

Permeabilidad intestinal en el primer año de vida. Efecto de la diarrea

M. Gotteland, S. Cruchet Muñoz, M. Araya Quezada, J. Espinoza Madariaga, O. Brunser Tesarschü

Resumen. *Objetivos:* La permeabilidad de la mucosa intestinal a la lactulosa y al manitol se evaluó en forma longitudinal en niños de 1, 3-4 y 11-12 meses de edad, y en los episodios de diarrea que sufrieron durante este período. *Métodos:* La excreción urinaria de estos azúcares se determinó en orina de 5 horas mediante cromatografía de gases. *Resultados:* Los resultados muestran una disminución de la excreción de lactulosa, significativa a los 11-12 meses ($p=0,02$). Ningún cambio fue detectado en la excreción de manitol, a pesar de una tendencia a la disminución. La tasa de excreción de lactulosa/manitol no se modificó durante el período de seguimiento. Sin embargo, se observó un aumento considerable de esta tasa durante los episodios de diarrea, debido esencialmente a un aumento de la excreción de lactulosa. *Conclusión:* Se plantea la hipótesis de que la reducción de la excreción de lactulosa entre 1 y los 11-12 meses de edad podría reflejar el fenómeno de maduración de la barrera intestinal, mientras que el aumento de la permeabilidad detectado durante la diarrea se debe al daño ocurrido en el epitelio digestivo.

An Esp Pediatr 1998;49:125-128.

Palabras clave: Diarrea; Niños; Permeabilidad intestinal; Lactulosa; Manitol.

INTESTINAL PERMEABILITY DURING THE FIRST YEAR OF LIFE. EFFECT OF DIARRHEA

Abstract. *Objective:* The permeability of the intestinal mucosa to lactulose and mannitol was explored longitudinally in infants at 1, 3-4 and 11-12 months of age. This was also evaluated during the episodes of diarrhea that they suffered during follow-up. *Patients and methods:* Sugar excretion was measured by gas chromatography in five-hour urine samples. *Results:* A decrease in lactulose excretion was observed, which became significant at 11-12 months of age ($p = 0.02$). No changes were detected in mannitol excretion, although this showed a tendency to decrease. The lactulose/mannitol (L/M) ratio remained unchanged. During the 15 episodes of diarrhea observed in these infants during the 12 month follow-up, a considerable increase in this ratio was seen, due mainly to increased lactulose excretion. *Conclusions:* It is hypothesized that the decrease in lactulose excretion between one and 11-12 months of age is part of the maturational process of the intestinal barrier, while diarrhea results in increased permeability due to damage to the absorptive epithelium.

Key words: Diarrhea. Infant. Intestinal permeability. Lactulose. Mannitol.

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

Este estudio fue financiado por FONDECYT, Grant N° 193-0960.

El Dr. Martin Gotteland era recipiente de una Beca Dr. Abraham Stekel.

Correspondencia: Martín Gotteland, PhD., Unidad de Gastroenterología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA); Universidad de Chile, JP Alessandri 5540, Santiago, Chile.

Recibido: Julio 1997

Aceptado: Abril 1998

Introducción

La mucosa intestinal actúa como una barrera selectiva, que permite la absorción de los nutrientes presentes en el lumen y limita el acceso de patógenos, toxinas y antígenos de la dieta a la circulación sistémica^(1,2). La permeabilidad de la mucosa aumenta fisiológicamente en algunas especies durante el período neonatal a fin de permitir el transporte de IgA del calostro de la madre al niño, lo cual constituye el fenómeno de adquisición de la inmunidad pasiva⁽³⁾. El fin de este proceso ha sido denominado “cierre intestinal” (“gut closure”), está determinado por factores dietéticos (destete), hormonales y probablemente está programado genéticamente. En el ser humano, el período en el cual ocurre el cierre intestinal no está claramente determinado; sin embargo, la permeabilidad intestinal parece ser mayor en los recién nacidos y en los prematuros^(4,5).

