

Adaptación en el intestino corto: efecto de la nutrición enteral mínima y los probióticos sobre la proliferación y la apoptosis en la pared intestinal

I. Eizaguirre¹, N. García Urkia², A.B. Asensio², E. Hijona², J.M. García Arenzana³, P. Bachiller⁴, P. Aldazabal²

¹Servicio de Cirugía Pediátrica, ²Unidad Experimental, ³Microbiología, ⁴Farmacia. Hospital Donostia. San Sebastián.

RESUMEN

Introducción. La integridad de la pared intestinal es fundamental en la función de la barrera y depende del balance de proliferación/apoptosis. El intestino Corto (IC) o la Nutrición Parenteral (NP) inducen un alto índice de translocación bacteriana (TB) seguramente por fallo de la barrera intestinal.

La administración de probióticos o la nutrición enteral mínima (NEM) han reducido la TB en modelos animales.

Objetivos. Determinar en 2 modelos animales de TB (IC o NP) el efecto de la NEM y los probióticos sobre los índices de proliferación (IP) y apoptosis (IA) de la pared intestinal.

Metodología. Setenta y una ratas Wistar, divididas en 4 grupos: 1) NP (N=23): Nutrición parenteral; 2) NP/NEM (N=16): NP + NEM (2,9 g/100 g/día dieta estándar); 3) RES (N=15): Resección intestinal 80% y dieta oral estándar; 4) RESPROB (N=17): RES + probióticos (7X10⁹ UFC *Bifidobacterium lactis*).

Tras 10 días en jaulas metabólicas, se cultivaron ganglios mesentéricos, sangre portal y periférica. Por técnica inmunohistoquímica se calcularon IP y IA y el cociente proliferación-apoptosis (CPA).

Resultados. TB: Disminuyó en los grupos NP/NEM (45%) y RESPROB (35%) frente a los grupos NP (65%) y RES (67%). (p<0,05). IP: Mejora en los grupos NP/NEM (12,07) y RESPROB (13,93) frente a los grupos NP (7,45) y RES (5,54). (p<0,05). IA: Mejora en el grupo NP/NEM (7,81) respecto al grupo NP (14,90). (p<0,05). CPA: Mejora en los grupos NP/NEM (1,54) y RESPROB (1,67) frente a los grupos NP (0,50) y RES (0,71). (p<0,01).

Conclusiones. La NEM y los probióticos reducen la TB y mejoran la renovación celular favoreciendo la proliferación. La NEM, además, evita la apoptosis.

PALABRAS CLAVE: Translocación bacteriana; Intestino corto; Nutrición parenteral total; Proliferación celular; Apoptosis.

ADAPTATION IN THE SMALL INTESTINE: EFFECT OF MINIMAL ENTERAL NUTRITION AND PROBIOTICS ON PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN THE INTESTINAL WALL

ABSTRACT

Background. The intestinal wall integrity is central to the barrier function and depends on the balance of proliferation/apoptosis. Short bowel (SB) or Parenteral Nutrition (PN) induce high bacterial translocation (BT) probably by the intestinal barrier bug. Probiotics or minimal enteral nutrition (MEN) have reduced BT in animal models.

Objective. Determine in two BT animal models (SB or PN) the effect of MEN or probiotics on proliferation and apoptosis rates of the intestinal wall.

Methods. Seventy-one Wistar rats, divided into 4 groups: 1) PN (N = 23): parenteral nutrition; 2) PN/MEN (N = 16): PN + MEN (2.9 g/100 g/day standard diet); 3) RES (N = 15): 80% bowel resection and standard oral diet; 4) RESPROB (N = 17): RES + probiotics (7 X 10⁹ CFU *Bifidobacterium lactis*).

After 10 days in metabolic cages, mesentery lymph nodes, portal blood and peripheral blood were cultured. By immunohistochemistry, proliferation and apoptosis index were calculated as well as the proliferation-apoptosis rate.

Results. BT: decreased in PN/MEN (45%) and RESPROB groups (35%) versus PN (65%) and RES (67%) groups (p<0.05). Proliferation index: was better in PN/MEN (12.07) and RESPROB (13.93) groups than PN (7.45) and RES (5.54) groups. (p<0.05). Apoptosis index: PN/MEN group had 7.81 and PN group 14.90. (p<0.05). Proliferation-apoptosis rate: was higher in PN/MEN (1.54) and RESPROB (1.67) groups than PN (0.50) and RES (0.71) groups. (p<0.01)

Conclusions. MEN and probiotics reduce BT and improve cellular renewal by encouraging the proliferation. MEN also prevents apoptosis.

