

Descontaminación intestinal selectiva y hepatopatía asociada a nutrición parenteral: estudio experimental

N. García-Urkia¹, A.B. Asensio¹, A. Cano¹, N. Samprón¹, J.M. García-Arenzana²,
P. Bachiller³, P. Aldazabal¹, I. Eizaguirre⁴

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

RESUMEN: La descontaminación intestinal selectiva (DIS) ha demostrado su utilidad para frenar la translocación bacteriana (TB) tanto en modelos animales como en clínica humana.

La hepatopatía colostática es un grave problema, de origen poco claro, asociado al intestino corto y al uso prolongado de nutrición parenteral (NP), y en estos pacientes la TB es muy frecuente. Los gérmenes llegan a los ganglios mesentéricos, activan los macrófagos que liberan citoquinas, entre ellas la TNF- α e IL-1, las cuales, a través de la vena portal y los vasos linfáticos, dañan el hígado.

El objetivo de este estudio ha sido comprobar en un modelo experimental de intestino corto bajo NP, la utilidad de la DIS para frenar la TB y determinar a través de los niveles séricos de la IL-1 y TNF- α el posible efecto beneficioso para el hígado

Veinticinco ratas Wistar de entre 240-280 g fueron distribuidas en dos grupos, y mantenidas en jaulas metabólicas individuales durante 10 días:

- Grupo Resección-NPT (n=15): animales a los que se les realizó una resección del 80% del intestino delgado e infusión continua de NPT.
- Grupo Resección-NPT-DIS (n=10): como el grupo anterior, con administración oral diaria de tobramicina (20 mg/kg/día) y polimixina E (25 mg/kg/día).

Los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de ganglios linfáticos mesentéricos, sangre portal y sangre periférica para determinación de incidencia de la TB por cultivo microbiológico. La determinación de las concentraciones séricas de IL-1 y TNF- α se realizó por la técnica de ELISA.

La incidencia de la TB fue mayor en el grupo RES-NPT (67%) que en el grupo RES-NPT-DIS (30%) ($p < 0,05$). El riesgo relativo fue de 2,22 (IC 95% 0,81-6,11) y el número necesario a tratar 3 (IC 95% 2-235). Las concentraciones séricas de IL-1 y TNF- α fueron superiores en el grupo RES-NPT (7,537 y 5,399 pg/ml, respectivamente) que en el grupo RES-NPT-DIS (6,397 y 5,032 pg/ml, respectivamente) ($p < 0,001$).

Conclusiones

1. La DIS tiene un efecto reductor en la TB en un modelo murino de intestino corto bajo NP.
2. El daño hepático asociado al uso de la NP se redujo en los animales que recibieron DIS.

Correspondencia: Iñaki Eizaguirre. Plaza del Deporte 8-3ªA, 20009 San Sebastian.
E-mail: ieizagui@chdo.osakidetza.net

Recibido: Mayo 2004

Aceptado: Mayo 2005

PALABRAS CLAVE: Descontaminación intestinal selectiva; Translocación bacteriana; Nutrición parenteral.

SELECTIVE INTESTINAL DECONTAMINATION AND PARENTERAL NUTRITION RELATED LIVER DISEASE. EXPERIMENTAL STUDY

ABSTRACT: Selective intestinal decontamination (SID) has been useful restraining Bacterial translocation (BT) in both animal models and human clinics.

The not well known parenteral nutrition-related liver disease is a serious problem associated to short bowel and long-term parenteral nutrition (PN) use, and BT is also frequent in those patients. Germs reach liver through portal vein and activate Kupffer cells, which release cytokines as IL-1 or TNF- α .

The aim of this study was to test the use of SID restraining BT in a PN undergoing experimental short bowel model, and its possible favourable consequences on hepatic injury determined by IL-1 and TNF- α levels.

Twenty-five 240-280 g Wistar rats were divided into two groups and maintained in individual metabolic cages for ten days:

- Resection-PN group (n=15): animals with a bowel resection of the 80% and a continuous PN infusion.
- Resection-PN-SID (n=10) group: similar to previous group and a daily oral administration of Tobramycin (20mg/kg/day) and Polymyxine-E (25mg/kg/day).

Animals were sacrificed and mesenteric lymph nodes (MLN), and both peripheral and portal blood samples were recovered for TB determination in bacterial culture. Determination of both IL-1 and TNF- α seric levels were carried out by ELISA.

Bacterial translocation incidence was higher in RES-NPT group (66.6%) than RES-NPT-SID group (30%) ($P > 0,05$). The relative risk was 2.22 (IC 95% 0,81-6,11) and the number needed to treat was 3 (IC 95% 2-235).

