

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y  
DESARROLLO, A.C.

**Recuperación de infantes desnutridos graves con fórmulas  
modulares que contienen proteína de soya modificada o proteínas  
lácteas**

**Por**

**Victoria Lilly Ruvalcaba Márquez**

---

Tesis aprobada por la  
Dirección de Nutrición

como requisito parcial para obtener el grado de

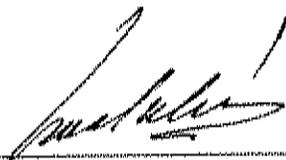
**MAESTRIA EN CIENCIAS**

Hennosillo, Sonora

Diciembre de 2004.

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Victoria Lilly Ruvalcaba Márquez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Nutrición y Alimentos.



---

Dra. Ana María Calderón de la Barca C.  
Directora de Tesis



---

MC. Adriana V. Bolaños Villar

Asesor



---

Dr. José Alberto López Díaz

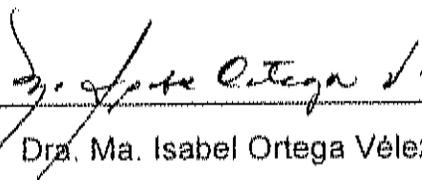
Asesor



---

Dr. Mauro E. Valencia J.

Asesor



---

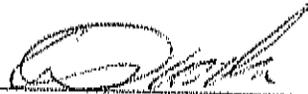
Dra. Ma. Isabel Ortega Vélez

Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del director de tesis.



---

Dr. Alfonso Gardea Béjar  
Director General del CIAD, A.C.

## DEDICATORIA

A Dios:

Por haberme puesto en el camino un reto más y darme las amistades necesarias para lograrlo.

A mis Papás, Crucito y Viviana:

Gracias muchachos por darme su apoyo y permitirme lograr una aventura más.

Los extrañé mucho pero nunca los senti lejos.

Los amo.

A la Kcht's:

Hermanita, gracias por tu apoyo y cariño.

Tus giiiiiiiiis hacen mi día.

Te amo.

A Noé:

Apodaca, gracias =)

Y suerte!!!

A mis abuelitos, tios, primos y sobrinos por su constante apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

**"El lunar, es el punto final del poema de la belleza"**

**Ramón Gómez de la Serna**

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por brindarme el apoyo económico para estudiar la maestría.*

*Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, por haberme dado la oportunidad de desarrollar parte de mi trabajo de tesis en sus instalaciones.*

A la Dra. Ana María por aceptarme en su grupo de trabajo y arriesgarse conmigo. Dice mi Papá que sólo los secretos se dan a los hijos, usted me dio muchos Doctora, gracias.

A la Dra. Isabel, al Dr. Mauro, Dr. Alberto y MC. Adriana por todo su apoyo para llevar a su fin este trabajo.

Al personal del *Hospital Infantil del Estado de Sonora*, al Dr. Jaime Hurtado, a las nutriólogas Claudia y Marisela por su cooperación y enseñanzas y a todas las señoras amables del banco de leche.

A los niños y sus mamás que formaron parte de este trabajo, por su confianza y colaboración. Se quedan en mejores manos.

A mis amigos de laboratorio: Mi hermine, hermana sabes cuanto te quiero !!!, Xaviera y su pink planet, gracias por ayudarme. Emmanuel, manta te extraño !!!, Javis, ves? si me acordé. Aurora, rompiste con el esquema !!!, Adri, chiquita, hermosa, reina. Renecito, gracias por ser más amigo e instructor. Abraham y José Alberto gracias por su amistad. Cynthia, mucha suerte !!!.

A mis amigos y compañeros: Sonia, Eduardo, Edith Val-BUENA, Mata, Chayito, Mario, Francelia, Alex Pedraza, Citlalli, Héctor Jr y Gerardo.

## CONTENIDO

	Página
PRÓLOGO .....	v
INTRODUCCIÓN .....	vii
ANTECEDENTES GENERALES .....	ix
Manejo Dietario de la Desnutrición .....	ix
Evaluación de la Recuperación Nutricia .....	x
Métodos Antropométricos .....	x
Índices Bioquímicos .....	xi
Fórmulas Disponibles para el Tratamiento de la Desnutrición.....	xii
Fuentes Proteicas Usadas en el Tratamiento de la Desnutrición.....	xii
Modificación Enzimática.....	xiii
REFERENCIAS.....	xiv
 <b>Capítulo I. IMPLEMENTACIÓN DE FÓRMULAS MODULARES PARA LA RECUPERACIÓN INTRAHOSPITALARIA DE LA DESNUTRICIÓN INFANTIL</b>	
RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
MATERIALES Y MÉTODOS .....	3
Diseño de la sala para la preparación de fórmulas.....	3
Elaboración de fórmulas modulares .....	3
Participación del personal del hospital.....	4
Sujetos y tratamiento intrahospitalario.....	4
Evaluación antropométrica de la recuperación.....	5
Evaluación bioquímica de la recuperación .....	5
Análisis estadístico .....	6
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
Diseño y equipamiento de la sala para la preparación de fórmulas.....	6

Calidad sanitaria, funcionalidad y costo de las fórmulas .....	7
Evaluación antropométrica .....	7
Evaluación bioquímica .....	9
RECONOCIMIENTOS.....	10
REFERENCIAS.....	11
Tabla 1. Cantidades de ingredientes utilizados en las formulaciones F-75 y F-100.....	13
Tabla 2. Contribución de macronutrientes a las fórmulas F-75 y F-100..	14
Tabla 3. Valor promedio de las variables antropométricas al inicio y al final del tratamiento. ....	15
Tabla 4. Valor promedio de las variables bioquímicas al inicio y al final del tratamiento. ....	16

**Capítulo II. VALIDACIÓN DE UN ENSAYO INMUNOQUÍMICO  
PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PREALBÚMINA HUMANA**

RESUMEN .....	17
INTRODUCCIÓN .....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
Materiales .....	20
Prueba de los anticuerpos anti-prealbúmina .....	20
Purificación y análisis de la prealbúmina estándar .....	20
Purificación.....	20
Detección por ensayo de manchas .....	22
Desarrollo del inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) .....	23
Construcción de una matriz de dilución .....	23
Construcción de la curva estándar.....	23
Variación intra e interensayos y análisis estadístico .....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
Prueba de los anticuerpos anti-prealbúmina .....	25
Purificación y análisis de la prealbúmina estándar .....	25

Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).....	26
Matriz de dilución .....	26
Curva estándar.....	26
Variación intra e inter-ensayo.....	27
Muestras problema .....	28
CONCLUSIÓN .....	29
REFERENCIAS.....	30
Figura 1. Inmunodifusión radial en agarosa de anticuerpos anti- prealbúmina, contra suero humano.....	32
Tabla 1. Matriz de dilución de prealbúmina en suero humano y de los anticuerpos de conejo anti-prealbúmina humana.....	33
Tabla 2. Concentración sérica de prealbúmina (mg/dL) de niños desnutridos durante el tratamiento nutricional con respecto al tiempo. ....	34
Figura 2. Curva estándar de prealbúmina obtenida en el ELISA. ....	35

**Capítulo III. COMPARACIÓN DEL TRATAMIENTO INTRAHOSPITALARIO  
DE NIÑOS DESNUTRIDOS CON PROTEÍNAS DE LECHE Y  
ALTERNATIVAMENTE PROTEÍNAS DE SOYA MODIFICADA**

RESUMEN .....	36
INTRODUCCIÓN .....	37
MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
Material e ingredientes .....	40
Obtención de la proteína de soya modificada enzimáticamente (F1-10 <sub>E</sub> ) .....	40
Concentrado de enzimas .....	40
Hidrólisis enzimática .....	41
Síntesis enzimática, ultrafiltración y secado.....	42
Caracterización química de la fracción enriquecida F1-10 <sub>E</sub> .....	42
Análisis proximal .....	42
Composición de aminoácidos .....	43
Tratamiento intrahospitalario de niños desnutridos .....	44

Población .....	44
Protocolo de alimentación.....	44
Ingredientes de las fórmulas .....	45
Preparación <i>in situ</i> de la fórmula modular .....	45
Osmolalidad .....	45
Evaluación antropométrica.....	46
Evaluación bioquímica .....	46
Análisis estadístico.....	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
Modificación enzimática.....	47
Obtención del concentrado enzimático .....	47
Obtención de la proteína de soya modificada enzimáticamente .....	47
Tratamiento intrahospitalario de niños desnutridos .....	49
Características de la población .....	49
Tratamientos .....	50
Osmolalidad de las fórmulas.....	52
Evaluación antropométrica durante la recuperación .....	53
Evaluación bioquímica .....	54
CONCLUSIONES .....	57
REFERENCIAS.....	58
Tabla 1. Ingredientes utilizados en las formulaciones F-75 y F-100 .....	62
Tabla 2. Perfil de aminoácidos esenciales de proteínas de leche de vaca, aislado de soya y F <sub>1-10</sub> E.....	63
Tabla 3. Promedio de variables antropométricas al inicio y final del tratamiento .....	63
Tabla 4. Promedio de variables bioquímicas al inicio y final del tratamiento de ambos grupos.....	65

## RESUMEN

A principios del 2002, personal del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), solicitó a investigadores de CIAD apoyo para la preparación de una fórmula enteral para la recuperación de la desnutrición, de acuerdo a los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud. Para dimensionar el problema, se inició analizando los expedientes para cuantificar y tipificar los casos de desnutrición infantil, a lo largo de la historia del hospital. A continuación, se sometió a concurso un protocolo de investigación: "Tratamiento hospitalario de la desnutrición infantil con proteína de soya enzimáticamente modificada", para obtener recursos en apoyo del proyecto en el hospital. Esto porque se estaba finalizando con una evaluación en modelos animales de desnutrición, de la proteína modificada antes mencionada.

El protocolo resultó ganador y fue así como se inició esta tesis, con el mismo objetivo general de la propuesta: diseñar y preparar una formulación enteral hospitalaria, cuya base proteica fuera la soya modificada enzimáticamente. Así mismo, evaluar su eficiencia terapéutica en un grupo de infantes con desnutrición de segundo o tercer grado, en comparación a proteínas lácteas. Por esto, la primera etapa de este trabajo incluyó poner en marcha una sala de preparación de fórmulas enterales en el HIES. Esta parte forma el Capítulo I de esta investigación y ha derivado en un artículo que ya está en revisión editorial en la Revista Panamericana de Salud Pública de la OPS.

Cuando se consideraron los indicadores para evaluar el estado nutricional de los niños al inicio y durante la rehabilitación, nos ganó el laboratorio clínico sobre nuestro magisterio en nutrición. Por esto, se decidió usar como herramienta los niveles de prealbúmina sérica. En el Capítulo II de la tesis se presenta el manuscrito sobre el desarrollo de un ensayo de laboratorio para cuantificar prealbúmina. Se pretende enviar este artículo a *Clinical Chemistry*, para su evaluación y posible publicación. Aunque se aplicó el ensayo a lo largo de todo el estudio, sólo al final hubo tiempo para trabajar los detalles de la publicación.

El Capítulo III, presenta el desarrollo de 2 de los objetivos específicos del proyecto. a) Obtener la proteína de soya enriquecida enzimáticamente con metionina, para su uso como ingrediente proteico en una formulación enteral y b) evaluar la eficacia de la fórmula enteral en el tratamiento clínico de la desnutrición, en el ámbito intrahospitalario, en comparación con una fórmula enteral elaborada con proteínas de leche de vaca.

para su evaluación y posible publicación. Aunque se aplicó el ensayo a lo largo de todo el estudio, sólo al final hubo tiempo para trabajar los detalles de la publicación.

El Capítulo 11, presenta el desarrollo de 2 de los objetivos específicos del proyecto, a) Obtener la proteína de soya enriquecida enzimáticamente con metionina, para su uso como ingrediente proteico en una formulación enteral y b) evaluar la eficacia de la fórmula enteral en el tratamiento clínico de la desnutrición, en el ámbito intrahospitalario, en comparación con una fórmula enteral elaborada con proteínas de leche de vaca.

## INTRODUCCIÓN

La desnutrición energético-proteica (DEP) es el resultado de la disponibilidad inadecuada de energía y nutrimentos a las células y tejidos del organismo (Secretaría de Salud, 1998). Aunque puede presentarse a cualquier edad, los niños menores de 5 años y especialmente durante el primer año de vida, tienen mayor riesgo. Esto, debido a que sus requerimientos nutricios son más altos durante esta etapa de crecimiento acelerado (Plazas, 2001).

En México, 800 mil niños menores de 5 años padecen de desnutrición severa, afectando principalmente a los estados del sur del país (INSP, 2001). En el estado de Sonora los índices de desnutrición son de alrededor de 8% (Ávila y col., 1997). Los casos que se presentan a nivel hospitalario, son principalmente de niños de familias jornaleras que migran del sur del país en busca de trabajo en los campos agrícolas. En el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), un centro de atención y concentración regional, un 3.6% de los ingresos son a causa de la desnutrición, 42% del tipo primario (Bolaños, 2004).

Los productos utilizados en los hospitales para el apoyo nutricional, son fórmulas especiales comerciales para pacientes hipercatabólicos o fórmulas infantiles comerciales a las que se añaden aceite y glucosa. Las fórmulas comerciales más adecuadas son de alto costo y la población que los requiere no es precisamente la mejor posicionada económicamente. Por esto, la OMS recomienda el uso de fórmulas modulares en el tratamiento de la desnutrición grave (WHO, 1999). Estas se preparan con ingredientes comerciales de bajo costo y utilizando proteínas de leche de vaca desnatada.

En algunos casos, las proteínas de leche o de fuentes vegetales integrales pueden causar reacciones de alergia o malabsorción en los niños con desnutrición grave, cuyo sistema gastrointestinal está vulnerable. Por esto, algunas fórmulas para alimentación especial son preparadas con proteínas de

leche o soya predigeridas o hidrolizadas. Tal es el caso de las fórmulas para pacientes hipercatabólicos, que se usan como alternativa para los desnutridos cuando no da buen resultado el uso de fórmulas con proteínas completas. Además del alto costo, las fórmulas con proteínas hidrolizadas por lo general tienen sabor amargo. Este sabor se debe a la presencia de aminoácidos libres que se generan durante la hidrólisis o a aquellos que son añadidos intencionalmente.

Para evitar el sabor amargo al mismo tiempo que se obtiene una buena absorción y un perfil de aminoácidos ideal, se ha propuesto la modificación enzimática de las proteínas. Ésta se realiza por medio de una hidrólisis leve, seguida de ultrafiltración para remover polipéptidos de poca digestión y aquellos muy pequeños entre los cuales están los de sabor amargo. Después, los aminoácidos que hagan falta a los péptidos para un perfil adecuado, se unen químicamente por medio de enzimas. Con esta técnica, se ha podido ampliar el espectro de uso de las proteínas vegetales. La proteína de soya modificada enzimáticamente con metionina unida covalentemente, se ha probado con excelentes resultados en un modelo animal con desnutrición, siendo incluso comparable con la caseína. También el sabor final de la fórmula es muy aceptable (De Regil y Calderón de la Barca, 2004).

En este trabajo, se dio tratamiento nutricional a niños con desnutrición grave internados en el HIES, utilizando las fórmulas modulares recomendadas por la OMS. Se comparó la eficiencia de la proteína de soya modificada enzimáticamente como fuente alternativa de la proteína de leche de vaca durante la recuperación. Por último, se desarrolló un ensayo de ELISA para la cuantificación de prealbúmina sérica, un indicador bioquímico muy sensible a la deficiencia e incorporación de la proteína a la dieta (Beck y Rosenthal, 2002).

## ANTECEDENTES GENERALES

### Manejo Dietario de la Desnutrición

El objetivo del apoyo nutricional en los casos de desnutrición infantil, es inducir una repleción acelerada de los depósitos corporales de proteínas y energía y favorecer con esto una recuperación rápida. Para aplicarlo se deben considerar: 1) los requerimientos nutricios; 2) la elección de vía nutricional y modalidad para infundir y; 3) la composición de la fórmula a utilizar (Lagrutta, 1996).

La Organización Mundial de la Salud (1999) recomienda para el tratamiento de la desnutrición infantil el uso de dos fórmulas modulares, F-75 (75 kcal/mL) y F-100 (100 kcal/mL). La F-75 se administra durante la fase inicial del tratamiento, mientras que la F-100 se utiliza en la fase de rehabilitación, después de que se ha recuperado el apetito. Estas fórmulas se pueden preparar fácilmente a partir de ingredientes básicos como: leche desnatada en polvo, azúcar, aceite comestible vegetal, mezcla de minerales y vitaminas (WHO, 1999).

