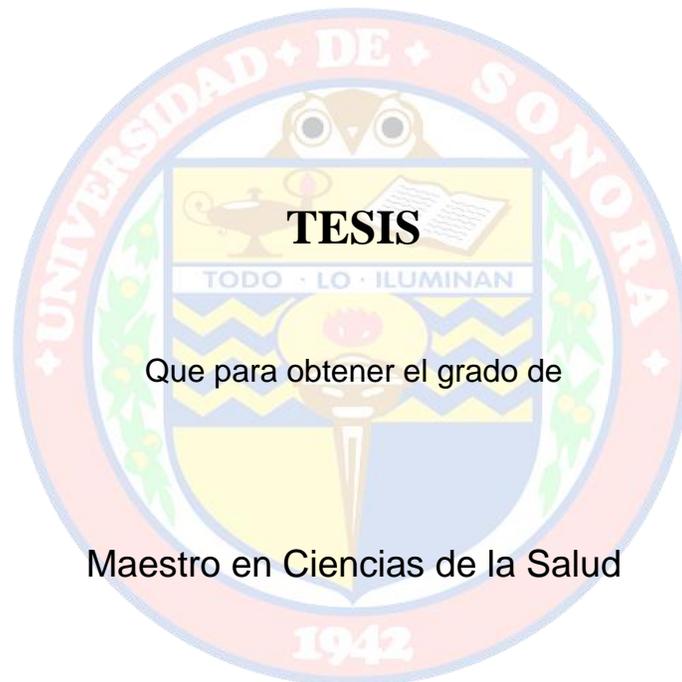


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Excreción de proteínas en heces fecales de niños con Síndrome Nefrótico sometidos a diferentes dietas en el Hospital Infantil del Estado de Sonora



Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Edna Lizbeth Robles Valenzuela

Hermosillo, Sonora

Octubre de 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



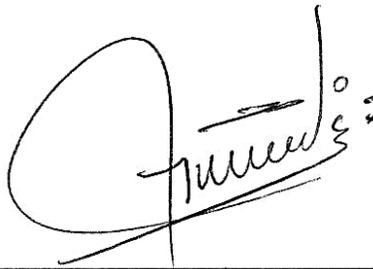
**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de Edna Lizbeth Robles Valenzuela, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



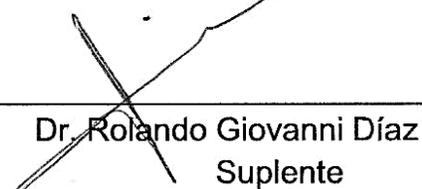
Dr. Norberto Sotelo Cruz
Director Académico



Dr. Ramiro García Álvarez
Secretario



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Vocal



Dr. Rolando Giovanni Díaz Zavala
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme llegar a este día de mi vida, donde termino un ciclo más de estudios. A mi familia, a mis papás por siempre darme todo el amor y el apoyo que necesito para cumplir mis sueños y poder alcanzar mis metas desde el inicio de mis días, y a mis hermanos por su cariño y ánimos para seguir adelante.

Gracias a la Universidad de Sonora y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por permitirles a jóvenes como yo estudiar un posgrado de calidad, que nos servirá en nuestro desarrollo profesional y de vida.

Muchas gracias a los miembros de mi comité de tesis por acompañarme durante estos dos años. Al Dr. Norberto Sotelo Cruz, por aceptarme como parte de su equipo de trabajo y apoyarme durante toda la maestría; a la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna, quien fue como otra directora de tesis, guiándome y permitiéndome entrar en su laboratorio, donde aprendí muchas cosas nuevas; al Dr. Ramiro Garcia Alvarez, por las pláticas y enseñanzas durante el tiempo de búsqueda de pacientes, y al Dr. Rolando Giovanni Díaz Zavala, quien fue mi maestro en la licenciatura y ahora continúa en mi camino aconsejándome para hacer siempre un mejor trabajo.

Quiero agradecer a las instituciones que permitieron que este estudio se llevara a cabo. Al Hospital Infantil del Estado de Sonora, por abrir sus puertas a la investigación clínica y a todo su personal por el apoyo que me brindaron para que los pacientes del estudio pudieran participar. Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), en especial al laboratorio de la Dra. María Islas, y a todos los que trabajan ahí por tratarme como parte de su equipo y enseñarme todos sus trucos para poder trabajar en armonía, ustedes fueron parte importante de este trabajo ya que no hubiera podido hacer nada sin su colaboración. También a la Dra. Ana María Calderón de la Barca, quien al final del proyecto me

compartió parte de su conocimiento para que este fuera un mejor trabajo y me enseñó que no todo debe ser cómo dice el manual, que todo está en la práctica.

A los pacientes que voluntariamente participaron en este trabajo y a sus padres por todo su apoyo y por su excelente colaboración para conmigo. Sin ellos y su disposición, no hubiera podido realizar este trabajo.

No puedo dejar de agradecer a mis maestros y compañeros de la Maestría, por todos sus conocimientos y consejos que compartieron conmigo para ser una mejor persona y profesional. Gracias a mis amigos, quienes me aguantaron en el proceso de la realización de esta tesis y me echan porras cada vez que pueden para que no deje de crecer.

¡Muchas Gracias!

ÍNDICE

OBJETIVOS.....	1
Objetivo General.....	1
Objetivos Específicos.....	1
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	7
Causas del Síndrome Nefrótico.....	7
Tratamiento Nutricional del Síndrome Nefrótico.....	9
Pérdida de Proteínas por Vía Digestiva en el Síndrome Nefrótico	15
Justificación.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Diseño de estudio	18
Sujetos de estudio.....	18
Criterios de Inclusión.....	18
Criterios de Exclusión.....	18
Criterios de Eliminación.....	19
Consideraciones Bioéticas.....	19
Tratamiento Nutricional.....	19
Historia Clínica de los Pacientes.....	21
Determinación de Proteínas Excretadas en Heces.....	22
Reactivos.....	22
Manejo de Muestras.....	22
Extracción de Proteínas.....	22
Determinación de la Concentración de Proteínas.....	23
Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes.....	25

Tinción de los Geles con Colorante Azul de Coomassie....	27
Doble Inmunodifusión Radial (Método Oücheterlony).....	27
Inmunolectroforesis Cruzada con Dos Antígenos.....	28
Electrotransferencia e Inmunodetección.....	29
Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA).....	30
Determinación de Humedad de las Muestras de Heces.....	32
Prueba de Sangre Oculta en Heces.....	32
Manejo y Análisis de Datos.....	33
Financiamiento.....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
Características de los Sujetos.....	34
Tratamiento Nutricional.....	37
Concentración de Proteínas en Heces.....	42
Análisis de Proteínas de Heces por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes..	50
Doble Inmunodifusión Radial e Inmunolectroforesis Cruzada con Dos Antígenos.....	52
Electrotransferencia e Inmunodetección.....	56
Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA).....	56
CONCLUSIONES.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	62
APÉNDICE 1. Consentimiento Informado.....	69
APÉNDICE 2. Asentimiento Informado para los niños.....	72
APÉNDICE 3. Ejemplo de uno de los planes alimenticios otorgados a los pacientes con síndrome nefrótico.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Porcentaje de prevalencia de las principales causas de Síndrome Nefrótico por edad del paciente.....	8
II	Valores de referencia de proteínas para niños de 1 a 13 años (IOM, 2005).....	13
III	Características generales de los pacientes con síndrome nefrótico del estudio.....	35
IV	Análisis bioquímicos realizados a los pacientes con síndrome nefrótico antes de realizar la intervención nutricional del estudio.....	38
V	Datos generales del tratamiento nutricional de los pacientes con síndrome nefrótico.....	39
VI	Comparación de las características generales de los sujetos de estudio entre los diferentes grupos.....	41
VII	Comparación de la concentración de proteínas de los niños con síndrome nefrótico antes y después del tratamiento nutricional y del grupo control.....	44
VIII	Concentración de proteínas de las muestras de heces de niños con síndrome nefrótico y grupo control ajustada al peso seco de las muestras.....	46
IX	Comparación de la diferencia de la concentración de proteínas en heces de los niños con síndrome nefrótico antes y después del tratamiento nutricional.....	49
X	Concentración de inmuglobulina A de muestras de heces de pacientes con síndrome nefrótico y controles medida por el método de ELISA.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Muestra de heces con buffer de extracción de proteínas después de centrifugar y antes de separar el sobrenadante.....	24
2	Microplaca después de la medición de la concentración de proteínas con el método del ácido bicinconínico.....	24
3	Cámara de electroforesis con geles de poliacrilamida al inicio de la corrida.....	26
4	Curva estándar de absorbancia contra concentración de proteínas del estándar de albúmina de suero bovino.....	43
5	Cambios en la concentración de proteínas en heces de cada uno de los pacientes con síndrome nefrótico del estudio, según el tratamiento nutricional recibido.....	48
6	Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % en condiciones desnaturalizantes de las proteínas extraídas de las heces de pacientes con síndrome nefrótico.....	51
7	Doble inmunodifusión pasiva en gel de agarosa de proteínas extraídas de heces de pacientes con síndrome nefrótico.....	53
8	Inmunoelectroforesis cruzada en gel de agarosa de proteínas extraídas en heces de niños con síndrome nefrótico.....	55
9	Doble inmunodifusion radial en gel de agarosa de proteínas extraídas de heces.....	55

Figura		Página
10	Electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas extraídas de heces e inmunodetección en membrana electrotransferida de IgA y albúmina.....	57

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la excreción de proteínas en heces fecales de pacientes pediátricos de 2 a 18 años con síndrome nefrótico del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) sometidos a diferentes dietas.

Objetivos Específicos

- Administrar dietas con niveles diferentes de proteínas, lípidos y sodio a niños con síndrome nefrótico, durante su estancia intrahospitalaria o a través del control de consulta externa.
- Determinar la excreción de proteínas en heces en los niños participantes, por el método del Ácido bicinconínico (cuantitativo) y electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (cualitativo).
- Comparar la excreción de proteínas en heces entre los niños sometidos a los diferentes planes alimenticios así como sus controles pareados por edad.
- Considerar las variaciones notables de los niveles sanguíneos y en orina de diferentes marcadores bioquímicos, así como el peso y el estado general del paciente, antes y después de la intervención.

RESUMEN

Introducción. El síndrome nefrótico (SN) se caracteriza por la pérdida de proteínas en la orina (proteinuria) y en heces. La alimentación adecuada de estos pacientes es importante ya que de ella depende la disminución de los signos de la enfermedad. Debido a que no existe evidencia de la asociación entre la proteína en la dieta y la pérdida proteica por vía intestinal, en el presente estudio se evaluó este efecto en niños con SN, en comparación a niños saludables.

Objetivo. Determinar la excreción de proteínas en heces en pacientes pediátricos con SN con diferentes dietas.

Material y Métodos. Se reclutaron 11 pacientes con SN en el Hospital Infantil del Estado de Sonora, 5 cumplieron con los criterios de inclusión, y eran niños entre 2 y 17 años. Se les asignaron: dieta normal, hipoproteica o hiperproteica. Antes y después de la intervención se recolectaron muestras de heces, así como de niños sanos pareados por edad. Se extrajeron proteínas totales, y se midió la concentración de proteínas por el método del ácido bicinconinico. Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida para analizar el perfil proteico individual, y se inmunodetectaron albúmina e IgA en membrana electrotransferida y se cuantificaron por ELISA.

Resultados. La concentración de proteínas de las heces fue desde 85.2 mg/g hasta los 461 mg/g. Los pacientes que consumieron poca proteína aumentaron la concentración de proteínas en heces, mientras que el paciente con dieta hiperproteica disminuyó la concentración, aunque no hubo diferencia significativa entre grupos de tratamiento y control ($p=0.368$). Los perfiles electroforéticos de proteínas extraídas de las heces fueron diferentes al menos en una subunidad entre pacientes y niños saludables; además, se presentaron también diferencias en la concentración de proteína total entre cada muestra antes y después del tratamiento dietético. Sin embargo, no fue posible establecer un patrón

diferencial. La albúmina en heces, aunque no está nítida en electroforesis, se inmunodetectó en todas las muestras. Las concentraciones de albúmina fueron menores a 2 µg/L, excepto en una muestra. La IgA también estuvo presente en las muestras, en valores más bajos de lo normal en heces, especialmente en un paciente con glomeruloesclerosis focal y segmentaria.

Conclusiones. No se encontraron diferencias significativas entre la concentración de proteínas en heces de pacientes del grupo control y los pacientes con síndrome nefrótico, y sólo un paciente presentó una mayor excreción de proteínas en su contraparte sana. Las dietas tampoco fueron significativamente determinantes en la excreción de proteínas aunque es prudente investigar más acerca de los efectos de la dieta hiperproteica. No fue posible establecer un perfil de proteínas exclusivo de pacientes con síndrome nefrótico como se ha hecho en orina en pacientes renales y en otras enfermedades.

INTRODUCCIÓN

Los riñones tienen varias funciones que mantienen saludable al organismo. Una de sus principales funciones es mantener el equilibrio homeostático de líquidos, electrolitos y solutos orgánicos, además de bloquear el paso de células sanguíneas y de proteínas mayores a 6.5 kDa a la orina. Todo lo anterior gracias a que filtran la sangre del organismo y por esto reciben hasta un 20% del gasto cardiaco (Mahan y col., 2009).

Cada riñón está constituido por más de un millón de unidades funcionales llamadas nefronas, que están formadas por glomérulos (redes de capilares), un túbulo proximal, un túbulo distal y un túbulo colector (Botella, 2002). Estos componentes son los encargados de filtrar, reabsorber y excretar lo que sea necesario para que el organismo se mantenga en equilibrio y funcionando. Cuando un segmento de una nefrona es destruido o dañado pierde toda su funcionalidad (Mahan y col., 2009).

El glomérulo posee una pared capilar conformada de diferentes estructuras: tiene una membrana basal, conformada de colágeno y otras glucoproteínas, que tiene unidas unas estructuras llamadas podocitos (células con prolongaciones en forma de pies y que están separadas por hendiduras de filtración). El glomérulo también el glomérulo está sostenido por células mesangiales que se encuentran entre los capilares y pueden fagocitar y proliferar (Kumar y col., 2004). La función del glomérulo es crear la orina primitiva, sobre la cual actuarán las distintas partes de los túbulos para obtener la orina final, cuya composición debe ser la adecuada para mantener la homeostasis del medio interno (Botella, 2002).

El síndrome nefrótico es una condición patológica en la cual ocurren pérdidas de proteínas a través del filtrado glomerular, se acompaña de edema, hipoalbuminemia e hiperlipidemia además de otros trastornos metabólicos. Se presentan de 1 a 3 casos por cada 100,000 menores de 16 años (Velásquez, 2014). Al microscopio se evidencia daño en los podocitos de los glomérulos y

estos se aprecian aplanados (no en forma de pies) (Eddy y Symons, 2003). Los elementos de laboratorio que se consideran para el diagnóstico incluyen proteinuria (valores mayores a 3.5 g de proteína en orina en 24 horas), hipoalbuminemia (<2.5 g/dL de albúmina en sangre), e hiperlipidemia (Brown, 1985). La proteinuria se suele expresar en g/día, y se considera normal hasta 60-80 mg/día, mientras que si es superior a 3.5 g/día se considera una proteinuria de rango nefrótico.

Debido a la pérdida de proteínas por la orina, la disminución de las proteínas en sangre, incluyendo la albúmina (hipoalbuminemia). La disminución de proteínas en sangre provoca un desequilibrio en la presión oncótica, que hace que el agua migre al espacio intersticial provocando el edema (Eddy y Symons, 2003). Por todo esto, se sabe que existen alteraciones en la síntesis de lipoproteínas en el hígado que conducen a la hipercolesterolemia (Eddy y Symons, 2003).

El síndrome nefrótico es una de las 5 enfermedades renales más frecuentes en el mundo (Davin y Rutjes, 2011). En el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, uno de los principales institutos nacionales de salud del país, hay una incidencia de 35 a 40 nuevos casos al año, de los cuales la mitad están en edad preescolar, y se presentan más casos en pacientes del sexo masculino (AMP, 2000). En un estudio reciente en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) se observó que del año 1977 al 2012 se presentaron 306 casos de síndrome nefrótico, siendo la segunda causa de pacientes hospitalizados por enfermedades renales, sólo después de las infecciones de vías urinarias (García y col., 2014).

Aún no se ha descubierto una cura para la enfermedad, ya que estos pacientes suelen tener recaídas con el paso de los años (Lewis y col. 1989). Sin embargo es posible mantener un buen control con un tratamiento adecuado.

