

11262
6
F-2



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION

"PRESENCIA DE ACTIVIDAD ANTISECRETORA EN
EL PLASMA DE NIÑOS CON Y SIN DIARREA"

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de:
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

p r e s e n t a:

DR. FELIPE GONZALEZ VELAZQUEZ



ASESORES:
DR. HECTOR GUISCAFRE GALLARDO
DR. F. JAVIER TORRES LOPEZ

México, D. F. TESIS CON
FALLA DE ORICEN

1993



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE:

	Página
I. Resumen.....	
II. Antecedentes.....	1
III. Planteamiento del problema.....	13
IV. Objetivos.....	13
V. Hipótesis.....	13
VI. Material y metodos.....	15
VII. Resultados.....	22
VIII. Figuras y tablas.....	25
IX. Discusión.....	35
X. Conclusiones.....	41
XI. Bibliografía.....	42



RESUMEN

El factor antisecretor es una proteína que inhibe la hipersecreción intestinal inducida por enterotoxinas bacterianas o por prostaglandinas. Es inducido en ratas o en cerdos retados intragástricamente con toxina de cólera (CT). La actividad antisecretora se encuentra principalmente en pituitaria, aunque se desconoce el sitio de síntesis y las vías de distribución. Se ignora la importancia de esta proteína en diarrea aguda (DA) en humanos. El objetivo del trabajo fue estudiar la presencia de actividad antisecretora (AAS) en el de plasma de niños con y sin diarrea.

Para tal efecto se realizó un estudio observacional, prospectivo y longitudinal en 63 niños con edades de 2 meses a 5 años que se distribuyeron en 3 grupos de estudio; todos los pacientes tuvieron menos de 72 hrs de evolución. Una muestra de 4 ml de sangre se tomó en cada caso, por dos ocasiones : el día de la captación y 4 días después, mientras que de los controles sanos solamente se tomó una muestra el día de la captación. El plasma se procesó por cromatografía por afinidad en agarosa para separar la AAS de otros componentes. La fracción adherida al gel se eluyó con α -metil-glucosa para posteriormente medir su actividad en un modelo de asa ligada en rata. La muestra se inoculó por vía intravenosa (IV) a un par de ratas que enseguida fueron retadas con CT en asas yeyunales ligadas previamente. La secreción intestinal se midió por la razón peso/longitud (mg/cm) de las asas con CT y la AAS se midió por el por ciento de inhibición de la secreción en las ratas inoculadas IV con la muestra, comparada con la secreción observada en ratas inoculadas



IV con solución reguladora .

Se estudiaron 21 niños asintomáticos, 22 con DA sin sangre y 20 con DA con sangre. No hubo significancia estadística en las características clínicas de los grupos a excepción de la duración de la diarrea que fue menor en el grupo de DA sin sangre. En el grupo de diarrea sin sangre la AAS del plasma fue significativamente más alta en el día 4 (mediana 14.5 con amplitud 0-55) que en el día 1 (0, 0-43) con una p de 0.04; en pacientes con DA con sangre la AAS del plasma en el día 4 (13.5, 0-62) también fue más alta que en el día 1 (2.5, 0-36) aunque el incremento no fue significativo. La AAS del plasma en el día 4 de ambos grupos fue significativamente más alta que la observada en controles sanos (0 %, 0-22 %) con una p < 0.05.

Concluimos que existe AAS en el plasma de humanos; que la AAS es baja al inicio de la diarrea y que incrementa cuando la diarrea se limita, y que no existen diferencias en la AAS de los pacientes con diarrea aguda sin sangre y con sangre.



ANTECEDENTES

La diarrea infecciosa aguda es un problema de salud mundial que ocupa el segundo lugar como causa de morbilidad y uno de los primeros lugares como causa de mortalidad en los países en vías de desarrollo (1). Anualmente mueren aproximadamente más de 5 millones de personas por diarrea infecciosa aguda, el 80 % de estas muertes corresponden a niños menores de 2 años (2). De todas las enfermedades infecciosas, las diarreas tienen el efecto adverso más grande en el crecimiento de los niños. Este es el resultado de factores tales como malabsorción de nutrientes en el intestino delgado causada por el proceso infeccioso y la ingesta de dieta reducida resultante de la anorexia y el retiro de alimentos como consecuencia de las prácticas tradicionales (3).

Las diarreas todavía son causa de hospitalización en 30 % de las admisiones hospitalarias en países en desarrollo, lo cual ocasiona el uso de antibióticos caros y líquidos intravenosos que producen una carga financiera y familiar en los presupuestos nacionales de salud (4).

Un amplio espectro de etiologías virales, bacterianas y parasitarias ocasionan diarrea infecciosa aguda con diversos mecanismos fisiopatogénicos. La diarrea infecciosa aguda ocurre cuando un número crítico de microorganismos (o en algunas ocasiones toxinas microbianas preformadas) es ingerido, sobrevive el paso a través de la acidez gástrica y llega al intestino (5).



Una vez ahí, los organismos deben adherirse al moco o directamente a las células epiteliales y colonizar el lumen o invadir las células de la pared intestinal. El primer caso ocurre generalmente en la parte alta del intestino delgado donde una enterotoxina microbiana o el microorganismo mismo ocasionan hipersecreción que se manifiesta como diarrea acuosa. En el segundo caso, el microorganismo o sus citotoxinas causan un proceso invasivo, principalmente en el colon, que se manifiesta como disentería (6).

En los casos de diarrea acuosa, hay dos maneras por las que los microorganismos enteropatógenos o sus productos pueden alterar el funcionamiento normal del intestino. El primero es mediante un aumento directo o indirecto de los mecanismos secretores normales, induciendo una secreción neta anormal. El segundo, es destruyendo células de absorción u otras vías que provocan un desequilibrio en el flujo bidireccional de agua y electrólitos, resultando en hipersecreción (7).

Escherichia coli enterotoxigénica y Vibrio cholerae 01 son microorganismos que aumentan los mecanismos secretores normales (8,9); estos patógenos se adhieren a la pared del intestino delgado mediante factores de colonización, que generalmente son fimbrias que tienen gran afinidad por receptores presentes en la membrana del enterocito. Una vez que colonizaron la vecindad del epitelio, producen enterotoxinas como la termolábil de E. coli y la de V. cholerae que interactúan con el gangliósido GM1 de las células epiteliales e inducen un aumento del segundo mensajero



AMPC; este segundo mensajero estimula una enzima (proteína cinasa A) que modifica la estructura de los sistemas de transporte de los electrólitos en la membrana del enterocito. El resultado final es un bloqueo en la absorción de Na y Cl, y por ende, de agua en las vellosidades y el aumento en la secreción de Cl y HCO₃ y por tanto de agua en las criptas (10). Las toxinas termoestables de E. coli y Y. enterocolitica actúan de manera similar, solo que utilizan como segundo mensajero al GMP cíclico (11,12).

Microorganismos que destruyen células de absorción (vellosidades intestinales) incluyen E. coli enteropatógena (EPEC) (13), G. lamblia (14), Cryptosporidium (15) y rotavirus (16). Estos microorganismos se adhieren a las células en las puntas de las vellosidades del intestino delgado, pero no alcanzan la zona de las criptas. EPEC, G. lamblia y Cryptosporidium se adhieren fuertemente a las vellosidades de la membrana en el enterocito causando atrofia de la región responsable de la absorción de Na y Cl. En el caso de G. lamblia y Cryptosporidium la infección despierta una respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal y se cree que mediadores de inflamación pueden también dañar la pared intestinal. Rotavirus se adhiere también al enterocito, pero en este caso invade la célula, se multiplica intracelularmente y lisa las células, liberando partículas virales que van a invadir a otros enterocitos.

En casos de diarrea aguda con sangre el microorganismo o sus



productos citotóxicos causan un proceso invasivo en colon acompañado de una respuesta inflamatoria local. Shigella invade y se multiplica dentro de las células epiteliales del colon y rara vez penetra más allá de la lámina propia (17). Dentro de la célula epitelial, la bacteria puede producir una toxina, denominada toxina shiga que detiene la síntesis de proteínas del enterocito y junto con el proceso invasivo, provoca la destrucción de la mucosa e induce una respuesta inflamatoria (18). E. coli enteroinvasora provoca diarrea con sangre mediante mecanismos similares a los de Shigella (19).

