en pacientes con FQ, y parece que es más marcada en presencia de infección por *P. aeruginosa*⁹⁶.

Seguramente, las **células musculares lisas** de la vía aérea también juegan un papel en la fisiopatología de la inflamación en la FQ, ya que en condiciones normales también expresan CFTR⁹⁷. Prueba de ello es que en los pacientes con FQ está aumentada la masa muscular lisa de la vía aérea, lo que refleja, seguramente, un proceso de remodelado⁹⁸. Además, los pacientes con FQ presentan una elevada prevalencia de síntomas de hiperreactividad bronquial⁹⁹. Por otra parte, en la vía aérea de los pacientes con FQ hay una elevada concentración de mediadores inflamatorios que también participan en la fisiopatología del asma (TNF- α , IL-8, IL-17, IL-4 o IL-13), enfermedad en la que el papel de las células musculares lisas está perfectamente establecido.

2.5.- Tratamiento de la inflamación en la fibrosis quística

Dada la importancia de la inflamación en la FQ, su tratamiento tendría un impacto importante en la evolución de la enfermedad. El problema fundamental es la complejidad de la respuesta inflamatoria, que hace prácticamente inabordable el tratamiento de todos los aspectos de esta. De forma práctica, la estrategia del tratamiento antiinflamatorio en la FQ podría dividirse en dos objetivos: 1) inhibir las señales proinflamatorias y la respuesta inflamatoria excesiva, y 2) neutralizar los productos secretados, fundamentalmente por los neutrófilos, implicados en las consecuencias de la inflamación crónica. El tratamiento de la inflamación, sobre todo a nivel pulmonar, sería fundamental para frenar el círculo vicioso de obstrucción-inflamación-infección y prevenir el deterioro de la FP, y debería iniciarse en etapas precoces de la vida¹⁰⁰.

El arsenal terapéutico actual es bastante limitado, por la escasez de fármacos eficaces o por los efectos secundarios de algunos de ellos (ibuprofeno, corticoides orales)¹⁰¹. En la práctica clínica habitual está extendido el uso de azitromicina y DNasa.

La **azitromicina** es un antibiótico bacteriostático con una excelente biodisponibilidad oral, pero que, además, presenta una importante actividad inmunomoduladora¹⁰². Es capaz de disminuir la producción de citoquinas relacionadas con la fase aguda de la inflamación, como IL-8, GM-CSF, IL-6, MMPs o TNF- α , que tienen una acción quimiotáctica para neutrófilos y otras células inflamatorias¹⁰³ y son muy abundantes en la vía aérea de los pacientes con FQ. En la fase crónica de la inflamación, la azitromicina regula la acción de los neutrófilos aumentando su apoptosis y disminuyendo sus funciones

oxidativas¹⁰⁴. Esta modulación de la inflamación puede explicarse por la capacidad de la azitromicina de inhibir la expresión del NF- κ B¹⁰⁵, cuya importancia en el estado inflamatorio crónico de la FQ se ha explicado antes. Desde el punto de vista clínico, la azitromicina actúa directamente sobre las células epiteliales de la vía aérea reduciendo las secreciones respiratorias, disminuyendo la producción de moco e incrementando la integridad del epitelio respiratorio¹⁰⁶. El uso crónico de azitromicina se ha asociado con mejoría de la FP y disminución del número de EP en pacientes con FQ e infección crónica por *P. aeruginosa*¹⁰⁷, aunque parece que este efecto podría disminuir con el tiempo y desaparecer a los 12 meses¹⁰⁸. El beneficio en pacientes más jóvenes sin infección crónica por *P. aeruginosa* es más modesto; ha demostrado sólo disminuir las EP pero no las hospitalizaciones, los tratamientos intravenosos ni la FP¹⁰⁹. Además, parece que el uso crónico de azitromicina podría antagonizar los efectos positivos del tratamiento inhalado con tobramicina en pacientes con FQ e infección crónica por *P. aeruginosa*^{110, 111}, por lo que son necesarios más estudios para decidir cuál es la mejor indicación para pacientes con FQ, y durante cuánto tiempo debe administrarse¹¹². Las guías americanas recomiendan el uso crónico de azitromicina en pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa* (grado de recomendación B), en los que previamente se ha descartado infección por micobacterias no tuberculosas. También recomiendan su uso en pacientes sin infección crónica por *P. aeruginosa*, con una menor fuerza de recomendación (grado de recomendación C)¹¹³. Las guías europeas consideran la azitromicina como un tratamiento estándar para pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa*, con dudas sobre la duración de su efecto o su impacto sobre las resistencias antibióticas a largo plazo¹⁴.

La **DNasa** fue el primer tratamiento aprobado específico para la FQ, después de demostrar mejorar la FP en estudios de hasta 2 años de duración^{114, 115}. Actúa descomponiendo aleatoriamente el ADN extracelular, lo que reduce su concentración y longitud, provocando la reducción de la viscosidad del esputo. Estos cambios facilitan el AMC, disminuyen la obstrucción y mejoran la FP¹¹⁶. Estos beneficios se han demostrado también en pacientes con afectación pulmonar leve¹¹⁷. Además de su efecto sobre las propiedades reológicas del esputo, la DNasa tiene un efecto sobre la inflamación neutrofílica. En pacientes con FQ e inflamación pulmonar, medida como aumento del porcentaje de neutrófilos en el LBA, el tratamiento durante 3 años con DNasa mantuvo estable el porcentaje de

neutrófilos, mientras que en el mismo periodo este porcentaje se incrementó tanto en el grupo no tratado como en un grupo control cuyo porcentaje de neutrófilos en el LBA era normal al inicio del estudio. También se encontró un aumento de la actividad de EN y de la concentración de IL-8 en estos grupos, mientras que el grupo tratado con DNasa permaneció estable¹¹⁸. Aunque otros trabajos, de duración menor, no han corroborado estos hallazgos, en general se considera que la DNasa tiene un potencial efecto antiinflamatorio, que explicaría los beneficios clínicos en pacientes sin enfermedad pulmonar evidente¹¹⁹. Las guías americanas recomiendan su uso crónico a partir de los 6 años de edad, independientemente de la gravedad de la enfermedad pulmonar¹¹³. Las guías europeas resumen los beneficios de la DNasa, aunque no hacen una recomendación tan firme a favor de su uso¹⁴.

Más allá de la azitromicina y la DNasa, existen otros agentes con efecto antiinflamatorio cuyo empleo no es generalizado y otros que están en estudio. La descripción de todos ellos va más allá del propósito de esta introducción, por lo que se resumen en la **Tabla 4**.

El efecto de los nuevos moduladores de CFTR sobre la inflamación no está claramente definido, pero parece que es menor del esperado inicialmente. Por este motivo, es previsible que en el futuro el tratamiento de la inflamación siga siendo fundamental en el manejo de la FQ³⁸.

Tabla 4. Fármacos antiinflamatorios en uso o en estudio en la fibrosis quística

Clase terapéutica	Fármaco(s)
Corticoides	Prednisona ^Δ , prednisolona, corticoides inhalados ^Δ
AINEs	Ibuprofeno ^Δ , talniflumato, piroxicam
Inhibidores de los eicosanoides	Montelukast ^Δ , zafirlukast, amelubant (BIIL 284BS) ^Δ , acebilustat†
Potenciadores de mediadores eicosanoides antiinflamatorios	Acebilustat†, DHA ^Δ , lenabasum†, ácido lipóico, AGEs omega-3, fenretidina†
Inhibidores específicos de mediadores proinflamatorios o sus Rc	Ac monoclonal anti-IL-17, anti-IL-8, anti-IL-1β, anti-TNF-α, anti-Rc-TNF-α, anti-Rc-IL-1 (anakinra), antiCXCR2-RA (GSK SB656933) ^Δ
Modificadores de la señalización intracelular	Pioglitazona ^Δ , simvastatina ^Δ , sulforafano ^Δ , inhibidores de NF-κB, inhibidores de p38MAPK
Citoquinas antiinflamatorias	IL-10, INF-γ ^Δ
Inhibidores de moléculas de adhesión	Anti-ICAM-1
Inmunomoduladores	Metotrexate ^Δ , hidroxicloroquina ^Δ , azatioprina, ciclosporina ^Δ , timosina-α-1
Antibióticos	Azitromicina† (y otros macrólidos), doxiciclina
Anti-proteasas	α1-AT ^Δ , EPI-hBE4 (depelestat), Ac monoclonal anti-MMP9 (GS-5745) ^Δ
Antioxidantes	N-acetilcisteína ^Δ , colina, glutamina, glutatiónt, piruvato sódico, β-caroteno, vitamina E, ácido ascórbico, tiocianato, coenzima Q10
Inhibidores de la fosfodiesterasa	Sildenafil†, inhibidores de la PDE3/4, pentoxifilina
Tratamientos celulares	Células madre mesenquimales†
Otros	DNasa ^Δ , cromolina, digitoxina ^Δ , ejercicio ^Δ , seleciclib†

AINEs: antiinflamatorios no esteroideos; DHA: ácido docosahexaenoico; AGE: ácido grado esencial; Ac: anticuerpo; IL: interleucina; TNF: factor de necrosis tumoral; Rc: receptor; NF: factor nuclear; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; INF: interferón; ICAM: molécula de adhesión intercelular; MMP: metaloproteína de la matriz; α1-AT: alfa-1 antitripsina; PDE: fosfodiesterasa; FQ: fibrosis quística.

^ΔFármacos que han sido evaluados en ensayos clínicos en FQ. †Fármacos actualmente en investigación en FQ.

*Adaptado de Roesch EA (2018)³⁸.

3.- Importancia de la nutrición en la fibrosis quística

La malnutrición secundaria a enfermedades crónicas tiene un impacto negativo en la evolución clínica del paciente por su repercusión sobre la respuesta inmunológica, la función digestiva y el apetito, entre otras. Mantener un estado nutricional adecuado es también un aspecto imprescindible en el tratamiento de la FQ, ya que repercute directamente en la calidad de vida, en la FP y en la supervivencia¹²⁰. El estándar de tratamiento nutricional para los pacientes con FQ incluye una dieta hipercalórica sin restricción grasa para alcanzar un estado nutricional óptimo, la TSE en los pacientes con IP y la suplementación con vitaminas liposolubles¹⁵. Es importante que la administración tanto de los enzimas pancreáticos como de las vitaminas liposolubles se dosifique de manera correcta y, además, se administre en el momento y forma adecuados¹²¹. La monitorización del estado nutricional debe iniciarse desde el momento del diagnóstico¹⁵, para prevenir la malnutrición, iniciando con énfasis la educación nutricional de los padres y pacientes mayores para asegurar una ingesta adecuada que logre un balance positivo de energía, tanto durante los períodos estables como durante las EP que sufren estos enfermos. El objetivo es mantener un índice de masa corporal (IMC) por encima del percentil 50 en niños y adolescentes, y en adultos por encima de 23 kg/m² en varones y 22 kg/m² en mujeres^{15, 122}.

El balance energético en los pacientes con FQ se ve alterado por 3 factores fundamentales: ingesta inadecuada (falta de apetito, dieta inadecuada, síntomas gastrointestinales, depresión), aumento de las pérdidas energéticas por malabsorción/maldigestión y aumento del gasto energético debido al aumento del trabajo respiratorio y al estado de inflamación y de infección crónicas¹²³. Es fundamental una adecuada dosificación de la TSE en los pacientes con IP, que se ajustará en función del contenido graso de la comida y el grado de malabsorción del paciente¹²⁴. En general, el aporte de calorías debe ser elevado, alrededor del 120-200% de las recomendaciones de ingesta diaria para su edad, peso y talla, aunque debe individualizarse ya que depende de factores como el estado nutricional del paciente o su afectación pulmonar¹⁵. Se debe evitar la restricción de grasas, que hace la dieta menos calórica y apetitosa¹²⁵. La práctica actual consiste en ofrecer dietas hipercalóricas con aportes

elevados de grasas, que mejoran el sabor de los menús y que, además, aporten triglicéridos (TG) de cadena larga y AGE¹²⁶. El tratamiento con los nuevos moduladores y correctores de CFTR tiene un impacto positivo sobre el estado nutricional de los pacientes y sobre su calidad de vida, en los dominios apetito, imagen corporal y peso¹²⁷, e incluso podría revertir o retrasar la aparición de la IP en etapas precoces de la vida¹²⁸. Conseguir una nutrición correcta y, sobre todo, mantenerla, precisa de la colaboración de todo el equipo multidisciplinar, siendo fundamental la participación de especialistas en nutrición y de dietistas¹²⁹.

4.- Los ácidos grasos esenciales en la fibrosis quística

Los AGE son ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que no pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser obtenidos directamente de la dieta. Las vías metabólicas para la producción de los distintos PUFA comparten enzimas para la elongación/desaturación de la cadena, por lo que puede haber una interacción entre las vías metabólicas que comprometa la producción de alguno de ellos¹³⁰. Para el ser humano, son AGE el ácido linoleico (LA) y el ácido alfa-linolénico (ALA). Su metabolismo da lugar a las dos familias principales de PUFA, implicadas en los procesos de inflamación: los omega-6 y los omega-3. Sus principales componentes y sus vías metabólicas se muestran en la **Figura 2**.

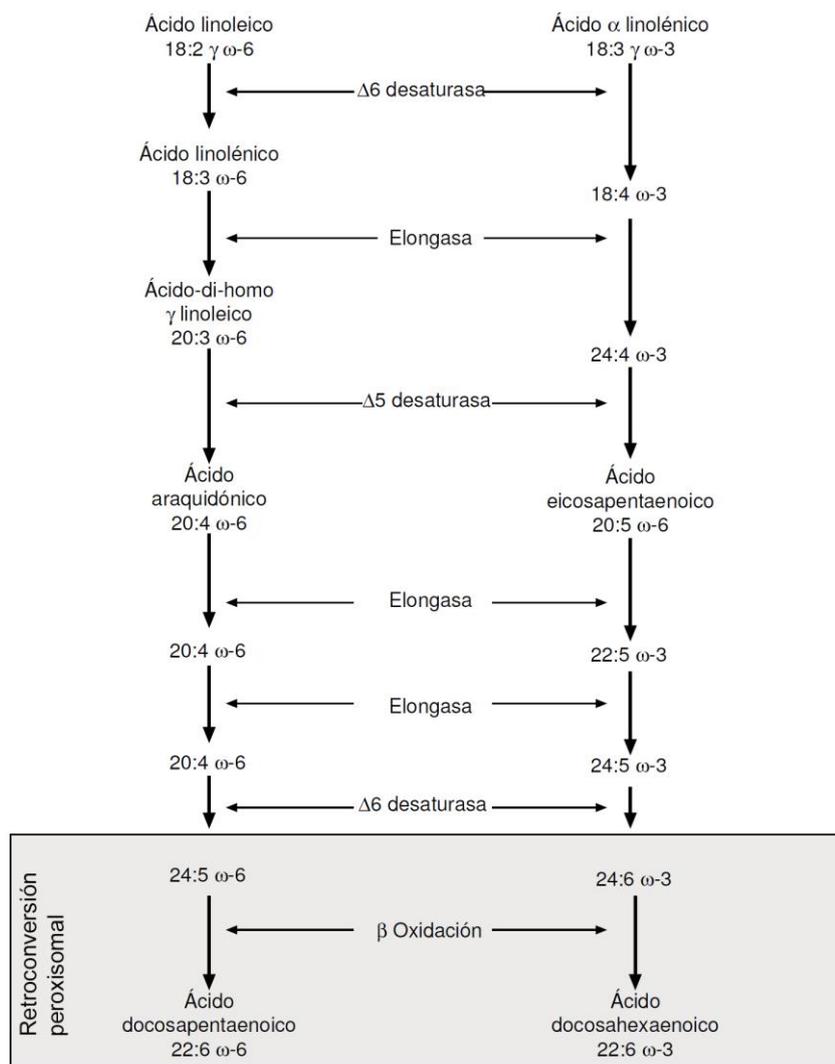


Figura 2. Transformación biológica de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y 6. γ: gamma; ω: omega; α: alfa. Modificado de Gil-Campos M (2010)¹³⁰.

El AA se forma en la vía de metabolización de los omega-6 y es un precursor de mediadores proinflamatorios conocidos como los eicosanoides, entre los que se incluyen las prostaglandinas (PG), los LT y el tromboxano. Estos mediadores incrementan la migración de neutrófilos a los tejidos con el consiguiente aumento de moco y mediadores celulares que favorecen la destrucción tisular. El ALA, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el DHA son productos del metabolismo de la vía omega-3, se comportan como potentes agentes antiinflamatorios y son determinantes para la integridad de las membranas celulares¹³¹. En nuestro organismo, el ALA se convierte en EPA, que normalmente se encuentra en los aceites marinos. La principal fuente natural de EPA en la alimentación humana son los pescados grasos (atún, bonito, jurel, salmón, arenques). Dado que sólo una pequeña proporción de EPA da lugar a la síntesis de DHA por la vía de los omega-3, el aporte exógeno de este es indispensable y podría considerarse que, en muchas situaciones clínicas, el DHA es también un AGE. El DHA se encuentra de manera natural en los aceites de pescado, linaza y en las nueces^{131, 132}.

En los pacientes con FQ se describió por primera vez una alteración en la relación y concentración de PUFA, en comparación con sujetos sanos, en 1962¹³³. Años más tarde, se describió que en estos pacientes existía una elevación de la relación omega-6/omega-3, debido a un aumento de la concentración y del empleo de AA por parte de las membranas celulares, lo que provocaba un aumento del LA en la vía omega-6 y una disminución del DHA como producto final de la vía omega-3¹³⁴. Para investigar los desequilibrios en los PUFA en la FQ, Freedman y colaboradores demostraron que los ratones recién nacidos con el gen CFTR deleciónado en ambos alelos (*cftr-/cftr-*) tenían una alteración en la composición de los PUFA en las membranas celulares, y mostraban un aumento de los niveles de AA y una disminución de los niveles de DHA¹³⁵. El análisis de las muestras de tejido de intestino delgado, pulmón y páncreas de ratones *cftr-/cftr-* mostraron que incorporaban hasta tres veces más AA en sus membranas celulares que los ratones no modificados genéticamente, lo que determinaba secundariamente una menor proporción de DHA en dichas membranas^{136, 137}. El cociente AA/DHA está elevado en las biopsias nasales y rectales de los enfermos con FQ, mientras que los portadores presentan valores intermedios comparados con los controles¹³⁸. Son numerosos los factores que explican la modificación de los PUFA en la FQ: la alteración de la actividad desaturasa de

la lipasa hepática, el aumento de su metabolismo, el incremento de la síntesis de mediadores antiinflamatorios y la alteración de la utilización de PUFA en el epitelio celular, entre otros¹³⁹.

El patrón anómalo de PUFA se ha objetivado tanto en pacientes con IP como con suficiencia pancreática (SP), lo que unido a la alteración de estos en portadores de una mutación de FQ sugiere que, además de los mecanismos de alteración de los PUFA anteriormente nombrados, puede existir una correlación entre el grado de alteración del perfil de estos y la disfunción de CFTR. Esto determinaría una relación directa con el defecto genético de esta enfermedad¹⁴⁰.

5.- La suplementación con omega-3 en la fibrosis quística

La dieta de los humanos hace siglos tenía un cociente de omega-6/omega-3 de 1:1. Sin embargo, la dieta occidental ha ido incrementando progresivamente el aporte de omega-6, lo cual favorece la aparición de trastornos cardiovasculares, inflamatorios y autoinmunes¹⁴¹. La idea del efecto beneficioso de la suplementación con aceites de pescado ricos en omega-3 partió, inicialmente, de la observación de la dieta de los esquimales de Groenlandia (los Inuits), rica en omega-3, ya que éstos tienen una baja incidencia de enfermedades inflamatorias que son frecuentes en Europa o en América del Norte^{142, 143}. El tipo de PUFA administrado es de suma importancia, ya que el ALA, que se considera esencial desde el punto de vista nutricional, no es eficaz para incrementar los niveles celulares de DHA. Sin embargo, el aporte exógeno de DHA sí es capaz de incrementar los niveles celulares de DHA y EPA¹⁴⁴.

En relación con los efectos beneficiosos de los PUFA sobre la salud, el consumo de DHA se ha asociado históricamente con una reducción de la muerte por infarto agudo de miocardio y beneficios en el tratamiento de la hipertensión arterial, la artritis, la trombosis y algunos tipos de cáncer¹⁴⁵. Sin embargo, revisiones más recientes tienen en cuenta la variedad de resultados obtenidos y la inconsistencia de muchas de las variables utilizadas en estos estudios, a pesar de lo cual se continúa considerando que la suplementación con DHA tendría un efecto positivo sobre las funciones cardiovascular y cerebral¹⁴⁶. En relación con el cáncer, el efecto del DHA sobre las distintas etapas del ciclo celular se ha demostrado *in vitro*, aunque su mecanismo de acción no está todavía aclarado y su utilidad como tratamiento adyuvante a la quimioterapia debe ser todavía estudiada en ensayos específicamente diseñados para ello¹⁴⁷. En la edad pediátrica, se ha estudiado el efecto del DHA en patologías como el autismo o el trastorno por déficit de atención e hiperactividad, aunque no hay evidencias claras de su utilidad en estos procesos¹³⁰.

En relación con la patología respiratoria, la suplementación con omega-3 se ha relacionado con una mejor FP en adultos, sobre todo fumadores¹⁴⁸, con una mejoría de la oxigenación en el síndrome de distrés respiratorio agudo del adulto¹⁴⁹, o con menos síntomas respiratorios en fumadores

con enfermedad pulmonar obstructiva crónica¹⁵⁰. En niños, la introducción temprana de pescado en la dieta (entre los 6 y los 9 meses) y el consumo regular del mismo al menos 1 vez por semana se ha asociado con una menor prevalencia de asma y sibilancias hasta los 4.5 años de edad¹⁵¹. En madres gestantes, la suplementación a partir de la semana 24 de gestación con un aporte de 2.4 g/día de aceite de pescado rico en omega-3 redujo en un 30% el riesgo de que sus hijos presentaran asma persistente a los 3 años¹⁵². Sin embargo, su consumo no se ha asociado con una menor prevalencia de síntomas alérgicos en la edad escolar en niños con antecedentes de prematuridad¹⁵³, ni con una menor incidencia de displasia broncopulmonar en este grupo de pacientes¹⁵⁴.

Estudios en animales han demostrado que la administración de DHA oral a ratones recién nacidos promueve la diferenciación de los neumocitos tipo II y favorece una mayor producción de surfactante¹⁵⁵. Los estudios de suplementación de DHA en ratones *cftr-/cftr-* han demostrado su utilidad para corregir la alteración del perfil de PUFA, aumentando los niveles de DHA y disminuyendo los niveles de AA, lo que se asoció a una modificación de la anatomía pancreática (disminución de la dilatación de los acinis pancreáticos) y a una mejoría de la estructura de las vellosidades intestinales¹³⁵. Este mismo estudio demostró que la concentración de neutrófilos en el LBA de ratones *cftr-/cftr-* expuestos a la adquisición de *P. aeruginosa* mediante aerosol, era mucho mayor que la de los controles, y que la suplementación con DHA revertía este fenómeno. Se constató, además, que estos efectos eran específicos de la administración de DHA y no se producían cuando se administraban otros ácidos grasos o aceites de pescado¹⁵⁶. Otro estudio, más reciente, en el que se empleó una dieta enriquecida con omega-3 (DHA y EPA) en madres y ratones recién nacidos homocigotos para la mutación Phe.508del, demostró que los ratones suplementados, en comparación con los ratones con una dieta estándar, incorporaban una mayor proporción de omega-3 en sus membranas celulares, corregían el déficit de crecimiento, presentaban una menor hiperplasia de células epiteliales bronquiales, y una respuesta inflamatoria y daño menores tras la exposición a LPS¹⁵⁷. Sin embargo, hay que ser cautelosos a la hora de extrapolar directamente los hallazgos en ratones a seres humanos. Las células inmunes de los ratones tienen un contenido mayor de DHA que las células humanas, y la incorporación de DHA tras su aumento en la dieta excede con mucho la capacidad de incorporación

de DHA de las células humanas. Además, la respuesta inflamatoria que acontece en ratones frente a distintos tipos de trauma es diferente a la observada en humanos, lo que indicaría que los modelos murinos no reflejan de manera adecuada la respuesta fisiológica observada en humanos frente a procesos inflamatorios sistémicos¹⁵⁸. Estas diferencias entre la fisiología humana y la de los ratones podrían explicar las diferencias observadas en los resultados entre estudios realizados en modelos murinos y en seres humanos. Una forma de compensar la refractariedad de las células inmunes humanas a incorporar PUFA en sus membranas celulares sería administrar dosis elevadas de los mismos. En relación a las dosis necesarias en humanos, algunos autores han propuesto que se necesitaría una dosis de al menos 2 g de DHA+EPA para inducir cambios en la respuesta inflamatoria¹⁵⁹. Otros trabajos de revisión concluyen que los efectos protectores cardiovasculares del DHA se obtienen a partir de dosis de 500 mg al día, mientras que para obtener efectos “terapéuticos” para mejorar la recuperación tras un infarto de miocardio se necesitarían dosis aún mayores (1860 mg de EPA y 1500 mg de DHA al día durante 6 meses)¹⁶⁰.

La administración exógena de DHA a una dosis adecuada podría tener, por tanto, un papel en la corrección bioquímica de la alteración del perfil de los PUFA y, también, un potencial como terapia antiinflamatoria en la FQ.

En la literatura hay pocos estudios en los que se haya empleado la suplementación con diferentes PUFA en pacientes con FQ, con algo más de 100 enfermos estudiados en total y generalmente por periodos cortos de tiempo (menores de 3-6 meses). Lawrence y colaboradores¹⁶¹, realizaron un estudio cruzado de 6 semanas, con 12 semanas de lavado, en 19 enfermos (12-26 años) a los que se les administró cápsulas de aceite de pescado con 2.7 gramos de EPA. El grupo tratado tuvo mejor FEV₁ y mejor capacidad vital forzada (FVC, del inglés *forced vital capacity*) en la espirometría, disminución del volumen del esputo y mejoría de puntuaciones en la radiografía de tórax. Henderson y colaboradores¹⁶², realizaron un estudio aleatorizado de 6 semanas de tratamiento con 8 cápsulas de aceite de pescado, repartidas dos veces al día (dosis diaria de 3.2 g de EPA y 2.2 g de DHA), en 12 niños y adultos jóvenes con FQ comparados con 13 controles sanos pareados por edad y sexo. Ambos grupos fueron aleatorizados a recibir suplemento o placebo. Se objetivaron niveles más bajos de LA y AA en

los controles sanos a nivel basal y aumento de DHA y EPA en plasma y membrana de eritrocito tras la suplementación en los enfermos con FQ. Panchaud y colaboradores¹⁶³, realizaron un estudio cruzado de 6 meses, sin periodo de lavado, en 17 niños y adultos jóvenes con FQ que recibieron un suplemento enriquecido o no de forma aleatorizada, con 100 a 300 mg de DHA y 200 a 600 mg de EPA en función del peso. No se obtuvieron diferencias significativas en la FP ni en los datos antropométricos; sin embargo, el grupo suplementado tuvo un aumento significativo de EPA, pero no de DHA, en la membrana de neutrófilos y un descenso del cociente LTB₄/LTB₅. Otros estudios, no aleatorizados ni controlados, tampoco han demostrado mejoría del FEV₁ con la suplementación de EPA y DHA en pacientes con FQ¹⁶⁴. Pocos trabajos y, además, la mayoría de ellos no aleatorizados ni controlados con placebo, han estudiado el efecto que la suplementación de omega-3 en la dieta tiene sobre la inflamación en la FQ^{162, 165, 166}. La suplementación con PUFA y DHA produce una reducción de inmunoglobulina (Ig) G y de α 1-AT¹⁶⁴, una disminución de la quimiotaxis de neutrófilos en respuesta al LTB₄¹⁶⁵ y un descenso del mismo¹⁶⁶, así como un descenso en el cociente LTB₄/LTB₅¹⁶³. Parece que la explicación a estos cambios se debe a que los PUFA de la serie omega-3 compiten con las elongasas y desaturasas de la serie omega-6, favoreciendo la liberación de eicosanoides antiinflamatorios¹⁶⁷, lo cual produciría una reducción de la cantidad de moco, de la quimiotaxis y activación de los neutrófilos y de la respuesta inflamatoria que genera vasoconstricción y broncoconstricción. Recientemente, se han publicado un estudio a corto plazo (4 semanas)¹⁶⁸, dos trabajos de suplementación a medio (2 y 3 meses)^{169, 170} y dos a largo plazo (12 meses)^{171, 172} con una mezcla de PUFA en pacientes con FQ en los que se ha valorado la mejoría de parámetros inflamatorios sistémicos y pulmonares, la FP, la nutrición, la necesidad de antibioterapia y el número de EP. El trabajo a corto plazo es un estudio cruzado de 4 semanas de duración, con un periodo de lavado de 9 semanas, en sólo 10 pacientes, con dosis relativamente bajas de DHA (5-10 mg/kg/día), en el que se evidenció un aumento en los niveles de DHA en plasma y plaquetas, un incremento de los niveles plasmáticos de vitamina E y una tendencia no significativa al descenso en marcadores de peroxidación de lípidos; según los autores, esto demostraría el potencial antioxidante del DHA¹⁶⁸. La suplementación de 3 meses con PUFA en un total de 35 pacientes, tuvo un efecto beneficioso sobre los marcadores de inflamación pulmonar (valorados

por la fracción exhalada de ON tanto a nivel nasal como pulmonar), con una disminución asociada de marcadores inflamatorios en sangre (velocidad de sedimentación globular -VSG- e IL-8), sin modificaciones sobre la FP valorada por FEV₁¹⁶⁹. El estudio de 2 meses de duración en 15 pacientes encontró que la suplementación con DHA conseguía aumentar la cantidad de DHA y reducir la de AA en las membranas de los eritrocitos en tan sólo un mes, y que se reducían los niveles plasmáticos de IL-6 y EN al final del estudio¹⁷⁰. En uno de los trabajos de suplementación a largo plazo, no aleatorizado y sin placebo, realizado por un grupo español, que incluyó 19 pacientes que recibieron suplementación con una mezcla de PUFA durante 1 año, se produjo una disminución del número de EP, de la necesidad de antibioterapia y de los marcadores inflamatorios sistémicos estudiados (anticuerpos anti-LDL oxidada y TNF- α) asociado a una mejoría de los parámetros espirométricos y de la masa magra¹⁷¹. En el trabajo a largo plazo más reciente, en el que se incluyeron 15 pacientes homocigotos para la mutación Phe.508del (7 pacientes con DHA+EPA, 8 con placebo), se encontró una disminución de las EP y de los días con necesidad de tratamiento antibiótico, aunque no hubo cambios en la FP ni en los parámetros inflamatorios estudiados en suero (leucocitos totales, neutrófilos totales, proteína C reactiva -PCR-, VSG, IgG)¹⁷².

La última revisión Cochrane sobre el empleo de PUFA de la serie omega-3 en FQ¹⁷³ concluye que, dado el escaso número de estudios aleatorizados y controlados con placebo realizados, de momento hay poca evidencia para recomendar la suplementación con omega-3 en pacientes con FQ, aunque en los trabajos realizados no se han observado efectos secundarios importantes. Por este motivo, concluyen que sería de enorme importancia la realización de un estudio clínico a largo plazo de suplementación con PUFA para determinar su beneficio sobre los síntomas clínicos de la enfermedad, saber cuál es la correcta dosificación de estos y estudiar la modificación de la necesidad de enzimas pancreáticos con dicha suplementación. Hay dos ensayos clínicos registrados en la página web *ClinicalTrials.gov* que valoran el efecto de la suplementación con DHA en FQ. Uno de ellos, ha estudiado el efecto de la suplementación con DHA a corto plazo (4 semanas) sobre la inflamación pulmonar valorada a través de la medida de 8-iso-prostaglandina-F2 α (NCT00924547). El reclutamiento consta como terminado en julio de 2015, ha incluido 17 pacientes, pero no se han

publicado resultados. El otro ensayo, a largo plazo (12 meses), ha valorado el efecto de la suplementación con DHA en la fórmula adaptada en niños de hasta 56 días de vida diagnosticados de FQ por cribado neonatal, teniendo como objetivo principal la valoración del estado nutricional y la evolución de la elastasa-1 fecal como marcador de la IP (NCT00530244). En la última actualización, en marzo de 2018, consta como terminado, con 76 pacientes incluidos, pero tampoco se han publicado resultados de este ensayo. Adicionalmente, hay otro estudio registrado en la base de datos europea (*clinicaltrialsregister.eu*) desde 2008 cuya variable principal es el cociente LTB_4/LTB_5 , que aún consta como en marcha y tampoco tiene resultados publicados (EudraCT Number:2006-004155-38).

6.- Resumen

La FQ es una enfermedad multisistémica en cuya fisiopatología la inflamación tiene un papel central. Está demostrado que los pacientes con FQ tienen una alteración en la distribución de PUFA, con un aumento de los PUFA proinflamatorios de la serie omega-6 (como el AA) y una disminución de los PUFA con efectos antiinflamatorios de la serie omega-3 (como el DHA y el EPA). Esta alteración podría estar relacionada no sólo con el estado nutricional de los pacientes, si no que existiría un defecto primario asociado a la falta o malfuncionamiento de CFTR.

La respuesta inflamatoria exagerada y mal regulada que muestran los pacientes con FQ no sólo está vinculada a la infección bronquial, ya que se ha demostrado su existencia en ausencia de infección. Estos pacientes tienen, además, dificultades para poner en marcha mecanismos de control de la inflamación, lo que conlleva la perpetuación de esta. En este escenario, es de suma importancia encontrar agentes antiinflamatorios que mejoren el actual esquema terapéutico disponible para estos pacientes. Como se ha expuesto, la administración exógena de DHA tiene un potencial efecto antiinflamatorio, ya que bloquearía la biosíntesis de AA a partir del LA y además desplazaría al AA de los fosfolípidos de membrana, que es el sustrato para la producción de factores proinflamatorios como LT y PG.

La suplementación con DHA u otros PUFA en la FQ ha aportado datos clínicos y bioquímicos interesantes, pero, como concluye la última revisión Cochrane, hacen falta más estudios, con un número mayor de pacientes, con una duración mayor y una metodología de mayor calidad, para poder aconsejar su uso sistemático en pacientes con FQ¹⁷³.

Es de enorme relevancia, por tanto, la realización de un estudio a largo plazo, prospectivo, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, que aclare el efecto de la suplementación con DHA en la FQ. Este estudio debe incluir pacientes desde el diagnóstico, ya que hasta ahora los estudios se han realizado en pacientes mayores de 6 años, y valorar parámetros tanto clínicos como bioquímicos. También deben recogerse los efectos secundarios, ya que, aunque la suplementación con PUFA se considera en general segura, no está exenta de riesgos¹⁷⁴.

HIPÓTESIS y OBJETIVOS

La administración de DHA en pacientes diagnosticados de FQ podría tener propiedades antiinflamatorias a nivel pulmonar, intestinal y sistémico. La demostración de estas propiedades, y su eventual inclusión en el tratamiento habitual de estos enfermos, sería de enorme importancia para mejorar la clínica y su estado nutricional, con la consiguiente influencia en la morbimortalidad derivada de esta enfermedad. Como se ha expuesto con anterioridad, el DHA ha demostrado tener efectos antiinflamatorios a nivel sistémico y pulmonar en enfermos con FQ de edades superiores a 6 años, aunque los estudios publicados son escasos, con pocos pacientes, de corta duración o no controlados, y muy pocos de ellos con calidad suficiente para ser incluidos en la revisión Cochrane¹⁷³.

Además, el efecto del DHA no ha sido estudiado en niños recién diagnosticados ni en menores de 5 años, y tampoco ha sido valorada la repercusión que puede tener la administración de este sobre la inflamación a nivel intestinal. Dado que cualquier medicación antiinflamatoria en FQ debe ser empleada desde las etapas precoces de la vida¹⁰⁰, es importante determinar la utilidad del DHA a partir del diagnóstico de esta enfermedad, así como la dosis óptima para estos pacientes.

Con estas premisas, la hipótesis de trabajo es que la administración a largo plazo de DHA en pacientes con FQ tendría propiedades antiinflamatorias a nivel pulmonar, intestinal y sistémico.

1.- Objetivos del estudio

1.1.- Objetivo principal

Estudiar si la administración de DHA a largo plazo (12 meses), a dosis de 50 mg/Kg/día, en pacientes mayores de 2 meses diagnosticados de FQ disminuye la inflamación pulmonar, intestinal y sistémica en comparación con placebo.

1.2.- Objetivos secundarios

a) Estudiar si la administración de DHA:

1. Produce modificaciones sobre otros marcadores inflamatorios a nivel pulmonar y sistémico.
2. Mejora parámetros clínicos relacionados con la afectación respiratoria en la FQ (FP, tasa de EP y EP graves, tiempo hasta la aparición de la primera EP y la primera EP grave, infección por *P. aeruginosa*).
3. Mejora los parámetros clínicos relacionados con la afectación digestiva / nutricional en la FQ (peso, IMC, dosis de enzimas pancreáticos, CRG).
4. Produce modificaciones en la calidad de vida.
5. Produce modificaciones sobre el perfil de PUFA en suero y membrana de eritrocito.

b) Determinar el perfil de seguridad de la administración de DHA en pacientes con FQ mayores de 2 meses.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Diseño del estudio

Se diseñó un estudio clínico en fase 4, doble ciego, paralelo y controlado con placebo en pacientes con FQ mayores de 2 meses, aleatorizados a recibir suplementación con DHA (DHA-Basic®) o placebo durante 48 semanas. El protocolo de estudio era acorde con la Declaración de Helsinki y cumplía con los requisitos establecidos en las legislaciones nacional y europea, fue revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Ramón y Cajal (HURyC) (nº 230/10, Anexo 1) y se registró en ClinicalTrial.gov (NCT01783613). Todos los pacientes de 18 años o más incluidos en el estudio (Anexo 2), y los padres o representantes legales de todos los pacientes menores de 18 años (Anexo3), firmaron el correspondiente consentimiento informado. Los menores de edad de más de 12 años firmaron, además, un consentimiento específico (Anexo 4).

El estudio se llevó a cabo en cinco Unidades de Fibrosis Quística: HURyC (Madrid), Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid), Hospital Universitario de La Princesa (Madrid), Hospital Universitario La Fe (Valencia) y Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo).

2.- Participantes

Todos los pacientes mayores de 2 meses de edad, atendidos en las Unidades de FQ de los hospitales participantes, con un diagnóstico confirmado de FQ, eran elegibles para participar en el estudio. Los pacientes debían cumplir todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión indicados a continuación.

2.1.- Criterios de inclusión

- a) Pacientes con diagnóstico de FQ, de edad mayor de 2 meses, cuyos padres/tutores y/o ellos mismos, en caso de ser mayores de 12 años, aceptasen participar en el estudio y firmasen el consentimiento informado correspondiente.
- b) Capacidad para la realización de una espirometría forzada en mayores de 6 años, con valores reproducibles.
- c) Valor de FEV₁ en mayores de 6 años, para su edad, sexo, peso y talla, superior al 30% del predicho.
- d) Capacidad de realización de la técnica de esputo inducido (EI) en mayores de 6 años.
- e) Situación clínica estable y ausencia de tratamiento antibiótico oral o intravenoso en las 2 semanas previas a la firma del consentimiento informado.

2.2.- Criterios de exclusión

- a) Hipersensibilidad conocida al DHA o alguno de los componentes del suplemento.
- b) Tratamiento con anticoagulantes y/o antiplaquetarios (ticlopidina, clopidogrel, dipiridamol).
- c) Recuento plaquetario <50 000/mm³.
- d) Alteración hepática (aumento de las aminotransferasas 3 veces los límites normales, o hipertensión portal).
- e) Actividad de protrombina <70%.
- f) Colestasis grave (aumento de la bilirrubina directa por encima de 2 veces el límite normal para su edad).

- g) Hipoalbuminemia grave (albúmina en sangre <2.5 g/mL).
- h) Insuficiencia renal.
- i) Ingreso hospitalario o administración de antibióticos orales o intravenosos en las 2 semanas previas a la firma del consentimiento informado.
- j) Haber sufrido un episodio reciente (menos de 4 semanas tras la firma del consentimiento informado) de hemoptisis amenazante.
- k) Cambios en el tratamiento habitual en las 2 semanas previas a la firma del consentimiento informado.

2.3.- Criterios de retirada y análisis

Los pacientes podían suspender su participación en el estudio en cualquier momento que lo desearan. A su juicio y criterio, el médico investigador también podía decidir la retirada de un paciente del estudio en caso de que no siguiese las normas del protocolo.

3.- Aleatorización y enmascaramiento

La Unidad de Bioestadística Clínica del HURyC realizó la asignación aleatoria de tratamientos a los centros participantes en el estudio mediante contacto telefónico y/o por correo electrónico. La asignación siguió un algoritmo adaptativo de minimización de acuerdo con determinados factores que podrían afectar al estado inflamatorio del paciente o su respuesta al DHA; edad (\leq o >2 años), FEV₁ predicho (\leq o $>75\%$), infección crónica por *P. aeruginosa* (sí o no), tratamiento inhalado con DNasa (sí o no) y uso crónico de tratamiento antiinflamatorio con azitromicina (sí o no). Una vez incluido el paciente y tras recibir los datos correspondientes a los cinco factores expuestos, la Unidad de Bioestadística asignaba cada paciente al grupo de tratamiento o al grupo control. La Unidad de Bioestadística conservó un registro de las asignaciones aleatorias de tratamiento, que se mantuvieron ciegas en todo momento a los investigadores, los participantes y sus familias.

4.- Intervención

Los pacientes incluidos en el brazo activo de tratamiento recibieron un suplemento de DHA en forma de solución de aceite de microalga *Schizochytrium* spp. (DHA-Basic®, CASEN Fleet SLU, Pozuelo de Alarcón, España), con un contenido en DHA del 35%, aceite de girasol, emulgente (E-322), antioxidantes (E-304i y E-306) y aromas naturales (extracto de romero). La dosis establecida de DHA fue 50 mg/Kg/día (equivalente a 0,15 mL de DHA-Basic®/Kg/día), con una dosis máxima de 3 g/día (9 mL de DHA-Basic®/día). La dosis elegida era igual o mayor que la empleada en la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha en FQ, a excepción del estudio de Kurlandksy et al. en el que se emplearon dosis de 100 mg/kg/día¹⁶⁶, y suficiente para conseguir efectos terapéuticos en otras enfermedades¹⁶⁰. La composición exacta de PUFA contenida en el producto DHA-Basic® se refleja en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Composición cuantitativa de ácidos grasos poliinsaturados del producto DHA-Basic®			
Ácido graso poliinsaturado	Concentración (mg/mL)	Ácido graso poliinsaturado	Concentración (mg/mL)
AG 16:0	123.0±0.5	AG 20:3 n-6	3.0±0.1
AG 18:0	8.9±1	AG 20:4 n-6 (AA)	8.9±0.5
AG 20:0	1.0±0.3	AG 22:4 n-6 (DTA)	1.1±0.5
AG 22:0	1.9±0.5	AG 22:5 n-6 (DPA-n6)	187.0±1.4
AG 24:0	2.0±0.4	AG 18:3 n-3 (ALA)	0.4±0.3
AG 18:1 n-9 (OA)	150.4±0.3	AG 20:3 n-3 (DGLA)	0.5±0.2
AG 18:1 n-7	3.2±0.1	AG 20:5 n-3 (EPA)	9.8±0.5
AG 18:2 n-6 (LA)	6.9±0.3	AG 22:6 n-3 (DHA)	423.3±2.4
AG 18:3 n-6 (GLA)	1.9±0.2		

La concentración se expresa como media±desviación estándar. Las concentraciones se midieron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (n= 5).
 AG: ácido graso; OA: ácido oleico; LA: ácido linoleico; GLA: ácido gamma-linoleico; AA: ácido araquidónico; DTA: ácido docosatetraenoico; DPA: ácido docosapentaenoico; ALA: ácido alfa-linolénico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; DGLA: ácido dihomo-gamma-linolénico.

Los pacientes incluidos en el brazo control recibieron un placebo, también elaborado por CASEN Fleet S.L.U., con el mismo sabor, color, olor y textura y a las mismas dosis.

Tanto la administración de DHA como la de placebo se realizó por vía oral, una vez al día, en una de las comidas principales, mediante una jeringuilla dosificadora, directamente o bien mezclado con cualquier alimento.

El placebo fue aportado de forma gratuita por el Laboratorio CASEN Fleet S.L.U., etiquetado de acuerdo con las recomendaciones del Real Decreto 223/2004. El alimento para usos médicos especiales (ADUME) se etiquetó de la misma manera y fue suministrado por el mencionado laboratorio; la financiación de la compra del ADUME corrió a cargo del promotor (Dra. Lamas) a través del Consorcio de Apoyo a la Investigación Biomédica en Red (CAIBER).

El ADUME y el placebo fueron almacenados en las Unidades de Investigación Clínica de cada centro participante y, después de llevarse a cabo el proceso de aleatorización y la codificación correspondiente, fueron suministrados a los investigadores para su dispensación a los participantes en el estudio clínico.

Todos los pacientes recibieron las mismas recomendaciones dietéticas para homogeneizar la ingesta de PUFA en ambos grupos a lo largo del estudio. Las recomendaciones buscaban una dieta equilibrada y balanceada en PUFA. Las limitaciones del estudio no suponían, en ningún caso, una alteración importante de la dieta habitual de los pacientes, ya que la cantidad permitida de los distintos alimentos era similar a la habitualmente recomendada (Anexo 5).

Al inicio del estudio, todos los medicamentos y tratamientos asociados al paciente se registraron en una hoja de recogida de datos, describiendo el tipo, la dosis y la duración de estos, con especial atención a los tratamientos con el potencial de alterar los efectos de la intervención. Durante el estudio se permitía, además, el uso de tratamientos concomitantes: SSH, tratamiento broncodilatador a demanda del paciente, tratamiento con corticoides inhalados y/o broncodilatadores de acción prolongada, antibióticos orales o parenterales en caso de EP, antibióticos inhalados y fisioterapia respiratoria. La prescripción de tratamientos a lo largo del estudio quedaba a criterio del médico responsable de cada paciente. En cualquier caso, todos los tratamientos iniciados se registraron en la hoja de recogida de datos del paciente.

5.- Variables de estudio

5.1.- Variables principales

Las variables principales elegidas fueron:

- a) IL-8 en secreciones respiratorias (SR), ya fuera en EI o en aspirado nasofaríngeo (ANF), para valorar la inflamación respiratoria.
- b) IL-8 en suero, para valorar la inflamación sistémica.
- c) Calprotectina fecal, para valorar la inflamación intestinal.

