

Capacidad antioxidante tisular y traslocación bacteriana bajo nutrición parenteral. Estudio experimental*

I. Eizaguirre², L. Aldámiz⁵, P. Aldazábal¹, N. García¹, A.B. Asensio¹, P. Bachiller³, J.M. García Arenzana⁴, P. Sanjurjo⁵, G. Pérez Nanclares⁵

¹Unidad Experimental. ²Servicio de Cirugía Pediátrica. ³Servicio de Farmacia. ⁴Sección de Microbiología. Complejo Hospitalario Donostia. San Sebastián. ⁵Hospital de Cruces. Barakaldo.

RESUMEN: Durante la nutrición parenteral total (NPT) aparecen alteraciones en la capacidad antioxidante (CA) que pueden depender de la propia NPT o de su exposición a la luz. La traslocación bacteriana (TB) es frecuente bajo NPT y puede estar relacionada con la CA.

Se ha estudiado el efecto adverso de la NPT estándar o suplementada con glutamina (SG), con o sin exposición a la luz, sobre la CA, y su relación con la TB.

Tras colocar un catéter central a 49 ratas Wistar adultas, se les randomizó para uno de los cinco grupos siguientes:

- Sham (n = 16): suero salino i.v. y dieta oral libre.
- NPT (n = 10): NPT estándar expuesta a la luz.
- NPT(-) (n = 8): NPT estándar sin exposición a la luz.
- GNPT (n = 8): NPT expuesta a la luz y SG.
- GTPN(-) (n = 7): NPT sin exposición a la luz y SG.

A los diez días se determinó el glutatión reducido (GSH) en hígado y riñón y se cultivaron ganglio mesentérico y sangre portal y periférica. Los grupos con NPT tuvieron niveles significativamente más bajos de GSH que el grupo Sham, pero no hubo diferencias entre los grupos con NPT estándar o, ni entre grupos con y sin exposición a la luz. En el grupo Sham la TB fue del 12%, mientras que en los que recibieron NPT fue mayor ($p < 0,05$): 70% en el grupo NPT, 88% en el NPT(-), 86% en el GNPT(-) y sólo 50% en el grupo GNPT ($p = 0,06$ vs grupo NPT). En conclusión: 1. La NPT disminuye la CA e induce TB. 2. El SG o la protección contra la luz no mejoran la CA tisular bajo NPT. 3. La ausencia de luz no disminuye la TB debida a la NPT. 4. El SG reduce la TB sólo en presencia de luz.

PALABRAS CLAVE: Nutrición parenteral total; Capacidad antioxidante; Glutatión reducido; Glutamina; Exposición a la luz; Traslocación bacteriana.

TISSUE ANTIOXIDANT CAPACITY AND BACTERIAL TRANSLOCATION UNDER TOTAL PARENTERAL NUTRITION. AN EXPERIMENTAL STUDY

ABSTRACT: Alterations in the antioxidant system (AS) has been ob-

Correspondencia: Iñaki Eizaguirre, Plaza del Deporte 8, 3º A, 20009 San Sebastián.

*Este trabajo ha sido presentado en el XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica en Santander, Mayo 2000.

Trabajo realizado con una ayuda del FIS 98/1212.

Recibido: Mayo 2000. Aceptado: Enero 2001

served during total parenteral nutrition (TPN). Light exposure or changes in the composition of TPN may affect this deleterious effect. On the other hand, bacterial translocation (BT) is frequent under TPN and may be related to AS.

The aim of the study was to determine the adverse effect of standard and glutamine-enriched (GE) TPN, with or without light exposure, on the AS, and its relationship to BT.

Forty-nine adult Wistar rats underwent central venous cannulation and were randomly assigned to one of five groups:

- Sham (n = 16): chow and water ad libitum and saline i.v.
- TPN (n = 10): had standard TPN.
- TPN(-) (n = 8): standard TPN without light-exposure.
- GTPN (n = 8): GE TPN.
- GTPN(-) (n = 7): GE TPN without light exposure.