El niño con desnutrición presenta apetito escaso, debilidad y estomatitis dolorosa, por lo que la vía enteral es la más adecuada para el apoyo nutricional. En comparación a la vía intravenosa, es más fisiológica y permite una función intestinal normal (Bloch y Mueller, 2001). Cuando el niño en tratamiento recupera el apetito y no requiere ser alimentado con sonda nasogástrica, se considera que ha entrado en la etapa de rehabilitación nutricional. Esto indica que las infecciones gastrointestinales o respiratorias han sido controladas, que el hígado es capaz de metabolizar los alimentos y que las anomalías metabólicas han mejorado. En este momento es necesario registrar los cambios metabólicos que se presentan con el fin de evaluar la eficiencia de la intervención, haciendo uso de los métodos antropométricos y bioquímicos.

## Evaluación de la Recuperación Nutricia

### **Métodos Antropométricos**

Las mediciones antropométricas son útiles para la evaluación del crecimiento y de la composición corporal. Para evaluar el crecimiento se utilizan comúnmente la talla o longitud (para niños menores de 24 meses de edad) y el peso corporal. Ambas mediciones son rápidas y fáciles de desarrollar. Relacionando el peso, la talla, el sexo y la edad se obtienen indicadores, como: peso/talla, peso/edad y talla/edad; que son utilizados para clasificar el estado nutricional. Los valores de los indicadores se comparan con clasificaciones que tienen puntos de corte basados en desviaciones estándar (DE) de una población sana de referencia. Cuando el indicador de peso para la talla presenta  $-1$  DE de la mediana de los valores de referencia del NCHS/OMS, se considera seguro dar de alta a un niño recuperado de desnutrición (WHO, 1999).

La circunferencia cefálica se ha asociado directamente con el crecimiento del cerebro, por lo que es una medida antropométrica útil en la evaluación del niño a edad temprana (Vásquez-Garibay, 1998). Los niños con desnutrición, presentan valores por debajo del rango normal debido a la dieta limitada en proteínas.

Las mediciones de composición corporal se basan en el supuesto de que el cuerpo se divide en dos compartimentos: grasa corporal y masa corporal libre de grasa. La evaluación indirecta de ambos compartimentos es útil para determinar el estado nutricional (Gibson, 1990). Estas mediciones son relativamente rápidas, no invasivas y requieren de un mínimo de equipo. La grasa corporal se puede determinar por la relación de ecuaciones empíricas con la medición del grosor de varios pliegues cutáneos y de la circunferencia media del brazo. Cuando los cambios de composición de la grasa corporal son pequeños, no se detectan con esta última técnica.

## **Índices Bioquímicos**

La evaluación bioquímica del estado nutricional tiene ventajas sobre otros métodos en cuanto a precisión, sensibilidad y especificidad. Las pruebas de laboratorio son usadas efectivamente para establecer una deficiencia nutricional a nivel subclínico y denotar las reservas y homeostasis de nutrientes. Sin embargo, este tipo de técnicas tiene limitaciones debido a su alto costo, complejidad, tipo y tamaño de la muestra requerida. Por lo que la evaluación bioquímica se ve limitada al tamaño de muestra del estudio (Linder, 1991).

Los avances recientes en computación, robótica e instrumentos de análisis han sido aplicados al laboratorio clínico para mejorar y desarrollar nuevas técnicas. La introducción de juegos de reactivos comerciales y los microensayos han permitido reducir costos y tiempos de reacción.

Las proteínas séricas totales y la hemoglobina, han sido los indicadores bioquímicos de rutina en la evaluación del grado de desnutrición y de la recuperación nutricional (Vásquez-Garibay, 1998). Sin embargo, en los últimos años se ha utilizado la cuantificación de prealbúmina sérica como un indicador bioquímico del grado de desnutrición y de recuperación nutricional (Beck y Rosenthal, 2002). Esta proteína es más sensible a los cambios dietarios del paciente y sus niveles no son afectados por otras variables como la albúmina, una proteína que se mide de rutina en la evaluación del paciente desnutrido.

El costo del juego comercial de reactivos para la cuantificación de prealbúmina es elevado. En México, no existe ningún estudio donde se haya utilizado la prealbúmina en la evaluación del tratamiento nutricional, por lo que es necesario el desarrollo de técnicas económicas y sensibles que permitan su cuantificación.

## Fórmulas Disponibles para el Tratamiento de la Desnutrición

Cada hospital tiene su propia forma de tratar la desnutrición y por tanto, se usa una variedad amplia de productos para este fin. Esto debido a que no hay productos comerciales diseñados *ex profeso*, por lo que en la clínica se usan muchas variantes (Calderón de la Barca y col., 2000). La OMS (WHO, 1999), recomienda el uso de fórmulas modulares con leche de vaca desnatada en polvo, como fuente de proteína dietaria en el tratamiento de la desnutrición. En el mercado hay fórmulas especiales con diferente diseño (con proteína hidrolizada o con alta densidad energética), que se pueden usar en algunos casos de desnutrición. Su costo es 2.3 veces más alto que el de las fórmulas infantiles convencionales, lo que dificulta su uso en tratamientos prolongados. Por ello, los hospitales recurren a la adecuación energética de fórmulas infantiles convencionales, pero esta práctica solo contempla los requerimientos energéticos, viéndose afectado el contenido de proteína en la formulación.

### **Fuentes Proteicas Usadas en el Tratamiento de la Desnutrición**

Las proteínas de leche de vaca cumplen con el perfil de aminoácidos recomendados para los lactantes (FAO/WHO, 1991). Sin embargo, no se absorben fácilmente y por su tamaño pueden desencadenar respuestas alérgicas en los niños desnutridos. Además, la leche desnatada en polvo, que es la fuente más económica, contiene altas concentraciones de lactosa, lo que puede inducir diarreas en los niños desnutridos por su osmolaridad alta. Otra opción, son los hidrolizados de proteínas lácteas o de soya. En el mercado hay diversas fórmulas que los contienen y se usan más para alimentar niños alérgicos, que para tratar la desnutrición. Esto se debe a su costo alto, además de que tienen problemas de sabor, especialmente las de caseína hidrolizada que son muy amargas.

Los hidrolizados de soya son menos comunes en las formulaciones, pero de acuerdo a diversos estudios (Kimura y Arai, 1998; Calderón de la Barca, 2000; De Regil y Calderón de la Barca, 2004) podrían tener buena potencialidad. Estos hidrolizados, serán más adecuados si se complementa su perfil de aminoácidos enriqueciéndolos con metionina unida covalentemente.

### **Modificación Enzimática**

Varios autores (Aso y col., 1985; Hussein y col., 1995; Hajós y col., 1996; Calderón de la Barca y col., 2000), han modificado la proteína de soya hidrolizándola y uniéndole metionina covalentemente, por tratamiento enzimático. Tal modificación aporta propiedades funcionales como solubilidad, buena claridad, actividad emulsificante y capacidad espumante a las formulaciones líquidas. Así mismo, aumenta el valor nutricional por adecuar el perfil de aminoácidos y por inactivar factores antifisiológicos y aumentar la digestibilidad (Hajós y col., 1996; De Regil y Calderón de la Barca, 2004).

Kimura y Arai (1988), obtuvieron oligopéptidos de la proteína de soya por modificación enzimática y los evaluaron en la recuperación de ratas desnutridas. Sin embargo, su proceso es bastante complejo y caro para hacerlo viable industrialmente. De Regil y Calderón de la Barca (2004), probaron un ingrediente proteico de soya modificada de diseño fácil, también en un modelo de desnutrición animal, con excelentes resultados. La calidad proteica fue comparable a la de la caseína y mejor que el aislado de soya con metionina libre añadida. Así mismo, prepararon una fórmula modular con dicho ingrediente proteico, acorde a las recomendaciones de la OMS (1999), para el tratamiento de la desnutrición infantil. Esta fórmula que diseñaron tuvo mejor aceptación sensorial que la de una fórmula infantil comercial (Peptamen Jr®) con composición similar, pero con proteína de leche hidrolizada. Por ello, se sugiere la proteína enzimáticamente modificada como ingrediente alternativo en las fórmulas enterales para el tratamiento de la desnutrición infantil.

## REFERENCIAS

- Aso H, Kimura H, Watanabe M, Arai S. Chemical properties of enzymatically modified proteins produced from soy protein by covalent attachment of methionine. *Agric Food Chem* 1985; 49:165-169.
- Ávila-Curiel A, Shamah-Levy T, Chavéz-Villasana A. Encuesta nacional de alimentación y nutrición en el medio rural, 1996. México, D.F.: Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, 1997.
- Beck FK, Rosenthal TC. Prealbumin: A marker for nutritional evaluation. *Am Fam Physician* 2002; 65:1575-1578.
- Bloch AS, Mueller C. Apoyo mediante nutrición enteral y parenteral. En: Mahan KL, Escote-Stump S, editores. *Nutrición y dietoterapia de Krause*. 10ª edición. México: McGraw Hill; 2001.
- Bolaños AV, Hurtado J, López Cervantes G, Calderón de la Barca AM. Impacto de la migración de jornaleros en la prevalencia y tipo de desnutrición infantil intrahospitalaria en Sonora. *Nutrición Clínica* 2004; 7:24-31.
- Calderón de la Barca AM, Ruiz Salazar A, Jara Marini M. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. *J Food Sci* 2000; 65:246-253.
- De Regil LM, Calderón de la Barca AM. Nutritional and technological evaluation of an enzymatically methionine-enriched soy protein for infant enteral formulas. *Int J Food Sci Nutr* 2004; 55:91-99.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization). Protein quality evaluation report of the joint expert consultation. Rome: 4-8, December 1989. FAO, 1991.
- Gibson RS. Principles of nutritional assessment. New York; Oxford University Press, 1990.

- Hajós G, Gelencsér E, Grant G, Bardocz S, Sakhri M, Duguid TJ, Newman AM, Pusztai A. Effect of the proteolytic modification and methionine enrichment on the nutritional value of soya albumins for rats. *J Nutr Biochem* 1996; 7: 481-487.
- Hussein S, Gelencsér E, Hajós GY. Reduction of allergenicity and increasing biological value of buffalo's milk proteins by enzymatic modification. *J Food Biochem* 1995; 19:239-252.
- INSP (Instituto Nacional de Salud Pública). Encuesta nacional de nutrición 1999. Estado nutricional de mujeres y niños. México: INSP; 2001.
- Kimura H, Aray S. Oligopeptide mixtures produced from soy protein by enzymatic modification and their nutritional qualities evaluated by feeding tests with normal and malnourished rats. *J Nutr Sci Vitaminol*. 1988; 34: 375-386.
- Lagrutta SF. Tratamiento nutricional de la desnutrición. En: Héller RS (editor). *Nutrición*. México: Editorial Interamericana Mc Graw Hill; 1996.
- Linder MC. *Nutritional biochemistry and metabolism with clinical implication*, 2<sup>nd</sup> edition. EUA: Apleton & Lange, 1991.
- Plazas M. Nutrición del preescolar y el escolar. En: Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur AB, Arroyo P. (editores). *Nutriología Médica*. México DF: Editorial Médica Panamericana; 2001.
- Secretaría de Salud. Dirección General de Estadística e Informática. Aspectos relevantes sobre la estadística y deficiencia de la nutrición. *Salud Pub Mex* 1998; 40(2):206-215.
- Vásquez-Garibay EM. Diagnóstico del estado nutricional en la infancia. *Acta Pediatr Mex* 1998; 19:1-11.
- WHO (World Health Organization). *Management of severe malnutrition: A manual for physicians and other senior health*. Geneva: WHO; 1999.

## CAPÍTULO I

### IMPLEMENTACIÓN DE FÓRMULAS MODULARES PARA LA RECUPERACIÓN INTRAHOSPITALARIA DE LA DESNUTRICIÓN INFANTIL

Ana María Calderón de la Barca <sup>‡1</sup>, Victoria L. Ruvalcaba <sup>1</sup>, Adriana Bolaños <sup>1</sup>,  
Jaime Hurtado <sup>2</sup>,

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC.

<sup>2</sup> Hospital Infantil del Estado de Sonora.

<sup>‡</sup>Correspondencia: Dra. Ana María Calderón de la Barca, Investigadora Titular.  
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a La  
Victoria, km 0.6. Apdo. Postal 1735. Hermosillo 83000, Sonora. Tel (662) 289-  
24-00 ext. 288. Fax (662) 280-00-21. E-mail: amc@cascabel.ciad.mx

Artículo en revisión en la *Revista Panamericana de la Salud* (Sep., 2004).

## RESUMEN

**Objetivos.** Instalar un área para elaborar fórmulas modulares para la recuperación de la desnutrición en un hospital infantil. Aplicar las fórmulas en la recuperación de una muestra de niños desnutridos, con ayuda del personal y evaluar su recuperación.

**Métodos.** El Hospital Infantil del Estado de Sonora en México, asignó un área para la preparación de fórmulas. Se diseñó e instaló mobiliario tipo cocineta incluyendo lavaplatos, refrigerador, microondas, autoclave y mezcladora. Se adquirieron los ingredientes y utensilios para preparación de fórmulas modulares. Se entrenó al personal para elaborarlas de acuerdo a las recomendaciones de la OMS y se trataron de enero a junio del 2004, 12 niños menores de 2 años, desnutridos en segundo y tercer grados. Se evaluó su recuperación midiendo variables antropométricas y bioquímicas, incluyendo niveles de prealbúmina sérica.

**Resultados.** Una asociación empresarial financió el proyecto, incluyendo la instalación de la sala de preparación. El tiempo promedio de tratamiento fue de 18 d (DE = 11 d), con una ganancia diaria de 13.7 g/kg de peso corporal (DE = 7.5 g/kg). Todas las variables antropométricas aumentaron significativamente durante la rehabilitación. El puntaje Z de peso/talla al final del tratamiento fue de -1.44 (DE = 0.82). Sólo se observaron cambios significativos positivos en los indicadores bioquímicos hemoglobina y prealbúmina ( $p < 0.05$ ).

**Conclusiones.** Contando con un área especial de preparación, las fórmulas modulares son fáciles de adecuar a los requerimientos de cada niño, favoreciendo así una ganancia de peso rápida y reduciendo el tiempo de estancia hospitalaria y los costos del tratamiento.

**Palabras claves.** Desnutrición infantil severa, fórmulas modulares, tratamiento intrahospitalario.

## INTRODUCCIÓN

La población infantil menor de 5 años, es la de mayor riesgo de desnutrición energético-proteica (DEP) y representa el 10.2 % del total en México. La prevalencia de DEP en esta población es contrastante entre un noroeste, con 7.1% y un sureste con 29.2 % (1).

Debido a la pobreza, hay migración de los pobladores desde el sureste hacia el noroeste, en donde se contratan como jornaleros en los campos agrícolas. Entre los más afectados por los cambios sociales que conlleva la migración, están los niños. Es por eso que un 3 % de los que ingresan al Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES), un centro de atención en el noroeste de México, padece DEP. Más de la mitad de los mismos, la presenta en forma grave. La mayoría de estos menores son hijos de jornaleros del sureste mexicano, proporción que ha ido en aumento en los últimos años (2).

Hasta hace un año, para rehabilitar a los desnutridos, en el HIES se utilizaban fórmulas infantiles convencionales enriquecidas con aceite y miel para incrementar el aporte energético, aunque disminuía el aporte proteico. La Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda el uso de fórmulas modulares a partir de ingredientes comerciales, para este fin (3). El tratamiento es acorde al estado de cada niño, permitiendo un mejor control y reduciendo costos y tiempo de estancia hospitalaria.

Así, los objetivos de este trabajo fueron diseñar y obtener los recursos para instalar un área especial en el HIES para preparar fórmulas modulares para la recuperación de la desnutrición infantil, de acuerdo a la recomendación de la OMS. Así mismo, aplicar las fórmulas en la recuperación de una muestra de niños con desnutrición de segundo y tercer grado, con ayuda del personal del hospital. Por último, dar seguimiento a la recuperación con evaluación bioquímica y antropométrica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño de la sala para la preparación de fórmulas

El HIES asignó un área del piso de recuperación nutricia para la instalación de la sala de preparación de fórmulas. Se seleccionó mobiliario de cocina con: lavaplatos inoxidable, repisas y mesas de trabajos de poliuretano con anaqueles y cajones. Se consideraron una autoclave digital con capacidad para 16 vasos, un refrigerador de 15 ft<sup>3</sup>, un horno de microondas casero de 2 ft<sup>3</sup>, una mezcladora de 3 velocidades con frascos de vidrio de 1 L, una balanza digital para pesar los ingredientes (1,200 g). También utensilios de acero y plástico para la preparación y tratamiento de las fórmulas.