Salmonella invade la pared intestinal del colon y del ileon; la bacteria se adhiere al enterocito y penetra por un mecanismo de pinocitosis donde la membrana de la célula rodea al microorganismo y éste viaja dentro de la vesícula hasta la lámina propia donde es liberada (20). Allí, la bacteria se multiplica e induce una fuerte respuesta inflamatoria, cuyos mediadores aumentan el daño a la pared intestinal y algunos de ellos, pueden provocar hipersecreción, contribuyendo a la pérdida de líquidos.

Campylobacter, a semejanza de Salmonella y Yersinia spp., atraviesa la mucosa intestinal en ileon terminal y colon, causando poco daño al epitelio y se multiplica en lámina propia y en nódulos mesentéricos, induciendo una fuerte respuesta inflamatoria (21). El microorganismo produce una enterotoxina semejante a la termolábil de E. coli y a la de V. cholerae (22) y se sugiere que participa en la hipersecreción, principalmente



en aquellos casos de diarrea acuosa sin sangre.

C. difficile coloniza el colon, pero no invade la mucosa; el daño que causa está mediado por toxinas. La toxina A causa desprendimiento de células epiteliales en las vellosidades sin afectar la zona de las criptas; conforme la lesión progresa en el lumen se acumulan restos celulares y células inflamatorias que forman pseudomembranas y en la pared intestinal se observa necrosis y sangrado (23,24).

Entamoeba histolytica (25) coloniza el colon e interacciona con las células epiteliales mediante una lectina que reconoce residuos N-acetilgalactosamina sobre la membrana celular. El trofozoito libera entonces proteínas denominadas amebóforos que se insertan en la membrana del enterocito y forman canales que provocan lisis celular. El parásito libera también enzimas proteolíticas e hidrolíticas y fagocita células muertas o moribundas, lo que favorece una mayor penetración a la pared intestinal.

La enfermedad diarreica involucra interacciones complejas entre el hospedero y el microorganismo. Estas interacciones involucran varios factores del hospedero, no inmunológicos e inmunológicos, cuya función es proteger al cuerpo contra efectos dañinos de varios patógenos entéricos y sus toxinas.

Algunas de las líneas de defensa que funcionan contra patógenos entéricos son: La acidez gástrica normal, la motilidad



del intestino delgado, la capa de moco, la microflora intestinal normal y el sistema inmune de mucosas (5).

Un pH gástrico inferior a 4.0 es una defensa importante contra bacterias ingeridas. Muchas bacterias se destruyen rápidamente con un pH menor que 4, ejemplo, Salmonella, E. coli, V. cholerae, etc. La peristalsis normal mueve las bacterias ingeridas del intestino delgado dentro del colon; este proceso es probablemente asistido por la acción del moco secretado, que ayuda a remover partículas inertes de la superficie de la mucosa (5).

La resistencia al desarrollo de infecciones respiratorias e intestinales se asocia más con la presencia de anticuerpos específicos en secreciones mucosas que con aquellos en el suero. La IgA es el isotipo de inmunoglobulina predominante en las secreciones mucosas y esto es generalizable para todas las superficies mucosas. La IgA se sintetiza, transporta y secreta en la pared intestinal, ya que es el lumen su sitio de acción como defensa de mucosas, estos hechos hacen que la inmunidad de mucosas sea diferente de la inmunidad sistémica (26).

La recuperación de las enfermedades con organismos invasivos tales como Shigella, Salmonella, y posiblemente, rotavirus dependen del desarrollo de una inmunidad tisular más profunda. Esta segunda línea de defensa que puede prevenir el desarrollo de enfermedad con organismos invasores tisulares está formada por: anticuerpos séricos operando en conjunción con el sistema



de complemento y macrófagos y células con capacidad para reacciones inmunes mediadas por células. Estas células incluyen citotoxicidad de células T restringidas al complejo mayor de histocompatibilidad, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos y actividad de células asesinas naturales (27,28).

Una variedad de hormonas y neurotransmisores regulan el transporte de iones intestinales. Algunos son hormonas circulantes y otros se sintetizan localmente en la mucosa intestinal y se liberan cerca de los enterocitos; tienen efectos directos sobre el enterocito, uniéndose a receptores sobre la membrana basolateral. Algunas hormonas y neurotransmisores afectan el enterocito indirectamente al estimular la liberación de otros efectores. Las células del mesénquima, las cuales liberan una variedad de estímulos secretores, tienen receptores para ciertos neuropéptidos: células cebadas para sustancia P, y linfocitos T para péptido vasoactivo intestinal (VIP), sustancia P y somatostatina (29,30).

Ejemplo de neurotransmisores y hormonas que estimulan la secreción intestinal son: VIP que activa la adenilato ciclasa, serotonina que puede ser liberada de las células enterocromafines en el epitelio del intestino y tiene actividad secretora por sí misma o puede liberar acetilcolina o VIP de las neuronas mucosas; acetilcolina que tiene efectos directos sobre las células epiteliales siempre mediados por receptores colinérgicos muscarínicos; histamina que es liberada de las células cebadas



de mucosa y produce una respuesta secretora al incrementar la permeabilidad vascular; neurotensina que actúa indirectamente al estimular la liberación de sustancia P en las neuronas; bradiquinina que estimula la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos y bombesina que modulan la liberación de hormonas gastrointestinales (sustancia P, motilina) (29-32).

Otras células del mesénquima de la mucosa como son linfocitos T y B, neutrófilos, eosinófilos, células cebadas, macrófagos, y fibroblastos producen secreción indirectamente al liberar diversos efectores (29). Uno de ellos es la calicreína que activa los cininógenos. Las cininas resultantes estimulan la secreción de electrólitos al causar activación dependiente del Ca de la fosfolipasa A₂, induciendo liberación del ácido araquidónico y síntesis de eicosanoides.

Los metabolitos del ácido araquidónico, prostaglandinas y leucotrienos que están elevados en el líquido y tejido intestinal en diarreas asociadas con inflamación aumentan la secreción intestinal (33).

Hormonas y neurotransmisores que tienen una función de absorción o antisecretora son: somatostatina (34), norepinefrina (35), encefalinas (36), neuropéptido Y y péptido YY (37,38). Norepinefrina y somatostatina activan la proteína G inhibitoria, que interfiere con la activación de la adenilato ciclasa y la actividad mediadora del Ca. Los efectos inducidos por encefalinas involucran receptores opiáceos delta y parece ser que su efecto



es indirecto (36), ya que no se han encontrado esos receptores en el enterocito. Neuropéptido Y es uno de los mayores agentes antiseoretos liberado por neuronas entéricas intrínscas (38), su efecto es similar al de la norepinefrina pero no es mediado por receptores α -2 adrenérgicos . En episodios de diarrea infecciosa se ha observado un desequilibrio de estas substancias que al producir una secreción neta contribuyen a la pérdida de líquidos.

La terapia de rehidratación oral (TRO) es la piedra angular de todos los programas nacionales de control de la diarrea porque es sencilla, efectiva, y barata. La TRO se usa para tratar o prevenir la deshidratación por reemplazar las pérdidas en el curso de la diarrea. Su efectividad se fundamenta en que la absorción activa de glucosa por el intestino delgado continúa durante el curso de la infección intestinal, permitiendo el co-transporte de Na y la absorción de agua (39).

Aunque la TRO es muy efectiva para combatir la deshidratación y sus consecuencias graves, ella no disminuye la cantidad y duración de la diarrea. Se está de acuerdo en que una droga que podría disminuir la diarrea sería un adyuvante útil a la terapia de rehidratación oral. Tiene que ser de valor práctico, barata y segura, especialmente en niños.

Los drogas actualmente disponibles para tratamiento de la diarrea incluyen: agentes que inhiben la motilidad intestinal, agentes antiseoretos, flora bacteriana cuyo mecanismo es tratar



de inhibir el crecimiento del enteropatógeno y los adsorbentes. Estos agentes disponibles no tienen ningún valor práctico comprobado e incrementan el costo de tratamiento y el riesgo de reacciones adversas sobretodo en niños (40).