KEY WORDS: Bacterial translocation; Short bowel; Total parenteral nutrition; Cell proliferation; Apoptosis.

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

E-mail: ignacio.eizaguirre@osakidetza.net

Recibido: Mayo 2009

Aceptado: Mayo 2010

INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal está revestido por un epitelio simple que sirve como barrera entre el medio exterior e inte-

rior. La población epitelial de la mucosa está sometida a una constante y rápida renovación, que está regulada por la proliferación celular y la muerte celular⁽¹⁻²⁾.

La apoptosis o muerte celular programa un proceso fisiológico que permite la eliminación de las células inservibles, y puede ser inducido por una amplia variedad de factores, como la deficiencia de factores de crecimiento o de nutrientes⁽³⁻⁴⁾. Un aumento del rango de apoptosis, especialmente asociada a una reducción de la proliferación, lleva al tracto gastrointestinal a lesiones e infecciones. Por lo tanto, el cociente entre los índices de proliferación y apoptosis puede ser considerado como un marcador del proceso de renovación y maduración⁽⁵⁾.

El síndrome de intestino corto (SIC), una de las principales causas de fallo intestinal, es definido como el resultado de un fallo congénito o como consecuencia de una resección del intestino delgado que conlleva una drástica pérdida de capacidad de absorción, lo cual impide el mantenimiento del balance de energía, fluidos, electrolitos y micronutrientes obtenidos en una dieta normal^(6,7). En el SIC, complicaciones como la atrofia de las vellosidades, el sobrecrecimiento bacteriano y el déficit inmunológico permiten la translocación bacteriana (TB)⁽⁸⁻¹⁰⁾.

La nutrición parenteral (NP) es el soporte nutricional provisional que permite mantener los requerimientos metabólicos y de crecimiento, y su uso se justifica solo cuando la nutrición enteral es imposible^(11,12). El uso de NP está asociado a cambios morfológicos intestinales, del flujo sanguíneo y de algunas funciones intestinales como la de barrera⁽¹³⁾.

Tanto en resección intestinal como en la NP, existe un alto índice de translocación bacteriana (TB). La TB es definida como el paso de bacterias viables o sus productos a través de la barrera intestinal hasta ganglios linfáticos⁽¹³⁻¹⁵⁾; está limitada, entre otros, por una mucosa intestinal intacta⁽¹⁶⁾.

La Nutrición Enteral Mínima (NEM) permite a través del contacto directo de los nutrientes luminales con la mucosa intestinal mejorar la actividad de las enzimas gastrointestinales, la liberación de hormonas, el flujo sanguíneo, la motilidad y la microflora, contribuyendo así a estimular la adaptación intestinal^(17,18).

La ingesta de probióticos se recomienda como prevención para mantener el equilibrio en la flora intestinal; de ese modo, mejora el bienestar debido que al incremento de sus niveles induce a crear un efecto barrera contra los patógenos comunes mientras facilita la absorción de nutrientes^(19,20).

OBJETIVOS

Determinar en 2 modelos de TB (IC o NP) el efecto de la NEM y los probióticos sobre los índices de proliferación (IP) y apoptosis (IA) de la pared intestinal, y comprobar sus beneficios para la TB.

MATERIAL Y MÉTODOS

Setenta y un ratas Wistar machos (CRL: (WI) BR. Crifafa, Barcelona), de 250 g criadas y mantenidas en nuestras instalaciones de acuerdo con la legislación vigente⁽²¹⁾, fueron distribuidas aleatoriamente a un régimen de infusión continua de NPT a través de un catéter yugular (Grupos NP) o a una resección del 80% del intestino delgado (Grupos RES). A uno de los grupos se le administró nutrición enteral mínima (Grupo NEM) y a otro, probióticos por vía oral (Grupo PROB):

- 1) Grupo NPT (N= 23): infusión continua de NPT estándar (300 ml/24 h, 280 kcal/kg/ 24 h).
- 2) Grupo NPT-NEM (N= 16): NPT estándar y dieta oral (pienso de mantenimiento A04 Panlab, Barcelona, hasta 15 g/24 h, 3,1 kcal/g).
- 3) Grupo RES (N= 15): animales con resección del 80% del intestino delgado (desde 10 cm más allá del ángulo de Treitz hasta 10 cm antes de la válvula ileocecal) y dieta oral. Administración oral diaria de 1 ml de suero fisiológico por gavaje bajo sedación.
- 4) Grupo RES-PROB (N= 17): RES y probióticos por gavaje bajo sedación (7×10^9 UFC *Bifidobacterium lactis*, Nestlé S.A.)