Se incluyeron ingredientes para la preparación de las fórmulas, considerando al menos 30 niños y un tiempo aproximado de tratamiento de 4 semanas para cada caso. Para evaluar la recuperación nutricia, se consideró un infantómetro (hasta 99 cm) y una balanza digital (hasta 20 kg).

### Elaboración de fórmulas modulares

Basándose en las recomendaciones de la OMS (3,4), se prepararon las fórmulas modulares F-75 ó F-100 para cada niño. Los ingredientes comerciales utilizados fueron: proteínas de leche de vaca (Alapro 4420, NZMP Limited, Nueva Zelanda), premezcla de vitaminas (donación de Roche México), premezcla de minerales (Spectrum Chemical Mfg Corp, E.U.A.), goma tara (donación de Transformadora Agrícola, México) y lecitina de soya líquida (Pronat Ultra). Se usaron además, azúcar y aceite de maíz del mercado local.

Las cantidades de los ingredientes y el volumen de minerales y agua utilizada se presentan en la Tabla 1. Para preparar las fórmulas siguiendo el protocolo de De Regil y Calderón de la Barca (5), en un vaso de precipitado se mezclaron con una cuchara el aceite y la lecitina de soya líquida hasta tener

una mezcla homogénea. Después en una mezcladora (Osterizer Clásica), se mezclaron el agua, la goma tara y la mezcla aceite-lecitina por 1 min en velocidad baja. Por último se agregó el resto de los ingredientes y se mezclaron por 1 min en velocidad baja también. La fórmula así preparada se pasteurizó en un horno de microondas (Sharp Carousel, R-420B). Para un volumen de 250 mL se calentó por 70 s a potencia máxima. Enseguida se disminuyó a 60 s en potencia baja, hasta alcanzar una temperatura final de 74 °C. Se verificó la eficiencia de la pasteurización por microondas, haciendo un análisis microbiológico para detectar mesófilos aerobios, coliformes totales, levaduras, hongos y *Salmonella sp* (6).

La fórmula se distribuyó en vasos estériles dependiendo del número de tomas al día del paciente, los cuales se entregaron al banco de leches del HIES para su distribución, dependiendo de los horarios de toma de cada paciente.

#### Participación del personal del hospital

En esta etapa del estudio, los responsables del proyecto trabajaron en la preparación y pasteurización de las fórmulas. El personal del hospital encargado de la atención de los niños dio seguimiento a los procesos y ayudó con su experiencia en el manejo. Este último, se basó en el manual del manejo de la desnutrición severa de la OMS (3). Antes de hacer entrega de la sala de preparación de fórmulas, se entrenará al personal del hospital para la preparación y pasterización de las fórmulas.

#### Sujetos y tratamiento intrahospitalario

Después de que el Comité de Ética del HIES aprobó el protocolo del estudio, se incluyó a todos los menores de 2 años que llegaron entre enero y junio del 2004 para recuperación de la desnutrición de segundo o tercer grado,

de acuerdo al peso para su talla. Los criterios de inclusión también fueron la completa estabilización hídrica, carencia de infección y de otras patologías. Basándose en las recomendaciones de la OMS (3) para el tratamiento de la desnutrición, se preparó diariamente y de manera individual la fórmula modular F-100 ó F-75 (Tabla 2), adecuando el contenido proteico y calórico de acuerdo al peso corporal en kg del niño. En todos los casos se inició con 3 g de proteína y 160 kcal/kg de peso corporal/día (7). De acuerdo a la evolución del paciente, estos requerimientos se incrementaron hasta llegar a 5 g de proteína y 200 kcal/kg de peso corporal/día. La vía de administración dependió de la condición clínica del paciente, pero siempre se prefirió la vía enteral.

#### Evaluación antropométrica de la recuperación

Al inicio del tratamiento y al final de cada semana de rehabilitación, se midieron longitud con un infantómetro (Seca mod. 207, Vogel & Halke GMBH & Co. Alemania), así como circunferencia cefálica y braquial con cinta métrica. El peso se midió en una balanza digital (Baby Scale mod. 8440, Cardinal Detecto, EUA) y se registró diariamente. Los datos de peso y longitud se introdujeron en el programa Epi Info 2000 (8) para calcular el puntaje Z de peso para la talla, utilizando como referencia los datos de NCHS/WHO de 1978 (9).

#### Evaluación bioquímica de la recuperación

Cada semana y al final del tratamiento, se analizaron hemoglobina, proteínas séricas totales, albúmina y prealbúmina sérica. Los tres primeros fueron cuantificados en el laboratorio de análisis clínicos del HIES. Para la determinación de los niveles séricos de prealbúmina se desarrolló un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Brevemente, se utilizaron primero anticuerpos anti-prealbúmina humana preparados en conejo (A 0002 Dako.

Copenhague, Dinamarca). Como segundo anticuerpo se utilizó uno comercial de cerdo anti-IgG de conejo ligado a peroxidasa (P 0.399 Dako, Dinamarca). Finalmente, como sustrato se utilizó TMB (174-1068 BIO-RAD. Hércules, EUA) y se midió la absorbancia en un lector de microplacas (Microplate Reader 550, BIO-RAD. Hércules, EUA) a 450 nm.

#### Análisis estadístico

Se analizaron descriptivamente las variables antropométricas y bioquímicas. La comparación de los indicadores iniciales y finales se realizó con la prueba t de Student pareada para datos con homogeneidad de varianza y la prueba no paramétrica de Wilcoxon para los datos que no dieron homogeneidad, utilizando el paquete estadístico NCSS (10), con  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### Diseño y equipamiento de la sala para la preparación de fórmulas

Los recursos para la instalación y compra de mobiliario, equipos e insumos ya señalados, se obtuvieron en concurso con una propuesta sobre tratamiento hospitalario de la desnutrición infantil, en una convocatoria de una asociación empresarial. Aunque la convocatoria solo era por 12,000 dólares por proyecto, éstos fueron suficientes para la instalación completa de la sala, equipos, insumos e ingredientes para la preparación de las fórmulas. Con el recurso obtenido y dos becarias de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, se puso en marcha el programa en el hospital.

### Calidad sanitaria, funcionalidad y costo de las fórmulas

Con las condiciones de tratamiento de las fórmulas en horno de microondas previamente probadas (5), se logró su pasteurización. La cuenta total de mesófilos aerobios, coliformes, hongos y levaduras fue  $< 10$  UFC/mL y *Salmonella sp* ausente en 25 mL. Así mismo, las formulaciones se mantuvieron en suspensión sin ocluir las sondas cuando fueron usadas, como había sido mostrada antes su estabilidad reológica (5). Además, la aceptabilidad fue total, no hubo rechazo por parte de los niños debido al sabor o aroma, cuando fue administrada por vía oral.

En lo que respecta a costos, para preparar 100 mL de cada una de las fórmulas modulares de la OMS, se requieren ingredientes por un total de \$0.059 dólares para la F-75 y de \$0.072 dólares para la F-100. En cambio, 100 mL de una fórmula infantil comercial convencional cuestan \$0.125 dólares (mercado mexicano al menudeo, agosto, 2004). Si en lugar de una fórmula convencional se usa una fórmula especial, el costo puede aumentar a \$0.832 dólares/100 mL. Esto porque se recurre a las especiales ya que es prácticamente imposible adecuar una fórmula convencional, tal y como fácilmente se hace con una fórmula modular como las recomendadas por la OMS.

### Evaluación antropométrica

Se inició el tratamiento de 15 niños y se describen aquí 12 de ellos que permanecieron en tratamiento al menos por 7 días o hasta llegar al menos a la DE  $-1$  de peso para la talla. De los 12 pacientes a los cuales se les dio tratamiento intrahospitalario, 10 presentaron desnutrición de segundo grado y 2 de tercero al ingresar al hospital (de acuerdo al indicador peso/talla). Estos últimos presentaron desnutrición grave, tipo kwashiorkor. El grupo se conformó por 7 niños y 5 niñas con una edad promedio de 12.5 meses (DE = 7 meses).

Once de los niños, eran hijos de padres jornaleros procedentes de los estados del sureste de México y de nivel socioeconómico bajo.

El tiempo promedio de recuperación nutricia fue de 18 d (DE = 11 d), el cual es menor a los 31 días registrados en promedio en los años 1985 – 2001 en el mismo hospital (2). En este tiempo, los pacientes tuvieron una ganancia diaria de peso de 13.72 g/kg (DE = 7.5 g/kg), mayor a la recomendada de 10 g/kg en la recuperación de la desnutrición (11). La mayoría de ellos, aceptó la fórmula por la vía oral. Sólo 5 sujetos iniciaron la alimentación con sonda nasogástrica, pero al final del tratamiento a todos se les administró la fórmula por la vía oral.

Al realizar la evaluación antropométrica, se observaron aumentos significativos ( $p < 0.001$ ) en todas las variables (Tabla 3). El peso, aunque no es un indicador muy sensible en el corto plazo, en casos de desnutrición, su variación es muy notoria. Su registro diario permitió evaluar tanto la aceptación como la adecuación de la fórmula para cada infante.

Al salir del hospital, 5 de los 12 infantes tuvieron un puntaje Z de peso/talla igual o mayor a -1, lo cual establece la OMS como criterio para dar de alta al paciente (3). El resto de los niños, tuvo un valor muy cercano al deseado, pero su egreso del hospital fue voluntario a petición de las madres. Debido a su naturaleza de jornaleros agrícolas, los lugares de residencia de las familias quedan lejos del hospital (unas 2 h de viaje), impidiendo a las madres atender a los demás miembros mientras acompañan al niño hospitalizado. Esto indica la necesidad de instalaciones hospitalarias cercanas a los lugares de trabajo. Aunque idealmente lo que se requeriría es evitar la desnutrición.

Se ve la necesidad de aplicar programas de educación nutricia enfocados a las madres. Además de prevenir la desnutrición, si ésta se diera tendrían que colaborar en la recuperación de sus hijos hasta que alcancen al menos el puntaje Z de -1 en peso/talla (12). Otro punto importante, tendría que

ser la educación para el seguimiento de los niños, así se evitarían recaídas de los ya tratados.

#### Evaluación bioquímica

En general, no se observaron aumentos significativos ( $P < 0.001$ ) en las proteínas séricas totales, albúmina (Tabla 4). Esto puede deberse a que al igual que los valores iniciales, los finales estuvieron dentro de los rangos normales, debido a la amplia variación de estos indicadores. Sólo los niños con kwashiorkor presentaron proteínas plasmáticas disminuidas. Ello por la presencia de edema que influye directamente sobre la concentración (13). Por esto, la alimentación inicial de estos niños fue con la fórmula F-75 (75 kcal/100mL) y menos de 4 g de proteínas/kg de peso corporal/día. El edema desapareció rápidamente y se les cambió a la fórmula F-100. Al final del tratamiento los valores de proteínas totales y albúmina de todos los niños se ubicaron dentro de los rangos normales.

La hemoglobina no cambió significativamente entre el inicio y el término del periodo de recuperación de los niños. Esta proteína no es un indicador muy sensible a corto plazo, al igual que la albúmina. La vida media de la prealbúmina es de 2 días comparada con 20 de la albúmina y es más sensible a los cambios en la dieta (14). Por ello se desarrolló exitosamente un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la cuantificación de esta proteína.

En México, no se usa el indicador prealbúmina para diagnosticar y evaluar la recuperación de la desnutrición. Rutinariamente se cuantifica albúmina ya que se considera un análisis más sencillo y económico. Sin embargo, en otros países se usa la prealbúmina durante la recuperación del paciente desnutrido. Una de las principales ventajas de este indicador es su sensibilidad, con lo cual se reduce el tiempo de hospitalización y por ende el costo del tratamiento nutricional (15). De acuerdo a los valores de albúmina, sólo 12% de 147 pacientes ingresados a un hospital canadiense se diagnosticaron

desnutridos, mientras que 24% lo eran al medir prealbúmina (16). De manera similar, en el presente estudio al utilizar los niveles séricos de albúmina, sólo 2 de los 12 pacientes podrían haber sido diagnosticados con desnutrición. Sin embargo, de acuerdo a sus valores de prealbúmina, se confirmó que los 12 estaban desnutridos. De allí la ventaja de medir este indicador, que si se hace en un ensayo propio y no con juego comercial de reactivos, resulta barato.

En conclusión, con este trabajo se muestra que basta un poco de voluntad y trabajo interinstitucional para adecuar e instalar un área especial dentro de los hospitales, para la preparación de fórmulas modulares, como las que recomienda la OMS, para la recuperación de los desnutridos. Este tipo de instalación, permite tener mejor control sobre el tratamiento dietario y de la respuesta del paciente.

Las formulaciones recomendadas por la OMS no solo tienen menor costo *per se*, sino que la recuperación se da en un tiempo menor, si se compara con el tratamiento con fórmulas infantiles comerciales convencionales. Debido a su diseño y adecuación fácil, el uso de las fórmulas modulares en la recuperación nutricia de los infantes tratados fue muy favorable. Para el seguimiento fino de la recuperación, se recomienda medir prealbúmina además de los indicadores antropométricos y bioquímicos más comunes.

A pesar de los buenos resultados que se obtuvieron, es necesario el trabajo social con las madres. Hay que orientarlas tanto para que esperen a que se termine la rehabilitación del niño por completo antes de solicitar el alta, como para que colaboren en el seguimiento una vez dado de alta su hijo.

## RECONOCIMIENTOS

Este, es un trabajo de colaboración entre el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, sus estudiantes de posgrado becarios del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Hospital Infantil del Estado de Sonora.

El presupuesto para el proyecto, fue obtenido por concurso en una convocatoria de la Asociación Americana de la Soya.

### REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricional de mujeres y niños. México: INSP; 2001.
2. Bolaños AV, Hurtado J, López Cervantes G, Calderón de la Barca AM. Impacto de la migración de jornaleros en la prevalencia y tipo de desnutrición infantil intrahospitalaria en Sonora. *Nutrición Clínica* 2004; 7(1):24-31.
3. WHO. Management of severe malnutrition: A manual for physicians and other senior health. Geneva: WHO, 1999.
4. WHO. Management of the child with a serious infection or malnutrition. Guidelines for care at the first-referral level in developing countries. Geneva: WHO; 2000.
5. De Regil LM, Calderón de la Barca AM. Nutritional and technological evaluation of an enzymatically methionine-enriched soy protein for infant enteral formulas. *Int J Food Sci Nutr* 2004; 55(2):91-9.
6. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. *Diario Oficial de la Federación* 1997; Diciembre 17(primerá sección); 8-93.
7. Vázquez EM, Romero E. Manejo dietético del niño con desnutrición grave. *Bol Med Hosp. Infant Mex* 2000; 57(8):463-72.
8. Epi Info 2002 [computer program]. Atlanta, Georgia: Centers for disease control and prevention (CDC); 2000.
9. World Health Organization. A growth chart for international use in maternal and child health care. Geneva: WHO, 1978.

10. NCSS 2001 [computer program]. Keyville, Utah: Visual components; 1997.
11. Bahn MJ, Bhandari N, Bahl R. Management of the severely malnourished child: perspective from developing countries. *BMJ* 2003; 326:146-51.
12. Armar-Klimesu M, Ruel MT, Maxwell Daniel G, Levin CE, Morris SS. Poor maternal schooling is the main constraint to good child care practices in Accra. *J Nutr* 2000; 1597-07.
13. Roediger, WE. New Views on the pathogenesis of Kwashiorkor: methionine and other amino acids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21(2):130-6.
14. Beck FK, Rosenthal TC. Prealbumin: A marker for nutritional evaluation. *Am Fam Physician* 2002; 65:1575-8.
15. Bernstein LH, Ingenbleek Y. Transthyretin: Its responses to malnutrition and stress injury. Clinical usefulness and economic implication. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(12):1344-48.
16. Potter MA, Luxton G. Transthyretin measurement as a screening tool for protein calorie malnutrition in emergency hospital admissions. *Clin Chem Lab Med* 2002 40(12):1349-54.