El tratamiento exitoso del síndrome nefrótico incluye indicaciones dietéticas, de actividad física, control del edema, tratamiento de infecciones y apoyo

psicológico al paciente y su familia (AMP, 2000). En cuanto al tratamiento farmacológico, consiste en la administración de prednisona. La dosis indicada es de 60 mg/m² diariamente por 4-6 semanas, seguido por 40 mg/m² alternando días por 4-6 semanas más (Gordillo, 2009). En razón de la respuesta a este tratamiento, se identifican dos variedades de la enfermedad: síndrome nefrótico sensible a esteroides y síndrome nefrótico resistente a esteroides, ambas pueden estar relacionadas con mutaciones genéticas (Carrasco y col., 2013). Unos de los tratamientos a elegir cuando los pacientes son resistentes a la prednisona, es la ciclosporina, y últimamente se encuentran en estudio nuevos medicamentos como el rituximab para tratar los síntomas y signos de la enfermedad en pacientes que no responden al tratamiento convencional (Suyama y col., 2015).

En cuanto al tratamiento nutricional, los principales objetivos incluyen el proporcionar un adecuado aporte de proteínas y calorías para evitar el catabolismo muscular, reducir el edema presente, controlar los valores elevados de lípidos en sangre y vigilar que no haya ninguna deficiencia de algún otro nutrimento (Escott-Stump, 2010). Este tratamiento es parte fundamental en el cuidado de los pacientes pediátricos con enfermedades renales, ya que el crecimiento es una de las partes que más se ven afectadas durante la enfermedad, y es importante que reciban una alimentación adecuada para revertir esta afectación (Cano, 2003; Santos y Fernández, 2003). Además, los pacientes deben recibir las cantidades correctas de macronutrientes, como es el caso de las proteínas, que al consumirse en cantidades adecuadas ayudan a limitar el daño renal y evitar el avance de la enfermedad (Wingen y col., 1997; Uauy y col., 1994).

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Causas del Síndrome Nefrótico

El síndrome nefrótico, caracterizado por la presencia de proteinuria, hipoalbuminemia, edema e hiperlipidemia, puede deberse a problemas relacionados o no al sistema inmune, en los que se daña la membrana del glomérulo alterando su permeabilidad. La causa de la enfermedad generalmente depende de la edad de los pacientes.

En niños menores de 15 años, lo más común es que la causa sea alguna lesión primaria glomerular, mientras que en adultos el síndrome nefrótico suele derivar de una enfermedad sistémica, principalmente la diabetes mellitus, lupus eritematoso sistémico, infecciones, entre otras (Casanueva y col., 2008, Kumar y col., 2004). También la prevalencia de las causas de la enfermedad varía según la edad (Tabla I), la prevalencia aproximada de enfermedades primarias es mayor en los niños (95 %) y menor en adultos (60 %), mientras que las enfermedades sistémicas son causantes de síndrome nefrótico en el 40 % de los adultos y sólo en el 5 % de los niños (Kumar y col., 2004). La causa primaria más común de síndrome nefrótico en los niños es la enfermedad de cambios mínimos, causante del 65 % de la prevalencia, mientras que en adultos, el 40 % de la prevalencia de síndrome nefrótico por una causa primaria es la glomerulonefritis membranosa (Kumar y col., 2004).

La enfermedad con cambios mínimos es una enfermedad relativamente benigna en donde los glomérulos se observan normales al microscopio pero los podocitos están fusionados. El pronóstico de los niños con esta enfermedad es bueno y más del 90 % responden al tratamiento (Kumar y col. 2004). El 70% de los niños con enfermedad de cambios mínimos son menores de 5 años, mientras que del 20-30% son adolescentes (Eddy y Symons, 2003).

Tabla I. Porcentaje de prevalencia de las principales causas de Síndrome Nefrótico por edad del paciente. Adaptada de Kumar y col., 2004.

	Porcentaje de prevalencia (%)	
	Niños	Adultos
Glomerulopatías primarias		
Glomerulonefritis membranosa (GN)	5	40
Enfermedad de cambios mínimos	65	15
Glomeruloesclerosis focal y segmentaria	10	15
GN membranoproliferativa	10	7
Enfermedades sistémicas		
Diabetes mellitus	Causas sistémicas más frecuentes	
Amiloidosis		
Lupus eritematoso sistémico		
Fármacos (oro, penicilamina)		
Infecciones (sífilis, hepatitis B)		
Neoplasias malignas		
Otras		

En la glomeruloesclerosis focal y segmentaria se presenta esclerosis (endurecimiento patológico de un tejido) que afecta sólo a algunos glomérulos y sólo a segmentos de ellos, de ahí el nombre que recibe. Los pacientes con este tipo de enfermedad, comparada con la enfermedad de cambios mínimos, tienden a presentar hematuria e hipertensión arterial y la respuesta al tratamiento convencional es muy escasa (Kumar y col., 2004). En niños, esta enfermedad se desarrolla normalmente alrededor de los 6 años (Eddy y Symons, 2003).

La glomerulonefritis membranoproliferativa se caracteriza por alteraciones de la membrana basal y del mesangio. Es responsable del 5 al 10% de los casos de síndrome nefrótico idiopático en niños y adultos (Kumar y col., 2004). La última de las causas primarias es la glomerulonefritis membranosa o nefropatía membranosa que es una enfermedad asociada a depósitos de complejos inmunes (inmunoglobulinas) entre los podocitos glomerulares y la membrana basal (Eddy y y Symons, 2003). Es una enfermedad muy rara en los niños, y es muy frecuente entre los 30 y 50 años de edad.

En cuanto a las causas genéticas del síndrome nefrótico, las variantes como el síndrome nefrótico congénito y la glomeruloesclerosis focal y segmentaria se deben a daños en la estructura del podocito debido a mutaciones genéticas. Sin embargo, aún se requiere mayor investigación para ofrecer mejores tratamientos médicos a estos pacientes (Akchurin y Reidy, 2014).

Algunos estudios mencionan que otra de las causas del síndrome nefrótico podría derivarse de la alimentación, y que alimentos como la leche pueden alterar la microbiota intestinal, cambiando el estado normal del organismo y produciendo la enfermedad. Sin embargo, aún no se conoce con claridad el mecanismo, pero se sigue investigando (Uy y col., 2015; de Sousa y col., 1995).

Tratamiento Nutricional del Síndrome Nefrótico

El tratamiento nutricional como parte del tratamiento integral de diversas enfermedades es una parte fundamental para la recuperación y mantenimiento

de la salud de todos los pacientes, sobre todo cuando se tratan de enfermedades renales. También es importante considerar la edad del paciente, ya que existen estudios en niños con enfermedad renal crónica, en los cuales su crecimiento se vio afectado por la enfermedad, y es por esto que se recomienda un tratamiento nutricional adecuado para que se puedan prevenir los daños innecesarios de diferentes enfermedades (Cano, 2003; Santos y Fernández, 2003). Se sabe que las enfermedades renales crónicas pueden modificar el patrón de crecimiento de un niño, dependiendo del tiempo de evolución de la enfermedad, el grado de deterioro de la función renal y la edad en la que inició la enfermedad (Calzada, 1998).

También es necesario que el tratamiento médico y nutricional se lleven a la par, debido a que existen tratamientos como la diálisis peritoneal, en los que el crecimiento de los niños se afecta de una manera más notoria que con la sola enfermedad (Cano, 2003). Además de la diálisis, el tratamiento principal del síndrome nefrótico, que es la administración de prednisona o glucocorticoides, tiene un efecto negativo en el crecimiento y en la densidad ósea en niños que lo reciben, sobre todo en los casos donde se consume más de 0.2 mg/kg/día por períodos largos de tiempo (Ribeiro y col., 2015). Lo anterior se deriva de efectos secundarios del medicamento sobre el metabolismo de la vitamina D, lo que puede causar su deficiencia y provocar daño óseo (Nielsen y col., 2015).

Las recomendaciones para el tratamiento nutricional para el síndrome nefrótico han causado controversia a través de los años, debido a que existen pocos estudios donde se hable específicamente de la alimentación adecuada en esta enfermedad. Las recomendaciones se suelen basar en las que se hacen para la enfermedad renal crónica, debido a que ésta es una de las enfermedades renales más frecuentes.

Anteriormente a los pacientes con síndrome nefrótico y otras enfermedades renales se les recomendaba una dieta hiposódica o baja en sodio, y alta en proteínas (Jureidini y col., 1990). Esto se hacía con el fin de recuperar la proteína

excretada en la orina y estabilizar la hipoalbuminemia. Sin embargo, se encontró que una dieta hiperproteica empeoraba la proteinuria en pacientes con síndrome nefrótico y que producía pérdidas de la función renal, incluso en pacientes sanos (Friedman, 2004).

Al observar que aumentar la proteína no mostraba beneficios en pacientes con síndrome nefrótico, o aquellos que además desarrollaban insuficiencia renal, se comenzaron a recomendar restricciones en el consumo de proteína, incluso en niños (Jureidini y col., 1990). A partir de los años ochenta se empezó a utilizar la restricción de proteínas en la dieta en pacientes con insuficiencia renal crónica. Esta alternativa, comparada a las dietas altas en proteína, mejoraba los síntomas urémicos como la excreción elevada de urea en orina y retrasaba el inicio de la utilización de diálisis peritoneal, por lo que se ha seguido utilizando éste tratamiento nutricional desde entonces (Fraga, 2007).

Las dietas bajas en proteínas también se han utilizado en pacientes pediátricos. Sin embargo, se ha visto que tienen poco efecto en niños con enfermedades renales (Wingen y col., 1997; Chaturvedi y Jones, 2007). Contrariamente en los adultos se han encontrado resultados favorables al utilizar este tipo de dietas (Fouque y Aparicio, 2007; Aparicio y col., 2001; Giordano y col., 2001; Walser y col., 1996).

A partir de esto, existen inclinaciones que recomiendan que los niños con síndrome nefrótico consuman las cantidades normales de proteína para su edad (Wingen y col., 1997; Uauy y col., 1994), así como de otros nutrientes como los lípidos y carbohidratos (AMP, 2000). Esto con el fin de favorecer el crecimiento y desarrollo en estos pacientes, y debido a que esta enfermedad no requiere necesariamente una restricción de proteínas como parte del tratamiento.

El Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencias (IOM, por sus siglas en inglés) en Estados Unidos, publicó en 2005 las recomendaciones de Ingesta Dietética de Referencia (DRI) de los diferentes nutrientes y para todas las edades. Los valores de referencia de consumo de proteínas al día para la

población de niños de 2 a 18 años se encuentran en la Tabla II, en donde se puede observar que la recomendación de consumo de proteína es de alrededor de 1 gramo por kilogramo de peso del paciente al día. La recomendación es que las proteínas sean del 10 al 25% del valor calórico total (IOM, 2005). Sin embargo, se debe dar prioridad a los gramos por kilogramo de peso al día para tener un consumo adecuado a cada paciente.

En cuanto al aporte calórico total de la dieta, es muy importante que del 50 al 70% de las proteínas que consumen los pacientes con síndrome nefrótico sean de alto valor biológico, para lograr un crecimiento adecuado (Valle, 2003). Estas proteínas se encuentran principalmente en los alimentos de origen animal.

Los carbohidratos deben aportar del 45 al 65% del valor calórico total (IOM, 2005). Mientras que en el caso de los lípidos, la recomendación es que estos aporten del 25 al 35 % del valor calórico total (IOM, 2005).

Los niños que padecen una enfermedad renal crónica tienden a presentar desnutrición, por lo que es importante cuidar su consumo calórico, proteico, de sal y adecuar una dieta según su cultura y disponibilidad de alimentos, para evitar complicaciones y permitir un crecimiento sano (Martini, 2005).

Otro de los efectos del síndrome nefrótico es el aumento de colesterol y otros lípidos en sangre. Los niveles sanguíneos de colesterol total y de colesterol-LDL deben ser menores a 200 mg/dL y 130 mg/dL, respectivamente, en niños saludables, pero estos pacientes alcanzan niveles muy altos (Mahan y col., 2009). Normalmente a un paciente con hipercolesterolemia se le harían recomendaciones de cambios de estilo de vida, como realizar actividad física regularmente y hacer cambios en su alimentación, como aumentar el consumo de verduras y frutas, disminuir la ingesta de grasas saturadas y aumentar la fibra de la dieta. Sin embargo, en pacientes con síndrome nefrótico no son suficientes estas recomendaciones para poder regularizar los niveles tan altos de lípidos en sangre, por lo que es necesario incluir al tratamiento ciertos medicamentos como las estatinas.

Tabla II. Valores de referencia de proteínas para niños de 1 a 18 años (IOM, 2005).

Edad (años)	DRI de proteína (g/kg/d)	DRI de proteína (g/d)
1-3	1.05	13
4-8	0.95	19
9-13	0.95	34
14-18	0.85	Niños: 52 Niñas: 46

Abreviaturas: IDR, ingesta dietética de referencia; g/kg/d, gramos de proteína por kilogramo de peso al día; g/d, gramos de proteína al día.

De hecho, existen estudios donde prueban que el tratamiento nutricional por sí sólo no tiene un gran efecto en la mejora de la salud del paciente y que el medicamento sí puede ayudar. Coleman y Watson (1996) realizaron un ensayo donde compararon a un grupo de niños con síndrome nefrótico que consumió simvastatina después de someterse a una dieta modificada en energía. La dieta contenía 35 % de las calorías totales de lípidos, sustitución de grasas saturadas por poliinsaturadas y monoinsaturadas, 10-15 % de las calorías totales de proteínas (1 a 2 g/kg) y 45-50 % de las calorías totales de carbohidratos (utilizando principalmente carbohidratos complejos y disminuyendo azúcares refinados), y no se utilizó sal agregada. Ellos encontraron que el medicamento ayudó a disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos en un 41 % y 44%, respectivamente, después de 6 meses de tratamiento. Mientras que antes de consumir el medicamento y sólo mantenerse con el tratamiento nutricional no se observaron cambios. Al bajar los niveles de colesterol en sangre, este medicamento en conjunto con una dieta adecuada ayudan a aumentar los niveles de albúmina en sangre, que se encuentran anormalmente bajos en el síndrome nefrótico (Coleman y Watson, 1996; Rayner y col., 1996) además de contribuir en la disminución de la proteinuria (Rayner y col., 1996). Sin embargo, aún no es concluyente la información existente en la literatura y se necesitan más ensayos clínicos aleatorizados (Kong y col., 2013).

La energía o calorías de los alimentos también deben de calcularse de manera adecuada, ya que una dieta baja en calorías se relaciona con la disminución del crecimiento. Existen estudios que demuestran que un aporte energético menor del 80 % de la recomendación disminuye el crecimiento hasta en un 34 %. En cambio, si el consumo es excesivo se puede producir obesidad y el retraso del crecimiento no se recupera, por lo que es muy importante que el niño reciba la energía total de los alimentos que le permita llevar todas sus actividades diarias sin afectar su crecimiento (Calzada, 1998).

El sodio es uno de los micronutrientes a cuidar en la alimentación del síndrome nefrótico. En una persona sana la recomendación de sodio es de 1500 mg al día (IOM, 2005), aunque algunas fuentes recomiendan un consumo máximo de 2400 mg al día (Mahan y col., 2009). Sin embargo, en pacientes con síndrome nefrótico, debido a las alteraciones en el agua corporal y la presencia de edema, se tienen que hacer restricciones en el sodio consumido, llevando a cabo una dieta sin sal agregada. Se debe disminuir el consumo de alimentos industrializados o consumir los que sean bajos en sodio (menos de 140 mg por porción), no agregar sal de mesa a los alimentos y cocer los alimentos a consumir (Escott-Stump, 2010; Calleja y col., 2009).

También es muy importante que se lleve a cabo una evaluación nutricional completa del paciente con enfermedad renal, sobre todo si se trata de un niño enfermo, para conocer completamente el estado del paciente y ofrecer un tratamiento adecuado tanto médico como nutricional (Glaser, 2004).

Pérdida de Proteínas por Vía Digestiva en el Síndrome Nefrótico

Hace varios años se hizo la observación que durante la actividad del síndrome nefrótico existen pérdidas de proteínas por el tubo digestivo, aunque no existe suficiente información sobre este tema (Gordillo y col., 2009; Brown, 1985).

Entre los autores que han investigado acerca de la pérdida de proteína en heces en pacientes con síndrome nefrótico, están Jensen y sus colaboradores (1966), quienes argumentaron que la pérdida de proteína urinaria no era suficiente para explicar los niveles bajos de albúmina en sangre. Ellos midieron los niveles de proteína excretada al administrar proteína marcada (⁵¹Cr-albúmina) por vía intravenosa, y la midieron en muestras de heces de varios días después. Encontraron que 4 de los 11 pacientes con síndrome nefrótico medidos mostraron una cantidad elevada de proteínas.