La integridad de la barrera mucosal intestinal también puede estar alterada en situaciones patológicas que se asocian con lesiones del epitelio. Tales alteraciones han sido detectadas en modelos animales de daño intestinal generado por agentes farmacológicos, nutricionales o infecciosos, y también en humanos desnutridos, en la enfermedad celíaca, en las patologías inflamatorias crónicas del intestino y la gastroenteritis^(6,7). Se ha postulado que el paso de material antigénico a través de la mucosa intestinal en dichas patologías, como consecuencia de alteraciones de la función de barrera, podría activar a las células inmunes presentes en el corion de la mucosa y, de esta manera, iniciar o mantener las lesiones del tejido⁽⁸⁾.

Por otra parte, el paso asintomático de bacterias, parásitos y virus a lo largo del tracto digestivo en los individuos que viven en un ambiente microbiológicamente contaminado, se asocia con cambios de la morfología y de la función absorbente de su mucosa intestinal^(9,10). No se sabe a qué edad este fenómeno empieza, ni cuales son sus repercusiones. Para estudiar estos aspectos, seguimos una cohorte de niños de bajo nivel socio-económico durante su primer año de vida, evaluando su permeabilidad intestinal a distintas edades, y durante los eventuales episodios de diarrea.

Pacientes y métodos

Pacientes

En el Consultorio La Faena, un área de bajo nivel socio-económico ubicada en el este de Santiago, se reclutaron niños de sexo masculino en su primer mes de edad. Los padres o representantes legales de los niños fueron informados de los objeti-

Tabla I Excreción de lactulosa y de manitol durante el primer año de vida (n= 39)

	Lactulosa %*	Manitol %*	L/M%
mes 1	0,45(0,38-0,52)**	11,63(8,99-14,28)	5,54(4,33-6,74)
meses 3-4	0,35(0,29-0,41)	9,34(7,76-10,91)	5,57(4,09-7,04)
meses 11-12	0,32(0,27-0,46)	8,92(7,84-10,00)	4,19(3,35-5,03)

* Los resultados están expresados como el promedio de la excreción y el CI 90%

** $p=0,021$ entre 1 y 11-12 meses por la prueba de Tukey,

vos del proyecto y dieron su consentimiento por escrito para autorizar su participación en el estudio. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Se incorporaron aproximadamente 9 niños al estudio cada mes durante un año. El estatus nutricional de estos niños era normal en el momento de la admisión y en ningún caso se deterioró durante el período de seguimiento. La prueba de permeabilidad intestinal a la lactulosa/manitol se realizó 3 veces durante el período: la primera en el mes siguiente al nacimiento, mientras los niños estaban amamantados; la segunda entre los 3 y 4 meses de edad, cuando la mayoría de las madres vuelven a su trabajo, destetan a los niños, y empiezan a darles puré de verduras y/o de frutas; y finalmente a los 11-12 meses, cuando los niños estaban consumiendo alimentos sólidos, y eran considerados como plenamente expuestos a la contaminación microbiológica del ambiente. La prueba se realizó también cuando se detectó un episodio de diarrea; éste era definido de acuerdo con los criterios de la OMS⁽¹¹⁾. Los datos antropométricos y dietéticos y sobre la ocurrencia de diarrea, se obtuvieron durante controles regulares realizados a lo largo del seguimiento. Se excluyeron del estudio los niños con otras patologías que pudieran alterar la permeabilidad intestinal, el metabolismo de los hidratos de carbono o la excreción renal de los marcadores.

Prueba de permeabilidad intestinal.

Después de un ayuno de 4 a 6 horas los niños tomaron 2ml/kg de una solución acuosa que contenía 50 mg/ml de lactulosa (Sigma Chemical Co. St.Louis, Mo, USA) y la misma cantidad de manitol (Merck Chemical Co., Darmstadt, RFA), con una osmolalidad de 420,5 mosm/L. Se recolectó la orina durante las 5 horas siguientes, usando recolectores adhesivos (Urogard, Terumo Corp. Tokio, Japón) que contenían como agente bacteriano 0,1 ml de thymersal al 10%. A partir de la tercera hora de la prueba los niños pudieron tomar agua, con el fin de estimular la diuresis. Al final del período de recolección se midió el volumen de orina emitido y se conservó una alícuota a -30°C. El contenido en manitol y lactulosa de las muestras se analizó por cromatografía de gases, usando α -metil glucosa y turanosa (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA) como estándares internos⁽¹²⁾. Muestras de orina control adicionadas con cantidades conocidas