Los animales se mantuvieron durante 10 días en jaulas metabólicas individuales. Al final del experimento, los animales fueron anestesiados con una mezcla de Atropina 0,1 mg/kg. (Atropina® B.Braun Medical S.A.), Ketamina 60 mg/kg. (Ketolar® Parke-Davis) y Diacepan 3 mg/kg (Valium®, Roche) por vía i.m. y sacrificados en condiciones estériles mediante punción portal y cardiaca. Se tomaron muestras de ganglios linfáticos mesentéricos (GGLL), sangre portal y sangre periférica para su posterior cultivo y diagnóstico de TB, y muestras de duodeno, yeyuno e ileon para la obtención de los índices de proliferación celular, apoptosis y el cociente proliferación-apoptosis mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Las muestras de sangre portal (1 ml) y periférica (2 ml) se inocularon en frascos de hemocultivo (Bacter, Bencton-Dickison, Maryland, USA) y se incubaron en un sistema automático de hemocultivo (Bacter 9240, Bencton-Dickison, Maryland, USA) durante siete días. Las muestras de GGLL se mezclaron con la misma cantidad de suero salino estéril, se homogeneizaron y se cultivaron con un asa calibrada de 100 ml (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 las bacterias se hizo por medios convencionales: catalasa, coagulasa, bilisesculina de la Gram (+), y mediante galería para la identificación de Enterobacterias (Api 20E, Merieux, Francia) en los Gram (-). El cultivo de sangre, tanto portal como periférica, se considero positivo de forma cualitativa. En el caso del ganglio mesentérico, se consideró positivo un crecimiento ≥ 100 UFC/g.

Se definió la TB como la presencia de Enterobacterias en cualquiera de los campos observados.

Tabla I Porcentaje de translocación bacteriana de todos los grupos.

Grupo	Número de animales	Porcentaje de animales afectados (TB)
NP	23	65%
NP-NEM	16	45%
RES	15	67%
RES-PROB	17	35%

NP Vs NP-NEM $p < 0,05$. RES Vs RES-PROB $p < 0,05$

Además, se extrajo el intestino completo, se fijó en formal al 10% durante 24 horas, y a continuación se extrajeron porciones de duodeno, yeyuno e ileon de 1 cm, y se procesaron en parafina según el protocolo habitual del servicio de Anatomía Patológica hasta obtener cortes de 3 micras (Microtomo, Leitz). Para la determinación de la proliferación celular se realizó inmunohistoquímica utilizando como marcador primario un antígeno nuclear denominado KI67 (Dako), y para la determinación de la apoptosis se utilizó un ensayo comercial basado en la técnica de TUNEL (Apoptag® Peroxidase In situ Apoptosis detection kit, Chemicon).

El recuento nuclear se efectuó en 100 células de cripta y vellosidad de cada preparación bajo microscopio; para el marcador Ki67 únicamente se utilizaron las criptas cuya base alcanzó la base muscular, y para la apoptosis únicamente las vellosidades completas. Los índices de proliferación (IP) y el de apoptosis (AP) fueron calculados mediante la proporción existente entre las células positivas y el número total de células. El cociente de proliferación-apoptosis (CPA) se calculó dividiendo el índice de proliferación por el índice de apoptosis.

Todas las variables se describieron por métodos estadísticos comunes. Las comparaciones entre grupos se realizó mediante el test "t" de Student o "U" de Mann-Whitney. En todo el estudio se aceptó una $p < 0,05$ como nivel de significación estadística.

RESULTADOS

Los porcentajes de TB de cada uno de los grupos se hallan reflejados en la Tabla I, que recoge el número y el porcentaje de animales afectados.

La incidencia del grupo NP-NEM fue de un 45%, mientras que la del grupo NP fue de 65% ($p < 0,05$). En el grupo RES-PROB fue de un 35%, mientras que el grupo sin tratamiento, grupo RES, fue de un 67% ($p < 0,05$).