5.2.- Variables secundarias

Como variables clínicas secundarias se analizaron:

- a) Número de EP (definidas por los criterios de Fuchs¹⁷⁵ modificados, ver **Tabla 6**) y el tiempo hasta la primera EP.
- b) Número de EP graves (definidas por la necesidad de tratamiento antibiótico intravenoso) y el tiempo hasta la primera EP grave.
- c) Cambios en la FP (espirometría; FEV₁).
- d) Parámetros nutricionales (peso, talla, IMC).
- e) Dosificación de los enzimas pancreáticos.
- f) Calidad de vida (valorada por medio de cuestionarios de calidad de vida específicamente diseñados para pacientes y padres/tutores de pacientes con FQ).
- g) Seguridad (abandonos, incidencia de efectos secundarios)

Como variables analíticas secundarias se incluyeron:

- a) IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , porcentaje de neutrófilos y PCR en suero.
- b) IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , EN, lactato y calprotectina en SR (EI o ANF).
- c) Coeficiente de reabsorción de grasa (CRG) y elastasa-1 fecal.
- d) Perfil de PUFA en suero y en membrana de eritrocito.
- e) Primoinfección por *P. aeruginosa*.

Tabla 6. Criterios de exacerbación pulmonar del estudio (criterios de Fuchs modificados)¹⁷⁵

Cambios en el esputo	Aumento de la tos
Aumento de la disnea	Anorexia o pérdida de peso
Malestar, fatiga o letargia	Fiebre >38º C
Aparición de hemoptisis o empeoramiento de una hemoptisis previa	Sensibilidad o dolor a nivel de los senos paranasales
Cambios en la secreción en senos paranasales	Cambios en la auscultación pulmonar
Pérdida de función pulmonar ≥10%	Cambios en la radiografía de tórax sugestivos de infección
Se considera la existencia de una exacerbación cuando el paciente cumple al menos 4 de los criterios recogidos en la tabla y precisa la administración de antibióticos.	

6.- Cronograma del estudio

Todos pacientes que aceptaron participar en el estudio completaron una visita de selección (V0), en los 28 días previos al inicio de la suplementación dietética. Tras comprobar el cumplimiento de los criterios de inclusión, los pacientes y/o sus tutores legales firmaron el consentimiento informado y recibieron un manual de información para participantes en el estudio. Además, se realizaron los siguientes controles: evaluación clínica, exploración general, examen nutricional, determinaciones analíticas (DA), pruebas de FP, pulsioximetría, tensión arterial, cultivo para análisis microbiológico con antibiograma de las SR (EI o ANF), perfil de PUFA en sangre, determinación de elastasa-1 fecal, cuantificación de la dosificación de enzimas pancreáticos, registro de la medicación concomitante, cuantificación de grasa en heces de tres días por el método Fenir (van de Kamer) y encuesta dietética para la valoración del CRG, test de embarazo (mujeres en edad fértil), cuestionarios de calidad de vida, determinación de marcadores inflamatorios sistémicos (MI-S), pulmonares (MI-P) (en el EI o el ANF) e intestinales (MI-I).

Los pacientes que cumplían todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión realizaron la visita 1 (V1), en la que se le realizaron las mismas pruebas que en la V0 a excepción de: DA, MI-S, perfil de PUFA, recogida de muestra de heces de tres días con encuesta dietética y prueba de embarazo. En la V1 se procedió a la aleatorización del paciente y a la administración, en la propia Unidad, de la primera dosis del ADUME o placebo para comprobar la tolerancia. Se programaron visitas de control a las 12 (visita 2: V2), 24 (visita 3: V3) y 48 (visita 4: V4) semanas del estudio. Todas las visitas programadas, excepto V1, coincidían con las visitas de seguimiento habitual de los pacientes en las Unidades de FQ de los hospitales participantes. En la V2 se programaron los mismos controles que en la V1. En las V3 y V4 se realizaron las mismas determinaciones que en la V0, exceptuando la prueba de embarazo que sólo se repitió en la V4. Las extracciones de sangre programadas coincidían también con las que habitualmente se hacen a lo largo del año en estos enfermos durante su seguimiento habitual.

Los pacientes que, después de la V1, presentaron clínica de EP de acuerdo con el protocolo de estudio acudieron en las siguientes 24-48 horas a su Unidad de FQ de referencia para ser

adecuadamente tratados y entregar una muestra de SR (EI o ANF) para la realización de estudios microbiológicos (en estas visitas no se realizó determinación de MI-P). Las visitas debidas a EP se consideraron visitas no programadas y se registraron como tales en el Cuaderno de Recogida de Datos (CRD). El cronograma del estudio se resume en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Cronograma del estudio					
	V0	V1	V2	V3	V4
	Selección	Basal	Sem 12	Sem 24	Sem 48
Evaluación clínica	X	X	X	X	X
Examen físico, peso, talla e IMC	X	X	X	X	X
Determinaciones analíticas (DA)*	X			X	X
Función pulmonar	X	X	X	X	X
Pulsioximetría	X	X	X	X	X
Cultivo de SR	X	X	X	X	X
MI sistémicos	X			X	X
MI pulmonares	X	X	X	X	X
Marcadores inflamatorios intestinales	X	X	X	X	X
Perfil de PUFA	X			X	X
Determinación grasa en heces y CRG	X			X	X
Elastasa-1 fecal	X	X	X	X	X
Encuesta dietética	X			X	X
Calidad de vida		X	X	X	X
Criterios de inclusión/exclusión	X				
Consentimiento informado	X				
Aleatorización		X			
Medicación concomitante	X	X	X	X	X
Efectos Adversos			X	X	X
Recomendaciones dietéticas	X				
Prueba de embarazo	X				X

*DA: Hemograma, proteína C reactiva, proteínas totales y proteinograma, transaminasas, bilirrubina directa e indirecta, coagulación, urea y creatinina.
 Sem: semana; IMC: índice de masa corporal; SR: secreciones respiratorias; MI: marcadores inflamatorios; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; CRG: coeficiente de reabsorción de grasas.
 Todas las visitas tenían un margen sobre la fecha prevista de +/- 7 días.

7.- Procedimientos del estudio

Este estudio clínico se desarrolló en las Unidades de Fibrosis Quística del HURyC, los Hospitales Universitarios 12 de Octubre y La Princesa, en Madrid, La Fe, en Valencia, y el Central de Asturias, en Oviedo. En cada hospital un investigador principal se encargó de la coordinación local del estudio. La evaluación clínica y la exploración física de los pacientes en cada una de las visitas fueron realizadas por alguno de los médicos integrantes de la Unidades de FQ participantes en el estudio.

7.1.- Definiciones

Al inicio del estudio se recogieron las características de los pacientes y la presencia o no de complicaciones relacionadas con la FQ. Las complicaciones de los pacientes fueron diagnosticadas por sus médicos habituales, siguiendo los criterios aceptados internacionalmente. La insuficiencia pancreática se definió como la presencia de valores de elastasa-1 fecal por debajo de 100 µg/g heces¹⁵. La EHRFQ se definió según los criterios fenotípicos propuestos por Debray et al¹⁷⁶. La DRFQ se definió por los criterios de la Asociación Americana de Diabetes con las recomendaciones específicas para la FQ¹⁷⁷. La aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) se definió según los criterios establecidos en 2003¹⁷⁸. Las infecciones pulmonares crónicas se definieron por la presencia del patógeno en cuestión en ≥50% de los cultivos en el año previo, siguiendo el criterio habitual de definición de infección crónica por *P. aeruginosa*^{179, 180}.

7.2.- Antropometría

En todas las visitas se registraron el peso y la talla de los pacientes, y se calculó el IMC. La talla se valoró en bipedestación y con el paciente descalzo, con un tallímetro inextensible. El peso se cuantificó con una báscula previamente calibrada, en ropa interior en las edades más jóvenes y con camiseta y/o pantalón en edades posteriores. El IMC se calculó con la fórmula: $IMC = \text{peso (kg)} / \text{talla (m)}^2$. Para todas las medidas se calculó el *z-score* de acuerdo a las curvas de crecimiento nacionales¹⁸¹.

7.3.- Función pulmonar

En todos los pacientes mayores de 6 años, y aquellos menores de 6 años capaces de realizar una espirometría válida y reproducible, se realizó una espirometría forzada en cada una de las visitas. Las pruebas se realizaron con los aparatos disponibles en cada una de las Unidades participantes: Flowhandy ZAN100 USB (Zan Messgerate GmbH, Louisville, Colorado, EE. UU.) en el HURyC y MasterLab versión 4.0 (Jaeger, Würzburg, Alemania) en el resto de las Unidades. Todas las pruebas se realizaron de acuerdo a los criterios establecidos por la *American Thoracic Society* y la *European Respiratory Society*¹⁸² y los porcentajes sobre el valor predicho y los correspondientes *z-scores* se calcularon con las ecuaciones GLI-2012¹⁸³.

7.4.- Recogida y procesamiento de muestras

Las **muestras de sangre** se recogieron en las visitas V0, V3 y V4. Una muestra para análisis convencional (hemograma, coagulación, bioquímica) se envió al laboratorio de cada uno de los hospitales participantes. Las muestras para estudio de marcadores inflamatorios y PUFA se centrifugaron durante 15 minutos a 2000 rpm, para posteriormente dividir el sobrenadante en 5 alícuotas, cada una de ellas marcada con etiquetas identificativas del paciente, con la fecha de extracción y la semana del estudio. Las alícuotas se congelaron a -70°C en cada uno de los hospitales participantes, y se enviaron al final del estudio al HURyC para su análisis.

Las **muestras respiratorias** se obtuvieron mediante ANF, en los menores de 6 años y mediante EI en los mayores de 6 años. La técnica del EI¹⁸⁴ se llevó a cabo por parte del personal de enfermería que habitualmente trata a los pacientes participantes en el estudio clínico, bajo la supervisión de un médico investigador por si se producía algún efecto adverso. Tras comprobar la normalidad de la espirometría y premedicar al paciente con 400 µg de salbutamol inhalado con cámara, se procedía a la nebulización mediante un compresor ultrasónico, con boquilla y pinza nasal, de suero salino al 3% durante 12 minutos, fraccionada en sesiones de 2 minutos de duración. El reservorio se rellenaba con 100 mL de suero al 3% y el paciente tenía que respirar normalmente por la boquilla. Cada 2 minutos de inhalación se le daba al paciente la instrucción de retirar la pieza bucal y escupir con fuerza las SR,

de forma espontánea o bien secundaria a la tos, en un bote de plástico estéril, hasta obtener una muestra respiratoria adecuada. El paciente estaba también autorizado a retirar la pieza bucal y escupir siempre que lo necesitase. El volumen mínimo aceptable de recolección se consideró de 0.5 mL. Los criterios de interrupción de la prueba antes de los 12 minutos fueron: sensación de broncoespasmo o malestar por parte del paciente, auscultación de sibilancias, caída de la FP >20% (o >10% sin recuperación tras administrar 200 µg de salbutamol), caída de la saturación de oxígeno <90%, o recolección de más de 0.5 mL de esputo. Durante la realización de la técnica el paciente se controló mediante auscultación pulmonar a los 2, 6 y 10 minutos de la prueba, y mediante espirometría a los 4, 8 y 12 minutos. De forma continua se monitorizó la saturación transcutánea de oxígeno.

Independientemente del método de recolección, la muestra respiratoria se procesó para separar el esputo de la saliva. Del esputo se separó una alícuota (1 mL) para el estudio microbiológico en el hospital participante. Los estudios microbiológicos en cada centro se realizaron siguiendo los estándares publicados para el cultivo de muestras respiratorias de pacientes con FQ¹³. Al remanente se le añadieron 3 partes de su volumen de solución salina buffer de fosfato y 4 partes más de Sputolysin® al 10% (Bering Diagnostics, Inc., Somerville, Massachusetts, EE. UU.), y la mezcla se introdujo en un baño agitador durante 15 minutos a 37° C, removiendo cada 5 minutos con una pipeta para su completa homogenización. Posteriormente, la mezcla se transfirió a tubos cónicos de 50 mL y se centrifugó a 250 G (1000 rpm) durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril de 10 mL que se centrifugó de nuevo a 4500 rpm durante 20 minutos, a 4°C. El sobrenadante resultante se dividió en alícuotas de 0.5 o 1 mL repartidas en Criotúbulos Nunc®, que se congelaron a -70°C en cada uno de los hospitales participantes, y se enviaron al final del estudio al HURyC para su análisis. Cada alícuota se marcó con etiquetas identificativas del paciente, la fecha de extracción y la semana de estudio.

Las **muestras de heces** de 3 días para el cálculo del CRG y para las determinaciones de elastasa-1 se procesaron localmente según el protocolo de cada hospital participante. Las muestras para la determinación de calprotectina se congelaron y se enviaron, debidamente etiquetadas, al HURyC para su posterior análisis.

7.5.- Determinaciones analíticas

7.5.1.- Marcadores inflamatorios

Los niveles de interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α fueron cuantificados mediante el kit de BD[®] CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit (BD Biosciences, San Jose, California, EE. UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante y analizadas en un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences, San José, California, EE. UU.) con software DIVA (Data-Interpolating Variational Analysis) para el procesamiento de datos y empleando el software FCAP Array (BD Biosciences, San José, California, EE. UU.) para su tabulación. Brevemente, las muestras biológicas se incubaron con una mezcla de 6 poblaciones de bolas con intensidades de fluorescencia diferentes y cada una tapizada con un anticuerpo monoclonal específico para cada IL. Cada bola captura específicamente la IL contenida en la muestra, y es cuantificada mediante anticuerpos específicos conjugados con un fluorocromo, que reconocen a la IL haciendo un sándwich. En el caso de muestras de esputo, la reconstitución de la curva estándar se realizó en el tampón provisto en el kit al que se añadió ditiotreitól a una concentración final de 0.6 mM, para igualar las condiciones químicas con las de las muestras procesadas.

La concentración de la EN se determinó mediante el kit comercial de Invitrogen PMN (Neutrophil) Elastase Human ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EE. UU.). Se trata de un ensayo inmunoenzimático en placas microtituladoras de 96 pocillos que ya están recubiertas con el anticuerpo específico de la elastasa, en los que se añaden las muestras y un segundo anticuerpo (detector) con un sustrato que reacciona con el complejo enzima-anticuerpo-objetivo para producir una señal medible. Esta señal se mide en un lector que proporciona la absorbancia de cada pocillo. La concentración final se calcula en relación con la curva de muestras estándar con una concentración definida.

El estudio de la determinación de lactato en EI o ANF se realizó mediante el analizador de bioquímica Architect c16000 (Abbott, Green Oaks, Illinois, EE. UU.) a través de la valoración de la transformación de ácido láctico en piruvato y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por acción del enzima lactato oxidasa. La peroxidasa cataliza la oxidación del precursor del cromógeno por el H₂O₂ para

producir un compuesto coloreado. El incremento en la absorbancia, a 548 nm, es directamente proporcional a la concentración de ácido láctico presente en la muestra.

La determinación de calprotectina en EI, ANF o heces se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático-colorimétrico de determinación de calprotectina que utiliza anticuerpos policlonales (Calprest®, Eurospital, Trieste, Italia) y un analizador Dynex DS2 (Dynex Technologies, Inc., Chantilly, Virginia, EE. UU). Brevemente, el anticuerpo adsorbido en los pocillos fija la calprotectina presente en la muestra, y los anticuerpos anti-calprotectina conjugados con fosfatasa alcalina, se unen a la calprotectina fijada en el pocillo. A continuación, la fosfatasa alcalina cataliza el sustrato transformándolo en un producto coloreado. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de calprotectina en la muestra.

Para poder realizar el análisis en las muestras de heces, una vez descongeladas, se recogió una muestra de 100 mg (rango 40-120 mg) de materia fecal para su procesamiento. Se añadió una solución de extracción diluida (relación peso/volumen 1:50) y se agitó durante 25 ± 5 minutos con un agitador hasta su homogeneización. Se transfirió una alícuota de ese material a un tubo cónico de microcentrífuga y se centrifugó en una centrífuga de sobremesa durante 20 minutos a 10 000 G, a temperatura ambiente. Posteriormente se tomó una muestra de 500 μ L del sobrenadante para su análisis según el procedimiento previamente descrito.

7.5.2. Ácidos grasos poliinsaturados

La extracción de lípidos del plasma se realizó mediante la técnica de Folch¹⁸⁵ con ligeras modificaciones. El plasma (100 μ L) se sometió a un proceso de transesterificación en presencia de 1.9 mL de cloruro de acetilo en metanol (1:20). Los metilésteres de los ácidos grasos (FAMES) del plasma resultantes, se extrajeron con hexano (750 μ L). El crudo se evaporó en corriente de nitrógeno y se reconstituyó en 150 μ L de hexano. Dos μ L del extracto de FAMES se inyectaron en un cromatógrafo de gases con detector de masas (GC-MS), empleando una columna HP-INNOWAX 30mx0.25x0.25 (Agilent, Palo Alto, California, EE. UU.). A continuación, y tras su ionización por impacto electrónico, los diferentes PUFA se detectaron mediante espectrometría de masas y se identificaron en función de su

perfil característico de fragmentación. Se integraron los iones característicos correspondientes a los picos de los ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA, fundamentalmente), así como las del resto de ácidos grasos presentes en el plasma, obteniendo sus concentraciones con respecto a las de estándares de concentración conocida preparados a tal efecto. La señal de los iones generados en el detector es proporcional a la concentración del mismo ácido graso presente en la muestra¹⁸⁶.

7.6.- Calidad de vida

Para la valoración de la calidad de vida se utilizó la versión española del cuestionario de fibrosis quística revisado (CFQ-R, del inglés *Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised*)^{187, 188}. Este cuestionario consta de 3 versiones diferentes en función de la edad: niños de 6 a 13 años (formato entrevistador para niños de 6-11 años, autoadministrado en niños de 12-13 años), adolescentes mayores de 14 años y adultos, y padres/cuidadores. Cada cuestionario consta de diferentes dominios. La versión para adultos consta de 50 preguntas estructuradas en 12 dominios que valoran aspectos generales de la calidad de vida (capacidad física, limitaciones de rol, vitalidad, percepción de la salud, estado emocional y aislamiento social) y aspectos específicos de la FQ (imagen corporal, problemas con la alimentación, carga del tratamiento, problemas de peso, síntomas respiratorios y síntomas digestivos). La versión para padres/cuidadores consta de 44 preguntas estructuradas en 11 dominios (carece de los dominios "limitaciones de rol" y "aislamiento social", y añade el dominio "colegio"). La versión para niños consta de 35 preguntas que se estructuran en 8 dominios (carece de los dominios "limitaciones de rol", "vitalidad", "percepción de la salud" y "problemas de peso"). Cada uno de los dominios puntúa de 0 a 100 en función de las respuestas obtenidas, siendo las puntuaciones más altas las que indican mejor calidad de vida. La diferencia mínima clínicamente relevante ha sido establecida para el dominio respiratorio en 4 puntos en pacientes estables y 8.5 puntos en pacientes con una exacerbación respiratoria¹⁸⁹. No existe una puntuación total del cuestionario que integre todos los dominios.

8.- Estadística

Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico Stata, versión 14.1 (StataCorp, College Station, Texas, EE. UU.) y se contó con el asesoramiento de la Unidad de Bioestadística del HURyC.

8.1.- Cálculo del tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral se estimó la potencia estadística alcanzada en diferentes supuestos de magnitud del efecto observado, medido como diferencia estandarizada de medias (DEM) para los parámetros IL-8 en suero y calprotectina en heces. La variabilidad esperada de estos parámetros se estimó de acuerdo con la literatura reciente^{190, 191}. Teniendo en cuenta esto, con un tamaño muestral de 100 pacientes (50 en cada rama) se alcanzaría una potencia estadística del 84% para encontrar una DEM de 0.6, en los supuestos habituales de un contraste de hipótesis bilateral para muestras independientes, con un nivel de significación del 5%.

8.2.- Análisis estadístico

Se realizó una primera descripción de todas las variables recogidas en la base de datos mediante el número de casos válidos y los perdidos, para identificar anomalías en la recolección de estas. Se utilizó la frecuencia absoluta y relativa para valorar las posibles inconsistencias en variables cualitativas, y la media, desviación típica, mínimo y máximo en las cuantitativas.

Se realizó una comparación de la distribución de las variables basales entre las dos ramas del estudio (DHA y placebo), para verificar el correcto funcionamiento de la aleatorización. Para las variables cuantitativas se empleó el contraste de medias (contraste de t de student) en los casos que se podía asumir normalidad (comprobada mediante el contraste de Shapiro-Wilk) y considerando varianzas iguales o no (a través de la prueba de Levene modificada¹⁹²) según fuera el caso. Si no se podía asumir la hipótesis de distribución normal en las dos ramas de tratamiento se empleó el contraste no paramétrico de la suma de rangos (U de Mann-Whitney). Independientemente del contraste estadístico utilizado, por cuestiones de coherencia, se describieron todas mediante la

mediana y el rango intercuartílico. Las variables cualitativas se describieron con su frecuencia en cada rama, y para evaluar la distribución entre ellas, se utilizó el contraste de Chi^2 o la prueba exacta de Fisher, según correspondiera de acuerdo con la menor frecuencia esperada.

Para la valoración de las variables dependientes se diseñaron unas tablas cruzadas como primer acercamiento a evaluar, a lo largo de las visitas, el efecto del tratamiento (DHA o placebo) sobre las variables respuesta o variables dependientes. En las mismas tablas se evaluó también el efecto en cada visita, entre e intra ramas de tratamiento. Se contrastó mediante la prueba de suma de rangos, en la diagonal principal, la igualdad de respuesta entre DHA y placebo, para cada una de las visitas, mientras que, en las mitades superior e inferior de las tablas, se evaluó la evolución entre todas las combinaciones de visitas, dentro de tratados con DHA (mitad superior) y no tratados (mitad inferior). Se realizó también una descripción visual mediante gráficos de cajas y bigotes, diferenciando entre tratados y no tratados, incluyendo y excluyendo los valores atípicos para facilitar su interpretación.

A continuación, para cada una de las variables dependientes se realizó un modelo estimativo del efecto de DHA por semana de tratamiento, mediante un modelo de regresión lineal de efectos mixtos, siendo el primer nivel el paciente y el segundo cada una de las medidas repetidas que se realizaron. El efecto del DHA se calculó como el cambio en el valor absoluto entre el valor de cada semana y el valor en el momento basal. Se ajustó el efecto en un modelo multivariante por el valor basal de la variable dependiente. Posteriormente, se realizaron análisis de sensibilidad, ajustando por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización: valor de la variable dependiente en el momento basal, la semana en la que se determinó la medición del valor de la variable, el número de mutaciones Phe.508del y por las variables empleadas en el algoritmo adaptativo de minimización en la fase de aleatorización de pacientes (edad \leq o >2 años, FEV₁ predicho \leq o $>75\%$, infección crónica por *P. aeruginosa*, tratamiento inhalado con DNasa y tratamiento crónico con azitromicina). Se realizó un análisis de subgrupos en función de las variables incluidas en el algoritmo adaptativo de minimización y para las variables inflamatorias se realizó, además, un análisis de sensibilidad después de una transformación logarítmica de las mismas.

Para las variables seleccionadas, se presentaron análisis de tiempo hasta el evento, mediante tasas de incidencia y el cociente de tasas entre las dos ramas de tratamiento, gráficamente mediante curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) y mediante el Hazard Ratio (HR) de los pacientes tratados frente a no tratados, obtenido a través de un modelo de regresión de Cox. Estos análisis se consideraron hasta el primer evento, es decir, sin evaluar posibles recaídas.

Todos los análisis se realizaron por intención de tratar, de acuerdo con el plan estadístico preestablecido, mediante pruebas bilaterales y considerando significativos valores de $p < 0.05$.

9.- Financiación del estudio

El proyecto es un estudio clínico independiente que ha contado con la siguiente financiación:

- a) Convocatoria del Ministerio de Sanidad, Orden SAS/2377/2010 de ayudas para la investigación clínica independiente como ensayo del Consorcio de Apoyo a la Investigación Biomédica en Red (CAIBER): código de referencia: 1392-I-036. Financiación: 100 000 euros.
- b) Beca Sira Carrasco 2011, concedida por la Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (SEGHNP). Financiación: 12 000 euros.
- c) Beca Ayuda a la Fibrosis Quística 2011, concedida por la Fundación Pablo Motos. Financiación: 18 000 euros.
- d) Beca Ayuda a la Fibrosis Quística 2011, concedida por la Fundación Sira Carrasco. Financiación: 20 000 euros.
- e) Beca Ayuda a la Fibrosis Quística 2014, concedida por la Fundación Sira Carrasco. Financiación 17 282 euros.

RESULTADOS

Al tratarse de un estudio clínico se han seguido las recomendaciones de la guía CONSORT (*CONsolidated Standards Of Reporting Trials*) para la comunicación de sus resultados¹⁹³.

1.- Población del estudio

Entre septiembre de 2011 y marzo de 2013 fueron reclutados un total de 96 pacientes para participar en el estudio clínico: 52 en el HURyC, 15 en el Hospital La Fe, 13 en el Hospital de La Princesa, 11 en el Hospital Central de Asturias y 5 en el Hospital 12 de Octubre. Los pacientes se aleatorizaron a recibir DHA (n=48) o placebo (n=48) (**Figura 3**). Las características basales de los pacientes incluidos fueron similares en ambos grupos, con excepción del número de alelos con la mutación Phe.508del, que mostraba una distribución no balanceada entre las dos ramas del estudio (**Tablas 8 y 9**). La adherencia al tratamiento, medida por las botellas de producto devueltas por cada paciente, fue muy alta y similar en ambos grupos (DHA 95.3 ± 50.1 ; placebo 97.2 ± 52.9 ; $p=0.861$).

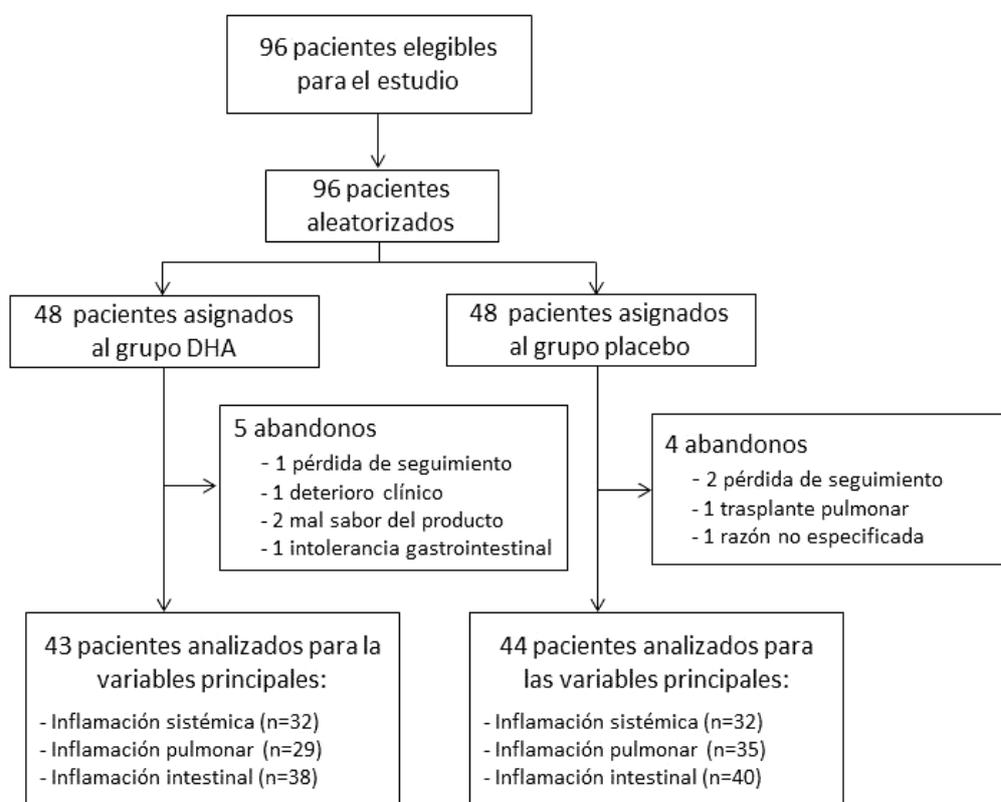


Figura 3. Diagrama de flujo de la población de estudio. Aleatorización y seguimiento.

Tabla 8. Características basales de la población de estudio. Variables cualitativas

Variable	Categoría	DHA		Placebo		p valor
		N	%	N	%	
Sexo	Mujer	21	47.7%	23	52.3%	0.682 ^a
	Hombre	27	51.9%	25	48.1%	
Alelos con la mutación Phe.508del	Ninguna	8	40%	12	60%	0.027^a
	Heterocigoto	27	65.9%	14	34.2%	
	Homocigoto	13	37.1%	22	62.9%	
Insuficiencia pancreática	No	8	42.1%	11	57.9%	0.442 ^a
	Sí	40	52%	37	48.1%	
EHRFQ	No	39	47%	44	53%	0.136 ^a
	Sí	9	69.2%	4	30.8%	
Alteración del metabolismo de los hidratos de carbono	Normal	38	50%	38	50%	0.339 ^b
	IHC	6	40%	9	60%	
	DRFQ	4	80%	1	20%	
Asma	No	34	47.2%	38	52.8%	0.346 ^a
	Sí	14	58.3	10	41.7%	
Hemoptisis amenazante	No	48	51.6%	45	48.4%	0.242 ^b
	Sí	0	0%	3	100%	
ABPA	No	48	51.6%	45	48.4%	0.242 ^b
	Sí	0	0%	3	100%	
Infección crónica por <i>S. aureus</i>	No	17	43.6%	22	56.4%	0.299 ^a
	Sí	31	54.4%	26	45.6%	
Infección crónica por <i>P. aeruginosa</i>	No	38	51.3%	36	48.7%	0.627 ^a
	Sí	10	45.5%	12	54.6%	
Infección crónica <i>A. xylosoxidans</i>	No	48	50.5%	47	49.5%	1.000 ^b
	Sí	0	0%	1	100%	
Infección crónica BCC	No	48	51.1%	46	48.9%	0.495 ^b
	Sí	0	0%	2	100%	
Infección crónica <i>S. maltophilia</i>	No	46	50%	46	50%	1.000 ^b
	Sí	2	50%	2	50%	

^aTest de Chi² / ^bPrueba exacta de Fisher.

EHRFQ: enfermedad hepática relacionada con la fibrosis quística; IHC: intolerancia a los hidratos de carbono; DRFQ: diabetes relacionada con fibrosis quística; ABPA: aspergilosis broncopulmonar alérgica; *A. xylosoxidans*: *Achromobacter xylosoxidans*; *S. maltophilia*: *Stenotrophomonas maltophilia*; BCC: complejo *Burkholderia cepacia*.

Tabla 9. Características basales de la población de estudio. Variables cuantitativas

Variable	DHA		Placebo		p valor
	N	Mediana (p25; p75)	N	Mediana (p25; p75)	
Edad (años)	48	13.57 (6.02; 22.46)	48	10.89 (3.28; 20.47)	0.603 ^c
Peso (z-score)	48	-0.84 (-1.34; -0.13)	48	-0.9 (-1.17; -0.28)	0.404 ^c
Talla (z-score)	48	-0.62 (-1.28; -0.01)	48	-0.75 (-1.44; -0.09)	0.554 ^a
IMC (z-score)	48	-0.68 (-1.09; -0.01)	48	-0.38 (-0.85; 0.16)	0.214 ^c
Enzimas (UL/kg/día)	41	3873 (2143; 4870)	36	4036 (2900.5; 5775)	0.330 ^a
FEV ₁ (z-score)	36	-2.19 (-3.62; -0.91)	34	-2.44 (-3.34; -1.23)	0.514 ^c
FVC (z-score)	36	-1.63 (-2.71; -0.55)	34	-1.43 (-2.41; -0.98)	0.500 ^a
FEV ₁ /FVC	36	76.42 (65.74; 87.74)	34	79.01 (66.67; 85.04)	0.969 ^a
PCR en suero (mg/L)	45	1.2 (0.4; 4.64)	42	0.95 (0.3; 2.5)	0.726 ^c
IL-1 β en suero (pg/mL)	41	0.00 (0.00; 0.00)	43	0.00 (0.00; 0.00)	0.628 ^c
IL-6 en suero (pg/mL)	41	0.00 (0.00; 0.00)	43	0.00 (0.00; 0.00)	0.851 ^c
IL-8 en suero (pg/mL)	41	0.00 (0.00; 1.89)	43	0.00 (0.00; 0.00)	0.603 ^c
IL-1 β en SR (pg/mL)	47	242.93 (49.55; 1198.09)	45	110.33 (35.31; 582.95)	0.752 ^c
IL-6 en SR (pg/mL)	47	0.00 (0.00; 4.32)	45	0.00 (0.00; 3.7)	0.420 ^c
IL-8 en SR (pg/mL)	47	5025 (1349; 10 515)	45	3351 (430; 9582)	0.649 ^c
EN en SR (ng/mL)	35	90.4 (18.64; 238.13)	30	46.13 (9.79; 162.17)	0.783 ^c
Lactato en SR (mmol/L)	25	0.12 (0.03; 0.6)	24	0.21 (0.03; 0.64)	0.460 ^c
Calprotectina en SR (μ g/mL)	25	194.52 (118.04; 340.49)	24	246.77 (186.19; 503.75)	0.148 ^c
Calprotectina en heces (μ h/g H)	45	105.77 (50; 267.52)	45	111 (50.65; 186.83)	0.634 ^c
EPA (μ g/mL)	48	7.28 (5.12; 10.79)	47	7.83 (5.09; 11.07)	0.411 ^c
DHA (μ g/mL)	48	38.53 (29.8; 45.85)	47	33.94 (21.26; 49.28)	0.733 ^c
ALA (μ g/mL)	48	4.19 (3.09; 7.02)	47	4.44 (3.45; 6.84)	0.411 ^c
AA (μ g/mL)	48	142.95 (123.71; 180.11)	47	147.38 (115.52; 167.09)	0.694 ^c
LA (μ g/mL)	48	515.89 (457.64; 558.43)	47	499.83 (445.07; 546.94)	0.508 ^a
GLA (μ g/mL)	48	8.7 (6.36; 11.79)	47	9.84 (7.68; 12.56)	0.248 ^c

^aPrueba de la T (igualdad de varianzas); ^bPrueba de la T (varianzas no iguales); ^cU Mann-Whitney.

IMC: índice de masa corporal; UL: unidades de lipasa; FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada; PCR: proteína C reactiva; IL: interleucina; SR: secreción respiratoria; EN: elastasa de neutrófilo; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; ALA: ácido alfa-linolénico; AA: ácido araquidónico; LA: ácido linoleico; GLA: ácido gamma-linolénico.

2.- Resultados de las variables principales

2.1.- Inflamación respiratoria: IL-8 en secreciones respiratorias

No se encontraron diferencias en las concentraciones de IL-8 en SR entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control al final del estudio (DHA $8913.87 \pm 14\ 517.52$ pg/mL; placebo 5177.85 ± 5338.37 pg/mL; $p=0.384$). El número de pacientes analizados al final del estudio fue 64 (DHA 29, placebo 35). La **Tabla 10** muestra la comparación en cada una de las visitas, entre e intra ramas de tratamiento.

Tabla 10. Comparación de los valores de IL-8 en secreciones respiratorias entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control a lo largo del estudio						
DHA						
Placebo	Basal (Placebo=DHA) $p=0.444$	Δ DHA (Basal-V1) $p=0.872$	Δ DHA (Basal-V2) $p=0.995$	Δ DHA (Basal-V3) $p=0.746$	Δ DHA (Basal-V4) $p=0.581$	Basal
	Δ Placebo (Basal-V1) $p=0.302$	V1 (Placebo=DHA) $p=0.381$	Δ DHA (V1-V2) $p=0.765$	Δ DHA (V1-V3) $p=0.752$	Δ DHA (V1-V4) $p=0.019$	V1
	Δ Placebo (Basal-V2) $p=0.713$	Δ Placebo (V1-V2) $p=0.694$	V2 (Placebo=DHA) $p=0.476$	Δ DHA=1 (V2-V3) $p=0.504$	Δ DHA=1 (V2-V4) $p=0.210$	V2
	Δ Placebo (Basal-V3) $p=0.342$	Δ Placebo (V1-V3) $p=0.987$	Δ Placebo (V2-V3) $p=0.134$	V3 (Placebo=DHA) $p=0.697$	Δ DHA=1 (V3-V4) $p=0.820$	V3
	Δ Placebo (Basal-V4) $p=0.242$	Δ Placebo (V1-V4) $p=0.369$	Δ Placebo (V2-V4) $p=0.062$	Δ Placebo (V3-V4) $p=0.893$	V4 (Placebo=DHA) $p=0.384$	V4
	Basal	V1	V2	V3	V4	
En la diagonal principal (gris oscuro) se muestra el contraste de hipótesis de igualdad de respuesta entre DHA y placebo (prueba de suma de rangos), para cada una de las visitas (V). Las mitades superior e inferior muestran la evolución entre todas las combinaciones de visitas, dentro del grupo DHA y placebo, respectivamente. IL: interleucina.						

El modelo de regresión lineal de efectos mixtos tampoco mostró diferencias en el efecto a lo largo del estudio del DHA o del placebo sobre la IL-8 en SR, ni ajustado por el valor basal (cambio medio semanal placebo -140.63 , $IC_{95\%}$ -526.31 ; 245.04 , cambio medio semanal DHA 4.86 , $IC_{95\%}$ -416.25 ; 425.97 , $p=0.618$) ni tras ajustar por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización (cambio medio semanal placebo -115.77 , $IC_{95\%}$ -500.78 ; 269.25 , cambio

medio semanal DHA -28.26 , $IC_{95\%}$ -449.61 ; 393.09 , $p=0.764$). La **Figura 4** muestra la representación gráfica de los valores de IL-8 en SR en cada una de las visitas.

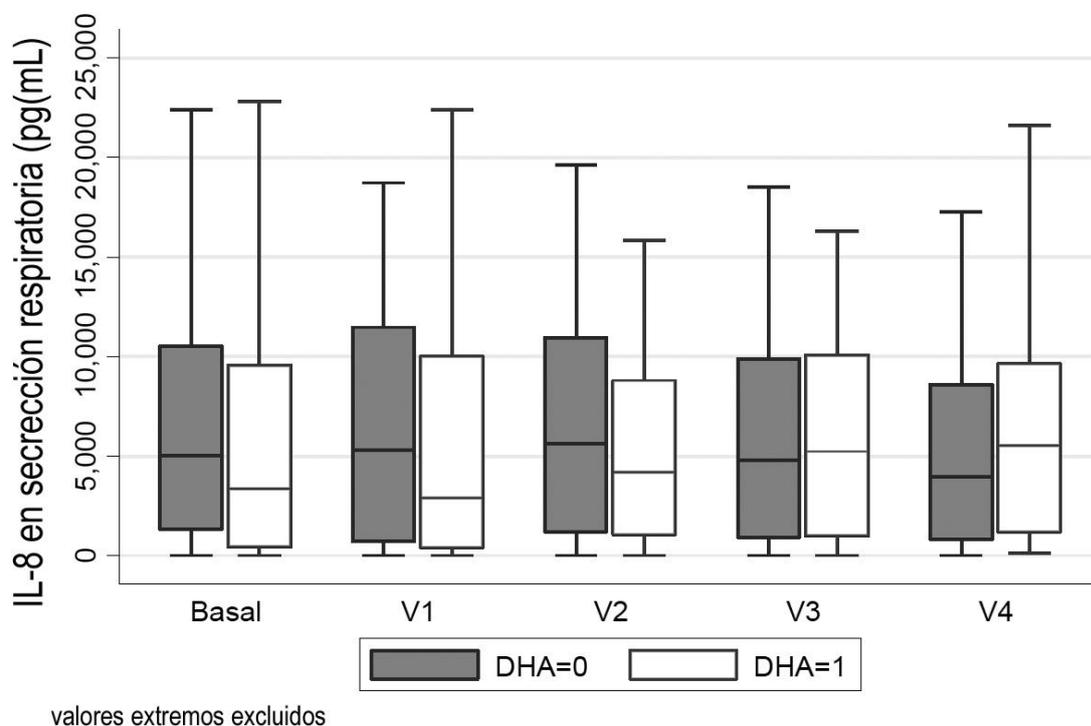


Figura 4. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de IL-8 en secreciones respiratorias en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0). Se han excluido los valores atípicos para facilitar su interpretación.

2.2.- Inflamación sistémica: IL-8 en suero

No se encontraron diferencias en las concentraciones de IL-8 en suero entre el grupo de intervención y el grupo control al final del estudio (DHA 921.28 ± 3631.14 pg/mL; placebo 2349.05 ± 8115.88 pg/mL; $p=0.909$). El número de pacientes analizados al final del estudio fue 64 (DHA 32, placebo 32). La **Tabla 11** muestra la comparación en cada una de las visitas, entre e intra ramas de tratamiento.

El modelo de regresión lineal de efectos mixtos tampoco mostró diferencias en el efecto a lo largo del estudio del DHA o del placebo sobre la IL-8 en suero, ni ajustado por el valor basal (cambio medio semanal placebo 75.72 , $IC_{95\%}$ -21.75 ; 173.20 , cambio medio semanal DHA 19.11 , $IC_{95\%}$ -70.40 ; 108.62 , $p=0.402$) ni tras ajustar por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el

proceso de aleatorización (cambio medio semanal placebo 68.43, IC_{95%} -28.86; 165.71, cambio medio semanal DHA 16.05, IC_{95%} -72.91; 105.02, p=0.435). La **Figura 5** muestra la representación gráfica de los valores de IL-8 en suero en cada una de las visitas en las que se evaluó. Puede apreciarse la gran dispersión de valores que se obtuvieron, muy por encima de lo esperado.

Tabla 11. Comparación de los valores de IL-8 en suero entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control a lo largo del estudio				
DHA				
Placebo	Basal (Placebo=DHA) <i>p=0.600</i>	Δ DHA (Basal-V3) <i>p=0.846</i>	Δ DHA (Basal-V4) <i>p=0.452</i>	Basal
	Δ Placebo (Basal-V3) <i>p=0.692</i>	V3 (Placebo=DHA) <i>p=0.792</i>	Δ DHA (V3-V4) <i>p=0.397</i>	V3
	Δ Placebo (Basal-V4) <i>p=0.049</i>	Δ Placebo (V3-V4) <i>p=0.295</i>	V4 (Placebo=DHA) <i>p=0.909</i>	V4
	Basal	V3	V4	

En la diagonal principal (gris oscuro) se muestra el contraste de hipótesis de igualdad de respuesta entre DHA y placebo (prueba de suma de rangos), para cada una de las visitas (V). Las mitades superior e inferior muestran la evolución entre todas las combinaciones de visitas, dentro del grupo DHA y placebo, respectivamente.
IL: interleucina.

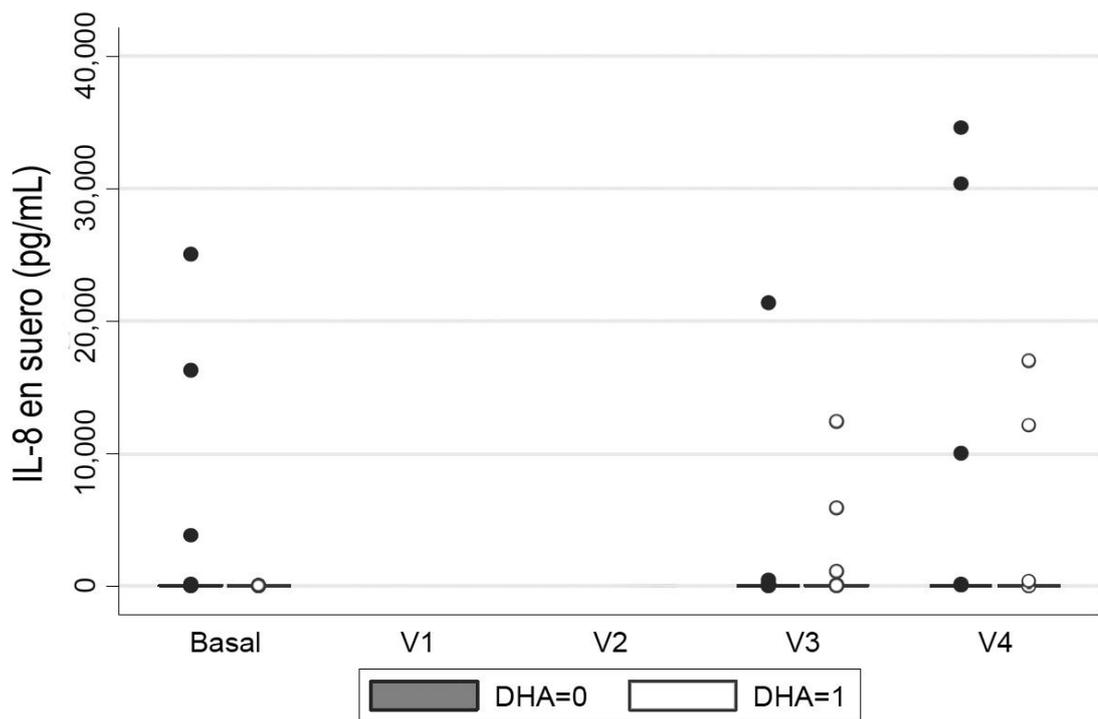


Figura 5. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de IL-8 en suero en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

2.3.- Inflamación intestinal: calprotectina en heces

No se encontraron diferencias en las concentraciones de calprotectina en heces entre el grupo de intervención y el grupo control al final del estudio (DHA $144.76 \pm 158.36 \mu\text{g/g}$ heces; placebo $144.56 \pm 133.05 \mu\text{g/g}$ heces; $p=0.948$). El número de pacientes analizados al final del estudio fue 78 (DHA 38, placebo 40). La **Tabla 12** muestra la comparación en cada una de las visitas, entre e intra ramas de tratamiento.