Recientemente se encontró una substancia semejante a una hormona con potente actividad antisecretora en los extractos de mucosa yeyunal, cerebro y glándula pituitaria de ratas que habían sido retadas previamente con 5 dosis por vía oral de toxina de cólera (CT) (41); la mayor concentración de actividad antisecretora se encontró en la glándula pituitaria. El extracto de la glándula pituitaria también inhibió la secreción intestinal cuando esta fue inducida por prostaglandina E₁, enterotoxinas de E. coli, Campylobacter y C. difficile (42-44). Esto sugiere que la actividad antisecretora no reconoce el agente secretor sino el desequilibrio causado por éste; a esta substancia se le ha denominado factor antisecretor (FAS) (42).

El FAS a dosis de 5 ng inhibe la secreción intestinal producida por enterotoxinas cuyo mecanismo de acción es mediado por segundos mensajeros como el AMPC para CT y toxina de Campylobacter, y el GMPC para ST de E. coli (43). Esta dosis también inhibe la secreción producida por la toxina de Dynophisis que tiene un mecanismo de acción desconocido (43). Estos resultados sugieren que el FAS actúa independientemente del mediador primario de la secreción.

Se ha purificado y caracterizado FAS de la hipófisis de



rata, cerdo y de cadáveres humanos encontrándose que es una proteína con características similares en las tres especies, (45,46), tiene un peso molecular aproximado de 60 kDA con un punto isoeléctrico de 4.5 a 5.2 con afinidad a galactosa (45), gracias a esta afinidad, la proteína se puede purificar en gel de agarosa; la fracción lectina adherente puede eluirse con α -metil-glucosa o galactosa (45). También se ha encontrado FAS con características similares en la bilis y leche de rata (47). La fracción humana del FAS tuvo un punto isoeléctrico de 4.5 lo que indica que es una proteína más ácida que el FAS de cerdo y rata. Anticuerpos en contra de FAS de cerdo inhibieron la actividad de FAS humano y FAS de rata (45). Estos datos sugieren que proteínas de diferentes especies comparten características químicas y antigénicas.

En un estudio comparativo en cerdos se encontró que lechones que ingirieron leche con FAS fueron protegidos contra diarrea causada por E. coli enterotoxigénica; mientras que en aquellos cuyas madres no tenían este factor en leche no fueron protegidos, lo que sugiere que el factor antisecretor en la leche de cerdas es importante para la resistencia de la diarrea neonatal en lechones (48).

Se desconoce tanto en humanos como en animales si esta actividad antisecretora se produce durante episodios diarreicos y en humanos no sabemos si es posible detectarla en el plasma. Este trabajo es el primer intento en niños para estudiar la actividad antisecretora circulante durante la enfermedad



diarreica en humanos.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El factor antisecretor es una proteína que está presente en líquidos corporales de ratas y cerdos cuya actividad se estudia en bioensayos midiendo la inhibición de la secreción intestinal causada por diversas enterotoxinas por lo que nos planteamos las siguientes preguntas:

- 1.- ¿ Existe la actividad antisecretora en el plasma de pacientes con diarrea aguda con o sin sangre en heces ?
- 2.- ¿ Existen diferencias en la actividad antisecretora del plasma de pacientes con diarrea aguda sin sangre con la de los pacientes con diarrea aguda con sangre ?
- 3.- ¿ Existe actividad antisecretora en el plasma de niños asintomáticos ?

OBJETIVOS

- 1.- Estudiar si existe actividad antisecretora en el plasma de pacientes con diarrea aguda con y sin sangre.
- 2.- Determinar si existen diferencias en la actividad antisecretora en el plasma de pacientes con diarrea aguda con sangre y en pacientes con diarrea aguda sin sangre.
- 3.- Estudiar la presencia de actividad antisecretora en el plasma de niños asintomáticos.

HIPOTESIS

- 1.- Que al inicio de la diarrea aguda la actividad



antisecretora en plasma es baja y esta se incrementa cuando la diarrea se limita.

2.- Que en los pacientes con diarrea aguda con sangre la actividad antisecretora en plasma es menor que en los pacientes con diarrea aguda sin sangre.

3.- Que en niños asintomáticos no existe actividad antisecretora plasmática.



MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio observacional, prolectivo y longitudinal, llevándose a cabo la captación de los pacientes y niños asintomáticos en las Clínicas de Coyoacán No 19 y de Vicente Guerrero No 31 del IMSS. El procesamiento y bioensayo de las muestras se hizo en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, IMSS.

Se formaron 3 grupos de niños que quedaron distribuidos de la siguiente forma:

- 1.- Grupo 1: 21 niños asintomáticos.
- 2.- Grupo 2: 22 pacientes con diarrea aguda sin sangre.
- 3.- Grupo 3: 20 pacientes con diarrea aguda con sangre.

Las definiciones de las variables usadas fueron las siguientes:

Diarrea aguda.- Presencia de 3 ó mas evacuaciones líquidas en las últimas 24 hrs con menos de 72 hrs de evolución.

Episodio de diarrea.- Inició con la presencia de 3 ó más evacuaciones líquidas en 24 hrs y finalizó cuando el paciente permaneció por un periodo de 48 hrs sin diarrea.

Niño asintomático.- Con ausencia de enfermedad aguda o crónica.

Actividad antisecretora.- Se consideró que hubo actividad antisecretora cuando la fracción del plasma dializada inhibió la secreción intestinal inducida por toxina de cólera en una asa



ligada en rata, en comparación con la secreción observada en ratas inoculadas con PBST (amortiguador de fosfatos) (inhibición medida en porcentaje).

Se incluyeron todos los niños asintomáticos y pacientes con diarrea que tuvieran o no sangre en las heces, de ambos sexos y con edades comprendidas entre 2 meses y 5 años. No se incluyeron los pacientes que cursaban con un episodio de diarrea y que en los últimos 30 días habían presentado otro episodio diarreico; tampoco, se incluyeron aquellos que presentaban otra enfermedad aguda o crónica concomitante con la diarrea y los que no aceptaron ingresar al estudio. Se eliminaron todos los pacientes que desarrollaron otra enfermedad antes de la segunda toma sanguínea o aquellos que no aceptaban continuar con el estudio.

La selección de pacientes y niños asintomáticos se realizó los lunes de cada semana mediante un interrogatorio intencionado sobre los criterios de inclusión y de no inclusión. Si reunían los requisitos se invitaba al familiar del niño a que participara en el estudio y se le pedía firmar una carta de consentimiento. Enseguida se procedía a la captación de datos en cuestionarios hechos para este fin, que contenían nombre, edad, dirección, teléfono, fecha de inicio y terminación de la diarrea, características de las evacuaciones, episodios diarreicos previos, medicamentos, medición de la actividad antisecretora, resultado de coprocultivo, evolución de la diarrea. Los viernes (cuatro días después de la primera toma) hicimos visita domiciliaria a los pacientes para la toma de la segunda muestra



sanguínea y registro de la evolución, si la diarrea no se había limitado para esa fecha, se hablaba por teléfono o realizábamos otra visita para conocer el día de la limitación del episodio diarreico.

A los pacientes del grupo 1 se les tomó una sola muestra sanguínea y a los de los grupos 2 y 3 dos muestras; la primera cuando fueron captados (día 1) y la segunda toma, cuatro días después de la primera (día 4). En cada toma se extrajeron 4 ml de sangre, eligiéndose alguna vena del codo, antebrazo o cara dorsal de la mano.

A cada paciente se le pidió una muestra de heces para búsqueda de enteropatógenos. La identificación de enteropatógenos en el laboratorio se hizo de acuerdo a los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (49). Se tomó una muestra fecal con isopos estériles que se depositaron en los medios de transporte de Stuart y tioglicolato para posteriormente en un plazo menor a 24 hrs sembrarse en los medios de cultivo de primoaislamiento; otra parte de materia fecal se fijó en formol para búsqueda de parásitos (50). En los casos de diarrea con sangre una fracción de la muestra fecal se fijó en alcohol polivinílico para búsqueda de trofozoitos de amiba (50). Se identificaron por cultivo Shigella, Salmonella, Yersinia, Campylobacter, y Aeromonas; se tomaron 5 colonias de E. coli para detectar LT y ST por hibridización (51), se efectuó ensayo de citotoxicidad en cultivo celulares para identificar E. coli citotóxica y toxinas de C. difficile (49) y rotavirus se



identificós por aglutinación en heces (52).