**Tabla 1. Cantidades de ingredientes utilizados en las formulaciones F-75 y F-100.**

<b>Ingrediente</b>	<b>F-75</b>	<b>F- 100</b>
Aceite (g)	27	50
Lecitina de soya líquida (g)	5	5
Goma tara (g)	1	1
Proteínas de leche (g)*	20.09	67.59
Azúcar (g)	100	50
Premezcla de vitaminas (mg)	140	140
Premezcla de minerales (mL)	20	20
Agua hasta completar (mL)	1000	1000

\* Proteínas de leche: producto comercial con 42.9 % de proteínas, 44,5% de carbohidratos, 1% de lípidos, 3,6 % de humedad y 8 % de cenizas.

**Tabla 2. Contribución de macronutrientes a las fórmulas F-75 y F-100.**

<b>Componente</b>	<b>F-75</b>	<b>F-100</b>
Proteínas (%)	5	12
H. de carbono (%)	63	34
Lípidos (%)	32	55
Energía (kcal/100 mL)	75	100

WHO, 1999.

**Tabla 3. Valor promedio de las variables antropométricas al inicio y al final del tratamiento.**

<b>Variable</b>	<b>Inicio</b>	<b>Final</b>
Peso (kg)	5.05 <sup>a</sup>	5.94 <sup>b</sup>
Talla (cm)	63.69 <sup>a</sup>	64.45 <sup>b</sup>
Peso/talla (puntaje Z)	-2.57 <sup>a</sup>	-1.44 <sup>b</sup>
Circ. Cefálica (cm)	40.71 <sup>a</sup>	41.63 <sup>b</sup>
Circ. Braquial (cm)	10.12 <sup>a</sup>	10.63 <sup>b</sup>

Literales distintas entre columnas indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

**Tabla 4. Valor promedio de las variables bioquímicas al inicio y al final del tratamiento.**

<b>Variable</b>	<b>Inicial</b>	<b>Final</b>
Hemoglobina (g/dL)	10.73 <sup>a</sup>	10.51 <sup>a</sup>
Proteína total (g/dL)	6.44 <sup>a</sup>	6.60 <sup>a</sup>
Albumina (g/dL)	3.60 <sup>a</sup>	3.71 <sup>a</sup>
Prealbumina (mg/dL)	5.87 <sup>a</sup>	18.08 <sup>b</sup>

Literales distintas entre columnas indican diferencias significativas,  $p < 0.05$

## CAPÍTULO II

### VALIDACIÓN DE UN ENSAYO INMUNOQUÍMICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PREALBÚMINA HUMANA

Victoria L. Ruvalcaba <sup>1</sup>, Ana María Calderón de la Barca <sup>‡1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC.

<sup>‡</sup>Correspondencia: Dra. Ana María Calderón de la Barca, Investigadora Titular.  
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a La  
Victoria, km 0.6. Apdo. Postal 1735. Hermosillo 83000, Sonora. Tel (662) 289-  
24-00 ext. 288. Fax (662) 280-00-21. E-mail: amc@cascabel.ciad.mx

**Artículo en preparación para la revista *Clinical Chemistry***

## RESUMEN

La albúmina es el indicador bioquímico más utilizado en la evaluación del estado nutricional. Sin embargo, el tiempo de vida media y los grandes depósitos corporales de la albúmina no permiten detectar cambios agudos en la ingestión deficiente de proteína. La prealbúmina tiene vida media de 2 días y concentración baja en plasma, por ello responde fácilmente al déficit y reincorporación de proteínas a la dieta. En este estudio, se desarrolló un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para cuantificar prealbúmina y se aplicó para evaluar la recuperación de niños desnutridos. Se evaluó la viabilidad del anticuerpo comercial por inmunodifusión y se obtuvo un estándar de prealbúmina purificando por electroforesis e inmunoreactividad con anticuerpos anti-prealbúmina. Se hizo una matriz de dilución de suero contra el primer anticuerpo y la mejor dilución sirvió para establecer las condiciones del ensayo. Se construyó la curva estándar y cuantificó el contenido de prealbúmina en niños desnutridos. Se evaluó el CV intra e inter-ensayos y el valor mínimo detectable. Las condiciones del ELISA fueron antígeno 1:500, primer anticuerpo 1:1000 y segundo anticuerpo 1:2000. La ecuación de la curva estándar fue  $\ln y = 1.9832 \ln x - 3.951$  y el valor de  $R^2 = 0.976$ . El valor mínimo detectable fue de 0.014 mg/dL. Los CV intra e inter-ensayos fueron 4.65% y 3.79%, respectivamente. Los niveles séricos de prealbúmina de 17 niños desnutridos mostraron aumentos significativos entre el inicio y el final del tratamiento. Con el uso de este indicador fue posible diagnosticar riesgo nutricional en todos los niños, en comparación con el uso de la albúmina donde sólo se diagnosticaron 4. El ensayo de ELISA desarrollado mostró ser sencillo, confiable y de bajo costo.

## INTRODUCCIÓN

Los indicadores bioquímicos más utilizados en la evaluación del estado nutricional son las proteínas totales, albúmina y hemoglobina. Estos parámetros forman parte de los análisis clínicos de rutina al ingresar a un hospital, debido a la facilidad y al costo accesible de las pruebas (Vásquez-Garibay, 2000). Normalmente, estas proteínas se almacenan en gran cantidad en el cuerpo. Por ello, un nivel bajo de cualquiera de ellas se presenta cuando el paciente ha experimentado periodos prolongados de ingestión deficiente de proteína.

Las proteínas utilizadas como indicadores de la desnutrición deben ser muy sensibles a los cambios en la dieta, tener vida media corta y un tiempo relativamente corto de síntesis (Potter y Luxton, 2002). La albúmina ha sido el indicador bioquímico más utilizado para evaluar el estado nutricional del paciente desnutrido. Sin embargo, el decremento en los niveles séricos de esta proteína solo se observa después de periodos muy prolongados de disponibilidad inadecuada de nutrientes y en niños con desnutrición tipo kwashiorkor (Toussaint, 2001).

La albúmina tiene una vida media de 20 días y los depósitos corporales son muy grandes, casi del 60% del total de las proteínas plasmáticas (Tortora y Grabowski, 2000). Además de la prolongada ingestión deficiente de proteínas, factores como la deshidratación y enfermedades renales pueden disminuir su concentración plasmática (Beck y Rosenthal, 2002).

La prealbúmina en cambio, tiene una vida media de 2 días, es también sintetizada en el hígado pero los depósitos corporales son muy pequeños, por lo que responde muy fácilmente a la ingestión deficiente de proteínas y a la incorporación de la misma a la dieta. La función de la prealbúmina es el transporte de tiroxina y del complejo retinol-RBP (proteína unida a retinol). Los

niveles séricos de esta proteína se ven afectados sólo por el consumo crónico de alcohol y una dieta deficiente en proteína (Vélez-Salazar, 2001)

Los métodos desarrollados para la cuantificación de prealbúmina en la actualidad, involucran reacciones antígeno-anticuerpo. Los productos formados de la reacción son medidos por turbidimetría en equipos muy especializados y de alto costo (Bernestein y Ingenbleek, 2002). En nuestro país, el juego de reactivos comercial para la cuantificación de prealbúmina, es caro. Por ello, se hace necesario desarrollar un método alternativo, fácil y confiable que permita la cuantificación de los niveles séricos a un precio más accesible.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un ensayo de ELISA fácil, económico y reproducible, para cuantificar los niveles de prealbúmina de niños en recuperación de la desnutrición. Se evaluaron algunas características del ensayo como la dilución óptima de antígeno y anticuerpos, las variaciones intra e inter-ensayos y la construcción de la curva estándar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Se usaron anticuerpos anti-prealbúmina humana (A0002) preparados en conejo, de DAKO (Copenhague, Dinamarca). Los segundos anticuerpos de cerdo anti-IgG de conejo acoplados a peroxidasa (0399) fueron de DAKO (Copenhague, Dinamarca). El TMB y el DAB fueron de Sigma (St. Louis, EUA). La prealbúmina se purificó como se describe mas adelante. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico de Aldrich (Milwaukee, EUA).

### Prueba de los anticuerpos anti-prealbúmina

Esta prueba de actividad de los anticuerpos comerciales (A0002) se realizó por difusión radial (Ouchterlony y Nilsson, 1975). Se cubrió un portaobjetos de vidrio con agarosa al 1%, se dejó gelificar y se hicieron perforaciones de acuerdo con la Fig. 1A. En el pozo central se cargaron 5  $\mu$ L de suero sin diluir de un sujeto aparentemente sano y en el resto de los pozos se colocaron 5  $\mu$ L del anticuerpo sin diluir y en diluciones 10X, 50X, 100X, 500X. Se conservó el gel dentro de una cámara húmeda por 24 h. Posteriormente se secó y lavó el cubreobjetos, se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 por 5 min y se destiñó con una mezcla de etanol/ácido acético/agua por 5 min, 3 veces. Se eliminó el excedente de humedad con papel filtro y se dejó secar.

### Purificación y análisis de la prealbúmina estándar

#### **Purificación**

Para obtener la prealbúmina pura se hizo una separación de proteínas séricas por electroforesis de zona en agarosa (Carlström y Johansson, 1983).

En una placa de vidrio de 10 X 10 cm, se cargaron 15 mL de agarosa al 1% (0.1M Tris-HCl/Gly pH 8.6) y se hicieron 5 pozos horizontales cercanos a uno de los lados. Se dejó gelificar y se cargaron 15  $\mu$ L de suero humano filtrado, en cada pozo. Se corrió la electroforesis durante 1 h a 10 V/cm en una cámara horizontal (Bio-phoresis BIO-RAD. Hercules, EUA). Se cortó un pedazo del gel y se fijó por 10 min en una solución de TCA (ácido tricloroacético) al 10% y 33% de etanol. Con esto se observó la posición de la banda más densa que es la albúmina y se cortó todo el gel por encima de ésta, para eliminar la mayor cantidad de albúmina y otras proteínas que migran menos. El gel conteniendo la prealbúmina (por ser la que migra más rápido), con residuos de albúmina principalmente, se homogeneizó con agua en un tubo cónico de 50 mL con un homogeneizador de tejidos (Tissue Treator Modelo 985370, Biospec Products Inc, Bartlesville, EUA). Se dejó macerando por 4 h a temperatura ambiente. Después, se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y se colectó el sobrenadante.

Se midió el volumen del sobrenadante y se diluyó con un volumen igual de buffer de dilución (0.2 M Tris-HCl pH 8.6). Una tira de nitrocelulosa impregnada con 50  $\mu$ L de anticuerpo anti-prealbúmina humana (A0002 DAKO, Copenhagen, Dinamarca), secada con pistola de aire, se colocó en una caja petri de vidrio y se dejó incubando toda la noche con la solución conteniendo la prealbúmina aislada en el paso anterior. Al día siguiente, se desechó el sobrenadante y se dieron 3 lavados a la membrana por 5 min con buffer de lavado (0.1M tris-HCl pH 8.6, 1M NaCl). Se eluyó la prealbúmina unida al anticuerpo con buffer de citrato-HCl pH 3.0 por 4 min. La membrana se retiró y lavó con buffer de lavado. El eluido se neutralizó inmediatamente con buffer de fosfatos pH 9.3 y se concentró 20 veces (SpeedVac SVC-100H, Savant Instruments, Farmingdale, EUA). Por último, se cuantificó el contenido de proteína por la técnica de Bradford (1976) y se denominó estándar de prealbúmina.

### **Detección por ensayo de manchas**

Se hicieron diluciones 1X, 10X, 100X, 1000X y 10,000X del estándar de prealbúmina en buffer de incubación y lavado de membranas (0.05M Tris-HCl pH 7.2, 0.15M NaCl, 0.015M NaN<sub>3</sub>, 0.05% Tween 20%). Se cortaron tres tiras de nitrocelulosa de 5 mm X 8 cm y se marcaron 6 pozos con espacio de 1 cm entre ellos. Se cargaron 2 µL de cada dilución por pozo en dos tiras y en la tercera se cargaron 2 µL del primer anticuerpo. Cuando las membranas se secaron, se cubrieron con 1 mL de buffer de bloqueo (0.05M Tris-HCl pH 7.2, 0.15M NaCl, 0.015M NaN<sub>3</sub>, 2% Tween 20%) por 2 min sin agitación. Después, se eliminó el buffer y se incubó con 1 mL del primer anticuerpo 1:1000 en la membrana de prueba. La tira de nitrocelulosa que era el control negativo y la que tenía fijo el primer anticuerpo se incubaron con 1 mL de buffer de incubación cada una. La incubación se realizó por 2 h a temperatura ambiente y con agitación constante suave.

Transcurrido este tiempo, se dieron 3 lavados de 5 min con buffer de lavado y se cargó 1 mL del segundo anticuerpo ligado a peroxidasa 1:1000 (anti-IgG de conejo-HRP 0399 DAKO, Copenhague, Dinamarca) por tira, la incubación duró 1 h bajo las mismas condiciones que la anterior. Después de este tiempo, se dieron 3 lavados con buffer de lavado y 2 con agua destilada por 5 min.

Se preparó una solución de DAB, disolviendo una pastilla de 3,3'-Diaminonbenzidina (D-5905, St. Louis, EUA) en 15 mL de buffer de incubación. Se añadió la solución de DAB a las tiras juntas en una caja petri de vidrio y en el mismo momento se agregaron 12 µL de peróxido hidrógeno como sustrato para revelar. La reacción se detuvo a los 30 min con lavados de agua destilada.

## Desarrollo del inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

### **Construcción de una matriz de dilución**

El método se desarrolló utilizando el suero estándar y el primer anticuerpo en diferentes diluciones para construir una matriz de dilución. Una placa de ELISA se cubrió con 100  $\mu$ L de buffer de carbonatos 0.1M pH 9.6. Se cargaron 100  $\mu$ L del antígeno 1:250 en todos los pozos de la fila A y se hicieron diluciones dobles seriadas con una micropipeta múltiple. Se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se aspiró la placa con una bomba de vacío para ELISA (ELISA Plate Washer, Corning 430473, EUA) y se bloqueó la placa con 100  $\mu$ L de proteínas de leche al 1% en buffer de lavado (Tris 0.1M HCl pH 7.4, 0.05% Tween 20, 0.05% de rojo de fenol y 5 mM de NaN<sub>3</sub>) por 1 h. Pasado este tiempo, se aspiró la placa y se dieron 4 lavados x 3 min con buffer de lavado. Se cubrió la placa con 100  $\mu$ L de buffer de lavado y se cargaron 100  $\mu$ L del primer anticuerpo 1:250 en todos los pozos de la columna 1. Se diluyó seriadamente y se dejó incubar por 2 h.

Se aspiró la placa y se dieron 4 lavados x 3 min con buffer de lavado. Se incubó con un segundo anticuerpo (IgG de cerdo anti-IgG de conejo unido a peroxidasa 0399 DAKO, Copenhague, Dinamarca) diluido 1:1000 por 1 h. Se aspiró la placa y se dieron 3 lavados x 3 min con buffer de lavado y 1 x 3 min con buffer de fosfatos. Se agregaron 100  $\mu$ L de TMB en cada pozo y se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M hasta que se desarrolló un color azul intenso. Las absorbancias se registraron en un lector de microplacas (Microplate Reader 550, BIO-RAD, Hércules, EUA) en una longitud de onda de 450 nm.

### **Construcción de la curva estándar**

El estándar de prealbúmina purificada se diluyó 1:1 con buffer de dilución y se cargaron 100  $\mu$ L en dos pozos. El ensayo, se corrió siguiendo la misma metodología del paso anterior. Se graficaron los valores linealizados del valor

medio de la absorbancia, contra la concentración del estándar, para obtener la ecuación del modelo y cuantificar la concentración de las muestras problema (Plikaytis y col., 1991).

### **Variación intra e interensayos y análisis estadístico**

Se corrieron duplicados del estándar y de las muestras problema en diferentes placas. La desviación estándar se dividió entre el promedio de las mediciones y el valor obtenido se multiplicó por 100 para obtener el coeficiente de variación (CV). El CV intra-ensayo se calculó evaluando las réplicas de una muestra en la misma placa y el CV inter-ensayo observando el valor de las réplicas obtenido en diferentes días. La linealización y el análisis de los datos fueron realizados con el programa de estadística NCSS versión 6.0.2.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Prueba de los anticuerpos anti-prealbúmina

En el ensayo de inmunoprecipitación en gel, las proteínas se difunden alrededor del pozo y si el anticuerpo reconoce al antígeno, se formará un precipitado. En la Fig. 1B se observa que hubo un reconocimiento entre el anticuerpo comercial y la prealbúmina del suero utilizado. Así mismo, se observa que el mayor reconocimiento se dio cuando ambas proteínas se manejaron con el mismo factor de dilución, esto es 1:1. McCarthy y col. (1987), compararon la cuantificación de prealbúmina por inmunodifusión, un método inmunturbidimétrico y por nefelometría. Los valores de las muestras fueron muy similares entre los tres métodos, pero por inmunodifusión se registraron valores más altos. En nuestro estudio, la inmunodifusión, fue una técnica de gran ayuda para evaluar el estado actual del anticuerpo utilizado y una aproximación de la relación antígeno-anticuerpo más favorable en el ensayo de ELISA.

