

Determinación del reflujo duodenogástrico mediante la cuantificación de los ácidos biliares del jugo gástrico

J. Cabrol*, X. Navarro, J. Simó y R. Segura

Departamento de Biología Celular y Fisiología
Universidad Autónoma de Barcelona y
Hospital de Sabadell
08208 Sabadell (España)

(Recibido el 22 de febrero de 1988)

J. CABROL, X. NAVARRO, J. SIMÓ and R. SEGURA. *Duodeno-Gastric Reflux Assessment by Quantitation of the Bile Acids Present in Gastric Juice*. Rev. esp. Fisiol., 45 (1), 21-26, 1989.

The existence of duodeno-gastric reflux was evaluated in a group of 15 healthy subjects, in fasting and for 24 hours. The assessment of duodeno-gastric reflux was made by quantitation of the bile acids (BA) present in the gastric juice. The individual free and conjugated BA were separated and quantified by means of thin-layer chromatography and *in situ* spectrofluorometry. In 7 of the subjects studied no BA were detected, and in the other 8 subjects the BA levels were below 6 μmol reflux/hour. There were no free BA detected in any of the subjects. The levels of BA in gastric juice increased progressively with age, but there were no differences between sex. The chromatographic technique used is highly sensitive for the analysis of BA in biological samples. The study of BA in the gastric juice provides a quantitative and reliable assessment of the degree of duodeno-gastric reflux.

Key words: Bile acids, Duodeno-gastric reflux, Gastric juice, Thin-layer chromatography.

El reflujo del contenido duodenal al estómago es un fenómeno bien conocido, cuya existencia implica diversos trastornos, fundamentalmente a nivel de la mucosa gástrica. En trabajos experimentales se ha demostrado que el contacto crónico con la bilis y el jugo pancreático induce a cambios inflamatorios y metaplásicos en la mucosa gástrica (12, 15). En el hombre, el

reflujo duodeno-gástrico (RDG) puede ocurrir esporádicamente de manera fisiológica, tanto en ayunas como después de la ingestión de alimentos (25). Sin embargo, el RDG aumenta considerablemente en diversas situaciones patológicas, entre las que cabe destacar la gastritis postoperatoria por reflujo alcalino (24), la úlcera gástrica tipo I (2), la úlcera duodenal (22) y el cáncer gástrico (19).

Para poder valorar la real importancia del RDG como factor causante de lesiones gástricas, es necesario cuantificarlo de ma-

* A quien debe dirigirse la correspondencia: Servicio de Cirugía, Hospital de Sabadell. 08208 Sabadell (España).

nera precisa y conocer qué niveles pueden ser considerados como normales. Los objetivos del presente estudio han consistido en el desarrollo de un método que permita cuantificar el RDG, mediante el análisis cromatográfico de los ácidos biliares (AB) presentes en el jugo gástrico, y la determinación de sus niveles en ayunas para que puedan ser considerados como fisiológicos, estudiando un grupo de sujetos sanos.

Material y Métodos

Los sujetos de este estudio fueron 15 individuos con buen estado de salud o que sólo mostraban patologías banales (hernia inguinal, fisuras y hemorroides), que fueron el motivo de su consulta. En todos ellos se descartó cualquier tipo de patología esofágica, gástrica, duodenal, biliar o pancreática, mediante las exploraciones apropiadas. El grupo estaba integrado por 8 hombres y 7 mujeres, con una media de edad de 42 ± 14 años (rango 19-67). Todos fueron informados adecuadamente sobre el estudio que se pretendía realizar y otorgaron su conformidad al mismo.

Tras una cena frugal, los pacientes fueron sometidos a un ayuno de 12 horas tras el cual se les introdujo, bajo control radiológico, una sonda nasogástrica del número 18, fijándola a 6-7 cm del píloro. El contenido gástrico se obtuvo mediante aspiración continua durante 24 horas, con los sujetos en posición de semisentados. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis.

Cuantificación de los ácidos biliares. — La extracción de los AB del jugo gástrico se realizó añadiendo 1 ml de éste a 10 ml de una mezcla de etanol/éter (3/1 v/v), agitando durante 10 min y centrifugando, posteriormente, a 1.500 g durante 15 min. El sobrenadante fue evaporado bajo corriente de nitrógeno y redisolto en 1 ml de etanol.

Para el análisis de los AB conjugados, se aplicaron de 5 a 10 μl del extracto sobre una placa de sílica gel 60 (Merck), que fue desarrollada hasta 10 cm del origen, en una cámara conteniendo la mezcla solvente constituida por l-propanol/tetracloroetileno/ácido fórmico (13/5/2 v/v) (18).

