

Anticuerpos monoclonales en la evaluación de enzimas del ribete estriado yeyunal de lactantes con diarrea persistente

Magdalena Araya Q.¹; Julio Espinoza M.¹; Francisco Alliende G.¹; M. Jesús Rebollo G.²; Oscar Brunser T.¹; Francisco Barrera Q.²; Buford Nichols³

Evaluation of microvilli enzymes by monoclonal antibodies in infants with longstanding diarrhea

Expression of small intestine microvilli enzymes lactase, sucrase-isomaltase, maltase and aminopeptidase by monoclonal antibodies was studied in biopsies of yeyunal mucosa from eight infants (age 2 to 12 months) and two toddlers (aged 16 and 33 months) with persistent diarrhea. Results were compared with clinical findings, mucosal morphology (light microscopy), disaccharidase activities (Dahlqvist), and histochemical expression of lactase. Aminopeptidase was expressed by monoclonal antibodies in all patients, both in crypts and villi. Lactase expression by monoclonal antibodies in villi was in agreement with results of histochemical and Dahlqvist methods while in only two childrens the corresponding enzymes became expressed by monoclonal antibodies in crypts. Sucrase-isomaltase expression by monoclonal antibodies in villi tended to be more frequent in patients where mucosal morphology was best preserved, except for one case who had a primary enzyme deficiency, even though they were detected in the crypts of all but two cases that also showed no expression in their villi. Evaluation of microvilli enzymes by monoclonal antibody expression in patients with secondary damage to the small intestine may be useful, because it may enhance the understanding of impairment and repair mechanisms and help to estimate prognosis of patients with longstanding diarrhea.

Key words: diarrhea persistent, infant, intestinal mucosa, microvilli antibodies monoclonal, aminopeptidases, disaccharidases.

El diagnóstico y tratamiento de pacientes con diarrea persistente grave han mejorado considerablemente en los últimos años, sin embargo, ella continúa siendo responsable de parte importante de la letalidad por enfermedad diarreica, causa desnutrición severa y su tratamiento tiene alto coste en alimentaciones especiales y largas hospitalizaciones¹⁻⁴.

Un factor frecuente de diarrea persistente es la intolerancia a hidratos de carbono, incluyendo lactosa, sacarosa y almidones. La deficiencia enzimática puede durar períodos prolongados, favoreciendo la pérdida de nutrientes, aparición o agravamiento de la desnutrición y pululación

bacteriana. Estas intolerancias se evalúan principalmente mediante medición del pH y sustancias reductoras en deposiciones, estimación de la actividad enzimática en la mucosa intestinal, curvas de tolerancia al hidrato de carbono que se supone ofensor y pruebas clínicas de privación dietética de éste. Desde que se dispone de anticuerpos monoclonales (AcM) para las enzimas del ribete estriado, se ha abierto una nueva forma de evaluar las lesiones de la mucosa intestinal, que podría facilitar la comprensión de los mecanismos de daño y reparación de dichas enzimas. Con ellos y otros métodos de estudio sobre la biología molecular de las enzimas se ha podido determinar que las fallas congénitas de disacaridasas, especialmente sacarasa, pueden obedecer a errores en la síntesis, inserción o activación de la enzima en la membrana. Sin embargo, la información sobre los cambios que ocurren en casos no congénitos es muy escasa⁵⁻⁹. El propósito de esta experiencia fue evaluar la información obtenida con el método de

1. Unidad de Gastroenterología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

2. Servicio de Pediatría, Hospital San Borja-Arriarán.

3. Children Nutrition Research Center (CNRC), Texas, Houston, USA.

Financiado parcialmente por FONDECYT 194-0335.

identificación de enzimas del ribete estriado mediante anticuerpos monoclonales, en comparación con otros más corrientes.