Tabla 12. Comparación de los valores de calprotectina en heces entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control a lo largo del estudio

		DHA				
Placebo	Basal (Placebo=DHA) <i>p=0.493</i>	Δ DHA (Basal-V1) <i>p=0.895</i>	Δ DHA (Basal-V2) <i>p=0.845</i>	Δ DHA (Basal-V3) <i>p=0.925</i>	Δ DHA (Basal-V4) <i>p=0.821</i>	Basal
	Δ Placebo (Basal-V1) <i>p=0.851</i>	V1 (Placebo=DHA) <i>p=0.128</i>	Δ DHA (V1-V2) <i>p=0.157</i>	Δ DHA (V1-V3) <i>p=0.778</i>	Δ DHA (V1-V4) <i>p=0.860</i>	V1
	Δ Placebo (Basal-V2) <i>p=0.242</i>	Δ Placebo (V1-V2) <i>p=0.271</i>	V2 (Placebo=DHA) <i>p=0.501</i>	Δ DHA=1 (V2-V3) <i>p=0.561</i>	Δ DHA=1 (V2-V4) <i>p=0.388</i>	V2
	Δ Placebo (Basal-V3) <i>p=0.971</i>	Δ Placebo (V1-V3) <i>p=0.912</i>	Δ Placebo (V2-V3) <i>p=0.649</i>	V3 (Placebo=DHA) <i>p=0.384</i>	Δ DHA=1 (V3-V4) <i>p=0.777</i>	V3
	Δ Placebo (Basal-V4) <i>p=0.934</i>	Δ Placebo (V1-V4) <i>p=0.457</i>	Δ Placebo (V2-V4) <i>p=0.804</i>	Δ Placebo (V3-V4) <i>p=0.739</i>	V4 (Placebo=DHA) <i>p=0.948</i>	V4
	Basal	V1	V2	V3	V4	

En la diagonal principal (gris oscuro) se muestra el contraste de hipótesis de igualdad de respuesta entre DHA y placebo (prueba de suma de rangos), para cada una de las visitas (V). Las mitades superior e inferior muestran la evolución entre todas las combinaciones de visitas, dentro del grupo DHA y placebo, respectivamente.

El modelo de regresión lineal de efectos mixtos tampoco mostró diferencias en el efecto a lo largo del estudio del DHA o del placebo sobre la calprotectina en heces, ni ajustado por el valor basal (cambio medio semanal placebo -0.27, IC_{95%} -2.59; 2.05, cambio medio semanal DHA -1.38, IC_{95%} -3.68; 0.92, *p*=0.506) ni tras ajustar por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización (cambio medio semanal placebo -0.20, IC_{95%} -2.52; 2.12, cambio medio semanal DHA -1.37, IC_{95%} -3.66; 0.93, *p*=0.482). La **Figura 6** muestra la representación gráfica de los valores de calprotectina en heces en cada una de las visitas en las que se evaluó.

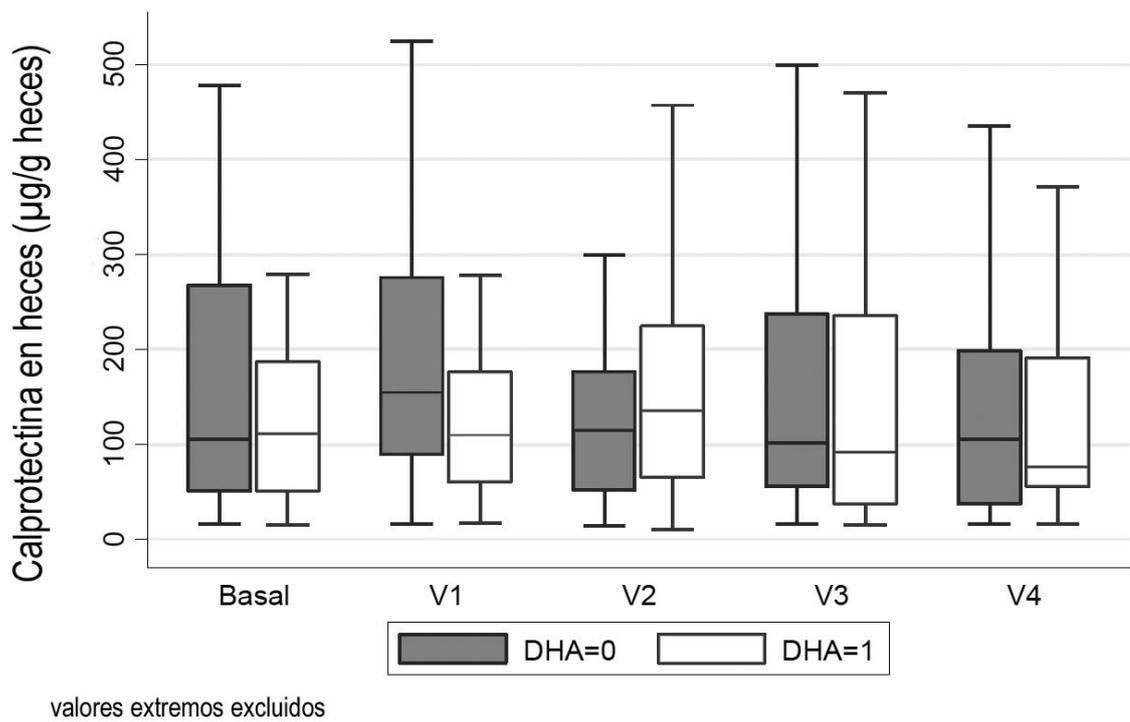


Figura 6. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de calprotectina en heces en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0). Se han excluido los valores atípicos para facilitar su interpretación.

3.- Resultados de las variables secundarias

3.1.- Otros marcadores de inflamación en secreción respiratoria

No se encontraron diferencias en ninguno de los marcadores inflamatorios secundarios estudiados en SR (IL-1 β , IL-6, EN, lactato y calprotectina) entre el grupo de intervención y el grupo control al final del estudio (**Tabla 13**). Los valores de IL-10 y TNF- α en SR obtenidos estaban por debajo del rango de detección de la técnica, por lo que no se incluyeron en el análisis estadístico.

Tabla 13. Comparación de los valores de marcadores inflamatorios secundarios en secreciones respiratorias entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control al final del estudio			
	DHA	Placebo	p valor*
IL-1 β en SR	649.40 \pm 834.56 (n=29)	815.34 \pm 1305.04 (n=35)	0.741
IL-6 en SR	3.80 \pm 9.26 (n=29)	48.68 \pm 142.03 (n=35)	0.261
EN en SR	192.06 \pm 168.88 (n=27)	177.34 \pm 207.51 (n=31)	0.370
Lactato en SR	0.73 \pm 0.78 (n=17)	0.81 \pm 1.25 (n=18)	0.668
Calprotectina en SR	345.86 \pm 214.12 (n=17)	365.93 \pm 195.18 (n=17)	0.547

DHA: ácido docosahexaenoico; IL: interleucina; EN: elastasa de neutrófilo; SR: secreción respiratoria.
*Prueba de suma de rangos.

Las **Figuras 7, 8, 9, 10 y 11** muestran la representación gráfica de los valores de marcadores inflamatorios secundarios en SR en cada una de las visitas en las que se evaluó.

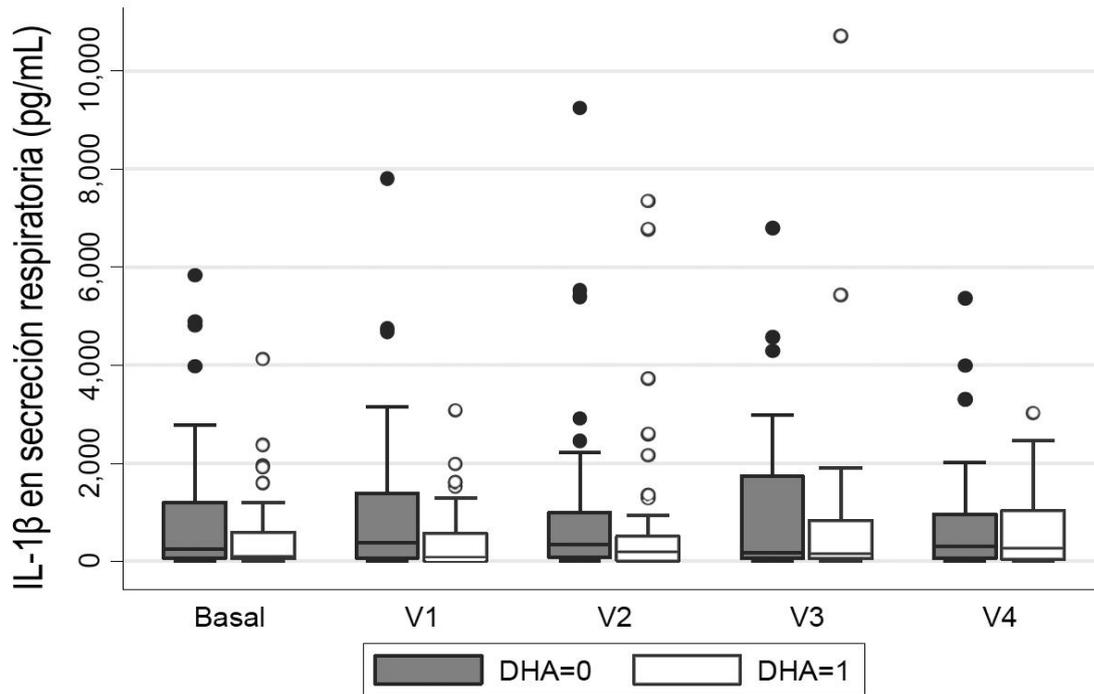


Figura 7. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de IL-1 β en secreción respiratoria en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

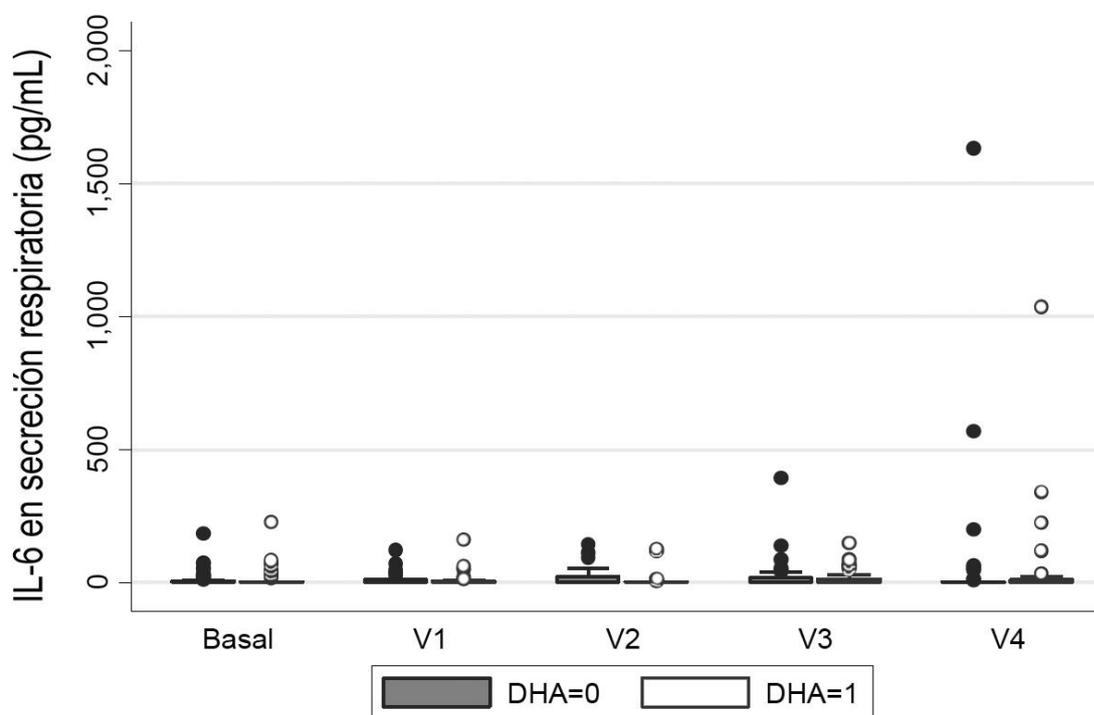


Figura 8. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de IL-6 en secreción respiratoria en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

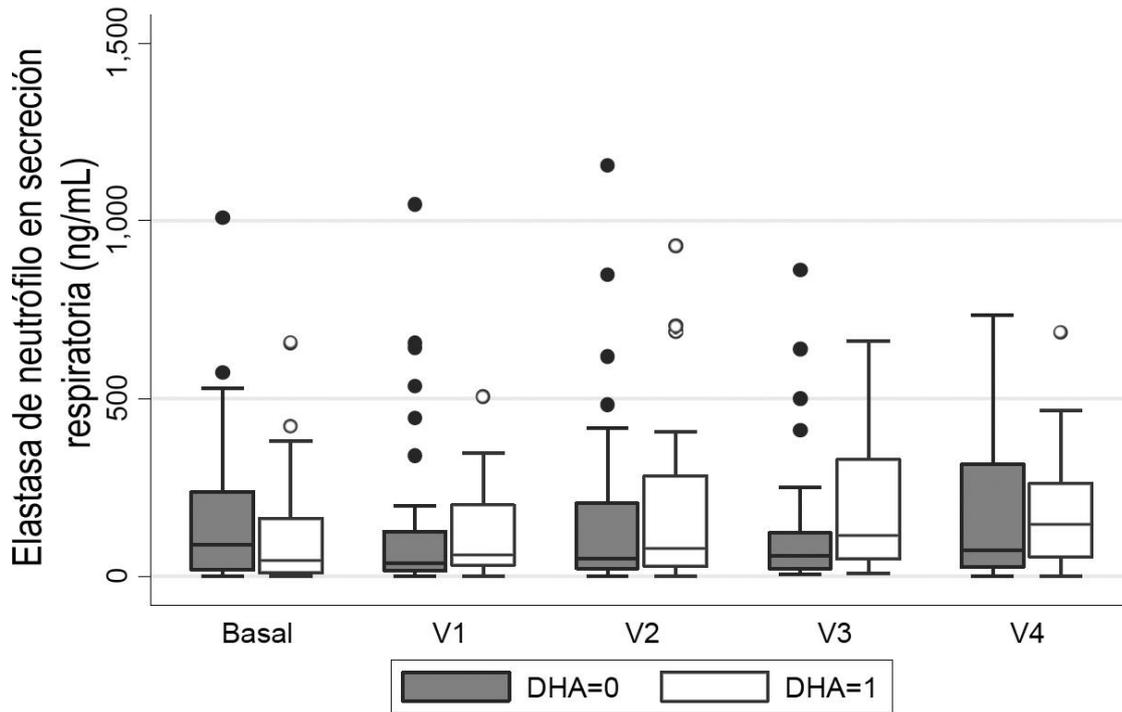


Figura 9. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de elastasa de neutrófilo en secreción respiratoria en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

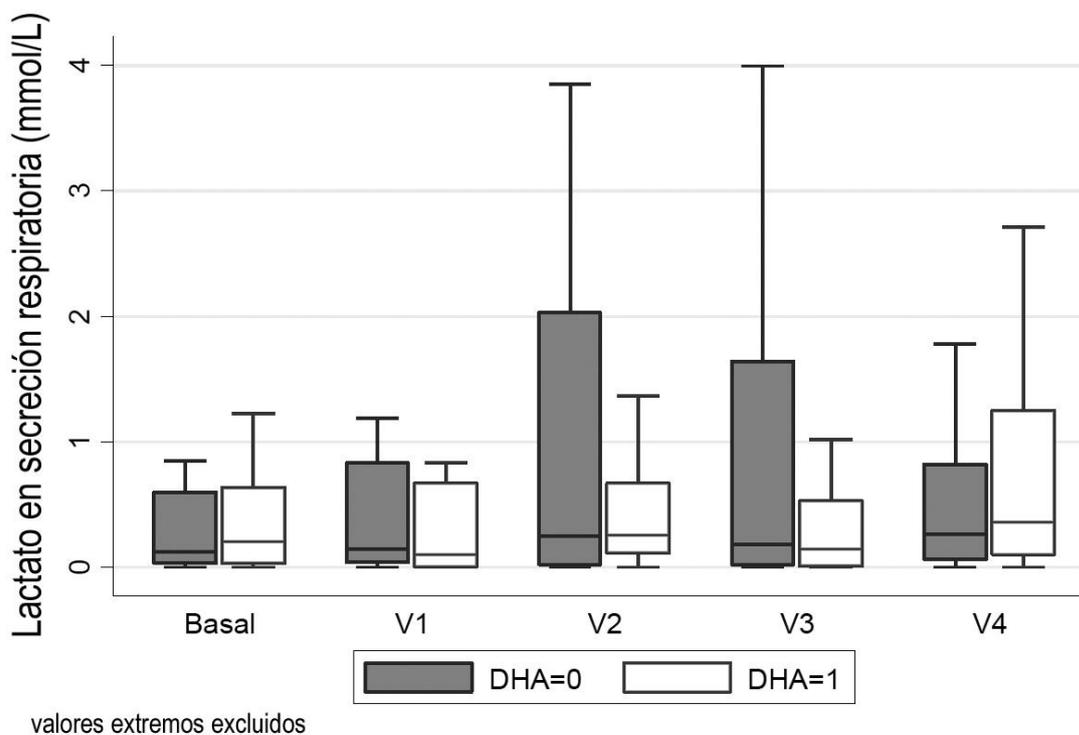


Figura 10. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de lactato en secreción respiratoria en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0). Se han excluido los valores atípicos para facilitar su interpretación.

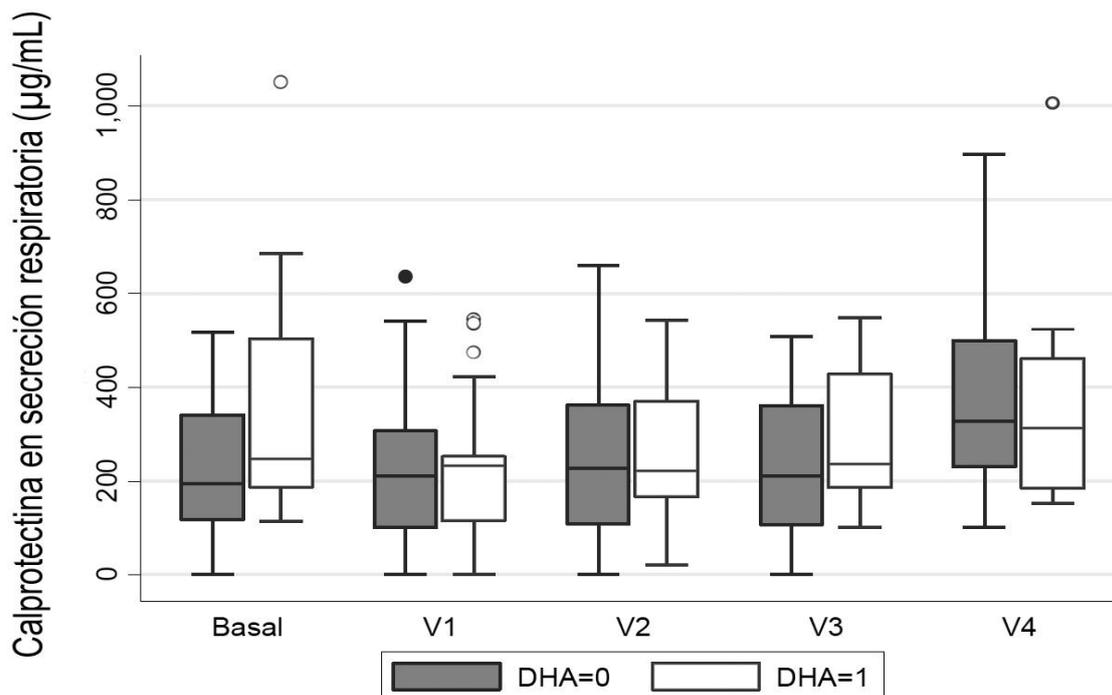


Figura 11. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de calprotectina en secreción respiratoria en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

El modelo de regresión lineal de efectos mixtos tampoco mostró diferencias en el efecto a lo largo del estudio del DHA o del placebo sobre los marcadores inflamatorios secundarios en SR estudiados, ni ajustado por el valor basal (Tabla 14) ni tras ajustar por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización (Tabla 15).

Tabla 14. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para las variables inflamatorias secundarias en secreción respiratoria (ajustado por el valor basal)

Variable	Cambio medio semanal (IC _{95%})		p valor
	DHA	Placebo	
IL-1 β en SR (pg/mL)	-1.86 (-17.89; 14.17)	-5.03 (-19.69; 9.63)	0.775
IL-6 en SR (pg/mL)	1.51 (-0.30; 3.33)	1.61 (-0.06; 3.27)	0.939
EN en SR (ng/mL)	0.21 (-2.08; 2.51)	0.38 (-1.73; 2.49)	0.916
Lactato en SR (mmol/L)	0.00 (-0.36; 0.37)	-0.29 (-0.66; 0.08)	0.268
Calprotectina en SR (µg/mL)	1.52 (-0.75; 3.80)	3.57 (1.33; 5.80)	0.210

DHA: ácido docosahexaenoico; IL: interleucina; SR: secreción respiratoria; EN: elastasa de neutrófilo.

Tabla 15. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para las variables inflamatorias secundarias en secreciones respiratorias (ajustado por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización)

Variable	Cambio medio semanal (IC _{95%})		p valor
	DHA	Placebo	
IL-1 β en SR (pg/mL)	-2.65 (-18.80; 13.50)	-5.63 (-20.37; 9.11)	0.789
IL-6 en SR (pg/mL)	1.58 (-0.24; 3.40)	1.62 (-0.05; 3.29)	0.977
EN en SR (ng/mL)	0.20 (-2.09; 2.49)	0.37 (-1.73; 2.48)	0.912
Lactato en SR (mmol/L)	0.07 (-0.29; 0.43)	-0.32 (-0.68; 0.03)	0.131
Calprotectina en SR (μ g/mL)	3.64 (1.40; 5.88)	1.57 (-0.71; 3.85)	0.207

DHA: ácido docosahexaenoico; IL: interleucina; SR: secreción respiratoria; EN: elastasa de neutrófilo.

3.2.- Otros marcadores de inflamación en suero

No se encontraron diferencias en ninguno de los marcadores inflamatorios secundarios estudiados en suero (IL-1 β , IL-6, porcentaje de neutrófilos y PCR) entre el grupo de intervención y el grupo control al final del estudio (**Tabla 16**). Como ya se ha comentado, los valores de IL-10 y TNF- α en suero obtenidos estaban por debajo del rango de detección de la técnica, por lo que no se incluyeron en el análisis estadístico.

Tabla 16. Comparación de los valores de marcadores inflamatorios secundarios en suero entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control al final del estudio

	DHA	Placebo	p valor*
IL1 β en suero (pg/mL)	1.03 \pm 5.85 (n=32)	5.59 \pm 31.64 (n=32)	0.982
IL6 en suero (pg/mL)	2.30 \pm 9.03 (n=32)	12.85 \pm 40.46 (n=32)	0.339
Neutrófilos sangre (%)	50.21 \pm 14.51 (n=43)	51.98 \pm 16.00 (n=43)	0.460
Proteína C reactiva (mg/L)	4.66 \pm 7.13 (n=41)	7.30 \pm 17.11 (n=44)	0.378

DHA: ácido docosahexaenoico; IL: interleucina.
*Prueba de suma de rangos.

Las Figuras 12, 13, 14 y 15 muestran la representación gráfica de los valores de marcadores inflamatorios secundarios en suero en cada una de las visitas en las que se evaluó.

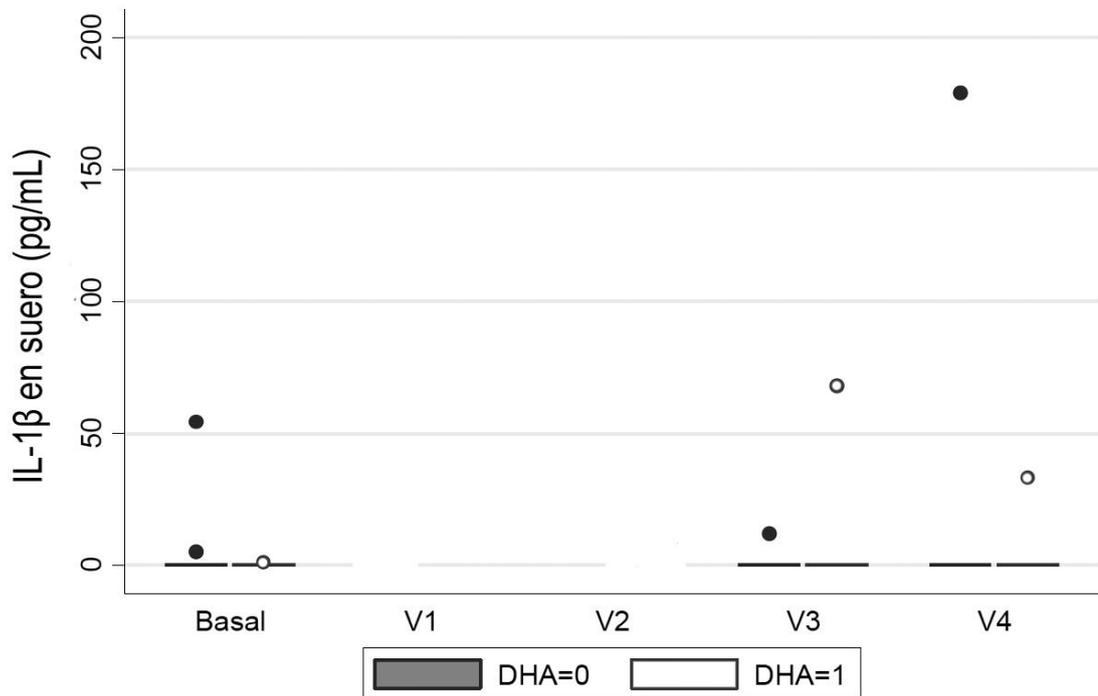


Figura 12. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de IL-1β en suero en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

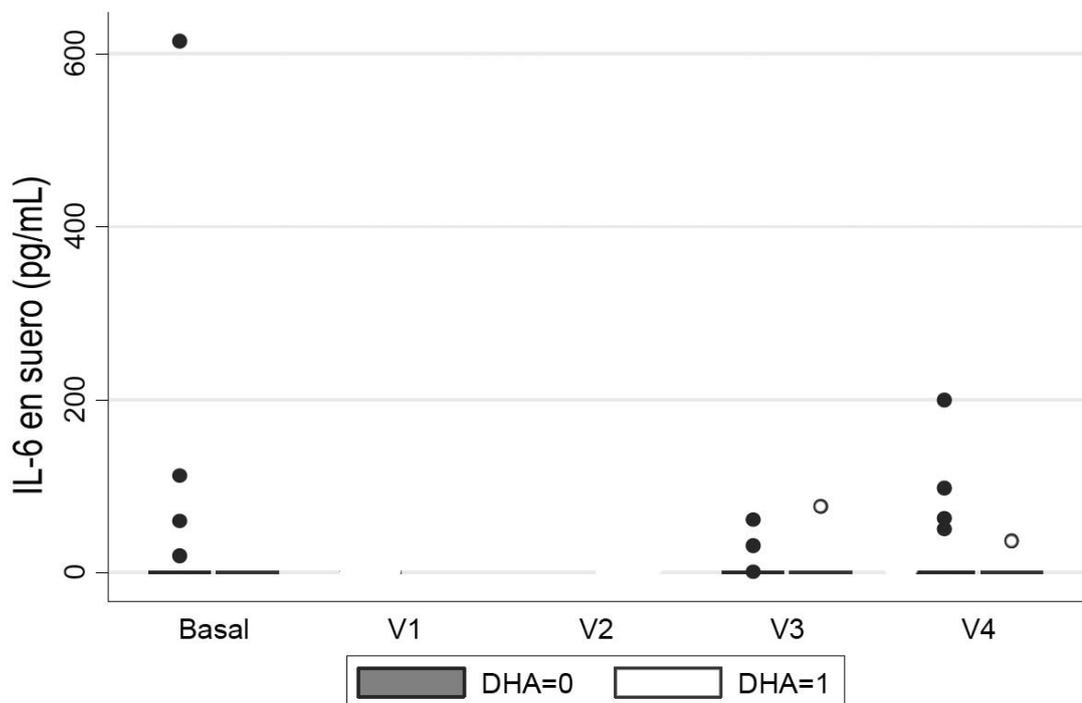


Figura 13. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de IL-6 en suero en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

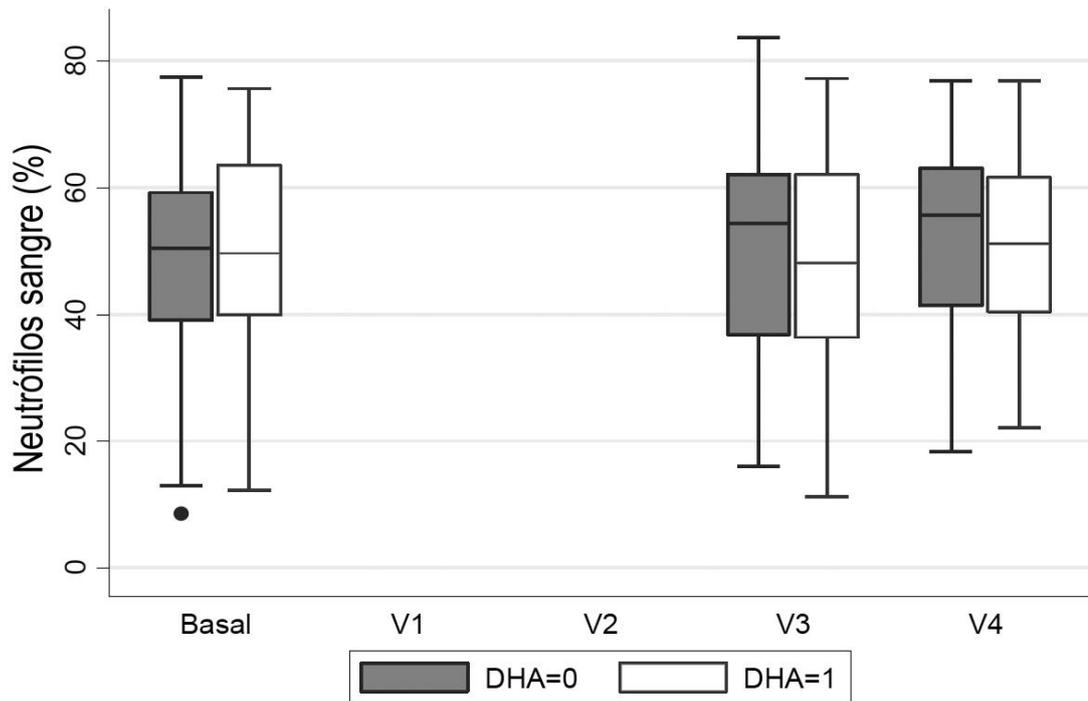
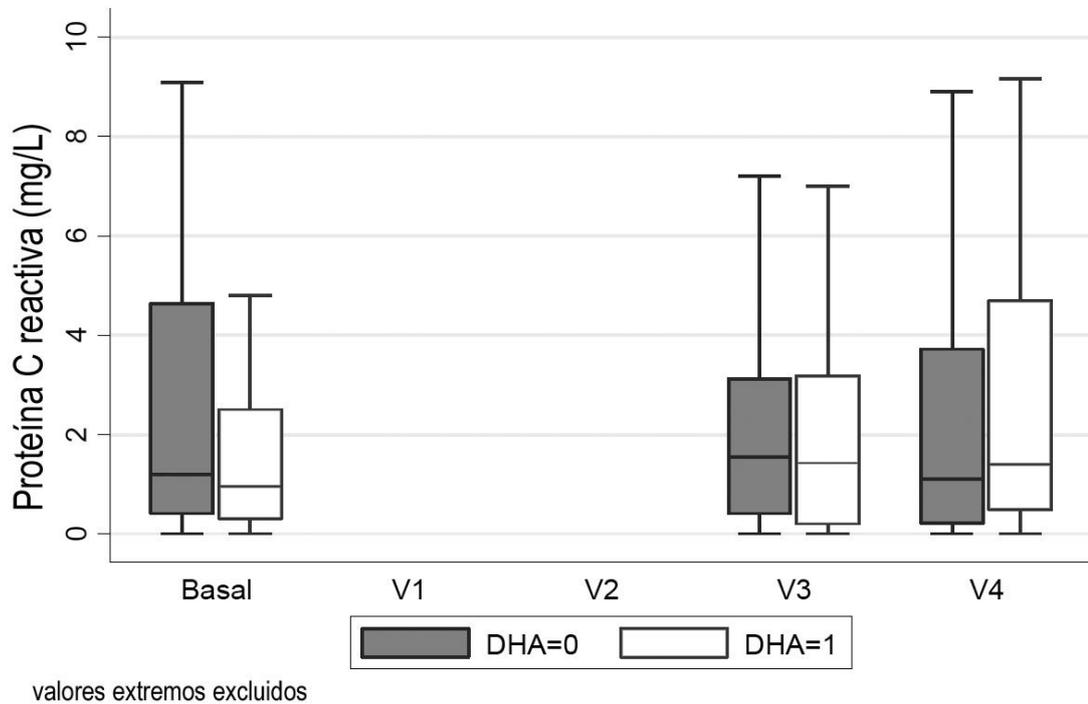


Figura 14. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de neutrófilos (%) en sangre en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).



valores extremos excluidos

Figura 15. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de proteína C reactiva en suero en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0). Se han excluido los valores atípicos para facilitar su interpretación.

El modelo de regresión lineal de efectos mixtos tampoco mostró diferencias en el efecto a lo largo del estudio del DHA o del placebo sobre los marcadores inflamatorios secundarios en suero estudiados, ni ajustado por el valor basal (**Tabla 17**) ni tras ajustar por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización (**Tabla 18**).

Tabla 17. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para las variables inflamatorias secundarias en suero (ajustado por el valor basal)			
Variable	Cambio medio semanal (IC _{95%})		p valor
	DHA	Placebo	
IL-1 β en suero (pg/mL)	-0.04 (-0.34; 0.27)	0.21 (-0.12; 0.54)	0.290
IL-6 en suero (pg/mL)	0.03 (-0.37; 0.43)	0.49 (0.06; 0.92)	0.125
Neutrófilos en sangre (%)	0.05 (-0.11; 0.20)	0.07 (-0.08; 0.23)	0.819
Proteína C reactiva (mg/L)	0.07 (-0.04; 0.18)	0.15 (0.05; 0.25)	0.279

DHA: ácido docosahexaenoico; IL: interleucina.

Tabla 18. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para las variables inflamatorias secundarias en suero (ajustado por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización)			
Variable	Cambio medio semanal (IC _{95%})		p valor
	DHA	Placebo	
IL-1 β en suero (pg/mL)	-0.03 (-0.33; 0.28)	0.21 (-0.13; 0.54)	0.309
IL-6 en suero (pg/mL)	0.02 (-0.38; 0.42)	0.48 (0.05; 0.92)	0.126
Neutrófilos en sangre (%)	0.08 (-0.07; 0.24)	0.05 (-0.11; 0.20)	0.736
Proteína C reactiva (mg/L)	0.06 (-0.05; 0.17)	0.15 (0.05; 0.25)	0.266

DHA: ácido docosahexaenoico; IL: interleucina.

3.3.- Variables clínicas relacionadas con la afectación respiratoria en la fibrosis quística

En relación con la **función pulmonar**, no se encontraron diferencias en el FEV₁ expresado como *z-score* entre el grupo de intervención y el grupo control al final del estudio (DHA -1.99 \pm 1.82; placebo -1.87 \pm 1.64; p=0.298)

La **Figura 16** muestra la representación gráfica de los valores de FEV₁ en cada una de las visitas en las que se evaluó.

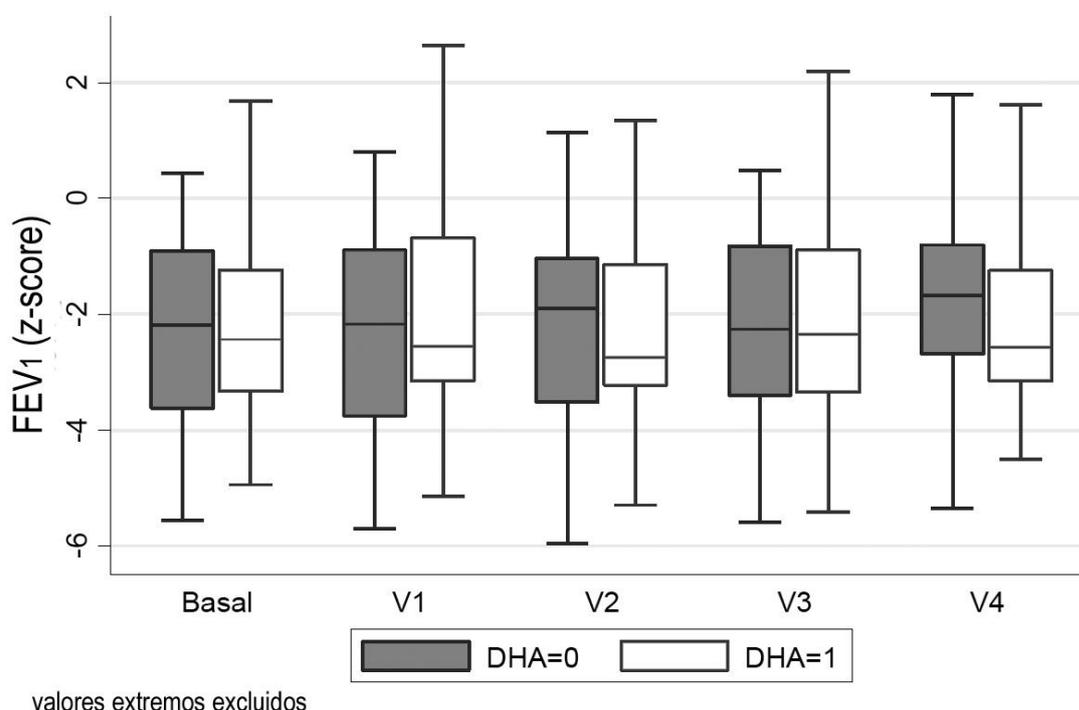


Figura 16. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores del flujo espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁) en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0). Se han excluido los valores atípicos para facilitar su interpretación.

El modelo de regresión lineal de efectos mixtos tampoco mostró diferencias en el efecto a lo largo del estudio del DHA o del placebo sobre el FEV₁ expresado como *z-score*, ni ajustado por el valor basal (cambio medio semanal placebo 0.00 IC_{95%} -0.01; 0.01, cambio medio semanal DHA 0.00 IC_{95%} -0.01; 0.01, $p=0.540$) ni tras ajustar por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización (cambio medio semanal placebo 0.00 IC_{95%} -0.01; 0.01, cambio medio semanal DHA 0.00 IC_{95%} -0.01; 0.01, $p=0.519$).

No se encontraron diferencias en la **tasa de EP** entre los grupos de estudio (tasa de incidencia DHA 1.9/paciente-año, placebo 1.9/paciente año; cociente de tasas 1.03, IC_{95%} 0.75; 1.43, $p=0.845$) ni en la **tasa de EP graves** que requirieron tratamiento intravenoso (tasa de incidencia DHA 0.14/paciente-año, placebo 0.32/paciente-año; cociente de tasas 2.2, IC_{95%} 0.8; 7.09, $p=0.096$). El

tiempo hasta la primera EP (HR 1.28, IC_{95%} 0.80; 2.04, p=0.301) y el **tiempo hasta la primera EP grave** (HR 0.52, IC_{95%} 0.19; 1.42, p=0.203) fueron similares en ambas ramas del estudio. Las **Figuras 17 y 18** muestran el tiempo libre de EP y EP graves, respectivamente, en los dos grupos de estudio.

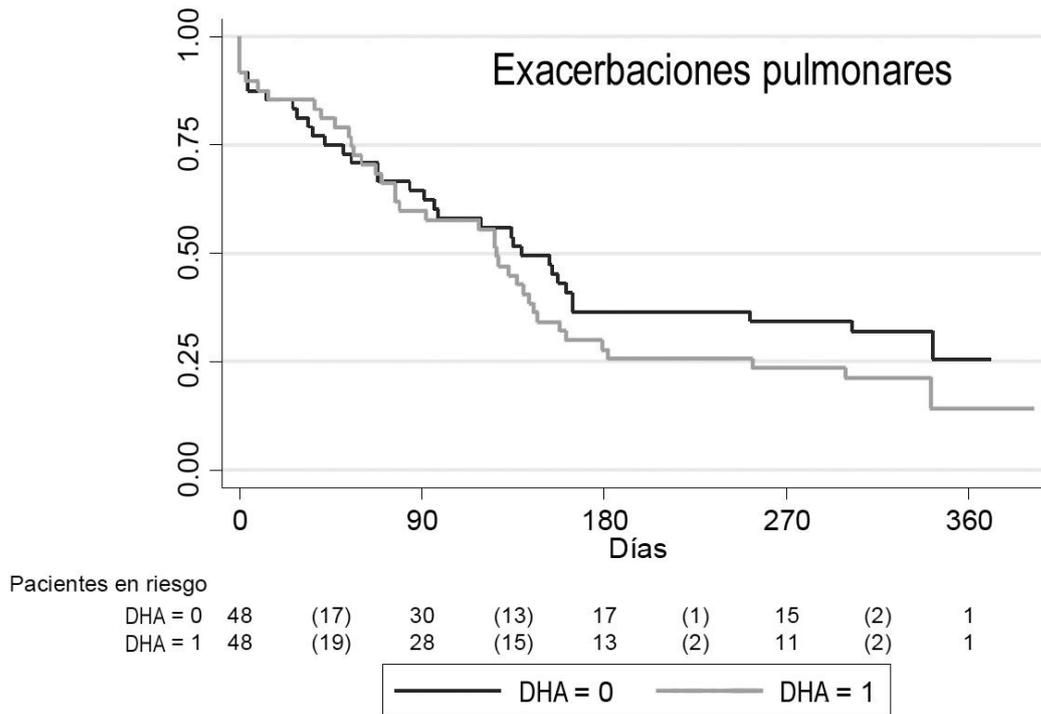


Figura 17. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) del total de exacerbaciones pulmonares. Se muestra la proporción de pacientes libre de exacerbación pulmonar en el grupo de intervención (DHA=1) y en el grupo control (DHA=0).

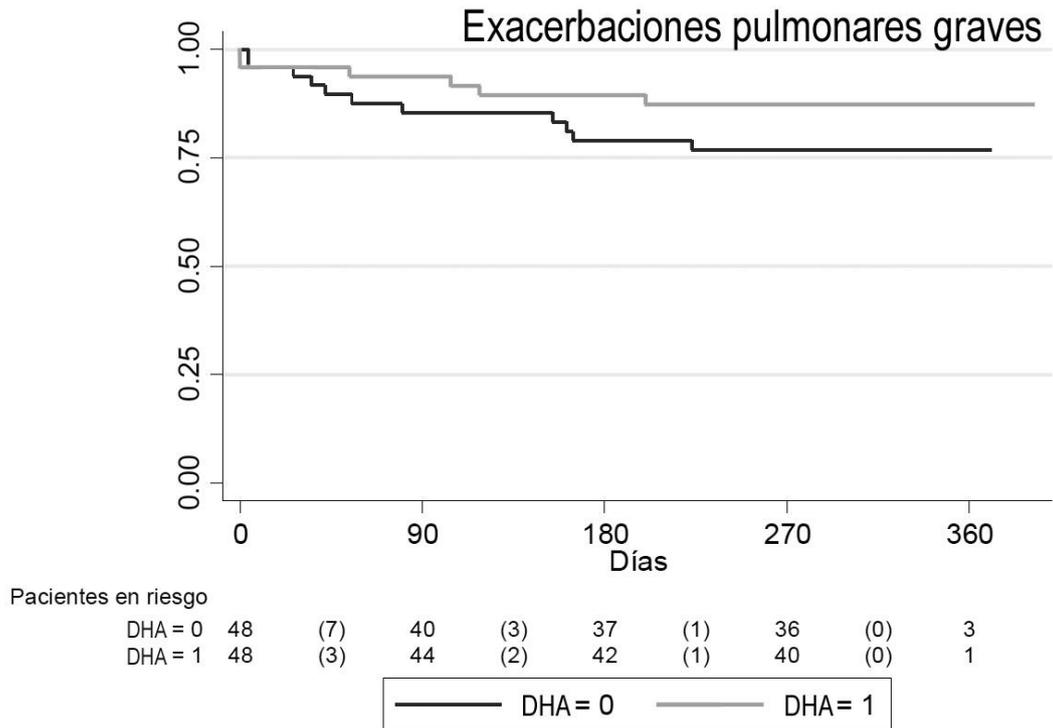


Figura 18. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de exacerbaciones pulmonares graves. Se muestra la proporción de pacientes libre de exacerbación pulmonar grave en el grupo de intervención (DHA=1) y en el grupo control (DHA=0).

La tasa de incidencia de **infección por *P. aeruginosa*** en los pacientes sin infección crónica al inicio del estudio (n=74) fue similar entre los dos grupos de estudio (tasa de incidencia DHA 0.34/pacientes-año, placebo 0.385/pacientes-año; cociente de tasas 0.88, IC_{95%} 0.36; 2.16, p=0.763). El **tiempo hasta la infección por *P. aeruginosa*** también fue similar en ambos grupos (HR 1.07, IC_{95%} 0.38; 3.06, p=0.897, **Figura 19**).

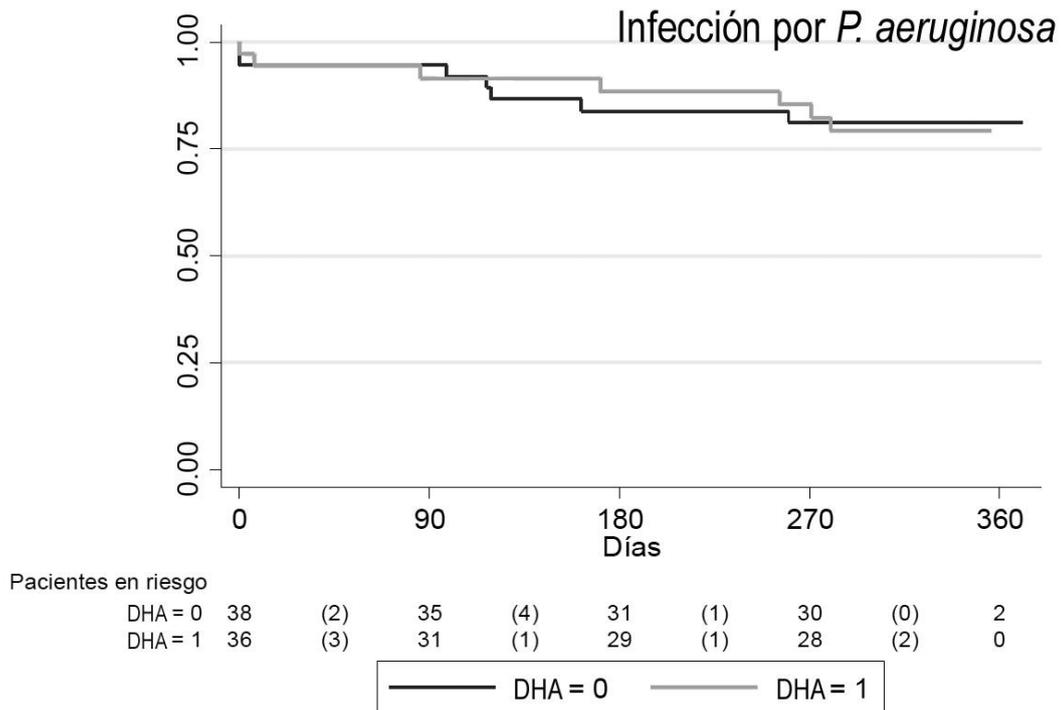


Figura 19. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de la infección por *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Se muestra la proporción de pacientes libre de infección por *P. aeruginosa* en el grupo de intervención (DHA=1) y en el grupo control (DHA=0).