### Purificación y análisis de la prealbúmina estándar

El volumen inicial de la solución de prealbúmina obtenida fue de 6 mL y se concentró hasta un volumen final de 300  $\mu$ L. Esta última solución contenía 0.037mg/mL ó 3.7 mg de proteína/dL. Esto corresponde a 11  $\mu$ g totales de prealbúmina en los 300  $\mu$ L obtenidos. Si se considera un valor medio de 30 mg/dL de prealbúmina en un sujeto saludable (Spiekerman, 1995), el máximo posible a obtener de los 60  $\mu$ L iniciales en la electroforesis, eran 18  $\mu$ g. Así, el rendimiento en el proceso de purificación fue de 62%.

En el ensayo de manchas, la tira de nitrocelulosa que tenía fijado el primer anticuerpo (IgG de conejo anti-prealbúmina) dio positivo al ensayo. Con esto, se confirmó que sí hubo un buen reconocimiento entre el primer y segundo anticuerpo (IgG de cerdo anti-IgG de conejo peroxidado). La tira que era el control negativo, no presentó ninguna mancha y la tira de nitrocelulosa con el estándar adherido dio ligeramente positivo en el primer pozo, donde el estándar estaba fijado sin dilución. Con este resultado, se presume que la concentración de prealbúmina del estándar es suficiente para ser detectada por ELISA, técnica con una sensibilidad al menos 10 veces mayor que la inmunodetección en membrana.

### Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)

#### **Matriz de dilución**

En la Tabla 1 se muestran los valores de absorbancia con respecto a las diluciones seriadas de antígeno y primer anticuerpo. El valor más alto de absorbancia (0.728) se observó en la dilución 1:1000 del suero y primer anticuerpo. Este resultado concuerda con la inmunodifusión radial, donde al utilizar un mismo factor de dilución la respuesta es más fuerte. Por lo tanto, con este resultado se establecieron las condiciones del ensayo de ELISA para construir la curva estándar: antígeno 1:500 y primer anticuerpo 1:1000. Esto considerando que los niveles de antígeno pueden estar disminuidos en la desnutrición.

#### **Curva estándar**

El ensayo de ELISA tiene un comportamiento de tipo sigmoidal (Deshpande, 1996), es por ello que se tiene que hacer un ajuste o transformación a los datos del suero estándar para linealizar su comportamiento. Plikaytis y col. (1991), hicieron varios tipos de

transformaciones a un ensayo de ELISA para cuantificar los niveles de anticuerpo de *Neisseria meningitidis* y observaron que al realizar un ajuste logistic-log de 4 parámetros, los datos del ensayo tenían un coeficiente de variación menor del 5 % y un valor alto de  $R^2$ ,

El Centro para el Control de Enfermedades ofrece de manera gratuita un software para el ajuste de los ensayos de ELISA (Plikaytis, 1996). Sin embargo, para operar el software es necesario haber capturado los datos en un lector de ELISA cuyo software sea compatible con el programa computacional. No se pueden analizar datos que no hayan sido capturados de esa forma, lo cual es una desventaja. En nuestro ensayo hicimos un ajuste lineal más sencillo, la linealización log-log de los datos de absorbancia y de concentración del estándar (Fig. 2). El ensayo tuvo un valor de  $R^2 = 0.976$  y la ecuación fue:  $\ln y = 1.9832 \ln x - 3.951$ . Con esta ecuación fue posible obtener la concentración de las muestras problema.

Considerando la concentración del estándar y las diluciones en que se manejó, el límite mínimo de detección fue de 0.014 mg/dL. Este valor es más de 300 veces mayor a los 5 mg/dL considerados ya un riesgo nutricional para el paciente (Beck y Rosenthal, 2002).

### **Variación intra e inter-ensayo**

Los coeficientes de variación del ensayo desarrollado estuvieron por debajo del 5 %. El CV intraensayo tuvo un valor promedio de 4.65% en 8 réplicas y en el interensayo se tuvo una variación del 3.79% en 8 réplicas de 4 días diferentes. Estos valores, reflejan la precisión y reproducibilidad del ensayo de ELISA. Los coeficientes de variación son más bajos que los obtenidos por Vatassery y col. (1991), en un ELISA para la cuantificación de la misma proteína en líquido cefalorraquídeo y suero.

### **Muestras problema**

Se evaluó la concentración sérica de prealbúmina de 17 niños hospitalizados por desnutrición. En la Tabla 2 se muestra el aumento gradual de los valores séricos de prealbúmina a través del tiempo. Al comparar los promedios obtenidos cada semana, se observan diferencias significativas entre el valor al inicio del tratamiento y la segunda semana ( $p = 0.027$ ). A partir de la tercera semana el tamaño de muestra disminuyó y no fue posible observar en promedio ningún aumento significativo. Sin embargo, de manera individual sí se notó el cambio. Por ejemplo, en los casos de los niños 1, 5, 8 y 12 el aumento fue significativo hasta la tercera semana. Pero, para la cuarta semana solamente los niños 8 y 12 continuaron con dicho aumento, lo cual no sucedió con el niño 1.

Con este indicador bioquímico, los 17 niños fueron diagnosticados en riesgo nutricio al inicio del estudio, tal y como lo habían sido con el puntaje Z de peso para la talla. Sin embargo, la evaluación basada en los niveles de albúmina solo permitió diagnosticar a 4 niños, aquellos que padecían kwashiorkor. De igual forma, Potter y Luxton (2002), cuantificaron prealbúmina y albúmina sérica a 124 pacientes que ingresaron a un hospital canadiense. El 24 % de los sujetos evaluados con la prealbúmina padecían desnutrición, mientras que con la cuantificación de albúmina, sólo el 12 % de ellos fueron detectados.

En México, no existe ningún estudio donde se haya evaluado la prealbúmina como un indicador del diagnóstico y de la recuperación de la desnutrición. Esto puede deberse a que la cuantificación de albúmina es mucho más sencilla y económica que la prealbúmina, además de que la albúmina está establecida como un análisis clínico de rutina. Sin embargo, en otros países como Canadá y Estados Unidos, se han hecho estudios para demostrar la utilidad de la prueba en la evaluación y recuperación nutricia. Así mismo, con ella se logran reducir costos de tratamiento y tiempo de hospitalización (Bernestein y Ingenbleek, 2002).

EL juego comercial de reactivos para la cuantificación de prealbúmina (PA 2473 RANDOX) tiene un costo de \$4,500 pesos y permite realizar 50 ensayos. Comparado con la técnica de ELISA aquí desarrollada, el primer anticuerpo utilizado en el ensayo tiene un costo de \$2,992 pesos y permite realizar al menos 1000 ensayos con las condiciones que se establecieron en el laboratorio. El segundo anticuerpo es un poco menos caro porque no es específico. Así también habría que considerar costos de los otros reactivos y de las placas de ELISA. Aun así, el ensayo de ELISA desarrollado en el laboratorio, resulta una alternativa económica y de fácil aplicación para la cuantificación de la prealbúmina en niños desnutridos.

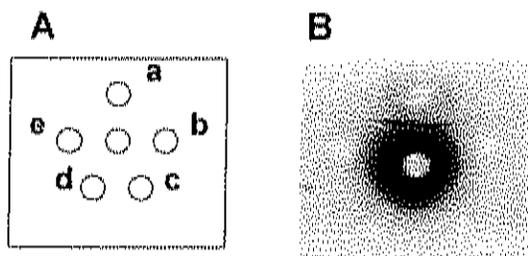
### **CONCLUSIÓN**

El ensayo de ELISA desarrollado en este trabajo mostró ser un método confiable, sencillo y económico para cuantificar prealbúmina en suero. La detección y cuantificación de concentraciones muy bajas de prealbúmina, convierten a esta prueba en una buena herramienta para la evaluación inicial y el seguimiento de niños desnutridos.

## REFERENCIAS

- Beck FK, Rosenthal TC. Prealbumin: A marker for nutritional evaluation. *Am Fam Physician* 2002; 65:1575-8.
- Bernstein LH, Ingenbleek Y. Transthyretin: Its response to malnutrition and stress injury. Clinical usefulness and economic implication. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:1344-1348.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 7(72):248-54.
- Carlström A, Johansson BG. Agarose gel electrophoresis-immunofixation. En: *Handbook of Immunoprecipitation in Gel Techniques*. Axelsen NH, editor. Gran Bretaña: Blackwell Scientific Publications, 1983.
- Deshpande SS. *Enzyme immunoassays from concept to product development*. New York: Chapman & Hall, 1996.
- McCarthy RC, Fetterhoff TJ, Luckey DW. Three immunoassay methods evaluated for quantifying prealbumin (transthyretin) in serum. *Clin Chem* 1987; 33(8): 1430-1432.
- NCSS. *Number Cruncher Statistical Systems. Programa estadístico para windows, Versión 6.0.2*, Hintze JL; U.S.A. 1996.
- Ouchterlony O, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En: Weir DM (Editor). *Handbook of experimental immunology*. Edinburgh: Blackwell Scientific Publications, 1975.
- Plikaytis B, Turner S, Gheesling L, Carlone G. Comparisons of Standard Curve-Fitting Methods To Quantitate *Neisseria meningitidis* Group A Polysaccharide Antibody Levels by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Microbiology* 1991; 29(7):1439-1446.

- Plikaytis BD, Holder PF, Carlone GM. Program ELISA for Windows User's Manual, version 1.00. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 1996.
- Potter MA, Luxton G. Transthyretin measurement as a screening tool for protein calorie malnutrition in emergency hospital admissions. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:1349-54.
- Spiekerman AM. Nutritional assessment (protein nutriture). *Anal Chem* 1995;67:429-36R.
- Tortora GJ, Grabowski SR. *Principios de Anatomía y Fisiología*. México, DF: Oxford University Press, 2002.
- Toussaint Martínez de Castro G, García-Aranda, JA. Desnutrición energético-proteínica. En: Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur AB, Arroyo P, editores. *Nutriología Médica*. México DF: Editorial Médica Panamericana; 2001.
- Vásquez-Garibay EM, Romero E. Manejo dietético del niño con desnutrición grave. *Bol Med Hosp. Infant Mex* 2000; 57(8):463-72.
- Vatassery GT, Quach HT, Smith WE, Benson BA, Eckfeldt JH. A sensitive assay of transthyretin (prealbúmina) in human cerebrospinal fluid in nanogram amounts by ELISA. *Clin Chim Acta* 1991;197:19-26.
- Vélez-Salazar I, González-Michaca L, Correa-Rotter, R. Alteraciones renales y nutrición. En: Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur AB, Arroyo P, editores. *Nutriología Médica*. México DF: Editorial Médica Panamericana; 2001.



**Figura 1. Inmunodifusión radial en agarosa de anticuerpos anti-prealbúmina, contra suero humano.** A: arreglo en que se hizo la difusión, con los anticuerpos anti-prealbúmina en el pozo central y un suero humano diluido a) 1:X, b) 10x, c) 50x, d) 100x y e) 100x, alrededor. B: gel con el inmunoprecipitado formado entre el anticuerpo y el suero diluido 1:1, en el pozo a).

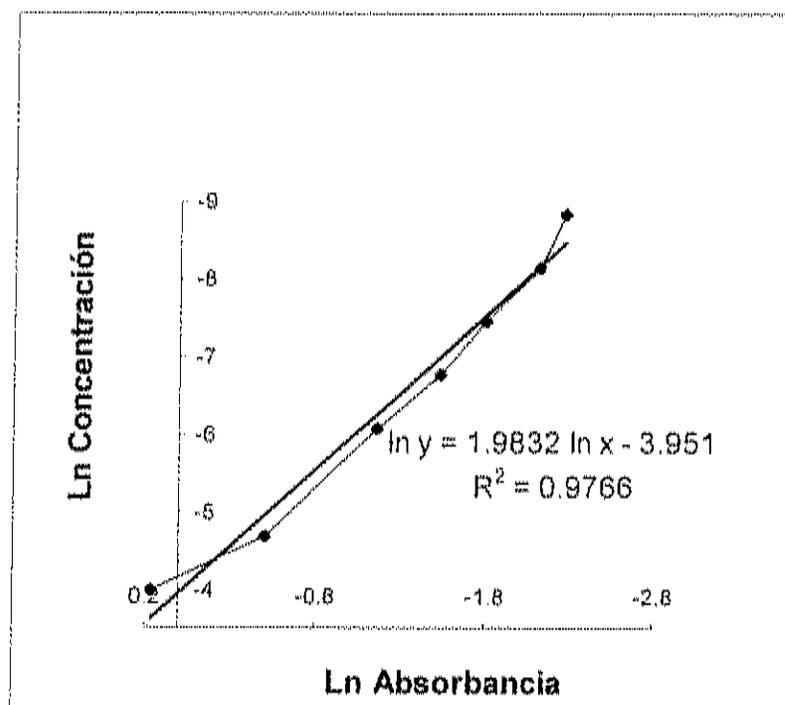
**Tabla 1. Matriz de dilución de prealbúmina en suero humano y de los anticuerpos de conejo anti-prealbúmina humana.**

Dilución del primer anticuerpo	Dilución del suero humano							
	500	1000	2000	4000	8000	16000	32000	64000
<b>500</b>	<b>0.676</b>	0.649	0.654	0.523	0.497	0.456	0.388	0.304
<b>1000</b>	0.72	<b>0.728</b>	0.675	0.58	0.571	0.508	0.43	0.332
<b>2000</b>	0.752	0.709	<b>0.645</b>	0.603	0.584	0.522	0.432	0.336
<b>4000</b>	0.742	0.653	0.598	<b>0.556</b>	0.533	0.484	0.443	0.325
<b>8000</b>	0.682	0.58	0.524	0.467	<b>0.473</b>	0.444	0.386	0.303
<b>16000</b>	0.582	0.484	0.549	0.416	0.397	<b>0.371</b>	0.321	0.275
<b>32000</b>	0.438	0.387	0.373	0.324	0.309	0.294	<b>0.259</b>	0.22
<b>64000</b>	0.317	0.264	0.259	0.23	0.287	0.198	0.182	<b>0.156</b>

**Tabla 2. Concentración sérica de prealbúmina (mg/dL) de niños desnutridos durante el tratamiento nutricio con respecto al tiempo.**

Niño	Semanas en tratamiento							
	Inicio	1	2	3	4	5	6	7
1	3.24	3.77	7.54	14.50	14.70	15.30		
2	1.48	3.98	4.77					
3	1.48	6.00						
4	2.11	4.49	8.61					
5	1.48	11.14	13.17	15.04				
6	10.75	14.60	18.20					
7	5.28	10.77	11.85					
8	12.16	15.00	27.00	32.00	41.33			
9	7.31	15.00	25.00					
10	13.89	25.80						
11	5.85	16.79	16.74					
12	5.41	6.67	10.89	12.61	15.70	25.74	26.10	28.33
13	13.47	14.03	14.65					
14	13.58	15.67	18.67					
15	16.50	19.73						
16	7.18	13.60	18.36					
17	6.60	10.41	13.90					
<b>promedio</b>	7.51 <sup>a</sup>	12.20 <sup>b</sup>	14.95 <sup>c</sup>	18.53 <sup>c</sup>	23.91 <sup>c</sup>	20.52 <sup>c</sup>	26.1 <sup>c</sup>	28.33 <sup>c</sup>

Literales distintas entre columnas indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ .



**Figura 2. Curva estándar de prealbúmina obtenida en el ELISA.** La prealbúmina purificada en concentración de 0.037 mg/mL se diluyó seriadamente y se incubó con los anticuerpos comerciales anti-prealbúmina (1:1000), seguidos de anticuerpos de cerdo anti-IgG de conejo peroxidados (1:2000) y se detectó el color desarrollado por el cromógeno de la TMB a 450 nm.