Material y Métodos

Se estudiaron los diez lactantes con diarrea persistente de intensidad moderada a grave en que se efectuó una biopsia de yeyuno como parte de su evaluación durante el año 1993. La muestra de mucosa yeyunal se obtuvo en el ángulo de Treitz mediante una cápsula pediátrica de Crosby-Kugler de doble puerta (Quinton Instruments, Seattle, WA). Uno de los trozos se dividió en dos: una de las mitades se fijó en reactivo Bouin e incluyó en parafina, para cortarla en series, teñirla con hematoxilina-eosina y estudiarla por microscopía de luz; los resultados morfológicos se tradujeron a una escala de 1 a 4, en que uno corresponde a la estructura normal y cuatro al aplastamiento total de la superficie, con pérdida de vellosidades, hipertrofia de las criptas e intensa infiltración celular de la lámina propia ("mucosa plana")¹⁰. La otra mitad se incluyó en Tissue-Tek OCT Compound (Elkhar, IN), se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se mantuvo a -70° C hasta el momento en que se obtuvieron cortes de 5° con un criostato a -20° C, que fueron fijados en acetona fría y secados a temperatura ambiente; los cortes se incubaron con anticuerpos monoclonales contra lactasa, sacarasa, maltasa y aminopeptidasa, provistos por uno de los autores (B. N.). El procedimiento usado ha sido descrito⁹ y, en resumen, consistió en una técnica de emparedado en que se bloquea la tinción inespecífica con 0,2% de seroalbumina bovina, se incuba el corte con el anticuerpo monoclonal correspondiente y luego se realiza una tinción de contraste con azul de Evans. Como controles positivos se usaron cortes de biopsias de tejido sano obtenidas de pacientes que requirieron un procedimiento quirúrgico con apertura o resección del intestino delgado. Otros cortes a los que no se agregó el anticuerpo sirvieron como controles negativos. Los resultados se expresaron como presencia o ausencia de producto de reacción, de acuerdo con el porcentaje de la superficie epitelial que mostraba reacción positiva, para lo cual se construyó una escala de 1 a 4, donde 1 indica 67 a 100%; 2 de 34 a 66%, 3 de 1 a 33% y 4 de 0%, respectivamente, de la reacción observada en tejidos de sujetos normales. En las muestras de mucosa donde la reacción sobre la superficie epitelial no era continua, la distribución se describió como *parcetar*. El corte adyacente a aquel que se incubaría con anticuerpos monoclonales anti-lactasa se hizo de 10 µ de espesor y fue empleado en la determinación histoquímica de lactasa, con medio de incubación preparado de acuerdo al método de Lojda y Kraml¹¹; se incubó por 20 minutos a 37° C, luego fue lavado dos veces en cloruro de sodio al 0,85%, fijado en formaldehído al 4%, lavado otras dos veces en agua deionizada, montado en glicerol con solución salina-tampón fosfato (1: 1 volumen a volumen) y evaluado con microscopio de luz, definiendo la intensidad del color obtenido en una escala de 1 a 4, semejante a la descrita para la evaluación de los anticuerpos monoclonales.

En otro trozo de la biopsia se midió la actividad de lactasa, sacarasa-isomaltasa y maltasas con el método de

Dahlqvist¹². Se definieron como normales actividades mayores o iguales a 10 UI de lactasa 40 UI de sacarasa-isomaltasa y 90 UI de maltasa. Los resultados se expresaron en escala de 1 a 5, asignando calificación 1 al equivalente a 100% del promedio normal de actividad; 2 entre 67 y 99%; 3 entre 34 y 66%; 4 entre 1 y 33% y 5 a ausencia de actividad enzimática.

En todos los niños se realizaron, además, estudios etiológicos en busca de enteropatógenos bacterianos, parasitarios y rotavirus, y los exámenes considerados necesarios para su correcto manejo clínico.