SEMIPURIFICACION DE LA ACTIVIDAD ANTISECRETORA

Como se esquematiza en la figura 1 el volumen de 4 ml de sangre extraído de cada paciente se mezcló inmediatamente con 7 ml de anticoagulante Alseviérs adicionado del inhibidor de proteasas fenil-metil-sulfonil-fluoruro 10^{-2} M y del antioxidante tiosulfito de sodio al 0.1 %; esta mezcla se centrifugó a 2,500 RPM a 5 °C por 20 minutos para separar el plasma. Este último se aplicó a una columna de 3 a 3.5 ml de Sepharosa 6B (Pharmacia, Suecia) (45), equilibrada con un amortiguador constituido de cloruro de sodio 0.15 M, fosfato de sodio 0.05 M y tiosulfito de sodio 0.1 %, a un pH 7.4 (PBST); inmediatamente se aplicó el plasma a la columna, y enseguida se lavó con 9 ml de PBST; las sustancias adheridas al gel de agarosa se eluyeron con 5 ml de α -metil-glucosa 1.5 M (45) en PBST, la fracción eluida (5 ml) se dializó contra PBST por 24 hrs, utilizando membranas dializantes con un límite de exclusión de 12 kDa. La fracción plasmática dializada se ajustó a un volumen final de 8 ml con PBST y se almacenó a -20 °C hasta su ensayo en rata.

MEDICION DE LA ACTIVIDAD ANTISECRETORA

Ratas machos Sprague-Dawley de 10-12 semanas de edad se alimentaron con dieta estándar del bioterio y se pusieron en ayuno 24 hrs antes de la cirugía con ingesta de agua a libre demanda (53).



ENTEROTOXINAS

Toxina de cólera altamente purificada (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) se disolvió en PBS + albúmina bovina 0.1% para obtener concentraciones finales de 1 y 3 $\mu\text{g/ml}$ de toxina.

ENSAYO DE ASA LIGADA

Previa anestesia con éter se realizó una pequeña incisión en la línea media de cada animal, se expuso el intestino y se realizaron dos asas intestinales yeyunales de aproximadamente 10 cm de longitud cada una; estas asas estuvieron libres de contenido intestinal y su flujo sanguíneo se respetó (53). Una vez preparadas estas asas se administró en la vena del pene 2 ml de la fracción plasmática dializada ó 2 ml de PBST a cada una de las ratas, 20 segundos después se inyectó 1 y 3 μg de CT en las asas ligadas previamente (41), finalmente se regresó el intestino a la cavidad abdominal y se cerró la pared abdominal. Cinco horas más tarde las ratas se sacrificaron por dislocación cervical.

Cada muestra de plasma se probó por duplicado en dos animales diferentes. Después de 5 hrs de incubación con CT los animales se sacrificaron y se estimó la secreción intestinal con el peso y longitud (mg/cm) de cada una de las asas ligadas, a esta estimación se le restó el peso y longitud de una asa no inoculada con CT para tener una secreción intestinal neta. Se hizo un promedio de la secreción intestinal de las dos asas ligadas inoculadas con 1 μg de CT y el promedio de las dos asas inoculadas con 3 μg de CT (43), tanto en los controles inoculados



intravenoso con PBST como en los inoculados con las muestras dializadas. Se comparó la secreción intestinal de los controles contra la secreción intestinal en las muestras dializadas para obtener el porcentaje de inhibición de la AAS como lo ejemplifica la tabla 1 .

VALIDACION DEL BIOENSAYO

La variabilidad interensayo se hizo por 2 observadores distintos en 18 fracciones de plasma con actividades antisecretoras diferentes, su primera medición se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del IMSS, México y para la segunda medición de las mismas muestras, éstas se enviaron congeladas y codificadas al Departamento de Microbiología Médica de la Universidad de Gothenburgo, Suecia, en donde un segundo observador cegado en cuanto al origen y resultados de la primera medición, ejecutó el bioensayo en rata.

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados no tuvieron una curva de distribución normal por lo que el análisis se hizo con pruebas no paramétricas.

Para dos muestras pareadas o dependientes se usó la prueba de Wilcoxon y para las muestras no pareadas o independientes se usó la U de Mann-Whitney (54).

Se realizó análisis de correlación de Pearson (55) para medir la variabilidad interensayo de 18 fracciones plasmáticas.

El nivel de significancia que se estableció en todos los



casos fue de $\alpha = 0.05$

TAMAÑO DE MUESTRA

La siguiente fórmula se usó para el cálculo de la muestra considerando la comparación de dos grupos y de que la AAS es una variable continua (55).

$$n = 2 [(Z_{\alpha} - Z_{\beta}) \sigma + \mu_1 - \mu_2]^2$$

Los siguientes datos se obtuvieron de un estudio piloto en adultos:

$\mu_1 = 25$, media de la AAS en el día 4 de pacientes con diarrea aguda.

$\mu_2 = 10$, media de adultos sanos.

$\sigma = 17$, desviación estándar de AAS en adultos.

Para alcanzar significancia entre los dos grupos se fijaron los siguientes niveles.

$\alpha = 0.05$

$\beta = 0.20$

Fuerza del estudio = 0.80

Con estos datos se obtuvo una $n = 18$ por grupo.



RESULTADOS

El estudio se realizó de septiembre de 1990 a octubre de 1992; se estudiaron un total de 63 niños de 2 meses a 5 años de edad, con una razón del sexo masculino/femenino de 10/11, 10/12 y 9/11 para el grupo de asintomáticos (G 1), de pacientes con diarrea aguda sin sangre (G 2) y pacientes con diarrea con sangre (G 3) respectivamente. En la tabla 2 se describen las características clínicas de cada uno de los grupos y en ella observamos que la diferencia de edad no fue estadísticamente significativa entre los diferentes grupos. El tiempo de evolución de la diarrea al ingresar al estudio fue similar para ambos grupos, G2 y G3; la duración del episodio diarreico tuvo una mediana de 4 para G2 y de 6.3 días para G3, que resultó con significancia estadística con una $p = 0.03$. La mayoría de los casos con diarrea no presentaron deshidratación y ninguno presentó deshidratación grave.

Se determinó la variabilidad interensayo en 18 muestras procesadas tanto en IMSS, México, como en la Universidad de Gothenburgo, Suecia y se obtuvo un coeficiente de Pearson de 0.83, mostrándose los resultados en el dispersograma de la figura 2.

En la tabla 3 se muestra la actividad antisecretora obtenida en niños asintomáticos y puede observarse que predominó la ausencia de AAS, aunque 5 de ellos tuvieron una AAS con una amplitud de inhibición de 10-22 %. En este grupo se identificaron únicamente 2 parásitos, G. lamblia e H. nana.



En la tabla 4 se describen los resultados obtenidos en los niños con diarrea aguda sin sangre y puede observarse que en las primeras 72 hrs de la evolución (día 1) la AAS fue menor (mediana 0 %, amplitud 0-44 %) que la detectada en el día 4 (mediana 14.5 %, amplitud 0-55 %); este incremento en la AAS coincidió con la curación de la diarrea (mediana 4, tabla 2). En este grupo se identificaron enteropatógenos en el 23 % de los casos.

La tabla 5 describe los resultados obtenidos en niños con diarrea aguda con sangre y se puede observar que la AAS en el día 1, en las primeras 72 hrs de evolución es aparentemente menor (mediana 2.5, amplitud 0-36) que en el día 4 (mediana 13.5 %, amplitud 0-62 %); en este grupo se identificó algún enteropatógeno en el 60 % de los casos.

La tabla 6 describe la comparación de las medianas de la AAS dentro de los grupos y entre los grupos. En los pacientes con diarrea aguda sin sangre, la mediana del día 1 comparada con la mediana del día 4 fue significativamente diferente. La mediana del día 4 de este grupo contrastada con la mediana de niños asintomáticos, también fue significativamente diferente con una $p = 0.03$.