Un experimento muy similar fue llevado a cabo por Schultze y colaboradores (1980), quienes utilizaron el mismo método de detección de proteínas, al

administrar ^{51}Cr -albúmina a un grupo de pacientes enfermos con síndrome nefrótico y a un grupo control sano. En los pacientes con síndrome nefrótico los niveles de proteína digestiva excretada fueron mayores a los del grupo control. Estos investigadores también dieron a sus pacientes una cantidad medida de albúmina marcada por vía intravenosa y midieron la excreción de proteínas en heces durante los días siguientes. Los resultados mostraron que los pacientes del grupo control excretaron solo el 0.2 % de la dosis ingerida, mientras que los pacientes con síndrome nefrótico tuvieron una excreción de 2.0 %, con lo que comprobaron que estos pacientes tuvieron una excreción de proteínas mayor por vía intestinal que los pacientes sanos.

En niños se han generado pocos estudios en relación a este particular, uno de ellos fue hecho en 1969 donde se les dio albúmina marcada con yodo a niños con síndrome nefrótico. En los resultados observaron que estos pacientes presentan un hipercatabolismo de albúmina y un ligero aumento en la pérdida gastrointestinal de proteínas ya que 4 de los 7 pacientes del estudio tuvieron este problema (Yssing y col., 1969).

Existen otros estudios que hablan del análisis de la excreción de proteínas en síndrome nefrótico, pero están enfocados en analizar las proteínas excretadas en orina por medio del uso de la técnica de electroforesis con geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Suhail y col., 2011), para determinar las proteínas de bajo, medio y alto peso molecular. En niños con síndrome nefrótico, así como en otras enfermedades renales, se han encontrado patrones característicos de proteínas en geles de poliacrilamida cuando la enfermedad está activa. Proteínas como albúmina, IgG y transferrina se han detectado en muestras de orina, por lo que se ha propuesto a la electroforesis como método diagnóstico o diferencial de pacientes con la enfermedad activa o en remisión (Brocklebank y col., 1991). Sin embargo, existen pocas referencias que hablan sobre el análisis electroforéticos de proteínas en heces, una de estas referencias analizan proteínas en pacientes con cáncer colorectal (Dubrow y Yannielli, 1992). En este estudio encontraron

patrones con proteínas como la albúmina y la hemoglobina, comparados con pacientes sanos, pero en pacientes con síndrome nefrótico en quienes existe una mayor excreción de proteínas no hay información.

Justificación

Debido a que los pacientes pediátricos con síndrome nefrótico presentan una pérdida de proteína por vía digestiva en heces y no existe información reciente acerca del tema en esta población, ni su relación con la dieta consumida. El presente estudio se llevó a cabo para conocer el efecto de diferentes dietas en niños con síndrome nefrótico en la pérdida proteica por vía intestinal. La importancia de este trabajo radica en poder hacer los ajustes dietarios para ofrecer el tratamiento nutricional más adecuado que mejore el estado de salud de estos niños.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de Estudio

El presente estudio se trata de un estudio cuasi-experimental, debido a la falta de aleatorización de los sujetos. El muestreo fue por conveniencia.

Sujetos de Estudio

En este estudio se incluyeron a pacientes pediátricos con el diagnóstico de síndrome nefrótico que asistieron por primera vez o a cita de control a la especialidad de Nefrología Pediátrica en el Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) de la ciudad de Hermosillo, Sonora y que manifestaron recaídas. También aquellos pacientes que fueron diagnosticados y hospitalizados en el área de Medicina Interna o Urgencias del hospital. Las edades de los pacientes fueron de los 2 a los 18 años. También se incluyó en el estudio un grupo control de niños sanos pareados por edad a los pacientes enfermos. La inclusión de los pacientes se llevó a cabo en el período comprendido de febrero de 2014 a mayo de 2015.

Criterios de Inclusión

Se incluyeron a niños de 2 a 18 años con diagnóstico de síndrome nefrótico, que asistieron a la consulta externa de especialidad de nefrología pediátrica. También niños diagnosticados que tuvieron una estancia de hospitalización de varios días.

Criterios de Exclusión

Se excluyeron de la muestra a aquellos pacientes que padecían alguna otra enfermedad que afectara el proceso digestivo y pudiera alterar los resultados (como diarrea) o que la enfermedad fuera secundaria a otra (como lupus eritematoso sistémico o nefropatía diabética).

Criterios de Eliminación

Se eliminaron a aquellos niños que no siguieron la dieta establecida o que no proporcionaron las muestras biológicas de manera suficiente para su análisis.

Consideraciones Bioéticas

Antes de iniciar el estudio se solicitó la aprobación del comité de ética e investigación de las instituciones involucradas. El Comité de Ética del Hospital Infantil del Estado Sonora, aceptó la realización del proyecto en sus instalaciones con el número de registro 048/2013; mientras que la Comisión de Bioética e Investigación del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora, consideró el proyecto como de “riesgo mínimo” y se permitió su ejecución (Clave: DMCS/CBIDMCS/D-45).

Los padres o tutores de los sujetos de estudio debieron firmar un formato de consentimiento informado (APÉNDICE 1) donde se les explicó el motivo y el procedimiento del estudio. Los sujetos mayores de 7 años (asumiendo que podían leer a esta edad) también firmaron un asentimiento (APÉNDICE 2).

Los voluntarios que decidieron participar en el estudio no recibieron apoyo económico. Sin embargo, a partir de los resultados se les brindaron recomendaciones que podían practicar en sus hogares para mejorar sus condiciones de salud.

Como garantía de privacidad, a cada participante se le dio una clave numérica. Esto con el fin de evitar utilizar sus datos personales, como el nombre, los cuáles fueron solo de conocimiento del grupo de investigación y permanecerán guardados en estricta confidencialidad.

Tratamiento Nutricional

El tratamiento nutricional se basó en la utilización de tres tipos de dietas, las cuales se ajustaron al gasto energético del paciente, peso ideal y edad. La

asignación de la dieta fue de manera secuencial y con un orden predefinido, de acuerdo a la llegada del paciente. Este plan alimenticio se siguió en los hogares de los pacientes quienes realizaron un registro diario de los alimentos consumidos (en los casos en los que no se apegaron totalmente al plan alimenticio asignado).

Las dietas administradas fueron las siguientes (asignadas en este orden): dieta hiposódica, con valores normales de proteínas, lípidos e hidratos de carbono; dieta hiposódica e hiperproteica; y dieta hiposódica e hipoproteica.

Las cantidades de proteínas se basaron en las recomendaciones del Instituto de Medicina (IOM, 2005) que se encuentran en la Tabla II y se ajustaron en este estudio de la siguiente manera: La dieta con valores normales de proteína se calculó con 1 g de proteína/kg de peso del paciente al día (entre 1.0 y 1.4 g/kg/día). La dieta hiperproteica contuvo entre 1.8 y 2.0 g/kg/día, mientras que la dieta hipoproteica presentó menos de 1.0 g/kg/día. Debido a la probable presencia de edema, se decidió utilizar el peso ideal para la edad de los pacientes para evitar errores en el cálculo. Este peso ideal fue obtenido de las tablas de referencia de crecimiento de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2006). Una vez obtenido el peso ideal se pudo calcular las kilocalorías adecuadas que cada paciente debía consumir al día, esto con las ecuaciones para niños de 1 a 18 años proporcionadas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO-OMS, 2004). Dichas ecuaciones se muestran a continuación, donde el peso fue expresado en kilogramos, y como se mencionó anteriormente se utilizó el peso ideal para la edad de cada paciente:

Gasto energético total (GET) para niños:

$$\text{GET (kcal/día)} = 310.2 + 63.3 * \text{peso} - 0.263 * \text{peso}^2$$

Gasto energético total (GET) para niñas:

$$\text{GET (kcal/día)} = 263.4 + 65.3 * \text{peso} - 0.454 * \text{peso}^2$$

Una vez calculada la recomendación diaria de proteínas y kilocalorías, se procedió a realizar un plan alimenticio individualizado de 5 días para cada paciente. Las porciones de los alimentos seleccionados se calcularon con ayuda del Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes (Pérez y col., 2014). Cada plan alimenticio fue otorgado a cada paciente y se siguió en sus hogares, y para asegurar su cumplimiento, se les pidió a los padres o a los mismos niños que registraran diariamente todos los alimentos consumidos. En el APÉNDICE 3 se presenta un ejemplo de uno de los planes alimenticios otorgados a los pacientes. Los niños del grupo control no tuvieron un tratamiento nutricional, y sólo se hizo un recordatorio de 24 horas del día que proporcionaron la muestra de heces.

Historia Clínica de los Pacientes

Para poder contar con una historia clínica completa se revisaron los expedientes clínicos de todos los pacientes. Se revisaron los exámenes de laboratorio, tanto de orina como de sangre, con los que contaba cada paciente y que eran solicitados por los médicos como medio de monitorización. Estos análisis clínicos incluyeron biometría hemática completa, examen general de orina, albúmina en orina de 24 horas, colesterol, triglicéridos, albúmina sérica, sodio y potasio séricos. Los estudios se realizaron en el laboratorio clínico del hospital o en algunos casos, en laboratorios particulares. Por razones ajenas al control de estudio, algunos pacientes no tuvieron algunos exámenes de laboratorio, lo cual no afectó el diagnóstico ni el desarrollo del protocolo.

Para obtener datos adicionales, se entrevistaron a los padres o tutores sobre los antecedentes alimenticios de los pacientes, así como sobre la evolución de la enfermedad con el fin de complementar los datos disponibles en el expediente clínico. Además, se realizó una evaluación nutricional básica de los pacientes que incluyó la medición del peso y talla.

Determinación de Proteínas Excretadas en Heces

Reactivos

Todos los reactivos que se utilizaron para el desarrollo de los experimentos de esta tesis fueron de acuerdo a las necesidades de los experimentos. Los reactivos necesarios para la SDS-PAGE fueron de Sigma-Aldrich (USA) y los equipos de Bio-Rad (California, USA). Los reactivos que se utilizaron para la medición de la concentración de proteínas fueron de Thermo Scientific (Illinois, USA). Los anticuerpos para la inmunodetección de proteínas fueron de Dako (Denmark) y el kit para detectar IgA de Immunology Consultants Laboratory, Inc. (Oregon, USA).

Manejo de Muestras

A cada niño del estudio se les pidieron dos muestras de heces: una de ellas fue antes del tratamiento nutricional y la otra después, excepto a los niños del grupo control quienes sólo proporcionaron una muestra. Cada muestra fue almacenada en congelación a -80°C hasta su análisis.

Extracción de Proteínas

Las proteínas se extrajeron de las muestras de heces de los niños con síndrome nefrótico y sanos. El método de extracción de proteínas de las heces incluyó inhibidores de proteasas (Oleksiewicz, 2004) y se realizó de acuerdo al método de Iwagaki y col. (2002).

De cada muestra se tomó una media de 0.1689 g (desde 0.0354 g a 0.2630 g) del recipiente original a tubos eppendorf. A cada tubo se le agregaron 500 µl de buffer de extracción que contenía 500 mM de la mezcla de Fosfato de potasio 100 mM a pH 7.5, 0.5 µl de Tween 20 (es decir, 0.1 %) como detergente y 5 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) como inhibidor de proteasas (Iwagaki y col. 2002). Después de homogenizar, se dejó reposar por 15 minutos y se

centrifugó a 13000 g en una centrífuga Eppendorf 5417C (Hamburg, Germany). Al terminar de centrifugar se separó el sobrenadante (Figura 1) y se almacenó en congelación hasta su análisis. El precipitado se desechó.

Determinación de la Concentración de Proteínas

Se determinó la concentración de proteínas por el método del Ácido Bicinconínico (Smith y col., 1985). Este método colorimétrico determina la concentración de proteína solubilizada gracias a que el reactivo es sensible y muy específico para iones cuprosos (Cu^{1+}) que se forman entre el ion cúprico (Cu^{2+}), que se agrega para la reacción, y las proteínas de la muestra produciendo un color morado. El color generado depende de la concentración de proteínas, y se lee a 562 nm, y por medio de la realización de una curva de concentración estándar se determina la concentración de proteína en la muestra.

En este caso se siguieron las indicaciones del fabricante de los reactivos (Thermo Scientific) para microplacas de 96 pozos. Se utilizaron 25 μl de la extracción de proteínas de la muestra o de estándar, que en este estudio fue albúmina de suero bovino (BSA, Bio-Rad; California, USA). La albúmina se diluyó a diferentes concentraciones desde 1 mg/ml hasta 0.2 mg/ml. Se hicieron 5 diluciones para crear la curva estándar: 1, 0.8, 0.6, 0.4 y 0.2 mg/ml. Además de la muestra o el estándar, en cada pozo se agregaron 200 μl del reactivo activo que se preparó justo antes de utilizarse con los reactivos proporcionados en el kit. Se calculó el volumen total requerido para todos los pozos y se mezclaron 50 partes del reactivo A con 1 parte del reactivo B. Cada muestra o estándar se cargó por triplicado en la placa y se registró los pozos pertenecientes a cada muestra. Después de cargar los pozos, se incubaron las placas a 37 °C durante 30 minutos. Después de incubar y dejar enfriar las placas, se leyeron en un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) a una longitud de onda de 562 nm, como se mencionó antes (Figura 2).



Figura 1. Muestra de heces con buffer de extracción de proteínas después de centrifugar y antes de separar el sobrenadante.

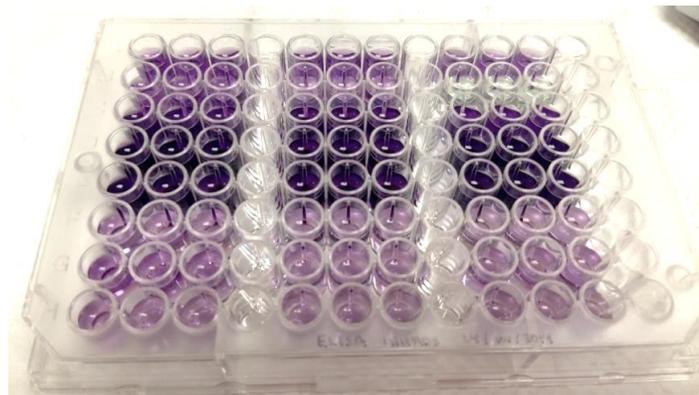


Figura 2. Microplaca después de la medición de la concentración de proteínas con el método del ácido bicinconínico.

Cuando se obtuvieron los resultados de absorbancia se realizó la curva estándar en el programa Microsoft Excel 2013 (versión 15.0.4420.1017), cuya ecuación se utilizó para poder calcular la concentración de proteínas de las muestras de este estudio. Sustituyendo en la ecuación con los datos obtenidos del espectrofotómetro se calculó la concentración de proteínas de las muestras y se obtuvo un promedio de ellas.

Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes

El tipo de proteínas de las muestras se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). La electroforesis se llevó a cabo basada en el método de Laemmli (1970). Se prepararon geles de poliacrilamida al 15 % con 10 pozos, que se colocaron en una cámara para electroforesis Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, California, USA). En cada pozo se cargó una muestra diferente y en el primero siempre se cargó un marcador de peso molecular de amplio espectro Bio-Rad, que indica proteínas desde los 200 hasta 6.5 kDa. De cada muestra se utilizaron 40 µg para cada pozo, y al volumen correspondiente a esos microgramos se les agregó buffer muestra en una proporción 1:3, es decir 1 parte de muestra y 3 de buffer, que se preparó con azul de bromofenol. En algunas ocasiones, las proteínas tenían que precipitarse para que el volumen no rebasara los 20 µl que caben en un pozo del gel, y para esto se utilizó el método PCK para precipitación orgánica de muestras para SDS-PAGE (Wessel y Flügge, 1984).

Antes de cargar la muestra, se calentó a 95 °C por 5 minutos, se dejó enfriar y con ayuda de una pipeta electrónica se colocó en los pozos (Figura 3). La cámara se conectó a una fuente de poder que se mantuvo entre 15-20 miliamperes para 1-2 geles.