Resultados

Las características clínicas más relevantes de los pacientes se exponen en la tabla 1. En el caso 1 el diagnóstico de egreso fue heterocigoto de deficiencia congénita de sacarasa-isomaltasa; en 3 años de seguimiento ha evolucionado con alzas y bajas de los niveles de dicha enzima, fluctuando entre menos de 50% de lo normal a no detectable, caso este último en que se hacía muy sensible a pequeñas cantidades de sacarosa en la dieta. El paciente 5 fue el único en que se aislaron agentes etiológicos (*Cryptosporidium* sp. en una ocasión y *Escherichia coli* enteropatógeno en otra); es también el único en que la microscopía de luz mostró daño moderado (grado 3), de tipo agudo, y las disacaridasas tuvieron valores entre 1 y 2 en todas las formas de medición. En el caso 10 se sospechó inicialmente intolerancia a proteína de leche de vaca, pero los estudios dieron resultado negativo, excepto la IgA secretoria en saliva, que no era detectable. En los otros dos casos en que se planteó intolerancia a proteína de leche de vaca (pacientes 4 y 7) las manifestaciones clínicas eran muy sugerentes de este diagnóstico y desaparecieron completamente cuando se suspendieron la leche y productos lácteos de la dieta, pero no fue posible seguirlos. El caso 6 era un niño con diarrea persistente grave, refractaria al tratamiento médico, que requirió alimentación parenteral casi permanentemente y finalmente falleció alrededor de los dos años, con desnutrición severa.

La evaluación de la mucosa intestinal desde el punto de vista morfológico, histoquímico, por inmunofluorescencia y de la medición de la actividad enzimática aparecen en la tabla 2. En ella se incluyen los resultados obtenidos en las vellosidades con anticuerpos monoclonales. En las criptas sólo se obtuvieron resultados positi-

Tabla 1

Características y diagnósticos de ingreso de pacientes con diarrea persistente

n	Edad (meses)	Sexo	Diagnóstico al ingreso	Peso/Edad (% NCHS)	Alimentación*
1	10	Masc	DN/IHC	60,0%	Pollo y verduras
2	10	Fem	DN/IHC	48,5%	Dieta modular
3	2	Masc	DN/IHC	75,4%	AI 110 ^R
4	11	Masc	IPLV	92,9%	Prosobee ^R
5	8	Fem	DN/Cry/EPEC	76,0%	Pollo y verduras
6	12	Masc	DN/DP	56,2%	Pregestimil ^R
7	10	Fem	DN/IPLV	42,7%	ADN ^R
8	16	Fem	EC	76,9%	S/lactosa
9	4	Masc	IHC	99,3%	ADN ^R
10	33	Masc	IPLV	95,1%	S/leche de vaca

IHC: intolerancia a hidratos de carbono; DN: desnutrición; IPLV: intolerancia a proteína de leche de vaca; Cry: *Cryptosporidium*; EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena; DP: diarrea persistente; EC: enfermedad celiaca. S/sin. Peso/Edad: porcentaje del percentil 50 de las tablas NCHS.

* Al momento de la biopsia

Tabla 2

Estudio morfológico y enzimático en biopsias yeyunales de pacientes con diarrea persistente

n	Diagnóstico al egreso	ML	HL	Ac. monoclonales				Dahlqvist		
				L	S	M	A	L	S	M
1	ICS/DN	2	3	3	4	3	3	1	3	2
2	DP/DN/IHC	1-2	1	1	4	1	1	1	5	2
3	DP/DN/IHC	2-3	1	1	1	1	2	1	2	1
4	IPLV/DN	2-3	1	2	1	3	1	1	2	1
5	EPEC/Cry/DN	3	1	1	1	1	2	1	2	1
6	DRT/DN/IL	2-3	4	3	2	3	1	3	3	3
7	IPLV/IL	4	4	4	1	4	1	3	3	2
8	EC/IL	4	4	3	1	2	1	3	3	2
9	DP/DN/IHC	2	1	1	1	1	1	1	1	1
10	Def IgAs	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ICS: intolerancia congénita a la sacarosa; DN: desnutrición; IHC: intolerancia a hidratos de carbono; DP: diarrea persistente; IPLV: intolerancia a proteína de leche de vaca; EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena; Cry: cryptosporidiosis; IL: intolerancia a la lactosa; DRT: diarrea refractaria al tratamiento; EC: enfermedad celiaca; Def IgAs: deficiencia de IgA secretoria; ML: microscopía de luz, 1 a 4; HL: histoquímica de lactasa; Ac: anticuerpos : 1 = 66 - 100%, 2 = 34 - 66%, 3 = 1 - 33%, 4 = 0; Método de Dahlqvist: 1 = 100%, 2 = 67-99%, 3 = 34-66%, 4 = 1-33%, 5 = 0. L: lactasa; S: sacarasa; M: maltasa; A: aminopeptidasa.