En los pacientes con diarrea aguda con sangre la mediana del día 1 contrastada con la mediana del día 4 no fue significativamente diferente; pero la mediana del día 4 comparada con la mediana de los asintomáticos si lo fue, $p = 0.03$.



Los pacientes de los grupos G2 y G3 se analizaron juntos para conocer el comportamiento de la AAS en pacientes con diarrea aguda, sin importar si los casos presentaron o no sangre. En el día 1 este grupo tuvo una mediana de 0, con una amplitud de 0-43; mientras que en el día 4 tuvo una mediana de 13.5 † con una amplitud de 0-62. Al comparar estas medianas se observó que el incremento de actividad en el día 4 fue estadísticamente significativo, con una p de 0.03.

No hubo diferencia significativa cuando se comparó la AAS de los días 1 y 4 del grupo 2 contra la de los días 1 y 4 del grupo 3.

Hicimos un análisis de la AAS del plasma por grupos de edad para cada uno de los grupos estudiados y como se muestra en las figuras 3 y 4 la AAS en los menores de 1 año de edad está prácticamente ausente en los 3 grupos (G1, G2 y G3), tanto en el día 1 como en el día 4. En los mayores de 1 año de edad la AAS se detecta desde el día 1 e incrementa en el día 4; mientras que en los mayores de 24 meses cuando se comparó la AAS entre los 3 grupos, tanto en el día 1 como en el día 4, no se observó diferencia estadística; Al hacer estos subgrupos, el tamaño de muestra en cada uno fue pequeño.

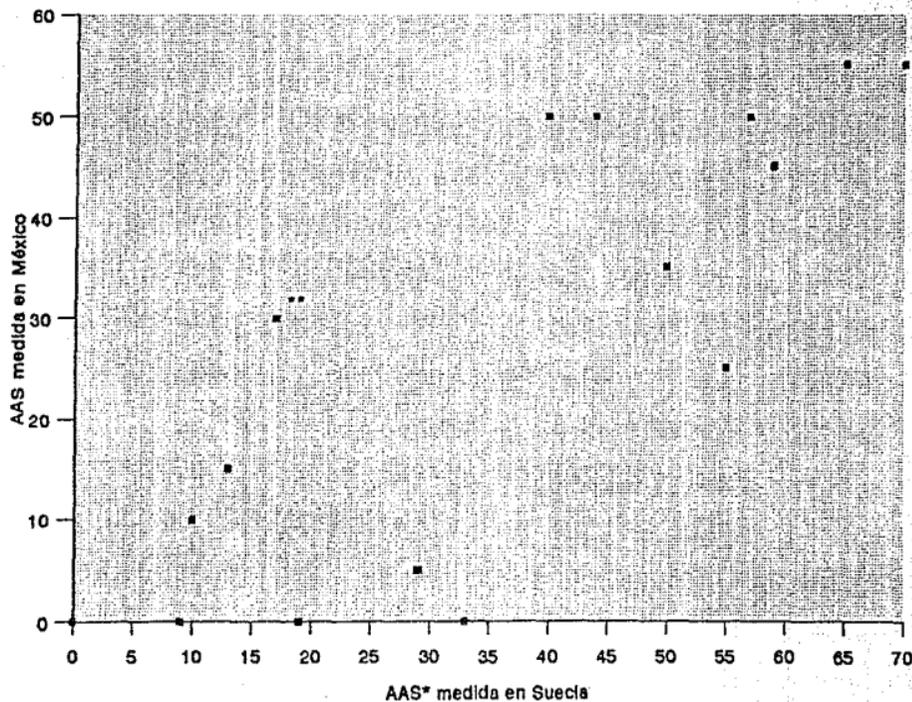
No hubo asociación entre la AAS del día 1 o del día 4 de G2 y G3 con el número de evacuaciones, duración del episodio diarreico (correlación de Pearson) o con el tipo de enteropatógenos (prueba exacta de Fisher).



FIG. 1 OBTENCION DE LA FRACCION DEL PLASMA CON ACTIVIDAD ANTISECRETORA



Fig. 2 Validación interensayo de 18 fracciones plasmáticas de pacientes con diarrea y sin diarrea. 26



* Actividad anti-secretores.

** Cada muestra fue procesada por dos investigadores diferentes para medición de la actividad anti-secretores.

TABLA 1. MEDICION DE LA ACTIVIDAD ANTISECRETORA DE LA FRACCION LECTINA DEL PLASMA DE CUATRO PACIENTES.

MUESTRA INOCULADA	ACUMULACION DE LIQUIDO (mg/cm) DESPUES DE RETAR CON TOXINA DE COLERA ^a :		
	1 μ g	3 μ g	‡ INHIBICION ^b
PBS	119 \pm 20	335 \pm 51	-----
FRACCION DEL PACIENTE 1	74 \pm 7	136 \pm 7	50
FRACCION DEL PACIENTE 2	79 \pm 23	163 \pm 30	45
FRACCION DEL PACIENTE 3	97 \pm 28	341 \pm 6	10
FRACCION DEL PACIENTE 4	120 \pm 25	336 \pm 40	0

a = Los valores representan el promedio \pm SEM de dos asas intestinales, 5 hs después del reto con toxina de cólera.

b = Representa el promedio de la inhibición observada a la dosis de 1 y 3 μ g del reto con toxina de cólera comparada con la de los controles (PBS).



TABLA 2. CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS PACIENTES CON DIARREA AGUDA Y LOS NIÑOS ASINTOMATICOS ESTUDIADOS.

CARACTERISTICA	DIARREA SIN SANGRE (N= 22)	DIARREA CON SANGRE (N= 20)	ASINTOMATICOS (N =21)
	MEDIANA, (AMPLITUD)		
EDAD (MESES)	17 (1-42)	11.5 (2-56)	24 (3-54)
EVOLUCION AL INGRESO (DIAS)	2 (1-3)	1.5 (1-3)	-----
NO DE EVACUACIONES EN 24 HS PREVIAS AL INGRESO	5 (3-20)	5.0 (3-15)	-----
DURACION DEL EPISODIO DE DIARREA, (DIAS)	4 (2-11)*	6.5 (1-13)*	-----

a) $P= 0.02$ entre diarrea aguda con y sin sangre.



TABLA 3. DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTISECRETORA EN PLASMA DE 21 NIÑOS < 5 AÑOS ASINTOMATICOS.

DATOS CLINICOS		
EDAD (MESES)	PATOGENO EN HECES	ACTIVIDAD ANTISECRETORA (%)
3	----	0
3	----	0
3	----	0
4	----	0
7	----	10
13	----	0
13	----	22
15	----	12
16	----	0
22	----	0
24	----	19
27	----	0
31	<u>H. nana</u>	0
36	----	0
36	----	0
37	----	0
39	<u>G. lamblia</u>	10
39	----	9
53	----	15
54	----	0
MEDIANA		0
AMPLITUD		(0-22)



TABLA 4. DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTISECRETORA EN PLASMA DE 22 NIÑOS < 5 AÑOS CON DIARREA AGUDA SIN SANGRE.

DATOS CLINICOS		ACTIVIDAD ANTISECRETORA (%)	
EDAD (MESES)	PATOGENO EN HECES	DIA 1	DIA 4
1	----	0	0
4	----	0	7
8	----	0	0
9	----	5	0
9	----	0	46
10	----	0	44
10	<u>EPEC</u>	0	45
13	----	5	44
14	----	0	42
15	----	0	29
16	----	17	0
18	----	8	15
21	----	43	55
21	----	35	21
22	<u>Salmonella "B"</u>	0	0
24	----	0	0
27	<u>Shigella sonnei</u>	0	14
28	----	0	0
33	----	7	20
33	----	15	0
36	<u>S. choleraesuis</u>	13	34
42	----	26	7
Mediana		0	14.5
Amplitud		0-43	0-55



TABLA 5. DETERMINACION DE ACTIVIDAD ANTISECRETORA EN PLASMA DE 20 NIÑOS < 5 AÑOS CON DIARREA AGUDA CON SANGRE.