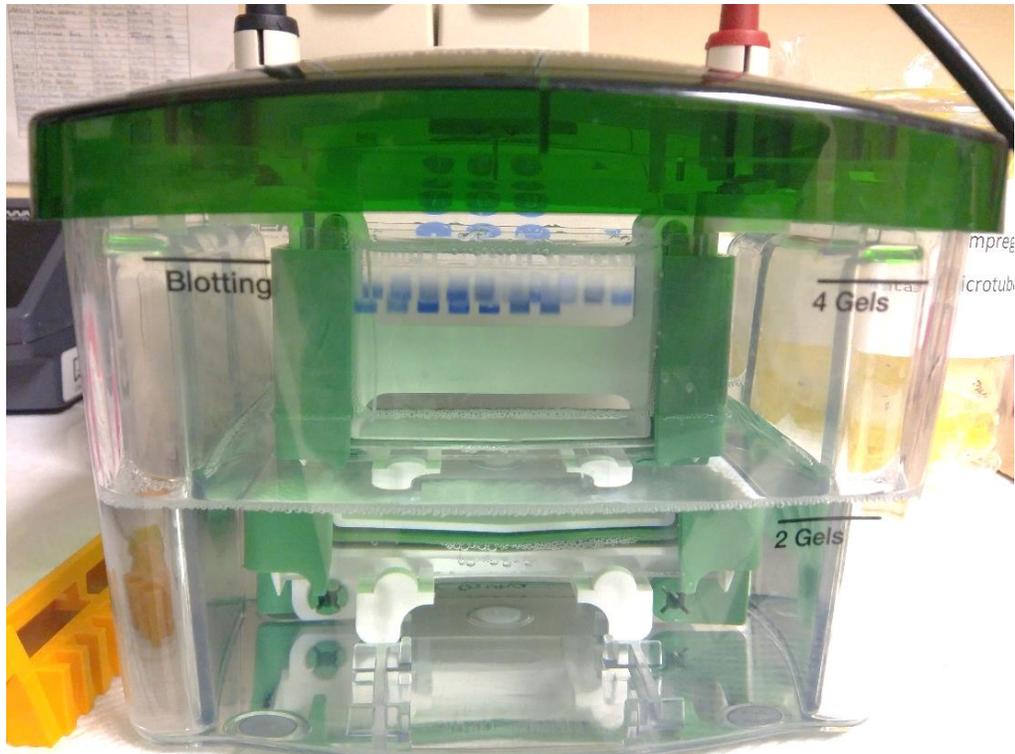


Figura 3. Cámara de electroforesis con geles de poliacrilamida al inicio de la corrida. Se pueden ver las muestras cargadas en los pozos del gel de poliacrilamida.

Tinción de los Geles con Colorante Azul de Coomassie

Una vez que el frente de corrida salió del gel se detuvo la fuente de poder y el gel se colocó en un recipiente para teñirse con el colorante Azul de Coomassie. Posteriormente se agregó una solución desteñidora hasta el momento de poder digitalizar la imagen del gel en un fotodocumentador Gel Doc EZ System (Bio-Rad, California, USA).

La digestión de proteínas en el tracto digestivo no afectó la interpretación de resultados, ya que se quería ver qué proteínas estaban presentes en las heces de los pacientes. Además de que se tuvieron datos previos al tratamiento nutricional para comparación.

Una vez obtenidos las imágenes de los geles, se compararon los perfiles de proteínas para observar si existían diferencias entre las muestras de los pacientes y entre el antes y después del tratamiento nutricional, así como en los pacientes sanos.

Doble Inmunodifusión Radial (Método Ouchterlony)

Para poder identificar claramente qué tipos de proteínas se encontraban en las muestras, se realizó el método de doble inmunodifusión radial (Calderón de la Barca, 1996). Con éste método se pudieron detectar proteínas específicas de una mezcla utilizando un anticuerpo. En una placa de agarosa al 1 % se hicieron pequeños pozos, uno en el centro y cinco alrededor de éste. En el pozo central se colocaron 5 µl de anticuerpo, que en este estudio se utilizaron anticuerpos de conejo anti-albúmina humana, anti-IgG humana, anti-IgA humana y anti-proteínas del suero total humano (Dako, Denmark). En los pozos de alrededor se colocaron 5 µl de diferentes muestras de las proteínas extraídas de las heces y se colocaron las placas con los geles en cámaras húmedas durante 12-18 horas para que los anticuerpos y las muestras migraran por difusión. Al encontrarse el anticuerpo y la proteína formaron un precipitado que ya no siguió migrando.

Después de la migración se secó el gel con papel filtro y papel absorbente, también se lavó varias veces con agua destilada y finalmente se secó con aire caliente para eliminar residuos de proteínas o de las muestras que no se precipitaron. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie para observar mejor la precipitación de los complejos proteína-anticuerpo.

Inmunoelectroforesis Cruzada con Dos Antígenos

Después de identificar que las muestras de heces contenían proteínas del suero humano gracias a la doble inmudifusión radial con el anticuerpo anti-proteínas del suero total humano, se decidió hacer una inmunoelectroforesis cruzada con dos antígenos para verificar cuáles proteínas estaban presentes en las muestras y compararlas entre ellas. En este caso sólo se utilizaron las muestras de los pacientes con síndrome nefrótico antes y después del tratamiento nutricional.

Este método analiza la relación inmunológica entre dos antígenos, y se le llama electroforesis cruzada con dos antígenos porque los dos antígenos se comparan al someterse a electroforesis en un gel de agarosa, para después cambiar el gel por uno con anticuerpos mezclados y dejar que reaccione la muestra (Calderón, 1996).

En la primera dimensión se preparó un gel de agarosa al 1 % al que se le hicieron 2 pozos por muestra, donde se cargaron las muestras de los pacientes antes y después de la intervención y se hizo un pozo más donde se agregó un marcador con azul de bromofenol. Una vez cargados los pozos se colocó el gel en una placa de una cámara de electroforesis Bio-phoresis Horizontal electrophoresis cell (Bio-Rad, California, USA) donde corrieron las muestras con una corriente de 200 volts por aproximadamente 40 minutos hasta que el marcador avanzó aproximadamente 4 centímetros. Después de la electroforesis de la primera dimensión se recortó el gel para que cada una de las muestras estuviera en un gel diferente para poder seguir con la siguiente dimensión. Después de recortar el gel se completó con agarosa al 1 % para formar un gel de

aproximadamente 5 cm x 5 cm. A la agarosa se le agregaron 125 μ L de Anticuerpo de conejo anti-proteínas de suero total y se volvió a colocar en la cámara de electroforesis, ahora por 16 horas con una corriente de 50 volts. Después de la electroforesis se lavaron y se secaron los geles y se tiñeron con Azul de Coomassie.

Electrotransferencia e Inmunodetección

Para llevar a cabo éste método, fue necesario preparar geles de poliacrilamida y llevar a cabo la electroforesis de la misma manera descrita anteriormente. El marcador de peso molecular utilizado para éste método fue el Kaleidoscope (Bio-Rad, California, USA). Además, al buffer muestra se le agregó Pironina Y, para que los carriles se marcaran en el gel y en la membrana y fuera más sencillo su manejo. Este método se utilizó para identificar, con ayuda de anticuerpos, las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida electrotransferidos a una membrana de nitrocelulosa (Calderón, 1996). Los geles se transfirieron en una cámara para electrotransferencia Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, California, Estados Unidos). El gel y la membrana de nitrocelulosa humedecida se colocaron entre papel absorbente o papel filtro también humedecido en buffer de transferencia (preparado con glicina, Tris y etanol) cuidando que no quedaran burbujas de aire. Luego se colocó entre las placas metálicas del Trans-Blot que conducen la electricidad de una fuente de poder a 15 voltios por 25 minutos a las muestras biológicas en la electrotransferencia. Posteriormente, las membranas se cambiaron a un recipiente donde se les agregó buffer de bloqueo (Tris, NaCl, NaN_3 y Tween 20 al 2 %) por 2 minutos para detener la transferencia.

En el caso de la detección de albúmina, el buffer de bloqueo se cambió por buffer de incubación (contiene lo mismo que el buffer de bloqueo con Tween 20 al 0.05%) con el cual se hicieron lavados para después agregar el anticuerpo de conejo Anti-albúmina humana marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (Dako,

Denmark) 1:1000 durante toda la noche en refrigeración a 4 °C. Después de la incubación, se volvieron a lavar las membranas y se incubaron por segunda vez con buffer de incubación pero esta vez con Anticuerpos de carnero anti-inmunoglobulinas de conejo-HRP 1:2000 (Dako, Denmark). Dos horas después se realizaron tres lavados más y se agregó una solución cromogénica de peroxidasa (diaminobencidina o DAB, buffer salino de Tris o TBS y H₂O₂) y se agitó hasta que apareció color en la membrana, hasta entonces se detuvo la reacción con agua.

En la detección de IgA se siguieron prácticamente los mismos pasos, sólo que después de hacer la transferencia y bloquear la membrana se quedó incubando solamente con buffer de incubación durante dos días. Después se realizaron varios lavados y se agregó el buffer de incubación con el anticuerpo de conejo anti-inmuglobulina A humana-HRP (Dako, Denmark) en una proporción 1:2000 durante dos horas. Al terminar la incubación se hicieron lavados y también se agregó la solución cromogénica de peroxidasa. Las membranas se dejaron secar y se observaron las inmunodetecciones.

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA)

Una vez identificadas las proteínas en las muestras, se realizó la cuantificación de los antígenos presentes en ellas por medio del método de Ensayo Inmunoabsorbente ligado a Enzima, mejor conocido como ELISA por sus siglas en inglés (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Con esta técnica se obtuvieron datos para cuantificar la concentración de las proteínas en las muestras de heces.

El principio del ELISA consiste en inmovilizar los antígenos de la muestra en la superficie de los pozos de la placa de plástico, y se les agregan compuestos conjugados con una enzima que reacciona con el sustrato y se produce un color proporcional a la concentración del antígeno (Calderón, 1996).

En este estudio se utilizó este método para cuantificar albúmina e IgA en las muestras. En el caso de la albúmina, se siguió el método descrito por Calderón de la Barca (1996), mientras que para IgA se utilizó un kit comercial (Immunology Consultants Laboratory, Inc., Oregon, USA).

Para la cuantificación de albúmina se diluyó la muestra 1:3000 utilizando buffer cubierta (buffer de carbonato, pH 9.6) y el estándar 1:1600 (Protein electrophoresis control, Sigma Diagnostics, Missouri, USA) y se cargaron 200 μ L de estas diluciones en las primeras líneas de la placa para después hacer diluciones seriadas en el resto de ella. Cada dilución se colocó por duplicado. Se cubrieron las placas y se almacenaron en refrigeración (4 °C) durante toda la noche. Al día siguiente, se lavaron las placas con buffer de lavado y dilución (Tris-HCl, Tween 20, Rojo de fenol y Azida de sodio, pH 7.4) en cuatro ocasiones, para después agregar 200 μ L de buffer de bloqueo (buffer de lavado con Gelatina de piel de pescado de agua fría al 45 %) en cada pozo por una hora y después se volvió a lavar. Al terminar los lavados se agregaron 100 μ L de solución con anticuerpos Anti-Albúmina humana (Dako, Denmark) diluida 1:5000 y se dejó agitando por dos horas. Se volvió a lavar la placa y se agregó un segundo anticuerpo, que fue un Anticuerpo de carnero anti-inmunoglobulinas de conejo 1:2000 (Dako, Denmark), y se agitó cubierto por 60 minutos. Se lavó de nuevo la placa y se agregaron 100 μ L del desarrollador o sustrato, que en este caso fue tetrametilbenzidina o TMB y H₂O₂ y se agitó hasta que se desarrolló el color azul. Cuando se observó el color en la mayoría de los pozos se agregaron 100 μ L de ácido sulfúrico en cada pozo para detener la reacción. Al terminar el proceso, se leyó la placa a 450 nm en un lector de microplacas Bio-Rad Modelo 510 (California, USA). Al obtener las absorbancias de los estándares se hizo una curva que se utilizó para calcular la concentración de albúmina de las muestras.

En la cuantificación de IgA se realizó básicamente el mismo procedimiento que en la albúmina, con la diferencia de que los anticuerpos y buffers fueron los otorgados por el kit Human IgA ELISA de Immunology Consultants Laboratory,

Inc. (Oregon, USA). Aquí también se obtuvieron las concentraciones de la inmunoglobulina por medio de una curva estándar.

Determinación de Humedad de las Muestras de Heces

Debido a las diferencias de consistencia y humedad de las muestras de heces de los sujetos del estudio, se decidió determinar el porcentaje de humedad de las muestras y así poder calcular una mejor concentración de proteínas con el peso seco de estas.

Para iniciar se pusieron a peso constante varios platos de aluminio, donde se pesaron las muestras. Los platos se pusieron en una estufa de secado a 100 °C por una hora y después se pasaron a un desecador a temperatura ambiente. Se mantuvieron en el desecador hasta que se les agregó la muestra.

Con el uso de pinzas se tomó un plato a la vez para pesarlo en una balanza analítica. Una vez registrado el peso del plato solo, se agregó aproximadamente 500 mg de la muestra de heces (cada muestra fue pesada por duplicado) y se registró el peso. Después de pesar la muestra se volvieron a poner los platos de aluminio en la estufa de secado a 100 °C por 8 horas. Después se volvieron a pasar a un desecador hasta que alcanzaron la temperatura ambiente y se registró el peso del plato con la muestra en seco.

Para calcular el porcentaje de humedad se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(\text{Peso del plato+muestra}) - (\text{Peso seco})}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Prueba de Sangre Oculta en Heces

Debido a que los valores de albúmina en las diferentes detecciones estuvieron fuera de rangos, se realizó una prueba de sangre oculta en heces para descartar que este fuera la razón de esos datos. La prueba se hizo con el kit comercial Hema Screen (Stanbio Laboratory, Texas, USA) y consistió en colocar la muestra

en una tarjeta que contenía guaiaco. Este componente contiene compuestos fenólicos que al ser oxidados, en este caso por componentes de la hemoglobina de la sangre, producen una coloración azul. Por lo que si la tarjeta de papel con guaiaco cambiaba a color azul indicaba un resultado positivo de sangre en heces.

Manejo y Análisis de Datos

Los datos de los pacientes fueron registrados en bases de datos, así como en bitácoras. Algunos análisis estadísticos y la elaboración de curvas estándar se realizaron en el programa Microsoft Excel 2013 (versión 15.0.4420.1017).

Después de determinar la normalidad de los datos se calcularon medias, medianas, desviaciones estándar como estadística descriptiva, también se calcularon diferencias entre grupos utilizando pruebas de t para muestras correlacionadas paramétricas o la prueba Wilcoxon para muestras correlacionadas no paramétricas, así como la prueba de Friedman para diferencias de dos o más grupos. Todo esto se hizo con ayuda del programa estadístico IBM SPSS Statistics (Versión 21.0.0.0).

Financiamiento

El financiamiento fue colaborativo entre Universidad de Sonora - Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) – Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). El costo fue incluido en la atención regular de pacientes con síndrome nefrótico en el HIES. Los materiales para la determinación de proteínas estuvo a cargo del CIAD dentro del programa de colaboración interinstitucional.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de los Sujetos

Durante el lapso de tiempo se captaron a 11 pacientes con síndrome nefrótico; sin embargo, por no cumplir con todos los criterios sólo 5 pacientes se quedaron en el estudio. Las principales razones de exclusión fueron la falta de interés de los padres, no seguir el tratamiento nutricional, la remisión de la enfermedad o la falta de entrega de muestras de heces. El número de pacientes coincide con las estadísticas presentadas en el HIES, donde en promedio se presentan 9 pacientes con síndrome nefrótico al año (García y col., 2014). Las características generales de los pacientes se muestran en la Tabla III.

Todos los pacientes estaban con la enfermedad activa cuando entraron al estudio, presentando proteinuria. El paciente 2 era de recién diagnóstico y el resto se invitó en la consulta de control.

La mediana de la edad de los pacientes fue de 10 años, con un rango de los 2 a los 17 años (Tabla III). 3 de los 5 pacientes (60 %) fueron mayores de 10 años, cuando la bibliografía dice que el 80 % de los pacientes pediátricos con síndrome nefrótico tiene entre 2 y 10 años (Davin y Rutjes, 2011). Por lo que esta población fue mayor de lo esperado. Sólo 2 de los 5 pacientes fueron del sexo masculino, siendo el sexo femenino el más común, contrario a lo expresado por la Academia Mexicana de Pediatría, que dice que es más frecuente en varones (en una relación 1:1.5) (AMP, 2000).

Todos los pacientes contaron con biopsia renal para especificar el origen de la enfermedad. 2 de los 5 pacientes (40 %) tuvo un diagnóstico de glomerulonefritis membranoproliferativa, 1 (20%) presentó enfermedad de cambios mínimos y los 2 pacientes restantes (40 %) presentó glomeruloesclerosis focal y segmentaria. En esta ocasión, la población de este estudio no se apegó a lo visto en la literatura, ya que la causa más común de síndrome nefrótico en niños es la enfermedad de cambios mínimos con un 65 %

Tabla III. Características generales de los pacientes con síndrome nefrótico del estudio.