vos a histoquímica y anticuerpos monoclonales para lactasa en los pacientes 3 y 9, en que la reacción correspondió al valor 3 en la escala de 1 a 4; los resultados con anticuerpos monoclonales para sacarasa-isomaltasa fueron positivos en las criptas en todos los casos menos los pacientes 1 y 2, en los que tampoco se observó

expresión en las vellosidades. Los anticuerpos monoclonales contra maltasa dieron resultados positivos de forma parcelar, en algunas criptas, de los pacientes 3, 9 y 10 con calificación 3. La aminopeptidasa fue positiva, en tasas normales, en todos los casos, tanto en las vellosidades como en las criptas.

Comentario

Los pacientes que se comentan sufrían diarrea prolongada y daño morfológico del intestino delgado de distinta magnitud, de tipo secundario. En tres no se hizo diagnóstico etiológico, y siete de diez sufrían desnutrición grave. De los bien nutridos, uno estaba en dieta sin leche de vaca desde hacía un mes y mostraba franca recuperación clínica y nutricional; en otro las manifestaciones hacían sospechar una intolerancia a sacarasa-isomaltosa que luego no se confirmó y en el tercero la enfermedad nunca afectó el estado nutricional durante toda la evolución.

Cuando la actividad de lactasa era baja con el método de Dahlqvist, la reacción con el anticuerpo monoclonal correspondiente era también escasa o nula. Salvo en el paciente 1, cuya actividad de lactasa era normal con el método de Dahlqvist, mientras —como en los demás— la reacción con anticuerpos monoclonales era baja y también era mayor la actividad sacarásica con el primer método que con el segundo; en los casos restantes los anticuerpos monoclonales resultaron ser más sensibles para detectar sacarasa que el método enzimático. Podría pensarse que esto es lógico, pues estos anticuerpos monoclonales pesquisan todas las moléculas de enzima producidas, aunque no sean activas, ya que el epítipo no está relacionado al sitio activo. La reacción con anticuerpos monoclonales para aminopeptidasa, normal o ligeramente disminuida en todos los casos salvo el paciente 1, corresponde con lo observado desde el punto de vista clínico, pues a pesar de la seriedad de la enfermedad ninguno de los pacientes tenía problemas para manejar las proteínas que se les suministraban.

El paciente 1 mostró un comportamiento distinto al de los demás casos estudiados; mientras la arquitectura de su mucosa intestinal presentaba daño leve a moderado, no específico, los dos métodos utilizados para demostrar sacarasa-isomaltasa en el ribete estriado dieron resultados profundamente alterados. Tomando en cuenta la información publicada acerca de casos congénitos de deficiencia de esta enzima⁵⁻⁸, estos resultados podrían ser explicados postulando que el paciente tenga una información genética alterada y que construya moléculas enzimáticas defectuosas, no pesquisables por el epítipo que liga el anticuerpo monoclonal correspondiente,

pero que no obstante tendrían intacta la región del sitio activo. Empleando juegos de doce anticuerpos monoclonales contra sacarasa-isomaltasa de seres humanos adultos, se ha demostrado que las células de las vellosidades expresan una enzima distinta que la de las criptas, pero ambas tendrían un precursor común y su expresión dependería del estado de maduración de los enterocitos de donde provienen¹³. Con el anticuerpo monoclonal utilizado por nosotros no se detectó sacarasa-isomaltasa en vellosidades y criptas. Los resultados de este estudio difieren con otros obtenidos en niños desnutridos, con diarrea crónica, en los que todos los pacientes tenían expresión de sacarasa-isomaltasa en vellosidades y criptas, independientemente del grado de daño morfológico que presentarían⁹.

Los anticuerpos monoclonales para enzimas del ribete estriado aportan información novedosa acerca del comportamiento de éstas. Su utilización en condiciones clínicas que representen modelos de daño secundario permitirá entender mejor los mecanismos de la lesión y reparación de la mucosa intestinal y, eventualmente, pueden servir para estimar el pronóstico de la afección intestinal.