### CAPÍTULO III

## COMPARACIÓN DEL TRATAMIENTO INTRAHOSPITALARIO DE NIÑOS DESNUTRIDOS CON PROTEÍNAS DE LECHE Y ALTERNATIVAMENTE PROTEÍNAS DE SOYA MODIFICADA

Victoria L. Ruvalcaba <sup>1</sup>, Adriana V. Bolaños <sup>1</sup>, Jaime Hurtado <sup>2</sup>, Ana María  
Calderón de la Barca <sup>‡1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC.

<sup>2</sup> Hospital Infantil del Estado de Sonora.

<sup>‡</sup>Correspondencia: Dra. Ana María Calderón de la Barca, Investigadora Titular,  
Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a La  
Victoria, km 0.6. Apdo. Postal 1735. Hermosillo 83000, Sonora. Tel (662) 289-  
24-00 ext. 288. Fax (662) 280-00-21. E-mail: amc@cascabel.ciad.mx

## RESUMEN

El tratamiento con fórmulas modulares recomendado por la OMS para la recuperación de niños desnutridos, ha reducido la mortalidad en los hospitales. La leche desnatada en polvo es la fuente proteica recomendada, sin embargo en algunos casos los niños no toleran la lactosa o presentan reacción alérgica a estas proteínas. En esos casos, la proteína de soya modificada podría ser una buena alternativa al uso de proteínas lácteas. El objetivo del estudio fue comparar la eficiencia de la proteína de soya modificada enzimáticamente como alternativa a las proteínas de la leche durante la recuperación intrahospitalaria de niños desnutridos. Se dio tratamiento con fórmulas modulares a dos grupos de niños desnutridos graves y se evaluaron parámetros antropométricos y bioquímicos. El tiempo promedio de tratamiento en el grupo alimentado con proteínas de leche ( $n = 12$ ) fue de 18 d (DE = 11 d), con una ganancia diaria de 13.7 g/kg de peso corporal (DE = 7.5 g/kg/d) y puntaje Z de peso/talla al final del tratamiento fue de -1.44 (DE = 0.82). En el grupo alimentado con proteínas de soya ( $n = 5$ ) el tiempo promedio de tratamiento fue de 13 d (DE = 4d), con una ganancia diaria de 9.0 g/kg de peso corporal (DE = 3.52 g/kg/d) y puntaje Z de peso/talla al final del tratamiento de -1.34 (DE = 0.82). Al final de los tratamientos, se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en todas las variables antropométricas. Las proteínas totales y albúmina no registraron cambios a excepción de los niños con kwashiorkor. La prealbúmina fue el indicador más sensible del grado de desnutrición y de la recuperación. La recuperación de los niños con la fórmula con proteína de soya fue tan eficiente como la de los alimentados con proteínas de leche. La proteína de soya es una excelente alternativa en casos de alergia o intolerancia a las proteínas lácteas.

## INTRODUCCIÓN

El Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) es un centro de atención regional. En los últimos 10 años, un 3% de los casos atendidos fueron niños con desnutrición grave, la mayoría provenientes de familias jornaleras de bajos recursos económicos. El tratamiento nutricional utilizado para recuperarlos, consistió en fórmulas infantiles convencionales con proteínas lácteas, añadidas con miel y aceite para aumentar su contenido energético (Bolaños y col., 2004). Tal forma de tratamiento nutricional no es el más adecuado, puede alargar la estancia hospitalaria y repercutir en el estado nutricional del niño.

Aun en los países más desarrollados, los pacientes desnutridos deterioran su estado en el hospital, a veces fatalmente, debido a problemas en su manejo clínico (Edington y col., 2000; WHO, 2002). Para reducir la morbimortalidad relacionada con desnutrición, es muy importante mejorar el soporte nutricional en los hospitales (De Regil y Calderón de la Barca, 2004). En estos casos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda el uso de dos fórmulas modulares con diferente aporte energético y que pueden ser ajustadas a los requerimientos de cada niño. Estas fórmulas se preparan con ingredientes comerciales y las proteínas provienen de leche en polvo (WHO, 1999).

La proporción y fuente de proteínas en las fórmulas infantiles, juega un papel muy importante en la recuperación del niño desnutrido. Además del requerimiento de aminoácidos muy alto en la infancia, el niño desnutrido requiere una cantidad adicional para la recuperación rápida de los tejidos afectados por su estado. Entre éstos, la mucosa del tracto gastrointestinal, uno de los tejidos corporales de mayor recambio, se ve atrofiada, limitando no sólo la digestión y absorción de proteínas (Toussaint y Garcia, 2000), sino permitiendo el tránsito de moléculas completas, lo que puede inducir alergias.

Así mismo, el uso de leche entera en polvo en las formulaciones, puede inducir diarrea osmótica por la presencia de lactosa (American Academy of Pediatrics, 1998).

Para el tratamiento nutricional de niños con malabsorción intestinal, alergias o intolerancias por causas diversas, se usan las fórmulas enterales. En el mercado internacional hay varias de estas formulaciones y en algunas de ellas las fuentes de aminoácidos son proteínas de leche de vaca hidrolizadas (Castillo y col., 2002). Hasta la fecha, sólo se han comercializado dos o tres productos de este tipo con proteínas de soya hidrolizadas (Nestlé y Milupa). Dichas formulaciones son para tratar diversas patologías pero no específicas para el tratamiento de niños desnutridos. Además de ser muy caras, más de tres veces el costo de las fórmulas infantiles convencionales en los países desarrollados, no se producen en los países emergentes, por lo cual se importan, incrementándose aun más el costo. En el caso de la desnutrición, se requiere de ellas principalmente en estos últimos países que son en donde se dan las mayores tasas de desnutrición infantil.

Las fórmulas con proteínas hidrolizadas son de fácil absorción e hipoalergénicas. Sin embargo, durante la hidrólisis, se pueden perder aminoácidos esenciales; más aún cuando se trata de proteínas de soya, que son limitantes en aminoácidos azufrados. Diversos autores (Calderón de la Barca y col., 2000; Wall, 2004; Süle y col., 1997; Kimura y Arai, 1988), después de hidrolizar la proteína de soya también usando tecnología enzimática, le han unido covalentemente metionina, en un proceso llamado modificación enzimática. La calidad de tal proteína modificada para la recuperación nutricional, ha sido probada en modelos animales de desnutrición, con muy buenos resultados.

De Regil y Calderón de la Barca (2004), adecuaron las fórmulas recomendadas por la OMS (1999) para la recuperación nutricional de los desnutridos, con la proteína de soya modificada e ingredientes locales.

Probaron esta fórmula en cuanto a propiedades sensoriales, funcionales y reológicas, así como calidad sanitaria. También comprobaron que su aceptabilidad fue mejor que la de una fórmula infantil comercial (Peptamen Jr®) con composición similar, pero con proteínas de leche de vaca hidrolizadas. La calidad nutricia de la proteína de soya modificada la encontraron comparable a la de la caseína e incluso mejor que la del aislado de soya con metionina libre, en la recuperación de ratas desnutridas. Por ello, sugirieron su uso como ingrediente alternativo en las fórmulas enterales para el tratamiento de la desnutrición infantil.

En el presente estudio, se utilizaron las fórmulas modulares recomendadas por la OMS con proteínas lácteas y las de soya modificada propuestas por De Regil y Calderón de la Barca (2004) para dar tratamiento nutricional a niños con desnutrición grave internados en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES). Se comparó la eficiencia de la proteína de soya modificada enzimáticamente como fuente alternativa de la proteína de leche durante la recuperación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material e ingredientes

La proteína modificada de soya se obtuvo a partir de aislado de soya Supro 500E (The Solae Company de México). Las fórmulas modulares se prepararon con concentrado proteico de leche de vaca (Alapro 4420, NZMP Limited, Nueva Zelanda) o proteína modificada de soya, premezcla de vitaminas (donación de Roche México), premezcla de minerales (Spectrum Chemical Mfg Corp, Kansas City, E.U.A.), goma tara (donación de Transformadora Agrícola, D.F., México) y lecitina de soya líquida (Pronat Ultra). Se usaron además, azúcar, aceite de maíz (La Gloria) del mercado local y saborizante artificial de vainilla (Castells, D.F., México). Todos los reactivos para la modificación enzimática de la proteína de soya y la evaluación bioquímica, fueron de grado analítico.

### Obtención de la proteína de soya modificada enzimáticamente (F1-10E)

#### **Concentrado de enzimas**

Para hidrolizar la proteína de soya, se preparó un concentrado enzimático de páncreas porcino (CEP). Se le hicieron modificaciones al método antes aplicado en el laboratorio (Calderón de la Barca y col., 2000) en las etapas de purificación y activación de zimógenos.

Se partió de páncreas frescos donados por la planta procesadora Alpro, S.A. (Hermosillo, Sonora, México). Éstos se transportaron en hielo al laboratorio para mantener la estabilidad del tejido. Para obtener el concentrado enzimático, a los páncreas se les retiró todo el tejido graso y el conectivo visible. Después, se licuaron con 2 volúmenes de  $H_2SO_4$  0.125 M frío y se dejaron macerando toda la noche en un cuarto frío (4 °C).

Al día siguiente, el macerado se pasó por un filtro hecho de varias capas de tela. El filtrado se recuperó y el retenido se licuó nuevamente con 1 volumen de  $H_2SO_4$  0.125 M frío y se pasó nuevamente por el filtro. Todo el filtrado obtenido se centrifugó a 3000 rpm y 4 °C por 30 min para eliminar la mayor cantidad de grasa posible y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente éste se ultrafiltró usando membranas en espiral con cortes de 50 y 10 kDa (Prep/Scale TFF Milipore). Se recuperó la fracción entre 50 y 10 kDa, concentrándose a 300 mL/kg de páncreas procesado. Se ultradiafiltró con buffer Tris-HCl 0.1M pH 8.0, hasta alcanzar un pH de 7.0. Finalmente, para activar el concentrado, se agregaron nueve volúmenes de solución Tris-HCl 0.1M pH 8.0 con  $CaCl_2$  0.25 M y se adicionó 20% v/v de tripsina exógena (1 mg/mL). El CEP activo se hizo pasar a través de una membrana de 10 kDa para eliminar los 9 volúmenes de buffer. Este concentrado se secó mediante liofilización (Virtis Sentir, Freezemobile 12SL) y se determinó su actividad enzimática de acuerdo a la técnica de Oppert y col. (1997).

### **Hidrólisis enzimática**

El aislado de soya se hidrolizó enzimáticamente bajo las condiciones establecidas por Calderón de la Barca y col. (2000). Estas fueron: aislado de soya al 4% p/v, relación enzima/proteína en aislado de soya al 4% p/p, pH 8 (mantenido con NaOH 2 N), 3 h y 50 °C en baño de agua. Una vez terminada la hidrólisis, el proceso aplicado al hidrolizado se diseñó *ex profeso* para esta tesis.

El hidrolizado se ultrafiltró con membranas en espiral con cortes de 50, 10 y 1 kDa (Prep/Scale TFF, Milipore, Billerica, EUA) y se colectó la fracción entre 1 y 10 kDa (F1-10), libre de enzimas. Ésta se concentró hasta aproximadamente un 20% de sólidos totales (principalmente proteína), que corresponden a 20 °Bx en un refractómetro (ABBE refractometer American

Optical Corporation, Bufalo, EUA). La F1-10 se almacenó en frascos plásticos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el proceso de enriquecimiento enzimático con metionina.

### **Síntesis enzimática, ultrafiltración y secado**

Al volumen total de la fracción líquida (F1-10) se le añadió glicerol hasta tener una concentración final de 3 M y 0.0566 g de metil-éster de metionina (Sigma Chemical Co. St Louis, EUA) por gramo de hidrolizado, de acuerdo a la recomendación de Calderón de la Barca y col. (2000). La enzima quimi tripsina (Sigma Chemical, Co. ST Louis, E.U.A.) se añadió en una relación con el sustrato 1/100 p/p. La reacción se llevó a cabo a pH 7 y  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 h en baño de agua con agitación constante. Transcurrido el tiempo de reacción, se inactivó la enzima en baño de agua a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 min. La fracción enriquecida (F1-10<sub>E</sub>) se ultrafiltró y dializó (Prep./Scale TFF Milipore, Billerica, E.U.A.) con membrana en espiral de corte de 1 kDa para eliminar el glicerol, los aminoácidos libres escindidos y el metiléster de metionina que no se unió. Finalmente, la fracción se secó en un liofilizador (Virtis Sentir, Freezemobile 12SL, Nueva York, E.U.A.).

### Caracterización química de la fracción enriquecida F1-10<sub>E</sub>

#### **Análisis proximal**

El análisis proximal, se realizó de acuerdo a los métodos aprobados por la AOAC (1990), para humedad (met. 4.934.01), cenizas (met. 942.05) y grasa (met. 4.920.39). El contenido de nitrógeno se cuantificó con un analizador de nitrógeno (LECO PF 528, St Joseph, E.U.A.), de acuerdo al método 990.03, de la AOAC (1990). Este último se registró como proteína total o cruda, usando el factor 6.25.

### **Composición de aminoácidos**

El análisis de aminoácidos se hizo por cromatografía líquida de alta resolución (Vázquez y col., 1995). Para la hidrólisis ácida se pesaron entre 2 y 3 mg de muestra en tubos capilares para microondas. Se les agregaron 30  $\mu\text{L}$  de HCl 6 N y se colocaron en chaquetas de digestión (Vapor Phase Hydrolysis Kit, CEM Co., Matthews, E.U.A.). A éstas se les añadió 5 mL de HCL 6 N y se introdujeron a un horno de microondas CEM model MDS-2000 (Microwave Sample Preparation System, CEM Co., Matthews, E.U.A.). La digestión por microondas se hizo en cinco etapas. Las condiciones de presión y tiempo en cada etapa fueron de 20 psi por 10 min y 100 psi por 9 min. Después de digeridas, las muestras se secaron en ambiente de nitrógeno por 10 min.

Las muestras digeridas se resuspendieron en 1 mL de buffer de citrato de sodio 0.2 M pH 2.2 y se almacenaron a 4°C hasta su uso. De esta solución se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se mezclaron con 40  $\mu\text{L}$  de estándar interno, llevándose a 1 mL con el buffer de citrato de sodio. Para la inyección de las muestras en el cromatógrafo se mezclaron 250  $\mu\text{L}$  de la solución anterior y 250  $\mu\text{L}$  de OPA (Orto-oftaldehído) como agente derivatizante. Esta mezcla se hizo pasar a través de un filtro acuoso (Millipore, Billerica, E.U.A.) de 0.22  $\mu\text{m}$ . Después de 2 min de reacción, la muestra se inyectó en el cromatógrafo (Varian mod. 9010, Palo Alto, E.U.A.).

Para la separación de los aminoácidos a los diferentes tiempos de retención se empleó una columna en fase reversa Microsorb Shortone Tm-100<sup>®</sup> de 10 cm de largo y 4.6 mm de diámetro. Como fase móvil se utilizó un gradiente de buffer de acetatos/metanol. Para cada muestra se utilizó un estándar de aminoácidos y un estándar interno de ácido  $\alpha$ -aminobutírico, ambos en una concentración de 0.05  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . La detección de los aminoácidos derivatizados se realizó mediante un detector Varian Fluorichrom II con lámpara de deuterio, a una velocidad de 1.5 mL/min. La corrida de las muestras se realizó a 25-27°C por 30 min y el análisis de los cromatogramas se hizo con el

programa computacional Star Chromatography Software 4.0 (Varian Associates Inc, Palo Alto, E.U.A.)

### Tratamiento intrahospitalario de niños desnutridos

#### **Población**

Se trabajó con dos muestras independientes de niños desnutridos internados en el HIES. En ambos casos los niños debían cumplir con los siguientes criterios de inclusión: ser menores de 2 años, tener un diagnóstico clínico de desnutrición en segundo o tercer grado de acuerdo al indicador peso/talla, presentar un balance hidrolítico adecuado e infección controlada.

#### **Protocolo de alimentación**

Un grupo de infantes fue alimentado con fórmulas modulares preparadas con proteínas de leche y el otro grupo con proteína de soya modificada enzimáticamente, preparada *ex profeso* para este estudio como se describió anteriormente. Para ambos grupos se siguió el mismo protocolo de alimentación. En base a las recomendaciones de la OMS (1999) para el tratamiento de la desnutrición y al trabajo combinado con el personal médico del hospital, se preparó diariamente y de manera individual la fórmula modular F-100 ó F-75. En cada caso se adecuó el contenido proteico y calórico en base al peso corporal en kilogramos del infante. En todos los casos se inició con 3 g de proteína y 160 kcal/kg de peso corporal/día. De acuerdo a la evolución del paciente y la ganancia de peso, estos requerimientos se fueron incrementando hasta llegar a un máximo de 5 g de proteína y 200 kcal/kg de peso corporal/día. Este estudio fue aprobado por los comités de ética del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC y del Hospital Infantil del Estado de Sonora.