DATOS CLINICOS		ACTIVIDAD ANTISECRETORA (%)	
EDAD (MESES)	PATOGENO EN HECES	DIA 1	DIA 4
2	<i>S. choleraesuis</i>	13	20
2	<i>C. jejuni</i>	0	6
2	<i>S. typhimurium</i>	0	10
3	<i>C. jejuni</i>	24	0
3	----	36	13
4	<i>C. jejuni</i>	8	14
4	<i>C. jejuni</i>	0	31
6	----	0	0
6	----	0	16
9	<i>C. jejuni</i>	0	0
14	----	31	62
16	<i>C. coli</i>	34	6
	<i>G. lamblia</i>		
18	<i>E. histolytica</i>	0	25
24	----	5	14
24	----	30	15
24	<i>S. flexneri</i>	5	0
27	----	0	0
36	<i>S. sonnei</i>	0	14
48	----	0	0
56	<i>C. jejuni</i>	26	23
Mediana		2.5	13.5
Amplitud		(0-36)	(0-62)



TABLA 6. ANALISIS ESTADISTICO DE LA ACTIVIDAD ANTISECRETORA EN PLASMA DE PACIENTES CON DIARREA AGUDA Y DE NIÑOS ASINTOMATICOS.

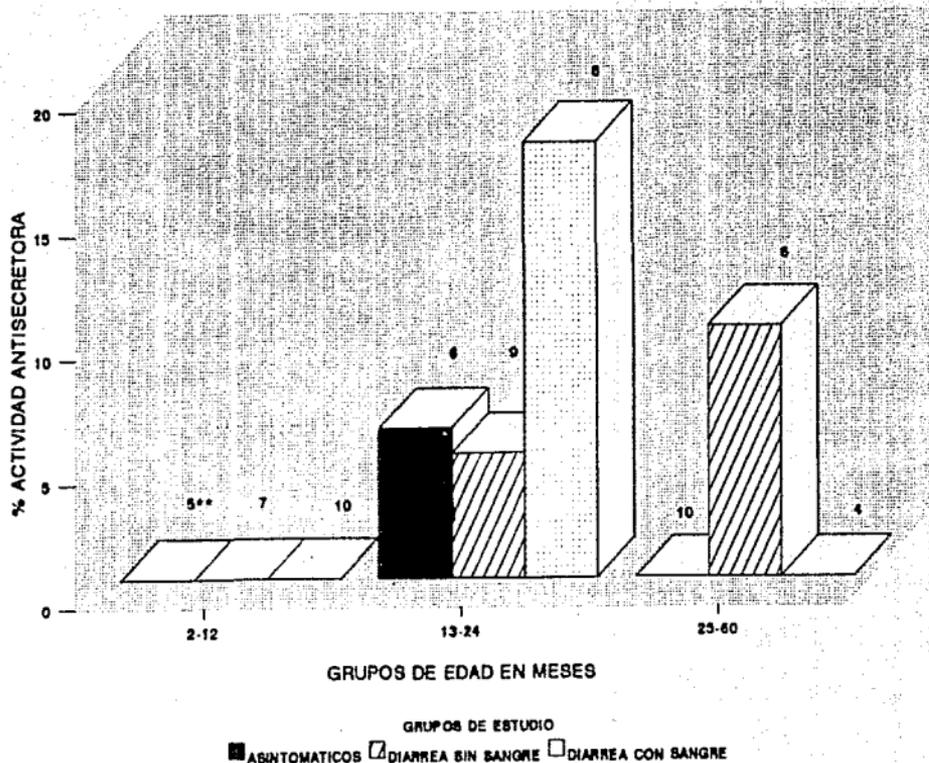
GRUPO	ACTIVIDAD ANTISECRETORA (%)		VALOR P
	DIA 1 MEDIANA (AMPLITUD)	DIA 4 MEDIANA (AMPLITUD)	
DIARREA SIN SANGRE	0 (0-43)	14.5* (0-55)	0.04
DIARREA CON SANGRE	2.5 (0-36)	13.5* (0-62)	0.36
DIARREA CON Y SIN SANGRE	0 (0-43)	13.5* (0-62)	0.03
ASINTOMATICOS	MEDIANA (AMPLITUD) 0 (0-22)		

a = p < 0.05 contrastada contra el grupo de asintomáticos.





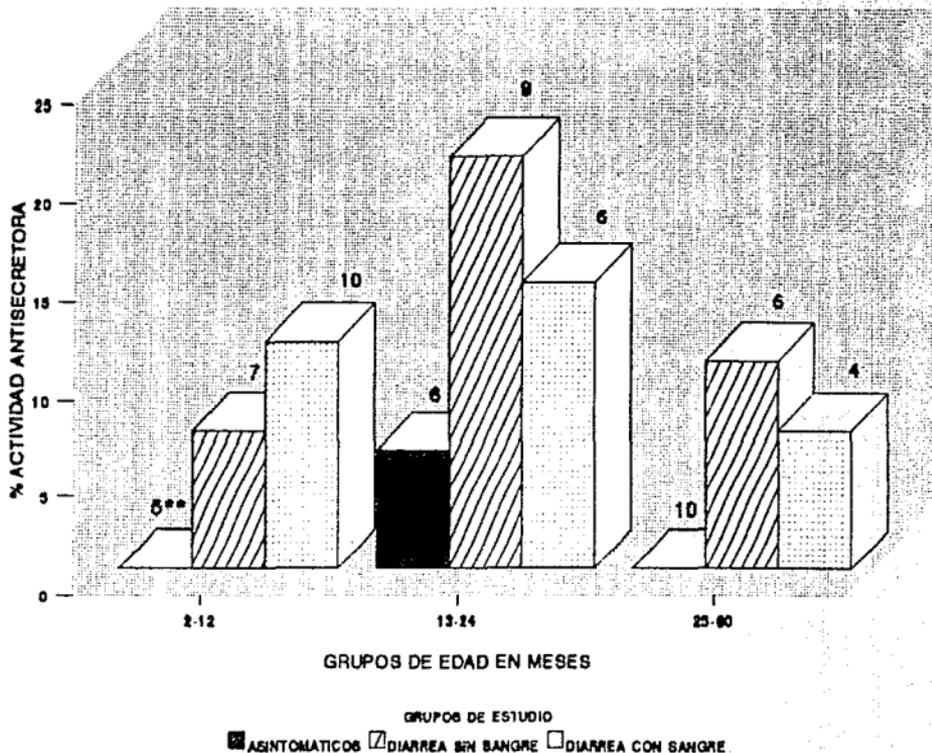
FIG. 3 Actividad antisecretora* en la muestra del día 1 en pacientes con diarrea y sin diarrea



* Expresado en mediana
** n en cada grupo de edad



Fig. 4 Actividad antisecretora* en la muestra del día 4 en 34 pacientes con diarrea y sin diarrea



* Expresada en mediana
** n de cada grupo de edad

DISCUSION

El factor antisecretor es una proteina que se ha caracterizado en ratas, cerdos y cadáveres humanos (42). Su actividad biológica reconocida hasta el momento es inhibir la secreción intestinal producida por diversas enterotoxinas en modelos de asa ligada en ratas y cerdos (38,39).

En lechones se ha observado que el FAS tiene un efecto protector contra la diarrea enterotoxigénica por *E. coli* en aquellos que ingirieron leche con el FAS comparado con aquellos que ingirieron leche sin la presencia del FAS, sugiriendo que el FAS puede tener un efecto protector contra la diarrea en lechones (48).

Este trabajo es el primero que se realiza en niños para estudiar la existencia del factor antisecretor en el plasma. Para ello se estudiaron a pacientes con diarrea aguda, ya que por los mecanismos que FAS es inducido en modelos animales, como lo es el incremento en la secreción intestinal producida por enterotoxinas y/o por substancias inflamatorias (56,57) presentes por el daño a la mucosa intestinal, es factible que el FAS fuera inducido durante el episodio diarreico en humanos.