3.4.- Variables clínicas relacionadas con la afectación digestiva/nutricional en la fibrosis quística

No se encontraron diferencias en el z-score de **peso** (DHA -0.57 ± 0.75 ; placebo -0.67 ± 0.89 ; $p=0.104$) ni de **IMC** (DHA -0.30 ± 0.74 ; placebo -0.56 ± 0.86 ; $p=0.750$) entre el grupo de intervención y el grupo control al final del estudio.

Las **Figuras 20 y 21** muestran la representación gráfica de los valores de peso e IMC, respectivamente, a lo largo del estudio.

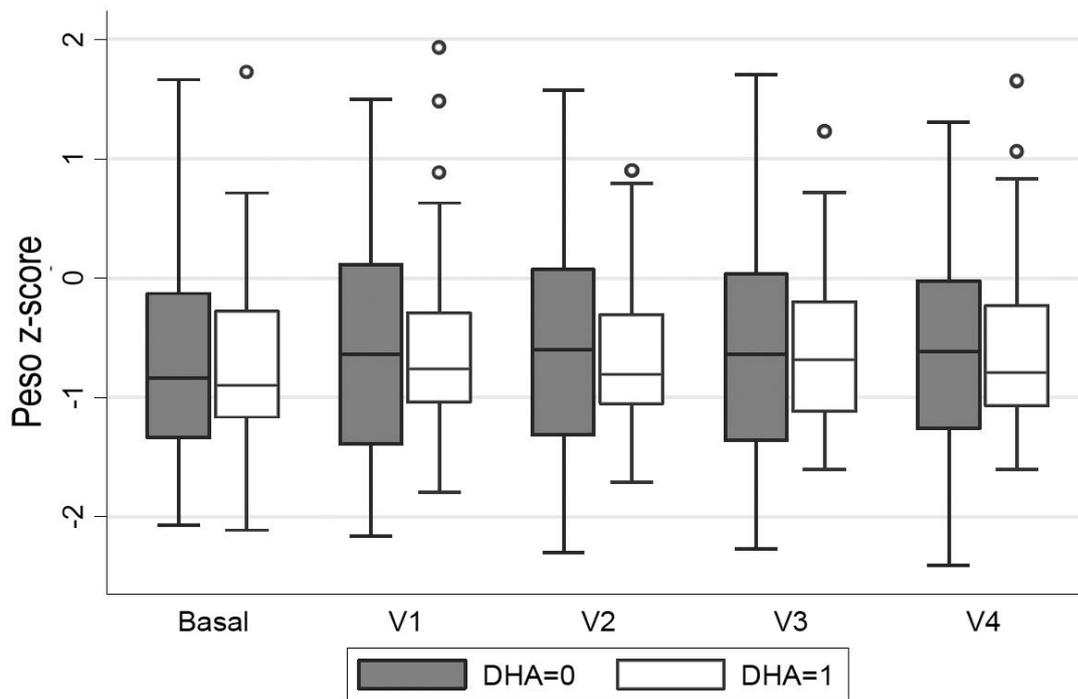


Figura 20. Gráfico de cajas y bigotes que representan el peso expresado como z-score en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

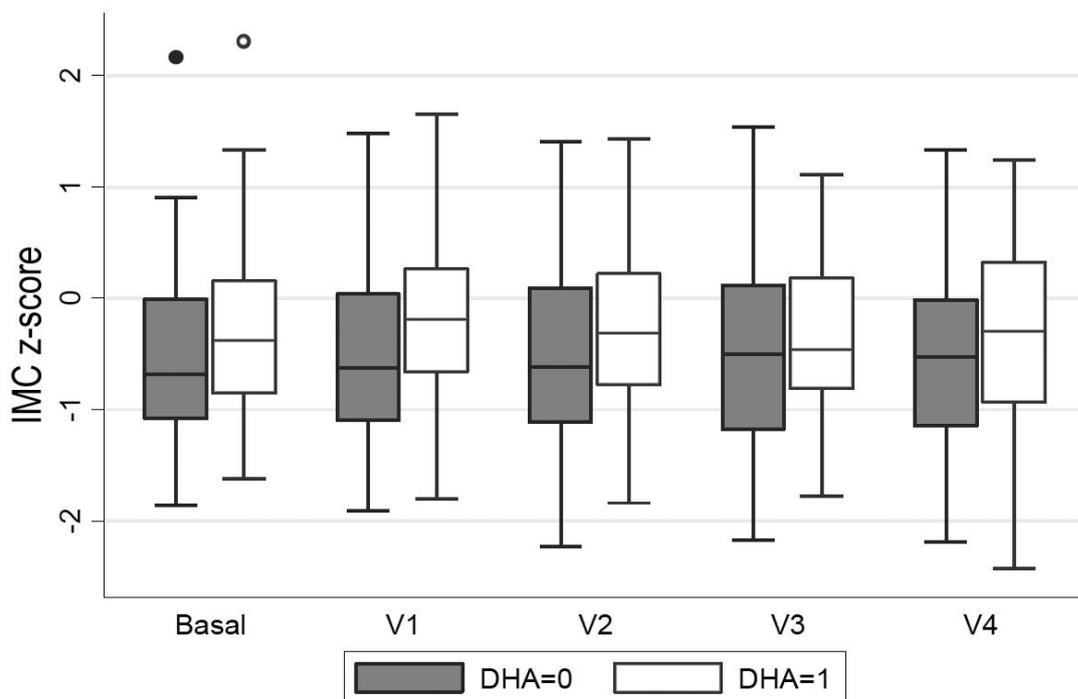


Figura 21. Gráfico de cajas y bigotes que representan el índice de masa corporal (IMC) expresado como z-score en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

La **dosificación de enzimas pancreáticos** (DHA 4521.29 ± 2095.20 UL/kg/día; placebo 3794.39 ± 2166.43 UL/kg/día; $p=0.192$) y el **CRG** (DHA $92.45 \pm 7.10\%$; placebo $91.91 \pm 5.81\%$; $p=0.556$) también fueron similares en ambos grupos de estudio al final del tratamiento.

Las **Figuras 22 y 23** muestran la representación gráfica de la dosificación de enzimas pancreáticos y del CRG, respectivamente, a lo largo del estudio.

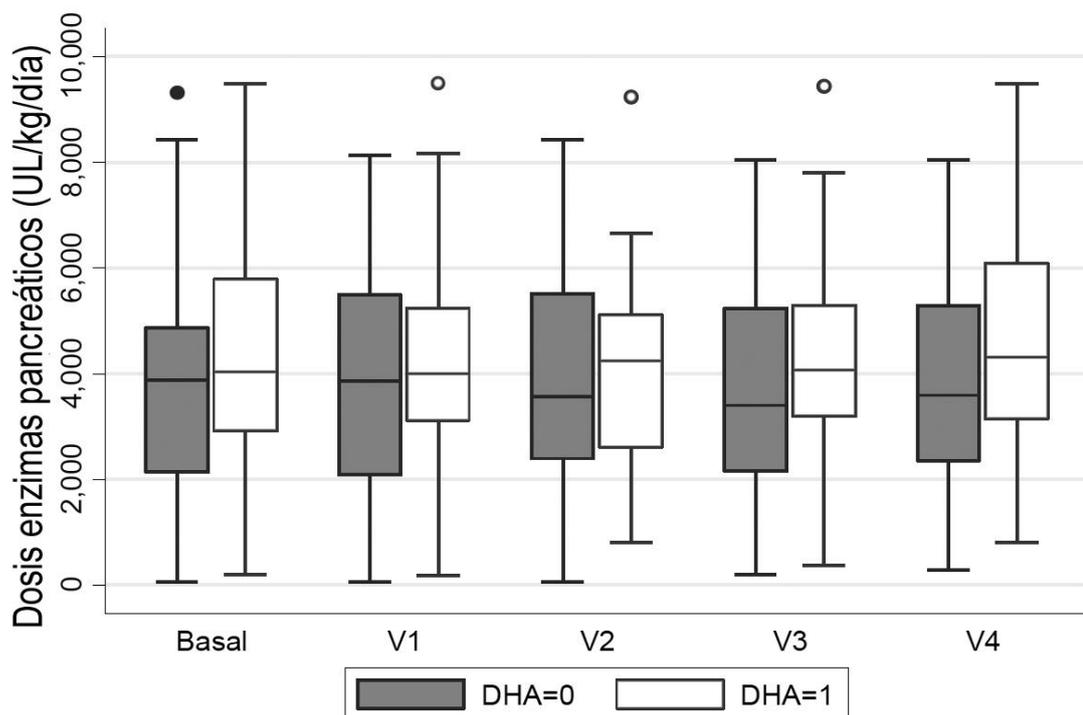


Figura 22. Gráfico de cajas y bigotes que representan la dosis de enzimas pancreáticos en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

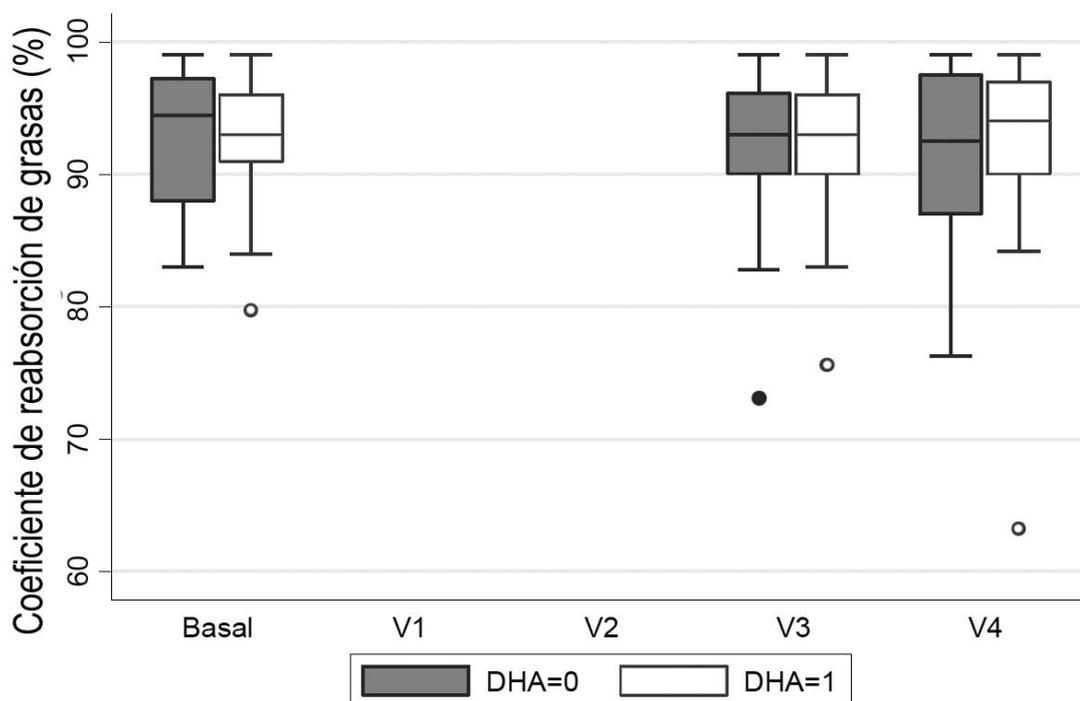


Figura 23. Gráfico de cajas y bigotes que representan el coeficiente de reabsorción de grasas en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0).

El modelo de regresión lineal de efectos mixtos tampoco mostró diferencias en el efecto a lo largo del estudio del DHA o del placebo sobre el peso, el IMC o la dosificación de enzimas pancreáticos, ni ajustado por el valor basal (**Tabla 19**) ni tras ajustar por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización (**Tabla 20**). Este modelo mostró una diferencia mínima, aunque estadísticamente significativa, en el efecto a lo largo del estudio del DHA y el placebo sobre el CRG (Tablas 19 y 20).

Tabla 19. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para las variables relacionadas con la afectación digestiva/nutricional (ajustado por el valor basal)

Variable	Cambio medio semanal (IC _{95%})		p valor
	DHA	Placebo	
Peso (z-score)	0.00 (0.00; 0.00)	0.00 (0.00; 0.00)	0.489
IMC (z-score)	0.00 (0.00; 0.00)	0.00 (0.00; 0.00)	0.578
Dosis de enzimas pancreáticos (UL/kg/día)	9.66 (2.95; 16.38)	1.07 (-5.38; 7.52)	0.070
CRG	0.03 (-0.03; 0.08)	-0.07 (-0.14; 0.00)	0.034

DHA: ácido docosahexaenoico; IMC: índice de masa corporal; UL: Unidades de lipasa; CRG: coeficiente de reabsorción de grasas.

Tabla 20. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para las variables relacionadas con la afectación digestiva/nutricional (ajustado por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización)

Variable	Cambio medio semanal (IC _{95%})		p valor
	DHA	Placebo	
Peso (z-score)	0.00 (0.00; 0.00)	0.00 (0.00; 0.00)	0.693
IMC (z-score)	0.00 (0.00; 0.00)	0.00 (0.00; 0.00)	0.788
Dosis de enzimas pancreáticos (UL/kg/día)	9.67 (2.97; 16.38)	1.21 (-5.24; 7.65)	0.075
CRG	0.02 (-0.04; 0.08)	-0.07 (-0.14; -0.01)	0.034

DHA: ácido docosahexaenoico; IMC: índice de masa corporal; UL: Unidades de lipasa; CRG: coeficiente de reabsorción de grasas.

3.5.- Calidad de vida

No se encontraron diferencias en ninguno de los dominios del cuestionario CFQ-R entre el grupo de intervención y el grupo control, en ninguna de las visitas del estudio (**Tablas 21, 22 y 23**).

Tabla 21. Comparativa de las puntuaciones en los diferentes dominios del cuestionario CFQ-R de la versión para adolescentes >14 años y adultos entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control a lo largo del estudio

Dominios	V1	V2	V3	V4
Capacidad física	p=0.427	p=0.263	p=0.494	p=0.392
Limitaciones de rol	p=0.236	p=0.565	p=0.540	p=0.753
Vitalidad	p=0.571	p=0.464	p=0.773	p=0.533
Percepción de la salud	p=0.591	p=0.330	p=0.920	p=0.407
Estado emocional	p=0.098	p=0.797	p=0.444	p=0.788
Aislamiento social	p=0.815	p=0.633	p=0.920	p=0.590
Imagen corporal	p=0.760	p=0.952	p=0.853	p=0.488
Problemas con la alimentación	p=0.443	p=0.758	p=0.455	p=0.641
Carga de tratamiento	p=0.978	p=0.628	p=0.148	p=0.301
Problemas de peso	p=0.330	p=0.790	p=0.162	p=0.051
Síntomas respiratorios	p=0.071	p=0.026	p=0.122	p=0.348
Síntomas digestivos	p=0.614	p=0.221	p=0.429	p=0.750

Se muestra el contraste de hipótesis de igualdad de respuesta entre DHA y placebo (prueba de suma de rangos), para cada una de las visitas (V).
CFQ-R: Cuestionario de fibrosis quística-revisado.

Tabla 22. Comparación de las puntuaciones en los diferentes dominios del cuestionario CFQ-R de la versión para padres/cuidadores entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control a lo largo del estudio

Dominios	V1	V2	V3	V4
Capacidad física	p=0.890	p=0.262	p=0.850	p=0.580
Vitalidad	p=0.584	p=0.484	p=0.294	p=0.732
Percepción de la salud	p=0.387	p=0.064	p=0.022	p=0.899
Estado emocional	p=0.780	p=0.409	p=0.929	p=0.244
Colegio	p=0.087	p=0.059	p=0.052	p=0.637
Imagen corporal	p=0.415	p=0.964	p=0.681	p=0.596
Problemas con la alimentación	p=0.978	p=0.323	p=0.200	p=0.180
Carga de tratamiento	p=0.330	p=0.195	p=0.481	p=0.847
Problemas de peso	p=0.857	p=0.847	p=0.585	p=0.897
Síntomas respiratorios	p=0.618	p=0.078	p=0.197	p=0.550
Síntomas digestivos	p=0.698	p=0.801	p=0.390	p=0.824

Se muestra el contraste de hipótesis de igualdad de respuesta entre DHA y placebo (prueba de suma de rangos), para cada una de las visitas (V).
CFQ-R: Cuestionario de fibrosis quística-revisado.

Tabla 23. Comparación de las puntuaciones en los diferentes dominios del cuestionario CFQ-R de la versión para niños 6-13 años entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control a lo largo del estudio

Dominio	V1	V2	V3	V4
Capacidad física	p=0.363	p=0.884	p=0.103	p=0.541
Estado emocional	p=0.422	p=0.093	p=0.768	p=0.653
Aislamiento social	p=0.216	p=0.607	p=0.075	p=0.655
Imagen corporal	p=0.588	p=0.688	p=0.834	p=0.883
Problemas con la alimentación	p=0.822	p=0.746	p=0.613	p=0.379
Carga de tratamiento	p=0.964	p=0.065	p=0.383	p=0.364
Síntomas respiratorios	p=0.339	p=0.731	p=0.354	p=0.287
Síntomas digestivos	p=0.625	p=0.359	p=0.515	p=0.178

Se muestra el contraste de hipótesis de igualdad de respuesta entre DHA y placebo (prueba de suma de rangos), para cada una de las visitas (V).
CFQ-R: Cuestionario de fibrosis quística-revisado.

Se realizaron análisis agrupando las puntuaciones de los dominios iguales de las versiones de CFQ-R para niños y adultos, de manera similar a estudios previamente publicados¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. El modelo de regresión lineal de efectos mixtos, con las puntuaciones agrupadas, tampoco mostró diferencias en el efecto a lo largo del estudio del DHA o del placebo sobre los diferentes dominios relacionados con la calidad de vida, ni ajustado por el valor basal (**Tabla 24**) ni tras ajustar por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización (**Tabla 25**), con excepción del dominio “imagen corporal”.

Tabla 24. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para la puntuación agrupada de los diferentes dominios del cuestionario CFQ-R (ajustado por el valor basal)			
Variable	Cambio medio semanal (IC_{95%})		p valor
	DHA	Placebo	
Capacidad física	-0.05 (-0.21; 0.11)	0.03 (-0.11; 0.17)	0.448
Estado emocional	-0.12 (-0.26; 0.02)	-0.09 (-0.22; 0.04)	0.786
Aislamiento social	-0.04 (-0.19; 0.11)	-0.07 (-0.20; 0.07)	0.785
Imagen corporal	0.11 (-0.06; 0.28)	-0.13 (-0.28; 0.02)	0.045
Problemas con la alimentación	0.10 (-0.08; 0.28)	0.00 (-0.16; 0.16)	0.391
Carga de tratamiento	-0.01 (-0.18; 0.16)	-0.01 (-0.17; 0.14)	0.961
Síntomas respiratorios	-0.18 (-0.35; -0.02)	0.01 (-0.14; 0.15)	0.094
Síntomas digestivos	-0.08 (-0.34; 0.18)	-0.07 (-0.30; 0.17)	0.924

Se han agrupado los dominios iguales de las versiones para niño y adolescentes >14 años y adultos.
CFQ-R: Cuestionario de fibrosis quística-revisado; DHA: ácido docosahexaenoico.

Tabla 25. Modelo de regresión lineal de efectos mixtos para la puntuación agrupada de los diferentes dominios del cuestionario CFQ-R (ajustado por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización)

Variable	Cambio medio semanal (IC _{95%})		p valor
	DHA	Placebo	
Capacidad física	-0.06 (-0.21; 0.10)	0.02 (-0.11; 0.16)	0.451
Estado emocional	-0.12 (-0.26; 0.02)	-0.09 (-0.22; 0.03)	0.091
Aislamiento social	-0.05 (-0.20; 0.11)	-0.07 (-0.20; 0.06)	0.821
Imagen corporal	0.10 (-0.07; 0.27)	-0.13 (-0.29; 0.02)	0.048
Problemas con la alimentación	0.10 (-0.08; 0.28)	-0.01 (-0.17; 0.15)	0.399
Carga de tratamiento	-0.02 (-0.19; 0.16)	-0.01 (-0.17; 0.14)	0.998
Síntomas respiratorios	-0.19 (-0.36; -0.02)	0.00 (-0.15; 0.15)	0.090
Síntomas digestivos	-0.08 (-0.34; 0.18)	-0.07 (-0.30; 0.17)	0.926

Se han agrupado los dominios iguales de las versiones para niño y adolescentes >14 años y adultos.
CFQ-R: Cuestionario de fibrosis quística-revisado; DHA: ácido docosahexaenoico.

3.6.- Perfil de ácidos grasos poliinsaturados en plasma y membrana de eritrocito

En relación con los PUFA de la vía omega-3, se encontraron valores significativamente mayores de EPA y DHA, aunque no de ALA, en el grupo de intervención con respecto al grupo control, en las visitas 3 y 4, tanto en valor absoluto como en porcentaje (**Tabla 26**). En cuanto a los PUFA de la vía omega-6, los valores de GLA y AA fueron significativamente menores en el grupo de intervención que en el grupo control, tanto en la visita 3 como en la visita 4. No se observaron diferencias en los valores de LA (**Tabla 26**).

Tabla 26. Comparación de los valores de ácidos grasos poliinsaturados entre el grupo de intervención (DHA) y el grupo control en las visitas 3 y 4 del estudio

	Visita 3			Visita 4		
	DHA	Placebo	p valor*	DHA	Placebo	p valor*
EPA (µg/mL)	17.98±10.14	9.60±5.06	<0.001	18.12±14.10	10.60±8.14	0.001
EPA (%)	0.99±0.57	0.50±0.26	<0.001	1.01±0.73	0.54±0.36	<0.001
DHA (µg/mL)	97.50±30.08	38.76±13.08	<0.001	89.32±42.06	38.68±14.12	<0.001
DHA (%)	5.33±1.57	2.03±0.63	<0.001	5.02±2.09	2.02±0.76	<0.001
ALA (µg/mL)	6.05±4.09	4.97±2.14	0.476	5.27±3.48	5.28±3.10	0.962
ALA (%)	0.32±0.20	0.26±0.11	0.228	0.29±0.16	0.27±0.16	0.385
AA (µg/mL)	135.31±29.91	154.01±39.44	0.019	133.44± 3.49	153.56±40.29	0.021
AA (%)	7.42±1.60	8.04±1.55	0.041	7.60±1.62	7.98±1.86	0.409
LA (µg/mL)	489.86±98.39	487.15±77.47	0.902	460±91.76	499±92.21	0.054
LA (%)	26.65±3.89	25.69±3.50	0.206	26.43±4.83	25.46±4.17	0.340
GLA (µg/mL)	7.14±2.98	9.52±4.82	0.020	6.40±3.27	10.04±4.94	<0.001
GLA (%)	0.38±0.14	0.48±0.18	0.012	0.36±0.16	0.51±0.23	0.001

Los valores se expresan como media±DE.
DHA: ácido docosahexaenoico; EPA: ácido eicosapentaenoico; ALA: ácido alfa-linolénico; AA: ácido araquidónico; LA: ácido linoleico; GLA: ácido gamma-linolénico.
*Prueba de suma de rangos.

Las **Figuras 24, 25, 26, 27, 28 y 29** muestran la representación gráfica de los principales PUFA a lo largo del estudio.

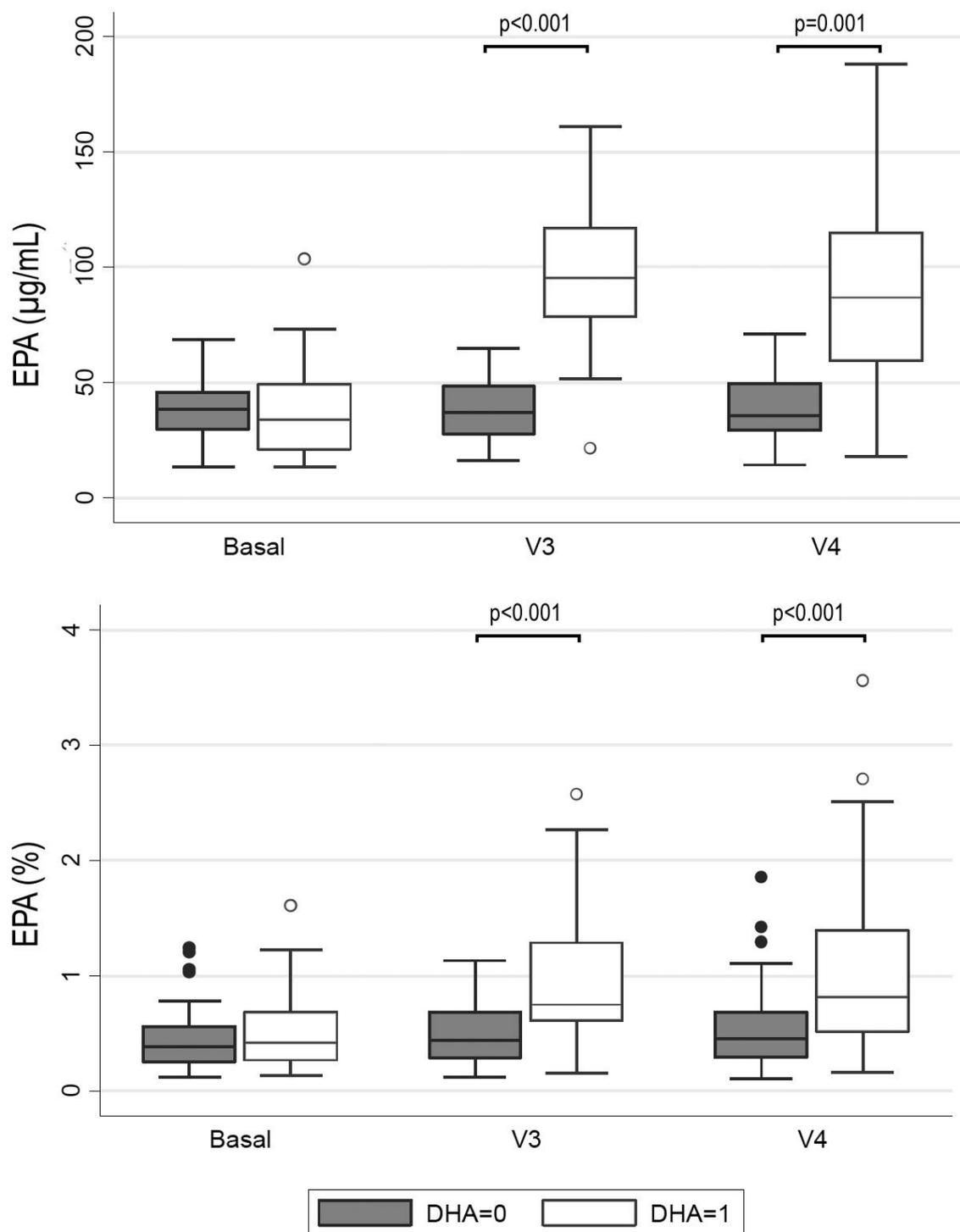


Figura 24. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de ácido eicosapentaenoico (EPA) en µg/mL (arriba) y porcentaje (abajo) en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0) a lo largo del estudio.

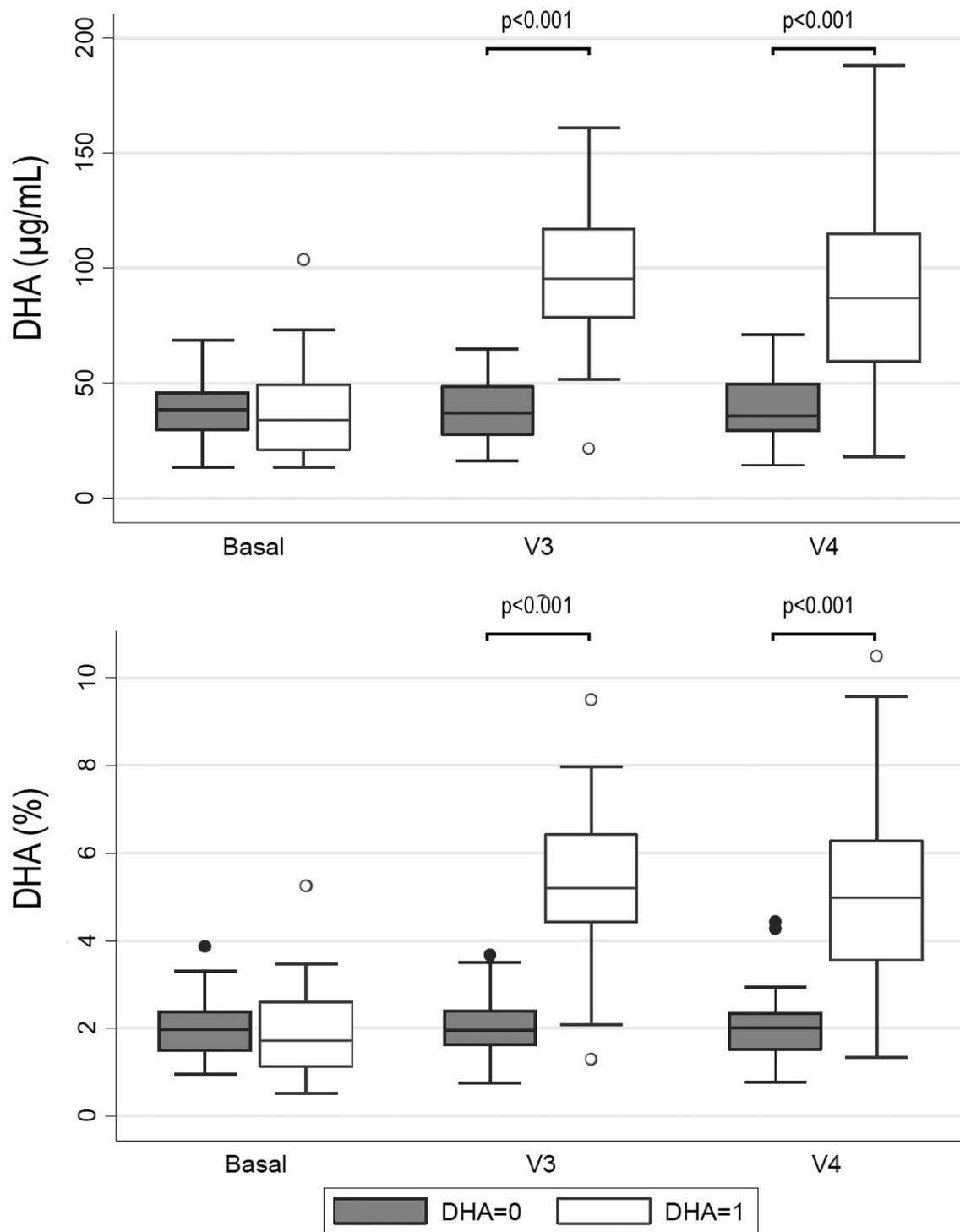


Figura 25. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de ácido docosahexaenoico (DHA) en µg/mL (arriba) y porcentaje (abajo) en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0) a lo largo del estudio.

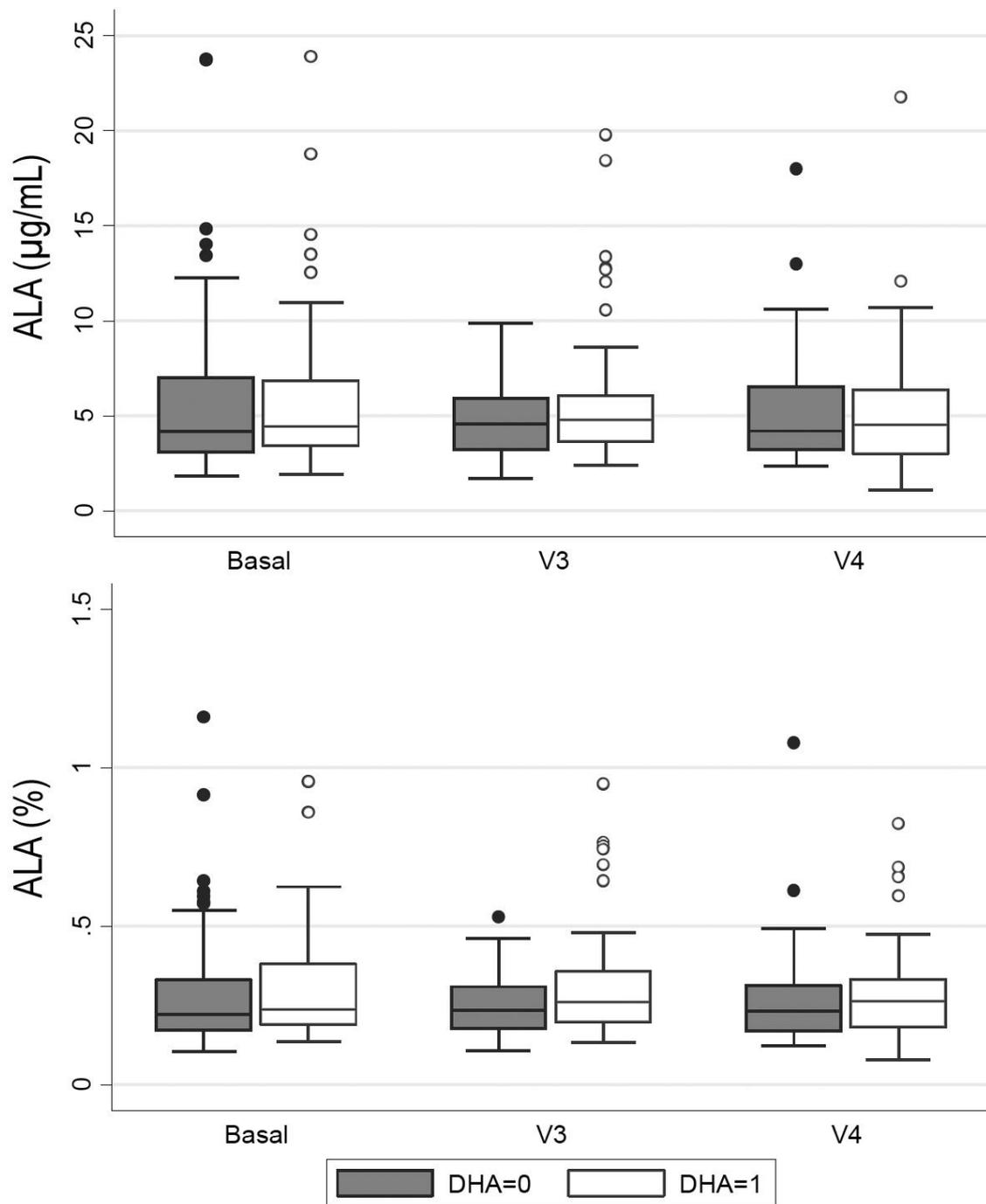


Figura 26. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de ácido alfa-linolénico (ALA) en µg/mL (arriba) y porcentaje (abajo) en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0) a lo largo del estudio.

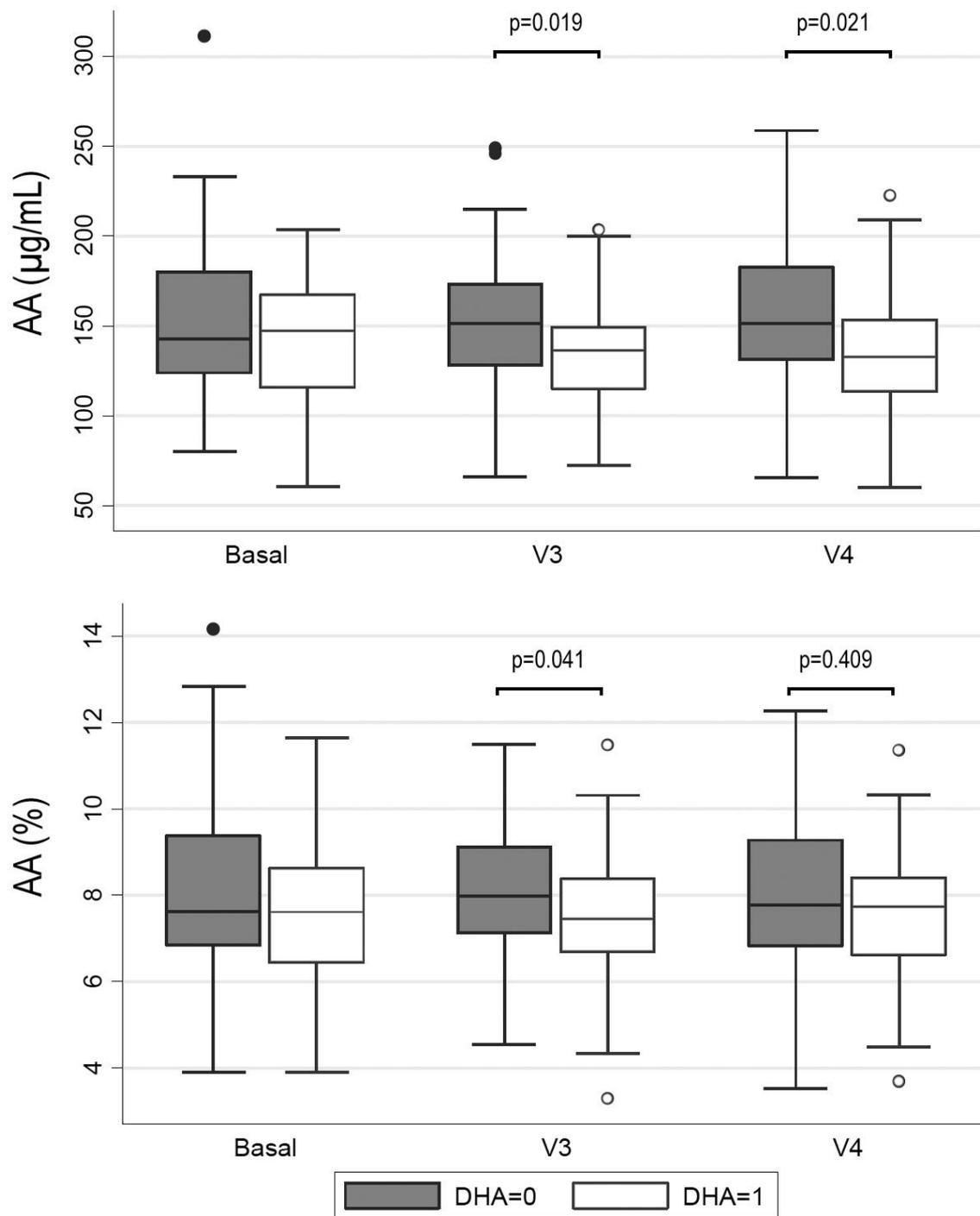


Figura 27. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de ácido araquidónico (AA) en µg/mL (arriba) y porcentaje (abajo) en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0) a lo largo del estudio.

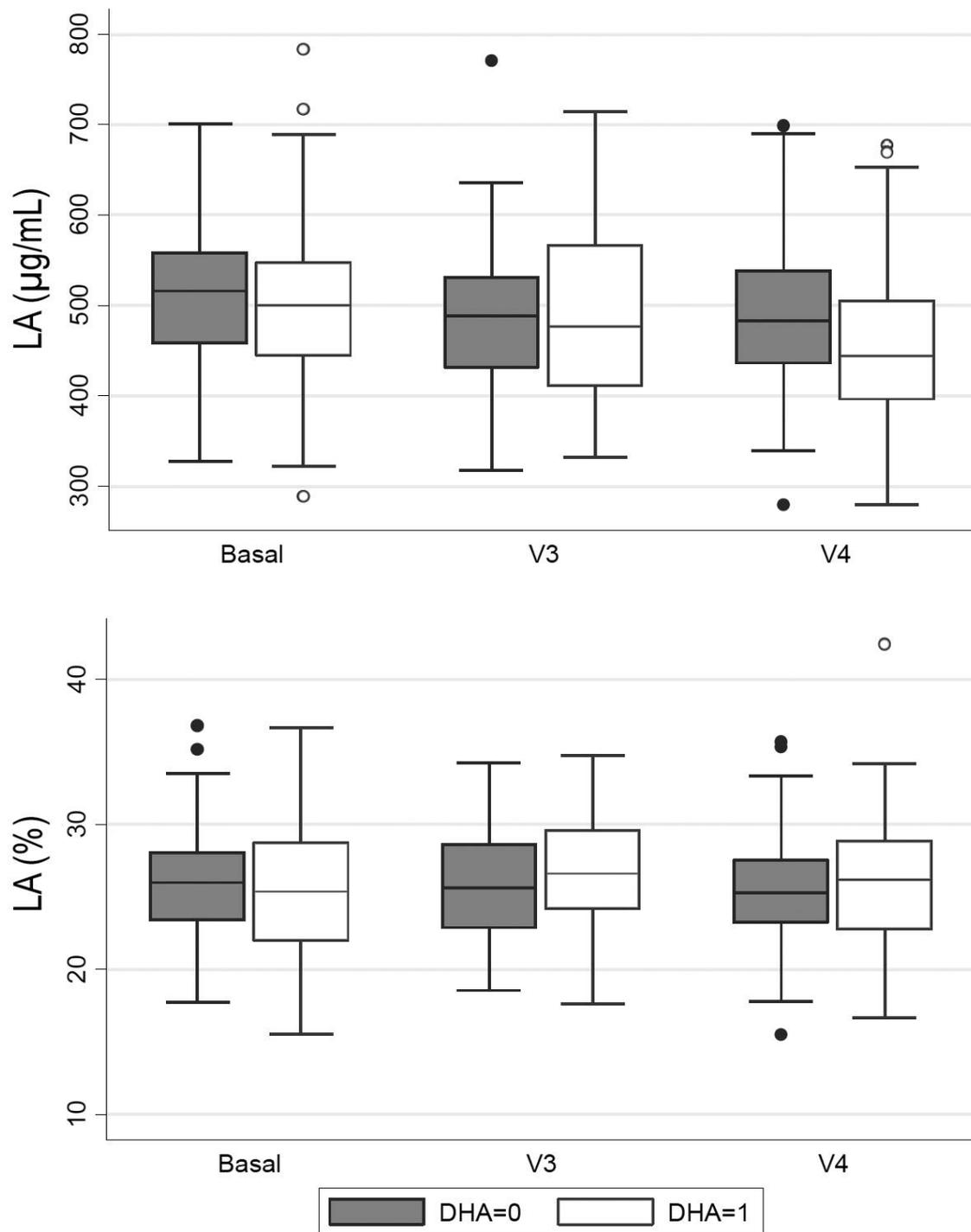


Figura 28. Gráfico de cajas y bigotes que representan los valores de ácido linoleico (LA) en µg/mL (arriba) y porcentaje (abajo) en el grupo de intervención (DHA=1) y el grupo control (DHA=0) a lo largo del estudio.

Debido a la dinámica de cambio esperada en el perfil de PUFA, con un cambio al inicio del tratamiento y una estabilización posterior a lo largo de todo el estudio, la aproximación estadística mediante el modelo estimativo del efecto de DHA por semana de tratamiento no se consideró adecuada.

La valoración del perfil de PUFA en membrana de eritrocito no fue posible debido a problemas con la reproducibilidad de la técnica de laboratorio.

3.7.- Seguridad

La **tasa de abandonos** fue similar en ambas ramas de estudio. Se produjeron 5 abandonos en el grupo de intervención y 4 en el grupo control (tasa de incidencia DHA 0.121/paciente-año, placebo 0.092/paciente año; cociente de tasas 0.766, IC_{95%} 0.152; 3.557, p=0.706). El tiempo hasta el primer abandono fue similar en ambas ramas del estudio (HR 1.322, IC_{95%} 0.355; 4.926, p=0.677, **Figura 30**). Los motivos de abandono pueden consultarse en la Figura 3.

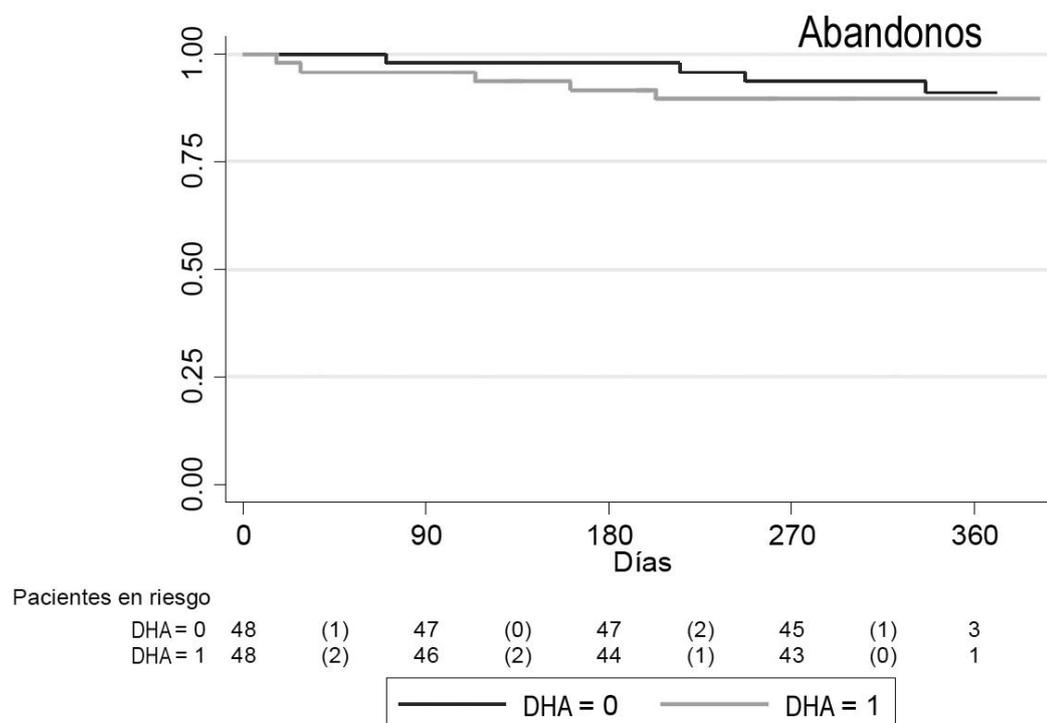


Figura 30. Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de abandono del estudio. Se muestra la proporción de pacientes que permanecen en el estudio en el grupo de intervención (DHA=1) y en el grupo control (DHA=0).

Para facilitar la comparación, los **efectos secundarios** se agruparon en función de su naturaleza: exacerbaciones respiratorias, problemas digestivos (vómitos, estreñimiento, diarrea, dolor abdominal, pancreatitis aguda), problemas infecciosos (infecciones bronquiales significativas -*P. aeruginosa*, *S. aureus* resistente a la meticilina, micobacterias no tuberculosas o infección por BCC-, fiebre, viriasis), problemas neurológicos (cefalea, mareo) y otros (exantema inespecífico, quemadura solar, síntomas rinoconjuntivales, candidiasis oral, contractura cervical). No se encontraron diferencias en relación con los efectos secundarios entre el grupo de intervención y el grupo control (**Tabla 27**).