After 10 days, glutatión reducido (GSH) was determined in liver and kidney. Mesenteric lymph nodes, peripheral and portal blood samples were cultured for BT.

Comparing to Sham rats, TPN groups had statistically significant lower GSH levels, but there were no differences between standard or GE groups nor with or without light exposure groups. Sham animals had 12% BT. Significantly higher BT ($p < 0.05$) was found in TPN rats: 70% in TPN group, 88% in TPN(-) group, 86% in GTPN(-) animals and only 50% in GTPN group ($p = 0.06$ vs TPN group).

To conclude:

1. TPN reduces antioxidant capacity and induces BT. 2. Glutamine supplementation or light protection do not improve tissue antioxidant capacity under TPN. 3. Glutamine supplementation tends to reduce BT only in the presence of light. 4. Absence of light exposure does not improve BT TPN-related.

KEY WORDS: Bacterial translocation; Glutamine; Light exposure; Glutatión; Total parenteral nutrition; Antioxidants status.

INTRODUCCIÓN

El efecto perjudicial que la nutrición parenteral total (NPT) tiene sobre la capacidad antioxidante es un fenómeno conocido. Se ha puesto de manifiesto al observarse una disminución del glutatión reducido (GSH), que es uno de los más potentes antioxidantes intracelulares que se conocen, así como un aumento de los radicales libres en recién nacidos que

recibieron NPT^(1,2). La adición de glutamina es capaz de reponer los niveles deteriorados de GSH⁽³⁾ y la supresión de la exposición a la luz de la solución de NPT (incluyendo jeringa de infusión y catéter de conexión con el sujeto), disminuye la peroxidación lipídica y la degradación de las vitaminas antioxidantes E y C^(4,5). Ambos mecanismos, al parecer, mejoran la capacidad antioxidante bajo NPT⁽³⁻⁵⁾.

También se ha descrito que la adición de glutamina a la NPT reduce el paso de gérmenes a través de la pared intestinal, es decir, la traslocación bacteriana (TB), fenómeno frecuente en los pacientes que reciben este tipo de tratamiento^(6,7). Las enterobacterias, pasan a la circulación portal, al sistema linfático o al peritoneo y, si no son depurados por los mecanismos de defensa en el hígado o por los sistemas defensivos en general, llegan a la circulación sistémica, con el riesgo de sépsis que ello supone⁽⁸⁾.

Los objetivos del presente trabajo han sido: i) Estudiar el efecto de la NPT estándar sobre la capacidad antioxidante tisular, determinada mediante el glutatión reducido (GSH) a nivel hepático y renal. ii) Estudiar el efecto de la NPT suplementada con glutamina, con o sin exposición a la luz, sobre la capacidad antioxidante tisular, determinada mediante el glutatión reducido (GSH) a nivel hepático y renal. iii) Analizar los posibles cambios que se producirían en la TB por la adición de glutamina a la NPT o la supresión de la exposición a la luz.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 49 ratas Wistar macho de entre 225 y 275 g [CRL:WI]. BR. Criffa, Barcelona, España], criadas y mantenidas en nuestras instalaciones de acuerdo con la legislación vigente⁽⁹⁾. Se dividieron en cinco grupos:

- Grupo SHAM (n = 16). Con infusión de suero fisiológico (1 mL/100 g/24 h) y acceso libre a comida (pienso de mantenimiento) y agua.
- Grupo NPT (n = 10). Con infusión de NPT (300 mL/kg/24 h, con un aporte calórico total de 280 kcal/kg/24 h) sin acceso a comida ni agua. La NPT con aminoácidos estándar (10), LCT como fuente lipídica y expuesta a la luz.
- Grupo NPT (n = 8). Con infusión de NPT sin acceso a comida ni agua. La NPT con aminoácidos estándar, LCT como fuente lipídica y sin exposición a la luz.
- Grupo NPTG (n = 8). Con infusión de NPT sin acceso a comida ni agua. La NPT enriquecida con glutamina aportada como dipéptido (alanina-glutamina) aportando el 30% del nitrógeno total, LCT como fuente lipídica y expuesta a la luz.
- Grupo NPTG (n = 7). Con infusión de NPT sin acceso a comida ni agua. La NPT enriquecida con glutamina, LCT como fuente lipídica y sin exposición a la luz.