de lactulosa y de manitol fueron procesadas y analizadas en paralelo. Para la derivatización de los azúcares, 10 μ l de orina se mezclaron con igual volumen de 0,2 mg/ml de turanosa y 2 mg/ml de α -metil glucosa en presencia de 25 μ l de piridina, los que fueron evaporados hasta sequedad en una corriente de nitrógeno. El residuo se disolvió con 75 μ l de 5 mg/ml metoxiamina (Sigma Chemical Co., St.Louis. MO, USA) en piridina anhidra, y fue calentado a 55°C durante dos horas. Las metiloximas resultantes fueron sililadas con 25 μ l de N,O-bis (trimetilsilil)-trifluoroacetamido que contenían 5% trimetilclorosilano (Alltech, Deerfield, IL, USA) durante una hora a 60°C. Los solventes y reactivos fueron evaporados hasta sequedad bajo nitrógeno y los residuos fueron disueltos en 200 μ l de hexano. Dos μ l de esta solución se inyectaron en modo "split" en un cromatógrafo de gas Varian 3600 equipado con un inyector split/splitless y un detector con ionización de llama (Varian Instruments, San Fernando, CA, USA). Se utilizó una columna capilar de silicio fundido (10 m x 0,32 mm) recubierta con fase tipo AT-1701 (Alltech, Deerfield, IL, USA), utilizando nitrógeno ultrapuro como gas portador. Las temperaturas de detección fueron 160°C y 240°C para el manitol y la lactulosa, respectivamente. La variación entre-ensayos de estas mediciones fue inferior al 15%. Los resultados se expresaron como porcentaje de las cantidades de lactulosa y de manitol ingeridos. Para evaluar la función renal se midió la excreción de creatinina urinaria usando un kit comercial (Sigma Chemical Co., St Louis. MO, USA).

Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron usando MANOVA y la prueba de Tukey por muestras de tamaño desigual. Los resultados se expresaron como promedio \pm intervalo de confianza 90% (CI 90%).

Resultados

De los 82 niños originalmente reclutados en el estudio, se realizó la segunda prueba de permeabilidad en 54 (65,8%) y la tercera solamente en 39 (47,6%). Durante ese período fueron detectados 22 episodios de diarrea, y de éstos, 15 ocurrieron en niños en quienes las tres pruebas fueron completadas (edad promedio al momento de la diarrea $7,5 \pm 2,0$ meses). La excreción urinaria de lactulosa y de manitol en estos niños aparece en la tabla I.

Se observó una disminución de la excreción urinaria de lactulosa durante el seguimiento (MANOVA $F = 4,11$; $p = 0,02$), mientras que la excreción de manitol, a pesar de mostrar una tendencia a la disminución, no varió significativamente (MANOVA $F = 2,05$; $p = 0,16$). Estos resultados se tradujeron en una tasa inalterada de excreción de L/M durante el curso del estudio.

Durante los episodios de diarrea, el porcentaje de excreción de lactulosa, de manitol, y la tasa L/M fueron de (promedio e IC 90%) 0,61% (0,49-0,73), 6,93% (4,94-9,93) y 12,52% (8,45-16,59), respectivamente (Fig. 1) lo cual sugiere una importante alteración de la mucosa intestinal (MANOVA $F = 10,07$; $p = 0,00005$) que se debió a un aumento considerable de la excreción urinaria de lactulosa ($p = 0,0005$).

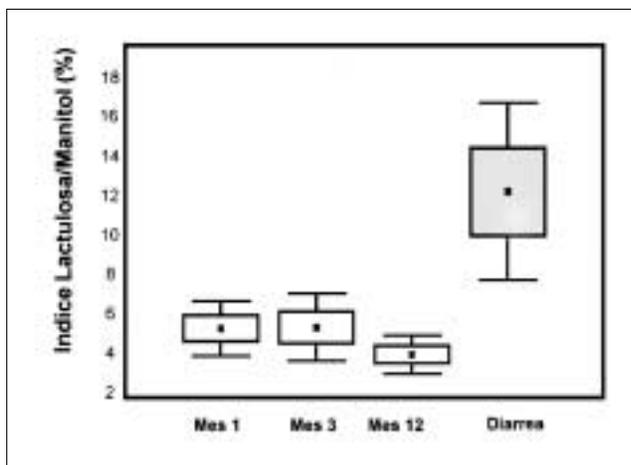


Figura 1. Efecto de la diarrea sobre el índice L/M; comparación con la medición del índice L/M durante el primer año de vida.