Tabla 27. Efectos secundarios en el periodo de estudio			
	DHA	Placebo	Total
Exacerbaciones respiratorias	77	83	160
Problemas digestivos	4	8	12
Problemas infecciosos	11	17	28
Primoinfección por <i>P. aeruginosa</i>	7	7	14
Problemas neurológicos	2	1	3
Otros	4	4	8
TOTAL	105	120	225

p=0.815.
 Se muestra el número absoluto de efectos secundarios acontecidos durante el periodo de estudio. En el texto se explican los efectos adversos incluidos en cada uno de los grupos.
 DHA: ácido docosahexaenoico; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*.

4.- Análisis de sensibilidad

Tal y como se había previsto en el plan estadístico original y se ha mostrado en los epígrafes anteriores, los modelos de regresión se ajustaron por los posibles factores de confusión y las variables no balanceadas en el proceso de aleatorización: valor de la variable dependiente en el momento basal, la semana en la que se determinó la medición del valor de la variable, el número de alelos con la mutación Phe.508del y por las variables empleadas en el algoritmo adaptativo de minimización en la fase de aleatorización de pacientes (edad \leq o >2 años, FEV₁ predicho \leq o $>75\%$, infección crónica por *P. aeruginosa*, tratamiento inhalado con DNasa y tratamiento crónico con azitromicina).

El análisis de subgrupos obtuvo resultados similares a los expuestos en la población total de estudio.

Por último, se realizó una transformación logarítmica de las variables inflamatorias principales y se construyó de nuevo el modelo de regresión lineal de efectos mixtos, obteniendo resultados similares a los ya expuestos (**Tablas 28 y 29**).

Tabla 28. Análisis de sensibilidad mediante el modelo de regresión lineal de efectos mixtos tras la transformación logarítmica de las variables inflamatorias (ajustado por el valor basal)			
Variable	Cambio medio semanal (IC_{95%})		p valor
	DHA	Placebo	
IL-8 en SR	0.00 (-0.01; 0.02)	-0.01 (-0.03; 0.00)	0.136
IL-8 suero	0.04 (-0.05; 0.13)	0.11 (0.01; 0.21)	0.269
Calprotectina fecal	0.00 (-0.01; 0.01)	0.00 (-0.01; 0.01)	0.923

DHA: ácido docosahexaenoico; IL: interleucina; SR: secreción respiratoria.

Tabla 29. Análisis de sensibilidad mediante el modelo de regresión lineal de efectos mixtos tras la transformación logarítmica de las variables inflamatorias (ajustado por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización)

Variable	Cambio medio semanal (IC _{95%})		p valor
	DHA	Placebo	
IL-8 en SR	0.00 (-0.01; 0.02)	-0.01 (-0.03; 0.00)	0.187
IL-8 suero	0.02 (-0.06; 0.11)	0.12 (0.02; 0.21)	0.175
Calprotectina fecal	0.00 (-0.01; 0.01)	0.00 (-0.01; 0.01)	0.938

DHA: ácido docosahexaenoico; IL: interleucina; SR: secreción respiratoria.

Debido a que la proporción de pacientes sin inflamación detectable en la visita basal era relativamente alta, y ante la posibilidad de que el efecto del DHA sobre la inflamación pudiera no ser significativo en pacientes sin inflamación basal detectable, se planteó un análisis *post hoc* valorando las variables principales únicamente en pacientes con inflamación detectable al inicio del estudio, es decir, con valores de IL-8 en suero o SR diferente a 0 (n=31). Los resultados fueron similares a los obtenidos en la población global del estudio con excepción de la IL-8 en suero (**Tablas 30 y 31**).

Tabla 30. Análisis de sensibilidad mediante el modelo de regresión lineal de efectos mixtos tras eliminar los pacientes sin inflamación detectable en la visita basal (ajustado por el valor basal)

Variable	Cambio medio semanal (IC _{95%})		p valor
	DHA	Placebo	
IL-8 en SR	23.07 (-159.65; 20579)	-54.93 (-187.85; 77.98)	0.499
IL-8 suero	-0.39 (-239.13; 238.34)	458.99 (139.13; 778.86)	0.024
Calprotectina fecal	0.33 (-2.60; 3.25)	0.76 (-2.15; 3.66)	0.837

DHA: ácido docosahexaenoico; IL: interleucina; SR: secreción respiratoria.

Tabla 31. Análisis de sensibilidad mediante el modelo de regresión lineal de efectos mixtos tras eliminar los pacientes sin inflamación detectable en la visita basal (ajustado por los posibles factores de confusión y variables no balanceadas en el proceso de aleatorización)

Variable	Cambio medio semanal (IC _{95%})		p valor
	DHA	Placebo	
IL-8 en SR	4.39 (-173.25; 182.03)	-55.07 (-186.93; 76.80)	0.597
IL-8 suero	26.66 (-202.17; 255.49)	474.29 (135.42; 813.16)	0.030
Calprotectina fecal	0.33 (-2.61; 3.27)	0.79 (-2.16; 3.74)	0.828

DHA: ácido docosahexaenoico; IL: interleucina; SR: secreción respiratoria.

DISCUSIÓN

En este estudio clínico en fase 4, doble ciego, paralelo y controlado con placebo en pacientes con FQ mayores de 2 meses, la suplementación con DHA a dosis de 50 mg/kg/día no se asoció con ningún cambio significativo en la inflamación sistémica, pulmonar o intestinal. Tampoco se asoció con cambios significativos a nivel clínico respiratorio, digestivo o de calidad de vida.

Se trata de un estudio a largo plazo, que incluye un número significativo de pacientes, similar a la suma de los 5 estudios incluidos en la última revisión Cochrane¹⁷³. El amplio rango de variables empleadas, tanto inflamatorias como clínicas, unido a la alta adherencia registrada, ofrece una buena visión global del efecto de la suplementación con DHA en pacientes con FQ.

En los próximos epígrafes se abordará una discusión ordenada de todos los resultados obtenidos y, finalmente, se expondrán tanto las fortalezas como las limitaciones del estudio. Las características de los estudios utilizados durante la discusión se resumen en la **Tabla 32**.

Tabla 32. Características de los estudios incluidos en la discusión

Ref	Autor	Año	Diseño					n	Edad	Duración
			Aleatorizado	Grupo control	Ciego	PUFA	Diseño			
201	Mischler EH	1986	No	No	No	LA	Longitudinal	20	10-24 años	12 meses
161	Lawrence R	1993	Si	Si (placebo)	Doble	EPA	Paralelo	16	12-26 años	6 semanas
162	Henderson WR	1994	Si	Si (placebo)	Doble	EPA+DHA	Paralelo	25	>9 años	12 semanas
166	Kurlandsky LE	1994	Si	Si (n6)	Doble	Mezcla n3	Paralelo	15	6-16 años	6 semanas
165	Lawrence R	1994	No	No	No	EPA	Longitudinal	9	14-22 años	6 semanas
207	Katz DP	1996	Si	Si (LA y OA)	Doble	EPA+DHA	Paralelo	18	>10 años	4 semanas
212	van Egmond AWA	1996	Si	Si (dosis bajas LA)	No	LA (dosis altas)	Paralelo	76	<9 meses	12 meses ¹
208	Steinkamp G	2000	Si	Si (no placebo)	No	LA	Paralelo	36	>4 años	3 meses
164	De Vizia B	2003	No	No	No	EPA+DHA	Longitudinal	30	0.8-24 años	8 meses
209	Lloyd-Still JD	2006	Si	Si (placebo)	Doble	DHA	Paralelo	20	8-20 años	6 meses
163	Panchaud A	2006	Si	Si (placebo)	Doble	Mezcla PUFA	Cruzado	17	>6 años	6 meses
205	Jumpsen JA	2006	No	No	No	DHA	Longitudinal	5	18-43 años	6 semanas
200	Van Biervelt S	2008	Si	Si (placebo)	Doble	DHA	Paralelo	17	>6 años	12 meses
171	Oliveira G	2010	No	No	No	Mezcla n3	Longitudinal	19	>16 años	12 meses
169	Keen C	2010	Si	Si (placebo y n6)	Doble	Mezcla n3	Paralelo	45	>7 años	3 meses
199	Leggieri E	2013	No	No	No	DHA	Longitudinal	10	6-18 años	6 meses
198	Alicandro G	2013	Si	Si (placebo)	Doble	DHA	Paralelo	41	6-10 años	12 meses
172	Hanssens L	2016	Si	Si (placebo)	Doble	DHA+EPA	Paralelo	15	>5 años	12 meses
197	Teopombi E	2019	No	No	No	DHA	Longitudinal	15	20-40 años	10 semanas

Ref: referencia bibliográfica; LA: ácido linoleico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico.

¹Duración variable, hasta fin de la lactancia o 18 meses de edad.

1.- Resultados sobre la inflamación respiratoria

Los resultados obtenidos en SR, tanto de la variable principal (IL-8) como de las variables secundarias (IL-1 β , IL-6, EN, lactato y calprotectina) no mostraron ningún efecto significativo de la suplementación con DHA, ni al final del estudio (semana 48), ni en el modelo de regresión que evaluó el cambio semana a semana. El hallazgo aislado de una diferencia estadísticamente significativa de IL-8 dentro del grupo suplementado con DHA, entre las visitas V1 y V4 ($p=0.019$) se debe interpretar como una consecuencia del elevado número de comparaciones realizadas.

En la literatura solamente un artículo estudia específicamente el efecto del DHA sobre muestras de esputo de pacientes con FQ. En este trabajo encontraron una disminución de LTB₄ y de ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (metabolitos del AA) y un aumento de 17-hidroxi-DHA (metabolito del DHA) en el esputo de 9 pacientes adultos después de 10 semanas de tratamiento con DHA a dosis similares a las empleadas en nuestro estudio, con tendencia a volver a su situación basal 10 semanas después de suspender el tratamiento¹⁹⁷. Este trabajo demuestra la capacidad de la suplementación con DHA de revertir, parcialmente, las alteraciones del perfil de PUFA en la vía aérea de los pacientes con FQ, pero no analiza si este efecto se traduce en una reducción de la inflamación de esta. En nuestro estudio no se analizaron los mismos biomarcadores, y entre la amplia variedad de marcadores inflamatorios que sí se estudiaron en SR (IL-8, IL-1 β , IL-6, EN, lactato y calprotectina), no se encontró ningún efecto significativo de la suplementación con DHA. La transformación logarítmica de las variables y el análisis *post hoc* en el subgrupo de pacientes con inflamación detectable al inicio del estudio arrojó los mismos resultados. La conclusión es que, en nuestro estudio, la suplementación con DHA a largo plazo, valorada a través del estudio de los biomarcadores inflamatorios mencionados previamente, no tuvo un efecto significativo sobre la inflamación pulmonar en la FQ.

2.- Resultados sobre la inflamación sistémica

Los resultados obtenidos en suero, tanto de la variable principal (IL-8) como de las variables secundarias (IL-1 β , IL-6, porcentaje de neutrófilos y PCR) no mostraron ningún efecto significativo de la suplementación con DHA, ni al final del estudio (semana 48), ni en el modelo de regresión que evaluó el cambio semana a semana.

Los diferentes trabajos que han evaluado marcadores inflamatorios en suero muestran resultados contradictorios y de difícil comparación, ya que emplean suplementaciones con diferentes tipos de PUFA y analizan distintos marcadores inflamatorios.

En un estudio cruzado con 16 pacientes con FQ adolescentes y adultos, la suplementación a corto plazo (6 semanas) con EPA demostró mejorar la quimiotaxis de neutrófilos frente a LTB₄ (sin llegar a normalizarse) y disminuir el número total de leucocitos y neutrófilos¹⁶¹. Otro estudio también cruzado y de 6 semanas de duración en 14 pacientes con FQ entre 6 y 16 años, demostró que la suplementación con una mezcla de omega-3, con una dosis aproximada de 24 mg/kg/día de DHA, disminuía la concentración de LTB₄ en suero, comparada con la suplementación con una mezcla de omega-6¹⁶⁶. Estos estudios, publicados en 1993 y 1994, respectivamente, se realizaron hace más de 20 años, por lo que es probable que las poblaciones de pacientes con FQ no sean directamente comparables a la de nuestro trabajo. Otro estudio más reciente, centrado también en el metabolismo de los LT, cruzado y de más duración (6 meses), encontró que la suplementación con una mezcla de omega-3 (con una dosis total de DHA 5-10 veces menor que la empleada en nuestro estudio) producía una disminución del índice LTB₄/LTB₅, por lo que especulaba que, en esas condiciones, los neutrófilos producirían metabolitos menos proinflamatorios en la vía del AA¹⁶³. Dado que en nuestro estudio no se ha valorado ni la concentración ni el metabolismo de los LT, los resultados no pueden compararse.

En relación con la IL-8, nuestra variable principal, los estudios publicados tienen también resultados heterogéneos. El estudio ya comentado de Panchaud y colaboradores, a pesar de encontrar un efecto beneficioso de la suplementación con omega-3 sobre el índice LTB₄/LTB₅, no encontró diferencias entre los grupos de estudio en la quimiotaxis de neutrófilos inducida por IL-8¹⁶³. Otro

estudio, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, con dosis altas de DHA y una duración de 12 meses, no encontró diferencias en los niveles de IL-8 entre los dos grupos al final del estudio¹⁹⁸. Por último, un estudio no controlado, en 10 pacientes pediátricos con FQ, tampoco encontró variaciones estadísticamente significativas en la concentración de IL-8 tras 6 meses de suplementación con DHA (100 mg/kg/día el primer mes, seguido de 25 mg/kg/día durante 5 meses más)¹⁹⁹. Tan sólo el estudio publicado por Keen y colaboradores encontró un efecto significativo de la suplementación con DHA sobre la concentración de IL-8¹⁶⁹. Se trata de un estudio aleatorizado de 3 meses de duración en 45 pacientes con FQ mayores de 7 años, con 3 ramas de tratamiento: mezcla de omega-3, mezcla de omega-6 y placebo. A los 3 meses, la concentración de IL-8 en suero descendió en el grupo suplementado con omega-3 (dosis de DHA 15 veces menor que en nuestro estudio), mientras que no varió ni en el grupo suplementado con omega-6 (en el que hubo un incremento estadísticamente no significativo) ni en el grupo control¹⁶⁹.

Los resultados obtenidos en las variables secundarias de inflamación sistémica son acordes a los publicados en la literatura. El estudio de Keen y colaboradores, no encontró diferencias en ninguno de los marcadores inflamatorios estudiados en suero (IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF- α , PCR), más allá del descrito previamente para IL-8¹⁶⁹. Otros estudios tampoco han encontrado diferencias significativas en TNF- α ^{198, 199}, PCR^{164, 172, 198, 199}, VSG^{172, 200}, IgG^{172, 200} o cifras de neutrófilos totales¹⁷². Tan sólo unos pocos estudios han encontrado cambios significativos en marcadores inflamatorios tras la suplementación con PUFA. Un estudio antiguo, no controlado, en 20 pacientes con FQ a los que se suministró AL durante 12 meses, encontró una disminución de PGF2 α (PG de acción broncoconstrictora) y aumento de PGE2 (PG de acción broncodilatadora), sin datos sobre marcadores específicamente relacionados con la inflamación²⁰¹. En el estudio ya descrito de Lawrence y colaboradores se encontró, como se ha mencionado, una disminución en el número total de leucocitos y neutrófilos en el grupo suplementado con EPA¹⁶¹. En un estudio no controlado, de 8 meses de duración, en el que 30 pacientes con FQ entre 0.8 y 24 años recibieron una mezcla de EPA y DHA (dosis por peso no especificada), se encontró una disminución en las concentraciones séricas de IgG y α 1-AT, aunque no de PCR¹⁶⁴. Otro estudio no controlado, en 19 pacientes con FQ mayores de 16 años, que recibieron una mezcla de

PUFA con un contenido de DHA unas 10 veces menor que nuestro estudio, durante 12 meses, también encontró una disminución de TNF- α a los 6 y 12 meses de estudio¹⁷¹.

En este punto, merecen una discusión más detenida los resultados obtenidos en el análisis *post hoc* realizado únicamente en pacientes con inflamación detectable en la visita basal. Centrándonos en el modelo de cambio semana a semana, ajustado por todos los posibles factores de confusión, se observó que los valores de IL-8 permanecieron estables en el grupo DHA (cambio semana a semana 26.66 pc/mL, IC_{95%} -202.17; 255.49), mientras que se incrementaron de manera significativa en el grupo control (cambio semana a semana 474.29 pc/mL, IC_{95%} 135.42; 813.16), y esta diferencia era estadísticamente significativa ($p=0.030$). Una explicación a estos hallazgos, en principio contrarios a todos los hallazgos sobre inflamación del estudio, es que en los pacientes sin inflamación detectable es difícil que se aprecien cambios en la inflamación. Esta podría ser la razón por la cual los estudios más antiguos, que incluyen pacientes en situaciones clínicas peores y, probablemente, con mayor inflamación basal, sí encuentran cambios significativos en parámetros inflamatorios, mientras que los resultados en los estudios más recientes son más heterogéneos. Por otro lado, los cambios que se han observado no son una disminución de la inflamación en el grupo de tratamiento con DHA, sino un empeoramiento en el grupo control, y este empeoramiento debería haberse encontrado también en los pacientes del grupo control sin inflamación basal. Dado que es un hallazgo único, no encontrado en otros marcadores inflamatorios, y en un análisis estadístico *post hoc* no planeado inicialmente, debe valorarse con mucha cautela.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los publicados en la literatura. Los estudios más antiguos, con pacientes en situaciones clínicas probablemente más graves que los incluidos en nuestro estudio, muestran mejorías en parámetros inflamatorios, aunque son parámetros diferentes a los usados en este estudio y la comparación directa tampoco es apropiada. La mayoría de los estudios recientes obtienen resultados similares a los nuestros, sin cambios significativos en los biomarcadores inflamatorios en suero, aunque las diferencias en el tipo de suplementación (DHA, EPA o mezcla de omega-3) y en la dosis empleada de DHA hacen muy difícil la comparación directa. En relación con la diferencia aislada que se ha encontrado en IL-8 en suero en el

subgrupo de pacientes con inflamación detectable al inicio del estudio, no es posible sacar conclusiones debido a que no hay ningún otro dato en el estudio que corrobore este hallazgo. Consideramos que los futuros trabajos que evalúen el efecto de la suplementación con DHA en la FQ deberían estudiar específicamente a la población con inflamación detectable.

3.- Resultados sobre la inflamación intestinal

Los resultados obtenidos de calprotectina en heces no mostraron ningún efecto significativo de la suplementación con DHA, ni al final del estudio (semana 48), ni en el modelo de regresión que evaluó el cambio semana a semana.

La calprotectina es un marcador de inflamación intestinal que ha demostrado ser útil en la FQ²⁰², con capacidad de detectar cambios con el tratamiento antibiótico²⁰³ o la suplementación con probióticos²⁰⁴, por ejemplo. Estudios previos han demostrado que la suplementación oral con DHA en pacientes con FQ es capaz de incrementar el contenido tisular de DHA a nivel intestinal²⁰⁵, pero el único estudio que ha valorado la inflamación intestinal mediante la calprotectina fecal no encontró ningún efecto de la suplementación con DHA durante 6 meses¹⁹⁹. Los resultados de nuestro estudio, en el que no se han encontrado cambios significativos con la suplementación con DHA en los niveles de calprotectina fecal, concuerdan con los estudios previamente publicados.

4.- Resultados clínicos

4.1.- Variables clínicas relacionadas con la afectación respiratoria en la fibrosis quística

Los resultados obtenidos de FEV₁, como medida de la FP, no mostraron ningún efecto significativo de la suplementación con DHA, ni al final del estudio (semana 48), ni en el modelo de regresión que evaluó el cambio semana a semana.

A pesar de que últimamente se ha puesto en duda su utilidad, sobre todo en los estadios iniciales de la enfermedad, el FEV₁ es el parámetro que mejor se relaciona con la progresión de la enfermedad pulmonar y la mortalidad en la FQ²⁰⁶. Es una prueba sencilla, muy accesible, y que forma parte de la evaluación habitual de todos los pacientes con FQ a partir de los 4-5 años de edad¹⁴. La mayoría de los estudios de DHA en FQ han evaluado la FP, al menos como variable secundaria, sin encontrar ningún efecto beneficioso de la suplementación de DHA sobre este parámetro^{163, 166, 169, 172, 197, 198, 200, 201, 205, 207-209}. El estudio de Leggieri y colaboradores, aunque refiere mejoría del FEV₁, ésta sólo se produce como valor absoluto (159 mL), tal y como es esperable al ser una población pediátrica en crecimiento, y no en el porcentaje sobre el predicho, que pasa del 91% basal al 85.4% al final de los 12 meses del estudio¹⁹⁹. El estudio de De Vizia y colaboradores refiere en el texto una mejoría del FEV₁ predicho tras 8 meses de suplementación con EPA y DHA, pero en realidad el cambio supone una pérdida significativa ($p < 0.05$) de FEV₁ desde 61% (basal) a 57% (8 meses)¹⁶⁴.

El estudio de Lawrence y colaboradores, sí encontró una mejoría del FEV₁ al final de las 6 semanas de tratamiento en el grupo que recibió la suplementación con EPA (EPA 0.25 L, placebo -0.1 L; $p = 0.006$)¹⁶¹, aunque, como ya se ha comentado antes, la población de estudio probablemente no es comparable a la nuestra debido a que el estudio es antiguo y los pacientes incluidos tenían una situación clínica mucho peor a la de los pacientes incluidos en nuestro estudio. El único estudio reciente que refiere una mejoría de la FP es el de Olveira y colaboradores, un estudio no controlado, en adultos, que refiere una mejoría mínima en el FEV₁ medido en valor absoluto (0.167 L, $p = 0.02$), pero no en % sobre el predicho (+2%, $p = n.s.$)¹⁷¹.

Los resultados obtenidos en relación con la FP son, por tanto, coincidentes con los resultados publicados en la literatura, que indican que no hay un efecto beneficioso de la suplementación con DHA sobre la FP.

Una de las variables respiratorias de mayor interés en la FQ son las EP, no sólo por el deterioro agudo que suponen para el paciente, sino por el impacto que tienen sobre la evolución de la enfermedad²¹⁰. En nuestro estudio, no se ha encontrado ningún efecto beneficioso de la suplementación con DHA sobre las EP, con tasas de EP similares en ambos grupos de estudio, aunque existía una tendencia a una menor incidencia de EP graves en el grupo tratado con DHA ($p=0.096$). A pesar de la importancia de las EP en la evolución de la FQ, no es una variable recogida de manera sistemática en los estudios publicados. La mayoría de los estudios que sí valoraron las EP no encontraron ningún efecto de la suplementación con DHA o EPA sobre el número de estas o el número de días con tratamiento antibiótico^{169, 198, 200}. El estudio de Olveira y colaboradores, que como ya se ha comentado es un estudio no controlado y realizado en población adulta, encuentra una disminución significativa en el número de EP en el año de suplementación con una mezcla de PUFA (DHA, EPA, LA y GLA) en relación con el año previo ($3,1\pm 2$ vs $2,2\pm 1,4$, $p<0.05$), aunque no en el número de EP graves ($0,7\pm 0,8$ vs $0,4\pm 0,6$, $p=n.s.$)¹⁷¹. También refiere un menor número total de días de antibiótico (47 ± 33 vs 32 ± 22 , $p<0.05$), aunque la diferencia no es significativa cuando se desglosa en número de días con antibiótico oral (39 ± 25 vs 27 ± 21 , $p=n.s.$) o con antibiótico intravenoso (8 ± 12 vs 4 ± 8)¹⁷¹. Solamente un estudio controlado con placebo, de 12 meses de duración, en el que 15 pacientes con FQ recibieron una mezcla de DHA y EPA, encontró diferencias en el número de EP y en el número de días de antibiótico durante el año de estudio¹⁷². En este estudio se comparó el número de EP en el grupo suplementado con el número de EP que el mismo grupo había presentado en el año previo (1.7 [1–3] vs 3 [1–6], $p=0.01$), pero no se hizo la comparación directa con el grupo control. Sí realizaron una comparación directa en el número de días de antibiótico que recibieron los dos grupos durante el periodo de estudio, y encontraron diferencias a favor del grupo suplementado con DHA y EPA (días de antibiótico intravenoso 6 vs 121 ; días de antibiótico oral 172 vs 402 , $p=0.01$)¹⁷². Una posible explicación a estas diferencias podría ser el tipo de suplementación; en nuestro estudio, y en la mayoría de los

estudios que no encontraron diferencias en el número de EP, sólo se empleó DHA como suplemento. Por otro lado, el estudio de Keen y colaboradores, que tampoco encontró diferencias en el número de EP, sí utilizó una mezcla de PUFA¹⁶⁹, lo que indica que no todos los datos apoyan esta hipótesis. Otra posible explicación sería que, aunque Hanssens y colaboradores refieren que no hay diferencias basales en los grupos de estudio, probablemente por el escaso número de participantes (n=15), la FP era bastante peor en el grupo que recibió placebo (%FEV₁ 83 [64–121] vs 65 [47–104]). Esta peor FP podría explicar que el grupo control tuviera mayor número de EP y más necesidad de tratamientos antibióticos intravenosos. La última revisión Cochrane, que incluye el estudio de Hanssens, apunta este hecho como una limitación del estudio y una posible explicación a las diferencias observadas en las EP y días de antibiótico¹⁷³.

En relación con la microbiología de las SR, no hemos encontrado ningún estudio que valore el efecto de la suplementación con PUFA sobre ella. Un estudio diseñado para valorar la composición de PUFA en pacientes con FQ y su relación con la clínica o el genotipo no encontró ninguna relación entre la composición de PUFA en suero y la tasa de infección bronquial crónica por *P. aeruginosa*²¹¹. En nuestro estudio, no hemos encontrado ningún efecto de la suplementación con DHA sobre la tasa de adquisición de *P. aeruginosa* (en pacientes sin infección bronquial crónica) ni en el tiempo hasta la primoinfección por este microorganismo.

4.2.- Variables clínicas relacionadas con la afectación digestiva/nutricional en la fibrosis quística

Los resultados observados en el peso y el IMC no mostraron ningún efecto significativo de la suplementación con DHA, ni al final del estudio (semana 48), ni en el modelo de regresión que evaluó el cambio semana a semana.

Uno de los primeros estudios sobre suplementación con PUFA en FQ, no controlado, mostraba un aumento significativo de peso²⁰¹, aunque la mayoría de los estudios que han valorado este parámetro no encuentran ninguna diferencia en el peso o el IMC^{161-164, 166, 169, 172, 198-200, 209, 212}. Un solo estudio refiere aumento de peso en el grupo suplementado con LA de 1.2 kg en 3 meses, mientras que

el grupo control el peso no varió de forma significativa²⁰⁸. El estudio, ya comentado previamente, de Oliveira y colaboradores refiere un aumento de la masa magra y del perímetro del brazo tras 1 año de suplementación con una mezcla de PUFA (DHA, EPA, LA y GLA), pero sin cambios significativos en el peso o el IMC¹⁷¹.

La literatura no ofrece, por tanto, datos que sugieran ningún efecto significativo de la suplementación con PUFA sobre el peso o el IMC, lo que concuerda con los resultados de nuestro trabajo.

La suplementación con PUFA, dado que aumenta la ingesta de lípidos, podría aumentar la esteatorrea y la necesidad de enzimas pancreáticos en el paciente con FQ. Esto último no está del todo claro, porque mientras algunos estudios han publicado un aumento de la necesidad de enzimas pancreáticos durante el periodo de suplementación^{161, 162}, otros no refieren ningún cambio significativo¹⁹⁸. Al final de nuestro estudio no hubo diferencias en la dosis de enzimas pancreáticos entre el grupo DHA y el grupo control. Sin embargo, el modelo de regresión sí muestra que en el grupo DHA existe un pequeño aumento semana a semana de la dosis de enzimas (9.66 UL/kg/día, IC_{95%} 2.95; 16.38), que no se encuentra en el grupo control (1.21 UL/kg/día, IC_{95%} -5.24; 7.65). La comparación entre grupos, por otra parte, no encontró diferencias significativas ($p=0.075$). Estos hallazgos podrían interpretarse como que la suplementación con DHA precisa de un pequeño aumento de la dosis de enzimas pancreáticos, pero este aumento no es suficiente para suponer una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control. Esta interpretación concuerda con los estudios publicados y es, además, plausible desde el punto de vista biológico dado que la suplementación con DHA supone un aporte mayor de grasas. Algo similar ocurriría con los datos obtenidos en este estudio en relación con la absorción de grasas, en la que se observa una mínima diferencia en el CRG entre grupos, que alcanza la significación estadística ($p=0.034$). No obstante, tampoco se puede descartar que esta última asociación sea efecto del elevado número de comparaciones realizadas.

4.3.- Calidad de vida

La medición de la calidad de vida permite valorar la perspectiva relacionada con la salud que tiene el paciente con FQ²¹³. A pesar de la importancia de contar con esa perspectiva, casi ninguno de los estudios publicados sobre el efecto de la suplementación con PUFA en la FQ ha valorado la calidad de vida. El único estudio que lo hace (utilizando un cuestionario no específico para FQ y diferente al que se ha usado en este estudio -cuestionario de St. George-) no encontró ningún efecto de la suplementación con una mezcla de PUFA durante 12 meses sobre la calidad de vida¹⁷¹. En el presente estudio no se encontró ninguna diferencia en ninguna de las visitas, en ninguno de los dominios del cuestionario CFQ-R, entre el grupo que recibió la suplementación con DHA y el grupo control. Con la intención de aumentar el número de pacientes incluidos en el análisis se agruparon las puntuaciones de los dominios iguales de las versiones para niños y adultos del cuestionario. El modelo de regresión, con estas puntuaciones agrupadas, tampoco encontró ninguna diferencia entre los grupos de estudio, a excepción de una pequeña diferencia, estadísticamente significativa ($p=0.045$), en el dominio “imagen corporal”. Este hallazgo aislado es difícil de interpretar. El dominio “imagen corporal” de forma aislada tiene escaso valor, aunque su puntuación se ha relacionado con la gravedad de las bronquiectasias en adultos con FQ²¹⁴. Las mejorías en la puntuación de este dominio habitualmente se acompañan de mejoría en otros dominios del cuestionario^{195, 215}, y no hemos encontrado referencias en la literatura que indiquen el significado de cambios aislados en este dominio. Tampoco hemos encontrado trabajos que valoren el cambio mínimo significativo en este dominio, aunque el cambio observado estaría en el límite de la mínima diferencia clínicamente relevante establecida para el dominio respiratorio en pacientes estables¹⁸⁹. Teniendo todo esto en cuenta, es poco probable que este hallazgo aislado traduzca un verdadero beneficio sobre la calidad de vida.

4.4.- Perfil de ácidos grasos poliinsaturados en plasma y membrana de eritrocito

El efecto de la suplementación con PUFA sobre el perfil de PUFA en pacientes con FQ está bastante descrito. La suplementación con LA fue de las primeras en ser estudiadas. En pacientes con FQ y un déficit demostrado de AGE, el aporte exógeno de LA fue capaz de incrementar sus niveles en

plasma y membrana de eritrocito²⁰¹. Otros estudios en los que se empleó también LA como suplemento también consiguieron incrementar los niveles de este hasta su normalización^{208, 212}.

Varios estudios han valorado las modificaciones que la suplementación con una mezcla de DHA y EPA induce en los PUFA de la serie omega-3. En uno de ellos, la suplementación con DHA y EPA en pacientes con FQ fue capaz de incrementar los niveles plasmáticos de estos a las 6 semanas de tratamiento, aunque estos cambios se revirtieron a las 6 semanas de la suspensión de la suplementación¹⁶². Otros estudios en los que se empleó una suplementación con EPA y DHA también encontraron incrementos similares de estos PUFA en plasma^{164, 172, 207} y membrana de eritrocito¹⁶⁴. El único estudio que utilizó una suplementación únicamente con EPA no valoró su efecto sobre el perfil de PUFA¹⁶⁵.

Los estudios que han empleado mezclas de PUFA tienen resultados menos homogéneos; mientras que en uno de ellos se encontró un incremento de EPA y DHA en la membrana de plaquetas¹⁶⁶, en otro estudio no se evidenciaron cambios en la membrana de neutrófilos¹⁶³. El estudio de Oliveira y colaboradores, que empleó una mezcla de varios PUFA (DHA, EPA, LA y GLA) y vitamina E evidenció un incremento del cociente DHA/AA tras la suplementación¹⁷¹. El estudio de Keen y colaboradores que, como ya se ha comentado antes, tenía tres ramas de tratamiento (omega-3, omega-6 y placebo), encontró un incremento de DHA y EPA en el grupo tratado con omega-3, un descenso de DHA en el grupo tratado con omega-6 y ningún cambio en el grupo control¹⁶⁹.

En relación con los estudios que han empleado DHA como suplemento, todos ellos encuentran, sin excepción, un incremento en los niveles de DHA en plasma^{197, 198, 200, 205, 209} y/o membrana de eritrocito^{205, 209}, y en algún caso también incrementos de EPA²⁰⁰. Los resultados obtenidos en este estudio en relación con los PUFA omega-3 están, por tanto, dentro de lo esperado, con un incremento significativo de los niveles de DHA y EPA en el grupo de intervención, tanto a las 24 como a las 48 semanas de estudio, que no se evidenció en el grupo control. No se evidenciaron, tampoco, cambios en el ALA, probablemente debido a que se trata de un precursor en la vía de los omega-3.

Sobre el efecto de la suplementación con PUFA en la vía de los omega-6, no todos los estudios ofrecen datos. De los estudios que utilizan como suplemento un precursor de la vía omega-6 como el

LA, sólo uno de ellos ofrece este dato, y refiere un incremento significativo del AA²⁰⁸. Los estudios que emplean suplementos con PUFA omega-3, ya sea DHA, EPA, DHA y EPA o una mezcla de omega-3, refieren sistemáticamente un descenso de los niveles de AA^{164, 172, 200, 205, 209}. En los estudios cuya variable era el índice DHA/AA, el incremento de este se asoció fundamentalmente con incrementos de DHA, sin que se observase un descenso significativo de los niveles de AA^{171, 197, 198}. Sólo dos estudios ofrecen datos sobre otros PUFA de la serie omega-6, observando también un descenso tras la suplementación con DHA^{200, 209}. En el presente estudio, se observa un descenso pequeño, aunque significativo, de los niveles de AA en el grupo suplementado con DHA, tanto en valor absoluto como en porcentaje sobre el total de PUFA, a las 24 semanas de estudio. Sin embargo, al final del estudio (semana 48), la proporción de AA fue similar en las 2 ramas del estudio, aunque se mantuvieron las diferencias en valor absoluto. Esto podría deberse simplemente a cambios en los otros PUFA, que hayan modificado el porcentaje que el AA representa sobre el total estos, aunque no puede descartarse que el descenso del AA no haya sido, al menos, tan marcado como el descrito en otros estudios.

Una posible explicación sería la falta de adherencia en la segunda mitad del estudio. Sin embargo, dado que la adherencia medida por la medicación administrada y recogida fue muy alta a lo largo de todo el estudio, y que los cambios observados en la semana 24 en la serie omega-3 permanecen iguales en la semana 48, esto no parece probable. Otra posible explicación es que, como se observa en la Tabla 5, el producto empleado en el estudio contenía casi un 20% de DPA-n6, un PUFA del final de la vía omega-6. La retroconversión de DPA-n6 a AA se ha descrito en modelos celulares y animales, de manera similar a como se produce la retroconversión de DHA a EPA²¹⁶. Esto podría, en última instancia, haber sido una fuente inadvertida de AA durante el estudio. Sin embargo, esta retroconversión no se ha descrito específicamente en pacientes con FQ y los estudios en humanos indican que, aunque es un fenómeno existente, no contribuye de manera significativa al incremento de EPA en los pacientes suplementados con DHA²¹⁷. Por este motivo, aunque no se puede descartar la existencia de cierta cantidad de retroconversión de DPA-n6 a AA, no es esperable que haya contribuido de forma significativa a los niveles finales de AA encontrados.

Al igual que en la serie omega-3, en la serie omega-6 se observa un descenso del GLA, precursor inmediato del AA, pero no del LA, que es un precursor muy anterior en la vía metabólica de los omega-6.

Por último, hay que destacar la ausencia de datos sobre el perfil de PUFA en la membrana de los eritrocitos debido a problemas de reproducibilidad con la técnica de análisis. Los cambios en el perfil de PUFA en la membrana de eritrocito son más estables que los cambios plasmáticos y, por tanto, son un mejor indicador de la adherencia terapéutica, motivo por el que es una variable incluida en muchos de los estudios de suplementación con PUFA en FQ^{162, 164, 201, 205, 209}. Otros estudios han estudiado las membranas de otros tipos celulares, como neutrófilo¹⁶³ o plaquetas¹⁶⁶, aunque otros tantos no estudian los PUFA en las membranas de ningún tipo celular^{169, 171, 198-200, 207}. En nuestro estudio, a pesar de la ausencia de los datos de PUFA en membranas, disponemos de otros indicadores de la buena adherencia, como los cambios en el perfil de PUFA en plasma, que se mantienen en la semana 48 de estudio, y el recuento de envases de medicación.

4.5.- Seguridad

En este estudio la suplementación con DHA se ha demostrado segura. El número de efectos secundarios, descontando las EP y las infecciones bronquiales bacterianas, que son propias de la FQ, es muy bajo, y similar en ambos grupos de tratamiento. Hay que destacar que se han incluido pacientes desde los 2 meses de edad, una edad muy por debajo de los estudios publicados hasta la fecha y, por ello, una demanda de la última revisión Cochrane sobre la suplementación con omega-3 en FQ¹⁷³. Tan sólo un estudio (NCT00530244) ha valorado la suplementación con DHA en el primer año de vida, pero, aunque consta como terminado en 2018 en *ClinicalTrials.gov*, todavía no se han publicado los resultados. El número de abandonos fue similar en ambos grupos de tratamiento, aunque los motivos potencialmente relacionados con el suplemento (mal sabor, intolerancia gastrointestinal) sólo se dieron en el grupo que tomó DHA. Todos los estudios publicados hasta la fecha refieren buena tolerancia y prácticamente ausencia de efectos secundarios, con excepción de elevación de gamma-glutamyl transferasa en 1 paciente²⁰⁵ o, con más frecuencia, molestias gastrointestinales o problemas

con el sabor del suplemento^{162, 169, 171, 172, 200, 201}. El número de abandonos también es muy bajo y, cuando se especifica el motivo, predominan también las molestias gastrointestinales^{162, 171, 172}. El número y tipo de efectos secundarios observados en el estudio son, por tanto, similares a los publicados en estudios de suplementación con DHA en FQ. Se podría concluir que la administración de DHA es segura en este tipo de pacientes.

5.- Fortalezas del estudio

La última revisión Cochrane sobre suplementación con omega-3 en FQ destacaba la necesidad de estudios a largo plazo con un número adecuado de pacientes¹⁷³. Esas son, precisamente, dos de las fortalezas de este trabajo que es importante resaltar. En primer lugar, es el estudio con un mayor número de pacientes que ha estudiado la suplementación con DHA en FQ, alcanzando, prácticamente, el tamaño muestral establecido *a priori*. Además, los pacientes se han seguido durante 48 semanas, tiempo suficiente para poder valorar el efecto de una suplementación con PUFA.

Es importante destacar también el diseño del estudio. Los estudios clínicos, aleatorizados, doble ciego y controlados con placebo presentan el mejor diseño para valorar el efecto de un tratamiento y son una necesidad, sobre todo en la población pediátrica, donde suelen ser escasos²¹⁸. Este tipo de estudios ofrecen datos consistentes y con una elevada validez interna. El uso de un algoritmo adaptativo de minimización en la fase de aleatorización de pacientes permitió distribuir los pacientes de forma balanceada entre los grupos, en función de características que pudieran interferir con la suplementación con DHA o el proceso inflamatorio crónico (edad, FEV₁, infección bronquial crónica por *P. aeruginosa*, tratamiento con DNasa y tratamiento crónico con azitromicina), lo que ayuda a minimizar el riesgo de sesgos y aumenta la validez interna del estudio.

El mayor inconveniente que presentan los estudios clínicos es que con frecuencia tienen criterios de inclusión y exclusión muy estrictos, lo que puede limitar su validez externa²¹⁹. El presente estudio tiene varias características que influyen positivamente en su validez externa, haciendo que los resultados obtenidos sean fácilmente aplicables a la práctica clínica habitual: la población de estudio es similar a la de cualquier unidad de FQ, las unidades de FQ en las que se desarrolla el estudio son representativas del resto de unidades del país, los criterios de inclusión y exclusión no son excesivamente estrictos y permiten que la mayoría de los pacientes que acuden a una unidad de FQ puedan participar en el estudio, el protocolo de estudio se ajusta a la práctica clínica habitual y las variables estudiadas (con excepción de los marcadores inflamatorios) son variables de utilidad clínica, fácilmente medibles y habitualmente empleadas en la práctica clínica diaria²²⁰.

Otra fortaleza del estudio es la cantidad de variables que se han estudiado, tanto a nivel bioquímico como clínico, lo que ofrece una amplia perspectiva del efecto de la suplementación con DHA en pacientes con FQ.

Por último, la elevada adherencia al tratamiento durante el estudio permite concluir que los resultados obtenidos responden, efectivamente, al efecto de la suplementación con DHA en pacientes con FQ.

6.- Limitaciones del estudio

Existen también algunas limitaciones que deben ser expuestas.

En primer lugar, la población de estudio es bastante heterogénea, ya que incluye pacientes con edades muy distintas y diferentes grados de afectación. Aunque en teoría esta heterogeneidad podría minimizar el efecto del DHA, creemos poco probable que sea así ya que los análisis de subgrupos y el análisis realizado en pacientes con inflamación detectable muestran resultados similares. Es más, el hecho de incluir una amplia variedad de pacientes, muy similar a los que tiene cualquier unidad de FQ, lejos de ser una limitación, es una característica que incrementa la validez externa del estudio y permite la generalización de los resultados. Sí podría ser una limitación el escaso número de pacientes incluidos con una afectación pulmonar grave. Esta limitación hace que los resultados del estudio no puedan aplicarse directamente a este tipo de pacientes y que, con los resultados de este estudio, no se pueda descartar que la suplementación con DHA tenga algún efecto beneficioso sobre esta población concreta.

Otra limitación importante es la elevada dispersión de alguna de las variables estudiadas, como la IL-8, y la valoración al final del estudio de un número menor de pacientes y muestras del previsto. Aunque el uso de pruebas no paramétricas es un método adecuado para controlar la asimetría y la sobredispersión, probablemente la potencia estadística del estudio es algo menor que la calculada. No obstante, los análisis tras la transformación logarítmica y el modelo de efectos mixtos arrojan resultados similares, lo que apoya los resultados obtenidos.

La determinación de PUFA en la membrana de los eritrocitos formaba parte del protocolo inicial del estudio, y su no realización debida a problemas técnicos es otra limitación importante de este trabajo, aunque se dispone de datos alternativos que sugieren una elevada adherencia al tratamiento.

También hay que reseñar, como se ha explicado anteriormente, que a pesar de que la luz de la vía aérea de los pacientes con FQ contiene abundantes mediadores proinflamatorios³⁷, las muestras de SR están sujetas a cierta variabilidad en función de la técnica empleada. Una proporción importante

de la población de estudio era de corta edad e incapaz de realizar la técnica del EI, por lo que la muestra de SR que se analizó fue el ANF, que no es directamente comparable al esputo.

Existe también una limitación en relación con el suplemento de DHA empleado. De acuerdo con la etiqueta comercial, el suplemento contenía, en teoría, únicamente DHA. Pero en realidad, como se comprobó tras un análisis independiente, el suplemento contenía hasta un 20% de DPA-n6. Como se ha explicado, el DPA-n6 podría haber supuesto, mediante retroconversión, una fuente inadvertida de AA. Ya se ha comentado en la discusión que, aunque no se puede descartar su existencia, no es probable que esto haya contribuido de forma significativa a los niveles observados de AA.

Por último, a pesar del proceso de aleatorización, el número de copias de la mutación Phe.508del (0, 1 o 2) no se distribuyó de forma balanceada entre los grupos, por lo que todos los análisis se ajustaron, entre otras, por esa variable.

CONCLUSIONES

En relación con el objetivo principal del estudio:

- La suplementación a largo plazo con DHA en pacientes con FQ mayores de 2 meses no se asoció con cambios significativos en la inflamación pulmonar.
- La suplementación a largo plazo con DHA en pacientes con FQ mayores de 2 meses no se asoció con cambios significativos en la inflamación sistémica.
- La suplementación a largo plazo con DHA en pacientes con FQ mayores de 2 meses no se asoció con cambios significativos en la inflamación intestinal.

En relación con los objetivos secundarios del estudio:

- La suplementación a largo plazo con DHA en pacientes con FQ mayores de 2 meses no se asoció con ninguna mejoría clínica en variables relacionadas con la afectación pulmonar como el FEV₁, la tasa de exacerbaciones pulmonares o la tasa de adquisición de *P. aeruginosa*.
- La suplementación a largo plazo con DHA en pacientes con FQ mayores de 2 meses no se asoció con cambios significativos en variables relacionadas con la afectación digestiva como el peso, el IMC, la necesidad de enzimas pancreáticos o el coeficiente de reabsorción de grasas.
- La suplementación a largo plazo con DHA en pacientes con FQ mayores de 2 meses no se asoció con cambios significativos en la calidad de vida de los pacientes.
- La suplementación a largo plazo con DHA en pacientes con FQ mayores de 2 años se asoció con un incremento en plasma de los PUFA de la serie omega-3 y un descenso de los PUFA de la serie omega-6.
- La suplementación a largo plazo con DHA en pacientes con FQ mayores de 2 años es segura y no se asoció a efectos adversos importantes.

Consideraciones finales

Como se ha expuesto, la suplementación a largo plazo con DHA en pacientes FQ no se ha asociado, en este estudio, con ningún efecto significativo a nivel bioquímico ni clínico. Los resultados obtenidos concuerdan con los resultados de otros estudios similares publicados. Aunque muchos de los estudios publicados refieren algún beneficio aislado (bioquímico o clínico) derivado de la suplementación con PUFA en FQ, en cada uno de los epígrafes que se han expuesto la mayoría de las referencias bibliográficas coinciden con los resultados de este estudio.