A todos los animales bajo anestesia general (ketamina 6 mg/100 g y pentobarbital 2 mg/100 g) se les colocó un caté-

ter de silicona en vena superior a través de la yugular interna. El catéter se exteriorizó tras tunelización subcutánea por la línea media dorsal entre ambas extremidades anteriores. A través de un arnés y un muelle metálico de protección hasta la conexión giratoria su extremo libre se conectó a una bomba de infusión de jeringa a través de la cual se les infundió suero fisiológico o la NPT correspondiente. Cuando la NPT no debía de exponerse a la luz se recubrió la jeringa de infusión y el catéter con material aislante de luz (papel aluminio).

Los animales permanecieron alojados individualmente en jaulas metabólicas con ciclos controlados de luz/oscuridad (12 h), aire acondicionado (15 renovaciones/hora) y 18-22 °C o de temperatura, cumpliendo la normativa legal (1986, 86/609/CEE) a lo largo de los 10 días que duró el experimento, durante los cuales se cuantificaron sus ingresos y pérdidas a diario.

Al final del estudio los animales fueron sacrificados en condiciones estériles, anestesiados y exanguinados por punción portal y cardíaca. Se extrajeron hígado y riñón derecho (ambos perfundidos previamente con suero salino por vía vascular para eliminar el componente sanguíneo y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido). Parte (0,3 g) de cada órgano se homogeniza, se acidifica y se almacena en congelador a -80 °C para la posterior determinación de GSH. Esta determinación enzimática se basa en el método propuesto por Brigelius⁽¹¹⁾, basado en la conjugación del GSH con Cl-2,4-dinitrobenceno (CDNB), catalizada por la GSH-S-transferasa (GST).

Las muestras de sangre portal (1 mL) y sangre periférica (2 mL) fueron recogidas en frascos de hemocultivo se procesaron igual que los hemocultivos rutinarios del hospital con un lector de hemocultivos durante 7 días.

Los ganglios mesentéricos fueron extraídos de forma estéril, se mezclaron en solución salina estéril, se homogeneizaron y sembraron con asa calibrada de 100 µL (0,1 mL) en placas de agar soja tripticase con sangre desfibrinada de caballo, agar manitol y agar Mac Conkey. Las placas se incubaron durante 48 horas a 35 °C.

La identificación de bacterias se realizó por métodos convencionales: catalasa, coagulasa, bilisesculina en los gram positivos y mediante galería para la identificación de Enterobacterias den los gram negativos.

El cultivo de sangre tanto portal como periférica se consideró positivo de forma cualitativa. En el tejido se consideró positivo un crecimiento de > 100 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL.

Se definió la TB como la presencia de gérmenes entéricos gram negativos en cualquiera de los territorios observados.

Cada variable de cada grupo se describió por métodos estadísticos comunes. Las comparaciones entre grupos se hicieron mediante test de Chi-cuadrado, con la corrección de Yates y test de la «t» de Student o de la «U» de Mann-Whitney.

Tabla I Niveles de glutatión reducido (GSH) en hígado y riñón

Grupos	Nº	GSH hepático (nmol/g) media ± DS	GSH renal (nmol/g) media ± DS
SHAM	16	5084,16 ± 565,30	1308,10 ± 190,02
NPT	10	1506,30 ± 462,90*	696,30 ± 318,50
NPT(-)	8	2209,07 ± 1329,60*	912,01 ± 328,92
GNPT	8	1157,07 ± 501,51*	908,00 ± 350,90
GNPT(-)	7	1674,00 ± 1267,20*	648,30 ± 74,90*

*p < 0,001 vs SHAM

Se aceptó para todo el estudio una p < 0,05 como nivel de significación estadística.

RESULTADOS

Los valores (incluyendo media y desviación estándar) de glutatión reducido (GSH) hepático y renal se presentan en la tabla I.