Discusión

Los niños de los países en vía de desarrollo, donde la contaminación microbiológica es alta, están sometidos desde sus primeros días de vida, al paso continuo de enteropatógenos a lo largo de su tubo digestivo^(9,13). Este fenómeno es, generalmente, asintomático mientras están amamantados, ya que están protegidos por la leche materna⁽¹⁴⁾. Sin embargo, después del destete, empezarán a aparecer cambios histológicos y funcionales que resultan en una disminución progresiva de la absorción de nutrientes, la cual puede llegar a ser de considerable magnitud en los adultos de áreas muy contaminadas^(10,15). La demostración de este daño ha requerido métodos invasores, tales como biopsias intestinales, estudios de balance o intubación intestinal. Las pruebas de permeabilidad representan un método no invasor, simple y reproducible para evaluar el daño del epitelio intestinal o gástrico^(16,17), incluso en niños. Los marcadores de permeabilidad intestinal, tales como el polietilenglicol (PEG), el ⁵¹Cr-EDTA, y los mono- y disacáridos, incluyendo la lactulosa y el manitol, se usan en forma corriente para explorar estos aspectos⁽⁶⁾. Estas pruebas se basan en la observación de que la lactulosa es aparentemente transportada a través de las "tight junctions" del epitelio intestinal, mientras el manitol difundiría por poros de la membrana plasmática. Por lo tanto, el paso de lactulosa es considerado un índice del transporte paracelular, mientras que el de manitol lo es del transporte transcelular y de sus respectivas modificaciones⁽⁶⁾. Sin embargo, todavía existen dudas acerca de la interpretación de estas pruebas, ya que estudios recientes han sugerido para estos marcadores distintos mecanismos de transporte hacia la circulación, los cuales se relacionarían con fenómenos absorptivos por mecanismos de contracorriente y de arrastre por solvente a nivel de las vellosidades intestinales⁽¹⁸⁾.

En este estudio, a diferencia de otros efectuados en la misma área geográfica, la deserción fue muy alta; esto se explica por la necesidad de recolectar orina durante 5 horas, que gene-

raba bajos niveles de cumplimiento con los requerimientos de la prueba. Los niveles de lactulosa y manitol detectados en la orina de 5 horas de estos niños están dentro de los rangos reportados en la literatura^(4,18,19). La progresiva disminución de la excreción de lactulosa es significativa cuando los valores al mes de edad se comparan con los obtenidos a los 12 meses. Por otra parte, la excreción urinaria de manitol disminuye sólo ligeramente, sin que este cambio sea significativo. Consecuentemente, la tasa L/M no cambia durante el período de observación. En niños amamantados se ha descrito una reducción rápida del índice L/M durante la primera semana de vida, contrariamente a lo observado en niños que recibían una fórmula láctea con proteínas de leche de vaca parcialmente hidrolizadas^(17,18), lo cual podría representar una posible explicación para el fenómeno de sensibilización precoz a proteínas de la dieta observado en recién nacidos y especialmente en prematuros^(2,19,20). La lenta y progresiva disminución de la permeabilidad a la lactulosa hasta el año de edad que se observa en este estudio, no concuerda con las observaciones realizadas por Weaver⁽¹⁹⁾ y por Catassi⁽²¹⁾, ya que en nuestros niños no resultó en cambios de la tasa de L/M. Eso sugiere que el transporte de lactulosa a través de la mucosa intestinal durante el primer año de vida sigue una evolución bifásica, con una disminución rápida en los niños amamantados en los primeros días, seguida por una lenta reducción durante los meses siguientes. Si el paso de lactulosa realmente representa un marcador de la permeabilidad paracelular, es posible plantear la hipótesis de que durante los primeros días de vida hay cambios maduracionales de la permeabilidad que pueden ser asimilados al cierre intestinal; los cambios posteriores representarían el proceso progresivo de "apriete" del epitelio. Sin embargo, el significado funcional de estos cambios no está claro, ya que varios estudios sugieren que el paso transepitelial de estos marcadores no se correlaciona de manera sistemática con el de antígenos^(22,23).