	Edad (años)	Sexo	Diagnóstico	Peso (kg)	Talla (m)	Tratamiento nutricional
1	13	M	SN con GNMP	76.0	1.56	Hipoproteica
2	2	F	SN con ECM	12.5	0.86	Hipoproteica
3	17	M	SN con GEFS	60.3	1.75	Normal
4	10	F	SN con GEFS	44.0	1.31	Hiperproteica
5	5	F	SN con GNMP	23.9	1.10	Normal

Datos obtenidos de los expedientes clínicos de los pacientes. La asignación del tratamiento nutricional fue de manera secuencial. *Abreviaturas:* M, masculino; F, femenino; SN, síndrome nefrótico; GNMP, glomerulonefritis membranoproliferativa; ECM, enfermedad de cambios mínimos; GEFS, glomeruloesclerosis focal y segmentaria.

de la prevalencia. Mientras que la glomerulonefritis membranoproliferativa y la glomeruloesclerosis focal y segmentaria, normalmente tienen una prevalencia del 10 % cada una (Kumar y col., 2004), pero en esta pequeña población las enfermedades menos frecuentes fueron la más comunes. En otros estudios ya se había descrito que la prevalencia de las otras variedades de síndrome nefrótico han ido en aumento (Eddy y Symons, 2003), y que están asociadas a diversos virus como el VIH, hepatitis, parvovirus 19, entre otros.

Los pacientes 3, 4 y 5 presentaron la variedad de síndrome nefrótico que es resistente al tratamiento principal, llamado corticorresistente, por lo que se confirma que los pacientes hispanos tienen una tendencia a desarrollar esta resistencia al tratamiento (Eddy y Symons, 2003), ya que normalmente el 85 % de los pacientes responden al tratamiento de prednisona (AMP, 2000).

El tratamiento que recibió cada paciente fue dependiendo de la respuesta al tratamiento. El paciente 1 y 3 estaban recibiendo prednisona cuando entraron al estudio. El paciente 2, al ser de recién diagnóstico, sólo se medicó con cefuroxima (antibiótico) durante los días que siguió la dieta especial, después comenzó a recibir prednisona. El paciente 4 tenía tratamiento triple con deflazacort, micofenolato y ciclosporina, y, el paciente 5, prednisona y ciclosporina mientras siguió la dieta especial.

En cuanto al estado nutricional de los pacientes, se optó por omitir el análisis del peso e índice de masa corporal debido a que no se pudo obtener el peso seco exacto de los pacientes (peso sin edema), sólo se presenta el peso y la talla de los pacientes en la Tabla III. La talla o estatura de los cinco pacientes se encontró entre los valores normales de crecimiento según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2006). Estos pacientes no presentaron un retraso en el crecimiento como generalmente les sucede a los pacientes con enfermedades renales (Cano, 2003; Santos y Fernández, 2003; Calzada, 1998), aun cuando algunos pacientes tenían años con la enfermedad. El grupo control fue conformado por 5 pacientes sanos con la misma edad del grupo de pacientes con síndrome nefrótico.

En la Tabla IV, se presentan los datos generales obtenidos antes de la intervención nutricional. Todos los pacientes presentaron proteinuria, al tener como mínimo 25 mg/dL de proteínas cuando el resultado normal debió haber sido negativo. Sin embargo, los valores de albúmina en orina de 24 horas no se encontraba en rangos nefróticos (> 3.5 g/día). Los pacientes 2 y 5 presentaron también hipercolesterolemia e hipoalbuminemia, características generales de la enfermedad. Estos dos pacientes fueron los más pequeños de la muestra, y el paciente 2 era de recién diagnóstico.

Los pacientes 3, 4 y 5 que presentaron hematuria o sangre en orina en sus exámenes de orina fueron los mismos pacientes que presentaron resistencia al tratamiento, por lo que esta resistencia pudo haber causado mayor daño renal y provocar el paso de sangre a la orina. Los niveles de glucosa, electrolitos y hemoglobina fueron normales en todos los pacientes.

Tratamiento Nutricional

Debido a que la mayoría de los pacientes fueron invitados al estudio durante la consulta externa de control o poco antes de darse de alta del área hospitalaria, todos los pacientes siguieron el plan alimenticio en sus hogares. La duración fue desde los 3 hasta los 5 días, siendo este último el más frecuente en 3 de los pacientes. Todos estuvieron en constante monitoreo y entregaron el diario de alimentos al terminar el tratamiento, donde se pudieron observar pocos cambios al plan original recomendado.

En la Tabla V se pueden observar los datos generales de los planes alimenticios otorgados a los pacientes. La energía y macronutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos) se calcularon utilizando el Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes (Pérez Lizaur y col., 2014), y siguiendo las

Tabla IV. Análisis bioquímicos realizados a los pacientes con síndrome nefrótico antes de realizar la intervención nutricional del estudio.

Análisis Clínico / Paciente	1	2	3	4	5
Proteínas en orina (mg/dL)	150 *	500 *	25 *	75 *	150 *
Sangre en orina (Ery/μL)	NEG	NEG	25 *	10 *	50 *
Albúmina en orina de 24 horas (g/24h)	ND	0.9 *	0.2 *	0.1	1.2 *
Colesterol (mg/dL)	160	434 *	ND	ND	210 *
Colesterol HDL (md/dL)	70	43 **	ND	ND	68
Colesterol LDL (mg/dL)	81	310 *	ND	ND	139 *
Triglicéridos (mg/dL)	147	485 *	ND	ND	93
Albúmina sérica (g/dL)	ND	1.3 **	ND	ND	3.3 **
Glucosa (mg/dL)	82	90	ND	ND	89
Urea (mg/dL)	12 **	19	ND	ND	16
Creatinina (mg/dL)	0.3 **	0.1 **	ND	0.3 **	0.2 **
Leucocitos ($10^3/\mu$L)	13.9 *	14.6 *	6.7	12.3 *	16.5 *
Eritrocitos ($10^6/\mu$L)	4.7	5.3	5.2	4.8	5.2
Hemoglobina (g/dL)	12.5	14.3	15.3	14.1	13.8
Sodio (mEq/L)	137	136	ND	ND	140
Potasio (mEq/L)	4.1	4.8	ND	ND	4.1
Cloro (mEq/L)	101	110	ND	ND	109

Datos obtenidos de los expedientes clínicos de los pacientes. * valores elevados respecto a los valores normales; ** valores bajos respecto a los valores normales. *Abreviaturas:* ND, valor no disponible.

Tabla V. Datos generales del tratamiento nutricional de los pacientes con síndrome nefrótico.

	Tratamiento nutricional	Días	Energía (kcal/d)	Proteína (g/kg/d)	Proteína (%)	Carbohidratos (%)	Lípidos (%)
1	Hipoproteica	5	2400	0.90	8.1	60.4	31.5
2	Hipoproteica	4	1000	0.90	4.5	62.0	33.5
3	Normal	5	2900	1.3	12.4	57.5	30.1
4	Hiperproteica	5	1950	1.9	12.1	53.9	34.0
5	Normal	3	1300	1.4	7.8	59.0	33.2

Datos aproximados calculados con el Sistema de Equivalentes de Alimentos Mexicanos (Pérez y col., 2014). La recomendación de energía y de proteínas se siguió del IOM (2005). La asignación del tratamiento nutricional fue de manera secuencial.

recomendaciones para la edad del Instituto de Medicina (IOM, 2005). Los porcentajes de carbohidratos y lípidos se encontraron dentro de los valores recomendados (carbohidratos del 45 al 65%, y lípidos del 25 al 35 % del valor energético total). Sin embargo, el porcentaje de las proteínas en 3 de las dietas de los pacientes fue menor del 10 %, que es el mínimo recomendado. Esto se debió a que en este estudio se le dio mayor importancia a los gramos de proteína por kilogramo de peso, pero al ser niños el cálculo dio muy bajo, sobre todo en los niños a los que se les dieron pocas proteínas (dieta hipoproteica) o de menor edad, ya que su peso ideal era menor. En el APÉNDICE 3 se encuentra un ejemplo del plan alimenticio otorgado a uno de los pacientes.

Los pacientes se dividieron entre los diferentes grupos de intervención y se verificó que no existieran diferencias entre ellas, lo cual ocurrió entre las diferentes variables de las características generales de todos los sujetos. Se conformaron cuatro grupos: los que llevaron una dieta hipoproteica (n=2), dieta normal (n=2), dieta hipoproteica (n=1) y el grupo control (n=5). La edad en años ($p=0.930$), el peso en kilogramos ($p=0.986$), la talla en metros ($p=0.829$) y la proteína en heces basal en mg/ml ($p=0.696$) no presentaron diferencias significativas entre grupos, por lo que se asumen que las características basales para iniciar la dieta fueron iguales en todos los grupos. En el caso de la proteína en orina en mg/dL sólo se tuvieron los datos de los pacientes con síndrome nefrótico, por lo que el grupo control no se incluyó en la medición de la diferencia de la distribución de los datos. Este último dato tampoco presentó diferencias significativas en la distribución de los tres grupos de intervención ($p=0.331$) (Tabla VI). Las diferencias se calcularon con la prueba de Kruskal-Wallis.

Tabla VI. Comparación de las características generales de los sujetos de estudio entre los diferentes grupos.

Variable	Dieta Hipoproteica (n=2)	Normal (n=2)	Dieta Hiperproteica (n=1)	Control (n=5)	p
Sexo, M/F	1/1	1/1	0/1	3/2	-
Edad, años	7.5	11	10	10 (2, 17)	NS
Peso, kg	44.3	42.1	44.0	45.0 (17.8, 77.5)	NS
Talla, m	1.21	1.43	1.31	1.41 (0.89,1.70)	NS
Proteína en orina, mg/dL	325	87.5	75	ND	NS
Proteína en heces basal, mg/ml	9.9	13.9	7.74	12.5 (5.93,17.30)	NS

Se muestran medianas (intervalo). La diferencia de distribución fue calculada por la prueba de Kruskal-Wallis al 95% de confianza. *Abreviaturas:* M, masculino; F, femenino; ND, dato no disponible; 0.NS, no significativa.

Concentración de Proteínas en Heces

Después de decidir que el método más adecuado y exacto para medir la concentración de proteínas en las muestras de heces de estos pacientes era el método del ácido bicinconínico, se prosiguió a descongelar las muestras y a tomar alícuotas para realizar el análisis por triplicado. Después de realizar la medición de la absorbancia se obtuvo la curva estándar de cada una de las microplacas analizadas. En la Figura 5 se observa el ejemplo de una de las curvas, cuya ecuación de la recta fue $y=1.3153x + 0.0803$, con una correlación de 0.9999, donde la y corresponde a la absorbancia a 562 nm y la x corresponde a la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas que se obtuvo fue en mg/mL. Las medianas de las concentraciones de proteínas encontradas se encuentran en la Tabla VII. En los pacientes 2 y 5, la concentración de proteínas disminuyó después del tratamiento nutricional que fueron dieta hipoproteica y normal, respectivamente. Cabe mencionar que estos pacientes fueron los de menor edad, y que tal vez en estos casos la respuesta al tratamiento nutricional sea de mayor ayuda. Se esperaba que los sujetos del grupo control tuvieran muy poca cantidad de proteínas, y aunque en algunos casos la concentración de proteínas si fue menor que la de los pacientes enfermos, no se encontró diferencia significativa entre ellos. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de proteínas entre los resultados del grupo control y del grupo con síndrome nefrótico, ni tampoco después de seguir el tratamiento nutricional. Después de varias revisiones en la literatura, no se pudo encontrar un valor normal que se pudiera comparar con los datos obtenidos en este estudio.

Debido a que también se calculó la humedad presente en todas las muestras, se calculó el peso seco de todas las muestras y así poder obtener una concentración de proteínas equivalente a los gramos de proteínas por gramo de heces secas (Tabla VIII). También se tomó en cuenta el volumen de buffer de extracción utilizado.

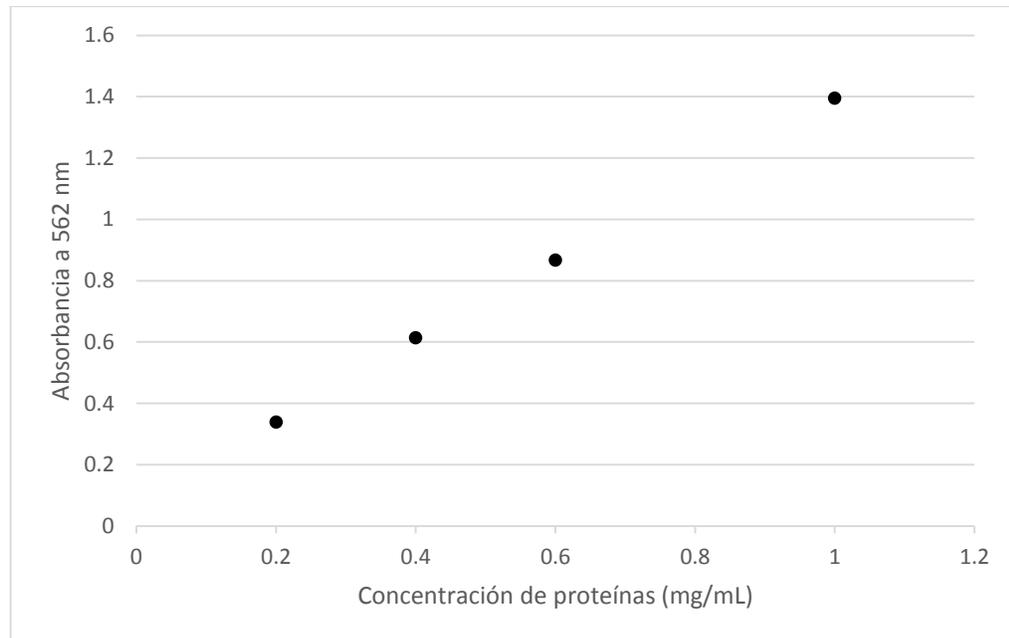


Figura 4. Curva estándar de absorbancia contra concentración de proteínas del estándar de albúmina de suero bovino. En el programa Microsoft Excel se introdujeron los datos obtenidos y se calculó la ecuación de la curva estándar para calcular la concentración de proteínas de las muestras de este estudio. La ecuación de la curva es $y=1.3153x + 0.0803$, $R^2= 0.9999$.

Tabla VII. Comparación de la concentración de proteínas de los niños con síndrome nefrótico antes y después del tratamiento nutricional y del grupo control.

	Concentración de proteínas antes del tratamiento nutricional (mg/mL)	Concentración de proteínas después del tratamiento nutricional (mg/mL)	Concentración de proteínas control (mg/mL)	P <
1	12.76 (6.69, 13.84)	10.30 (7.74, 14.72)	10.86 (8.15, 12.99)	NS
2	7.03 (6.74, 9.10)	9.13 (8.42, 9.65)	5.93 (5.86, 6.33)	NS
3	18.11 (18.08, 21.65)	14.83 (12.44, 15.13)	17.30 (15.72, 19.58)	NS
4	7.74 (5.27, 10.84)	12.20 (10.38, 12.39)	16.41 (13.32, 18.57)	NS
5	9.64 (9.21, 12.04)	14.73 (12.59, 16.10)	11.94 (10.46, 18.31)	NS

Se presenta mediana (intervalo) de cada una de las mediciones. La diferencia de distribución fue calculada por la prueba de Friedman al 95 % de confianza. *Abreviaturas:* NS, no significativa.

La mediana del porcentaje de humedad de las muestras fue de 77.4 %, con un intervalo de 64.1 hasta 84.9 %. Estos valores son similares a los encontrados en otro estudio con mujeres japonesas, donde encontraron valores de humedad en heces desde el 60 ± 3 % hasta el 85 ± 4 % (Nishimuta y col., 2006). Por lo anterior, se considera que los valores encontrados en este estudio se encuentran dentro de la normalidad en cuanto a esta variable.

Al hacer el ajuste de la concentración de proteínas sí se pudieron ver diferencias significativas entre algunas de las muestras. Primero se determinó las diferencias entre grupos por la prueba de Friedman con un intervalo de confianza del 95 %, y los niños 1 al 4 tuvieron diferencias de concentración de proteínas.

El paciente 1 tuvo diferencias entre las concentraciones de proteínas entre las muestras antes de la dieta y después de esta ($p=0.043$), y esto mismo sucedió en el paciente 4 ($p=0.043$). El paciente 1 llevó una dieta hipoproteica y el 4, hiperproteica, por lo que no se puede asumir que un tipo de dieta causó esta diferencia. Además, según la bibliografía consultada, una dieta hipoproteica no tenía efectos en los niveles de proteína excretada en niños (Wingen y col., 1997; Chaturvedi y Jones, 2007). Sin embargo, en este caso aumentó la concentración después de 5 días.

En el caso del paciente 4, quien consumió una dieta hiperproteica que generalmente aumenta la excreción de proteína en orina (Jureidini y col., 1990), la dieta seguida durante 5 días ayudó a disminuir la concentración de proteínas en heces.