Todos los grupos con NPT tuvieron niveles más bajos de GSH que en el grupo SHAM. A nivel hepático con valores significativos (p < 0,001) en todos los grupos [NPT, NPT(-), GNPT y GNPT(-)], a nivel renal sólo se observaron diferencias significativas en el grupo GNPT(-).

Los grupos con NPT (estándar, enriquecida con glutamina, con y sin exposición a la luz), entre ellos, no presentaron diferencias en ninguna de las dos determinaciones.

La incidencia de TB se muestra en la tabla II, incluyendo el número total de animales y el porcentaje en cada uno de los territorios observados, a nivel local (sangre portal y ganglio mesentérico) y en sangre periférica, así como la TB total.

Todos los grupos con NPT tuvieron una TB superior al grupo SHAM en prácticamente todos los territorios observados.

El efecto de la falta de luz fue negativo para la TB, ya que a nivel local, sin glutamina [NPT vs NPT(-)] o en sangre periférica, con glutamina [GNPT vs GNPT(-)] tuvieron un índice mayor los grupos sin exposición a la luz. La TB total también fue superior en los grupos no expuestos a la luz, aunque aquí las diferencias no fueron significativas.

La adición de glutamina sólo mostró un efecto favorable a nivel de sangre periférica y en total (NPT vs GNPT), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Los cultivos realizados en nuestro estudio fueron 147, de los cuales 42 resultaron positivos como indicadores de TB. En la mayoría de los casos se encontró un único germen marcador de TB; sólo en 11 cultivos positivos se localizaron dos gérmenes.

Los gérmenes más frecuentemente encontrados fueron:

Tabla II Traslocación bacteriana

Grupos	Nº	Sangre portal Ganglio n (%)	Sangre periférica n (%)	Total n (%)
SHAM	16	2 (12%)	0 (0%)	2 (12%)
NPT	10	5 (50%)*	4 (40%)*	7 (70%)*
NPT(-)	8	7 (88%)*#	2 (25%)*	7 (88%)*
GNPT	8	4 (50%)*	1 (12%)	4 (50%)*\$
GNPT(-)	7	5 (71%)*	6 (86%)*&	

*p < 0,05 vs SHAM; # p < 0,05 vs NPT; & p < 0,01 vs GNPT; \$ p = 0,06 (GNPT vs NPT).

Escherichia coli, Proteus mirabilis, seguidos de Klebsiella y enterococos.

DISCUSIÓN

La nutrición parenteral total (NPT) viene siendo utilizada como soporte nutricional imprescindible en numerosas patologías desde hace varias décadas, a lo largo de las cuales se ha ido desarrollando esta técnica haciéndola eficaz, y consiguiendo mejorar notablemente las expectativas en el tratamiento de muchas enfermedades. En el campo de la pediatría y la cirugía pediátrica, la NPT supuso un significativo avance, ya que hay que destacar que en esta edad no sólo hace falta mantener el equilibrio nutricional, sino permitir el crecimiento y desarrollo⁽¹²⁾.

Son varias las circunstancias que favorecen la TB bajo NPT, siendo las más conocidas, la atrofia de las vellosidades intestinales secundarias al ayuno, la alteración en la flora bacteriana, sobrecrecimiento bacteriano, alteración de la motilidad intestinal, o la alteración del sistema inmune del huésped⁽¹³⁻¹⁵⁾. Pero hay otros factores que pueden jugar un papel. La NPT altera la capacidad antioxidante (CAO) produciendo un aumento de radicales libres y una disminución del GSH^(1,2), que es uno de los más potentes antioxidantes intra-

celulares, esencial para la función y crecimiento celular, por lo que tiene un efecto importante en la proliferación celular del epitelio intestinal^(1,7,16). Esta alteración del epitelio puede modificar la permeabilidad intestinal y favorecer la TB. De hecho, en varios modelos experimentales de TB se ha observado una relación entre CAO y TB. Blair y cols. estimulan la síntesis de GSH mediante administración de L-2-Oxothiazolidina en ratas irradiadas, en las que la TB es alta. Tras conseguir restaurar los niveles de GSH, la TB disminuyó de manera significativa⁽¹⁸⁾. Schimpl y cols. en su modelo de TB en ratas con colédoco ligado⁽¹⁷⁾ y con alto índice de TB, consiguen disminuirlo cuando aumentan la tasa de GSH tisular al administrar vitaminas E y C, de marcado valor antioxidante.