Nuestros resultados demuestran que existe actividad antisecretora en el plasma de los niños con diarrea aguda y que pudo detectarse usando el mismo bioensayo descrito para FAS de ratas y cerdos. Es importante señalar que encontramos que en



episodios diarreicos agudos con o sin sangre, la actividad antisecretora estuvo presente en menor cantidad al inicio de la diarrea y que esta se incrementó cuando la diarrea se limitó. Aunque solo existió diferencia estadística en el grupo de diarrea aguda sin sangre, también fue evidente que en el grupo de diarrea con sangre existe un incremento de la AAS en plasma cuando la diarrea se limita. No hubo ninguna diferencia significativa cuando se comparó la AAS de G2 contra G3, sugiriendo este último análisis que ambos grupos provienen de la misma población y que la actividad antisecretora se presenta independientemente de que la diarrea ocurra con o sin daño a la mucosa intestinal.

La actividad antisecretora estuvo presente en una tercera parte del grupo de niños asintomáticos y fue menor comparada con la actividad antisecretora de los grupos con diarrea. El hecho de encontrar AAS en los niños asintomáticos abre la interrogante de que esta AAS pueda estar presente en forma basal y sus niveles se incrementen con un estímulo como lo es el desequilibrio hidroelectrolítico que ocurre en la diarrea. Estas y otras preguntas podrán ser contestadas cuando se tenga una prueba más sensible y menos variable que el bioensayo usado para detectar la proteína en este estudio.

El incremento significativo de la actividad antisecretora cuando la diarrea se limita aunado a la diferencia significativa contra la AAS de los controles, sugiere que probablemente esta AAS forme parte de los mecanismos compensatorios que se presentan en la limitación de la diarrea (58). Estos resultados son



similares a los encontrados en un estudio preliminar con adultos sanos y adultos con diarrea acuosa (datos no publicados), que parece apoyar la hipótesis del papel de esta AAS en la limitación de la diarrea.

La naturaleza de la AAS en el plasma de los niños estudiados es probablemente proteica, esto se sugiere porque a semejanza del FAS de hipófisis de rata, cerdo y cadáveres humanos (45) tiene afinidad hacia el gel de agarosa y es activo cuando se ensaya en el modelo de asa ligada en rata. Es muy poco probable que la AAS sea un anticuerpo ya que las inmunoglobulinas no tienen afinidad por la agarosa.

Los investigadores que han estudiado el FAS proponen varios posibles mecanismos de acción (59): 1) El factor antisecretor puede contribuir a una regulación de la adenilato ciclasa, dado que las ratas resistentes a CT no muestran activación de la adenilato ciclasa por CT; 2) el factor antisecretor puede modular el efecto de CT en los reflejos neurales intestinales dado que el FAS es uno de los más importantes inhibidores del transporte del GABA sobre membranas neurales (60), 3) el FAS puede inhibir el transporte de agua vía la interferencia con canales iónicos en las células epiteliales (61), y 4) el FAS puede interferir en el proceso de unión entre la toxina y el receptor en la membrana intestinal, aunque este último mecanismo es menos probable dado que CT se une igualmente al epitelio intestinal de ratas control y resistentes a CT (59) y toxina A de C. difficile se une al epitelio después de administrar FAS (44).



Aún cuando no fue objetivo del estudio y el tamaño de la muestra no permite llegar a conclusiones, se hizo un análisis de la actividad antisecretora por grupos de edad y su posible asociación con algún enteropatógeno específico y ello permitió observar que la AAS está prácticamente ausente en los grupos de menores de 1 año de edad, tanto en los pacientes con diarrea como en los niños asintomáticos. En niños mayores de 12 meses la AAS fue mayor; este aumento aparente de la AAS a mayor edad requiere investigarse con un tamaño de muestra adecuado que permita comprobar las diferencias; el FAS se encontró también en concentraciones altas en ratas y cerdos de mayor edad en contraste con las concentraciones no significativas que se encontraron con los animales jóvenes (menores de 6 meses) (47,59). La presencia del FAS en la leche materna y el no haber cursado con episodios diarreicos previos pudieran influir en la inducción de AAS o en la magnitud de la respuesta y son variables a controlar en futuros estudios. Con respecto a la posible asociación con enteropatógenos no se encontró diferencia, sin embargo, como en el análisis anterior el tamaño de muestra en los grupos resultó pequeño. Cabe señalar que los estudios hechos en animales sugieren que FAS se induce por la hipersecreción independientemente de su causa (43).

La aparente similitud de la AAS detectada en este estudio con el FAS encontrado en ratas, cerdos y cadáveres humanos le hace una sustancia interesante y prometedora si consideramos que una dosis de 10^{-12} mol/kg de peso corporal de FAS de hipófisis son suficientes para abolir la secreción intestinal de CT o



prostaglandina E₁ (42,45); otras drogas antidiarreicas como fenotiazinas, loperamida, y ácido nicotínico, inhiben la secreción de CT a 10^{-2} - 10^{-4} mol/kg de peso corporal (46), mientras los neuropéptidos, NPY y PYY, revierten la secreción intestinal inducida por prostaglandina con cerca de 10^{-2} - 10^{-3} mol/kg de peso corporal (38).

La actividad antisecretora (14.5 %) encontrada en este estudio es muy similar a la encontrada con uno de los péptidos antisecretores más potentes, el péptido YY (18.5 % a dosis baja) (62).

Otras drogas usadas en el tratamiento de la diarrea han sido poco eficaces y ocasionan efectos colaterales severos que limitan su uso y la mayoría están proscritas en pediatría, ejemplo de ellas son: Difenoxilato y loperamida que pueden causar somnolencia, íleo paralítico, náuseas, vómitos y paro respiratorio (63); clorpromazina que causa sedación y puede interferir con la ingesta de SRO en niños (64). Caolín solo incrementa la consistencia de las heces, pero no se afecta el peso y el contenido de agua (65). Es por ello que sigue la búsqueda intensa de una droga eficaz y sin efectos colaterales que ayude a tratar la diarrea o permita complementar la SRO.

El FAS se induce con azúcares como manosa y sorbitol y los aminoácidos glicina y alanina en ratas (66) por lo que sería interesante estudiar si sucede lo mismo en humanos, una vez que en este estudio se ha demostrado la existencia de actividad antisecretora en el plasma.



Finalmente queremos hacer énfasis en el diseño del estudio que es descriptivo y de las limitaciones que ello implica, sin embargo, debemos tener en mente que es el primer estudio realizado en niños que aporta resultados que son base para plantearse otras interrogantes a investigar.



CONCLUSIONES

1. - Se detectó actividad antisecretora en una fracción lectina de plasma de humanos usando bioensayo en rata.
2. - Al inicio de la diarrea aguda sin sangre la actividad antisecretora fue baja y esta se incrementó cuando la diarrea se limitó.
3. - La actividad antisecretora detectada en los pacientes con diarrea aguda con sangre fue semejante a la detectada en los pacientes con diarrea aguda sin sangre.
4. - La actividad antisecretora detectada en los niños asintomáticos fue baja.



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Guerrant RL, Hughes JM, Lima LL y Crane J. Diarrhea in developed and developing countries: Magnitude, special settings, and etiologies. Rev Infect Dis 1990; 12 Suppl 1: S41-S50.
- 2.- A manual for treatment of diarrhoea. WHO/CDD/SER/80.2 Rev.2 1990.
- 3.- Claesson M. y Merson M. Global progress in the control of diarrheal diseases. Pediatric Infect Dis J. 1990; 9: 345-355.
- 4.- Cohen MB. Etiology and mechanisms of acute infectious diarrhea in infants in the United States. J Pediatr 1991; 118: S34-9.
- 5.- Giannella RA. Pathogenesis of acute bacterial diarrheal disorders. Ann Rev Med 1981; 32: 41-57.
- 6.- Guerrant RL, Bobak DA. Bacterial and Protozoal Gastroenteritis N Eng J Med 1991; 325: 327-340.
- 7.- Field M., Rao MC y Chang EB Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease. N Eng J Med 1989; 321: 879-883.
- 8.- Leon E, Proia RL y Hart DA. Membrane receptors for bacterial toxins. Microbiol Rev 1983; 47: 596-620.
- 9.- Middlebrook JL y Dorland RB. Bacterial toxins: Cellular mechanisms of action. Microbiol Rev 1984; 48: 199-221.
- 10.- Guerrant RL: Introduction and overview. En: Evered D, Ehelan J, (ed). Microbial toxins and diarrhoeal disease. London Ciba Foundation Symposium 112, 1985; 1-13.
- 11.- Huott PA, Liu W, McRoberts JA, Gianella RA y Dharmasathaphorn K. Mechanism of action of Escherichia coli heat stable enterotoxin in a human colonic cell line. J Clin Invest 1988; 82: 514-523.
- 12.- Okamoto K, Inoue T, Shimizu K, Hara S y Miyama A. Further purification characterization of heat-stable enterotoxin produced by Yersinia enterocolitica. Infect Immun 1982; 35: 958-962.
- 13.- Browne RM. Traditional enteropathogenic Escherichia coli of infantile diarrhea Rev Infect Dis 1987; 9: 28-53.
- 14.- Barbieri D, DeBrito T, Hoshino S. y cols. Giardiasis in childhood. Absorption tests and biochemistry, histochemistry, light and electron microscopy of jejunal mucosa. Arch Dis Child 1970; 45: 466-472.