Aunque se sabe que los diferentes agentes etiológicos tienen distinto efecto sobre la permeabilidad intestinal, como es por ejemplo, el caso de rotavirus comparado con *Yersinia*^(24,25), el número de episodios de diarrea infecciosa detectados en este estudio fue tan bajo, que no permitió realizar el análisis estadístico de los datos estratificados según el agente etiológico. El bajo número de episodios de diarrea infecciosa detectados en este estudio refleja la fuerte disminución de la incidencia de esta patología observada en Chile en los últimos años⁽²⁶⁾. En este cuadro, los efectos directos de los enteropatógenos incluyen lesiones del ribete estriado del epitelio y/o de las uniones intercelulares, aumento del recambio celular e inmadurez del epitelio. En modelos animales, esto contribuye a reducir la eficiencia de la barrera intestinal, lo cual resulta en el paso de macromoléculas hacia la circulación^(2,27,28). Esto también ha sido mostrado en niños con diarrea aguda y persistente⁽²⁹⁻³³⁾. Nuestros resultados apoyan resultados previos que han demostrado un aumento de permeabilidad intestinal a azúcares marcadores en diarrea.

Estos resultados muestran que durante el primer año de vida, la tasa de excreción L/M no se altera, mientras que la per-

meabilidad a la lactulosa disminuye, pero que las alteraciones importantes de la permeabilidad intestinal ocurren sólo durante episodios de diarrea. Tal alteración de barrera intestinal podría tener consecuencias sobre las respuestas inmunes locales del huésped.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Doctor J. Pino, Director del Consultorio La Faena, a las Sras. M. Figueroa y E. Fontecilla por su trabajo en la estación de campo, y al Dr. L. Dehennin (Fondation de Recherche en Hormonologie, Fresnes, France) por sus consejos técnicos acerca de la determinación de azúcares mediante cromatografía.