Resumen

En las biopsias de mucosa yeyunal de diez pacientes con diarrea persistente se estudió la expresión de las enzimas lactasa, sacarasa-isomaltasa, maltasa y aminopeptidasa, del ribete estriado, mediante anticuerpos monoclonales y los resultados se contrastaron con los síntomas y signos clínicos, morfológicos (microscopía de luz), actividad disacaridásica (Dahlqvist) y la expresión de lactasa por un método histoquímico. Se obtuvo expresión de aminopeptidasa en criptas y vellosidades de todos los niños, en criptas y vellosidades, mediante los anticuerpos correspondientes. La expresión por anticuerpos, histoquímica y actividad enzimática (Dahlqvist) fueron concordantes para la expresión de lactasa en las vellosidades, mientras en las criptas se registró positividad sólo en dos casos. En las vellosidades los anticuerpos monoclonales tendieron a producir más reacciones positivas para sacarasa-isomaltasa en los casos con menos daño morfológico, excepto en uno de deficiencia primaria; en las criptas el resultado fue posi-

tivo en todos, menos dos pacientes, en los que tampoco hubo positividad en las vellosidades. Los anticuerpos monoclonales pueden aportar información útil para entender mejor los mecanismos de daño y reparación de las enzimas del ribete estriado y estimar el pronóstico de la lesión.

(**Palabras clave:** diarrea persistente, lactante, mucosa intestinal, microvellosidades, anticuerpos monoclonales, aminopeptidasas, disacarasidas.)

Referencias

1. *Avery GB, Villavicencio O, Lilly J, Randolph J:* Intractable diarrhea in early infancy. *Pediatrics* 1968; 41: 712-722.
2. *Lebenthal E:* Intractable diarrhea of infancy. *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy*. Segunda edición. NY Raven Press 1989: 1077-1091.
3. *Girault D, Goulet O, Le Deist F, et al:* Intractable infant diarrhea associated with phenotypic abnormalities and immunodeficiency. *J Pediatr* 1994; 125: 36-42.
4. *Barrera F, Curotto D, Ayendaño P, Espinoza A, Romero G, Escobar S:* Diarrea refractaria. *Rev Chil Pediatr* 1989; 55: 316-320.
5. *Hauri HP, Quaroni A, Isselbacher KJ:* Monoclonal antibodies to sucrase-isomaltase: probes for the study of postnatal development and biogenesis of the intestinal microvillus membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 6629-6633.
6. *Quaroni A, Isselbacher KJ:* Study of cell differentiation with monoclonal antibodies to intestinal cell surface components. *Dev Biol* 1985; 111: 267-279.
7. *Hauri HP, Roth J, Sterchi E, Lentze M:* Transport to cell surface of intestinal sucrase-isomaltase is blocked in the Golgi apparatus in a patient with congenital sucrase-isomaltase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4423-4427.
8. *Naim H, Sterchi E, Roth J, Hauri HP:* Congenital sucrase-isomaltase deficiency in man. Evidence for different mutations interfering with the intracellular transport of sucrase-isomaltase. *Experientia* 1988; 44: 64 (abstract).
9. *Nichols B, Curraza F, Nichols V, et al:* Mosaic expression of brush border enzymes in infants with chronic diarrhea and malnutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 14: 371-387.
10. *Baker S:* Geographical variations in the morphology of the small intestinal mucosa in apparently healthy individuals. *Pathol Microbiol* 1973; 39: 222-234.
11. *Lajda Z, Kraml J:* Indigogenic methods for glucosides. III An improved method with 4-Cl-5-Br-3-Indotyl-B-D- Fucoside and its application in studies of enzymes in the intestine, kidney and other tissues. *Histochemie* 1971; 25: 195-207.
12. *Dahlqvist A:* Methods for assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem* 1964; 7: 18-25.
13. *Beaulieu J, Nichols B, Quaroni A:* Posttranslational regulation of sucrase-isomaltase expression in intestinal crypt and villus cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 2000-2011.

AVISO A LOS AUTORES

Con el objeto de dar prioridad a los trabajos de investigación, en vista de las limitaciones de espacio de la Revista Chilena de Pediatría, el Comité Editorial ha acordado restringir la impresión de casos clínicos a un máximo de dos por cada número.