La dificultad para comparar estudios directamente, por las diferencias metodológicas y los diferentes tipos de PUFA utilizados en la suplementación, unido al diferente enfoque de cada uno y las diferentes variables empleadas, puede confundir al lector sobre los beneficios obtenidos. En general, todos los trabajos intentan destacar alguna diferencia encontrada, independientemente de su relevancia clínica, aunque la mayoría de las variables que estudian no se hayan modificado de forma significativa. Pero lo cierto es que el único resultado que es relativamente constante, y que también se ha obtenido en este estudio, es el aumento de los PUFA de la serie omega-3 y la disminución de los PUFA de la serie omega-6, ya sea en plasma o en membrana de eritrocito. La utilidad clínica de este hallazgo no está todavía establecida, más allá del marco teórico de corregir la alteración en el índice omega-3/omega-6. Para el resto de las variables, tanto bioquímicas como, sobre todo, clínicas, la mayoría de los estudios, como este, no obtienen resultados positivos.

En línea con la conclusión de la última revisión Cochrane, los resultados de este estudio no permiten aconsejar de forma rutinaria la suplementación con DHA en los pacientes con FQ. Sin embargo, no se puede descartar que exista algún beneficio de la suplementación con DHA en pacientes con afectación grave o con elevados niveles de inflamación, o a dosis diferentes de las empleadas en este estudio. Los futuros estudios que evalúen los beneficios de la suplementación con PUFA en FQ deberían centrarse en estos objetivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ratjen F, Bell SC, Rowe SM, Goss CH, Quittner AL, Bush A. Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15010 doi: 10.1038/nrdp.2015.10
2. Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, Macek M, Madge S, Davies JC, et al. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *Lancet Respir Med* 2020;8:65-124 doi: 10.1016/s2213-2600(19)30337-6
3. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 2016;4:662-74 doi: 10.1016/S2213-2600(16)00023-0
4. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* 2009;373:1891-904 doi: 10.1016/S0140-6736(09)60327-5
5. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr* 2017;181S:S4-S15 e1 doi: 10.1016/j.jpeds.2016.09.064
6. Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Dankert Roelse J, Duff A, Farrell M, et al. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros* 2009;8:153-73 doi: 10.1016/j.jcf.2009.01.004
7. Geller DE, Rubin BK. Respiratory care and cystic fibrosis. *Respir Care* 2009;54:796-800 doi: 10.4187/002013209790983241
8. Rottner M, Freyssinet JM, Martinez MC. Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respir Res* 2009;10:23 doi: 10.1186/1465-9921-10-23
9. O'Sullivan BP, Flume P. The clinical approach to lung disease in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2009;30:505-13 doi: 10.1055/s-0029-1238909
10. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:475-82 doi: 10.1164/rccm.200505-840OE
11. Castellani C, Assael BM. Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:129-40 doi: 10.1007/s00018-016-2393-9
12. Shanthikumar S, Neeland MN, Saffery R, Ranganathan S. Gene modifiers of cystic fibrosis lung disease: A systematic review. *Pediatr Pulmonol* 2019;54:1356-66 doi: 10.1002/ppul.24366
13. Conway S, Balfour-Lynn IM, De Rijcke K, Drevinek P, Foweraker J, Havermans T, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Framework for the Cystic Fibrosis Centre. *J Cyst Fibros* 2014;13 Suppl 1:S3-22 doi: 10.1016/j.jcf.2014.03.009
14. Castellani C, Duff AJA, Bell SC, Heijerman HGM, Munck A, Ratjen F, et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *Journal of Cystic Fibrosis* 2018;17:153-78 doi: 10.1016/j.jcf.2018.02.006
15. Turck D, Braegger CP, Colombo C, Declercq D, Morton A, Pancheva R, et al. ESPEN-ESPGHAN-ECFS guidelines on nutrition care for infants, children, and adults with cystic fibrosis. *Clin Nutr* 2016;35:557-77 doi: 10.1016/j.clnu.2016.03.004

16. Flume PA, Mogayzel PJ, Jr., Robinson KA, Goss CH, Rosenblatt RL, Kuhn RJ, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: treatment of pulmonary exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:802-8 doi: 10.1164/rccm.200812-1845PP
17. Lenney W. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis is potentially serious, and more than merely a marker for disease severity. *Paediatr Respir Rev* 2015;16 Suppl 1:35-6 doi: 10.1016/j.prrv.2015.07.016
18. Taccetti G, Campana S, Festini F, Mascherini M, Döring G. Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2005;26:458-61 doi: 10.1183/09031936.05.00009605
19. Cantón R, Máiz L, Escribano A, Olveira C, Oliver A, Asensio O, et al. Consenso español para la prevención y el tratamiento de la infección bronquial por *Pseudomonas aeruginosa* en el paciente con fibrosis quística. *Arch Bronconeumol* 2015;51:140-50 doi: 10.1016/j.arbres.2014.09.021
20. Szentpetery S, Flume PA. Optimizing outcomes of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2018;24:606-11 doi: 10.1097/mcp.0000000000000519
21. Heltshe SL, Goss CH, Thompson V, Sagel SD, Sanders DB, Marshall BC, et al. Short-term and long-term response to pulmonary exacerbation treatment in cystic fibrosis. *Thorax* 2016;71:223-9 doi: 10.1136/thoraxjnl-2014-206750
22. Flume PA, Suthoff ED, Kosinski M, Marigowda G, Quittner AL. Measuring recovery in health-related quality of life during and after pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2019;18:737-42 doi: 10.1016/j.jcf.2018.12.004
23. Frerichs C, Smyth A. Treatment strategies for cystic fibrosis: what's in the pipeline? *Expert Opin Pharmacother* 2009;10:1191-202 doi: 10.1517/14656560902928896
24. Ramos KJ, Smith PJ, McKone EF, Pilewski JM, Lucy A, Hempstead SE, et al. Lung transplant referral for individuals with cystic fibrosis: Cystic Fibrosis Foundation consensus guidelines. *J Cyst Fibros* 2019;18:321-33 doi: 10.1016/j.jcf.2019.03.002
25. Grasemann H. CFTR Modulator Therapy for Cystic Fibrosis. *N Engl J Med* 2017;377:2085-88 doi: 10.1056/NEJMe1712335
26. Gentsch M, Mall MA. Ion Channel Modulators in Cystic Fibrosis. *Chest* 2018;154:383-93 doi: 10.1016/j.chest.2018.04.036
27. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Drevinek P, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med* 2011;365:1663-72 doi: 10.1056/NEJMoa1105185
28. Davies JC, Wainwright CE, Canny GJ, Chilvers MA, Howenstine MS, Munck A, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:1219-25 doi: 10.1164/rccm.201301-0153OC

29. Davies JC, Cunningham S, Harris WT, Lapey A, Regelmann WE, Sawicki GS, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2-5 years with cystic fibrosis and a CFTR gating mutation (KIWI): an open-label, single-arm study. *Lancet Respir Med* 2016;4:107-15 doi: 10.1016/s2213-2600(15)00545-7
30. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, et al. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 2015;373:220-31 doi: 10.1056/NEJMoa1409547
31. Ratjen F, Hug C, Marigowda G, Tian S, Huang X, Stanojevic S, et al. Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6-11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med* 2017;5:557-67 doi: 10.1016/s2213-2600(17)30215-1
32. Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, van der Ent CK, Moeller A, Simard C, et al. Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med* 2017;377:2013-23 doi: 10.1056/NEJMoa1709846
33. Heijerman HGM, McKone EF, Downey DG, Van Braeckel E, Rowe SM, Tullis E, et al. Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 2019;394:1940-8 doi: 10.1016/S0140-6736(19)32597-8
34. Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, Lands LC, McKone EF, Polineni D, et al. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med* 2019;381:1809-19 doi: 10.1056/NEJMoa1908639
35. Pranke I, Golec A, Hinzpeter A, Edelman A, Sermet-Gaudelus I. Emerging Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. From Gene Editing to Personalized Medicine. *Front Pharmacol* 2019;10:121 doi: 10.3389/fphar.2019.00121
36. Stephenson AL, Sykes J, Stanojevic S, Quon BS, Marshall BC, Petren K, et al. Survival Comparison of Patients With Cystic Fibrosis in Canada and the United States: A Population-Based Cohort Study. *Ann Intern Med* 2017;166:537-46 doi: 10.7326/M16-0858
37. Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2015;50 Suppl 40:S39-56 doi: 10.1002/ppul.23242
38. Roesch EA, Nichols DP, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis: An update. *Pediatr Pulmonol* 2018;53:S30-S50 doi: 10.1002/ppul.24129
39. Rosen BH, Evans TIA, Moll SR, Gray JS, Liang B, Sun X, et al. Infection Is Not Required for Mucoinflammatory Lung Disease in CFTR-Knockout Ferrets. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;197:1308-18 doi: 10.1164/rccm.201708-1616OC

40. Livraghi-Butrico A, Kelly EJ, Klem ER, Dang H, Wolfgang MC, Boucher RC, et al. Mucus clearance, MyD88-dependent and MyD88-independent immunity modulate lung susceptibility to spontaneous bacterial infection and inflammation. *Mucosal Immunol* 2012;5:397-408 doi: 10.1038/mi.2012.17
41. Hisert KB, Heltshe SL, Pope C, Jorth P, Wu X, Edwards RM, et al. Restoring Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Reduces Airway Bacteria and Inflammation in People with Cystic Fibrosis and Chronic Lung Infections. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:1617-28 doi: 10.1164/rccm.201609-1954OC
42. Rowe SM, Heltshe SL, Gonska T, Donaldson SH, Borowitz D, Gelfond D, et al. Clinical mechanism of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator ivacaftor in G551D-mediated cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;190:175-84 doi: 10.1164/rccm.201404-0703OC
43. Wagener JS, Kahn TZ, Copenhaver SC, Accurso FJ. Early inflammation and the development of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol Suppl* 1997;16:267-8 doi: 10.1002/ppul.19502308138
44. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1075-82 doi: 10.1164/ajrccm.151.4.7697234
45. Hostoffer RW, Krukovets I, Berger M. Enhancement by tumor necrosis factor-alpha of Fc alpha receptor expression and IgA-mediated superoxide generation and killing of *Pseudomonas aeruginosa* by polymorphonuclear leukocytes. *J Infect Dis* 1994;170:82-7 doi: 10.1093/infdis/170.1.82
46. Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, et al. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986;136:4220-5
47. Cerami A, Beutler B. The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. *Immunol Today* 1988;9:28-31
48. Saba S, Soong G, Greenberg S, Prince A. Bacterial stimulation of epithelial G-CSF and GM-CSF expression promotes PMN survival in CF airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:561-7 doi: 10.1165/rcmb.2002-0019OC
49. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, et al. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2111-8 doi: 10.1164/ajrccm.152.6.8520783
50. Bonfield TL, Konstan MW, Berger M. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:72-8 doi: 10.1016/s0091-6749(99)70116-8

51. Grasemann H, Michler E, Wallot M, Ratjen F. Decreased concentration of exhaled nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1997;24:173-7 doi: 10.1002/(sici)1099-0496(199709)24:3<173::aid-ppul2>3.0.co;2-o
52. Balfour-Lynn IM, Lavery A, Dinwiddie R. Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1996;75:319-22 doi: 10.1136/adc.75.4.319
53. Karp CL, Flick LM, Park KW, Softic S, Greer TM, Keledjian R, et al. Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nat Immunol* 2004;5:388-92 doi: 10.1038/ni1056
54. Ringholz FC, Buchanan PJ, Clarke DT, Millar RG, McDermott M, Linnane B, et al. Reduced 15-lipoxygenase 2 and lipoxin A4/leukotriene B4 ratio in children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2014;44:394-404 doi: 10.1183/09031936.00106013
55. Moss RB, Bocian RC, Hsu YP, Dong YJ, Kemna M, Wei T, et al. Reduced IL-10 secretion by CD4+ T lymphocytes expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Clin Exp Immunol* 1996;106:374-88 doi: 10.1046/j.1365-2249.1996.d01-826.x
56. Elmer HL, Brady KG, Drumm ML, Kelley TJ. Nitric oxide-mediated regulation of transepithelial sodium and chloride transport in murine nasal epithelium. *Am J Physiol* 1999;276:L466-73 doi: 10.1152/ajplung.1999.276.3.L466
57. Mhanna MJ, Ferkol T, Martin RJ, Dreshaj IA, van Heeckeren AM, Kelley TJ, et al. Nitric oxide deficiency contributes to impairment of airway relaxation in cystic fibrosis mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:621-6 doi: 10.1165/ajrcmb.24.5.4313
58. Smith AW, Green J, Eden CE, Watson ML. Nitric oxide-induced potentiation of the killing of *Burkholderia cepacia* by reactive oxygen species: implications for cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 1999;48:419-23 doi: 10.1099/00222615-48-5-419
59. Sato Y, Walley KR, Klut ME, English D, D'Yachkova Y, Hogg JC, et al. Nitric oxide reduces the sequestration of polymorphonuclear leukocytes in lung by changing deformability and CD18 expression. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1469-76 doi: 10.1164/ajrccm.159.5.9808063
60. Flitter BA, Hvorecny KL, Ono E, Eddens T, Yang J, Kwak DH, et al. *Pseudomonas aeruginosa* sabotages the generation of host proresolving lipid mediators. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114:136-41 doi: 10.1073/pnas.1610242114
61. Pierdomenico AM, Patruno S, Codagnone M, Simiele F, Mari VC, Plebani R, et al. microRNA-181b is increased in cystic fibrosis cells and impairs lipoxin A4 receptor-dependent mechanisms of inflammation resolution and antimicrobial defense. *Sci Rep* 2017;7:13519 doi: 10.1038/s41598-017-14055-y

62. Eickmeier O, Fussbroich D, Mueller K, Serve F, Smaczny C, Zielen S, et al. Pro-resolving lipid mediator Resolvin D1 serves as a marker of lung disease in cystic fibrosis. *PLoS One* 2017;12:e0171249 doi: 10.1371/journal.pone.0171249
63. Ringholz FC, Higgins G, Hatton A, Sassi A, Moukachar A, Fustero-Torre C, et al. Resolvin D1 regulates epithelial ion transport and inflammation in cystic fibrosis airways. *J Cyst Fibros* 2018;17:607-15 doi: 10.1016/j.jcf.2017.11.017
64. Weber AJ, Soong G, Bryan R, Saba S, Prince A. Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl⁻ channel function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L71-8
65. DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1998;101:2598-605 doi: 10.1172/JCI2865
66. Venkatakrisnan A, Stecenko AA, King G, Blackwell TR, Brigham KL, Christman JW, et al. Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:396-403 doi: 10.1165/ajrcmb.23.3.3949
67. Parker D, Cohen TS, Alhede M, Harfenist BS, Martin FJ, Prince A. Induction of type I interferon signaling by *Pseudomonas aeruginosa* is diminished in cystic fibrosis epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;46:6-13 doi: 10.1165/rcmb.2011-0080OC
68. Roussel L, Farias R, Rousseau S. IL-33 is expressed in epithelia from patients with cystic fibrosis and potentiates neutrophil recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:913-6 doi: 10.1016/j.jaci.2012.10.019
69. Muhlebach MS, Reed W, Noah TL. Quantitative cytokine gene expression in CF airway. *Pediatr Pulmonol* 2004;37:393-9 doi: 10.1002/ppul.20010
70. Konstan MW, Hilliard KA, Norvell TM, Berger M. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:448-54 doi: 10.1164/ajrccm.150.2.8049828
71. Noah TL, Black HR, Cheng PW, Wood RE, Leigh MW. Nasal and bronchoalveolar lavage fluid cytokines in early cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1997;175:638-47 doi: 10.1093/infdis/175.3.638
72. Painter RG, Valentine VG, Lanson NA, Jr., Leidal K, Zhang Q, Lombard G, et al. CFTR Expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis. *Biochemistry* 2006;45:10260-9 doi: 10.1021/bi060490t
73. Painter RG, Marrero L, Lombard GA, Valentine VG, Nauseef WM, Wang G. CFTR-mediated halide transport in phagosomes of human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2010;87:933-42 doi: 10.1189/jlb.1009655

74. Painter RG, Bonvillain RW, Valentine VG, Lombard GA, LaPlace SG, Nauseef WM, et al. The role of chloride anion and CFTR in killing of *Pseudomonas aeruginosa* by normal and CF neutrophils. *J Leukoc Biol* 2008;83:1345-53 doi: 10.1189/jlb.0907658
75. Law SM, Gray RD. Neutrophil extracellular traps and the dysfunctional innate immune response of cystic fibrosis lung disease: a review. *J Inflamm (Lond)* 2017;14:29 doi: 10.1186/s12950-017-0176-1
76. Rahman S, Gadjeva M. Does NETosis Contribute to the Bacterial Pathoadaptation in Cystic Fibrosis? *Front Immunol* 2014;5:378 doi: 10.3389/fimmu.2014.00378
77. Dwyer M, Shan Q, D'Ortona S, Maurer R, Mitchell R, Olesen H, et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J Innate Immun* 2014;6:765-79 doi: 10.1159/000363242
78. Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med* 1998;4:615-8 doi: 10.1038/nm0598-615.
79. Downey DG, Bell SC, Elborn JS. Neutrophils in cystic fibrosis. *Thorax* 2009;64:81-8 doi: 10.1136/thx.2007.082388
80. Pham CT. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2006;6:541-50 doi: 10.1038/nri1841
81. Sly PD, Gangell CL, Chen L, Ware RS, Ranganathan S, Mott LS, et al. Risk factors for bronchiectasis in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2013;368:1963-70 doi: 10.1056/NEJMoa1301725
82. Sagel SD, Wagner BD, Anthony MM, Emmett P, Zemanick ET. Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:857-65 doi: 10.1164/rccm.201203-0507OC
83. Park JA, He F, Martin LD, Li Y, Chorley BN, Adler KB. Human neutrophil elastase induces hypersecretion of mucin from well-differentiated human bronchial epithelial cells in vitro via a protein kinase C $\{\delta\}$ -mediated mechanism. *Am J Pathol* 2005;167:651-61 doi: 10.1016/s0002-9440(10)62040-8
84. Rogan MP, Taggart CC, Greene CM, Murphy PG, O'Neill SJ, McElvaney NG. Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2004;190:1245-53 doi: 10.1086/423821
85. Hartl D, Latzin P, Hordijk P, Marcos V, Rudolph C, Woischnik M, et al. Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nat Med* 2007;13:1423-30 doi: 10.1038/nm1690
86. Gramegna A, Amati F, Terranova L, Sotgiu G, Tarsia P, Miglietta D, et al. Neutrophil elastase in bronchiectasis. *Respir Res* 2017;18:211 doi: 10.1186/s12931-017-0691-x

87. Bruscia EM, Zhang PX, Ferreira E, Caputo C, Emerson JW, Tuck D, et al. Macrophages directly contribute to the exaggerated inflammatory response in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator^{-/-} mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;40:295-304 doi: 10.1165/rcmb.2008-0170OC
88. Meyer M, Huaux F, Gavilanes X, van den Brule S, Lebecque P, Lo Re S, et al. Azithromycin reduces exaggerated cytokine production by M1 alveolar macrophages in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41:590-602 doi: 10.1165/rcmb.2008-0155OC
89. Del Porto P, Cifani N, Guarnieri S, Di Domenico EG, Mariggio MA, Spadaro F, et al. Dysfunctional CFTR alters the bactericidal activity of human macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 2011;6:e19970 doi: 10.1371/journal.pone.0019970
90. Liu G, Wang J, Park YJ, Tsuruta Y, Lorne EF, Zhao X, et al. High mobility group protein-1 inhibits phagocytosis of apoptotic neutrophils through binding to phosphatidylserine. *J Immunol* 2008;181:4240-6 doi: 10.4049/jimmunol.181.6.4240
91. Armstrong DA, Nyman AB, Ringelberg CS, Lesseur C, Hazlett HF, Howard L, et al. Pulmonary microRNA profiling: implications in upper lobe predominant lung disease. *Clin Epigenetics* 2017;9:56 doi: 10.1186/s13148-017-0355-1
92. Brennan S, Sly PD, Gangell CL, Sturges N, Winfield K, Wikstrom M, et al. Alveolar macrophages and CC chemokines are increased in children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2009;34:655-61 doi: 10.1183/09031936.00178508
93. Soltys J, Bonfield T, Chmiel J, Berger M. Functional IL-10 deficiency in the lung of cystic fibrosis (cfr^{-/-}) and IL-10 knockout mice causes increased expression and function of B7 costimulatory molecules on alveolar macrophages. *J Immunol* 2002;168:1903-10 doi: 10.4049/jimmunol.168.4.1903
94. Dubin PJ, McAllister F, Kolls JK. Is cystic fibrosis a TH17 disease? *Inflamm Res* 2007;56:221-7 doi: 10.1007/s00011-007-6187-2
95. Iannitti RG, Carvalho A, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Casagrande A, et al. Th17/Treg imbalance in murine cystic fibrosis is linked to indoleamine 2,3-dioxygenase deficiency but corrected by kynurenines. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:609-20 doi: 10.1164/rccm.201207-1346OC
96. Hector A, Schafer H, Poschel S, Fischer A, Fritzsching B, Ralhan A, et al. Regulatory T-cell impairment in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas* infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191:914-23 doi: 10.1164/rccm.201407-1381OC
97. Vandebrouck C, Melin P, Norez C, Robert R, Guibert C, Mettey Y, et al. Evidence that CFTR is expressed in rat tracheal smooth muscle cells and contributes to bronchodilation. *Respir Res* 2006;7:113 doi: 10.1186/1465-9921-7-113

98. Regamey N, Ochs M, Hilliard TN, Muhlfeld C, Cornish N, Fleming L, et al. Increased airway smooth muscle mass in children with asthma, cystic fibrosis, and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:837-43 doi: 10.1164/rccm.200707-9770C
99. Sanchez I, Powell RE, Pasterkamp H. Wheezing and airflow obstruction during methacholine challenge in children with cystic fibrosis and in normal children. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:705-9 doi: 10.1164/ajrccm/147.3.705
100. Chmiel JF, Konstan MW. Inflammation and anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 2007;28:331-46 doi: 10.1016/j.ccm.2007.02.002
101. Konstan MW. Ibuprofen therapy for cystic fibrosis lung disease: revisited. *Curr Opin Pulm Med* 2008;14:567-73 doi: 10.1097/MCP.0b013e32831311e8
102. Cramer CL, Patterson A, Alchakaki A, Soubani AO. Immunomodulatory indications of azithromycin in respiratory disease: a concise review for the clinician. *Postgrad Med* 2017;129:493-99 doi: 10.1080/00325481.2017.1285677
103. Parnham MJ, Erakovic Haber V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Perletti G, Verleden GM, Vos R. Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacol Ther* 2014;143:225-45 doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.03.003
104. Culic O, Erakovic V, Cepelak I, Barisic K, Brajsa K, Ferencic Z, et al. Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *Eur J Pharmacol* 2002;450:277-89 doi: 10.1016/s0014-2999(02)02042-3
105. Stellari FF, Sala A, Donofrio G, Ruscitti F, Caruso P, Topini TM, et al. Azithromycin inhibits nuclear factor-kappaB activation during lung inflammation: an in vivo imaging study. *Pharmacol Res Perspect* 2014;2:e00058 doi: 10.1002/prp2.58
106. Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev* 2010;23:590-615 doi: 10.1128/cmr.00078-09
107. Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA, et al. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *Jama* 2003;290:1749-56 doi: 10.1001/jama.290.13.1749
108. Samson C, Tamalet A, Thien HV, Taytard J, Perisson C, Nathan N, et al. Long-term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis. *Respir Med* 2016;117:1-6 doi: 10.1016/j.rmed.2016.05.025
109. Saiman L, Anstead M, Mayer-Hamblett N, Lands LC, Kloster M, Hocevar-Trnka J, et al. Effect of azithromycin on pulmonary function in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *Jama* 2010;303:1707-15 doi: 10.1001/jama.2010.563

110. Nick JA, Moskowitz SM, Chmiel JF, Forssen AV, Kim SH, Saavedra MT, et al. Azithromycin may antagonize inhaled tobramycin when targeting *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Ann Am Thorac Soc* 2014;11:342-50 doi: 10.1513/AnnalsATS.201310-352OC
111. Nichols DP, Happoldt CL, Bratcher PE, Caceres SM, Chmiel JF, Malcolm KC, et al. Impact of azithromycin on the clinical and antimicrobial effectiveness of tobramycin in the treatment of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2017;16:358-66 doi: 10.1016/j.jcf.2016.12.003
112. Saiman L, Schechter MS. Evaluating Long-Term Benefits of Chronic Azithromycin: Furthering Our Quest for Precision Medicine. *Am J Respir Crit Care Med* 2019 doi: 10.1164/rccm.201911-2234ED
113. Mogayzel PJ, Jr., Naureckas ET, Robinson KA, Mueller G, Hadjiladis D, Hoag JB, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines. Chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:680-9 doi: 10.1164/rccm.201207-1160oe
114. Shah PL, Scott SF, Geddes DM, Hodson ME. Two years experience with recombinant human DNase I in the treatment of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Respir Med* 1995;89:499-502 doi: 10.1016/0954-6111(95)90126-4
115. Shah PI, Bush A, Canny GJ, Colin AA, Fuchs HJ, Geddes DM, et al. Recombinant human DNase I in cystic fibrosis patients with severe pulmonary disease: a short-term, double-blind study followed by six months open-label treatment. *Eur Respir J* 1995;8:954-8
116. Wagener JS, Kupfer O. Dornase alfa (Pulmozyme). *Curr Opin Pulm Med* 2012;18:609-14 doi: 10.1097/MCP.0b013e328358d51f
117. Quan JM, Tiddens HA, Sy JP, McKenzie SG, Montgomery MD, Robinson PJ, et al. A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *J Pediatr* 2001;139:813-20 doi: 10.1067/mpd.2001.118570
118. Paul K, Rietschel E, Ballmann M, Griese M, Worlitzsch D, Shute J, et al. Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:719-25 doi: 10.1164/rccm.200307-959OC
119. Konstan MW, Ratjen F. Effect of dornase alfa on inflammation and lung function: potential role in the early treatment of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2012;11:78-83 doi: 10.1016/j.jcf.2011.10.003
120. Lusman S, Sullivan J. Nutrition and Growth in Cystic Fibrosis. *Pediatr Clin North Am* 2016;63:661-78 doi: 10.1016/j.pcl.2016.04.005
121. Matel JL, Milla CE. Nutrition in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2009;30:579-86 doi: 10.1055/s-0029-1238916
122. Solomon M, Bozic M, Mascarenhas MR. Nutritional Issues in Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med* 2016;37:97-107 doi: 10.1016/j.ccm.2015.11.009
123. Colombo C, Nobili RM, Alicandro G. Challenges with optimizing nutrition in cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med* 2019;13:533-44 doi: 10.1080/17476348.2019.1614917

124. Fieker A, Philpott J, Armand M. Enzyme replacement therapy for pancreatic insufficiency: present and future. *Clin Exp Gastroenterol* 2011;4:55-73 doi: 10.2147/CEG.S17634
125. Hollander FM, de Roos NM, Heijerman HGM. The optimal approach to nutrition and cystic fibrosis: latest evidence and recommendations. *Curr Opin Pulm Med* 2017;23:556-61 doi: 10.1097/MCP.0000000000000430
126. Robinson KA, Saldanha IJ, McKoy NA. Management of infants with cystic fibrosis: a summary of the evidence for the cystic fibrosis foundation working group on care of infants with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2009;155:S94-S105 doi: 10.1016/j.jpeds.2009.09.002
127. Borowitz D, Lubarsky B, Wilschanski M, Munck A, Gelfond D, Bodewes F, et al. Nutritional Status Improved in Cystic Fibrosis Patients with the G551D Mutation After Treatment with Ivacaftor. *Dig Dis Sci* 2016;61:198-207 doi: 10.1007/s10620-015-3834-2
128. Davies JC, Cunningham S, Harris WT, Lapey A, Regelman WE, Sawicki GS, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2-5 years with cystic fibrosis and a CFTR gating mutation (KIWI): an open-label, single-arm study. *Lancet Respir Med* 2016;4:107-15 doi: 10.1016/S2213-2600(15)00545-7
129. Michel SH, Maqbool A, Hanna MD, Mascarenhas M. Nutrition management of pediatric patients who have cystic fibrosis. *Pediatr Clin North Am* 2009;56:1123-41 doi: 10.1016/j.pcl.2009.06.008
130. Gil-Campos M, Dalmau Serra J, Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. Importancia del ácido docosahexaenoico (DHA): funciones y recomendaciones para su ingesta en la infancia. *An Pediatr (Barc)* 2010;73:142 e1-8 doi: 10.1016/j.anpedi.2010.03.019
131. Shahidi F, Ambigaipalan P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annu Revi Food Sci Technol* 2018;9:345-81 doi: 10.1146/annurev-food-111317-095850
132. Demar JC, Jr., Ma K, Chang L, Bell JM, Rapoport SI. alpha-Linolenic acid does not contribute appreciably to docosahexaenoic acid within brain phospholipids of adult rats fed a diet enriched in docosahexaenoic acid. *J Neurochem* 2005;94:1063-76 doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03258.x
133. Kuo PT, Huang NN, Bassett DR. The fatty acid composition of the serum chylomicrons and adipose tissue of children with cystic fibrosis of the pancreas. *J Pediatr* 1962;60:394-403 doi: 10.1016/s0022-3476(62)80065-1
134. Hubbard VS, Dunn GD, di Sant'Agnese PA. Abnormal fatty-acid composition of plasma-lipids in cystic fibrosis. A primary or a secondary defect? *Lancet* 1977;2:1302-4
135. Freedman SD, Katz MH, Parker EM, Laposata M, Urman MY, Alvarez JG. A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in *cftr*(-/-) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13995-4000
136. Freedman SD, Blanco PG, Shea JC, Alvarez JG. Analysis of lipid abnormalities in CF mice. *Methods Mol Med* 2002;70:517-24 doi: 10.1385/1-59259-187-6:517

137. Freedman SD, Weinstein D, Blanco PG, Martinez-Clark P, Urman S, Zaman M, et al. Characterization of LPS-induced lung inflammation in *cftr*^{-/-} mice and the effect of docosahexaenoic acid. *J Appl Physiol* (1985) 2002;92:2169-76 doi: 10.1152/jappphysiol.00927.2001
138. Freedman SD, Blanco PG, Zaman MM, Shea JC, Ollero M, Hopper IK, et al. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N Engl J Med* 2004;350:560-9 doi: 10.1056/NEJMoa021218
139. Christophe AB, Warwick WJ, Holman RT. Serum fatty acid profiles in cystic fibrosis patients and their parents. *Lipids* 1994;29:569-75
140. Andersson C, Al-Turkmani MR, Savaille JE, Alturkmani R, Katrangi W, Cluette-Brown JE, et al. Cell culture models demonstrate that CFTR dysfunction leads to defective fatty acid composition and metabolism. *J Lipid Res* 2008;49:1692-700 doi: 10.1194/jlr.M700388-JLR200
141. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 2002;21:495-505 doi: 10.1080/07315724.2002.10719248
142. Osterud B, Elvevoll E, Barstad H, Brox J, Halvorsen H, Lia K, et al. Effect of marine oils supplementation on coagulation and cellular activation in whole blood. *Lipids* 1995;30:1111-8 doi: 10.1007/BF02536611.
143. Bjerregaard P, Dyerberg J. Mortality from ischaemic heart disease and cerebrovascular disease in Greenland. *Int J Epidemiol* 1988;17:514-9 doi: 10.1093/ije/17.3.514
144. Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1467s-76s doi: 10.1093/ajcn/83.6.1467S
145. Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res* 1999;40:211-25 doi: 10.1006/phrs.1999.0495
146. Ghasemi Fard S, Wang F, Sinclair AJ, Elliott G, Turchini GM. How does high DHA fish oil affect health? A systematic review of evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2019;59:1684-727 doi: 10.1080/10408398.2018.1425978
147. Newell M, Baker K, Postovit LM, Field CJ. A Critical Review on the Effect of Docosahexaenoic Acid (DHA) on Cancer Cell Cycle Progression. *Int J Mol Sci* 2017;18 doi: 10.3390/ijms18081784
148. Patchen B, Xu J, Barr RG, van Eekelen E, Dupuis J, North K, et al. Positive Associations of Dietary Marine Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids with Lung Function: A Meta-analysis (P18-087-19). *Curr Dev Nutr* 2019;3 doi: 10.1093/cdn/nzz039.P18-087-19
149. Langlois PL, D'Aragon F, Hardy G, Manzanares W. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in critically ill patients with acute respiratory distress syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition* 2019;61:84-92 doi: 10.1016/j.nut.2018.10.026

150. Lemoine SC, Brigham EP, Woo H, Hanson CK, McCormack MC, Koch A, et al. Omega-3 fatty acid intake and prevalent respiratory symptoms among U.S. adults with COPD. *BMC Pulm Med* 2019;19:97 doi: 10.1186/s12890-019-0852-4
151. Papamichael MM, Shrestha SK, Itsiopoulos C, Erbas B. The role of fish intake on asthma in children: A meta-analysis of observational studies. 2018;29:350-60 doi: 10.1111/pai.12889
152. Bisgaard H, Stokholm J, Chawes BL, Vissing NH, Bjarnadottir E, Schoos AM, et al. Fish Oil-Derived Fatty Acids in Pregnancy and Wheeze and Asthma in Offspring. *N Engl J Med* 2016;375:2530-9 doi: 10.1056/NEJMoa1503734
153. Gunaratne AW, Makrides M, Collins CT, Gibson RA, McPhee AJ, Sullivan TR, et al. Docosahexaenoic acid supplementation of preterm infants and parent-reported symptoms of allergic disease at 7 years corrected age: follow-up of a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2019;109:1600-10 doi: 10.1093/ajcn/nqz010
154. Wang Q, Zhou B, Cui Q, Chen C. Omega-3 Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids for Bronchopulmonary Dysplasia: A Meta-analysis. *Pediatrics* 2019;144 doi: 10.1542/peds.2019-0181
155. Blanco PG, Freedman SD, Lopez MC, Ollero M, Comen E, Laposata M, et al. Oral docosahexaenoic acid given to pregnant mice increases the amount of surfactant in lung and amniotic fluid in preterm fetuses. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:1369-74 doi: 10.1016/j.ajog.2003.11.001
156. Beharry S, Ackerley C, Corey M, Kent G, Heng YM, Christensen H, et al. Long-term docosahexaenoic acid therapy in a congenic murine model of cystic fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G839-48 doi: 10.1152/ajpgi.00582.2005
157. Portal C, Gouyer V, Leonard R, Husson MO, Gottrand F, Desseyn JL. Long-term dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids show benefits to the lungs of Cftr F508del mice. 2018;13:e0197808 doi: 10.1371/journal.pone.0197808
158. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:3507-12 doi: 10.1073/pnas.1222878110
159. Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* 2012;142:592s-99s doi: 10.3945/jn.111.155259
160. Meyer BJ, Groot RHM. Effects of Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Cardiovascular Mortality: The Importance of the Dose of DHA. *Nutrients* 2017;9 doi: 10.3390/nu9121305
161. Lawrence R, Sorrell T. Eicosapentaenoic acid in cystic fibrosis: evidence of a pathogenetic role for leukotriene B4. *Lancet* 1993;342:465-9 doi: 10.1016/0140-6736(93)91594-c

162. Henderson WR, Jr., Astley SJ, McCreedy MM, Kushmerick P, Casey S, Becker JW, et al. Oral absorption of omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis who have pancreatic insufficiency and in healthy control subjects. *J Pediatr* 1994;124:400-8 doi: 10.1016/s0022-3476(94)70362-0
163. Panchaud A, Sauty A, Kernén Y, Decosterd LA, Buclin T, Boulat O, et al. Biological effects of a dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in cystic fibrosis patients: a randomized, crossover placebo-controlled trial. *Clin Nutr* 2006;25:418-27 doi: 10.1016/j.clnu.2005.10.011
164. De Vizia B, Raia V, Spano C, Pavlidis C, Coruzzo A, Alessio M. Effect of an 8-month treatment with omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic and docosahexaenoic) in patients with cystic fibrosis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2003;27:52-7 doi: 10.1177/014860710302700152
165. Lawrence RH, Sorrell TC. Eicosapentaenoic acid modulates neutrophil leukotriene B4 receptor expression in cystic fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1994;98:12-6 doi: 10.1111/j.1365-2249.1994.tb06599.x
166. Kurlandsky LE, Bennink MR, Webb PM, Ulrich PJ, Baer LJ. The absorption and effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids on serum leukotriene B4 in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1994;18:211-7 doi: 10.1002/ppul.1950180404
167. Christophe A, Robberecht E. Directed modification instead of normalization of fatty acid patterns in cystic fibrosis: an emerging concept. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001;4:111-3 doi: 10.1097/00075197-200103000-00005
168. Vericel E, Mazur S, Colas R, Delaup V, Calzada C, Reix P, et al. Moderate intake of docosahexaenoic acid raises plasma and platelet vitamin E levels in cystic fibrosis patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2016;115:41-47 doi: 10.1016/j.plefa.2016.10.008
169. Keen C, Olin AC, Eriksson S, Ekman A, Lindblad A, Basu S, et al. Supplementation with fatty acids influences the airway nitric oxide and inflammatory markers in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;50:537-44 doi: 10.1097/MPG.0b013e3181b47967
170. Morin C, Cantin AM, Vezina FA, Fortin S. The Efficacy of MAG-DHA for Correcting AA/DHA Imbalance of Cystic Fibrosis Patients. *Mar Drugs* 2018;16 doi: 10.3390/md16060184
171. Oliveira G, Oliveira C, Acosta E, Espildora F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Escobar E, et al. Fatty acid supplements improve respiratory, inflammatory and nutritional parameters in adults with cystic fibrosis. *Arch Bronconeumol* 2010;46:70-7 doi: 10.1016/j.arbres.2009.11.001
172. Hanssens L, Thiebaut I, Lefevre N, Malfroot A, Knoop C, Duchateau J, et al. The clinical benefits of long-term supplementation with omega-3 fatty acids in cystic fibrosis patients - A pilot study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2016;108:45-50 doi: 10.1016/j.plefa.2016.03.014
173. Watson H, Stackhouse C. Omega-3 fatty acid supplementation for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2020;4:CD002201 doi: 10.1002/14651858.CD002201.pub6

174. Chang CH, Tseng PT, Chen NY, Lin PC, Lin PY, Chang JP, et al. Safety and tolerability of prescription omega-3 fatty acids: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2018;129:1-12 doi: 10.1016/j.plefa.2018.01.001
175. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, et al. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med* 1994;331:637-42 doi: 10.1056/NEJM199409083311003
176. Debray D, Narkewicz MR, Bodewes F, Colombo C, Housset C, de Jonge HR, et al. Cystic Fibrosis-related Liver Disease: Research Challenges and Future Perspectives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017;65:443-48 doi: 10.1097/mpg.0000000000001676
177. Moran A, Brunzell C, Cohen RC, Katz M, Marshall BC, Onady G, et al. Clinical care guidelines for cystic fibrosis-related diabetes: a position statement of the American Diabetes Association and a clinical practice guideline of the Cystic Fibrosis Foundation, endorsed by the Pediatric Endocrine Society. *Diabetes Care* 2010;33:2697-708 doi: 10.2337/dc10-1768
178. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis* 2003;37 Suppl 3:S225-64 doi: 10.1086/376525
179. Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2003;2:29-34 doi: 10.1016/s1569-1993(02)00141-8
180. Doring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *J Cyst Fibros* 2012;11:461-79 doi: 10.1016/j.jcf.2012.10.004
181. Carrascosa A, Fernández J, Fernández A, López-Siguero J, López D, Sánchez E, et al. Estudios Españoles de Crecimiento 2010. Disponible en: https://www.seep.es/images/site/publicaciones/oficialesSEEP/Estudios_Espanoles_de_Crecimiento_2010.pdf. 2010
182. Graham BL, Steenbruggen I, Miller MR, Barjaktarevic IZ, Cooper BG, Hall GL, et al. Standardization of Spirometry 2019 Update. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Technical Statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;200:e70-e88 doi: 10.1164/rccm.201908-1590ST
183. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, Baur X, Hall GL, Culver BH, et al. Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3-95-yr age range: the global lung function 2012 equations. *Eur Respir J* 2012;40:1324-43 doi: 10.1183/09031936.00080312

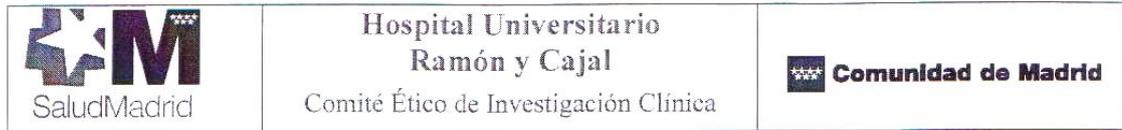
184. Al-Saleh S, Dell SD, Grasemann H, Yau YC, Waters V, Martin S, et al. Sputum induction in routine clinical care of children with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2010;157:1006-11 e1 doi: 10.1016/j.jpeds.2010.06.001
185. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509
186. Masood A, Stark KD, Salem N, Jr. A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. *J Lipid Res* 2005;46:2299-305 doi: 10.1194/jlr.D500022-JLR200
187. Quittner AL, Sawicki GS, McMullen A, Rasouliyan L, Pasta DJ, Yegin A, et al. Psychometric evaluation of the Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised in a national sample. *Qual Life Res* 2012;21:1267-78 doi: 10.1007/s11136-011-0036-z
188. Olveira G, Olveira C, Gaspar I, Cruz I, Dorado A, Perez-Ruiz E, et al. Validación de la versión española del cuestionario revisado de calidad de vida para fibrosis quística en adolescentes y adultos (CFQR 14+ Spain). *Arch Bronconeumol* 2010;46:165-75 doi: 10.1016/j.arbres.2010.01.006
189. Quittner AL, Modi AC, Wainwright C, Otto K, Kiriara J, Montgomery AB. Determination of the minimal clinically important difference scores for the Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised respiratory symptom scale in two populations of patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Chest* 2009;135:1610-18 doi: 10.1378/chest.08-1190
190. Werlin SL, Benuri-Silbiger I, Kerem E, Adler SN, Goldin E, Zimmerman J, et al. Evidence of intestinal inflammation in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51:304-8 doi: 10.1097/MPG.0b013e3181d1b013
191. Downey DG, Martin SL, Dempster M, Moore JE, Keogan MT, Starcher B, et al. The relationship of clinical and inflammatory markers to outcome in stable patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2007;42:216-20 doi: 10.1002/ppul.20553
192. Brown MB, Forsythe AB. Robust Tests for the Equality of Variances. *Journal of the American Statistical Association* 1974;69:364-67 doi: 10.1080/01621459.1974.10482955
193. Schulz KF, Altman DG, Moher D, Group C. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *Trials* 2010;11:32 doi: 10.1186/1745-6215-11-32
194. Modi AC, Lim CS, Driscoll KA, Piazza-Waggoner C, Quittner AL, Wooldridge J. Changes in pediatric health-related quality of life in cystic fibrosis after IV antibiotic treatment for pulmonary exacerbations. *J Clin Psychol Med Settings* 2010;17:49-55 doi: 10.1007/s10880-009-9179-2
195. Quittner A, Suthoff E, Rendas-Baum R, Bayliss MS, Sermet-Gaudelus I, Castiglione B, et al. Effect of ivacaftor treatment in patients with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation: patient-reported outcomes in the STRIVE randomized, controlled trial. *Health Qual Life Outcomes* 2015;13:93 doi: 10.1186/s12955-015-0293-6

196. Shoff SM, Tluczek A, Laxova A, Farrell PM, Lai HJ. Nutritional status is associated with health-related quality of life in children with cystic fibrosis aged 9-19 years. *J Cyst Fibros* 2013;12:746-53 doi: 10.1016/j.jcf.2013.01.006
197. Teopompi E, Rise P, Pisi R, Buccellati C, Aiello M, Pisi G, et al. Arachidonic Acid and Docosahexaenoic Acid Metabolites in the Airways of Adults With Cystic Fibrosis: Effect of Docosahexaenoic Acid Supplementation. *Front Pharmacol* 2019;10:938 doi: 10.3389/fphar.2019.00938
198. Alicandro G, Faelli N, Gagliardini R, Santini B, Magazzu G, Biffi A, et al. A randomized placebo-controlled study on high-dose oral algal docosahexaenoic acid supplementation in children with cystic fibrosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2013;88:163-9 doi: 10.1016/j.plefa.2012.10.002
199. Leggieri E, De Biase RV, Savi D, Zullo S, Halili I, Quattrucci S. Clinical effects of diet supplementation with DHA in pediatric patients suffering from cystic fibrosis. *Minerva Pediatr* 2013;65:389-98
200. Van Biervliet S, Devos M, Delhaye T, Van Biervliet JP, Robberecht E, Christophe A. Oral DHA supplementation in DeltaF508 homozygous cystic fibrosis patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008;78:109-15 doi: 10.1016/j.plefa.2007.12.005
201. Mischler EH, Parrell SW, Farrell PM, Raynor WJ, Lemen RJ. Correction of linoleic acid deficiency in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1986;20:36-41 doi: 10.1203/00006450-198601000-00010
202. Dhaliwal J, Leach S, Katz T, Nahidi L, Pang T, Lee JM, et al. Intestinal inflammation and impact on growth in children with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;60:521-6 doi: 10.1097/mpg.0000000000000683
203. Schnapp Z, Hartman C, Livnat G, Shteinberg M, Elenberg Y. Decreased Fecal Calprotectin Levels in Cystic Fibrosis Patients After Antibiotic Treatment for Respiratory Exacerbation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2019;68:282-84 doi: 10.1097/mpg.0000000000002197
204. Van Biervliet S, Declercq D, Somerset S. Clinical effects of probiotics in cystic fibrosis patients: A systematic review. *Clin Nutr ESPEN* 2017;18:37-43 doi: 10.1016/j.clnesp.2017.01.007
205. Jumpsen JA, Brown NE, Thomson AB, Paul Man SF, Goh YK, Ma D, et al. Fatty acids in blood and intestine following docosahexaenoic acid supplementation in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2006;5:77-84 doi: 10.1016/j.jcf.2006.01.004
206. Breuer O, Caudri D, Stick S, Turkovic L. Predicting disease progression in cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med* 2018;12:905-17 doi: 10.1080/17476348.2018.1519400
207. Katz DP, Manner T, Furst P, Askanazi J. The use of an intravenous fish oil emulsion enriched with omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis. *Nutrition* 1996;12:334-9 doi: 10.1016/s0899-9007(96)80056-6

208. Steinkamp G, Demmelmair H, Ruhl-Bagheri I, von der Hardt H, Koletzko B. Energy supplements rich in linoleic acid improve body weight and essential fatty acid status of cystic fibrosis patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31:418-23 doi: 10.1097/00005176-200010000-00016
209. Lloyd-Still JD, Powers CA, Hoffman DR, Boyd-Trull K, Lester LA, Benisek DC, et al. Bioavailability and safety of a high dose of docosahexaenoic acid triacylglycerol of algal origin in cystic fibrosis patients: a randomized, controlled study. *Nutrition* 2006;22:36-46 doi: 10.1016/j.nut.2005.05.006
210. Goss CH. Acute Pulmonary Exacerbations in Cystic Fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2019;40:792-803 doi: 10.1055/s-0039-1697975
211. Van Biervliet S, Vanbillemont G, Van Biervliet JP, Declercq D, Robberecht E, Christophe A. Relation between fatty acid composition and clinical status or genotype in cystic fibrosis patients. *Ann Nutr Metab* 2007;51:541-9 doi: 10.1159/000114208
212. van Egmond AW, Kosorok MR, Kosciuk R, Laxova A, Farrell PM. Effect of linoleic acid intake on growth of infants with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1996;63:746-52 doi: 10.1093/ajcn/63.5.746
213. Abbott J. Health-related quality of life measurement in cystic fibrosis: advances and limitations. *Chron Respir Dis* 2009;6:31-41 doi: 10.1177/1479972308098159
214. Kilcoyne A, Lavelle LP, McCarthy CJ, McEvoy SH, Fleming H, Gallagher A, et al. Chest CT abnormalities and quality of life: relationship in adult cystic fibrosis. *Ann Transl Med* 2016;4:87 doi: 10.21037/atm.2016.03.08
215. Rozov T, de Oliveira VZ, Santana MA, Adde FV, Mendes RH, Paschoal IA, et al. Dornase alfa improves the health-related quality of life among Brazilian patients with cystic fibrosis--a one-year prospective study. *Pediatr Pulmonol* 2010;45:874-82 doi: 10.1002/ppul.21267
216. Park HG, Lawrence P, Engel MG, Kothapalli K, Brenna JT. Metabolic fate of docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) in human cells: direct retroconversion of DHA to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) dominates over elongation to tetracosahexaenoic acid (24:6n-3). *FEBS Lett* 2016;590:3188-94 doi: 10.1002/1873-3468.12368
217. Metherel AH, Irfan M, Klingel SL, Mutch DM, Bazinet RP. Compound-specific isotope analysis reveals no retroconversion of DHA to EPA but substantial conversion of EPA to DHA following supplementation: a randomized control trial. *Am J Clin Nutr* 2019;110:823-31 doi: 10.1093/ajcn/nqz097
218. Joseph PD, Craig JC, Caldwell PH. Clinical trials in children. *Br J Clin Pharmacol* 2015;79:357-69 doi: 10.1111/bcp.12305
219. Rothwell PM. External validity of randomised controlled trials: "to whom do the results of this trial apply?". *Lancet* 2005;365:82-93 doi: 10.1016/s0140-6736(04)17670-8
220. Rothwell PM. Factors that can affect the external validity of randomised controlled trials. *PLoS Clin Trials* 2006;1:e9 doi: 10.1371/journal.pctr.0010009

ANEXOS

Anexo 1. Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Ramón y Cajal



Dra. **ITZIAR DE PABLO LÓPEZ DE ABECHUCO**, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Ramón y Cajal

CERTIFICA

Que el Comité Ético de Investigación Clínica, ha evaluado el **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

Título:

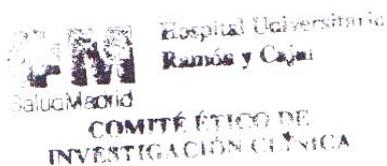
Estudio de la eficacia del tratamiento a largo plazo con ácido docosahexanóico sobre la inflamación pulmonar, sistémica e intestinal en pacientes con fibrosis quística.