Para el análisis de los AB libres, se aplicaron 40-50 μl del mismo extracto y el des-

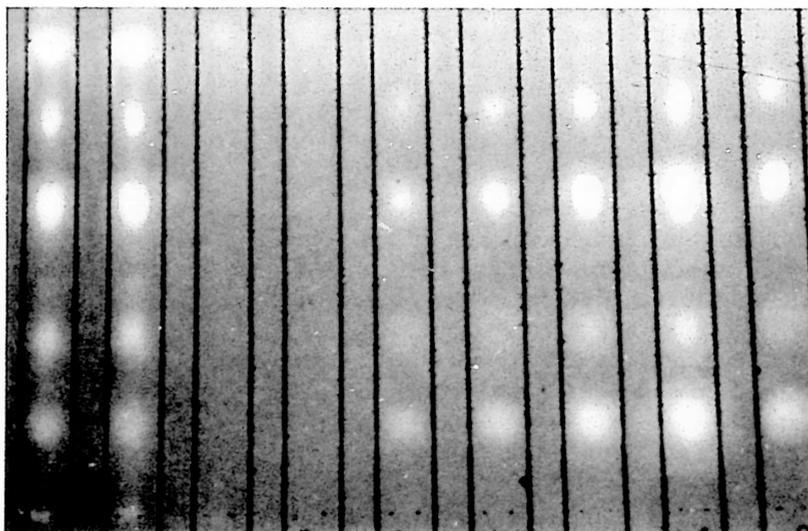


Fig. 1. Separación de los ácidos biliares conjugados mediante cromatografía en capa fina.

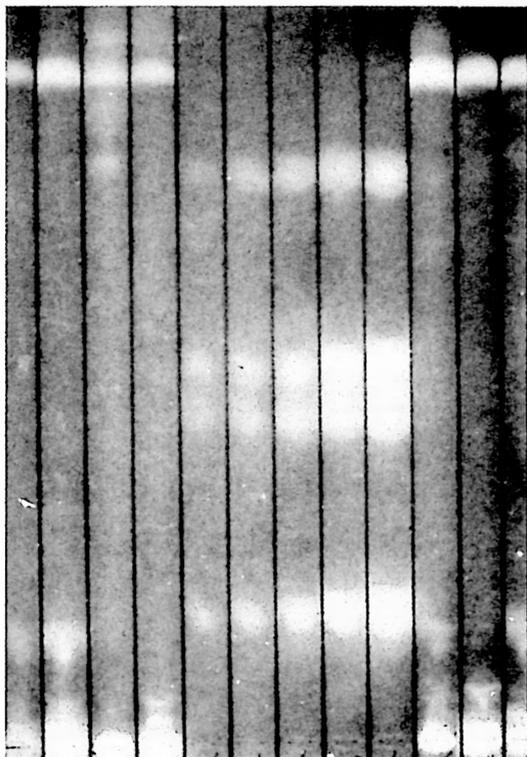


Fig. 2. Separación de los ácidos biliares libres mediante cromatografía en capa fina.

arrollo cromatográfico se realizó con una mezcla solvente constituida por isooctano/acetato de etilo/n-butanol/ácido acético (20/10/3/3 v/v) hasta 20 cm del origen (23).

En ambos casos, los AB fueron detectados como compuestos fluorescentes, por medio de tratamiento térmico a 160 °C durante 30 min, en presencia de tetracloruro de zirconio (20) (figs. 1 y 2). La cuantificación se realizó por medio de lectura fluorométrica con luz ultravioleta de 366 nm (espectrofluorímetro PM2K Zeiss) e integración automática de las áreas de las bandas correspondientes a cada uno de los AB. La cantidad de AB presente en cada una de ellas se obtuvo sobre la recta de regresión calculada a partir de patrones de AB puros (Sigma) desarrollados sobre la

misma placa (tabla I). El límite de sensibilidad de este método es del orden de 10 ng para cada clase de AB. Los patrones puros mostraron una relación lineal entre la raíz cuadrada del área de la banda y el logaritmo de la cantidad de AB, para valores entre 10 ng y 100 µg (figs. 3 y 4).

Tabla I. Composición de las soluciones patrones de ácidos biliares (AB) puros utilizadas para la cuantificación de los ácidos biliares presentes en las muestras de jugo gástrico.

Acido biliar	µg/µl
<i>AB conjugados</i>	
Glicocólico	1,0
Glicodeoxicólico	0,2
Glicoquenodeoxicólico	0,4
Taurocólico	0,65
Taurodeoxicólico	0,1
Tauroquenodeoxicólico	0,2
<i>AB libres</i>	
Cólico	0,05
Deoxicólico	0,05
Quenodeoxicólico	0,05
Litocólico	0,05

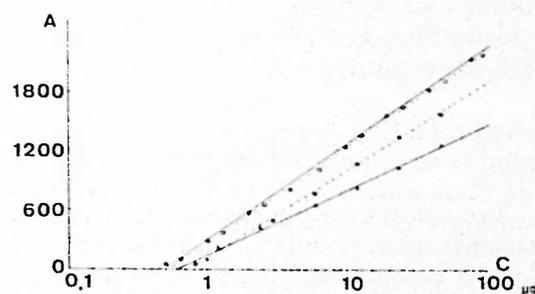


Fig. 3. Rectas de regresión de cada uno de los ácidos biliares (AB) conjugados, obtenidas a partir de los patrones puros separados por cromatografía en capa fina.

A = Área de la banda por lectura fluorométrica; C = Cantidad conocida de cada AB. Ácido glicocólico (★) ($r = 0,999$); ácido glicoquenodeoxicólico y glicodeoxicólico (△) ($r = 0,999$); Ácido taurocólico ($r = 0,999$) (○) ácido tauroquenodeoxicólico y taurodeoxicólico (●) ($r = 0,995$).

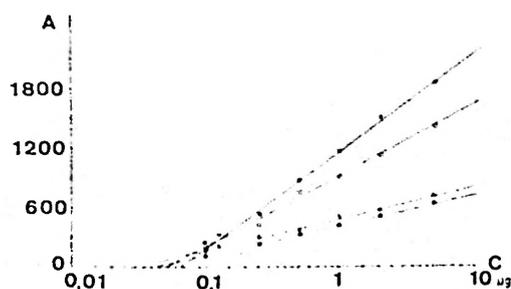


Fig. 4. Rectas de regresión de cada uno de los ácidos biliares (AB) libres, obtenidas a partir de los patrones puros separados mediante cromatografía en capa fina.

A = Área de la banda por lectura fluorométrica; C = Cantidad conocida de cada AB; ácido cólico (★) ($r = 0,997$); ácido quenodeoxicólico (Δ) ($r = 0,994$); ácido litocólico (●) ($r = 0,993$); ácido deoxicólico (○) ($r = 0,991$).

Los valores obtenidos inicialmente en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de concentración de AB en la muestra de jugo gástrico de 24 horas, se expresan en μmoles de reflujo/h. Este parámetro no sólo considera la concentración de AB, sino que también tiene en cuenta el volumen total del contenido gástrico aspirado. El valor de AB totales se ha calculado mediante la suma de cada uno de los AB aislados en cada caso.

Resultados

Los valores medios de los diferentes AB cuantificados se indican en la tabla II. De los 15 sujetos estudiados, 7 presentaron niveles indetectables de AB en el jugo gástrico y 8 niveles cuantificables, con una media de AB totales de $4,22 \pm 1,16$ (rango 2,16-5,61) μmoles de reflujo/h. En ninguno de los casos se detectaron AB libres. En consecuencia, se puede afirmar que casi el 50 % de los sujetos sanos no presenta evidencia de RDG o que es tan reducido que resulta indetectable. El resto muestra valores bajos, que en ningún caso

Tabla II. Ácidos biliares (AB) presentes en el jugo gástrico de sujetos sanos.

Los resultados (media \pm SE) están expresados en μmoles reflujo/h.

Ácido biliar		Escala
Glicocólico	$0,404 \pm 0,252$	0-3,54
Glicodeoxicólico + glicoquenodeoxicólico	$1,160 \pm 0,436$	0-4,67
Taurocólico	$0,626 \pm 0,229$	0-2,46
Taurodeoxicólico + tauroquenodeoxicólico	$0,063 \pm 0,062$	0-0,94
AB libres	---	---
AB totales	$2,253 \pm 0,608$	0-5,61

han superado la cifra de 6 μmoles de reflujo/h de AB totales.

El sexo no ha tenido relación con la existencia o no de RDG, pero sí la edad. La media de los 8 pacientes con RDG cuantificable fue de 51 ± 12 años, mientras que la de los 7 casos sin RDG fue de 32 ± 7 años ($p < 0,005$ en el test t de Student). El volumen de contenido gástrico aspirado no ha influido en los resultados; el volumen medio fue de 475 ± 219 ml en los sujetos con RDG detectable y de 792 ± 207 en los casos sin RDG.

Discusión

El estudio del RDG tiene gran interés, no sólo por su posible acción fisiopatológica sobre la mucosa gástrica, sino también por la dificultad que supone su cuantificación. La mayoría de los métodos empleados para valorarlo resultan poco fiables (1, 5) y otros, como el HIDA con $\text{Tc}^{99\text{m}}$, que han sido utilizados con mayor éxito (13), la complejidad instrumental, el carácter radiactivo del marcador y las dificultades en la interpretación (16) limitan su uso.

En el presente estudio se ha realizado una aproximación original para la evaluación del RDG mediante el análisis cuantitativo de los AB presentes en el jugo gás-

trico. El estómago está excluido del circuito enterohepático, por lo que la aparición de AB en su contenido refleja la existencia y la magnitud del RDG. Además, el análisis de los distintos AB permite estudiar su composición cualitativa, que puede tener importancia por la variable capacidad lesiva de los AB sobre la mucosa gástrica (7). Entre las técnicas existentes para la determinación de AB, el método enzimático (4) resulta sencillo y fiable para la cuantificación total, pero no permite evaluar los distintos AB individuales. Otros métodos incluyen la combinación compleja de separaciones por cromatografía en capa fina y, posteriormente, por cromatografía gas-líquido (8). El método desarrollado en este trabajo, utilizando cromatografía en capa fina y espectrofluorimetría *in situ*, permite la cuantificación de cada uno de los AB de una forma sencilla y en varias muestras simultáneamente. La resolución de los sistemas solventes cromatográficos empleados ha proporcionado una separación neta de los distintos AB, excepto para los AB dihidroxilados isómeros (conjugados de ácidos deoxicólico y quenodeoxicólico) entre sí que, como ocurre con otros sistemas (3,9), se han determinado conjuntamente.

Todos los métodos de análisis de la composición del jugo gástrico implican su aspiración previa mediante intubación gástrica. En contra de lo que, de manera empírica, se asumía tradicionalmente, estudios recientes han demostrado que los tubos gástricos y transpilóricos no afectan al vaciamiento gástrico ni la cantidad de RDG en el hombre (17). Por otra parte, la aspiración gástrica prolongada durante 24 horas permite recoger una muestra representativa de las variaciones a lo largo del día, así como evitar errores que pueden surgir en aspiraciones breves, debido al posible RDG inducido momentáneamente por la sensación nauseosa, originada durante la colocación de la sonda nasogástrica.

Los resultados de los 15 sujetos sanos

estudiados muestran que el RDG ocurre a niveles cuantificables en aproximadamente la mitad de los casos (54 %), aunque con valores de AB totales en el jugo gástrico inferiores a 6 μ moles de reflujo/h. Ya WORMSLEY (25) sugirió que el reflujo del contenido duodenal al estómago puede darse en el hombre de manera fisiológica en ayunas y después de la ingestión. Otros autores han llegado a la misma conclusión utilizando diversos métodos de valoración (11, 16). Entre los factores que pueden determinar la existencia o no de RDG en personas sanas, el sexo no parece tener importancia, pero sí la edad. Esta observación concuerda con hallazgos de un aumento de la frecuencia de gastritis crónica y de metaplasia intestinal con la edad (10, 21). Es decir, a medida que avanza la edad, se incrementaría progresivamente el RDG, cuyo efecto patógeno puede conducir a la aparición de gastritis crónica. Otro factor a tener en cuenta es la capacidad de aclaramiento del estómago durante la fase II del ciclo motor y secretor gastrointestinal. No se puede descartar que los casos que no presentan RDG detectable tengan, en realidad, un nivel de reflujo parecido al resto del grupo, pero que posean una mayor capacidad para evacuar de nuevo el material refluído hacia el duodeno, con lo que no sería aspirado por la sonda nasogástrica.

Ninguno de los sujetos estudiados tenía niveles de AB libres detectables en el jugo gástrico. Los AB son conjugados en el hígado con los aminoácidos glicina y taurina antes de ser excretados a los canalículos biliares y sólo, excepcionalmente, se han detectado cantidades ínfimas de AB libres en la bilis (6). Los AB se desconjugan, a medida que van descendiendo por el intestino delgado, por la acción de las bacterias intestinales. En el estómago de un individuo sano, con un nivel de clorhidria normal, la flora bacteriana de tipo intestinal es escasa o nula; en consecuencia, los AB que acceden al estómago por el RDG, permanecen en forma conjugada. Sin em-

bargo, en circunstancias patológicas, el crecimiento bacteriano en el estómago (14) provoca desconjugación y la consiguiente acción nociva de los AB libres, especialmente los deshidroxilados (deoxicólico y litocólico), sobre la mucosa gástrica (7).

La metodología desarrollada en este trabajo permite la evaluación cuantitativa del RDG y su aplicación en el estudio de diversos tipos de patología digestiva puede aportar valiosa información sobre el papel etiopatogénico del RDG y de los distintos AB presentes en el mismo.

Resumen

Se evalúa la posible existencia de reflujo duodenogástrico (RDG), en un grupo de 15 sujetos sanos, en ayunas y durante 24 horas, mediante la cuantificación de los ácidos biliares (AB) presentes en el jugo gástrico. Los diferentes AB libres y conjugados se han separado y cuantificado por medio de cromatografía en capa fina y espectrofluorimetría *in situ*. De los 15 sujetos estudiados, 7 no tienen AB detectables, mientras que los 8 restantes muestran valores de AB totales inferiores a 6 μ moles reflujo/h. En ningún caso se detectan AB libres. Los niveles de AB en el jugo gástrico no presentan diferencias entre sexos, pero sí aumentan con la edad. La técnica cromatográfica desarrollada es altamente sensible para el análisis de AB y la determinación de éstos en el jugo gástrico constituye un procedimiento cuantitativo y fiable para evaluar la existencia de RDG.

Palabras clave: Ácidos biliares, Reflujo duodenogástrico, Jugo gástrico, Cromatografía en capa fina.

Bibliografía

- Capper, W. M., Airth, G. R. y Kilby, J. O.: *Lancet*, 2, 621-623, 1966.
- Capper, W. M.: *Ann. Rev. Coll. Surg. Eng.*, 1, 21-35, 1967.
- Chavez, M. N. y Krone, C. I.: *J. Lipid Res.*, 17, 545-547, 1976.
- Engert, R. y Turner, M. D.: *Anal. Biochem.*, 51, 399-407, 1973.
- Faber, R. G., Russell, R. C., Royston, C. M., Withfield, P. y Hobsley, M.: *Gut*, 15, 880-884, 1974.
- Hanson, K., Lund, G., Steuram, U. y Wallesström, A.: *Acta Chirur. Scand.*, 126, 338, 1963.
- Harmon, J.W., Doong, T. y Gadacz, T.R.: *Surgery*, 84, 79-86, 1978.
- Hoffman, A. F.: *J. Lipid Res.*, 3, 127-128, 1962.
- Huang, C. H. y Nichols, B.: *J. Chromatogr.*, 101, 235-239, 1974.
- Ihamaki, T., Varis, K. y Siurala, M.: *Scand. J. Gastroenterol.*, 14, 801-812, 1979.
- Keane, F. B., Dimagno, E. P. y Malagelada, J.R.: *Gastroenterology*, 81, 726-731, 1981.
- Lawson, H. H.: *Lancet*, 1, 469-472, 1964.
- Mackie, C. R., Wisbey, M. L. y Cuschieri, A.: *Br. J. Surg.*, 69, 101-104, 1982.
- Marne, C., Pallarés, R., Casanova, A. y Sitges-Serra, A.: *Eur. J. Microbiol.*, 4, 426-427, 1985.
- Menguy, R. y Max, M.: *Am. J. Surg.*, 119, 177-182, 1970.
- Müller-Lissner, S. A., Jonnemberg, A., Müller-Duysing, W. et al.: *Scand. J. Gastroenterol.*, 16 (Suppl. 67), 43-46, 1981.
- Müller-Lissner, S. A., Fimmel, C. J., Will, N., Müller-Duysing, W., Heinzl, F. y Blum, A. L.: *Gastroenterology*, 83, 1.276-1.279, 1982.
- Navarro, X., Cabrol, J., Simó-Deu, J. y Segura, R.: II Congreso Luso-Español Bioquímica, 1983.
- Nicholls, J. C.: *World J. Surg.*, 3, 731-736, 1979.
- Segura, R. y Navarro, X.: *J. Chromatogr.*, 217, 329-340, 1981.
- Siurala, M., Sipponen, P. y Kekki, M.: *Scand. J. Gastroenterol.*, 20 (Suppl. 109), 69-76, 1985.
- Thomas, W. E. G.: *Scand. J. Gastroenterol.*, 19 (Suppl. 92), 151-155, 1984.
- Van den Ende, A., Rådecker, C.E. y Mairuhu, W.M.: *Anal. Biochem.*, 134, 153-162, 1983.
- Van Heerden, J. A., Priestly, J. T., Farrow, G. M. y Phillips, S. F.: *Am. J. Surg.*, 118, 427-433, 1969.
- Wormsley, R. G.: *Gut*, 13, 243-250, 1972.