### **Ingredientes de las fórmulas**

Para las formulaciones se utilizaron: proteínas de leche en polvo o proteínas de soya modificadas enzimáticamente (F1-10<sub>E</sub>), azúcar, aceite comestible de maíz, lecitina de soya, goma tara, premezcla de vitaminas, premezcla de minerales y agua purificada. La vía de administración de la fórmula dependió de la condición clínica del paciente, pero siempre se procuró la vía enteral (sonda nasogástrica u oral).

### **Preparación *in situ* de la fórmula modular**

En la sala de preparación de fórmulas diseñada y equipada en el HIES (Calderón de la Barca y col., 2004) se elaboraron las fórmulas modulares F-100 ó F-75. Éstas se prepararon de acuerdo a las condiciones descritas por De Regil y Calderón de la Barca (2004). Las cantidades de los ingredientes utilizadas se muestran en la Tabla 1. El contenido energético de la fórmula F-100 con proteínas de soya modificada, fue 20% menor que el aportado por la fórmula con concentrado de proteínas lácteas. La eficiencia de la pasterurización por microondas se probó haciendo un análisis microbiológico para detectar mesófilos aerobios, coliformes totales, levaduras, hongos y *Salmonella* según la norma NOM-131-SSA1-1995 (Secretaría de Salud, 1997).

La fórmula se distribuyó en vasos estériles dependiendo del número de tomas al día del paciente. Éstos se etiquetaron con el nombre del paciente, número de cama y hora de administración y se dejaron en el banco de leches del HIES para que el personal los entregara a cada paciente.

### **Osmolalidad**

En un osmómetro (Vapro Wescor, Logan, E.U.A.) se determinó la osmolalidad de las dos fórmulas F-100 preparadas en el hospital y de otra fórmula preparada bajo las mismas condiciones pero utilizando leche entera desnatada en polvo. Los valores se reportaron en mOsm/kg.

### **Evaluación antropométrica**

Al inicio de cada semana y al final del tratamiento, se midieron las variables antropométricas de peso, talla, circunferencia cefálica y de brazo (Gibson, 1990). Con el peso y la talla se calculó el puntaje Z del indicador peso/talla en el programa Epi Info 2000, utilizando como referencia los datos publicados por el NCHS/WHO (WHO, 1978). De acuerdo al valor obtenido y a los puntos de corte indicados por la norma oficial NOM-031-SSA2-1999 (Secretaría de Salud, 2001), se clasificó el grado de desnutrición del niño.

### **Evaluación bioquímica**

Al inicio de cada semana y al final del tratamiento se cuantificaron los indicadores bioquímicos: hemoglobina, proteínas totales, albúmina y prealbúmina. Los tres primeros fueron analizados por el laboratorio de análisis clínicos del HIES y la prealbúmina se cuantificó por un ensayo de ELISA desarrollado *ex profeso* (Ruvalcaba y Calderón de la Barca, 2004).

### **Análisis estadístico**

Se realizaron estadísticas descriptivas de las variables antropométricas y bioquímicas cuantificadas. La comparación de las variables antropométricas y bioquímicas al inicio y final del tratamiento para cada grupo se realizó con la prueba de t de Student pareada para datos paramétricos y la prueba de Wilcoxon para no paramétricos. Para ello se utilizó el paquete estadístico NCSS versión 6.0.2 con una probabilidad de error menor o igual a 0.05.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Modificación enzimática

#### **Obtención del concentrado enzimático**

Se obtuvo un concentrado enzimático de páncreas porcino con actividad de tripsina de  $8.65 \times 10^{-3}$  y de quimotripsina de  $4.09 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g p-nitroanilida}/\text{min}/\text{mg}$ . Estos valores fueron mayores que lo obtenido previamente en el laboratorio (Calderón de la Barca y col., 2000). Dicho aumento, se debió a las modificaciones realizadas a los procesos de purificación y activación. En el primero, se sustituyeron las etapas de precipitación con sulfato de amonio y diafiltración por centrifugación y ultrafiltración. Con ello se redujo el tiempo de obtención y los zimógenos resultaron poco afectados por estar menos expuestos a la temperatura ambiental y a menor número de etapas de extracción.

En el proceso de activación de zimógenos el calcio actúa como un cofactor. Se une al sitio activo y modifica la estructura de los zimógenos. Se ha observado en experimentos *in vivo* que a concentraciones extracelulares altas de este ión, el tripsinógeno se activa dentro del páncreas antes de ser excretado y produce la degradación del tejido muscular (Kruger y col., 2000). Es por esto que al aumentar la concentración de cloruro de calcio de 0.10 M a 0.25 M y diluir en 9 volúmenes más durante la activación de zimógenos, se obtuvo una mayor actividad proteolítica final.

#### **Obtención de la proteína de soya modificada enzimáticamente**

La composición proximal del concentrado proteico de soya enriquecido con Met, en base húmeda fue: 87.25% de proteína, 3.24% de hidratos de carbono, 2.0% de lípidos y 1.49% de humedad. La cantidad de proteína del aislado inicial era de 84.83%. La modificación enzimática la aumentó en un

2.42%. Hasta ahora, la modificación enzimática en el laboratorio se había hecho a partir de pasta de soya (Calderón de la Barca, 2000; De Regil y Calderón de la Barca, 2004; Wall y col. 2004). Con este trabajo, se observó que al utilizar aislado comercial como materia prima inicial, aunque se incrementan los costos, los rendimientos son muy buenos (20% de la fracción F1-10) y se espera mejor calidad nutricia debido a que no contiene carbohidratos complejos de digestión difícil. Así, cuando se trabajaba con pasta, se llegaba a un producto con 68% de proteína, muy por debajo del 87% obtenido en este estudio.

En la Tabla 2 se presenta el perfil de aminoácidos de la fracción enriquecida y se compara con la recomendación para lactantes basado en leche materna (FAO/WHO, 1991), con la composición de aminoácidos de la leche de vaca y la del aislado de soya sin modificar. La concentración final de aminoácidos azufrados en el ingrediente proteico modificado fue de 5.08 g/100 g de proteína, con lo cual se cubre el requerimiento de 4.2% de los lactantes (FAO/WHO, 1991). La concentración de los aminoácidos Phe, Tyr y Leu disminuyó en la fracción enriquecida con respecto al aislado de soya sin modificación. Sin embargo, el valor de la calificación química de la proteína de soya se mejoró de 60 a 80%.

El porcentaje de metionina unido fue de 3.85% y resultó menor al 5.05% reportado por De Regil y Calderón de la Barca (2004). Esto probablemente se debió a que el hidrolizado se concentró por ultrafiltración sin llegar a secarse, sino que se hizo la síntesis con un 20% de sustrato, en lugar del 30% usado antes. El no haber obtenido un porcentaje tan alto de unión de metionina, se compensa con el ahorro en tiempo, costos de secado y rendimiento mayor. Así mismo se eliminó el riesgo de hacer menos biodisponibles los aminoácidos como la lisina, que se altera por las altas temperaturas empleadas en el secador de espreas. En otro estudio, Calderón de la Barca y col. (2000), lograron la unión de un 3.2% de metionina, valor muy similar al del presente

trabajo, sin embargo utilizaron una mayor concentración de metil éster de metionina por gramo de sólido (0.076 g Met/g).

### Tratamiento intrahospitalario de niños desnutridos

#### **Características de la población**

Se incluyeron 17 niños en total, 12 fueron alimentados con proteínas de leche y 5 con proteína de soya modificada. El tamaño de muestra entre grupos no pudo ser igualado debido a que en el período comprendido entre junio y octubre del 2004, se observó una notoria disminución en el ingreso de niños desnutridos al HIES. De hecho a través del tiempo los casos de desnutrición en niños menores de 2 años ha disminuido y la población a la que se atiende en el hospital ha cambiado.

En los últimos años se han tratado en el HIES principalmente hijos de padres jornaleros migrantes (Bolaños y col., 2004). Actualmente, la baja asistencia de estos niños se debe al cambio en las condiciones de contrato de los jornaleros. Los dueños de algunos campos (como los de Pesqueira) prefirieron contratar hombres sin familias. Sin embargo, con estos cambios se presentaron problemas de violencia y alcoholismo en los campos, por lo que algunos de los patrones están contratando nuevamente a jornaleros con familia (comunicación personal, Dra. Isabel Ortega, CIAD). La escasa afluencia de niños desnutridos al HIES, no sólo podría explicarse por lo mencionado anteriormente sino que además en algunos campos agrícolas, se implementó el programa social de abasto OPORTUNIDADES. Este programa brinda apoyo en educación, salud, nutrición e ingreso a las familias que viven en extrema pobreza ([www.progresa.com.mx](http://www.progresa.com.mx)). Por todas estas limitantes, se amplió el criterio de inclusión y se trabajó con niños que fueron hospitalizados por desnutrición primaria y con cualquier grado del padecimiento, para el tratamiento con proteína de soya modificada.

El grupo de infantes alimentados con proteínas de leche se conformó de 7 niños y 5 niñas con una edad promedio de 12.5 meses ( $\pm 7$  meses). De acuerdo al indicador de peso/talla, 10 de ellos presentaron desnutrición de segundo grado y 2 de tercer grado, tipo kwashiorkor, al ingresar al hospital. Todos los niños pertenecían a familias de bajo nivel socioeconómico. Los padres de 11 de ellos eran jornaleros empleados en campos agrícolas de la Costa de Hermosillo y sólo 1 de ellos originario de Hermosillo se dedicaba a la albañilería.

### **Tratamientos**

El tiempo promedio que el grupo de infantes alimentados con proteínas lácteas estuvo en rehabilitación fue de 18 días ( $\pm 11$  días). Este tiempo fue menor que los 31 días que permanecían antes para lograrlo, de acuerdo con los registros en los años 1985 – 2001 del mismo HIES (Bolaños y col., 2004). Los pacientes tuvieron una ganancia promedio de peso de 13.72 g/kg/d ( $\pm 8.58$  g/kg/d), mayor a la señalada por Bhan y col. (2003), de 10 g/kg/d. La mayoría aceptó la vía oral sin ningún problema. Solamente 5 infantes iniciaron la alimentación con sonda nasogástrica, pero al final del tratamiento todos eran alimentados por vía oral. Es importante que se maneje la vía enteral cuando el niño no acepta la alimentación oral y se evite la alimentación parenteral para que el sistema digestivo no sufra atrofia. Por la vía enteral se conserva la capacidad de digestión y absorción del tubo digestivo, las funciones inmunológicas y gastrointestinales (Bloch y Mueller, 2001).

El grupo de niños alimentados con proteínas de soya modificada enzimáticamente se conformó por 5 infantes: 3 niños y 2 niñas con una edad promedio de 10.2 meses ( $\pm 9.2$  meses). Cuatro de ellos eran hijos de padres jornaleros provenientes del sur del país que trabajaban en los campos agrícolas de la Costa de Hermosillo y uno de padres originarios de Hermosillo dedicado a

la albañilería. Solamente un niño presentó desnutrición grave, tipo kwashiorkor, el resto cursaban con desnutrición leve.

El tiempo promedio que el grupo alimentado con la fórmula de soya estuvo en rehabilitación fue de 13 días ( $\pm 4$  días), lo cual fue menor a los 18 d registrados en el grupo de niños alimentados con proteínas de leche. Esto se debió más al grado de desnutrición de los niños de este grupo, que a la calidad de las proteínas de soya modificadas. Se ha observado que los niños con desnutrición severa, tienen un crecimiento más acelerado que los niños de la misma edad pero sanos, por lo tanto la ganancia de peso será mayor (Vásquez-Garibay, 2000). En este estudio, aunque los niños no estaban sanos, el grado de desnutrición de los alimentados con proteínas de soya fue menor al igual que su ganancia de peso de 9.0 g/kg/d ( $\pm 3.52$  g/kg/d) comparada con la del otro grupo. Todos los niños iniciaron la alimentación con sonda nasogástrica, pero al final del tratamiento todos aceptaron la fórmula por vía oral sin rechazo al sabor.

También hay que hacer notar, que por un error de cálculo, la fórmula a base de proteína de soya modificada no aportaba las 100 kcal/100 mL de una F-100, sino 89 kcal/100 mL. Este aporte es mucho mayor a las 67 kcal /100 mL que aporta una fórmula infantil convencional como la Nan I. Sin embargo, su proporción de proteína (12% del aporte energético) sí era la adecuada para la recuperación de la desnutrición, comparable a la fórmula modular láctea y mas del doble de una fórmula convencional comercial. Es por esto que se logró una recuperación efectiva.

Es importante señalar, que aunque no se realizó un estudio de aceptación sensorial en los niños, se observó que la fórmula con proteínas de soya tuvo mayor aceptación que la fórmula con concentrado de proteínas de leche. Esto quizás también se relaciona al mejor estado nutricional, ya que los niños a medida que se van recuperando muestran mejor apetito.

Los péptidos de bajo peso molecular y los aminoácidos libres tienen sabor amargo y poca aceptación. De Regil y Calderón de la Barca (2004), compararon la aceptación sensorial de la fórmula con proteína modificada de soya con la de una fórmula comercial conteniendo un hidrolizado de proteínas lácteas. El panel de evaluación tuvo una marcada aceptación por el hidrolizado de soya. Con esto se confirma la aceptabilidad por niños pequeños, ya que el estudio citado fue en adultos.

### **Osmolalidad de las fórmulas**

En el manual de la OMS, la fórmula F-100 elaborada con leche desnatada en polvo tiene un valor de 419 mOsm/kg; sin embargo, el valor determinado en el presente estudio para dicha fórmula fue de 773 mOsm/kg. La fórmula elaborada con concentrado de proteínas de leche tuvo una osmolalidad de 426 mOsm/kg y la que contenía la F1-10<sub>E</sub> de 406 mOsm/kg.

En niños sanos alimentados con proteínas lácteas, la carga renal de solutos no representa un problema, sin embargo en niños desnutridos que generalmente presentan deshidratación se debe tener mucho cuidado con la osmolalidad de las fórmulas. El límite máximo de carga renal para estos niños es de 33 mOsm/100 kcal (LSRO, 1998). La fórmula F-100 preparada con proteínas de leche, tenía un aporte de 100 kcal/100 mL, por lo tanto su osmolalidad fue de 42.6 mOsm en 100 kcal. La fórmula F-100 con proteína de soya modificada tiene un aporte energético de 89 kcal/100mL, por lo que la osmolalidad de esta preparación fue de 45.61 mOsm en 100 kcal. Uno de los criterios de inclusión de los niños al tratamiento, era el balance hidrolítico adecuado y la infección controlada. Por esto tal vez una carga mayor de solutos no les afectó, ya que no presentaron diarrea osmótica.

Un grupo de investigadores (Diop y col., 2003), rediseñó la fórmula modular recomendada por la OMS para la recuperación de la desnutrición infantil. Sustituyeron la fórmula líquida para evitar contaminación en el

transporte y en su uso casero, por una barra sólida. Para formularla, reemplazaron el 25% del contenido de leche desnatada en polvo de la F-100, con mantequilla de cacahuate, un producto común de la dieta de Senegal, donde la evaluaron. El alimento presentó una osmolalidad muy baja, debido al bajo contenido de agua y a que los componentes solubles en agua están protegidos por grasas. De esta manera lograron un producto 5 veces más energético que la fórmula F-100.

En este estudio no sería recomendable modificar las dos formulaciones F-100 para asemejar el aporte proteico de la barra nutritiva mencionada anteriormente. Esto porque son fórmulas líquidas y se considera que aquellas con densidad energética mayor a 100 kcal/100 mL son hiperosmolares (Koo, 1991). Sin embargo, cabe resaltar que al utilizar un concentrado de proteínas de leche en lugar de leche desnatada en polvo, se redujo la osmolalidad.

### **Evaluación antropométrica durante la recuperación**

En los niños tratados con proteínas de soya, se observaron aumentos ( $p < 0.05$ ) en las variables de peso, talla y circunferencia cefálica (Tabla 3). Aunque el aumento de peso fue significativo, no fue tan grande como para inducir un cambio notable ( $p > 0.05$ ) en el indicador peso/talla. Todos los niños finalizaron el tratamiento con un puntaje Z de este indicador muy cercano a  $-1$  con un rango de  $-1.42$  a  $-0.85$ . Tampoco se observó un incremento significativo en la circunferencia braquial.