Los valores de los índices de proliferación, apoptosis y el cociente de proliferación-apoptosis se muestran en la Tabla II.

Los índices de proliferación de los grupos NP-NEM (12,07) y RES-PROB (13,93), fueron mayores que los índices

Tabla II Índices de proliferación celular, apoptosis y cociente de proliferación-apoptosis.

Grupo	IP	IA	CPA
NP	7,45	14,90	0,50*
NP-NEM	12,07	7,81	1,54*
RES	5,54	7,80	0,71*
RES-PROB	13,93	8,34	1,67*

NP Vs NP-NEM $p < 0,05$. *NP Vs NP-NEM $p < 0,01$
RES Vs RES-PROB $p < 0,05$. *RES Vs RES-PROB $p < 0,01$

del grupo NP (7,45) y RES (5,54) ($p < 0,05$). El índice de apoptosis fue mayor en el grupo NP (14,90) que en el grupo NP-NEM (7,81) ($P < 0,05$).

Los valores de los cocientes de proliferación-apoptosis fueron mayores en los grupos NP-NEM (1,54) y RES-PROB (1,67) que en los grupos NP (0,50) y RES (0,71) ($p < 0,01$).

DISCUSIÓN

En las ratas Wistar sanas, la TB ocurre de modo espontáneo un porcentaje del 5 hasta el 10% de los casos⁽²²⁾, mientras que en los modelos de NP y RES los porcentajes aumentaron hasta entre un 65% y 67%. En ambos casos, la falta de estímulo luminal provoca atrofia de la mucosa, que a su vez conlleva a una disminución de las capacidades absorptivas y digestivas, y a una pérdida de los efectos protectores. La TB está limitada por una mucosa intestinal intacta, el sistema inmune del huésped y el equilibrio de la flora intestinal, factores que están disminuidos en nuestros modelos⁽¹⁶⁾.

El uso de la NP aunque es una terapia de supervivencia, produce una gran variedad de complicaciones. Niinikoski et al⁽²³⁾ observaron que a las 48 horas de inicio de la NPT se producía una disminución del contenido de ADN, longitud de vellosidades, del contenido de proteínas, de la proliferación celular en las criptas, y también se observó un alto rango de apoptosis en las vellosidades y las criptas ($p < 0,05$). En nuestro modelo de NP observamos que el valor del CPA es menor que en el grupo con estímulo enteral, debido a la disminución de la proliferación y el aumento de la apoptosis. La NPT provocaría una disminución de los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, que incrementaría la formación de radicales libres y las infecciones asociadas al aumento de la apoptosis⁽⁴⁾.

La administración de nutrición enteral mínima produce un aumento de la proliferación celular y disminución de la apoptosis, aumentando así el cociente de proliferación celular-apoptosis e indicando que existe una buena recuperación de la función de barrera^(5,24).

Después de una resección intestinal, la adaptación es un proceso que comienza de inmediato y puede durar meses o

años, y cuya finalidad es conseguir la autonomía total. Además del uso de dietas enterales, en los últimos años se han desarrollado diferentes estudios para valorar el efecto de los probióticos en la recuperación de la función de barrera.

Los probióticos son microorganismos que, cuando son ingeridos, colonizan temporalmente el intestino, se establecen como integrantes de su flora y ejercen un efecto beneficioso en el huésped⁽²⁵⁾. Únicamente algunas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* reúnen las condiciones necesarias para producir este efecto⁽²⁶⁾.

El empleo de los probióticos ha sido recomendado en diversas situaciones patológicas: tratamiento y prevención de diarreas agudas, alergia alimentaria sobre todo en la intolerancia a la lactosa, alteraciones inmunitarias, procesos inflamatorios intestinales, disminución de los niveles séricos de colesterol y prevención de la formación de tumores intestinales⁽²⁷⁾.

En nuestro estudio, observamos que la incidencia de la TB disminuye hasta un 35% al administrar probióticos a un modelo de resección intestinal; al mismo tiempo, el cociente de proliferación-apoptosis aumenta a expensas de un aumento de la proliferación celular. La administración de probióticos a través de diferentes mecanismos como la estimulación de la respuesta inmune, competencia por los nutrientes y receptores y formación de agentes antimicrobianos específicos^(19,28) lograría la recuperación de la función de barrera, aumentando el rango de renovación celular y disminuyendo la TB.