En los pacientes 2 y 3 hubo diferencias entre las muestras de heces de los pacientes enfermos con las muestras de los pacientes sanos. En el paciente 2 la concentración de proteínas fue mayor en la muestra control que la del niño enfermo (85.2 contra 123.0 mg/g, $p=0.043$), ocurriendo lo mismo en el paciente 3 (113.5 contra 235.5 mg/g, $p=0.043$).

Tabla VIII. Concentración de proteínas de las muestras de heces de niños con síndrome nefrótico y grupo control ajustada al peso seco de las muestras.

	Concentración de proteínas antes del tratamiento nutricional (mg/g)	Concentración de proteínas después del tratamiento nutricional (mg/g)	Concentración de proteínas control (mg/g)	P <
1	153.3 (141.1, 164.9)	212.5 (164.0, 224.7)	164.3 (154.5, 201.7)	0.05
2	85.2 (70.4, 122.2)	109.4 (75.0, 126.1)	123.0 (104.3, 134.0)	0.05
3	140.7 (123.9, 161.2)	113.5 (88.7, 143.0)	235.5 (215.1, 238.3)	0.05
4	461.5 (458.1, 604.2)	155.7 (111.2, 156.0)	271.2 (143.1, 285.9)	0.05
5	88.5 (87.9,200.4)	207.6 (177.3, 215.0)	97.6 (96.8, 116.2)	NS

Se presenta mediana (intervalo) de cada una de las mediciones. La diferencia de distribución fue calculada por la prueba de Friedman al 95 % de confianza. *Abreviaturas:* NS, no significativa.

Estos resultados difieren de lo reportado en la literatura científica que dice que los niños con síndrome nefrótico excretan más proteínas que los pacientes sanos (Schultze y col., 1980; Jensen y col., 1966). Por lo que en este estudio, al menos en dos de los pacientes no se cumple la regla de que los niños con síndrome nefrótico excretan más proteína en las heces que los niños sanos, independientemente de la dieta de los pacientes.

Se decidió realizar el análisis de diferencias de manera individual debido a la pequeña muestra del estudio. Sin embargo, el objetivo del estudio era comparar los diferentes tratamientos nutricionales. Por lo tanto, al igual que en los datos generales, se hizo una comparación de los cambios de la concentración de proteínas en heces entre los diferentes grupos de intervención (Figura 5).

En 3 de los 5 pacientes (60 %) aumentó la concentración de proteínas en heces, mientras que los 2 pacientes restantes (40 %) disminuyeron la concentración. En cuanto al tratamiento nutricional, los pacientes del grupo de dieta hipoproteica aumentaron la concentración de proteínas en 29.1 mg/g, al igual que los pacientes del grupo de dieta normal, quienes aumentaron 23.8 mg/g. El paciente perteneciente al grupo de la dieta hiperproteica fue el que tuvo una disminución bastante notoria de la concentración de proteínas en heces de 367.4 mg/g. Sin embargo, a pesar de que parece ser una diferencia muy grande entre grupos no existió diferencia estadísticamente significativa de la distribución de los datos ($p=0.368$) (Tabla IX).

Debido que el grupo de la dieta hiperproteica sólo cuenta con un paciente, no es posible remarcar esta diferencia. Este hallazgo es diferente a lo que se ve en la literatura científica en muestras de orina, donde cantidades menores de proteínas en la dieta disminuyen la excreción de proteínas y cantidades altas de éste micronutriente aumenta la excreción de proteínas a nivel renal (Fraga, 2007). Tal vez esto tenga que ver con mecanismos del metabolismo de proteínas que no se estudiaron en este trabajo, pero que da un campo de oportunidad para futuras investigaciones.

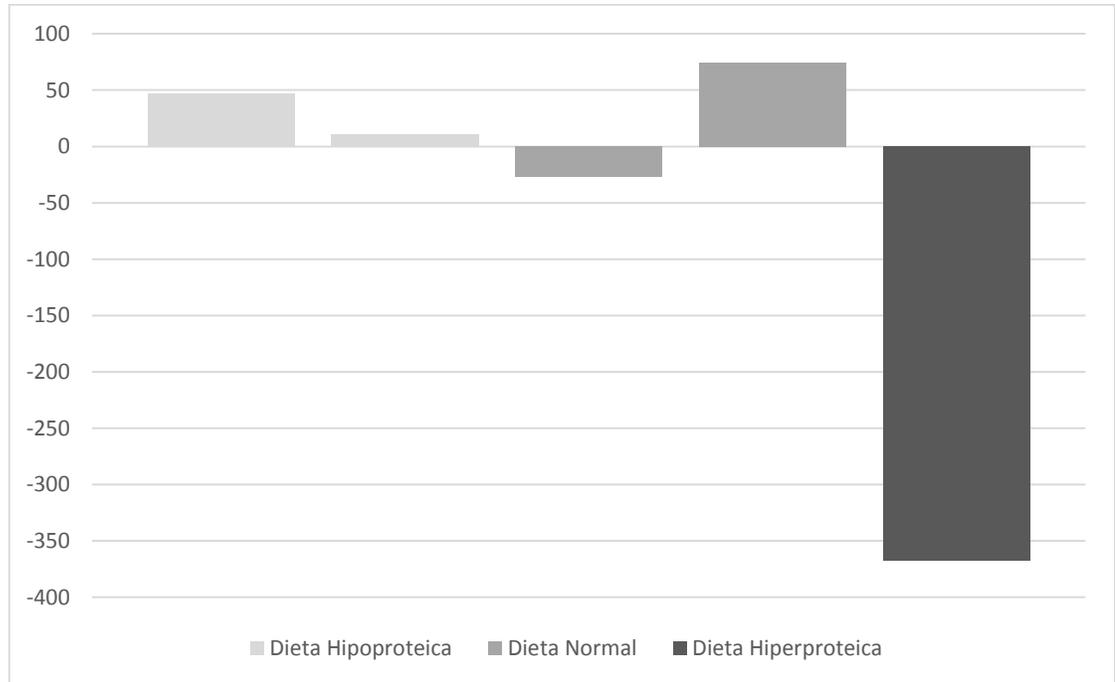


Figura 5. Cambios en la concentración de proteínas en heces de cada uno de los pacientes con síndrome nefrótico del estudio, según el tratamiento nutricional recibido. Los números negativos indican disminución de la concentración de proteína en heces y los positivos, aumento.

Tabla IX. Comparación de la diferencia de la concentración de proteínas en heces de los niños con síndrome nefrótico antes y después del tratamiento nutricional.

	Dieta Hipoproteica (n=2)	Dieta Normal (n=2)	Dieta Hiperproteica (n=1)	p
Diferencia de concentración de proteínas	29.1	23.8	-367.4	NS

Se calculó la diferencia de las medias de la concentración de proteínas en heces obtenida por el método del ácido bicinconínico en mg/g. La diferencia de distribución se calculó con la prueba de Kruskal-Wallis con un intervalo de confianza del 95%.

Análisis de Proteínas de Heces por Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes

Después de tomar fotografías de los geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie se analizaron las diferentes bandas. Para tener una mejor comparación se hizo una estimación de los pesos moleculares de las bandas más frecuentes en los diferentes carriles y encontramos que las bandas de aproximadamente 58 kDa, 47 kDa, 37 kDa, 27 kDa y 10 kDa fueron las que se encontraron en la mayoría de las muestras (Figura 6).

Sí fue posible observar diferencias entre los diferentes perfiles de proteínas. Sin embargo, no se logró establecer un patrón diferencial. Entre las diferencias encontradas entre las diversas muestras fue que algunas proteínas estaban sólo en algunas de ellas, o que la intensidad de las bandas variaron de una muestra a otra. Sobre todo entre aquellas del mismo paciente antes y después del tratamiento nutricional. Por ejemplo, en la muestra del paciente 1, las bandas de alrededor de 27 kDa (debajo de 31 kDa) aparecen en las dos muestras y en la muestra del niño control. Sin embargo, en la muestra obtenida antes del tratamiento aparece con mayor intensidad, mientras que la banda de alrededor de 37 kDa (arriba de 31 kDa) aparece con la misma intensidad en las tres muestras. Mientras que en el control aparece una banda de aproximadamente 37 kDa (debajo de 45 kDa) que no aparece en la del niño con síndrome nefrótico.

En las muestras del paciente 2 se pueden observar algunas proteínas similares, como la de alrededor de 48 kDa (arriba de 45 kDa) que aparece en las tres muestras, así como la de 27 kDa, que a pesar de tener mayor intensidad en la muestra del niño control y la muestra del niño con síndrome nefrótico obtenida después del tratamiento, también está presente en las tres muestras. Aunque la proteína de 37 kDa sólo aparezca en las muestras de heces del paciente enfermo.

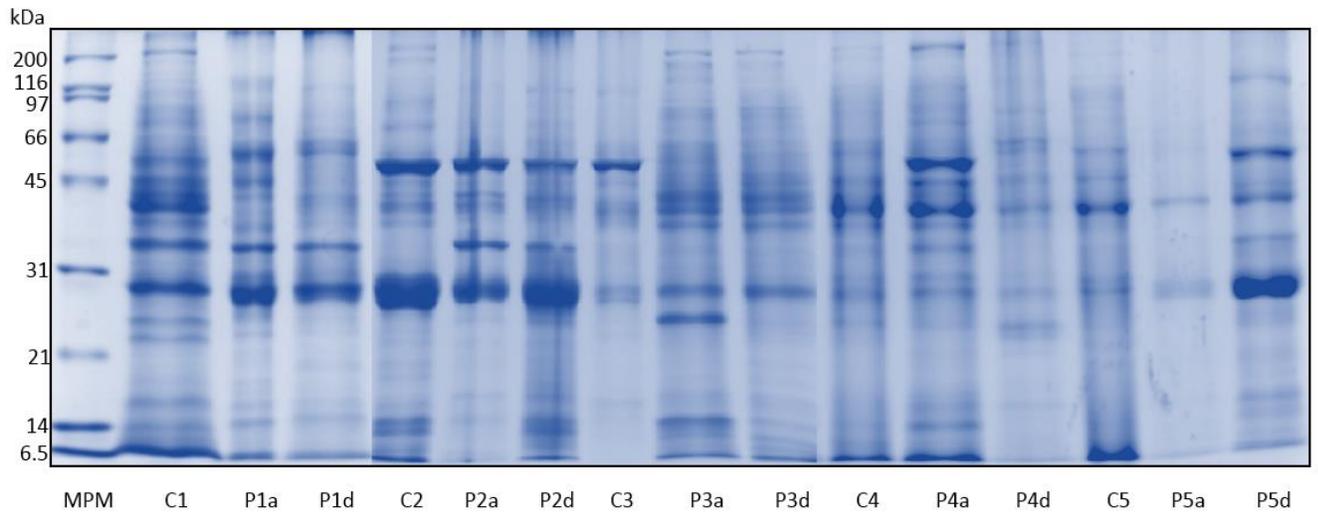


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % en condiciones desnaturizantes de las proteínas extraídas de las heces de pacientes con síndrome nefrótico. Se encontraron diferencias entre controles y pacientes y diferencias más sutiles entre muestras de un mismo paciente antes y después del tratamiento nutricional. Abreviaturas: MPM, marcador de peso molecular; C, control; Pa, paciente antes del tratamiento nutricional; Pd, paciente después del tratamiento nutricional.

En las muestras del paciente 3 y su control, también apareció la proteína de 27 kDa en menor intensidad a otras muestras, y la proteína de 58 kDa sólo aparece en la muestra del paciente sano. En los demás pacientes se ven patrones similares, aunque en la muestra del paciente 5 antes del tratamiento se observan pocas bandas, probablemente por algún problema al cargar la muestra. Sin embargo, se pueden observar las bandas de 27 kDa y la de 42 kDa, que están presentes en el resto de las muestras.

Es de notar que la albúmina, una proteína de 66 kDa que comunmente se encuentra en las heces (Dubrow y Yannielli, 1992; Nakano y col., 1978) en pacientes sanos o con síndrome nefrótico, no se observó en los perfiles de proteínas de las muestras de este estudio.

En otras enfermedades como el cáncer colorrectal con muestras de heces (Dubrow y Yannielli, 1992) o en enfermedades renales con muestras de orina (Suhail y col., 2011), se encontraron patrones de proteínas que permitieron un tipo de prueba diagnóstica con sólo realizar geles de poliacrilamida. Sin embargo, en este estudio no se encontraron proteínas que estuvieran presentes en todas las muestras de heces de los niños enfermos que no estuvieran en los pacientes sanos, o al contrario, proteínas que no estuvieran presentes en los niños con la enfermedad en estudio.

Doble Inmunodifusión Radial e Inmunoelectroforesis Cruzada con Dos Antígenos

Debido a que sólo con los geles de poliacrilamida no fue posible identificar cuáles eran las proteínas presentes se realizaron pruebas inmunológicas de identificación de diferentes proteínas. Primero, se utilizaron anticuerpos anti-proteínas totales de suero humano en las muestras de heces de los niños enfermos, antes y después del tratamiento, y por medio del método de inmunodifusión radial se encontró que efectivamente las heces también contienen proteínas presentes en el suero humano (Figura 7).

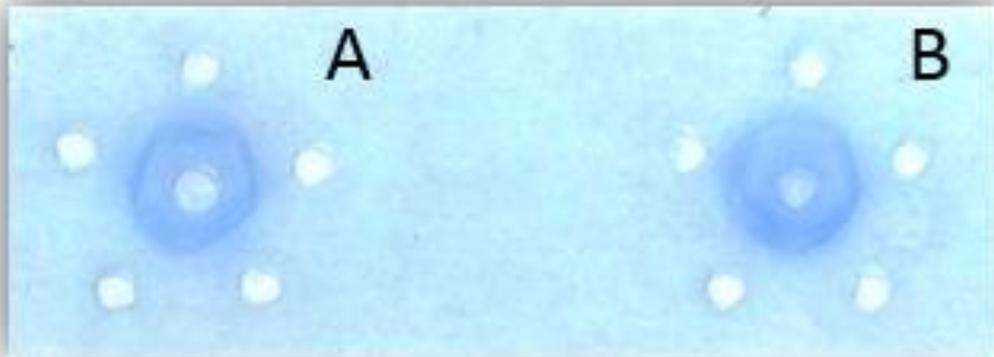


Figura 7. Doble inmunodifusión pasiva en gel de agarosa de proteínas extraídas de heces de pacientes con síndrome nefrótico. En el centro se colocó 5 µL de anticuerpos anti-proteínas totales de suero humano y se dejó difundir hacia las muestras de heces pacientes con síndrome nefrótico antes (A) y después (B) del tratamiento nutricional.

Ya que se identificó que las muestras tenían proteínas del suero humano, se hizo inmunolectroforesis cruzada para separar estas proteínas y poder así tener una mejor idea de cuáles eran las proteínas presentes en las muestras. Los resultados que se muestran en la Figura 8, nos indican que existen diferentes proteínas en diversas muestras de heces. Cada uno de los picos que aparecieron en la segunda dimensión de la electroforesis corresponde a una proteína diferente. Según Weir y Stewart (1993) los picos marcados con la letra a, corresponden a inmunoglobulinas, los picos marcados con la letra b son probablemente correspondientes a otra inmunoglobulina. Sin embargo no es fácil de identificar, mientras que los picos indicados con la letra c corresponden a la albúmina. Se muestran dos letras (a, y a') debido a que fueron dos muestras cargadas, y para indicar que son dos picos diferentes.

Una vez identificadas algunas proteínas por este método se volvió a realizar el método de inmunodifusión radial pasiva para comprobar cuáles eran las proteínas presentes en las muestras. En este caso los anticuerpos fueron anti-IgA, anti-IgG y anti-albúmina. Todos estos anticuerpos se pusieron en el pozo central y alrededor se usaron diferentes muestras, tanto de pacientes con síndrome nefrótico como sanos y en algunos casos se utilizó suero humano como control positivo de la reacción antígeno-anticuerpo. En la Figura 9 se puede ver que algunas de las muestras reaccionaron al anticuerpo de la inmunoglobulina A, mientras que para la inmunoglobulina G ninguna muestra se precipitó. En cuanto a la albúmina se observó la reacción del suero humano con el anticuerpo de manera muy visible, mientras que las muestras del estudio no reaccionaron cómo se esperaba.

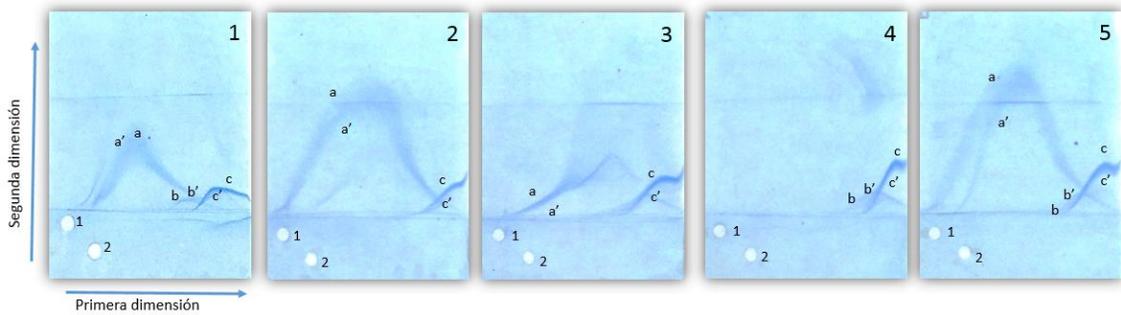


Figura 8. Inmunolectroforesis cruzada en gel de agarosa de proteínas extraídas en heces de niños con síndrome nefrótico. Aparece la primera y segunda dimensión del método. Los números del 1 al 5 son la clave de los pacientes. Los picos a y a', corresponden a inmunoglobulinas; b y b' no se pueden identificar y c y c' pudieran corresponder a albúmina.

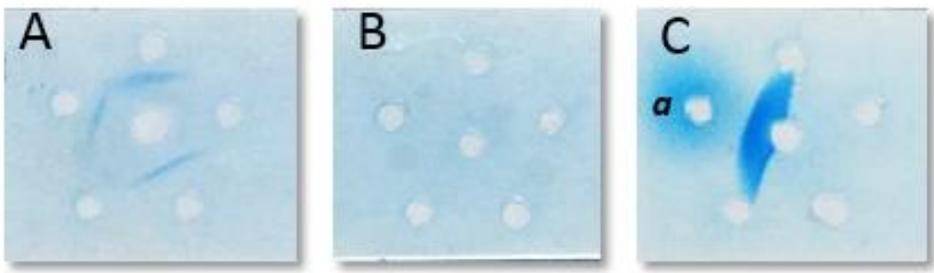


Figura 9. Doble inmunodifusión radial en gel de agarosa de proteínas extraídas de heces. Los anticuerpos utilizados fueron anti-IgA (A), anti-IgG (B) y anti-albúmina (C). Se marca con α el pozo con muestra de suero humano del gel C.

Electrotransferencia e Inmunodetección

Siguiendo con la confirmación de las proteínas presentes en las muestras, se hizo de nuevo su análisis por electroforesis con geles de poliacrilamida. Las proteínas presentes en los geles se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa y después, con ayuda de diferentes anticuerpos como anti-IgA y anti-albúmina, que fueron las proteínas que se detectaron en las muestras cuando se utilizaron los otros métodos.

En las membranas se pudo confirmar que todas las muestras contenían alguna cantidad de inmunoglobulina A y de albúmina, ya que las muestras utilizadas, tanto de pacientes enfermos como pacientes sanos mostraron una reacción o banda gracias al anticuerpo con el que se incubó la membrana correspondiente. Las bandas de la presencia de las proteínas se encuentran en la Figura 10.

La inmunoglobulina A es una proteína que se encuentra en muestras de heces de niños (Dion y col., 2004), y se conforma de dos subunidades que tienen tamaños de 59.6 kDa y 26.4 kDa. Probablemente estas son las bandas que encontramos en el gel de poliacrilamida inicial correspondientes a los 58 kDa y 27 kDa, y es por eso que se encontraron en la mayoría de las muestras.

Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA)

Al identificar las proteínas presentes en las muestras, se procedió a cuantificarlas por el método de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima, conocido como ELISA, por sus siglas en inglés. La medición de la concentración de albúmina en las muestras de heces no resultó como se esperaba. La concentración de proteínas de las muestras no entró dentro de la curva estándar, donde el valor mínimo fue de 2 µg/L. Por lo anterior, se puede decir que todas las muestras tuvieron menos de 2 µg/L de albúmina. Sólo en una muestra se obtuvo una concentración de albúmina mayor a los 2 µg/L, y se trató de la muestra del control del paciente 1, que se trataba de una niña de 13 años. Por lo anterior, se tuvo la

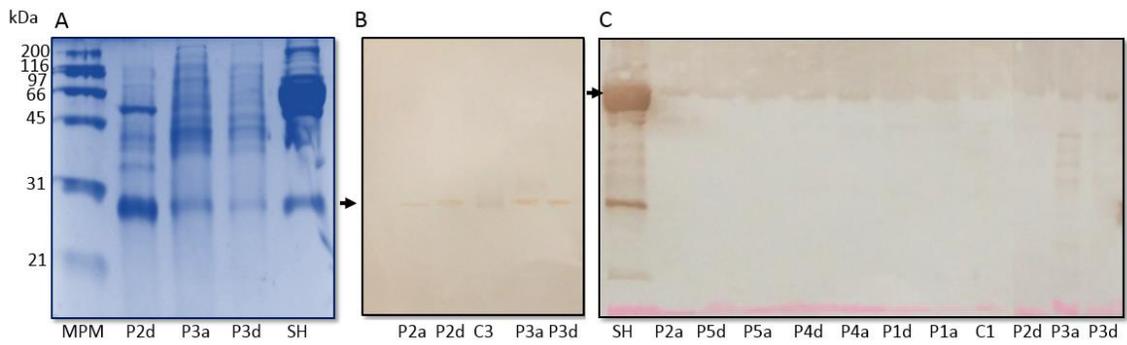


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas extraídas de heces (A) e inmunodetección en membrana electrotransferida de IgA (B) y albúmina (C).

sospecha de que probablemente la muestra pudo haber estado contaminada con sangre. Para corroborar, a la muestra de niña se le hizo una prueba de sangre oculta en heces, la cual resultó negativa, y no se sabe porque razón la muestra de esta niña tuvo más albúmina que el resto de las muestras de heces.

La inmunoglobulina A se pudo medir en 7 de las 10 muestras analizadas, que fueron los controles y las muestras de antes del tratamiento nutricional, el resto de las muestras quedó por debajo de la curva estándar cuyo valor más bajo fue de 25 $\mu\text{g/g}$. Los valores encontrados de inmunoglobulina A en heces fueron desde los 89.9 $\mu\text{g/g}$ hasta los 745.8 $\mu\text{g/g}$, con una mediana de 287.2 $\mu\text{g/g}$. Este valor supera el encontrado por Dion y colaboradores (2004), quienes midieron inmunoglobulina A en heces de niños de 6 a 24 meses y encontraron en promedio 140 $\mu\text{g/g}$. Los valores encontrados aparecen en la Tabla X. El paciente 4 fue el único que mostró valores menores a 25 $\mu\text{g/g}$ tanto en el control aparentemente sano como en el enfermo. Este paciente presentó glomeruloesclerosis focal y segmentaria, una de las variedades de la enfermedad menos comunes y con más daños renales, por lo que pudo ser una de las causas de la disminución de IgA, aunque en el caso del paciente 3 que también presentó esta enfermedad, no ocurrió lo mismo. Sin embargo, el paciente 4 fue el que cursó la enfermedad por más tiempo (aproximadamente 8 años).

Los pacientes 2, 3 y 5 tuvieron una mayor cantidad de IgA en el control que en el enfermo, y debido a que la IgA es una inmunoglobulina presente en las mucosas gastrointestinales y otras mucosas del cuerpo (Weir y Stewart, 1993), se podría inferir que los pacientes sanos tienen un mejor recubrimiento de mucosas ya que su organismo no tiene daños. El paciente 1 fue el único al que el sujeto enfermo superó su concentración de IgA.

Tabla X. Concentración de inmuglobulina A de muestras de heces de pacientes con síndrome nefrótico y controles medida por el método de ELISA.

Paciente	Concentración de IgA ($\mu\text{g/g}$)	Concentración de IgA control ($\mu\text{g/g}$)
1	89.9	< 25
2	287.2	595.9
3	302.6	745.8
4	< 25	< 25
5	96.6	285.9

La concentración se obtuvo por el método de ELISA y se ajustó con el peso de las muestras utilizadas. *Abreviaturas:* IgA, inmunoglobulina A.

CONCLUSIONES

La excreción de proteínas en heces de niños con síndrome nefrótico es un campo poco explorado. En este estudio se encontraron valores desde los 85.2 mg/g hasta los 461 mg/g de proteínas en heces. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes del grupo control y los pacientes con síndrome nefrótico, y sólo un paciente presentó una mayor excreción de proteínas en su contraparte sana. Los datos indicaron que la proteína en la dieta podría ser determinante en la excreción de proteínas, aunque no la diferencia no fue significativa en este estudio. No obstante, esto pudo deberse a la muestra limitada. Los pacientes que tuvieron cantidades bajas de proteínas en la dieta aumentaron la concentración después del tratamiento nutricional, mientras que el paciente con dieta hiperproteica, la disminuyó, lo que deja un campo de oportunidad para futuras investigaciones con muestras más grandes.

En cuanto a los patrones de proteínas se pudieron observar diferencias entre las bandas de proteínas entre los pacientes y sus controles, así como antes y después del tratamiento nutricional. No fue posible establecer un perfil de proteínas exclusivo de pacientes con síndrome nefrótico como se ha hecho en orina o en otras enfermedades.

Fue posible identificar proteínas como albúmina e inmunoglobulina A. En cuanto a esta última proteína, resaltó que uno de los pacientes con el mayor número de años con la enfermedad, con varias recaídas y con biopsia renal con histología de glomeruloesclerosis focal y segmentaria, tuvo valores muy bajos (por debajo de la curva estándar de concentración) comparado con el resto de los pacientes. Este hallazgo no permite hacer conclusiones al respecto, pero deberá tomarse en cuenta en estudios posteriores. Tampoco se encontraron diferencias en la albúmina e IgA entre los niños controles, aparentemente sanos y los niños enfermos.

La inmunoglobulina A se encontró presente en la mayoría de las muestras de heces en valores que fueron desde 89.9 µg/g hasta los 745.8 µg/g, tanto en los pacientes controles como con síndrome nefrótico, superando los valores reportados en otros estudios.

El objetivo específico de comparar el estado de salud de los pacientes antes y después del tratamiento nutricional no fue posible de llevar a cabo debido a la falta de algunos indicadores bioquímicos en los pacientes. Sin embargo, se identificó que los valores de laboratorio eran característicos de la enfermedad.

Es necesario llevar a cabo este tipo de estudio con mayor inclusión de niños con la enfermedad, así como mayor control del tratamiento nutricional en conjunto con la parte médica para poder hacer conclusiones más claras, y tener datos más concisos.

BIBLIOGRAFÍA

- [AMP] Academia Mexicana de Pediatría. 2000. Comité de Expertos en Nefrología. Síndrome nefrótico en niños. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 57: 522-36.
- Akchurin, O., Reidy, K.J. 2014. Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: impact on podocyte pathobiology. *Pediatr Nephrol.* 30(2): 221-33.
- Aparicio, M., Chauveau, P., Combe, C. 2001. Are supplemented low-protein diets nutritionally safe? *Am J Kidney Dis.* 37(1):S71-S76.
- Botella García, J. 2002. Manual de nefrología clínica. Primera edición. Masson, S.A. Barcelona, España. p. 3-6, 22-24.
- Brocklebank, T., Cooper, E.H., Richmond, K. 1991. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis patterns of proteinuria in various renal diseases of childhood. *Pediatr Nephrol.* 5: 371-5.
- Brown, E.A. 1985. Mechanisms of disease: The nephrotic syndrome. *PMJ.* 61:1057-62.
- Calderon de la Barca, A.M. 1996. Técnicas inmunoquímicas. Manual de prácticas del programa de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Calleja Fernández, A., López Gómez, J.J., Vidal Casariego, A., Cano Rodríguez, I., Ballesteros Pomar, M.D. 2009. Eficacia del tratamiento dietético en el síndrome nefrótico. *Nutr Hosp.* 24(6):744-7.
- Calzada León, R. 1998. Crecimiento en enfermedades renales. En: Crecimiento del niño. Fundamentos fisiopatológicos. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. p. 191-9.
- Cano Schuffeneger, F. 2003. Adecuación y nutrición en diálisis peritoneal pediátrica. *Arch Latin Nefr Ped.* 3(2):82-9.

- Carrasco- Miranda, J.S., Garcia-Alvarez, R., Sotelo-Mundo, R.R., Valenzuela, O., Islas-Osuna M.A., Sotelo-Cruz, N. 2013. Mutations in NPHS2 (podocin) in Mexican children with nephrotic syndrome who respond to standard steroid treatment. *Genet Mol Res.* 12(2):2102-7.
- Casanueva, E., Kaufer-Horwitz, M., Pérez-Lizaur, A.B., Arroyo, P. 2008. *Nutriología médica*. Tercera ed. Editorial Médica Panamericana. México.
- Chaturvedi, S., Jones, C. 2007. Protein restriction for children with chronic renal failure. *Cochrane Database Syst Rev.* (4):CD006863.
- Coleman, J.E., Watson, A.R. 1996. Hyperlipidaemia, diet and simvastatin therapy in steroid-resistant nephrotic syndrome of childhood. *Pediatr Nephrol.* 10:171-4.
- Davin, J.C., Rutjes, N.W. 2011. Nephrotic syndrome in children: from bench to treatment. *Int J Nephrol.*
- De Sousa, J.S., Rosa, F.C., Baptista, A., Fonseca, H., Sá, G. 1995. Cow's milk protein sensitivity: a possible cause of nephrotic syndrome in early infancy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 21:235-7.
- Dion, C., Montagne, P., Bene, M.C., Faure, G. 2004. Measurement of faecal immunoglobulin A levels in young children. *J Clin Lab Anal.* 18:195–9.
- Dubrow, R., Yannielli, L. 1992. Fecal protein markers of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol.* 87:854-8.
- Eddy, A.A., Symons, J.M. 2003. Nephrotic syndrome in childhood. *The Lancet.* 362:629-39.
- Escott-Stump, S. 2010. *Nutrición, diagnóstico y tratamiento*. Sexta ed. Lippincott Williams & Wilkins. Barcelona, España.
- [FAO-OMS] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organización Mundial de la Salud. 2004. Human energy requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Roma. p. 20-32.
- Fouque, D., Aparicio, M. 2007. Eleven reasons to control protein intake of patients with chronic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol.* 3(7):383-92.

- Fraga, A. 2007. Restricción proteica en la enfermedad renal progresiva crónica. *Arch Latin Nefr Ped.* 7:86-90.
- Friedman, A.N. 2004. High-protein diets: potential effects on the kidney in renal health en disease. *Am J Kidney Dis.* 44:950-62.
- García-Álvarez, R., Sotelo Cruz, N., Gutiérrez Torres, P.I., Rea Torres, A.R. 2014. Revisión sucinta de las enfermedades renales en niños de un hospital de pediatría del noroeste de México. *Rev Mex Pediatr.* 81(6): 226-28.
- Giordano, M., De Feo, P., Lucidi, P., dePascale, E., Giordano, G., Cirillo, D., Dardo, G., Santo Signorelli, S., Castellino, P. 2001. Effects of dietary protein restriction on fibrinogen and albumin metabolism in nephrotic patients. *Kidney Int.* 60:235-42.
- Glaser, L.E. 2004. Proceso del cuidado nutricional. *Arch Latin Nefro Ped.* 4(2):107-12.
- Gordillo Paniagua, G. 2009. Síndrome nefrótico. En: Gordillo Paniagua, G., Exeni, R.A., de la Cruz, J. Nefrología pediátrica. Tercera ed. Elsevier España. Barcelona.
- Hogg, R.J., Portman, R.J., Milliner, D., Lemley, K., Eddy, A., Igelfinger, J. 2000. Evaluation and management of proteinuria and nephrotic syndrome in children: recommendations from a pediatric nephrology panel established at the National Kidney Foundation conference on Proteinuria, Albuminuria, Risk, Assessment, Detection, and Elimination (PARADE). *Pediatrics.* 105:1242-49.
- [IOM] Institute of Medicine. 2005. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. The National Academies Press. Washington, D.C.
- Iwagaki, N., Mizuno, M., Nasu, J., Mizuno, M., Okazaki, H., Hori, S., Yamamoto, K., Tsuji, T., Fujita, T., Shiratori, Y. 2002. Advances in the development of a reliable assay for the measurement of stool decay-accelerating factor in

- the detection of colorectal cancer. *J Immunoassay Immunochem.* 23: 497-507.
- Jensen, H., Jarnum, S., Hart Hansen, J.P. 1966. Gastrointestinal protein loss and intestinal function in the nephrotic syndrome. *Nephron.* 3:209-20.
- Jureidini, K.F., Hogg, R.J., van Renen, M.J. 1990. Evaluation of long-term aggressive dietary management of chronic renal failure in children. *Pediatr Nephrol.* 4:1-10.
- Kong, X., Yuan, H., Fan, J., Li, Z., Wu, T., Jian, L. 2013. Lipid-lowering agents for nephrotic syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 12:CD005425.
- Kumar, V., Cotran, R., Robbins, S.L. 2004. Robbins patología humana. Séptima edición. Elsevier España, S.A. Madrid, España. p. 509-22.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-85.
- Lewis, M.A., Baildom, E.M., Davis, N., Houston, I.B., Postlethwaite, R.J. 1989. Nephrotic syndrome: from toddlers to twenties. *Lancet.* 1(8632):255-9.
- Luxton, R.W., Patel, P., Keir, G., Thompson, E.J. 1989. A micro-method for measuring total protein in cerebrospinal fluid by using benzethonium chloride in microtiter plate wells. *Clin Chem.* 35: 1731-4.
- Mahan, L.K., Escott-Stump, S., Raymond, J.L. 2009. Krause dietoterapia. Doceava ed. Elsevier España. Barcelona, España.
- Martini, R.J. 2005. Sobre el tratamiento de los niños con enfermedad renal crónica. Reflexiones basadas en la experiencia. *Arch Latin Nefr Ped.* 5: 121-8.
- Nakano, M., Sumi, Y., Miyakawa, M. 1978. Isolation and properties of fecal proteins and fecal alkaline phosphatase from germfree and conventional rats. *Appl Environ Microbiol.* 35:283-9.
- Nielsen, C.A., Jense, J.E., Cortes, D. 2015. Vitamin D status is insufficient in the majority of children at diagnosis of nephrotic syndrome. *Dan Med J.* 61(2):A5017.