En la relación NPT-CAO hay dos factores que tienen interés, la glutamina y la exposición a la luz. La glutamina es un aminoácido esencial para reponer los niveles deteriorados de GSH, aunque la ventaja de su administración no está del todo clara. Existe un gran número de investigaciones en animales que muestra sus efectos beneficiosos (minimiza la depleción de GSH tisular y reduce la traslocación bacteriana)^(3,19). En el hombre los trabajos son escasos, pero parece que la glutamina preserva la inmunidad intestinal, previene cambios en la permeabilidad, reduce la tasa de infección y atenúa la atrofia debida al ayuno⁽¹⁾. En Pediatría hay todavía menos datos, destacando un trabajo reciente de Tubman y Thompson, para la Colaboración Cochrane. Revisan la evidencia publicada sobre la utilidad del suplemento de glutamina en prematuros y sólo encuentran tres trabajos que cumplen los requisitos para ser tenidos en cuenta. Hacen un metaanálisis⁽¹⁹⁾ en el que se concluye que no hay evidencia suficiente para recomendar el suplemento de glutamina en prematuros, y que se debe hacer un estudio randomizado amplio para determinar si la glutamina mantiene o no la integridad de la mucosa y reduce la tasa de infección.

La exposición a la luz de la solución de NP es otro factor que puede jugar un papel importante en la alteración de la capacidad antioxidante bajo NPT, ya que produce una peroxidación lipídica y se degradan las vitaminas antioxidantes^(4,20). La protección de la luz con material opaco de toda la solución (incluyendo la bolsa o la jeringa de infusión y catéter que conecta con el sujeto), reduce la generación de peróxidos y las alteraciones de los componentes específicos de la solución. En este sentido, se ha descrito recientemente que la mejor protección se obtiene utilizando material de color amarillo o naranja para la bolsa y el catéter⁽⁴⁾.

Nuestros resultados confirman, por una parte, que la NPT se asocia un grado alto de TB, ya que todos los grupos que la recibieron tuvieron índices de entre 50 y 86%, por el 12% de los animales alimentados por vía oral. Por otro lado, la CAO tisular, a nivel hepático, se ha visto muy disminuida.

Sin embargo, la adición de glutamina no ha conseguido elevar el GSH hepático, que se corresponde con los datos pu-

blicados por Denno y cols.⁽¹⁾, quienes consiguen elevar el GSH plasmático pero no el tisular, al suplementar con glutamina la NPT.

Tampoco con la supresión de la exposición a la luz se mejora la CAO a nivel hepático, aunque los efectos negativos de la luz han de buscarse más a nivel de la formación de hidroperóxidos, que de la alteración del GSH⁽⁴⁾.

En cuanto a la repercusión de los cambios introducidos en la solución de NPT sobre la TB, sí da la impresión que la glutamina tuvo un efecto positivo. Los animales que la recibieron en presencia de luz (grupo NPTG) tuvieron menos TB (50%) que su grupo de comparación (grupo NPT), que tuvo el 70%; diferencias que no llegan a ser estadísticamente significativas, quizá debido al escaso número de animales de cada grupo.

No podemos decir lo mismo con la protección de la exposición a la luz, ya que no sólo no disminuyó la TB en los animales no expuestos [grupos NPT(-) y NPTG(-)], sino que se alcanzaron los índices más altos (86 y 88%).

Podemos concluir, pues, que:

- La TB es alta cuando la vía de nutrición es parenteral.
- La capacidad antioxidante tisular disminuye por efecto de la NPT.
- El suplemento con glutamina o la protección contra la luz no mejoran la capacidad antioxidante tisular bajo NPT.
- El suplemento con glutamina reduce la TB sólo en presencia de luz.
- La TB debida a la NPT aumenta en ausencia de luz.