- 15.- Navin TR y Juranek DD. Cryptosporidiosis-clinical, epidemiologic and parasitologic review. Rev Infect Dis 1984; 6: 313-327.
- 16.- Christensen ML. Human viral gastroenteritis. Clinic Microbiol Rev 1989; 2: 51-89.
- 17.- Sansonetti PJ. Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by Shigella species Rev Infect Dis 1991; 13 (Suppl 4): S286-S292.
- 18.- Rolfe AT, Acheson DW, y Keusch GT Shiga toxin: Purification, structure and function Rev Infect Dis 1991; 13 (Suppl 4) S293-S297.
- 19.- Levine MM. Escherichia coli that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis 1987; 155: 377-388.
- 20.- Rennels MB y Levine MM. Classical bacterial diarrhea: perspectives and update-Salmonella, Shigella, Escherichia coli, Aeromonas and Plesiomonas. Pediatric Infect Dis J 1986; 5: S91-S100
- 21.- Klipstein FA, Engert RF y Short H. Pathogenic properties of Campylobacter jejuni. Assay and correlation with clinical manifestations. Infect Immun 1985; 50: 43-49.
- 22.- Ruiz-Palacios GM, Torres NJ, y cols. Cholera-like enterotoxin produced by Campylobacter jejuni: Characterization and clinical signification. Lancet 1983; II: 250-253.
- 23.- Lyerly DM, Krivan HC y Wilkins TC. Clostridium difficile: Its disease and toxins. Clin Microb Rev 1988; 1: 1-18.
- 24.- Torres J, Jennische E y Lonroth I. Enterotoxins from Clostridium difficile; diarrhoeogenic potency and morphological effects in the rat intestine. Gut 1990; 31: 781-785.
- 25.- Martinez-Palomo A. The pathogenesis of amoebiasis. Parasite Pathology 1987; 3: 123-131.
- 26.- Allardyce RA y Bienenstock. the mucosal immune system in health and disease, with an emphasis on parasitic infection. Bull/WHO 1984; 62: 7-25.
- 27.- Brandtzaeg P, Halnstensen TS, Kett K, Krajci P., Kvale D, Rognum TO y Sollid LM. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: Humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. Gastroenterology 1989; 97: 1562-84.
- 28.- Holmgren J and Lycke N. Immune mechanisms in enteric infections. En: Holmgren J, Lindberg A, Molby R, (ed).



Development of vaccines and drugs against diarrhea. Lund: 11th Nobel Conference, Stockholm 1986: 9-22.

- 29.- Field M, Rao MC, y Chang EB. Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease. *N Eng J Med* 1989; 321: 800-806.
- 30.- Cooke HJ. Neurobiology of the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1986; 90: 1057-81.
- 31.- Furness JB, Costa M, Beradsley AM y cols. Detection and characterization of Neurotransmitters, particularly peptides, in the Gastrointestinal tract. En: Polak JM, Bloom SR, Wright NA, Dalay MJ, (ed). *Structure of the gut*. Glaxo Group Research Limited, London 1982: 239-248.
- 32.- Cassuto J, Jodal M, Tuttle R y Lundgren O. On the role of intramural nerves in the pathogenesis of cholera toxin-induced intestinal secretion. *Scand J Gastroent* 1981; 16: 377-384.
- 33.- Banwell JG. Pathophysiology if diarrheal disorders. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (Suppl 1): S30-S35.
- 34.- Dharmasathaporn K, Sherwin RS, y Dobbins JW. Somatostatin inhibits fluid secretion in the rat jejunum. *Gastroenterology* 1980; 78: 1554-1558.
- 35.- Nakaki T, Nakadate T, Yamamoto S y Kato R. Alpha-2 adrenergic inhibition of intestinal secretion induced by prostaglandin E₁, Vasoactive Intestinal Peptide and dibutyryl cyclic AMP in rat jejunum. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 220: 637-641.
- 36.- Kachur JF, Miller RJ, y Field M. Control of guinea pig intestinal electrolyte secretion by a delta-opiate receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77: 2753-2756.
- 37.- Cox HM, Cuthbert AW, Hakanson R y Wahlestedt. The effect of Neuropeptide Y and Peptide YY on electrogenic ion transport in rat intestinal epithelia. *J Physiology* 1988; 398: 65-80.
- 38.- Servin AL, Fessard R, Balasubramaniam A, Pierre SS y Laburthe M. Peptide-YY and Neuropeptide-Y inhibit vasoactive intestinal peptide-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate production in rat small intestine: Structural requirements of peptides for interacting with peptide-YY-prerring receptors. *Endocrinology* 1989; 124: 692-700.
- 39.- Santosham M, y Greenough BW. Oral therapy: A global perspective. *J Pediatric* 1991; 118: S44-S51.
- 40.- Drugs in the management of acute diarrhoea in infants and young children. WHO/CDD/CTM/1986.
- 41.- Lange S, y Lonroth I. Passive transfer of protection



- against cholera toxin in rat intestine. FEMS Microbiology Letters 1984; 24: 165-168.
- 42.- Lonnröth, y I. Lange S. Inhibition of cyclic AMP-mediated intestinal hypersecretion by pituitary extracts from rats pretreated with cholera toxin. Medical Biology 1984; 62: 290-294-
- 43.- Lonnröth I, Lange S y Skhadauge E., The antisecretory factors: Inducible proteins which modulate secretion in the small intestine. Comp Biochem Physiol 1988; 90A: 611-617.
- 44.- Torres J, Jennische E, Lange S y Lonnröth I. Clostridium difficile toxin A induces a specific antisecretory factor which protects against intestinal mucosal damage. Gut 1991; 32: 791-795.
- 45.- Lonnröth I y Lange S. Purification and characterization of a hormone-like factor which inhibits cholera secretion. FEBS 1984; 177: 104-108.
- 46.- Lonnröth I y Lange S. Purification and characterization of the antisecretory factor: A protein in the central nervous system and in the gut which inhibits intestinal hypersecretion induced by cholera toxin. Biochim Biophys Acta 1986; 883: 138-144.
- 47.- Lange S y Lonnröth I. Bile and milk from cholera toxin treated rats contain a hormone-like factor which inhibits diarrhea induced by the toxin. Int Archs Allergy Appl Immun 1986; 296: 270-275.
- 48.- Lonnröth I, Martinsson K y Lange S. Evidence of protection against diarrhoea in suckling piglets by a hormone-like protein in the sow's milk. J. Vet Med 1988; 35: 1-10.
- 49.- Manual for laboratory investigations of acute infections. World Health Organization, Geneva 1987. Publication No. WHO/CDD/83.3 Rev. 1.
- 50.- Collection and Preservation of feces. En: Lawrence R. Ash y Thomas C. Orihel, (ed). A guide to laboratory procedures and identification. American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1987; 3-46.
- 51.- Moseley L, Echeverria P y cols. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli by colony hybridization using three enterotoxigenic gene probes. J Infect Dis 1982; 145: 863-869.
- 52.- Hughes JH, Tuomari AV, Mann DR y Hamparian HH. Latex immunoassay for rapid detection of rotavirus. J Clin Microbiol 1984; 20: 441-447.
- 53.- Lange S. A rat model for an in vivo assay of enterotoxigenic diarrhea. FEMS Microbiology Letters 1982; 15: 239-242.