Seric levels of IL-1 and TNF- α were also higher in RES-NPT group (7,537 and 5,399 pg/ml, respectively) than in RES-NPT-SID group (6,397 and 5,032 pg/ml respectively) ($p < 0,001$).

1. SID reduces TB in a PN undergoing experimental short bowel resection murine model.
2. Parenteral nutrition-related liver disease decreases in DIS receiving animals.

KEY WORDS: Selective Intestinal Decontamination (SID); Bacterial Translocation (BT); Parenteral Nutrition (PN).

INTRODUCCIÓN

El daño hepático asociado a la nutrición parenteral (NP) es una grave complicación de origen poco claro y probablemente multifactorial, en el tratamiento de los niños con intestino corto. Algunos de estos pacientes incluso fallecen por la hepatopatía¹⁻⁶.

En el síndrome de intestino corto (SIC) la presencia de episodios de sepsis por gérmenes gramnegativos se relaciona con la aparición del daño hepático.

En el SIC, la atrofia vellositaria debida al ayuno, el sobrecrecimiento bacteriano condicionado por la dismotilidad intestinal y el déficit inmunitario consecuente a la pérdida de grandes cantidades de tejido linfóide asociado al intestino (GALT), deterioran el efecto barrera de la pared intestinal y permiten la traslocación de gérmenes. Esta traslocación podría ser, en parte, responsable del daño hepático⁷⁻¹⁴.

Una de las medidas recomendadas para frenar la traslocación bacteriana (TB) es la descontaminación intestinal selectiva (DIS), es decir, la administración por vía enteral de antibióticos no absorbibles con la finalidad de reducir la flora intestinal. La DIS es una técnica empleada en clínica humana y con amplios precedentes experimentales, aunque hasta ahora no ha sido estudiada en un modelo de intestino corto¹⁵.

El objetivo de este trabajo ha sido comprobar en un modelo experimental de intestino corto bajo NP, la utilidad de la DIS para frenar la TB, y determinar su posible efecto beneficioso para el hígado a través de los niveles séricos de dos citoquinas proinflamatorias, la interleukina -1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que suelen encontrarse elevados en situaciones de hepatopatía severa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Veinticinco ratas Wistar adultas [(CRL: (WI) BR), Crifafa, Barcelona] de entre 240-280 g, criadas y mantenidas en nuestras instalaciones de acuerdo con la legislación vigente¹⁶, fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos:

- Grupo RES-NPT (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 con una infusión continua de NPT (300 ml/24 h, 280 kcal/kg/24 h) a través de un catéter yugular.
- Grupo RES-NPT-DIS (n=10): como el grupo anterior, más una administración oral diaria de tobramicina (20 mg/kg/día) y polimixina E (25 mg/kg/día).

Los animales se mantuvieron alojados en jaulas metabólicas individuales durante 10 días.

Al décimo día, 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 diazepam 3 mg/kg (Valium®, Roche) por vía IM, y sacrificados en condiciones estériles mediante exanguinación por punción cardíaca.

Se obtuvieron muestras de ganglios linfáticos mesentéricos (GGLL), sangre portal y sangre periférica, para su cultivo microbiológico, así como muestras de sangre portal para realizar las determinaciones séricas de las citoquinas TNF- α e IL-1.

Las muestras de sangre portal (1 ml) y periférica (2 ml) se inocularon en frascos de hemocultivo (Bacter, Benton-Dickinson, Maryland, USA) y se incubaron durante 7 días. Las muestras de ganglios linfáticos mesentéricos se mezclaron en una cantidad igual de solución salina estéril, se homogeneizaron y sembraron con asa calibrada de 100 ml en placas de agar soja tripticasa con sangre desfibrinada de caballo, agar manitol y agar MacConkey. Las placas se incubaron durante 48 horas a 35°C.

La identificación de las bacterias se realizó por métodos convencionales: catalasa, coagulasa, bilisesculina para Gram (+) y mediante galería de identificación para enterobacterias (Api 20E, Merieux, Francia) en Gram (-).

Los cultivos de sangre tanto portal como periférica, se consideraron positivos de forma cualitativa. En los GGLL fueron considerados positivos los cultivos con un crecimiento >100 UFC/g.

La TB se definió como la presencia de gérmenes entéricos Gram (-) en cualquiera de los territorios observados que se clasificaron de la siguiente manera: TB local (GGLL y sangre portal); TB general (sangre periférica), y TB total (todos los campos estudiados).

Para realizar las determinaciones de las citoquinas TNF- α e IL-1 se obtuvieron muestras de plasma por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos, de muestras de sangre portal recogidas en tubos EDTA. Las muestras se almacenaron en criotubos a -20°C.

La determinación de TNF- α e IL-1 se realizó empleando inmunoensayo enzimático (Rat TNF- α /TNFSF1A Quantikine ELISA Kit y Rat IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit, R & D Systems). Se obtuvieron las concentraciones de las citoquinas en log pg/ml.

Todas las variables se describieron por métodos estadísticos comunes. Las comparaciones entre grupos se realizaron 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

Para valorar el efecto de la DIS sobre la incidencia de la TB y los niveles séricos de las citoquinas, TNF- α e IL-1 en el modelo de intestino corto experimental, comparamos los grupos RES-NPT-DIS frente al grupo RES-NPT.

La incidencia de la TB se muestra en la tabla I.

La TB total (local más general) fue mayor en el grupo RES-NPT (67%) que en el grupo RES-NPT-DIS (30%) ($p < 0,05$). A nivel local (ganglio mesentérico y sangre portal)

Tabla I Incidencia de la traslocación bacteriana (TB) en diferentes territorios

| Grupo | Número de animales | TB local | | TB general | | TB total | |
|-------------|--------------------|----------|-----|------------|----|----------|-----|
| | | n | % | n | % | n | % |
| RES-NPT | 15 | 10 | 67* | 2 | 13 | 10 | 67* |
| RES-NPT-DIS | 10 | 2 | 20 | 3 | 30 | 3 | 30 |

* $p < 0,05$ vs RES-NPT-DIS

también fue mayor, mientras que no hallamos diferencias estadísticamente significativas a nivel de la circulación general.

El riesgo relativo para la traslocación total fue de 2,22 (IC 95% 0,81-6,11) y el número necesario a tratar 3 (IC 95% 2-235).

Las concentraciones séricas de las citoquinas TNF- α e IL-1 se observan en la tabla II. Las concentraciones de IL-1 y TNF- α en el grupo RES-NPT ($7,537 \pm 0,1072$ log pg/ml $5,899 \pm 0,187$ log pg/ml, respectivamente) fueron mayores que en el grupo RES-NPT-DIS ($6,397 \pm 0,045$ log pg/ml y $5,032 \pm 0,050$ log pg/ml, respectivamente) ($p < 0,01$).

DISCUSIÓN

La utilización de la nutrición parenteral (NP) ha supuesto una importante mejora de la supervivencia de los pacientes con síndrome de intestino corto (SIC). La NP compensa la pérdida de fluidos intestinales y proporciona la adecuada nutrición para un desarrollo normal. Además, la NP previene las deficiencias nutricionales mientras asegura el balance positivo de energía, la adecuada síntesis de proteínas y la adaptación del intestino remanente¹. Sin embargo, se acompaña de importantes complicaciones, en especial la infección relacionada con el catéter, la atrofia de vellosidades, la traslocación bacteriana y una serie de alteraciones tisulares, en especial, la hepatopatía colestática¹⁻⁶.

El hígado tiene un papel importante en el proceso de alimentación artificial. El uso de este tipo de nutrición produce cambios en los procesos metabólicos del hígado, y además conlleva un reposo intestinal prolongado, que afecta al sistema hormonal, a la dinámica de ácidos biliares y como consecuencia, a la flora intestinal⁷.

Desde el punto de vista histopatológico, el primer hallazgo es la esteatosis (acúmulo de lípidos en el citosol), para pasar a la colestasis (estancamiento de bilis dentro de los hepatocitos, colangiomas y resto de la vía biliar). Estos cambios son más o menos reversibles, pero desencadenan una respuesta en los fibroblastos de los espacios porta, mediada por citoquinas y diferentes factores estimuladores celulares, que

Tabla II Concentraciones séricas de las citoquinas TNF- α e IL-1 de ambos grupos

| Grupos | Numero de animales | TNF- α (log pg/ml) | IL-1 (log pg/ml) |
|-------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| | | Media \pm SD | Media \pm SD |
| RES-NPT | 15 | $5,899 \pm 0,187^*$ | $7,537 \pm 0,238^*$ |
| RES-NPT-DIS | 10 | $5,032 \pm 0,50$ | $6,397 \pm 0,045$ |

* $p < 0,05$ vs RES-NPT-DIS

pueden originar cambios irreversibles conduciendo a la cirrosis y al fallo hepático⁷.

Los factores de riesgo más importantes en el desarrollo del fallo hepático son: prematuridad, edad gestacional, peso al nacer, vía y tiempo de administración de la NP, duración del reposo intestinal, exceso de aporte calórico global o de algunos macro o micronutrientes y, sobre todo, los episodios repetidos de sepsis^{1,8}.

Estos episodios de sepsis, cuando son producidos por gérmenes Gram (+), se deben a contaminación externa a través del catéter implantado para la NP, pero con mucha frecuencia están producidos por Gram (-), entonces el origen es intestinal, por TB, ya que en estos pacientes se dan muchas de las circunstancias que producen fallo en el efecto barrera y favorecen la traslocación (atrofia de vellosidades, dismotilidad, déficit inmunitario, entre otros).

La TB supone una agresión para el hígado y una situación de estrés tras la que se desencadena más o menos inmediatamente una reacción de alarma que se conoce como respuesta de fase aguda (RFA) y se caracteriza, entre otras cosas, por la activación de diversas células inmunitarias como monocitos o macrófagos, y la liberación de citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α , y algunas interleucinas e interferones. También hay en la RFA una respuesta humoral, con la liberación de citoquinas protectoras (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10). Al balance entre la respuesta inmunocelular (Th1) y humoral (Th2) se le da una gran importancia¹⁴.

También se liberan potentes mensajeros químicos como el óxido nítrico y péptidos producidos en el hígado conocidos como proteínas de fase aguda, que activan las células de Kupffer y a su vez liberan citoquinas proinflamatorias como la IL-1 o el TNF- α , que pueden agravar la situación hepática¹⁴.

La DIS es una técnica empleada en clínica humana y con amplios precedentes experimentales, aunque no había sido hasta ahora estudiada en este modelo murino de intestino corto^{15,17,18}.

En nuestro trabajo hemos comprobado que la DIS reduce la TB a algo menos de la mitad. Además, los niveles de TNF- α e IL-1 disminuyeron en el grupo de animales que tuvo menos TB, lo que sugiere una relación entre TB y daño hepático.

BIBLIOGRAFÍA

1. Goulet O, Ruemmele F, Lacaille F, Colomb V. Irreversible intestinal failure. *JPGN* 2004;**38**(3):250-269.
2. Shulman RJ, Phillip S. Parenteral nutrition in infants and children. *JPGN* 2003;**36**(5):587-607.
3. Cooper A, Floyd TF, Ross III AJ, Bishop HC, Templeton JM, Ziegler MM. Morbidity and mortality of short-bowel syndrome acquired in infancy: an update. *J Pediatr Surg* 1984;**19**:711-718.
4. Pedron Giner C, Moreno Vilres JM. Síndrome de intestino corto: un abordaje pluridisciplinar. *Ann Pediatr* 1999;supl126:1-3.
5. Alverdy JC, Aoyo E, Moss GS. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. *Surgery* 1998;**104**:185-190.
6. Eizaguirre I, Aldámiz L, Aldazabal P, García N, Asensio A, Bachiller P, García-Arenzana J.M, Sanjurjo P, Perez Nanclares G. Capacidad antioxidante tisular y traslocación bacteriana bajo nutrición parenteral. Estudio experimental. *Cir Pediatr* 2002;**15**:29-33.
7. Morán Penco JM. ¿Qué sucede en el hígado durante la alimentación artificial? *Nutr Hosp* 2001;XVI(5):145-151.
8. Teitelbaum DH. Parenteral nutrition-associated cholestasis. *Seminars in Pediatric Surgery* 2001;**10**(2):72-80.
9. Lichtman SM. Bacterial translocation in Humans. *JPGN* 2001;**33**(1):1-10.
10. Wesley AJ, Boyce ST, Babcock GF. The process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990;**212**(4):496-512.
11. Vanderhoof J, Lagunas A. Short-bowel syndrome in children and adults. *Gastroenterology* 1997;**113**:1767-1778.
12. Vanderhoof J. Short bowel syndrome. *Clinics in Perinatology* 1996;**23**:377-386.
13. Asensio A, García-Urkia N, Aldazabal P, Bachiller P, García-Arenzana J, Eizaguirre I. Incidencia de la translocación bacteriana en cuatro modelos diferentes de intestino corto experimental. *Cir Pediatr* 2003;**16**:20-25.
14. Bengmark S. Modulation by enteral nutrition of the acute phase response and immune functions. *Nutrición Hospitalaria* 2003;XVII(1):1-5.
15. Spath G, Hirner A. Microbial translocation and impairment of mucosal induced by an elemental diet in rats is prevented by selective decontamination of the digestive tract. *Eur J Pediatr Surg* 1998;**164**(3):223-228.
16. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 1986, 18 de Diciembre- NL 358/1 al NL 358/28.
17. Akman M, Akbal H, Emir H, Ozturk R, Erdogan E, Yeker D. The effects of sucralfate and selective intestinal decontamination on bacterial translocation. *Pediatric Surgery International* 2000;**16**(1-2):91-3.
18. Biffi R, Privitera G, Matinato C, Pozzi S, Marzona L, De Rai P et al. Parenteral antibiotics and selective intestinal decontamination do not prevent enteric bacterial overgrowth or translocation observed in a swine model of small bowel transplantation. *J Surg Res* 1995;**58**(4):391-4.