CONCLUSIONES

La NEM y los probióticos reducen la TB y mejoran la renovación celular favoreciendo la proliferación. La NEM, además, evita la apoptosis.

BIBLIOGRAFÍA

- Oates PS, West AR. Heme in intestinal epithelial cells turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World Gastroenterol.* 2006; 12 (7): 4281-4295.
- Histología. Texto y atlas de color con biología celular y molecular. MH Ross, Paulina. 5ª Edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.
- Sukhotnik I, Bernsteyn A, Mogilner JG The Basic of apoptosis and implications for Pediatric Surgery. *Eur J Pediatr Surg.* 2005; 15: 229-235.
- Goldewki MM, Slupecka M, Wolinski J, Skrzypek T, Skrzypek H, Motyl T et al. Into the unknown. The death pathways into the neonatal gut epithelium. *J Physiol Pharmacol.* 2005; 56 suppl: 7-24.
- Zabielski R, Godlewski MM, Guilloteau P. Control of development of gastrointestinal system in neonatos. *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59 (supl 1): 35-54.
- Goulet I, Reumelle F, Lacaille F, Coloma V. Irreversible Intestinal Failure. *J Pediatr Gastroenterol.* 2004; 38: 250-269.
- Goulet I. Short Bowel in Pediatric Patients. *Nutrition.* 1998; 14: 784-787.
- Wessel JJ, Kocoshis SA. Nutritional management of infants with short bowel syndrome. *Semin Perinatol.* 2007; 31: 104-111.
- Lichtman SM. Bacterial translocation in humans. *JPGN.* 2001; 33(1): 1-10.
- Wesley AJ, Boyce ST, Babcock GF. The process of microbial translocation. *Ann Surg.* 1990; 212(4): 496-512.
- Vanderhoof J. Short bowel syndrome. *Clinics in Perinatology.* 1996; 23: 377-386.
- Chaudhari S, Kadam S. Total parenteral nutrition in Neonatos. *Indian Pediatrics.* 2006; 43: 953-964.
- FW Guglielmi, D Boggie-Bertinet, A Federico, GB Forte, A Guglielmi, C Loguercio, et al. Total parenteral nutrition-related gastroenterological complications. *Digestive and Liver Disease.* 2006; 38: 623-642.
- Eizaguirre I, Asensio AB, García-Urkiá N, Aldazabal P, Bachiller P, García-Arenzana JM. Incidencia de la traslocación bacteriana en cuatro modelos diferentes de intestino corto experimental. *Cir Pediatr.* 2003; 16(1): 20-5.
- Balzan S, De Almeida Quardos et al. Bacterial translocation: Overview of mechanics and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22(4): 464-471.
- Potoka DA, Nadler EP, Upperman JS, Ford HR. Role of nitric oxide and peroxynitrite in gut barrier failure. *World J Surg.* 2002; 26: 806-811.
- Mishra S, Agarwal R, Minimal enteral nutrition. *Indian J Pediatr.* 2008; 75(3): 267-269.
- Arnaiz L. Efectos de la hormona de crecimiento sobre el intestino corto postquirúrgico de la rata. Comparación dosis fisiológica-dosis farmacológica. Tesis Doctoral. San Sebastián: Universidad del País Vasco; 1995.
- Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr.* 2002; 88: s39-s49.
- Bachers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. Probiotics and Immunity. *J Gastroenterol.* 2009; 44: 26-46.
- Diario Oficial de las Comunidades Eúpoas 1986, 18 de diciembre-NL358/1 al NL 358/28.
- Schimpl G, Smith SD, Rowe MI. Catéter sepsis in short bowel syndrome. *Arc Surg.* 1992; 1217: 21-5.
- Niinikoski H, Stoll B, Guan X, Kanasagra K, Lambert BD, Stephens J et al. Onset of small atrophy is associated with reduced intestinal blood flow in TPN-fed neonatal piglets. *J Nutr.* 2004; 134: 1467-1474.
- Tyson JE, Kennedy KA. Cochrane Database of Systematic Reviews. (2):CD000504, 2000.
- J Schzenmeir, M De Verse. Probiotics, prebiotics and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73 (suppl): 361S-4S.
- N Ishibashi, Shoi Yamazaki. Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73 (suppl): 465S-70S.
- PR Marteau, M de Vrese, CJ Cellier, J Schzenmeir. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73 (suppl): 430S-6S.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbio Re.* 1995; 59: 171-200.