Investigador Principal: **Dra. Adelaida Lamas Ferreiro.**

Servicio: **Unidad de Fibrosis Quística.**

Y ha decidido su **APROBACIÓN.** (Condicionado a la suscripción de una póliza de seguros de responsabilidad civil).

Lo que firmo en Madrid a 30 de Noviembre de 2010



Fdo.: Dra. Itziar de Pablo López de Abechuco
Secretaria del CEIC



**HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL
PACIENTE MAYOR DE 18 AÑOS**

TÍTULO: “Estudio de la eficacia del tratamiento a largo plazo con ácido docosahexanóico sobre la inflamación pulmonar, sistémica e intestinal en pacientes con Fibrosis Quística”

Código de protocolo: DHA-FQ-1

Investigador principal:

Hospital:

Teléfono:

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre el desarrollo de un estudio de investigación en el que se le invita a usted a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica. Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello, lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio, es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Como médico responsable de su tratamiento y de acuerdo a sus antecedentes médicos, he considerado que usted podría ser candidato a la participación en este estudio clínico. Los estudios de investigación clínica son necesarios para aumentar los conocimientos sobre la eficacia y la tolerancia de los medicamentos o alimentos funcionales.

Sin embargo, en estos casos existe la necesidad absoluta de que los pacientes otorguen su consentimiento informado, ya sea por escrito u oralmente ante testigos, para participar en el estudio.

Por favor, lea atentamente el texto que sigue a continuación, que se proporciona como base para formular comentarios, y no dude en formular cualquier pregunta que se le ocurra.

Objetivos del estudio clínico:

El propósito de este estudio clínico es comprobar si añadir a su alimentación habitual un aceite formulado como un Alimento Dietético Para Usos Médicos Especiales (ADUME) que contiene gran cantidad de un Ácido Graso Esencial (AGE), el ácido docosahexanóico (DHA), puede disminuir la inflamación de los pulmones, el intestino y la sangre, secundarias a su enfermedad.

Posibilidades de tratamiento alternativo:

No existen, ya que la función que realiza la suplementación con DHA no tiene posibilidad de tratamiento alternativo.

No obstante, le aclaramos que usted puede recibir este alimento funcional sin necesidad de participar en este estudio clínico que le proponemos.

Información sobre el producto de estudio:

El DHA y otros AGE han demostrado mejorar en algunos estudios la función pulmonar, la inflamación en la sangre y en los pulmones pero ninguno ha estudiado si mejora la inflamación en el intestino. Estudios previos han demostrado que es eficaz para este fin pero están hechos con pocos pacientes, se han evaluado pocos parámetros y se necesitan más estudios para probar su utilidad.

Descripción del estudio:

A usted se le va a suplementar durante 1 año la dieta con 50 mg/Kg/día de Ácido Docosahexanóico (DHA) o placebo. El producto se llama en el mercado DHA-basic® y está basado en un aceite nutricional derivado del alga marina *Schizochytrium sp*, que

contiene gran cantidad de DHA. El placebo estará envasado igual y tendrá el mismo olor, textura, sabor y color al DHA-basic[®] pero sin el producto dietético. La suplementación dietética empleada en el estudio y el placebo serán elaborados por el Laboratorio CASEN Fleet S.L.U. y se etiquetará de acuerdo a las recomendaciones del Real Decreto 223/2004. La suplementación del producto o del placebo se hará mediante la administración de un aceite que se debe agitar antes de usar, se extrae de la botella con jeringuilla dosificadora y se toma una vez al día de forma aislada o bien mezclado con cualquier comida principal. La forma de tomar el producto se le explicará con detalle por parte de los investigadores y la primera dosis del mismo será ingerida en el Hospital.

La Unidad de Ensayos clínicos del Hospital Universitario Ramón y Cajal, después de haber realizado el proceso de aleatorización (asignación al azar de tratamiento o placebo), le proveerá del suplemento dietético o placebo a las Unidades de Fibrosis Quística participantes en el estudio. El suplemento o placebo le será entregado por parte de los investigadores del estudio.

Durante el estudio es necesario que consuma una dieta variada y equilibrada, como se le recomienda habitualmente. Esta dieta no debe contener otra fuente de DHA diferente de la del estudio, por lo que está prohibido el uso de aceite de pescado, linaza y las nueces, que contienen gran cantidad de DHA. La dieta debe ser, además, equilibrada en ácido linoleico (AL), precursor del ácido araquidónico (AA), que está elevado en pacientes con FQ y su aumento es perjudicial para la inflamación que tienen los distintos órganos del cuerpo en esta enfermedad, por lo que deben evitarse determinados aceites y grasas como el aceite de girasol, maíz y soja, la margarina y limitar la ingesta excesiva de manteca, aceite de oliva, yema y mayonesa. Todos los cereales, frutas, lácteos y derivados, pescados y mariscos, azúcares y dulces están permitidos (excepto hojaldres y magdalenas). De las carnes y aves, solo hay que evitar la gallina, beicon, chicharrón, butifarra, lomo embuchado, chorizo y sobrasada. Los frutos secos deben restringirse un poco también. Le informamos que la limitación de estos productos no va a desviarse casi nada de su dieta habitual, ya que la cantidad de gramos al día permitidos de los distintos alimentos que contienen DHA es lo que habitualmente usted ingiere en una

dieta como la que siempre le hemos recomendado. Usted en todo momento tomará una dieta equilibrada y balanceada en Ácido Grasas Esenciales.

Para la realización de este estudio, el promotor contratará una póliza de seguros que garantiza compensación e indemnización en caso de menoscabo de su salud o de lesiones que pudieran producirse dentro de la investigación. Una vez iniciado el estudio, se hará constar en esta hoja el número de póliza y la compañía aseguradora contratada.

La asignación a cada grupo de tratamiento se realizará al azar (es decir como si tirásemos una moneda al aire) por lo que usted tiene la misma probabilidad de recibir el ADUME o el placebo. Ni usted ni los investigadores del estudio sabremos que tratamiento tiene asignado hasta que finalice el mismo. Todas las características del producto le serán explicadas con minuciosidad por su médico y le serán dados por escrito en hojas informativas.

Este estudio clínico se desarrollará en las Unidades de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Ramón y Cajal, Hospital Universitario Doce de Octubre, Hospital Universitari i Politecnic La Fe de Valencia, Hospital Universitario Central de Asturias y Hospital Universitario La Princesa y será llevado a cabo por los médicos que integran estas unidades y que son los que habitualmente le tratan. Antes de la inclusión en el estudio se documentará la historia de su enfermedad y se le practicará una exploración médica y analítica detallada.

Durante el mismo se llevarán a cabo, en intervalos concretos que le serán detallados, una serie de análisis que requerirán la extracción de muestras de sangre (en total serán 3 a lo largo del año de estudio). También se realizarán pruebas de función respiratoria en todas las visitas, como se le hace habitualmente, y se recogerán muestras de esputo por la técnica de esputo inducido (en total serán 5 a lo largo del estudio) para estudio de la infección, inflamación y de los genes que se expresan en las células de dicha muestra. Le mediremos también, en todas las visitas, el valor del Óxido Nítrico exhalado con un aparato por el que tiene que soplar durante 10 segundos, esta medida nos sirve para valorar la inflamación pulmonar. Se le pedirá que entregue dos muestras pequeñas de heces en cada una de las 5 visitas y también en las tres últimas que rellene una encuesta

dietética con lo que ha comido previamente. Si tiene clínica de exacerbación pulmonar después del proceso de aleatorización para tomar DHA o placebo, deberá acudir a la Unidad de FQ en el espacio de 24-48 horas para ser evaluado por uno de los médicos investigadores del estudio y comenzar tratamiento. Esta visita se considera como una Visita no Programada (VNP) y le será recogida una muestra de secreciones respiratorias para estudio microbiológico, de inflamación y de expresión de genes en las células de esa muestra. El tratamiento de las muestras se llevará a cabo de acuerdo a la Ley de Investigación Biomédica 14/2007 y las muestras serán almacenadas por un período de cinco años y a las mismas sólo tendrán acceso los miembros del equipo investigador.

En tres ocasiones, al principio, al final y a la mitad del estudio, le pediremos que nos traiga la recogida de heces de tres días, como hacemos de manera habitual en las Unidades que participamos en el estudio, para cuantificar la cantidad de grasa en heces y el Coeficiente de Reabsorción de Grasas (CRG). Se le darán instrucciones por escrito de cómo se debe realizar esta recogida de muestras en un manual para el participante en el estudio que le será entregado por alguno de los investigadores.

Si es usted es una mujer en edad fértil, también se le realizará una prueba de embarazo antes y al finalizar el estudio clínico.

En cada una de estas ocasiones y para recoger el producto del estudio, deberá acudir al hospital. En total, serán necesarias como mínimo 5 visitas, una visita más de las que habitualmente le corresponden de forma habitual. Durante las visitas se le entrevistará, por favor, informe al investigador responsable durante el estudio de cualquier acontecimiento que haya ocurrido durante el periodo transcurrido desde la última visita. Su participación en el estudio no le supondrá coste económico alguno, salvo el inconveniente de tener que venir una vez más al Hospital de las visitas que habitualmente le corresponden. La suplementación con este alimento funcional o el placebo le serán proporcionados de forma gratuita.

En 5 de las visitas concertadas, tendrá que rellenar una encuesta de calidad de vida que le llevará aproximadamente 15 minutos cada vez y que deberá hacer antes de pasar a la consulta a la revisión habitual y también antes de ser pesado, medido o de que se le haya realizado la función pulmonar. En las tres últimas visitas también se le pedirá que rellene una encuesta dietética para controlar el tipo de comida que usted realiza.

Posibles molestias, acontecimientos adversos y riesgos:

El DHA no suele producir efectos secundarios, algunos enfermos refieren dolor de estómago, ganancia de peso o se quejan del olor a aceite de pescado.

Le advertimos que por el diseño del estudio, se requerirán la extracción de sangre para determinaciones analíticas, que son las mismas que se le realizarían de forma habitual a lo largo del seguimiento en la consulta.

Adquisición de nuevos conocimientos:

Será informado, con la mayor brevedad posible, sobre los nuevos conocimientos que se vayan adquiriendo que pueden ocasionar un replanteamiento de su participación en el estudio.

Posibles beneficios de la participación en el estudio:

Con la utilización de este alimento funcional en su dieta, es posible que se ralentice la progresión de su enfermedad. Sin embargo, también es posible que su participación en este estudio no le produzca beneficios directos sobre su salud.

Creemos que los resultados de este estudio pueden contribuir a mejorar el tratamiento para otros pacientes que tienen la misma enfermedad que usted.

Finalización prematura del estudio:

Quiero significarle claramente que su participación en el estudio es voluntaria.

En cualquier momento puede usted retirar su consentimiento para participar en el estudio sin que tenga que dar explicaciones de ningún tipo. Ello tampoco le comportará desventaja alguna en relación con su posterior atención médica.

Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, es posible que yo, como médico responsable, decida que su participación deba finalizar de forma prematura sin previamente obtener su consentimiento. Las razones para ello pueden ser:

- No puede satisfacer los requerimientos del estudio.
- Si ha contraído otra enfermedad grave.

Si decide usted finalizar prematuramente su participación en el estudio o si la misma es prematuramente cancelada por cualquiera de las razones arriba mencionadas, se realizará un examen normal de control. Esto incluirá un chequeo físico y pruebas de laboratorio.

Confidencialidad de la documentación:

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo establecido en esta ley, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de los datos, para lo cual deberá dirigirse al investigador principal del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código numérico y solo los médicos que participan en el estudio y los otros colaboradores podrían relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal. El responsable del Registro de los datos será el investigador principal de cada Unidad de FQ participante en el estudio.

Compensación económica:

Ni el promotor estudio ni ninguno de los investigadores recibirán compensación económica alguna por el trabajo adicional que este estudio conlleve.

Posibilidad de formular preguntas adicionales:

Mis colaboradores y yo mismo estamos a su disposición para comentar cualquier pregunta adicional relativa a este estudio clínico. Nos complacerá responderle a las preguntas relacionadas con sus derechos como paciente participante en este estudio.

Debe saber que este estudio, por sus características peculiares, ha sido aprobado por los Comités Éticos de Investigación Clínica de los Hospitales participantes y que el promotor del estudio ha contratado una póliza de seguro específica que le proporcionará compensación e indemnización en caso de menoscabo de su salud o de lesiones que pudieran producirse.

Además, como en el estudio participan niños, de acuerdo a la legislación vigente el promotor del estudio ha puesto en conocimiento del Ministerio Fiscal que se va a realizar este estudio y se pretende incluir menores de edad en el mismo.

**MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO PARA
PACIENTE**

Título: “Estudio de la eficacia del tratamiento a largo plazo con ácido docosahexanoíco sobre la inflamación pulmonar, sistémica e intestinal en pacientes con Fibrosis Quística”

Código de protocolo: DHA-FQ-1

Yo (nombre y apellidos)

.....
He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:.....

(Nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

FIRMA DEL PARTICIPANTE

FECHA:

FIRMA DEL INVESTIGADOR

FECHA:

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente. Además el investigador se encargará de guardar una copia en la historia general del hospital del paciente.



**HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL
PADRE, MADRE O TUTOR DEL MENOR**

TITULO: “Estudio de la eficacia del tratamiento a largo plazo con ácido docosahexanóico sobre la inflamación pulmonar, sistémica e intestinal en pacientes con Fibrosis Quística”

Código de protocolo: DHA-FQ-1

Investigador principal:

Hospital:

Teléfono:

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre el desarrollo de un estudio de investigación en el que se le invita a su hijo/a a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no que su hijo/a participe en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que la participación de su hijo/a en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación que su hijo/a y usted tiene con su médico, ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Como médico responsable del tratamiento de su hijo/a, y de acuerdo a sus antecedentes médicos, he considerado que su hijo/a podría ser candidato a la participación en este estudio clínico. Los estudios clínicos son necesarios para aumentar los conocimientos

sobre la eficacia y la tolerancia de los medicamentos o alimentos funcionales, como es el caso.

Sin embargo, en estos casos existe la necesidad absoluta de que los padres/tutores del paciente menor de edad otorguen su consentimiento informado, ya sea por escrito u oralmente ante testigos, para participar en el estudio.

Por favor, lea atentamente el texto que sigue a continuación, que se proporciona como base para formular comentarios, y no dude en formular cualquier pregunta que se le ocurra.

Objetivos del estudio clínico:

El propósito de este estudio clínico es comprobar si la suplementación de la alimentación con un alimento que contiene gran cantidad de un Ácido Graso Esencial (AGE), el Ácido docosahexanóico (DHA), puede disminuir la inflamación de los pulmones, el intestino y la sangre de su hijo/a. Estudios previos han demostrado que es eficaz para este fin pero están hechos con pocos pacientes y se necesitan más estudios para probar su utilidad.

Posibilidades de tratamiento alternativo:

No existen, ya que la función que realiza la suplementación con DHA no tiene posibilidad de tratamiento alternativo. No obstante, le aclaramos que su hijo/a puede recibir este alimento funcional sin necesidad de participar en el estudio clínico que le proponemos.

Información sobre el producto de estudio:

El DHA y otros AGE han demostrado mejorar en algunos estudios la función pulmonar, la inflamación en la sangre y en los pulmones pero ninguno ha estudiado si mejora la inflamación en el intestino. Todos los trabajos publicados hasta el momento se han hecho en muy pocos enfermos por lo que es necesario que se hagan más estudios.

Descripción del estudio:

A su hijo/a se le va a suplementar durante 1 año la dieta con 50 mg/Kg/día de Ácido Docosahexanóico (DHA) o placebo. El producto se llama en el mercado DHA-basic[®] y está basado en un aceite nutricional derivado del alga marina *Schizochytrium sp.*, que contiene gran cantidad de DHA. El placebo estará envasado igual y tendrá el mismo olor, textura, sabor y color al DHA-basic[®] pero sin el producto dietético. La suplementación dietética empleada en el estudio y el placebo serán aportados por el Laboratorio CASEN Fleet S.L.U. y se etiquetará de acuerdo a las recomendaciones del Real Decreto 223/2004. La suplementación del producto o del placebo se hará mediante la administración de un aceite que se debe agitar antes de usar, se extrae de la botella con jeringuilla dosificadora y se toma una vez al día de forma aislada o bien mezclado con cualquier comida principal. La forma de tomar el producto se le explicará con detalle por parte de los investigadores y la primera dosis del mismo será ingerida en el Hospital.

La Unidad de Ensayos clínicos del Hospital Universitario Ramón y Cajal, después de haber realizado el proceso de aleatorización (asignación al azar de tratamiento o placebo), le proveerá del suplemento dietético o placebo a las Unidades de Fibrosis Quística participantes en el estudio. El suplemento o placebo le será entregado por parte de los investigadores del estudio.

Durante el estudio es necesario que consuma una dieta variada y equilibrada, como se le recomienda habitualmente, y adecuada para la edad de su hijo/a. Esta dieta no debe contener otra fuente de DHA diferente de la del estudio, por lo que está prohibido el uso de aceite de pescado, linaza y las nueces, que contienen gran cantidad de DHA. La dieta debe ser, además, equilibrada en ácido linoleico (AL), precursor del ácido araquidónico (AA), que está elevado en pacientes con FQ y su aumento es perjudicial para la inflamación que tienen los distintos órganos del cuerpo en esta enfermedad, por lo que deben evitarse determinados aceites y grasas como el aceite de girasol, maíz y soja, la margarina y limitar la ingesta excesiva de manteca, aceite de oliva, yema y mayonesa. Todos los cereales, frutas, lácteos y derivados, pescados y mariscos, azúcares y dulces están permitidos (excepto hojaldres y magdalenas). De las carnes y aves, solo hay que

evitar la gallina, beicon, chicharrón, butifarra, lomo embuchado, chorizo y sobrasada. Los frutos secos deben restringirse un poco también. Le informamos que la limitación de estos productos no va a desviarse casi nada de la dieta habitual de su hijo/a, ya que la cantidad de gramos al día permitidos de los distintos alimentos es lo que habitualmente su hijo/a ingiere en una dieta como la que siempre le hemos recomendado. Su hijo/a en todo momento tomará una dieta equilibrada y balanceada en Ácido Grasas Esenciales.

Para la realización de este estudio, el promotor contratará una póliza de seguros que garantiza compensación e indemnización en caso de menoscabo de la salud de su hijo/a o de lesiones que pudieran producirse dentro de la investigación. Una vez iniciado el estudio, se hará constar en esta hoja el número de póliza y la compañía aseguradora contratada.

La asignación a cada grupo de tratamiento se realizará al azar (es decir como si tirásemos una moneda al aire) por lo que su hijo/a tiene la misma probabilidad de recibir la suplementación o el placebo. Ni usted, ni su hijo/a ni los investigadores del estudio sabremos que tratamiento tiene asignado hasta que finalice el mismo. Todas las características del producto le serán explicadas con minuciosidad por su médico y le serán dados por escrito en hojas informativas.

Este estudio clínico se desarrollará en las Unidades de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Ramón y Cajal, Hospital Universitario Doce de Octubre, Hospital Universitari i Politecnic La Fe de Valencia, Hospital Universitario Central de Asturias y Hospital Universitario La Princesa, y será llevado a cabo por los médicos que integran estas unidades y que son los que habitualmente tratan a su hijo/a. Antes la inclusión en el estudio se documentará la historia de su enfermedad y se le practicará una exploración médica y analítica detallada.

Durante el mismo se llevarán a cabo, en intervalos concretos que le serán detallados, una serie de análisis que requerirán la extracción de muestras de sangre (en total serán 3 a lo largo del año de estudio). También se realizarán pruebas de función respiratoria en todas las visitas, como se le hace habitualmente, y se recogerán muestras respiratorias

mediante de la técnica de esputo inducido, si su hijo/a es mayor de 6 años, o por aspirado–naso-faríngeo, si es menor de 6 años (en total serán 5 a lo largo del estudio) para estudio de la infección, inflamación y de la expresión de los genes en dicha muestra. Le mediremos, también en todas las visitas si su hijo/a es mayor de 6 años, el valor del Óxido Nítrico exhalado con un aparato por el que tiene que soplar durante 6-10 segundos. Esta medida nos sirve para valorar la inflamación pulmonar. Se le pedirá que entregue dos muestras pequeñas de heces en cada una de las 5 visitas y también en las tres últimas que rellene una encuesta dietética con lo que ha comido previamente su hijo/a. Si su hijo/a tiene clínica de exacerbación pulmonar después del proceso de aleatorización para tomar DHA o placebo, deberá acudir a la Unidad de FQ en el espacio de 24-48 horas para ser evaluado por uno de los médicos investigadores del estudio y comenzar tratamiento. Esta visita se considera como una Visita no Programada (VNP) y le será recogida una muestra de secreciones respiratorias (por esputo inducido o aspirado naso-faríngeo) para estudio microbiológico, de inflamación y de expresión de genes en las células de esa muestra. El tratamiento de las muestras se llevará a cabo de acuerdo a la Ley de Investigación Biomédica 14/2007 y las muestras serán almacenadas por un período de cinco años y a las mismas sólo tendrán acceso los miembros del equipo investigador.

Si su hija ha tenido la menarquia, también se le realizará una prueba de embarazo antes y al finalizar el estudio clínico.

En cada una de estas ocasiones y para recoger la medicación, deberán acudir al hospital. En total, serán necesarias como mínimo 5 visitas, una visita más de las que habitualmente le corresponden a su hijo/a de forma habitual. Durante las visitas se le entrevistará a usted y a su hijo/a, por favor, informe al investigador responsable durante el estudio de cualquier acontecimiento que haya ocurrido durante el periodo transcurrido desde la última visita. La participación de su hijo/a en el estudio no le supondrá coste económico alguno, salvo el inconveniente de tener que venir una vez más al Hospital de las visitas que habitualmente le corresponden. La suplementación con este alimento funcional o el placebo le serán proporcionados de forma gratuita.

En 5 de las visitas concertadas, su hijo/a, si es mayor de 6 años, tendrá que rellenar una encuesta de calidad de vida adecuada a su edad, que le llevará aproximadamente 15

minutos cada vez, y que deberá hacer antes de pasar a la consulta a la revisión habitual y también antes de ser pesado, medido o de que se le haya realizado la función pulmonar. También, tendrá que rellenar usted una encuesta de calidad de vida como padre de su hijo/a afecto de Fibrosis Quística.

Posibles molestias, acontecimientos adversos y riesgos:

El DHA no suele producir efectos secundarios pero a veces ocasiona vómitos, dolor abdominal o puede que no le guste a su hijo/a por su sabor a pescado. Le advertimos que por el diseño del estudio, se requerirán la extracción de sangre para determinaciones analíticas, que son las mismas que se le realizarían de forma habitual a lo largo del seguimiento en la consulta.

Adquisición de nuevos conocimientos:

Será informado, con la mayor brevedad posible, sobre los nuevos conocimientos que se vayan adquiriendo que pueden ocasionar un replanteamiento de su participación o la de su hijo/a en el estudio.

Posibles beneficios de la participación en el estudio:

Con la utilización de este alimento funcional en su dieta, es posible que se ralentice la progresión de la enfermedad de su hijo/a. Sin embargo, también es posible que su participación en este estudio no le produzca beneficios directos sobre su salud. Creemos que los resultados de este estudio pueden contribuir a mejorar el tratamiento para otros pacientes que tienen la misma enfermedad que su hijo/a.

Finalización prematura del estudio:

Quiero significarle claramente que la participación de su hijo/a en el estudio es voluntaria.

En cualquier momento puede usted retirar el consentimiento para que su hijo/a participe en el estudio sin que tenga que dar explicaciones de ningún tipo. Ello tampoco le comportará desventaja alguna en relación con la posterior atención médica de su hijo/a.

Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, es posible que yo, como médico responsable, decida que la participación de su hijo/a, deban finalizar de forma prematura sin previamente obtener su consentimiento. Las razones para ello pueden ser:

- No puede satisfacer los requerimientos del estudio.
- Si ha contraído otra enfermedad grave.

Si decide usted en nombre de su hijo/a finalizar prematuramente su participación en el estudio o si la misma es prematuramente cancelada por cualquiera de las razones arriba mencionadas, se realizará a su hijo/a un examen normal de control. Esto incluirá un chequeo físico y pruebas de laboratorio.

Confidencialidad de la documentación:

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo establecido en esta ley, usted puede ejercer los derechos en nombre de su hijo/a de acceso, modificación, oposición y cancelación de los datos, para lo cual deberá dirigirse al investigador principal del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código numérico y solo los médicos que participan en el estudio y los otros colaboradores podrían relacionar dichos datos con los de su hijo/a y con su historia clínica. Por lo tanto, la identidad de su hijo/a no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal. El responsable del Registro de los datos será el investigador principal de cada Unidad de FQ participante en el estudio.

Compensación económica:

Ni el promotor del estudio ni ninguno de los investigadores recibirá compensación económica alguna por el trabajo adicional que este estudio conlleve.

Estudios clínicos en menores de edad:

Al tratarse de un estudio clínico con menores de edad y si su hijo tiene más de 12 años de edad, se le va a entregar a él mismo una hoja de información y asentimiento informado adaptados a su capacidad de entendimiento y deberá firmarlos (este documento se llama “Consentimiento informado para el menor mayor de 12 años”). Además, de acuerdo a la legislación vigente, el promotor del estudio ha puesto en conocimiento del Ministerio Fiscal que se va a realizar este estudio y se pretende incluir menores de edad en el mismo.

Posibilidad de formular preguntas adicionales:

Mis colaboradores y yo mismo estamos a su disposición para comentar cualquier pregunta adicional relativa a este estudio clínico. Nos complacerá responderle a las preguntas relacionadas con sus derechos como padre/madre o tutor legal del paciente participante en este estudio.

Debe saber que este estudio, por sus características peculiares, ha sido aprobado por los Comités Éticos de Investigación Clínica de los Hospitales participantes y que el promotor del estudio ha contratado una póliza de seguro específica que le proporcionará compensación e indemnización en caso de menoscabo de la salud o de lesiones de su hijo/a por la participación en este estudio.

Además, como en el estudio participan niños, de acuerdo a la legislación vigente el promotor del estudio ha puesto en conocimiento del Ministerio Fiscal que se va a realizar este estudio y se pretende incluir menores de edad en el mismo.

**MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO PARA
PADRE/MADRE O TUTOR DEL MENOR**

Título: “Estudio de la eficacia del tratamiento a largo plazo con ácido docosahexanóico sobre la inflamación pulmonar, sistémica e intestinal en pacientes con Fibrosis Quística”

Código de protocolo: DHA-FQ-1

Yo (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:.....Nombre del investigador)

Comprendo que la participación de mi hijo/a es voluntaria.

Comprendo que puedo retirar a mi hijo/a del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para que mi hijo/a participe en el estudio.

FIRMA DEL PADRE-MADRE O TUTOR LEGAL

FECHA:

FIRMA DEL INVESTIGADOR

FECHA:

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente. Además el investigador se encargará de guardar una copia en la historia general del hospital del paciente.



HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL MENOR MAYOR DE 12 AÑOS (PACIENTE ENTRE 12 Y 18 AÑOS DE EDAD)

TITULO: “Estudio de la eficacia del tratamiento a largo plazo con ácido docosahexanóico sobre la inflamación pulmonar, sistémica e intestinal en pacientes con Fibrosis Quística”

Código de protocolo: DHA-FQ-1

Investigador principal:

Hospital:

Teléfono:

Nota a los padres o tutores legales:

Los padres o tutores legales deben firmar la hoja de consentimiento informado para padres o tutores legales. Este formulario de asentimiento, consentimiento para el menor mayor de 12 años de edad, debería ser leído en paralelo con el formulario de información sobre el estudio clínico para padres o tutores legales para obtener una información completa del estudio. Una firma en este formulario sólo no es suficiente para permitir a un niño o a un adolescente menor de edad entrar en el presente estudio.

Te pedimos que participes en este estudio de investigación pero antes de que decidas participar, necesitas saber lo siguiente:

1. Debemos explicarte el estudio para que sepas en que consiste y debes saber que puedes hacer las preguntas sobre el mismo que creas de interés.
2. Está bien decir “no” si tú no quieres participar en el estudio. Tendrás el mismo tipo de atención médica aunque no participes.
3. Puedes dejar de participar en el estudio en cualquier momento sin que por eso cambie tu atención médica.
4. Puede que el suplemento de la alimentación que queremos probar no tenga ningún beneficio para ti, pero a nosotros nos servirá para aprender y poder ayudar a otros pacientes como tú en el futuro.

Por qué estamos haciendo este estudio

Te invitamos a participar en este estudio porque tienes Fibrosis Quística (FQ), lo cual hace que tus pulmones, el intestino y otros órganos del cuerpo están inflamados y, además, los pulmones aclaran mal las secreciones y a veces puedes retener mucho moco. Por eso, de vez en cuando tienes infecciones pulmonares y hay que darte antibióticos. Recuerda que, además, para poder eliminar el exceso de moco, te decimos siempre que hagas todos los días la fisioterapia respiratoria y a lo mejor tomas algunas medicinas para mejorar el estado de tus pulmones y de otros órganos, por lo que este suplemento de la alimentación que te vamos a dar debes usarlo además de los otros medicamentos que recibes. Como puede que en tu caso el páncreas no funcione bien tienes que tomar enzimas para poder digerir la comida y vitaminas que siempre te faltan.

En este estudio queremos probar como funciona dar todos los días, una vez al día con las comidas o solo, y durante un año lo que llamamos un Alimento Dietético con Usos Médicos Especiales (ADUME), que en este caso es un aceite que contiene mucha cantidad de un ácido graso esencial (AGE), que es el Ácido Docosahexanóico (DHA) que tienen bajo los enfermos de Fibrosis Quística.

En este trabajo vamos a dar a la mitad de los enfermos un aceite que contiene DHA y la otra mitad va a tomar placebo (es decir, una solución con el mismo color, sabor, olor y textura pero que no tiene DHA) con la idea de probar si el DHA aportado en la dieta, disminuye la inflamación en los pulmones, intestino y en la sangre. El producto se llama en el mercado DHA-basic[®] y está basado en un aceite nutricional derivado del alga marina *Schizochytrium sp*, que contiene gran cantidad de DHA. El placebo estará envasado igual y tendrá el mismo olor, textura, sabor y color al DHA-basic[®] pero sin el producto dietético. La suplementación dietética empleada en el estudio y el placebo las fabrica el Laboratorio CASEN Fleet S.L.U. y se etiquetará de acuerdo a las recomendaciones del Real Decreto 223/2004.

La suplementación del producto o del placebo se hará mediante la administración de un aceite que se debe agitar antes de usar, se extrae de la botella con jeringuilla

dosificadora y se toma una vez al día de forma aislada o bien mezclado con cualquier comida principal. La forma de tomar el producto se te explicará con detalle por parte de los investigadores y la primera dosis del mismo será ingerida en el Hospital. La Unidad de Ensayos clínicos del Hospital Universitario Ramón y Cajal, después de haber realizado el proceso de aleatorización (asignación al azar de tratamiento o placebo), le dará el suplemento dietético o placebo a las Unidades de Fibrosis Quística participantes en el estudio y éste te será entregado por parte de los investigadores del estudio.

Que te toque tomar DHA o placebo depende del azar, es como si tiras una moneda al aire, tienes las mismas probabilidades de recibir una cosa o la otra y, además, tu médico y el resto de los investigadores tampoco van a saberlo por lo que no pueden influir en eso. La forma en la que tienes que tomar este alimento te lo van a explicar muy bien los médicos y las enfermeras que normalmente te tratan para que lo entiendas bien.

No podemos asegurarte en este estudio que te vayas a sentir mejor, ni tampoco que vaya a disminuir la inflamación de tus pulmones o tu páncreas, pero es posible que esto ocurra porque otros pacientes lo han experimentado en otros estudios.

Durante el estudio es necesario que consumas una dieta variada y equilibrada, como se te recomienda habitualmente pero esta dieta no debe contener otra fuente de DHA diferente a la del estudio, por lo que no puedes tomar aceite de pescado, linaza y las nueces, que contienen gran cantidad de DHA. La dieta debe ser, además, equilibrada en ácido linoleico (AL), precursor del ácido araquidónico (AA), que está elevado en pacientes con FQ y su aumento es perjudicial para la inflamación que tienen los distintos órganos del cuerpo en esta enfermedad, por lo que debes evitar determinados aceites y grasas como el aceite de girasol, maíz y soja, la margarina y limitar la ingesta excesiva de manteca, aceite de oliva, yema y mayonesa. Todos los cereales, frutas, lácteos y derivados, pescados y mariscos, azúcares y dulces están permitidos (excepto hojaldres y magdalenas). De las carnes y aves, solo hay que evitar la gallina, beicon, chicharrón, butifarra, lomo embuchado, chorizo y sobrasada. Los frutos secos deben restringirse un poco también. La limitación de estos productos no va a desviarse casi nada de tu dieta habitual, ya que la cantidad de gramos al día permitidos de los distintos alimentos es lo que habitualmente tomas y siempre te hemos recomendado. Vas a tomar una dieta equilibrada y balanceada en Ácido Grasas Esenciales.

Para la realización de este estudio, el promotor contratará una póliza de seguro que garantiza compensación e indemnización en caso de que por la participación en este estudio tengas algún problema físico. Una vez iniciado el estudio, se hará constar en esta hoja el número de póliza y la compañía aseguradora contratada.

Quién participará en este estudio y donde se va a realizar

En este estudio van a participar unas 100 personas mayores de 2 meses de edad que tiene FQ y se tratan en los Hospitales Universitarios Ramón y Cajal, Doce de Octubre y La Princesa de Madrid y, también, del Hospital de La Fe de Valencia y del Hospital Central de Asturias de Oviedo.

No hay ningún problema si no quieres participar en el estudio, es tu decisión y la tienes que tomar con libertad y sin presiones.

Qué tienes que hacer si decides participar en el estudio

Si entras a participar en el estudio, estarás en él durante 48 semanas (1 año). Tendrás que venir 5 veces al hospital a lo largo de ese tiempo. Habrá una primera visita 28 días antes del empezar el estudio y, por lo tanto, antes de iniciar el tratamiento con DHA o placebo, en la que decidirás si quieres participar en el estudio y tendrás que firmar este papel. Si decides participar, te haremos las siguientes pruebas:

1. Te hará tu médico una revisión en la que además de la exploración clínica, te pesarán y medirán.
2. Te harán soplar por una máquina (espirometría) para ver qué tal está tu función pulmonar (esto ya sabes que te lo hacen cada vez que vas a la revisión).
3. Te harán soplar por una máquina para valorar la inflamación de los pulmones (es muy fácil).
4. Te pediremos que traigas las heces de tres días (para el van de Kamer) con la encuesta dietética y dos muestra pequeña de heces (como otras veces) en todas las visitas.
5. Te recogerán un cultivo de esputo pero no como siempre, sino haciéndote inhalar suero salino al 3% y diciéndote que tosas, y si puedes expectores, cada 2 minutos. La prueba en total dura 12 minutos, por lo que tendrás que toser y expectorar 6 veces como mínimo, aunque también puedes hacerlo antes o

después de lo programado si tienes ganas de toser. Toda la expectoración se recogerá en un bote estéril para analizarla. Esta técnica especial para recoger el esputo hace que obtengamos más volumen y podamos estudiar más cosas en él, entre ellas como está de inflamado el pulmón, saber un poco más de las bacterias que tienes y que genes se han activado en ellas. Esta técnica se te lo explicarán con calma antes de empezar el estudio.

6. Te sacarán sangre de una vena del brazo para comprobar que tus análisis están bien.
7. Si eres chica y ya tienes la regla, te harán una prueba de embarazo.
8. Te harán unas preguntas para ver cómo te sientes y si puedes participar en el estudio.
9. Te preguntarán la medicación y la cantidad de enzimas pancreáticos que tomas.
10. Te darán unas recomendaciones de dieta que serán parecidas a las que te recomendamos siempre.
11. Te pedirán que si quieres participar firmes este documento. Tus padres firmarán otro permitiendo que participes en el estudio.
12. Si tienes clínica de infección pulmonar después de empezar a tomar el DHA o el placebo, debes venir al hospital en un espacio de tiempo de 24-48 horas (como haces habitualmente) para que los médicos del estudio te vean y te pongan el tratamiento que necesites. Esta visita se llama Visita No Programada (VNP) y en ella te recogeremos también la muestra de esputo, por la técnica que ya te hemos explicado de esputo inducido, para estudiar otra vez la infección, la inflamación y los genes.

Todos los análisis y las muestras serán tratados de acuerdo a lo establecido por la ley, en este caso por una que se llama: Ley de Investigación Biomédica 14/2007 y las muestras serán almacenadas por un período de cinco años y a las mismas sólo tendrán acceso los miembros del equipo investigador.

¿Qué me van a hacer a lo largo del año que dura el estudio?

Cuando empiece el estudio, tendrás que tomar el suplemento dietético o el placebo en el hospital para comprobar que no tienes problema con su ingesta. Luego, tendrás que hacer una visita al mes de haber empezado a utilizar esta suplementación en la dieta para comprobar que todo va bien y también a las 12, 24, y 48 semanas después del inicio del estudio.

En cada visita se te hará lo siguiente:

1. Tu médico te hará una revisión y de nuevo te pesará y tallará.
2. Te harán la espirometría y el análisis del óxido nítrico.
3. Te recogerán un cultivo de esputo como en la visita de selección, es decir como te hemos explicado antes, inhalando suero salino al 3% durante 12 minutos en total. Recuerda que con esta técnica se te pedirá que tosas y expectores cada 2 minutos, recogiendo el esputo resultante de las 6 veces en las que se te ha pedido expectorar y también de las veces en las que tú tengas tos de forma espontánea. Esta forma de recoger el esputo se hará en todas las visitas del estudio y en las visitas no programadas.
4. Te sacarán sangre de una vena del brazo en la mitad del estudio, para comprobar si la medicación que estás inhalando hace que tengas menos inflamación y ver que tus análisis van bien.
5. Te harán unas preguntas para ver cómo te sientes y si ha mejorado tu vida desde que tomas el producto o el placebo. Si tienes entre 6 y 13 años, tendrás que rellenar una encuesta cada vez que vengas y tus padres rellenarán otra. Es importante que lo hagas tú solo y contestes lo que te parezca.
6. Le preguntarán a tus padres que otras medicinas tomas y cuantos enzimas pancreáticos necesitas.
7. Te pediremos dos muestras pequeñas de heces.
8. En la visita de mitad del estudio y al final te pediremos de nuevo que traigas las heces de tres días (para el van de Kamer) con la encuesta dietética y una muestra pequeña de heces (como otras veces).
9. Si eres chica y ya tienes la regla, te haremos otra prueba de embarazo al final del estudio.

10. Te mediremos el oxígeno en la sangre de manera indirecta con un aparato que se llama Pulsioxímetro.
11. Te preguntaremos si te has sentido mal con la medicación o si has tenido cualquier problema.

En la visita final del estudio, además de lo anterior, te volveremos a hacer unos nuevos análisis de sangre para ver qué tal está tu salud y como está la inflamación, y además si eres chica, y ya tienes la regla, te haremos una nueva prueba de embarazo.

¿Me va a doler algo por participar en el estudio?

Te puede doler un poco cuando te saquen la muestra de sangre del brazo y puede que te quede un punto rojo y a veces hasta un hematoma en la zona donde te pinchó la enfermera, pero ya sabes que eso desaparece en unos días. Si cuando te estén sacando la sangre te sientes mareado, no dudes en decírselo a la enfermera o el médico. El análisis que te vamos a hacer es parecido al que te han hecho otras veces.

El tratamiento o el placebo no suelen tener efectos secundarios pero en algunos trabajos a la gente no le gusta el olor o el sabor, a veces les duele la tripa o tienen vómitos, pero todo esto es muy poco frecuente. Si te encuentras mal, tienes dolor o te pasa algo en el estudio, tienes que llamar al número de urgencias que te vamos a dar que funciona las 24 horas. Es importante que tu médico lo sepa lo antes posible. Puede ocurrir que a lo largo de la toma de este suplemento o del placebo comiences a no tolerarlo, en ese caso debes comentarlo con tus padres y llamar a tu médico para decidir si puedes seguir en el estudio o no.

Embarazo y natalidad

Lo más seguro es que el este suplemento no tenga ningún efecto perjudicial sobre el feto si te quedas embarazada, pero tampoco te lo podemos asegurar. Si eres una chica lo suficientemente mayor y tienes relaciones sexuales, lo mejor es emplear métodos para evitar quedarte embarazada durante el estudio. Puedes preguntar a tu médico por métodos para no quedarte embarazada. Si te quedas embarazada a lo largo del estudio, tendrás que dejar de participar en él y hacérselo saber a tu médico lo antes posible.

¿Qué ocurre si estoy participando en el estudio y luego cambio de opinión?

No tienes que preocuparte, no tienes que estar en el estudio si no quieres. Nadie va a enfadarse contigo y tu médico te seguirá tratando igual que antes.

Si empiezas el estudio, puedes pararlo en cualquier momento. Si decides interrumpir el estudio, debes comunicarlo a tu médico y acudir a la consulta para que se te hagan las pruebas finales. Es importante que si quieres parar lo hables con tus padres con total confianza.

También puede ocurrir que tu padre, madre o tutor quiere interrumpir el estudio, en ese caso al ser menor de edad ellos tiene derecho a decidir esa parte por ti. También tu médico puede decidir que ya no debes participar más por alguna causa, si es así te explicará por qué. También puede decidir que no participes más si creo que es eso mejor para ti, si no estás haciendo correctamente la medicación o si empiezas a encontrarte mal.

¿Me va a costar dinero participar en el estudio?

No os va a costar nada a ti ni a tus padres, salvo la molestia y el desplazamiento que supone venir una vez más a la consulta al mes de empezar el estudio.

¿Verá alguien la información médica sobre mi persona de este estudio?

Las personas que están trabajando en este estudio podrán ver tu información médica; sin embargo, no conservarán una vez finalizado el estudio ninguna información en la que aparezca tu nombre. No se dará tu nombre a nadie que no esté participando en el estudio. Toda la información del estudio que tiene que ver contigo, se guardará de forma confidencial, segura y sólo se utilizará para fines relacionados con el estudio. Todo esto se hace de acuerdo a una ley orgánica (que hace el Gobierno) que se llama Ley Orgánica 15/1999, del 13 de diciembre, sobre la protección de datos de carácter personal, la cual se hace efectiva de acuerdo a la Directiva Europea de 95/46/EC sobre protección de datos. Por lo tanto, tu identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal. El responsable del Registro de los datos será el investigador principal de cada Unidad de FQ participante en el estudio.

Tienes derecho a acceder a tus datos personales y si lo consideras necesario puedes modificarlos o rectificarlos. Si así lo deseas, debes decírselo a tus padres para que se lo digan al médico que te atiende en el estudio.

¿Cómo me informaré de lo que se descubra en este estudio?

En el momento que tu médico tenga nuevos conocimientos sobre el suplemento que estamos probando, te lo dirá cuanto antes.

Debes saber que este estudio, por sus características peculiares, ha sido aprobado por los Comités Éticos de Investigación Clínica de los Hospitales participantes y que el promotor del estudio ha contratado una póliza de seguro específica que te proporcionará compensación e indemnización en caso de empeoramiento de tu salud o de lesiones que puedan producirse.

Además, como en el estudio participan niños, de acuerdo a la legislación vigente el promotor del estudio ha puesto en conocimiento del Ministerio Fiscal que se va a realizar este estudio y se pretende incluir menores de edad en el mismo.

MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL NIÑO MAYOR DE 12 AÑOS

Título: “Estudio de la eficacia del tratamiento a largo plazo con ácido docosahexanóico sobre la inflamación pulmonar, sistémica e intestinal en pacientes con Fibrosis Quística”

Código de protocolo: DHA-FQ-1

Con tu firma nos indicas que has leído el estudio, que has tenido la oportunidad de plantear todas las preguntas que has considerado convenientes y que te han sido aclaradas.

Por otra parte ratificas que tu padre, madre o tutor, así como el personal que participa en el estudio te han explicado en que consiste éste, que lo has entendido bien y que también te han explicado todas las pruebas que te van a hacer.

También ratificas que te han explicado que si te sientes mal, no toleras bien la medicación o simplemente no quieres seguir en el estudio, debes decirlo cuanto antes y puedes dejar de tomar el fármaco si así lo deseas, sin que eso modifique nada el trato que recibes por parte de tu médico. Que tienes claro que si quieres más información del estudio puedes preguntarla en cualquier momento. También que sabes que tus datos están protegidos por una ley (Ley Orgánica 15/1999 de diciembre) sobre la protección de datos de carácter personal. Que has comprendido que tu historia clínica puede ser vista por el promotor del estudio, por otras personas que están en la investigación o por personas que están autorizadas para ello y que das tu permiso para que estas personas tengan acceso a tu historia clínica y que el Ministerio Fiscal pueda ser notificado de tu participación en el estudio.

Nombre del niño en letra de imprenta

Edad

Firma del niño

Fecha

Nombre del investigador.....

Firma.....

Fecha

Este documento se firmará por duplicado quedándose una copia el investigador y otra el paciente. Además el investigador se encargará de guardar una copia en la historia general del hospital del paciente.

Anexo 5. Listado de alimentos permitidos, limitados y prohibidos durante el estudio

Aceites y grasas

Permitido: Mantequilla (máx. 10 g/día)

Limitado: Manteca, aceite de oliva (30 mL/día), mayonesa (10 g/día)

Prohibido: Aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de soja, margarina vegetal, aceite de cacahuete

Huevos

Permitido: Huevo entero (máx. 3 Ud/semana)

Limitado: Yema

Cereales y derivados

Permitido: Pan tostado tipo biscote, pan de molde de trigo integral, harina de trigo integral, pan de molde de trigo blanco, harina de trigo refinada, pasta, sémola de trigo, pan de trigo integral, pan de trigo blanco, tapioca

Carnes, caza y embutido

Permitido: Butifarra, salchicha fresca, pies de cerdo, jamón serrano, chuleta de cerdo, lomo de cerdo, jamón york, pavo, salchichón, pato, salchicha de Frankfurt, mortadela, conejo, liebre, pollo, foie-gras, pierna de cordero, hígado de ternera, cerdo, cordero o pollo, costillas de cordero, caballo, bistec de buey, solomillo de buey, bistec de ternera, chuleta de ternera, solomillo de ternera, riñones de ternera

Limitado: Lomo embuchado, chorizo, sobrasada (3 raciones/semana))

Prohibido: Gallina, beicon, chicharrón, butifarra cocida

Pescado, mariscos y crustáceos (máx. 5 raciones/semana)

Permitido: Ostras, sardinas, boquerón, anchoas, salmón, sardina en lata en aceite vegetal, caballa, atún, atún en lata en aceite vegetal, salmón ahumado, salmonete, trucha, mejillón, merluza, rape, gambas, langostino, lenguado, bacalao fresco, bacalao en salazón

Frutas

Permitido: Aceitunas, aguacate, coco, mango

Pastelería

Permitido: Bollo, ensaimada, croissant chocolate, melindros, coca, roscón, galletas chocolate, galletas tipo María, bizcocho, galletas con mantequilla, Donut®, croissant, galletas saladas

Prohibido: Pasta de hojaldre cocida, pasta brisa cocida, magdalenas

Azúcares y dulces

Permitido: Chocolate sin leche, chocolate con leche, cacao en polvo, helado sorbete, polo

Lácteos y derivados

Permitido: Queso emmenthal, queso roquefort, queso gruyere, leche de vaca entera en polvo, nata y crema de leche, queso camembert, queso manchego, queso de bola, queso en porciones, queso parmesano, petit suisse natural y de sabores, leche de vaca condensada azucarada o sin azucarar, queso de burgos, queso quark, cuajada, helados lácteos, leche de vaca entera, yogur enriquecido con nata, requesón, yogur natural, queso blanco desnatado, yogur con fruta, leche de vaca en polvo descremada, yogur desnatado, yogur desnatado con fruta

Frutos secos

Prohibido: Nueces, piñones, cacahuete, almendra, avellanas, pistacho



Contents lists available at ScienceDirect

Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plefa



Long-term docosahexaenoic acid (DHA) supplementation in cystic fibrosis patients: a randomized, multi-center, double-blind, placebo-controlled trial

Alejandro López-Neyra^{a,b,*}, Lucrecia Suárez^{a,b}, Marta Muñoz^a, Ana de Blas^a,
Marta Ruiz de Valbuena^a, María Garriga^{b,c}, Joaquim Calvo^d, Carmen Ribes^d, Rosa Girón Moreno^e,
Luis Máiz^{b,f}, David González^g, Carlos Bousoño^g, Javier Manzanares^h, Óscar Pastor^{b,i,j},
Javier Martínez-Botas^{b,i,k}, Rosa del Campo^{b,l}, Rafael Cantón^{b,l}, Garbiñe Roy^m, Miriam Menachoⁿ,
David Arroyo^{o,p}, Javier Zamora^{o,p}, Joan B Soriano^{q,r}, Adelaida Lamas^{a,b}

^a Unidad de Fibrosis Quística. Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Ramón y Cajal. C^o Colmenar Km. 9,1. 28034-Madrid. Spain

^b Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). C^o Colmenar Km. 9,1. 28034-Madrid. Spain

^c Unidad de Fibrosis Quística. Servicio de Endocrinología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. C^o Colmenar Km. 9,1. 28034-Madrid. Spain

^d Unidad de Fibrosis Quística. Servicio de Pediatría. Hospital Universitario La Fe. Avinguda de Fernando Abril Martorell, 106. 46026-Valencia. Spain

^e Unidad de Fibrosis Quística. Servicio de Neumología. Hospital Universitario La Princesa. Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa. Calle de Diego de León, 62. 28006-Madrid. Spain

^f Unidad de Fibrosis Quística. Servicio de Neumología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. C^o Colmenar Km. 9,1. 28034-Madrid. Spain

^g Unidad de Fibrosis Quística. Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Central de Asturias. Av. Roma. 33011-Oviedo. Spain

^h Unidad de Fibrosis Quística. Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Doce de Octubre. Avda. de Córdoba. 28041-Madrid. Spain

ⁱ Servicio de Bioquímica Clínica, UCA-CCM. Hospital Universitario Ramón y Cajal. C^o Colmenar Km. 9,1. 28034-Madrid. Spain

^j CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III. Av. Monforte de Lemos, 3-5. 28029-Madrid. Spain

^k Servicio de Bioquímica-Investigación. Hospital Universitario Ramón y Cajal. C^o Colmenar Km. 9,1. 28034-Madrid. Spain

^l Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal. C^o Colmenar Km. 9,1. 28034-Madrid. Spain

^m Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Ramón y Cajal. C^o Colmenar Km. 9,1. 28034-Madrid. Spain

ⁿ Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Ramón y Cajal. C^o Colmenar Km. 9,1. 28034-Madrid. Spain

^o Unidad de Bioestadística Clínica, Hospital Universitario Ramón y Cajal. C^o Colmenar Km. 9,1. 28034-Madrid. Spain

^p CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III. Av. Monforte de Lemos, 3-5. 28029-Madrid. Spain

^q Hospital Universitario La Princesa. Universidad Autónoma de Madrid. Calle de Diego de León, 62. 28006-Madrid. Spain

^r Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III. Av. Monforte de Lemos, 3-5. 28029-Madrid. Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Essential fatty acids

ABSTRACT

Background: Cystic fibrosis (CF) patients have an alteration in fatty acid (FA) metabolism, associated with increased omega-6 and low omega-3 FA. Previous studies on supplementation with omega-3 FA in CF had

Declaration of interest: none

Funding

This study has been supported by the Spanish Clinical Research Network (SCReN), funded by the Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, grant PT13/0002/0007 integrated in the Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, and cofinanced by the European Regional Development Fund.

This study was funded by:

- Ministry of Health (Orden SAS/2377/2010 de ayudas para la investigación clínica independiente).
- Consortio de Apoyo a la Investigación Biomédica en Red (CAIBER): reference code: 1392-I-036.
- CAIBER 2012 grant for Marta Muñoz as clinical researcher.
- Sira Carrasco grant, awarded by Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (SEGHNP) 2011.
- “Ayuda a la Fibrosis Quística” grant, awarded by Pablo Motos Foundation 2011.
- “Ayuda a la Fibrosis Quística” grant, awarded by Sira Carrasco Foundation 2011.
- “Ayuda a la Fibrosis Quística” grant, awarded by Sira Carrasco Foundation 2014.
- Project OBN18PI03, Instituto de Salud Carlos III

Sponsor had not any role in study design, in collection, analysis or interpretation of data, in the writing of the report or in the decision to submit the article for publication.

* Corresponding author: Alejandro López-Neyra. Unidad de Fibrosis Quística. Servicio de Pediatría. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Hospital Universitario Ramón y Cajal, C^o Colmenar Km 9,1. 28034-Madrid, Spain, **Telephone:** +34-91 3368092

E-mail addresses: alopezn@salud.madrid.org, alopezn@hotmail.com (A. López-Neyra).

<https://doi.org/10.1016/j.plefa.2020.102186>

Received 23 February 2020; Received in revised form 25 September 2020; Accepted 29 September 2020
0952-3278/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Omega-3 Fatty Acids
 Docosahexaenoic acid
 Inflammation
 Interleukin-8
 Cystic Fibrosis

contradictory results, and to date there is no evidence to recommend routine use of omega-3 supplements in CF patients. We hypothesized that long-term supplementation with docosahexaenoic acid (DHA) will have beneficial effects in these patients, by reducing pulmonary, systemic and intestinal inflammation.

Methods: This was a randomized, double-blind, parallel, placebo-controlled trial. CF patients (age > 2 months) were randomized to receive a seaweed DHA oil solution (50 mg/Kg/day) or matching placebo for 48 weeks. Primary outcomes were pulmonary (interleukin [IL]-8), systemic (IL-8) and intestinal (calprotectin) inflammatory biomarkers. Secondary outcomes included other pulmonary (IL-1 β , IL-6, neutrophil elastase, lactate and calprotectin) and systemic (serum-IL-1 β , IL-6) inflammatory biomarkers, as well as clinical outcomes (FEV₁, pulmonary exacerbations, antibiotic use, nutritional status and quality of life).

Results: Ninety six CF patients, 44 female, age 14.6 \pm 11.9 years (48 DHA and 48 placebo) were included. At trial completion, there were no differences in all primary outcomes [serum-IL-8 (p=0.909), respiratory-IL-8 (p=0.384) or fecal calprotectin (p=0.948)], all secondary inflammatory biomarkers, or in any of the clinical outcomes evaluated. There were few adverse events, with similar incidence in both study groups.

Conclusion: In this study, long-term DHA supplementation in CF patients was safe, but did not offer any benefit on inflammatory biomarkers, or in clinical outcomes compared with placebo.

(NCT01783613)

1. INTRODUCTION

Inflammation plays a key role in the development of the cystic fibrosis (CF) lung disease, can be detected early in life, and predicts the development of bronchiectasis [1-3]. CF airways contain large amounts of pro-inflammatory mediators such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 and IL-17, while they are deficient in several counter-regulatory biomarkers including IL-10, nitric oxide and lipoxin (LX)-A₄ [4,5]. Neutrophils are the predominant cells in the CF airways and have a central role in the progression of lung disease [1]. Although several cytokines participate in the increased influx and decreased clearance of neutrophils, IL-8 is considered to be the most important, because its concentration in bronchoalveolar lavage often correlates with the amount of neutrophils and its products, even in the absence of bacterial infection [3].

Essential fatty acids (FA) are poly-unsaturated fatty acids (PUFAs) that cannot be synthesized in the body, and therefore must be obtained from diet. There are two families of essential FA: n-6 (omega-6) and n-3 (omega-3) [6]. Arachidonic acid (AA), a product of the n-6 pathway, is a precursor of very active inflammatory mediators such as prostaglandins, leukotrienes (LT) and thromboxanes, while eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), products of the n-3 pathway, are precursors of less inflammatory mediators and several anti-inflammatory lipids (resolvins, protectins and maresins) [2].

It is known that FA metabolism is altered in *cfr/cfr*- mice and CF patients. They show increased levels of n-6 PUFAs (AA and linoleic acid), low levels of DHA, and an increase in the AA/DHA ratio [7-9]. This lipid profile is considered to be secondary to the CFTR dysfunction and not to malabsorption or the nutritional status, because it is also seen in cell cultures [10] and in well-nourished patients [9], and carriers have a AA/DHA ratio between CF patients and healthy controls [8].

Supplementation with n-3 PUFAs demonstrated positive effects on several inflammatory diseases [11], but its effect on CF are controversial. There are several studies in CF patients that show a reduction in inflammatory biomarkers (i.e. LTB₅, immunoglobulins, TNF- α), an improvement in lung function (forced expiratory volume in the first second -FEV₁-) or a reduction in pulmonary exacerbations (PE), or need of antibiotics, but the results are not consistent among studies [12-20]. Of note, most of these trials involved a reduced number of patients, and are short-term (i.e. 8-12 weeks), not-blind or not placebo-controlled studies. The latest available Cochrane review included only five trials, totaling 106 patients, and concluded that there is insufficient evidence to recommend routine use of n-3 PUFAs supplements in patients with CF [21].

We hypothesized that long-term supplementation with a DHA supplement would have a beneficial effect in patients with CF, by reducing pulmonary, systemic and intestinal inflammation.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study overview

This was a randomized, double-blind, parallel, placebo-controlled trial conducted at five CF Units in Spain, from September 2011 to March 2013. The trial protocol was in accordance with the Declaration of Helsinki, and both national and European legislation, registered at ClinicalTrial.gov (NCT01783613) and approved by the Institutional Review Board at each site (Reference IRB: Hospital Universitario Ramón y Cajal -HURyC-; project n. 230/10). All parents or legal representatives of CF patients if < 18 years old, and all CF patients > 12 years old included in the study signed the written informed consent. We followed CONSORT guidance for reporting clinical trials [22], and a CONSORT checklist is appended in a Supplementary File.

2.2. Participants

Patients with a confirmed diagnosis of CF of ages 2 months and older were eligible for participating in the trial. Patients > 6 years old were also required to perform a valid forced spirometry with a FEV₁ \geq 30% of the predicted value, and induced sputum. All patients had to be clinically stable with no PE, antibiotic treatment, hospitalization or changes in their usual therapy during the 2 weeks before the start of the study. Patients were excluded if they had known hypersensitivity to DHA or any of the components of the study product, were on treatment with anticoagulant or antiplatelet drugs or had any of the following conditions: platelet count < 50,000/mm³, liver dysfunction (elevated liver enzymes > 3-fold the upper limit of normality -ULN-, conjugated bilirubin > 2-fold the ULN or portal hypertension), prothrombin activity < 70%, serum albumin < 2.5 g/dL, renal insufficiency, severe hemoptysis in the 4 weeks before signing of the informed consent, or pregnancy.

2.3. Randomization and blinding

An independent statistician was responsible for the randomization (1:1 ratio) of study participants. Randomization used a minimization algorithm with minimization factors age (< 2 years or \geq 2 years), FEV₁ (< 75% or \geq 75%), chronic *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) infection (yes or no), continuous treatment with azithromycin (yes or no), and continuous treatment with nebulized dornase alpha (yes or no). Nor patients or their families neither clinical and research personnel were aware of the randomization allocation.

The patient's treating doctors assessed patients for eligibility and invited each to participate in the trial. After informed consent was signed, the statistician was contacted via telephone or email to proceed with the patient's randomization. Each patient was identified with a

unique trial identification number.

2.4. Intervention

Participants in the active arm of the trial received DHA (50 mg/Kg/day, up to 3 g of DHA/day) from a seaweed (*Schizochytrium* spp) oil solution containing 35% of DHA (DHA-basic®, CASEN Fleet SLU, Pozuelo de Alarcón, Spain). DHA dose was selected because previous studies of essential FA in CF used similar or lower doses, except for the Kurlandksy et al. study where a dose of 100 mg/kg/d was used [18], and this dose has demonstrated to be enough to provide benefit in other conditions [23]. The product was administered once daily, orally, with one of the main meals, for 48 weeks. Participants in the placebo arm received an oil solution containing a mixture of corn and soy oil, without DHA or EPA, at the same doses, manufactured by the same laboratory, and with a similar taste, smell and texture. Composition of the active product is shown in table E1 of the Supplementary File. All patients or parents were given age-specific dietary recommendations in order to homogenize the daily intake of PUFAs during the study (see Supplementary File).

Usual medications were allowed, with no restrictions, and all patients continued with their prescribed treatments. All treatments at the beginning and during the study period were recorded.

An initial visit (V0) was scheduled in which informed consent was signed and all clinical and analytical procedures were performed (see Outcomes section below). If a patient fulfilled all the inclusion criteria, and none of the exclusion criteria, a new visit was scheduled (V1) in the following 28 days in which that patient was randomized and the first dose of the study product or placebo was administered. See

Supplementary File for the complete study procedures description. Table E2 also provides a summary of study visits and procedures.

2.5. Outcomes

Primary outcomes were serum concentration of IL-8 (systemic inflammation), concentration of IL-8 in respiratory secretions (pulmonary inflammation), and concentration of fecal calprotectin (intestinal inflammation). Secondary inflammatory outcomes included serum IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , percentage of neutrophils and C-reactive protein, and IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , neutrophil elastase (NE) activity, lactate and calprotectin in respiratory secretions. Other secondary outcomes were changes in PUFAs profile in serum and erythrocyte membrane, number of PE (defined by modified Fuchs' criteria [24]) and severe PE (defined by need of intravenous -i.v.- antibiotic treatment) during the study, time to first PE and time to first severe PE, changes in spirometry (when available), nutritional status (height, weight, body mass index -BMI-), dose of pancreatic enzymes, percentage of fat reabsorption (<18 years old), fecal elastase, quality of life (QoL), and *P. aeruginosa* primary infection.

2.6. Statistical analysis

A sample size was calculated *a priori* on the basis of published data of inflammatory biomarkers in stable CF patients [25,26]. With 50 patients in each group the study had 84% power to detect a standardized mean difference of 0.6 of biomarkers between groups, with a two-tailed alpha level of $p < 0.05$.

All analyses were performed on an intention-to-treat basis according

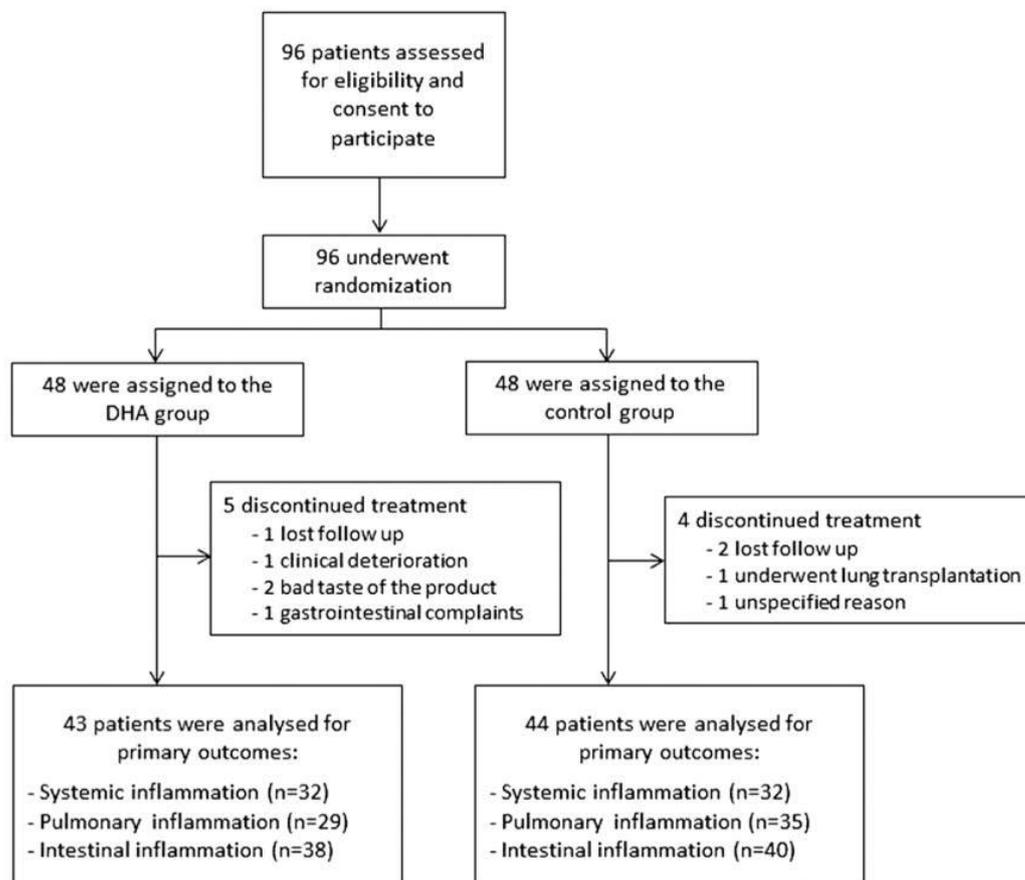


Figure 1. Flow chart of participation. Screening, randomization and follow-up.

to a pre-specified statistical analysis plan. Between-group differences in continuous variables were assessed using the t-test when normality could be assumed (checked by Shapiro-Wilk test) or the Mann-Whitney rank-sum test otherwise. Categorical variables were compared using the chi-squared test or Fisher exact test, wherever appropriate. Exacerbation-free survival time was estimated using Kaplan-Meier, and survival curves were compared using the log-rank test. Hazard ratios (HR) and their 95% confidence intervals (95% CI), were calculated using Cox proportional regression. A mixed-effect regression model was used for estimating the weekly effect of DHA on the study outcomes. Subgroup analyses were conducted according to the minimization factors. The statistical analysis was adjusted for baseline values and the number of alleles with F508del mutations (0, 1 or 2), because the distribution was unbalanced across study groups.

All statistical tests were 2-tailed, and the results were considered statistically significant at $p < 0.05$. Stata version 14.1 (StataCorp, College Station, Texas, USA) was used for all analyses.

3. RESULTS

Overall, a total of 96 patients were invited and accepted to participate in the study. They were randomized to the study product ($n = 48$) or placebo ($n = 48$) (Figure 1). Baseline characteristics were similar in the two study groups, except for the number of alleles with F508del mutations (0, 1 or 2) ($p = 0.027$) (Table 1). Adherence to treatment, calculated with bottles returned (% of doses prescribed), was very high in both groups (DHA 95.3 ± 50.1 ; placebo 97.2 ± 52.9 ; $p = 0.861$). Due to the multicentric nature of the study and some unexpected issues in processing and transporting the participants' samples, there were some missing data in several variables; therefore, comparisons of some outcomes included less subjects than expected. Accordingly, sample size finally included has been specified in each comparison.

3.1. Primary outcomes

There were no differences between DHA and placebo groups in any of the primary outcomes related to systemic, pulmonary or intestinal inflammation at the end of the study (Table 2), or at any other visits (data not shown). Multivariate analysis did also show no differences in any primary outcome between DHA and placebo effect over the study period.

3.2. Secondary outcomes

Analyses of other inflammatory biomarkers did not find differences between groups in systemic or pulmonary inflammation at the end of the study. There were also no differences in clinical variables or QoL. Table 3 summarized the most important secondary outcomes at the end of the study. No differences were found at any other time point throughout the study, neither in the univariate nor in the multivariate analysis.

There were no differences in the rate of PE between study groups (incidence rate DHA 1.9/patient-year, placebo 1.9/patient-year; incidence rate ratio -IRR- 1.03, 95% CI 0.75; 1.43, $p = 0.845$) or severe PE requiring i.v. treatment (incidence rate DHA 0.14/patient-year, placebo 0.32/patient-year; IRR 2.2, 95% CI 0.8; 7.09, $p = 0.096$). Time to first PE (HR 1.28, 95% CI 0.80; 2.04, $p = 0.301$) and time to first severe PE (HR 0.52, 95% CI 0.19; 1.42, $p = 0.203$) were similar in both study groups. Survival curves of PE and severe PE-free survival time are shown in Figure E1 of the Supplementary File.

PUFAs serum profile changed significantly with the administration of DHA, as there was an increase in DHA group compared with placebo in omega-3 FA: DHA (DHA 89.3 ± 42 $\mu\text{g}/\text{dL}$, placebo 38.7 ± 14.1 $\mu\text{g}/\text{dL}$, $p < 0.0001$), EPA (DHA 18.1 ± 14.1 $\mu\text{g}/\text{dL}$, placebo 10.6 ± 8.1 $\mu\text{g}/\text{dL}$, $p < 0.003$); and a decrease in omega-6 FA: AA (DHA 133.4 ± 33.5 , placebo 153.6 ± 40.3 $\mu\text{g}/\text{dL}$, $p = 0.014$), gamma-linolenic acid (DHA

6.4 ± 3.3 $\mu\text{g}/\text{dL}$, placebo 10 ± 4.9 $\mu\text{g}/\text{dL}$ $p < 0.0001$). Due to technical issues, determination of PUFAs in erythrocyte membrane was not possible.

Rate of *P. aeruginosa* primary infection in non-chronically infected patients (incidence rate DHA 0.34/patient-year, placebo 0.39/patient-year; IRR 0.88, 95% CI 0.36; 2.16, $p = 0.763$) and time to primary infection (HR 1.07, 95% CI 0.38; 3.06, $p = 0.897$) were similar between study groups.

A priori defined subgroup analysis according to minimization factors did not show any effect modification in any of the outcomes studied.

3.3. Sensitivity analysis

We performed sensitivity analysis using log-transformed outcome data and results were identical as per the primary analysis. We did not observe any difference between groups in any of the primary and secondary inflammatory parameters. We also performed a second sensitivity analysis including log-transformed longitudinal data by a mixed model. Results closely matched those obtained in the primary analysis (See E-table 3 on Supplementary File).

3.4. Safety

Administration of DHA was safe and well tolerated. Apart from PE, there were few adverse effects, without significant differences between study groups (Table 4). Four patients discontinued the treatment in the placebo group and 5 in the DHA group (IRR 0.77 95% CI 0.15; 3.56, $p = 0.706$). There were also no differences in the time to discontinuation (HR 1.30, 95% CI 0.36; 4.93, $p = 0.677$). Reasons for discontinuation are presented in Figure 1.

4. DISCUSSION

In this multicenter, randomized, controlled trial, an oral supplement of 50 mg/Kg/day of DHA was not associated with improvement or

Table 1
Demographic and clinical characteristics of study participants at baseline, by group

Characteristic	DHA (n = 48)	Placebo (n = 48)
Age (years)	14.4 \pm 12.9	14.9 \pm 11.1
Female sex	21 (43.8%)	23 (47.9%)
Genotype		
F508del/F508del	13 (27%)	22 (45.8%)
F508del/Other	27 (56.3%)	14 (29.2%)
Other/Other	8 (16.7%)	12 (25%)
Pancreatic insufficiency	40 (83.3%)	37 (77%)
CF-related liver disease	9 (18.8%)	4 (8.4%)
CF-related diabetes	4 (8.4%)	1 (2%)
Hemoptysis	0	3 (6.3%)
ABPA	0	3 (6.3%)
Chronic <i>S. aureus</i> infection	31 (64.6%)	26 (54.2%)
Chronic <i>P. aeruginosa</i> infection	10 (20.8%)	12 (25%)
Chronic <i>S. maltophilia</i> infection	2 (4.2%)	2 (4.2%)
Weight (z-score)	-0.68 \pm 0.73	-0.745 \pm 0.87
BMI (z-score)	-0.28 \pm 0.79	-0.53 \pm 0.82
Pancreatic enzyme dose (IU/Kg/day)	4238 \pm 2175	3752 \pm 2168
FEV ₁ (z-score)	-2.12 \pm 1.75	-2.26 \pm 1.74
Serum IL-8 (pg/mL)	5.5 \pm 14.4	1108 \pm 4627.1
IL-8 in respiratory secretions (pg/mL)	8073.9 \pm 15614.2	6322.9 \pm 5533.6
Fecal calprotectin ($\mu\text{g}/\text{g}$ stool)	154.9 \pm 175.8	232.9 \pm 333.5
DHA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	36.8 \pm 18.7	38.8 \pm 11.8
Arachidonic acid ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	141.9 \pm 34.1	155.6 \pm 46.3

Categorical data are expressed as value (percentage). Continuous data are expressed as mean \pm SD.

DHA: docosahexaenoic acid; CF: cystic fibrosis; ABPA: Allergic bronchopulmonary aspergillosis; BMI: body mass index; FEV₁: forced expiratory volume in the first second; IL: interleukin.

Table 2
Primary outcomes. Inflammatory markers at the end of the study (week 48)

	DHA	Placebo	P*
Serum IL-8 (pg/mL)	921.3 ± 3631.1 (n=32)	2349.1 ± 8115.9 (n=32)	0.909
IL-8 in respiratory secretions (pg/mL)	8913.9 ± 14517.5 (n=29)	5177.9 ± 5338.4 (n=35)	0.384
Fecal calprotectin (µg/g stool)	144.8 ± 158.4 (n=38)	144.6 ± 133.1 (n=40)	0.948

DHA: docosahexaenoic acid; IL: interleukin.

* Wilcoxon signed-rank test

Table 3
Secondary outcomes at the end of the study (week 48)

	DHA	Placebo	P*
IL-1β in respiratory secretions (pg/mL)	649.4 ± 834.6 (n=29)	815.3 ± 1305 (n=35)	0.741
IL-6 in respiratory secretions (pg/mL)	3.8 ± 9.3 (n=29)	48.7 ± 142 (n=35)	0.261
NE in respiratory secretions (ng/mL)	192.1 ± 168.9 (n=27)	177.3 ± 207.5 (n=31)	0.370
Lactate in respiratory secretions (mmol/L)	0.7 ± 0.8 (n=17)	0.8 ± 1.3 (n=18)	0.668
Calprotectin in respiratory secretions (µg/mL)	345.9 ± 214.1 (n=17)	365.93 ± 195.2 (n=17)	0.547
Serum IL-1β (pg/mL)	1 ± 5.9 (n=32)	5.6 ± 31.6 (n=32)	0.982
Serum IL-6 (pg/mL)	2.3 ± 9 (n=32)	12.9 ± 40.5 (n=32)	0.339
Percentage neutrophils (%)	50.2 ± 14.5 (n=43)	52 ± 16 (n=43)	0.460
C-reactive protein (mg/L)	4.7 ± 7.1 (n=41)	7.3 ± 17.1 (n=44)	0.378
Weight (z-score)	-0.6 ± 0.8 (n=43)	-0.7 ± 0.9 (n=44)	0.104
BMI (z-score)	-0.3 ± 0.7 (n=43)	-0.6 ± 0.9 (n=44)	0.75
Pancreatic enzyme dose (IU/Kg/day)	4521.3 ± 2095.2 (n=34)	3794.4 ± 2166.4 (n=36)	0.192
Fat reabsorption coefficient (%)	92.5 ± 7.1 (n=27)	91.9 ± 5.8 (n=26)	0.556
FEV ₁ (z-score)	-2 ± 1.8 (n=29)	-1.9 ± 1.6 (n=32)	0.298
Respiratory Symptoms Scale (CFQ-R)	74.9 ± 15.4 (n=25)	71.4 ± 20.6 (n=30)	0.809

Data are expressed as mean ± SD. Number of patients included in each analysis is shown in brackets. DHA: docosahexaenoic acid; IL: interleukin; NE: neutrophil elastase; BMI: body mass index; FEV₁: forced expiratory volume in the first second; CFQ-R: cystic fibrosis questionnaire revised.

*Wilcoxon signed-rank test

Table 4
Adverse events during the study period

	DHA	Placebo	Total
Respiratory	77	83	160
Digestive	4	8	12
Infectious diseases	11	17	28
<i>P. aeruginosa</i> primary infection	13	13	26
Neurologic	2	1	3
Other	4	4	8
Total adverse events	111	126	237

p=0.815

deterioration in inflammatory markers or clinical outcomes in patients with CF.

The effect of DHA or other n-3 PUFAs on inflammation in CF has been studied before, but with contradictory results. In short-term trials (6 weeks), supplementation with EPA [12] or a mix of n-3 PUFAs [18]

identified a positive effect on the metabolism of LTB₄. A longer trial (6 months) with a n-3 PUFAs mix supplementation reported an increase in LTB₅, a much less active metabolite of AA, and a decrease in LTB₄/LTB₅ ratio [15]. The effect on IL-8 is also very variable. Keen et al. found, in a three-arm study (n-3, n-6 or placebo) during 3 months, that both a n-3 mix supplement and placebo decreased serum IL-8 compared with a n-6 supplement, with a greater effect in the n-3 group [16]. However, other studies did not find any effect of DHA supplementation on serum IL-8 at 6 [27] or 12 months [20]. In our trial, we did not find any changes in any of the inflammatory biomarkers studied in the long-term. Similarly to our trial, 6 months of active treatment did not find significant changes in fecal calprotectin [27].

Beyond the laboratory outcomes, clinical outcomes are key in CF patients. Pulmonary function (mainly FEV₁) is an important outcome in all CF trials. In our study, we failed to demonstrate any effect of DHA on FEV₁. The study of Lawrence et al. reported an improvement in pulmonary function after 6 weeks of EPA supplementation in a small number of patients [12]. Other studies reporting better lung function had no control group [13,14,27]. Randomized controlled studies which have assessed pulmonary function did not find either any effect of DHA supplementation on pulmonary function [15-20,28-30]. PE have not been widely studied in DHA trials in CF. We did not find a decrease in PE rate, or in the time to a first PE. One non-controlled trial found fewer PE in the study year than in the previous year, in adults with CF supplemented with a mix of PUFAs [13]. However, most controlled trials have not found differences in PE [16,20,30], except for the study of Hanssens et al., which reported a decrease in the number of PE (1.7 vs 3) and the days on oral and i.v. antibiotic treatment [17]. Although they report no differences in baseline characteristics, probably due to the small number of participants (n=15), the supplemented group had better FEV₁ (83% vs 65%) [17], and this could explain the difference in PE rate. Our results in nutritional status or enzyme treatment are in accordance with others, which did not find any significant effect of DHA supplementation [12,14-18,20,27,30,31]. QoL has only been previously assessed in the study by Oliveira et al [13]. Although they used another questionnaire (St. George), they neither found, like us, any significant effect [13].

Side effects of the DHA supplement were similar to other trials elsewhere, with a similar rate of dropouts during the study [12-18,20,27,30,31].

Strengths of our trial include the long-term follow-up (one year), the variety of biomarkers studied, and a sufficient number of patients included that fulfilled the *a priori* established sample size, and was similar to the number of patients included in the latest Cochrane review of the topic [21]. Other strengths are the high adherence to the treatment, which accounts for the changes observed in the serum PUFAs profile in the treatment group. Finally, the wide range of outcomes we assessed, allowed us to look for multiple effects of DHA on CF patients, although we did not find any.

A number of limitations of our study deserve to be considered. First, we included patients with diverse ages and clinical conditions. Although this could reduce the effect of DHA, we do not think this is the case, because subgroup analyses, including a post-hoc sub-analysis of patients with detectable inflammation (i.e. different from zero), did not change results (data not shown). Indeed, patients included in the study represent the usual patients seen in CF clinics daily, so results should be easily generalized. On the other hand, the absence of very severe patients prevents us from applying these findings to such type of patients. Another limitation is the great dispersion of serum IL-8 values and missing data of some inflammatory biomarkers. Although our main analysis using non-parametric statistics was adequate to address data asymmetry and overdispersion, we acknowledge that this could have slightly lowered the statistical power of our study. However, our sensitivity analysis exploring the impact of using log-transformed data or using repeated measures mixed models rendered similar results supporting our findings. We were also unable to assess PUFAs levels in

erythrocyte membrane; although it is a good biomarker of the metabolism and intake of omega-3 fatty acids in the body, changes in the PUFA profile have also been found to be a good indicator of adherence to omega-3 treatment [32], and the changes observed in the study group confirm the good adherence recorded with the percentage of bottles returned. Lastly, the DHA product used in the study contained up to 20% of FA 22:5n6 (n-6 docosapentaenoic acid); although changes in serum PUFAs profile in the study were similar to published ones, we cannot rule out that the product used in this study could have lesser activity than other products with a purer n-3 PUFA composition. Finally, although we used a number of minimization factors for block randomization, there was a relative imbalance in genotypes by treatment arms (Table 1).

5. CONCLUSIONS

In this study long-term (up to one year) DHA supplementation in CF patients was safe, but did not offer any benefit on inflammatory biomarkers or any clinical outcomes compared with placebo.

Author statement

Alejandro López-Neyra: Formal analysis, Data Curation, Writing-Original draft, Writing-Review&Editing, Visualization; **Lucrecia Suárez:** Conceptualization, Methodology, Resources, Supervision, Funding acquisition; **Marta Muñoz:** Investigation, Resources; **Ana de Blas:** Investigation, Resources; **Marta Ruiz de Valbuena:** Investigation, Resources; **María Garriga:** Investigation, Resources; **Joaquim Calvo:** Investigation, Resources; **Carmen Ribes:** Investigation, Resources; **Rosa Girón Moreno:** Investigation, Resources; **Luis Máiz:** Investigation, Resources; **David González:** Investigation, Resources; **Carlos Bousoño:** Investigation, Resources; **Javier Manzanares:** Investigation, Resources; **Óscar Pastor:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources; **Javier Martínez-Botas:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources; **Rosa del Campo:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources; **Rafael Cantón:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing-Review&Editing; **Garbiñe Roy:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources; **Miriam Menacho:** Investigation, Resources; **David Arroyo:** Formal analysis, Resources, Data Curation, Writing-Review&Editing; **Javier Zamora:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Resources, Data Curation, Writing-Review&Editing; **Joan B Soriano:** Formal analysis, Writing-Original draft, Writing-Review&Editing, Visualization; **Adelaida Lamas:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing-Original draft, Writing-Review&Editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

All authors were fully responsible for all content and editorial decisions, retained full control over all content contained in this report, and have given final approval of the version submitted.

Conflict of interest

None of the authors have any conflict of interest, neither direct nor indirect. The authors have no financial relationships to disclose in relationship with this submission.

Data sharing statement

The full study protocol (in Spanish) and individual participant data that support the findings of this study, after deidentification, are available from the corresponding author, AL-N, upon request for investigators whose proposed use of the data has been approved by an independent review committee identified for this purpose. Proposals should be directed to alneyra@salud.madrid.org. To gain access, data requestors should need to sign a data access agreement.

Acknowledgments

We are grateful to all the patients and parents who participated in this study.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.plefa.2020.102186.

REFERENCES

- [1] DP Nichols, JF Chmiel, Inflammation and its genesis in cystic fibrosis, *Pediatr Pulmonol* 50 (Suppl 40) (2015) S39–S56, <https://doi.org/10.1002/ppul.23242>.
- [2] EA Roesch, DP Nichols, JF Chmiel, Inflammation in cystic fibrosis: An update, *Pediatr Pulmonol* 53 (2018) S30–S50, <https://doi.org/10.1002/ppul.24129>.
- [3] TZ Khan, JS Wagener, T Bost, J Martinez, FJ Accurso, DW. Riches, Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis, *Am J Respir Crit Care Med* 151 (1995) 1075–1082, <https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.4.7697234>.
- [4] CL Karp, LM Flick, KW Park, S Softic, TM Greer, R Keledjian, et al., Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway, *Nat Immunol* 5 (2004) 388–392, <https://doi.org/10.1038/ni1056>.
- [5] M Cockx, M Gouwy, J Van Damme, S. Struyf, Chemoattractants and cytokines in primary ciliary dyskinesia and cystic fibrosis: key players in chronic respiratory diseases, *Cell Mol Immunol* 15 (2018) 312–323, <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.118>.
- [6] MR Al-Turkmani, SD Freedman, M. Laposata, Fatty acid alterations and n-3 fatty acid supplementation in cystic fibrosis, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77 (2007) 309–318, <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.10.009>.
- [7] SD Freedman, PG Blanco, JC Shea, JG. Alvarez, Analysis of lipid abnormalities in CF mice, *Methods Mol Med* 70 (2002) 517–524, <https://doi.org/10.1385/1-59259-187-6:517>.
- [8] SD Freedman, PG Blanco, MM Zaman, JC Shea, M Ollero, IK Hopper, et al., Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism, *N Engl J Med* 350 (2004) 560–569, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021218>.
- [9] M Roulet, P Frascarolo, I Rappaz, M Pilet, Essential fatty acid deficiency in well nourished young cystic fibrosis patients, *Eur J Pediatr* 156 (1997) 952–956.
- [10] C Andersson, MR Al-Turkmani, JE Savaille, R Alturkmani, W Katrangi, JE Cluette-Brown, et al., Cell culture models demonstrate that CFTR dysfunction leads to defective fatty acid composition and metabolism, *J Lipid Res* 49 (2008) 1692–1700, <https://doi.org/10.1194/jlr.M700388-JLR200>.
- [11] PC Calder, Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man, *Biochem Soc Trans* 45 (2017) 1105–1115, <https://doi.org/10.1042/BST20160474>.
- [12] R Lawrence, T Sorrell, Eicosapentaenoic acid in cystic fibrosis: evidence of a pathogenetic role for leukotriene B4, *Lancet* 342 (1993) 465–469.
- [13] G Oliveira, C Oliveira, E Acosta, F Espildora, L Garrido-Sanchez, E Garcia-Escobar, et al., Fatty acid supplements improve respiratory, inflammatory and nutritional parameters in adults with cystic fibrosis, *Arch Bronconeumol* 46 (2010) 70–77, <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2009.11.001>.
- [14] B De Vizia, V Raia, C Spano, C Pavlidis, A Coruzzo, M. Alessio, Effect of an 8-month treatment with omega-3 fatty acids (eicosapentaenoic and docosahexaenoic) in patients with cystic fibrosis, *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 27 (2003) 52–57, <https://doi.org/10.1177/014860710302700152>.
- [15] A Panchaud, A Sauty, Y Kernen, LA Decosterd, T Buclin, O Boulat, et al., Biological effects of a dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in cystic fibrosis patients: a randomized, crossover placebo-controlled trial, *Clin Nutr* 25 (2006) 418–427, <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2005.10.011>.
- [16] C Keen, AC Olin, S Eriksson, A Ekman, A Lindblad, S Basu, et al., Supplementation with fatty acids influences the airway nitric oxide and inflammatory markers in patients with cystic fibrosis, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 50 (2010) 537–544, <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181b47967>.
- [17] L Hanssens, I Thiebaut, N Lefevre, A Malfroot, C Knoop, J Duchateau, et al., The clinical benefits of long-term supplementation with omega-3 fatty acids in cystic fibrosis patients - A pilot study, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 108 (2016) 45–50, <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.03.014>.
- [18] LE Kurlandsky, MR Bennink, PM Webb, PJ Ulrich, LJ. Baer, The absorption and effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids on serum leukotriene B4 in patients with cystic fibrosis, *Pediatr Pulmonol* 18 (1994) 211–217.
- [19] G Steinkamp, H Demmelmair, I Ruhl-Bagheri, H von der Hardt, B. Koletzko, Energy supplements rich in linoleic acid improve body weight and essential fatty acid status of cystic fibrosis patients, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31 (2000) 418–423.
- [20] G Alicandro, N Faelli, R Gagliardini, B Santini, G Magazzu, A Biffi, et al., A randomized placebo-controlled study on high-dose oral algal docosahexaenoic acid supplementation in children with cystic fibrosis, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 88 (2013) 163–169, <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2012.10.002>.
- [21] C Oliver, H Watson, C Stackhouse, Omega-3 fatty acid supplementation for cystic fibrosis, *Cochrane Database Syst Rev* (2020) CD002201, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002201.pub6>.
- [22] KF Schulz, DG Altman, D Moher, C Group, CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials, *BMJ* 340 (2010) c332, <https://doi.org/10.1136/bmj.c332>.

- [23] BJ Meyer, RHM Groot, Effects of Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Cardiovascular Mortality: The Importance of the Dose of DHA, *Nutrients* 9 (2017), <https://doi.org/10.3390/nu9121305>.
- [24] HJ Fuchs, DS Borowitz, DH Christiansen, EM Morris, ML Nash, BW Ramsey, et al., Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group, *N Engl J Med* 331 (1994) 637–642, <https://doi.org/10.1056/NEJM199409083311003>.
- [25] SL Werlin, I Benuri-Silbiger, E Kerem, SN Adler, E Goldin, J Zimmerman, et al., Evidence of intestinal inflammation in patients with cystic fibrosis, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51 (2010) 304–308, <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181d1b013>.
- [26] DG Downey, SL Martin, M Dempster, JE Moore, MT Keogan, B Starcher, et al., The relationship of clinical and inflammatory markers to outcome in stable patients with cystic fibrosis, *Pediatr Pulmonol* 42 (2007) 216–220, <https://doi.org/10.1002/ppul.20553>.
- [27] E Leggieri, RV De Biase, D Savi, S Zullo, I Halili, S Quattrucci, Clinical effects of diet supplementation with DHA in pediatric patients suffering from cystic fibrosis, *Minerva Pediatr* 65 (2013) 389–398.
- [28] DP Katz, T Manner, P Furst, J Askanazi, The use of an intravenous fish oil emulsion enriched with omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis, *Nutrition* 12 (1996) 334–339.
- [29] JD Lloyd-Still, CA Powers, DR Hoffman, K Boyd-Trull, LA Lester, DC Benisek, et al., Bioavailability and safety of a high dose of docosahexaenoic acid triacylglycerol of algal origin in cystic fibrosis patients: a randomized, controlled study, *Nutrition* 22 (2006) 36–46, <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.05.006>.
- [30] S Van Biervliet, M Devos, T Delhaye, JP Van Biervliet, E Robberecht, A Christophe, Oral DHA supplementation in DeltaF508 homozygous cystic fibrosis patients, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 78 (2008) 109–115, <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.12.005>.
- [31] WR Henderson Jr., SJ Astley, MM McCready, P Kushmerick, S Casey, JW Becker, et al., Oral absorption of omega-3 fatty acids in patients with cystic fibrosis who have pancreatic insufficiency and in healthy control subjects, *J Pediatr* 124 (1994) 400–408.
- [32] J Cao, KA Schwichtenberg, NQ Hanson, MY Tsai, Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids, *Clin Chem* 52 (2006) 2265–2272, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.072322>.