BIBLIOGRAFÍA

1. Denno R, Rounds JD, Faris R, Holejko LB, Wilmore DW. Glutamine-enriched total parenteral nutrition enhances plasma glutathione in the resting state. *J Surg Res* 1996;**61**:35-38.
2. Neu J, Roig JC, Meetze WH, Veerman M, Carter C, Millsaps M, Bowling D, Dallas MJ, Sleasman J, Knight T, Auestad N. Enteral glutamine supplementation for very low birth weight infants decreases morbidity. *J Pediatr* 1997;**131**:691-696.
3. Yoshida S, Kaibara A, Yamasaki K, Ishibashi N, Noake T, Kakegawa T. Effect of glutamine supplementation on protein metabolism and glutathione in tumor-bearing rats. *JPEN* 1995;**19**:492-497.
4. Laborie S, Lavoie JC, Pineault M, Chessex P. Protecting solutions of parenteral nutrition from peroxidation. *JPEN* 1999;**23**:104-108.
5. Laborie S, Lavoie JC, Chessex P. Paradoxical role of ascorbic acid and riboflavin in solutions of total parenteral nutrition: implication in photoinduced peroxide generation. *Pediatr Res* 1998;**43**:601-606.
6. Sokol RJ, Taylor SF, Devereaux MW, Khandwala R, Sondheimer NJ, Shikes RH, Mierau G. Hepatic oxidant injury and glutathione depletion during total parenteral nutrition in weanling rats. *American Journal of Physiology* 1996;**270**:G691-700.
7. Burke DJ, Alverdy C, Aoys E, Moss GS. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function. *Arch Surg* 1989;**124**:1396-1399.

8. Edmiston CE, Condon RE. Bacterial translocation. *SGO* 1991;**173**:73-83.
9. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 18-12-1986 del NL 358/1 al NL 358/28.
10. Martins FM, Wenneerg A, Khilberg R y cols. Total parenteral nutrition with different ratios of fat, carbohydrates and lipids at two energy levels: an animal study. *JPEN* 1985;**9**:47-52.
11. Brigelius R, Muchel C, Akerboom TP, Sies H. Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 1983;**32**:2529-2534.
12. Hakansson SJ, Wretlind A. Nutrición intravenosa total en animales. En: Lee HA (ed). *Nutrición parenteral total en las enfermedades agudas metabólicas*. Londres: Academic Press Inc. Ltd. 1977; págs. 379-388.
13. McAndrew HF, Lloyd DA, Rintala R, Van Saene HK. Intravenous glutamine or short-chain fatty acids reduce central venous catheter infection in a model of total parenteral nutrition. *J Pediatr Surg* 1999;**34**:281-285.
14. Alverdy JC, Aoye E, Moss GS. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* 1988;**104**:185-190.
15. Pierro A, Van Saene HFK, Donell SC y cols. Microbiol translocation in neonates and infants receiving long-term parenteral nutrition. *Arch Surg* 1996;**131**:176-179.
16. Mandir N, Goodlad RA. The effects of glutamine on intestinal epithelial cell proliferation in parenterally fed rats. *Gut* 1999;**44**:608-614.
17. Blair SL, Rose DM, Sachar S, Burt ME. Oral L-2-oxo-4-thiazolidine reduces bacterial translocation after radiation in the Fischer rat. *J Surg Res* 1996;**65**:165-168.
18. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, Feierl G, Ratschek M, Hollwath ME. The effect of vitamine C and vitamine E supplementation on bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common-bile-duct-ligated rats. *Eur Surgical Res* 1997;**29**:187-194.
19. Tubman TRJ, Thompson SW. *Glutamine supplementation for preventing morbidity in preterm infants*. The Cochrane Library 2000;1.
20. Bhatia J, Treinen Moslen M, Haque AK, McCleery R, Rassin DK. Total parenteral nutrition-associated alterations in hepatobiliary function and histology in rats: is light exposure a clue? *Pediatr Res* 1993;**33**:487-492.