- Nishimuta, M., Inoue, N., Kodama, N., Morikuni, E., Yoshioka, Y., Matsuzaki, N., Shimada, M., Sato, N., Iwamoto, T., Ohki, K., Takeyama, H., Nishimuta, H. 2006. Moisture and mineral content of human feces – High fecal moisture is associated with increased sodium and decreased potassium content. *J Nutr Sci Vitaminol.* 52:121-6.
- Oleksiewicz, M.B. 2004. Stool protein analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Scand J Gastroenterol.* 39:787-8.
- [OMS] Organización Mundial de la Salud (WHO). 2006. Multicentre growth reference study group: WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development. Geneva: World Health Organization, 2006. Disponible en: http://www.who.int/childgrowth/standards/technical_report/en/index.html
- Pérez de Gallo, A.B., Marván Laborde, L. 1999. Dietas normales y terapéuticas: los alimentos en la salud y en la enfermedad. Cuarta ed. Editorial La Prensa Médica Mexicana. México.
- Pérez Lizaur, A.B., Palacios González, B., Castro Becerra, A.L., Flores Galicia, I. 2014. Sistema mexicano de alimentos equivalentes. Cuarta ed. Fomento de Nutrición y Salud, A.C. México, D.F.
- Rayner, B.L., Byrne, M.J., van Zyl Smit, R. 1996. A prospective clinical trial comparing the treatment of idiopathic membranous nephropathy and nephrotic syndrome with simvastatin and diet, versus diet alone. *Clin Nephrol.* 46(4):219-24.
- Ribeiro, D., Zawadynski, S., Pittet, L.F., Chevalley, T., Girardin, E., Parvex, P. 2015. Effect of glucocorticoids on growth and bone mineral density in children with nephrotic syndrome. *Eur J Pediatr.* 174(7):911-17.
- Santos Rodriguez, F., Fernández Fernández, M. 2003. Crecimiento en niños con insuficiencia renal crónica. *Arch Latin Nefr Ped.* 3(2):90-97.

- Schultze, G., Ahuja, S., Faber, U., Moizahn, M. 1980. Gastrointestinal protein loss in the nephrotic syndrome studied with ^{51}Cr -albumin. *Nephron*. 25(5):227-30.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 150:76-85.
- Suhail, S.M., Woo, K.T., Tan, H.K., Wong, K.S. 2011. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of urinary protein in acute kidney injury. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 22(4):739-45.
- Suyama, K., Kawasaki, Y., Miyazaki, K., Kanno, S., Ono, A., Suzuki, Y., Ohara, S., Hosoya, M. 2015. Rituximab and low-dose cyclosporine combination therapy for steroid-resistant FSGS. *Pediatr Int*. En prensa.
- Uauy, R.D., Hogg, R.J., Brewer, E.D., Reisch, J.S., Cunningham, C., Holliday, M.A. 1994. Dietary protein and growth in infants with chronic renal insufficiency: a report from the Southwest Pediatric Nephrology Study Group and the University of California, San Francisco. *Pediatr Nephrol*. 8(1):45-50.
- Uy, N., Graf, L., Lemley, K.V., Kaskel, F. 2015. Effects of gluten-free, dairy-free diet on childhood nephrotic syndrome and gut microbiota. *Pediatr Res*. 77(1-2):252-55.
- Valle, M.G. 2003. La alimentación del enfermo renal. Consejos para los pacientes. *Arch Latin Nefr Ped*. 3:177-82.
- Velasquez Jones, L. 2014. Tratamiento del síndrome nefrótico idiopático en niños. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 71(5):315-22.
- Walser, M., Hill, S., Tomalis, E.A. 1996. Treatment of nephrotic adults with a supplemented, very low-protein diet. *Am J Kidney Dis*. 28(3):354-64.
- Weir, D.M., Stewart, J. 1993. Immunology. Séptima edición. New York: Churchill Livingstone. Edinburgh. p. 41-50.

- Wessel, D., Flügge, U.I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* 138(1):141-3.
- Wingen, A.M., Fabian-Bach, C., Schaefer, F., Mehls, O. 1997. Randomised, multicentre study of a low-protein diet on the progression of renal failure in children. *Lancet.* 349:1117-23.
- Yssing, M., Jensen, H., Jarnum, S. 1969. Albumin metabolism and gastrointestinal protein loss in children with nephrotic syndrome. *Acta Paediat Scand.* 58:109-15.

APÉNDICE 1. Consentimiento Informado

Hermosillo, Sonora a ____ de _____ 2013

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente yo, el (la) Sr.(a) _____

tutor legal de _____

de _____ años y número de expediente _____

con domicilio en _____

_____ y teléfono _____, _____, declaro haber sido invitado de parte de los médicos adscritos al Hospital Infantil del Estado de Sonora, para que mi hijo (a) participe en un estudio de investigación **sobre la excreción de proteínas en pacientes con Síndrome nefrótico (SN)** y los efectos que puede tener en la salud de los niños con este tipo de enfermedad renal en la que también se pierden proteínas por otras vías (orina).

En vista de que mi hijo (a) ha sido diagnosticado (a) con este padecimiento, se me ha explicado la necesidad de tomar muestras de heces fecales, sangre (5 mL) y orina para análisis de laboratorio, las cuales son procedimiento rutinarios para el tratamiento y control en los niños que tienen esta enfermedad, además se le solicitarán estudios en muestras de heces fecales por lo menos en dos ocasiones distintas, para cuantificar las proteínas que mi niño (a) pierde durante la enfermedad.

Debido a su enfermedad, es conveniente conocer si durante la fase de edema generalizado (hinchazón del cuerpo) el niño(a) está perdiendo proteínas en sus materia fecal además de las pérdidas que tiene de este nutrimento por orina; también se me ha

aclarado que a mi niño se le proporcionará una dieta en la que se cambiarán las cantidades de proteínas (pueden variar los nutrientes contenidos, sin embargo los alimentos presentes serán alimentos comunes), que ya has sido probadas para enfermos renales, la cual durará un período de una semana, durante el tiempo que mi hijo (a) se encuentre hospitalizado. En caso de solicitarlo, se me darán más recomendaciones alimenticias que podré aplicar al salir del hospital, para mejorar la calidad de vida de mi hijo.

Se me comentó también que si se encuentran cantidades importantes de proteínas en las heces fecales, se podrán diseñar dietas para ayudar a corregir este problema, lo que sería beneficioso para mi hijo y para otros pacientes con la misma enfermedad.

Por lo tanto:

Autorizo a la **L.C.N. Edna Lizbeth Robles Valenzuela** quien interviene como investigadora en este estudio titulado: **“Excreción de proteínas por vía digestiva en niños con Síndrome Nefrótico, sometidos a diferentes dietas”**, para que a mi hijo (a), quien es menor de edad, se le hagan los estudios necesarios en el entendido de que dichos estudios tienen como finalidad identificar alteraciones o complicaciones relacionadas con su enfermedad. Los estudios de laboratorio especiales se realizarán en heces fecales, donde se determinarán las proteínas contenidas mediante los métodos del ácido bicinónico y por electroforesis en geles de poliacrilamida, los cuales se me han explicado y aclarado en palabras comprensibles. También se me ha dicho que ninguno de los procedimientos causarán molestias a mi hijo (a). Autorizo también a los doctores que participan en el estudio para que se realicen los análisis de orina y de sangre que sean necesarios durante el tratamiento hospitalario (dos o tres extracciones de sangre), así como en los controles posteriores (al menos una toma de sangre cada mes).

Se me ha informado también que los resultados que se obtengan me serán comunicados en el curso de los controles siguientes en la consulta externa del Hospital Infantil del Estado de Sonora; así mismo, quedo enterado (a) de que:

- **No se le aplicará ningún medicamento experimental de ninguna clase.**
- **El estudio no representará un costo extra al tratamiento de mi hijo (a).**
- **Los datos de mi hijo (a) serán confidenciales (se utilizará una clave de identificación).**
- **Se me ha informado que no recibiré ninguna compensación económica, pero los estudios especiales que se harán para determinar las proteínas en materia fecal no tendrán ningún costo.**
- **En caso de presentar alguna inconformidad, mi hijo (a) es libre de abandonar el estudio en cualquier momento.**

Nombre y Firma del tutor

Para cualquier duda o aclaración, comuníquese con los responsables del estudio:

L.C.N. Edna Lizbeth Robles Valenzuela. Teléfono: 6623-25-82-18

Dr. Norberto Sotelo Cruz. Teléfono: 6622566817

Dr. Ramiro García Álvarez. Teléfono: 6621955126

APÉNDICE 2. Formato de Asentimiento Informado para los niños.

ASENTIMIENTO INFORMADO

Este asentimiento informado es para niños de 7 a 10 años que asisten al Hospital Infantil del Estado de Sonora con diagnóstico de Síndrome Nefrótico a quienes se les invita a participar en la investigación **“Excreción de proteínas por vía digestiva en niños con síndrome nefrótico sometidos a diferentes dietas”**.

Mi nombre es Edna Lizbeth Robles Valenzuela y mi trabajo consiste en investigar cuál es la mejor alimentación para un niño con síndrome nefrótico, para que los niños se sientan mejor y la enfermedad se cure pronto.

Te daré más información y te invito a formar parte de este estudio de investigación. Puedes elegir si participar o no, y en caso de que decidas participar, también puedes dejarlo en cualquier momento. Tus padres conocen también del estudio, y ellos también tienen que aceptar que tú participes.

Puedes tomar tu tiempo para decidir, no necesitas dar una respuesta inmediata y lo puedes discutir con alguien de tu confianza, así como preguntarme cualquier duda que tengas sobre algo que no entiendas, y yo con gusto te contestaré.

Los niños con síndrome nefrótico tienen el riesgo de sufrir desnutrición, porque debido a su enfermedad pierden nutrientes importantes para el crecimiento, por lo que queremos saber qué tipo de alimentación es adecuada para niños como tú. El estudio lo estamos haciendo en niños de 2 a 10 años, que tienen la misma enfermedad que tú y que asisten a este hospital, es por eso que te hemos elegido a ti para participar.

No es obligatorio que participes, y el hecho de que decidas no hacerlo no cambiará las atenciones que recibirás en un futuro en este Hospital. Además, en caso de que decidas participar y después cambies de opinión, también es posible abandonar este estudio.

Parte de tu participación será seguir la alimentación que se te recomiende durante el tiempo que estés en el hospital, así como dar una muestra de heces fecales la cuál analizaremos para conocer más sobre el efecto que tendrán los alimentos en tu cuerpo, así como muestras de sangre y orina para observar cambios que puedan darse, así sabremos cómo mejoras en tu enfermedad.

Todos estos procedimientos se hacen de manera normal en todos los niños que tienen tu enfermedad, por lo que no recibirás molestias innecesarias (especialmente en la extracción de sangre, que puede ser un poco dolorosa). Los alimentos que recibas, serán alimentos comunes, sólo cambiará el tipo y la cantidad que consumes.

Como se mencionó antes, queremos conocer la mejor manera de ayudarte a curarte pronto mediante los alimentos, por lo que si participas estarás ayudando para

que tú y otros niños con tu enfermedad puedan recibir los cuidados necesarios para que mejoren en su enfermedad. Una vez que tengamos más conocimiento en esto, yo misma estaré dispuesta a darte recomendaciones en tu alimentación que podrás llevarte a tu casa, lo mismo harán los doctores que te atienden para que te sientas mejor.

Es importante que sepas que los datos que se obtengan de esta investigación los conoceremos sólo los que participan en ella, nadie más sabrá que estás participando ni compartiremos tu información. Cuando la investigación finalice, les daremos a conocer a tus padres los resultados obtenidos.

Sé que puedo elegir participar en la investigación o no hacerlo. Sé que puedo retirarme cuando quiera. He leído esta información me la han explicado claramente y la entiendo. Me han respondido las preguntas y sé que puedo hacer preguntas más tarde si las tengo. Entiendo que cualquier cambio será platicado conmigo.

Acepto participar en la investigación.

Nombre: _____

Firma: _____

Fecha: _____

APÉNDICE 3. Ejemplo de uno de los planes alimenticios otorgados a los pacientes con síndrome nefrótico.



Dieta Normal (5 años) Síndrome Nefrótico

	DESAYUNO	COLACION	COMIDA	COLACION	CENA
Día 1	1 Licuado de plátano: 1 taza de leche entera, 1 plátano picado con 2 cucharaditas de miel de abeja. 1 pan tostado con 1 cucharadita de mantequilla.	1 manzana chica picada en cuadritos con 2 cucharaditas de miel.	Arroz integral al vapor (½ taza) con 2 cucharaditas de mantequilla. Ensalada de pollo (1 taza) de lechuga, tomate, zanahoria rallada y 1/3 de aguacate, con 25 g de pollo cocido.	1 taza de fruta de temporada picada en cuadritos con 4 cucharaditas de media crema y 2 cucharaditas de azúcar.	2 tazas de papaya picada. 5 galletas integrales.
Día 2	1 taza de leche entera. 1 huevo cocido (duro). 1 taza de papaya picada, con 1/3 taza de hojuelas de maíz y 2 cucharaditas de miel.	1 pera mediana.	1/2 taza de Calabacitas cocidas, con 1 cucharadita de aceite vegetal. 3 tostadas con 1 aguacate.	1 taza de fruta picada.	1 taza de puré de papa con mantequilla. 1 taza de jugo de naranja natural con 2 cucharaditas de azúcar.
Día 3	1 ½ pera picada. 2 pan tostado con 2 cucharaditas de mantequilla.	1 taza de papaya picada con 2 cucharaditas de crema y 2 de azúcar. 1 mango picado.	2 tacos de nopales a la parrilla: 2 tortillas de maíz con 1 taza de nopales cocidos a la plancha, con tomate y cebolla, 40 g de queso panela y 2 cucharaditas de aceite vegetal.	1 taza de gelatina.	1 plátano picado con 3 cucharaditas de media crema. 1 taza de leche entera
Día 4	1 taza de leche entera 2 tortillas de maíz con salsa de tomate (natural o puré de tomate rebajado) frito con 1 cucharadita de aceite.		1 taza de puré de papa con 2 cucharaditas de mantequilla. 30 g de carne deshebrada. Ensalada de verduras (1 taza de tomate y lechuga y 2/3 de aguacate).	2 tazas de melón picado con 2 cucharaditas de crema y 2 cucharaditas de azúcar.	2 manzanas pequeñas con 2 cucharaditas de miel de abeja.
Día 5	1 taza de leche entera ¾ de taza de avena cocida (con agua) y 2 cucharaditas de azúcar. 1 plátano.	1 manzana pequeña picada con 2 cucharaditas de miel.	1 taza de espagueti con 6 cucharaditas de media crema y champiñones y 30 g de carne molida. ½ taza de verduras cocidas (brócoli, zanahoria, calabaza).	1 taza de fruta fresca picada.	1 mango picado con 3 cucharaditas de media crema y 2 cucharaditas de azúcar.