Bibliografía

- Sanderson IR, Walker WA. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology* 1993; **104**:622-639.
- Heyman M, Desjeux JF. Significance of intestinal food protein transport. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; **15**:48-57.
- Israel IJ, Simister N, Freiberg E, Caplan A, Walker WA. Immunoglobulin-G binding sites on the human foetal intestine: a possible mechanism for the passive transfer of the immunity from mother to infant. *Immunology* 1993; **79**:77-81.
- Weaver LT, Laker MF, Nelson R. Intestinal permeability in the newborn. *Arch Dis Child* 1984; **59**:236-241.
- Beach RC, Menzies IS, Clayden GS, Scopes JW. Gastrointestinal permeability changes in the preterm neonate. *Arch Dis Child* 1982; **57**:141-145.
- Bjarnason Y, Macpherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995; **108**:1566-1581.
- Behrens RH, Lunn PG, Northrop CA, Hanlon PW, Neale G. Factors affecting the integrity of the intestinal mucosa of Gambian children. *Am J Clin Nutr* 1987; **45**:1433-1441.
- Rossi TM, Lebenthal E. Pathogenic mechanisms of protracted diarrhea. *Adv. Pediatr* 1983; **30**:595-633.
- Champsaur H, Questiaux E, Prevot J, Henry-Amar M, Goldszmidt D, Bourjouane M, Bach C. Rotavirus carriage, asymptomatic infection and disease in the first two years of life. *J Infect Dis* 1984; **149**:667-674.
- Brunser O, Araya M, Espinoza J, Figueroa G, Pacheco Y, Lois Y. Chronic environmental enteropathy in a temperate climate. *Human Nutr Clin Nutr* 1987; **41C**:251-261.
- World Health Organization. Management of diarrhoea and use of oral rehydration therapy. A joint WHO/UNICEF statement. 2nd ed. Geneva: World Health Organization 1985.
- Laker MF. Estimation of disaccharides in plasma and urine by gas-liquid chromatography. *J Chromat* 1979; **163**:9-18.
- Spencer E, Araya M, Sandino AM, Pacheco Y, Brunser O. Faecal excretion of rotavirus and other enteropathogens in newborns of the high and the low socio-economic stratum in Santiago, Chile. *Epidemiol Inf* 1988; **101**:425-436.
- Glass RI, Svennerholm AM, Stoll BJ, Khan MR, Hossain KMB, Huq MI, Holmgren J. Protection against cholera in breast-fed children by antibodies in breast milk. *N Engl J Med* 1983; **319**:1389-1392.
- Baker SJ. Subclinical intestinal malabsorption in developing countries. *Bull WHO* 1976; **54**:485-494.
- Sutherland LR, Verhoef M, Wallace JL, Van Rosendaal G, Crutcher R, meddings JB. A simple, non-invasive marker of gastric damage: sucrose permeability. *Lancet* 1994; **343**:998-1000.
- Vera JF, Gotteland M, Chávez E, Vial MT, Kakarieka E, Brunser O. Sucrose permeability in children with gastric damage and Helicobacter pylori infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; **24**:506-511.
- Bijlsma PB, peeters RA, Groot JA, Dekker PR, Taminiou JAJM, van der Meer R. Differential in vivo and in vitro intestinal permeability to lactulose and manitol in animals and humans: an hypothesis. *Gastroenterology* 1995; **108**:687-696.
- Weaver LT. The impact of milk and weaning diet on gastrointestinal permeability in English and Gambian infants. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1988; **82**:784-789.
- Strobel S. Developmental aspects of food allergy. In: Schmidt E, ed. Food Allergy. Nestlé Nutrition Workshop Series Vol. 17. New York: Raven Press, 1988:99-117.
- Catassi C, Bonucci A, Coppa GB, Carlucci A, Giorgi PL. Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; **21**:383-386.
- Weström BR, Tagesson C. Low molecular weight markers do not reflect intestinal macromolecular permeability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989; **8**:422-424.
- Weaver LT, Coombs RRA. Does "sugar" permeability reflect macromolecular absorption? A comparison of the gastrointestinal uptake of lactulose and beta-lactoglobulin in the neonatal guinea-pig. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988; **85**:133-135.
- Stintzing G, Johansen K, Magnusson KE, Svensson L, Sundqvist T. Intestinal permeability in small children during and after rotavirus diarrhoea assessed with different-size polyethyleneglycols (PEG 400 and PEG 1000). *Acta Paediatr Scand* 1986; **75**:1005-1009.
- Serrander R; Magnusson KE; Kihlström E; Sundqvist T. Acute yersinia infections in man increase intestinal permeability for low-molecular weight polyethylene glycols (PEG 400). *Scand J Infect Dis* 1986; **18**:409-413.
- Araya M, Espinoza J, Brunser O, Pacheco Y. Variaciones en la incidencia de diarrea aguda en niños menores de 2 años. *Rev Med Chil* 1992; **120**:697-701.
- Gotteland M, Isolauri E, Heyman M, Tomé D, Desjeux JF. Antigen absorption in bacterial diarrhea: in vivo intestinal transport of β -lactoglobulin in rabbits infected with the enteroadherent E.coli strain RDEC-1. *Pediatr Res* 1989; **26**:237-240.
- Keljo DJ, Butler DG, Hamilton JR. Altered jejunal permeability to macromolecules during viral enteritis in the piglet. *Gastroenterology* 1985; **88**:998-1004.
- Isolauri E, Juntunen M, Wiren S, Vuorinen P, Koivula T. Intestinal permeability changes in acute gastroenteritis: effects of clinical factors and nutritional management. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989; **8**:466-473.
- Holm S, Andersson Y, Gothefors L, Lindberg T. Increased protein absorption after acute gastroenteritis in children. *Acta Paediatr* 1992; **81**:585-588.
- Ford RPK, Menzies IS, Phillips AD, Walker-Smith JA, Turner MW. Intestinal sugar permeability: relationship to diarrhoeal disease and small bowel morphology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985; **4**:568-574.
- Sullivan PB, Northrop-Clewes CA, Crowe PT, Marsh MN, Neale G. Persistent diarrhea and malnutrition. The impact of treatment on small bowel structure and permeability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; **14**:208-215.
- Lunn PG, Northrop-Clewes CA, Downes RM. Intestinal permeability, mucosal injury, and growth faltering in Gambian infants. *Lancet* 1991; **338**:9807-910.