En el grupo de niños tratados con proteínas de leche, se observaron aumentos significativos ( $p < 0.05$ ) en todas las variables antropométricas. Este grupo inició con un grado mayor de desnutrición. El valor inicial del puntaje Z de peso/talla fue  $-2.57$  (rango:  $-3.3$  a  $-1.43$ ). La OMS (WHO, 1999), considera como criterio para dar de alta a un infante en recuperación, cuando éste alcanza un puntaje Z de  $-1$  en este indicador. Cinco de los 12 niños, fueron dados de alta cuando presentaron valores entre  $-1.07$  y  $0.1$ . Cuatro niños

tuvieron en promedio un valor de -1.68 y solamente 3 finalizaron el tratamiento con un valor Z de -2.3, debido a que su alta se otorgó a petición de las madres.

Lo anterior indica que se necesita trabajar en programas de educación nutricia dirigidos específicamente a las madres, para que no interrumpan la recuperación de sus hijos por lo menos hasta que alcancen el puntaje Z de peso/talla de -1.

En el estudio antes citado (Diop y col., 2003), en la evaluación de la barra sólida que sustituye a la fórmula líquida con proteínas de leche, discuten también el problema de que las madres retiran a sus hijos del tratamiento, antes de lograr la rehabilitación completa. De hecho, por eso diseñaron la barra, para que pueda administrarse fácilmente a nivel casero. También, dieron de alta a los niños con un puntaje Z de peso para la talla de -1.5, a fin de lograr la evaluación de un mayor número de niños.

### **Evaluación bioquímica**

En general no se observaron aumentos significativos ( $p > 0.05$ ) entre el inicio y final del tratamiento, en los valores promedios de hemoglobina, proteínas séricas totales y albúmina de los niños en ningún grupo (Tabla 5). A pesar del grado de desnutrición, los valores se encontraron dentro del rango normal. Sólo los niños con kwashiorkor de ambos grupos presentaron proteínas séricas y albúmina disminuidas. La hipoalbuminemia es una característica de los niños con este padecimiento y está relacionado con la presencia de edema (Toussaint y García, 2001). En estos casos, la alimentación se inició con la fórmula F-75 (75 kcal/100mL) y el edema desapareció rápidamente. Después se continuó la alimentación con la fórmula F-100. Al final del tratamiento, los valores séricos de proteínas totales y albúmina de los niños se encontraban dentro de los rangos normales (proteínas totales: 5.6 a 8.5 g/dL, albúmina: 3.0 a 6.0 g/dL).

En los hospitales, la cuantificación de albúmina se encuentra entre los análisis de rutina. Sin embargo, el análisis de la prealbúmina, es un indicador más sensible para evaluar la recuperación de los niños, debido a que la vida media de la albúmina es de 20 días, comparada con 2 de la prealbúmina. Así mismo, los depósitos de albúmina en el cuerpo son mayores a los de prealbúmina (Beck y Rosenthal, 2002). Hasta ahora, no existe ningún estudio en México donde se haya evaluado la prealbúmina como un indicador del diagnóstico y recuperación de la desnutrición. Quizá porque la cuantificación de albúmina es más sencilla y económica que la prealbúmina. Sin embargo, en otros países como Canadá y Estados Unidos, sí se han hecho estudios para demostrar la utilidad de la prueba en la recuperación y reducción del tiempo de hospitalización. Pero sobre todo en la disminución de los costos de tratamiento nutricional (Bernestein y Ingenbleek, 2002). Por ello, en este estudio se consideró de mucha ayuda e importancia desarrollar un método *ex profeso* para su cuantificación.

En los dos grupos de infantes de este estudio, se observó que el nivel inicial de prealbúmina aumentó significativamente al final del tratamiento (Tabla 4). Potter y Luxton (2002), cuantificaron prealbúmina y albúmina sérica a 124 pacientes que ingresaron a un hospital canadiense. De acuerdo al análisis de prealbúmina, el 24% de los sujetos sufrían desnutrición, mientras que con la cuantificación de albúmina sólo 12% la padecía. En este estudio se llevó a cabo una clasificación similar y al utilizar los niveles de prealbúmina, los 17 niños mostraron desnutrición o riesgo nutricional al iniciar el estudio. De acuerdo al análisis de albúmina, sólo 4 niños podrían haber sido diagnosticados con desnutrición y éstos fueron los que presentaban kwashiorkor.

Durante el periodo de trabajo en el hospital, ninguno de los niños desnutridos que recibió el tratamiento nutricional falleció. La implementación de las recomendaciones de la OMS para la recuperación de esta enfermedad ha tenido en este y en otros estudios un efecto positivo en la reducción de la

mortalidad infantil. Ashworth y col. (2004), hicieron un seguimiento de los casos de mortalidad de dos hospitales sudafricanos que implementaron las recomendaciones de la OMS para el manejo de la desnutrición severa. Durante el periodo en el que personal del hospital recibió instrucción basada en el manual de la OMS, los casos de mortalidad infantil se redujeron del 46 al 21% y del 25 al 18% en el otro hospital. Cuando se llevó a cabo la rotación de personal nuevo, los índices de mortalidad aumentaron nuevamente. Esto demuestra que el manejo de la desnutrición mejora con la implementación del protocolo promovido por la OMS y es muy conveniente que se establezca como un programa permanente en todos los hospitales, principalmente en los de concentración regional.

## CONCLUSIONES

Las fórmulas modulares basadas en proteína de leche de vaca, bajo las recomendaciones de la OMS, son un excelente tratamiento dietario para la recuperación de la desnutrición infantil en un plazo corto. Por su parte, las fórmulas modulares con proteína de soya modificada, cubrieron los requerimientos de los niños desnutridos, induciendo una ganancia de peso adecuada y un aumento significativo del indicador bioquímico prealbúmina.

La comparación entre una fórmula basada en proteínas lácteas y la otra en proteína de soya modificada, en cuanto a tiempo de recuperación y ganancia de peso diaria durante la misma, no fue posible porque el tipo de desnutrición y el número de niños en cada grupo, fue diferente. Sin embargo, se logró un primer ensayo de la proteína de soya modificada en niños desnutridos, demostrando posibilidades de utilizarse como una alternativa a las proteínas lácteas en casos de intolerancia o alergias. Esto en base a la eficiencia nutricional y la completa aceptación al sabor.

## REFERENCIAS

- American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. Soy protein-based formulas: Recommendations for use in infant feeding. *Pediatrics* 1998; 101:148-153.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15 th ed. Virginia, USA, 1990.
- Ashworth A, Chopra M, McCoy D, Sanders D, Jackson D, Karaolis N, Sogaula N, Schofield, C. WHO guidelines for management of severe malnutrition in rural South African hospitals: Effect on case fatality and the influence of operational factors. *Lancet* 2004;363: 1110-1115.
- Beck FK, Rosenthal TC. Prealbumin: A marker for nutritional evaluation. *Am Fam Physician* 2002; 65:1575-1578.
- Bernstein LH, Ingenbleek Y. Transthyretin: Its response to malnutrition and stress injury. Clinical usefulness and economic implication. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:1344-1348.
- Bhan MK, Bhandari N, Bahl R. Management of the severely malnourished child: perspective from developing countries. *BMJ* 2003; 326:146-151.
- Bolaños AV, Hurtado J, López Cervantes G, Calderón de la Barca AM. Impacto de la migración de jornaleros en la prevalencia y tipo de desnutrición infantil intrahospitalaria en Sonora. *Nutrición Clínica* 2004; 7:24-31.
- Calderón de la Barca AM, Ruiz Salazar A, Jara Marini M. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. *J Food Sci* 2000; 65:246-253.
- Calderón de la Barca AM, Ruvalcaba VL, Bolaños A, Hurtado J. Implementación de fórmulas modulares para la recuperación intrahospitalaria de la desnutrición. *Rev Panam Salud Publica* 2004. (con el editor).

- Castillo G, Sáenz MA, Serrano MA, Hernández A. Influence of protein source, type and concentration and product form on the protein quality of commercial enteral formulas. *J Food Sci* 2002;50:26-34.
- De Regil LM, Calderón de la Barca AM. Nutritional and technological evaluation of an enzymatically methionine-enriched soy protein for infant enteral formulas. *Int J Food Sci Nutr* 2004; 55:91-99.
- Diop el HI, Dossou NI, Ndour MM, Briend A, Wade S. Comparison of the efficacy of a solid ready-to-use food and a liquid, milk-based diet for the rehabilitation of severely malnourished children: a randomized trial. *Am J Clin Nutr*. 2003; 78:302-307.
- Edington J, Boorman J, Durrant ER, Perkins A, Giffin CV, James R y col. Prevalence of malnutrition on admission to four hospitals in England. *Clin Nutr* 2000; 19:191-195.
- Epi Info™ 2002 [computer program]. Version 3.3. Atlanta, Georgia: Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2000. Disponible en: <http://www.cdc.gov/epiinfo/> (16 Nov. 2004)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO). Protein Quality Evaluation Report of the Joint Expert Consultation. Rome: 4-8, December 1989. FAO, 1991.
- Gibson Rosalind S. Principles of nutritional assessment. New York, Oxford University Press, 1990.
- Kimura H, Aray S. Oligopeptide mixtures produced from soy protein by enzymatic modification and their nutritional qualities evaluated by feeding tests with normal and malnourished rats. *J Nutr Sci Vitaminol*. 1988; 34: 375-386.
- Koo WW, Poh D, Leong M, Tam YK, Succop P, Checkland EG. Osmotic load from glucose polymers. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1991;15:144-147.

- Kruger B, Albrecht E, Lerch MM. The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am J Pathol*. 2000;157:43-50.
- LSRO (Life Sciences Research Office) Executive Summary for the Report: Assessment of nutrient requirements for infant formulas. *J Nutr* 1998;128:2059S-2294S.
- NCSS. Number Cruncher Statistical Systems. Programa estadístico para windows, Versión 6.0.2, Hintze JL; U.S.A. 1996
- Oppert B, Kramer KJ, McGaughey WH. Rapid microplate assay for substrates and inhibitors of proteinase mixtures. *BioTechniques* 1997; 23: 70-72.
- Potter MA, Luxton G. Transthyretin measurement as a screening tool for protein calorie malnutrition in emergency hospital admissions. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:1349-1354.
- Ruvalcaba VL, Calderón de la Barca AM. Validación de un ensayo de ELISA para la cuantificación de prealbúmina humana. 2004 (artículo en preparación).
- Secretaría de Salud (SSA). Norma Oficial Mexicana NOM 131-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. *Diario Oficial de la Federación* 1997; Diciembre 17 (primera sección):8-93.
- Secretaría de Salud (SSA). Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño. *Diario Oficial de la Federación* 2001; Febrero 09 (primera sección):13-58.
- Süle E, Hajós GY, Tömösközi S. Functional properties of the enzymatically modified soya protein isolate. *Acta Alimentaria* 1997; 26:279-85.
- Toussaint Martínez de Castro G, García-Aranda, JA. Desnutrición energético-proteínica. En: Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur AB, Arroyo P, eds. *Nutriología Médica*. México DF: Editorial Médica Panamericana; 2001.

- Vázquez OF, Caire G, Higuera I, Hernández G. High performance liquid chromatographic determination of free aminoacids in shrimp. *J Liquid Chromatogr* 1995;18:20-59.
- Vásquez-Garibay EM, Romero-Velarde E. Manejo dietético del niño con desnutrición grave. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2000; 57:463-472.
- Wall-Medrano A. Efectos a nivel celular y molecular de la ingestión de soya enzimáticamente modificada para la recuperación de ratas desnutridas. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC. Hermosillo, Son., México. 2004.
- World Health Organization (WHO). A growth chart for international use in maternal and child health care. Geneva: WHO; 1978.
- World Health Organization (WHO). Management of severe malnutrition: A manual for physicians and other senior health. Geneva: WHO; 1999.
- World Health Organization (WHO). Management of the child with a serious infection or malnutrition. Guidelines for care at the first-referral level in developing countries. Geneva: WHO; 2000.

**Tabla 1. Ingredientes utilizados en las formulaciones F-75 y F-100**

<b>INGREDIENTE</b>	<b>F-75</b>	<b>F- 100</b>
Aceite (g)	27	60
Lecitina de soya líquida (g)	5	5
Goma tara (g)	1	1
Proteínas de leche* ó F1-10 <sub>E</sub> (g)	20.09 ó 10.03	67.59 ó 33.25
Azúcar (g)	100	50
Premezcla de vitaminas (mg)	140	140
Premezcla de minerales (mL)	20	20
Agua hasta completar (mL)	1000	1000

\* Proteínas de leche: producto comercial con 42.9 % de proteínas, 44.5% de carbohidratos, 1% de lípidos, 3.6 % de humedad y 8 % de cenizas.

**Tabla 2. Perfil de aminoácidos esenciales de proteínas de leche de vaca, aislado de soya y F<sub>1-10</sub>E**

<b>AA g/100g proteína</b>	<b>Recomendación para lactantes*</b>	<b>Proteínas de leche de vaca**</b>	<b>Aislado de soya**</b>	<b>F<sub>1-10</sub>E</b>
Thr	4.30	3.15	2.80	4.80
Phe + Tyr	7.20	8.96	8.50	6.68
Met + Cys	4.20	4.2	2.54	5.08
Val	5.50	6.54	5.25	5.67
Ile	4.60	5.80	5.47	5.50
Leu	9.30	9.73	8.38	7.75
Lys	6.60	7.68	6.33	5.88
His	2.60	2.18	2.03	3.01
Calificación química (%)***	100	73	60	83

\*FAO/OMS (1991)

\*\*Laboratorio de Proteínas, CIAD.

\*\*\*La calificación química (%) es el cociente del valor más bajo de cada aminoácido presente en la fuente proteica entre la recomendación del mismo aminoácido para un grupo de edad.

**Tabla 3. Promedio de variables antropométricas al inicio y final del tratamiento**

Variable	Proteínas de leche		Proteína de soya F <sub>1-10</sub> E	
	Inicio	Final	Inicio	Final
Peso (kg)	5.05 (±2.10) <sup>a</sup>	5.94 (±2.15) <sup>b</sup>	5.64 (±2.18) <sup>a</sup>	6.21 (±2.18) <sup>b</sup>
Talla (cm)	63.69 (±7.85) <sup>a</sup>	64.45 (±7.83) <sup>b</sup>	65.16 (±10.70) <sup>a</sup>	65.76 (10.33) <sup>b</sup>
Peso/talla (puntaje Z)	-2.57 (±0.71) <sup>a</sup>	-1.44 (±0.82) <sup>b</sup>	-1.76 (±0.67) <sup>a</sup>	-1.34 (±0.50) <sup>a</sup>
Circ. cefálica (cm)	40.71 (±4.31) <sup>a</sup>	41.63 (±3.82) <sup>b</sup>	40.60 (±3.90) <sup>a</sup>	41.70 (±3.90) <sup>b</sup>
Circ. braquial (cm)	10.12 (±2.07) <sup>a</sup>	10.63 (±1.84) <sup>b</sup>	11.70 (±2.77) <sup>a</sup>	12.60 (±2.25) <sup>a</sup>

Literales distintas entre columnas indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ .

**Tabla 4. Promedio de variables bioquímicas al inicio y final del tratamiento de ambos grupos**

Variable	Proteínas de leche		Proteína de soya F <sub>1-10</sub> E	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Hemoglobina (g/dL)	10.73 (±1.59) <sup>a</sup>	10.51 (±1.09) <sup>a</sup>	11.28 (±2.16) <sup>a</sup>	11.16 (±1.64) <sup>a</sup>
Proteína total (g/dL)	6.44 (±1.05) <sup>a</sup>	6.60 (±0.58) <sup>a</sup>	5.30 (±0.76) <sup>a</sup>	5.64 (±0.69) <sup>a</sup>
Albúmina (g/dL)	3.60 (±0.78) <sup>a</sup>	3.71 (±0.38) <sup>a</sup>	3.42 (±0.79) <sup>a</sup>	3.64 (±0.57) <sup>a</sup>
Prealbúmina (mg/dL)	5.87 (±4.36) <sup>a</sup>	18.08 (±10.55) <sup>b</sup>	11.47 (±4.35) <sup>a</sup>	17.06 (±2.61) <sup>b</sup>

Literales distintas entre columnas indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ .