



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y PEDIATRÍA

*Citrulina plasmática como marcador de atrofia
vellositaria en niños*

TESIS DOCTORAL

Javier Blasco Alonso

MÁLAGA 2007

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

*Citrulina plasmática como marcador de atrofia
vellostaria en niños*

TESIS DOCTORAL

por

Javier Blasco Alonso

DIRECTORES DE TESIS

Dr. D. Carlos Sierra Salinas

Prof. Dr. D. Manuel García del Río

La investigación a la que se refiere la presente Memoria se efectuó en el Servicio de Gastroenterología y Nutrición infantil del Hospital Regional “Carlos Haya”, de Málaga, bajo la dirección del Profesor Dr. D. Manuel García del Río y el Doctor D. Carlos Sierra Salinas, a quienes deseo manifestar mi agradecimiento por su magisterio y su apoyo, que he recibido continuamente a lo largo de la ejecución del trabajo.

Así mismo, agradezco a los miembros de la Unidad de Gastroenterología y Nutrición Infantil su constante colaboración, que ha hecho más agradable el trabajo diario, al Hospital, a través del Comité de Ética e Investigación, la evaluación y aprobación del proyecto y, por último, al Servicio de Anatomía Patológica y al Laboratorio del Materno Infantil su disposición y eficacia en el análisis de las muestras.

Javier Blasco Alonso

a mis padres y hermana
a Raquel

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA ENFERMEDAD CELÍACA	2
1.1.1. PREVALENCIA DE ENFERMEDAD CELÍACA	4
1.1.2. ANATOMÍA PATOLÓGICA	5
1.1.3. PRESENTACIÓN CLÍNICA	9
1.1.4. DIAGNÓSTICO	11
1.1.5. LABORATORIO	13
1.2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	15
1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA	16
1.2.2. ETIOPATOGENIA	19
1.2.3. DIAGNÓSTICO	20
1.2.4. TRATAMIENTO	22
1.3. LOS AMINOÁCIDOS	25
1.4. AMINOÁCIDOS E INTESTINO	27
1.4.1. GLUTAMINA	29
1.4.2. CITRULINA	32
1.4.3. ARGININA	33
1.4.4. PROLINA	36
1.4.5. OTROS AMINOÁCIDOS	37
1.4.6. METABOLISMO PROTEICO E INTESTINO	37

1.5. CITRULINA Y ATROFIA VELLOSIARIA. FUNDAMENTOS CIENTÍFICOS Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
2. HIPÓTESIS	49
3. OBJETIVOS	52
4. METODOLOGÍA	54
4.1. DISEÑO	55
4.2. SUJETOS DE ESTUDIO	55
4.3. RECLUTAMIENTO DE PACIENTES Y ASPECTOS ÉTICOS DEL PROYECTO	56
4.4. VARIABLES E INDICADORES	58
4.4.1. ENFERMEDAD CELÍACA	58
4.4.2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	58
4.5. PROCEDIMIENTO EN ESTUDIO CELÍACOS-CONTROLES	62
4.5.1. RECLUTAMIENTO	62
4.5.2. TOMA DE MUESTRAS Y DETERMINACION CLINICA	63
4.5.3. EVALUACIONES POSTERIORES	63
4.6. PROCEDIMIENTO EN ESTUDIO EII-CONTROLES	64
4.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	65
5. RESULTADOS	66
5.1. RESULTADOS CELÍACOS	67
5.2. RESULTADOS EII	86
6. DISCUSIÓN	97
6.1. CITRULINA Y ENFERMEDAD CELÍACA	98

6.2. CITRULINA Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL	105
7. CONCLUSIONES	111
8. ANEXO	114
9. BIBLIOGRAFÍA	116

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Microscopía óptica de mucosa intestinal de enfermo celíaco	7
2. Síntesis endógena de aminoácidos en enterocito	31
3. Metabolismo de la arginina	35
4. Correlación entre citrulina y fallo transitorio y permanente en adultos	45
5. Correlación entre citrulinemia y lesión enterocitaria en adultos	45
6. Distribución porcentual de los grupos estudiados	68
7. Distribución porcentual según grupos concretos de patología	69
8. Sexo de forma global	71
9. Edad de forma global	71
10. Edades de enfermos celíacos	72
11. Gráfico descriptivo de las cifras de albúmina plasmática en los casos	73
12. Citrulinemia (expresada en $\mu\text{mol/l}$) en casos y controles	75
13. Argininemia (expresada en $\mu\text{mol/l}$) en casos y controles	76
14. Distribución de grupos según el grado de lesión histológica encontrado en la biopsia intestinal	78
15. Citrulina plasmática (expresada en $\mu\text{mol/l}$) según resultados histológicos de la biopsia intestinal	78
16. Aminoácidos plasmáticos según el grado de alteración histológico	79
17. Correlación entre citrulinemia y glutamina plasmática en celíacos	82
18. Correlación entre citrulinemia y arginina plasmática en celíacos	83
19. Correlación entre citrulinemia e isoleucina plasmática en celíacos	83

20. Porcentaje de casos estudiados	86
21. Descriptiva de edades y sexos en los casos de EII	88
22. Citrulina plasmática en casos	90
23. Citrulina comparada entre casos en gráfico de dispersión	91
24. Correlación entre citrulina y glutamina plasmáticas en enfermedad inflamatoria intestinal globalmente	93
25. Correlación entre citrulina y arginina plasmáticas en enfermedad inflamatoria intestinal globalmente	94
26. Correlación entre citrulina e isoleucina plasmáticas en enfermedad inflamatoria intestinal globalmente	94
27. Correlación entre citrulina plasmática y calprotectina en enfermedad inflamatoria intestinal globalmente	95
28. Correlación entre citrulina plasmática y calprotectina en enfermedad inflamatoria intestinal tipo Crohn	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de Marsh modificada	9
Tabla 2. Grupos diagnósticos de enfermedad celíaca	11
Tabla 3. Frecuencias descriptivas de las variables numéricas estudiadas (media \pm DE)	70
Tabla 4. Media (DE) de principales aminoácidos plasmáticos y esteatorrea según el grado de alteración histológica en BIP	80
Tabla 5. Tabla de contingencia para citrulina plasmática	81
Tabla 6. Cifras de otros aminoácidos plasmáticos entre grupos de casos y controles	84
Tabla 7. Cifras de otros aminoácidos plasmáticos entre grupos de atrofia leve y atrofia grave	85
Tabla 8. Variables analizadas comparando los grupos estudiados	87
Tabla 9. Tabla de contingencia para citrulina plasmática	92

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AAE	Anticuerpos antiendomiso
AAG	Anticuerpos antigliadina
ADC	Agmatina decarboxilasa
Ad12	Adenovirus 12
ARG	Arginina
ASL	Arginino-succinato liasa
ASS	Arginino-succinato sintetasa
ATGt	Anticuerpos antitransglutaminasa tisular
ATP	Adenosintrifosfato
BIP	Biopsia intestinal
CrCl	Aclaramiento de creatinina
CU	Colitis ulcerosa
DE	Desviación estándar
EC	Enfermedad celíaca
ECr	Enfermedad de Crohn
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ESPGHAN	European Society of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition
FENIR	Espectroscopia fecal cercana al infrarrojo
GI	Gastrointestinal
GLU	Glutamina
GLY	Glicina
Hb	Hemoglobina
HLA	Complejo génico mayor de histocompatibilidad
IMC	Índice de masa corporal

LEU	Leucina
LYS	Lisina
NO	Óxido Nítrico
NOs	Óxido Nítrico sintasa
NP	Nutrición Parenteral
ORN	Ornitina
OTC	Ornitina transcarbamilasa
PCR	Proteína C reactiva
PHE	Fenilalanina
PRO	Prolina
P5CR	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato reductasa
P5CS	Pirrolina-5-carboxilato sintasa
SER	Serina
TAU	Taurina
TFN	Tasa de falsos negativos
TFP	Tasa de falsos positivos
TNP	Tratamiento Nutricional Primario
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TRE	Treonina
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo
VSG	Velocidad de sedimentación Globular
6-MP	6-mercaptopurina

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD CELÍACA

La enfermedad celiaca (EC), también denominada enteropatía sensible al gluten, es una intolerancia intestinal permanente a la gliadina y proteínas relacionadas con la misma, que ocasiona una lesión de la mucosa del intestino delgado superior en sujetos genéticamente susceptibles, siendo mediada por células T¹. En la actualidad se acepta que la EC es una enteropatía que afecta al intestino delgado, mediada inmunológicamente. Posiblemente, el fenómeno más importante derivado de la respuesta a la gliadina es la activación de las células T de la lámina propia por las células presentadoras de antígeno de la clase HLA II.

Dicke en 1953² comprobó la sensibilidad especial a ciertas harinas, destacando sobre todo la del trigo. Demostró que es en el gluten donde radica la toxicidad (mezcla de proteínas en forma de gránulos que queda como residuo después de la extracción del almidón con agua) y, dentro de él, en la gliadina (fracción endosperma parcialmente soluble en etanol)³. La intolerancia abarca a las gliadinas (trigo), secalinas (centeno), hordeínas (cebada), aveninas (avena) y triticales, en orden descendente de sensibilización.

Las gliadinas tienen porciones diferentes (α , β , γ , δ)⁴. La alfa-gliadina es la principal responsable de la antigenicidad, dependiendo mucho de la conformación espacial de los epítomos en solución de prolina y glutamina.

Los linfocitos de la mucosa intestinal reconocen péptidos de gliadina cuando se les presenta el heterodímero HLA-DQ2. Median mecanismos celulares (linfocitos T activados) y humorales⁵:

- Aumento de células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina A (Ig A) en lámina propia.
- No existe relación con el aumento de inmunoglobulina E (Ig E).
- Linfocitos intraepiteliales y submucosos > 40 / 100 células.
- Descenso de linfocitos CD8, aumento de linfocitos T gamma/delta.

El hallazgo de cifras bajas de linfocitos CD4-CD8 tanto en pacientes celíacos tratados como en no tratados indica que estas células T están inherentemente ausentes en los individuos predispuestos genéticamente para padecer enfermedad celíaca⁶. Estos marcadores pueden ser indicadores de formas latentes y sirven como un marcador precoz de la existencia de la enfermedad.

Se ha detectado analogía entre la fracción alfa-gliadina del gluten y una proteína del Adenovirus 12 (Ad12), que podría ser responsable de la sensibilización⁷.

Las consecuencias fisiopatológicas son: disminución de la superficie de absorción útil, disminución de la capacidad funcional del enterocito y lesión bioquímica e inmadurez del enterocito que se ha reproducido desde la cripta.

Se conoce la existencia de diversos casos en familias, estimándose una prevalencia de EC entre los familiares de primer grado de, aproximadamente, un 15 %, mientras que la concordancia para gemelos homocigóticos es de un

70-100 %⁸. Una gran parte de la susceptibilidad genética se circunscribe a la región HLA del cromosoma 6⁹. La asociación más fuerte es con HLA de clase II en región D. Se ha descrito asociación con los alelos HLA de clase II DR3 y DQ2. En las diferentes poblaciones de enfermos celíacos se encuentra una fuerte asociación con las moléculas HLA DR3 y DQ2¹⁰; los genes que codifican estas moléculas son hallados muy frecuentemente en el mismo cromosoma. Debido a este fenómeno, es difícil puntualizar el gen o genes que confieren la verdadera susceptibilidad primaria a la EC. Se asigna una asociación primaria de la EC con el heterodímero DQ α/β codificado por los genes DQA1*0501 y DQB1*0201, localizados bien en cis (en sujetos DR3-DQ2) o en trans (en individuos DR5/DR7-DQ2 heterodímeros)¹⁰. La molécula DQ2 se encuentra en más del 95 % de los enfermos celíacos, comparado con el 20-30 % de los controles sanos. Los datos disponibles en los pacientes DQ2 negativos indican que en ellos se expresan casi invariablemente los alelos HLA DR4-DQ8¹¹.

1.1.1. PREVALENCIA DE ENFERMEDAD CELÍACA

Se ha descrito una prevalencia de alrededor de 1:1000 con un rango de 1:250 (Suecia) a 1:4000 (Dinamarca) pero, a medida que se han efectuado más estudios, la cifra ha aumentado (Finlandia 1:99, Italia 1:106)^{12,13,14}. Parece existir mayor prevalencia en mujeres que en hombres. Con el tiempo, se ha apreciado cambio significativo en la prevalencia de la EC, pues debe tenerse en cuenta que ésta es el resultado de la interacción de un condicionamiento genético con factores ambientales; los cambios en la alimentación, el tiempo de lactancia al pecho, la menor antigenicidad de las fórmulas, y la introducción retardada del gluten, pueden explicar, por un lado, un descenso aparente en la

incidencia de la EC y, por otro, la aparición de formas atípicas de EC en niños mayores y adolescentes.

La investigación de EC asintomática se ha realizado en sujetos de riesgo, como familiares de primer grado, o en sujetos normales, por métodos de screening en donantes de sangre o en población escolar. La prevalencia de una enfermedad no diagnosticada debe ser muy superior a la de la enfermedad diagnosticada.

Entre los donantes de sangre, la prevalencia de EC asintomática se ha descrito con valores desde 1:681 hasta el 1:266¹⁵. Entre escolares sanos se ha encontrado una prevalencia de EC oculta o asintomática de 4,3 %¹⁶.

1.1.2. ANATOMÍA PATOLÓGICA

La biopsia intestinal es actualmente fundamental para poder demostrar la presencia de la enfermedad^{17, 18}, siendo los hallazgos muy característicos pero no patognomónicos.

Conviene tener en cuenta que, como paso previo a la observación directa de la pieza de la mucosa intestinal, el fragmento de pared es manipulado por la persona que realiza la técnica y, para su correcta valoración, debe ser manejada correctamente, sin destruir partes de la misma e introducida en un medio de inclusión (formol o suero) lo más precozmente posible.

Los principales hallazgos histológicos se encuentran en la mucosa duodenal, por lo que las dos técnicas más importantes para su obtención son la endoscopia digestiva superior y la biopsia por cápsula (“a ciegas”). En la primera porción duodenal se localizan unas lesiones muy típicas, que suelen

ser parcheadas, por lo que se deben obtener varias muestras si es posible. Esto puede hacerse con la biopsia por endoscopia que, además, permite valorar “in situ” el aspecto macroscópico de la mucosa y, así, biopsiar la zona más sospechosa de tener atrofia vellositaria. Con la biopsia “a ciegas” mediante cápsula se logra alcanzar más fácilmente la tercera o cuarta porción duodenales, en la región del bulbo duodenal, zona que suele presentar alteraciones significativas.

Patrones/fases de los cambios de la mucosa¹⁹:

- 1) Lesiones preinfiltrativas: Histología normal; suelen ir con aumento de anticuerpos antigliadina (AAG).
- 2) Lesión infiltrativa-proliferativa: Aumento de linfocitos intraepiteliales, con estructura normal de la mucosa. Aparece en 25 % de familiares de primer grado.
- 3) Lesión hiperplásica: Criptas hipertróficas, linfocitos epiteliales aumentados.
- 4) Lesión destructiva: Lesión “plana”, criptas alargadas, edema lámina propia. En 10-20 % de familiares primer grado.
- 5) Mucosa atrófica o hipoplásica: Grado más avanzado.

Al **microscopio estereoscópico**: Es lo primero que se emplea para orientar la pieza adecuadamente y para dar una idea sobre lo que se verá al microscopio óptico posteriormente.

- **Patrón de mucosa plana o en mosaico:** Vellosidades reducidas a esbozos rudimentarios (al haber hiperplasia de las criptas, la pieza no es tan fina como cabría esperar). Equivale a la atrofia subtotal/total.
- **Patrón de mucosa cerebriforme:** Se aprecia cierta parte de las vellosidades, sin ser imagen totalmente plana. Equivale a la atrofia parcial.
- **Patrón de mucosa foliácea:** Se ven las vellosidades perfectamente, como hojas de un árbol, apretadas unas con otras (en diferentes orientaciones a veces).

Al **microscopio óptico:** Aplanamiento de mucosa intestinal, con criptas hipertrofiadas. En la lámina propia hay *células plasmáticas*, *linfocitos*, neutrófilos, eosinófilos y algunos histiocitos. Células epiteliales cuboideas y pseudoestratificadas.

En la figura 1 se aprecian atrofia de vellosidades, hiperplasia críptica, enteritis grave e intenso infiltrado inflamatorio en lámina propia.

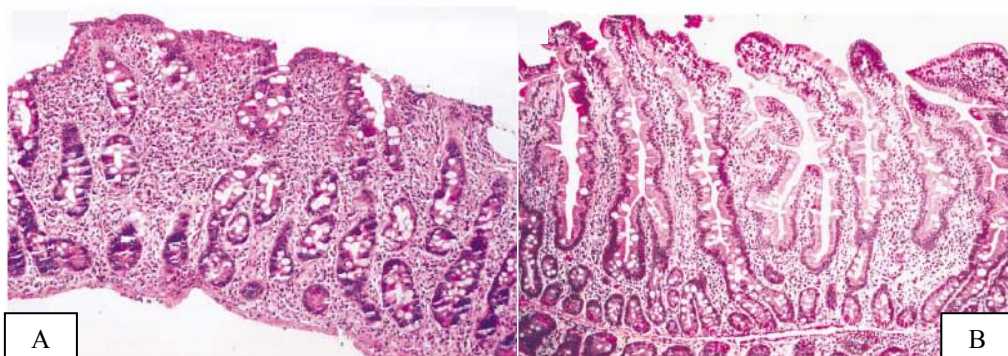


Figura 1. Microscopía óptica de mucosa intestinal de enfermo celíaco no tratado (A) frente a paciente sano (B).

En función del espesor de la mucosa, se utiliza la nomenclatura siguiente

– **Mucosa normal**. 350-500 micras de espesor de mucosa.

– **Atrofia parcial**:

Ligera o grado I: 300-500 micras de espesor de mucosa (corresponde a niños realizando dieta sin gluten).

Moderada o grado II: 150-300 micras (pequeñas transgresiones).

Grave o grado III: 50-150 micras.

– **Atrofia total o subtotal**: espesor < 50 micras.

En base a estos datos, según la infiltración linfoplasmocitaria intraepitelial (<20% normal; 20-40% dudoso; >40% patológico), se debe aplicar la clasificación de MARSCH modificada (tabla 1).

Al **microscopio electrónico**: Cisternas dilatadas de retículo endoplásmico rugoso, depósito de IgA e IgM en niños.

Otras causas de aplanamiento de la mucosa de intestino delgado:

- Predominantes en < 1 año:

· Síndrome postgastroenterítico, alergia a proteínas de leche de vaca, alergia proteína de soja, Giardiasis, inmunodeficiencias.

- Enteropatía autoinmune, quimioterapia antineoplásica, ferropenias, marasmo y Kwashiorkor, síndrome de sobrecrecimiento bacteriano intestinal, esprúe tropical, síndrome de Zöllinger-Ellison, linfoma intestinal, dermatitis herpetiforme, Ausencia congénita de villi.

- Defecto de la técnica.

Tabla 1. Clasificación de Marsh modificada

	GRUPO 0	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3		
				Grupo 3a	Grupo 3b	Grupo 3c
Infiltrado linfocitario intraepitelial	<40	>40	>40	>40	>40	>40
Criptas	Normal	Normal	Hipertrofia	Hipertrofia	Hipertrofia	Hipertrofia
Vellosidades	Normal	Normal	Normal	Atrofia parcial leve/moderada	Atrofia marcada	Ausencia

1.1.3. PRESENTACIÓN CLÍNICA

Las características clínicas de la EC son muy diferentes según la edad de presentación. Los síntomas clásicos de presentación (diarrea, distensión abdominal, fallo de medro) son comunes en los menores de 1 año. En niños mayores se caracteriza por la prevalencia de síntomas extraintestinales como talla baja, retraso en la pubertad y otros. Se puede hablar de cuatro tipos de EC, según las características clínicas, inmunológicas e histológicas^{20,21,22}: La tabla 2 recoge los grupos diagnósticos.

Enfermedad celíaca sintomática

En la presentación clásica de la enfermedad, los síntomas suelen aparecer antes de los 2 años de edad y consisten en diarrea, distensión abdominal, retraso ponderal, anorexia rebelde e irritabilidad. Muy pocos niños debutan en la actualidad como crisis celíaca, es decir con mal estado general, diarrea severa, trastornos hidroelectrolíticos, deshidratación y shock.

La característica histológica fundamental, aunque no específica, es la atrofia subtotal de vellosidades, que revierte a la normalidad tras dieta sin gluten.

Enfermedad celíaca silente

Existe ausencia de síntomas, aunque si se examina con profundidad suele encontrarse síntomas extraintestinales o con mínimos síntomas digestivos. La lista va aumentándose de forma progresiva: talla baja, estreñimiento, anemia, artritis, hepatitis crónica criptogénica, infertilidad, epilepsia con calcificaciones occipitales, etc. La mayoría de los casos de EC diagnosticados como consecuencia de despistaje entre familiares de primer grado corresponden a la forma silente.

Histológicamente se aprecia mucosa plana o atrofia subtotal que se normaliza tras instaurar dieta sin gluten.

Enfermedad celíaca latente

Este término se reserva en la actualidad para aquellos pacientes que tienen una biopsia intestinal normal pero que tiempo atrás o posteriormente presentan una mucosa yeyunal plana que se recupera después de retirar gluten de la dieta. Con frecuencia se detectan síntomas poco relevantes y/o factores de riesgo constituidos por patologías como diabetes mellitus, síndrome de Down, etc.

Los anticuerpos antigliadina no son marcadores obligatorios de esta condición. Los anticuerpos antiendomiso y anti-transglutaminasa tisular son los mejores predictores de progresión a la atrofia vellositaria.

Enfermedad celíaca potencial

Se ha propuesto este término acuñado por Fergusson²¹ para aquellos pacientes que no tienen y que nunca han tenido una biopsia intestinal

patológica y sin embargo presentan anomalías inmunológicas similares a las encontradas en la EC. Los marcadores sugestivos de la EC potencial son los siguientes: anticuerpos antiendomiso positivos, porcentaje de linfocitos intraepiteliales superior al 40 % y aumento de la densidad de linfocitos intraepiteliales que expresan los receptores de células T + $\gamma\delta$.

En la EC existe evidencia de afectación intestinal (enteropatía) pero también puede apreciarse, por respuesta inmunológica anómala, alteración en piel (dermatitis herpetiforme), boca (aftas recurrentes), riñón (nefropatía IgA), articulaciones (artritis) y sistema nervioso central (epilepsia y calcificaciones). Es probable que en la EC potencial se requiera para el desarrollo de la lesión mucosa típica del paciente celíaco, la existencia de factores facilitadores como el aumento temporal en la permeabilidad intestinal, el incremento en el consumo de gluten o bien una infección intestinal.

Tabla 2. Grupos diagnósticos de enfermedad celíaca

	Síntomas	Anticuerpos antigluten	Histología	HLA-DQ2
Celíaca sintomática	+ / ++	++	+++	+
Celíaca silente	—	+ / —	++	+
Celíaca latente	+ / —	+ / —	— actual (sería + anterior)	+
Celíaca potencial	—	— / +	—	+ / factores de riesgo (hermano de celíaco)

1.1.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clásico se basa en los criterios de ESPGHAN de 1969 que precisa de la realización de 3 biopsias intestinales²³. Los criterios revisados por

la ESPGHAN en 1990 ²⁴ para el diagnóstico de EC lleva a las siguientes consideraciones: se precisa el hallazgo, mientras está tomando gluten, de una biopsia intestinal patológica que muestre atrofia vellositaria e hiperplasia críptica, y una completa remisión clínica tras la retirada del gluten en la dieta. La evolución de los marcadores serológicos antigluten ayuda a la firmeza del diagnóstico.

Estos criterios renovados contemplan por tanto la realización de sólo una biopsia intestinal, salvo en determinadas ocasiones en las que se requiere la demostración de normalidad histológica. Este es el caso de aquellos pacientes asintomáticos que presentan lesión histológica sugestiva de EC, como en determinados familiares de primer grado o en aquellos diagnosticados durante un programa de despistaje en donantes de sangre o en población escolar supuestamente sana. Se recomienda la agresión con gluten cuando no se haya realizado la primera biopsia, si se efectúa el diagnóstico por debajo de los 2 años de edad, pues en los primeros 24 meses pueden existir otras situaciones que también provoquen mucosa plana (enteropatía por intolerancia a proteínas de leche de vaca, giardiasis y síndrome postenteritis).

Actualmente, este es un tema en debate y con revisiones frecuentes, pero aumenta el número de publicaciones que afirman que no es necesaria la provocación con gluten y la biopsia posterior, por la posibilidad de que aparezcan recaídas con manifestaciones extradigestivas, en forma de otras enfermedades autoinmunes, pudiendo tener una evolución negativa y difícil control mediante la vuelta a la dieta sin gluten...

1.1.5. LABORATORIO

Tests serológicos^{25,26}

Presentan elevadas sensibilidad y especificidad, aunque ninguno ha reemplazado a la biopsia intestinal. Los anticuerpos antigliadina (AAG) son predominantemente de clase IgA e IgG y en menor proporción IgM. El déficit de IgA es la principal causa de falsos negativos de AAG-IgA, recurriendo en estos casos a la determinación de AAG-IgG, cuyo único inconveniente es su escasa especificidad.

Los anticuerpos antiendomiso (AAE) poseen una sensibilidad y especificidad cercana al 100 %. Los pocos resultados falsos negativos ocurren en niños de menos de 2 años de edad. Son especialmente útiles en la investigación de sujetos de riesgo como los familiares de primer grado y también para la monitorización de la agresión con gluten como un buen predictor de recaída en los adolescentes.

Los anticuerpos anti-transglutaminasa tisular (ATGt) IgA tienen también sensibilidad y especificidad muy elevadas (94 – 100 %), con la ventaja de ser una técnica más fácil que la de AAE, en la que no influye la presencia de anticuerpos, como antinucleares y antimúsculo liso, y que no depende de la interpretación subjetiva del que observa al microscopio la imagen fluorescente^{27,28}.

Para la investigación de la ECr pueden considerarse distintos grupos:

1. Pacientes con síntomas sospechosos de la enfermedad (diarrea crónica, pérdida de peso y anorexia)

2. Pacientes que presentan uno o pocos síntomas sugestivos de la enfermedad (anemia ferropénica, talla baja, retraso puberal)
3. Pacientes pertenecientes a grupos de riesgo de enfermedad (familiares de primer grado, diabetes, tiroiditis, síndrome de Down, nefropatía IgA)
4. Sujetos supuestamente sanos (estudio de prevalencia en población escolar, en donantes de sangre o como investigación universal en niños).

Es importante considerar que la EC no tratada presenta riesgo de complicaciones, entre ellas infertilidad, osteoporosis y enfermedades malignas, como linfoma intestinal²⁹. Por otra parte, se sabe que, cuanto más precoz sea el diagnóstico, mejor será la adherencia a la dieta sin gluten, que debe ser estricta y para toda la vida. Todo esto conduce al interés creciente por realizar el diagnóstico en la etapa pediátrica.

1.2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Las enfermedades inflamatorias crónicas del intestino delgado y del colon en sentido estricto agrupan una serie de entidades caracterizadas por la presencia frecuente de diarrea, a veces sanguinolenta, dolor abdominal y un síndrome inflamatorio dominado por la fiebre, todo lo cual conduce a una alteración del estado general. Interesan especialmente la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) crónica de etiología desconocida o discutida, al frente de las cuales están la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (ECr). Junto a ellas hay otro grupo de etiología conocida (tuberculosis, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Entamoeba*, etc.)³⁰.

En 1932, los doctores Burrill B. Crohn, Leon Ginzburg y Gordon D. Oppenheimer^{31,32} publicaron un trabajo que marcó un hito en la descripción de las características clínicas de lo que ahora es conocido como la enfermedad de Crohn. La enfermedad de Crohn y una enfermedad relacionada, la colitis ulcerosa, son las principales divisiones del grupo de enfermedades llamadas enfermedades inflamatorias gastrointestinales.

Debido a que los síntomas de estas dos enfermedades pueden ser tan similares aproximadamente en el 10 por ciento de los casos no es posible diagnosticar definitivamente si se trata de colitis ulcerosa o de enfermedad de Crohn. En ambas enfermedades, hay una respuesta inmunológica anormal.

Las células de glóbulos blancos se infiltran en la pared intestinal, causando inflamación crónica³³. Entonces estas células producen productos nocivos que llevan finalmente a lesionar el tejido³⁴. Cuando esto sucede, el paciente experimenta los síntomas de EII. La causa precisa de una inflamación crónica asociada con EII no es conocida.

A pesar de que la enfermedad de Crohn afecta más comúnmente el final del intestino delgado (íleon terminal) y el principio del intestino grueso (ciego), puede involucrar cualquier parte del tracto gastrointestinal (GI). Por otro lado, la colitis ulcerosa limita su participación gastrointestinal al colon³⁵. En la enfermedad de Crohn, todas las capas del intestino pueden estar involucradas y puede haber partes sanas entre tramos del intestino enfermo. En contraste la colitis ulcerosa afecta únicamente las capas superficiales (la mucosa) del colon en una distribución más pareja y continua que inicia al nivel del ano³⁶.

1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA

Desde los años cuarenta, en el mundo occidental, ha habido un aumento constante de la incidencia, tanto de enfermedad de Crohn como de colitis ulcerosa³⁷, hasta llegar a las cifras actuales de 6 y 20 por cada 100.000, respectivamente³⁸.

Parece que hombres y mujeres son afectados por igual. La enfermedad de Crohn puede presentarse en cualquier edad, pero es, principalmente, una enfermedad de adultos jóvenes. La mayoría de los casos se diagnostica en pacientes con menos de 30 años de edad, pero, aunque con menor frecuencia, aparece también entre niños pequeños y en adultos de entre 50 y 70 años e incluso mayores.

La incidencia de CU en la población pediátrica aumentó progresivamente a nivel mundial hasta 1978, pero desde entonces se mantiene relativamente estable. La enfermedad es más frecuente en Estados Unidos y en el norte de Europa, con tasas de incidencia entre 3'9 y 7'3 casos por 100.000 y tasas de prevalencia entre 41'1 y 79'9 casos por 100.000 ^{39,40}.

Puede aparecer en cualquier edad, aunque la CU es excepcional antes de los 10 años. A pesar de que no se ha podido demostrar una transmisión con carácter mendeliano, la incidencia es mayor en familias afectas que en la población general⁴¹. Es más frecuente en blancos y judíos⁴² que en asiáticos y negros, con un predominio evidente y sorprendente en Norteamérica y Europa occidental.

En el momento actual no existe evidencia de un factor infeccioso (bacteriano o viral), aunque desde los comienzos se vio el parecido con la tuberculosis y, sucesivamente, se han ido detectando posibles agentes, como *Pasteurella pseudotuberculosis* (*Yersinia enterocolítica*) y *Mycobacterium paratuberculosis*, que no se descartan pero que difícilmente parecen ser la causa común y principal⁴³. La discusión es prácticamente común con la otra entidad, la ECr. Por su parte, los virus (incluido el del sarampión y su vacuna, virus respiratorios y otros), así como Chlamydia⁴⁴ y Micoplasma⁴⁵, actuarían desencadenando algunas recaídas e induciendo una disregulación inmune frente a la flora intestinal que, también, produciría una *hipersensibilidad inmunológica* de los linfocitos T y B.

La lactancia natural favorece una flora con bifidobacterias predominantes (protectores del epitelio y de la reacción inmune normal). La alimentación

artificial, en cambio, produce escasa flora Bifidus y predominio de la E.Coli y otros microorganismos hospitalarios. Para algunos autores, esto puede explicar la incidencia creciente de la EII y su aparición en edad cada vez más temprana. La acción nociva de las proteínas de la leche de vaca (teoría dietética) podría deberse al aumento de la permeabilidad intestinal a las macromoléculas.

Lo mismo que en la ECr, se aprecia su repetición en otros familiares, así como en familias con espondilitis anquilopoyética y antígeno HLA-B27^{46,47}. Ha sido descrito un locus en el cromosoma 16, que predispone a la enfermedad de Crohn (Hugot⁴⁸), pero Satsangi⁴⁹ señala también regiones de los cromosomas 3, 7 y 12.

Igual que en la colitis ulcerosa, la incidencia de la ECr varía según las distintas regiones entre el 1'2 y el 4'5 por 100000 habitantes^{39,40}, correspondiendo a la presentación infantil el 15-30 % de los casos, con una tendencia a ser cada vez más frecuente, lo que apoyaría la intervención patogénica posible de los factores ambientales (agentes microbianos, aditivos alimentarios, vacunas?). Aparece más en la raza blanca, en judíos, grupos HLA B12, DR7 y sobre todo B27, lo cual refuerza la idea de un factor genético predisponente (similar a lo indicado para la CU)^{42,46}. Han sido implicados igualmente factores alimentarios (azúcares refinados, harinas), bacterianos (*Clostridium difficile*, Mycobacterias atípicas), virales y sobre todo inmunológicos, con los mismos fundamentos expuestos a propósito de la CU.

En España, la enfermedad a partir de los años 70, ha ido aumentando de un modo acelerado, coincidiendo con una fuerte subida del nivel de vida. Se dice que es una enfermedad del mundo desarrollado. Según las últimas

investigaciones, la incidencia de la CU en España se ha duplicado o triplicado mientras la incidencia de la enfermedad de Crohn se ha multiplicado por 10. Se piensa que en toda España puede haber unos 50000 pacientes, con ligero predominio de la Colitis Ulcerosa.

1.2.2. ETIOPATOGENIA

Hoy día se desconocen las causas concretas que provocan la enfermedad y se baraja la intervención de factores muy diversos^{42,43,46,50}.

- Factores hereditarios.
- Factores infecciosos.
- Factores dietéticos.
- Factores tóxicos.

La causa de la enfermedad no está aclarada, pero las manifestaciones extraintestinales y los efectos terapéuticos positivos cuando se administran glucocorticoides y la azatioprina sugieren una base inmune.

Las defensas del cuerpo actúan en contra de los componentes del mismo, como si fueran elementos extraños. Estos antígenos extraños puede que sean la causa de la inflamación o puede que estimulen las defensas del cuerpo que producen la inflamación. Las investigaciones más recientes están encaminadas en este sentido: el campo de la inmunología, el estudio del sistema inmune y la microbiología, estudio de organismos microscópicos capaces de causar estas enfermedades. Muchos científicos creen que la interacción de un agente externo (un virus o una bacteria) con el sistema inmune del cuerpo puede causar daño en la pared intestinal, iniciando o acelerando el proceso.

Se sabe que la enfermedad de Crohn tiende a ocurrir en familias y ciertos grupos étnicos. Diferentes estudios han demostrado que del 20 al 25 % de los pacientes afectos por Crohn pueden tener un familiar cercano, ya sea con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. Se ha estimado que, aproximadamente del 5 al 8 por ciento de pacientes con enfermedad de Crohn, pueden tener un hermano, padre o hijo con EII. No parece haber un patrón claro de agrupamiento familiar y los patrones hereditarios son, probablemente, muy complejos. Los investigadores están tratando activamente de establecer a qué genes específicos se vincula la transmisión de esta enfermedad. Los datos sugieren que puede estar involucrado más de un gen. Por el momento, no hay manera de predecir cuáles, ni si alguno de los miembros de la familia desarrollará la enfermedad de Crohn.

1.2.3. DIAGNÓSTICO

Los síntomas comunes incluyen deposiciones frecuentes, semilíquidas o líquidas. Otros síntomas son espasmos abdominales, fiebre, algunas veces sangrado rectal, pérdida de apetito y de peso. Durante los períodos de síntomas activos, los pacientes también pueden experimentar fatiga, dolores articulares y posibles problemas cutáneos. Existen complicaciones claramente definidas en esta enfermedad⁵¹:

I. Complicaciones locales

1. Enfermedad perianal: complica la enfermedad en el 50% de los casos y se manifiesta de tres maneras diferentes:
 - a. Lesiones en piel: erosiones, abscesos; normalmente se producen por la diarrea crónica y la irritación local.

- b. Lesiones del canal anal: fisuras, úlceras, estenosis.
 - c. Fístulas: comunican los diferentes órganos y compartimentos que se encuentran alrededor del recto (vejiga, vagina o piel).
2. Megacolon tóxico: complicación muy grave que consiste en una gran dilatación del colon asociada a fiebre y dolor abdominal intenso. Puede requerir cirugía si no responde al tratamiento con fármacos.
 3. Perforación del colon.
 4. Hemorragia masiva.
 5. Cáncer de colon: fundamentalmente en los pacientes con colitis ulcerosa.

II. Complicaciones generales⁵²:

1. Articulares: Artritis.
2. Dermatológicas: aftas bucales (úlceras), eritema nodoso.
3. Oftalmológicas: iritis, epiescleritis.
4. Hepatobiliares: hepatitis, colangitis, litiasis biliar.
5. Hematológicas: anemia.

Debido a que la enfermedad de Crohn es una enfermedad crónica, los pacientes experimentarán períodos de brotes, seguidos por períodos de remisión. En general, las personas con enfermedad de Crohn pueden llevar una vida activa y normal, siendo nuestro objetivo como médicos evitar el mantenimiento de la actividad inflamatoria e intentar impedir las recaídas frecuentes.

No existe un examen único que inequívocamente diagnostique la enfermedad de Crohn. Para llegar al diagnóstico, se considera una combinación de información de la historia del paciente y un examen médico así como los resultados de los exámenes de laboratorio, rayos X y los hallazgos de los exámenes endoscópicos y patológicos, excluyendo otras causas conocidas de inflamación intestinal. Los exámenes con rayos X pueden incluir pruebas con contraste baritado de la parte superior e inferior del tracto gastrointestinal. Los exámenes endoscópicos pueden incluir sigmoidoscopia flexible y algunas veces colonoscopia, que permite examinar directamente el colon. Durante estos exámenes pueden obtenerse biopsias. Es importante asegurarse que una infección no sea la causa de los síntomas del paciente, por lo que se deben realizar rutinariamente exámenes de las heces para buscar organismos nocivos.

1.2.4. TRATAMIENTO

Debido a que no hay cura médica para la enfermedad de Crohn, la meta es suprimir la respuesta inflamatoria, permitiendo que el tejido intestinal sane y aliviar así los síntomas de la fiebre, diarrea y el dolor abdominal. Una vez que los síntomas son controlados, la terapia médica es usada para hacer menos frecuente los brotes de enfermedad y mantener la remisión.

Uno de los tratamientos más novedosos en los últimos años es el tratamiento nutricional primario (TNP) de la enfermedad de Crohn⁵³. Se refiere al empleo de fórmulas poliméricas como único alimento durante las primeras semanas tras el diagnóstico de la enfermedad inflamatoria (consensuado en los últimos protocolos su mantenimiento durante 6 semanas), consiguiéndose

mejoría clínico-analítica e, incluso, remisión del brote en los casos de enfermedad de Crohn de intestino delgado. Alguna de las fórmulas empleadas incluye una sustancia anti-TNF, que asocia efectos antiinflamatorios directos. Ciertos estudios encuentran que se consigue evitar o retrasar el empleo de esteroides en el primer brote de Crohn de intestino delgado⁵⁴.

Los fármacos principales para el tratamiento de la enfermedad son los salicilatos y los corticosteroides. Ambos reducen la inflamación. La sulfasalazina es una combinación de sulfonamida y un derivado de la aspirina y se utiliza para paliar los síntomas leves de la enfermedad y las recidivas. Para los síntomas más severos se utilizan corticosteroides por vía sistémica (oral o inyectable). También por vía tópica (aplicación en crema o pomada) para los casos de inflamación circunscrita al recto. Otros medicamentos utilizados son las azatioprina y la 6-mercaptopurina (6-MP), que tienen acción inmunosupresora, alivian los síntomas y reducen o disminuyen la dependencia a los corticosteroides que padecen algunos pacientes⁵⁵. También se utiliza el metronidazol para el tratamiento de las complicaciones perianales o de la sobreinfección por *Clostridium difficile*. En las infecciones locales es útil la administración de antibióticos.

La cirugía es necesaria cuando con los fármacos no se pueden controlar los síntomas o cuando aparece obstrucción intestinal u otra complicación. Normalmente se secciona el segmento de intestino alterado y se unen los dos extremos sanos. Se denomina resección y anastomosis. La cirugía permite al paciente estar libre de síntomas pero no se puede considerar la curación de la enfermedad, pues ésta recidiva con gran frecuencia en un lugar cercano a

donde se realizó la anastomosis. La ileostomía con abertura artificial del ileon en la pared abdominal es necesaria cuando el recto está afectado y no puede ser utilizado para una anastomosis.

1.3. LOS AMINOÁCIDOS

Las proteínas son componentes esenciales de todas las células vivas y por ello de todas las estructuras del organismo. Mediante hidrólisis se desdoblan, dando aminoácidos. Así mismo, en el organismo, a partir de los mismos, se forman proteínas de muy diversa índole.

Pero los aminoácidos no son sólo la base estructural de las proteínas, sino que también sufren modificaciones en diferentes rutas metabólicas y son básicos para sintetizar otras sustancias complejas.

Los aminoácidos tiene el **grupo amino** (-NH₂) y el **carboxílico** (-COOH), estando el primero siempre en posición α respecto al carboxilo. Son moléculas óptimamente activas (el átomo de carbono del esqueleto carbonado está sustituido asimétricamente), existiendo dos series esféricas, la L y la D. Los aminoácidos presentes en las proteínas pertenecen a la serie L. El grupo carboxílico, por ser ácido, puede disociar iones H⁺ y el grupo amino, básico, fija iones H⁺ (como ocurre con el amoniaco).

Las proteínas corporales contienen regularmente unos 20 aminoácidos distintos, que se diferencian por la naturaleza del radical denominado R (esqueleto carbonado terminal). Se pueden dividir en cuatro grupos:

1. *Aminoácidos con radical R no polar* (una cadena lateral hidrocarbonada pura): Glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina.

2. *Aminoácidos con grupos no ionizables, pero de naturaleza polar* ($\square\text{OH}$, o $\square\text{SH}$), en la cadena lateral: Tirosina, triptófano, serina, treonina, cisteína, metionina y las amidas de aminoácidos ácidos que son asparragina y glutamina.
3. *Aminoácidos de carácter ácido* (aminodicarboxílicos), con un segundo grupo carboxilo en el radical R: Ácido glutámico y ácido aspártico.
4. *Aminoácidos de carácter básico* (diaminomonocarboxílicos), con otro grupo básico: Lisina, arginina, histidina.

Otros aminoácidos menos frecuentes se encuentran libres en tejidos vegetales o animales y, a veces, se encuentran en el ser humano integrando péptidos sencillos o proteínas especiales, siendo componentes del metabolismo intermediario del organismo. Entre ellos, destacan hidroxiprolina, hidroxilisina, ornitina, ácido α -aminoadípico, taurina, ácido cisteínico, cicloserina...

El organismo humano, así como el de la mayoría de animales, no es capaz de sintetizar todos los aminoácidos, por lo que unos cuantos deben ser obligadamente aportados por la alimentación, recibiendo el nombre de **aminoácidos imprescindibles o esenciales**. Para el ser humano son valina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, treonina, fenilalanina, triptófano.

1.4. AMINOÁCIDOS E INTESTINO

Tradicionalmente, la visión del intestino se ha centrado mucho en sus funciones de digestión, de absorción de nutrientes y de fermentación. Sin embargo, cada vez se conoce mejor la gran complejidad de este órgano multicelular, que desarrolla una serie de funciones fisiológicas claves no implicadas en la asimilación de nutrientes. La mucosa intestinal contiene células secretoras, inmunes y neuroendocrinas además de los enterocitos. Por todo ello, es un órgano implicado en la vigilancia inmune y en la génesis de respuestas neuroendocrinas ante el medio ambiente luminal.

El intestino es una parte importante del sistema nervioso sensible a los antígenos externos y los nutrientes asimilados, permitiendo la adaptación del huésped.

Las vísceras que drenan vía portal (estómago, intestino, páncreas y bazo) son algunos de los tejidos metabólicamente más activos del cuerpo. Las cuatro colectivamente no suman más de un 6% del peso corporal total, pero son responsables de hasta un 50% del “turn-over” de algunos aminoácidos esenciales del cuerpo⁵⁶ y de entre un 10% y un 20% del gasto energético total corporal⁵⁷. En varios estudios se ha definido el concepto de tasa de síntesis proteica fraccional, comprobándose que es mayor en intestino (sobre todo a nivel duodenal) que en hígado o músculo⁵⁸.

Se ha demostrado en diversos estudios que la síntesis de albúmina aumenta tras una comida, incluso con una ingesta moderada de proteínas. La síntesis proteica en humanos es poco sensible a variaciones a corto plazo del estado nutricional. Con la alimentación, el catabolismo proteico de todo el organismo disminuye, mientras que la síntesis proteica aumenta levemente o casi nada. En el año 1998, en un estudio francés en seres humanos adultos sanos⁵⁹ se confirmó que el “turn-over” proteico en la mucosa duodenal era alto y que son los aminoácidos de dos orígenes los que contribuyen a la síntesis proteica durante la alimentación: los aminoácidos lumbales y los vasculares. También demostró que la síntesis proteica no era diferente durante la alimentación y durante el ayuno, al menos en esas condiciones experimentales.

El intestino se comporta como una barrera que impide la entrada en el organismo de la flora entérica y de sus toxinas. Durante diversas situaciones se puede alterar esa barrera (estados catabólicos, trauma, infecciones, medicamentos, ayuno prolongado, nutrición parenteral prolongada...) y puede ocurrir una translocación bacteriana, favoreciendo un estado hipercatabólico agudo que conduzca a un fallo multiorgánico.

La alimentación es la principal fuente de aminoácidos para la mucosa intestinal ya que el único aminoácido con elevada captación desde la sangre es la glutamina. Hay un gran catabolismo de aminoácidos en la mucosa intestinal, siendo muy importante este órgano en la homeostasis de muchos aminoácidos. Este metabolismo intestinal de aminoácidos juega un papel predominante en regular la integridad de la mucosa y su función por medio de tres mecanismos:

- La glutamina, el glutamato y el aspartato de la dieta, así como la glutamina arterial son los principales combustibles para el enterocito, que proveen la energía requerida para los procesos metabólicos ATP-dependientes.
- En segundo lugar, la ornitina es un precursor de la síntesis de poliaminas, que se convierte en esencial para la diferenciación y proliferación de las células epiteliales intestinales.
- Por último, la arginina es el precursor fisiológico del óxido nítrico (NO), que regula el flujo sanguíneo intestinal, la secreción y la migración celular epitelial.

Estos datos demuestran que los aminoácidos, más que la glucosa, son el principal combustible para la mucosa del intestino delgado. Se ha averiguado que la serina y la glicina pueden ser catabolizadas por la mucosa intestinal, mediante las rutas que involucran al glutatión y la síntesis de nucleótidos.

1.4.1. GLUTAMINA

Entre 1974 y 1980, Windmueller y Spaeth publicaron una serie de artículos claves en que probaron que los aminoácidos, especialmente los no esenciales, tienen un metabolismo importante en el intestino. Observaron que el intestino retira hasta un 25% de la glutamina sanguínea, evidenciando que dicho aminoácido es el precursor de una gran cantidad de rutas metabólicas, especialmente aquellas que llevan a la síntesis de ornitina, citrulina, prolina y arginina. Hay claras evidencias de que los enterocitos no sólo utilizan la glutamina extracelular sino que también la sintetizan ellas mismas.

La glutamina es el aminoácido libre más abundante en el torrente sanguíneo y en el músculo esquelético, siendo considerado un aminoácido no esencial, pero indispensable en ciertas situaciones de catabolismo (“condicionalmente indispensable”).

El metabolismo de la glutamina sigue dos rutas principalmente. En la primera, el grupo amida se utiliza para sintetizar purinas, pirimidinas y aminoazúcares, lo cual hace que se puedan hacer la glicosilación de la mucina, siendo por tanto la glutamina esencial para la actividad secretora y proliferativa. En la segunda ruta posible, la cadena carbonada y el grupo alfa-amino acaban produciendo otros aminoácidos, sobre todo prolina, ornitina y arginina.

La pirrolina-5-caboxilato sintasa (P5CS) es un enzima enterocitaria, sobre todo expresada en duodeno y yeyuno (en menor cantidad en íleon), que se encarga del paso de glutamato a ornitina, paso previo a la síntesis de la citrulina (figura 2).

Existe también formación de ornitina, citrulina y arginina por medio de una ruta alternativa en el enterocito, la prolina oxidasa, lo cual ha sido demostrado en cobayas, por lo que la citrulina no sólo deriva de la glutamina. La vía de la prolina oxidasa es la mayor fuente de citrulina circulante para la síntesis de arginina endógenamente. Este es un mecanismo vital en neonatos y de gran significación fisiopatológica ya que en la leche de muchos mamíferos, incluidos los humanos, la arginina es deficitaria y la prolina y la glutamina son abundantes. Por este motivo los neonatos con resecciones intestinales masivas o con deficiencias en la síntesis intestinal de citrulina tienen un estado de hipoargininemia e hipocitrulinemia.

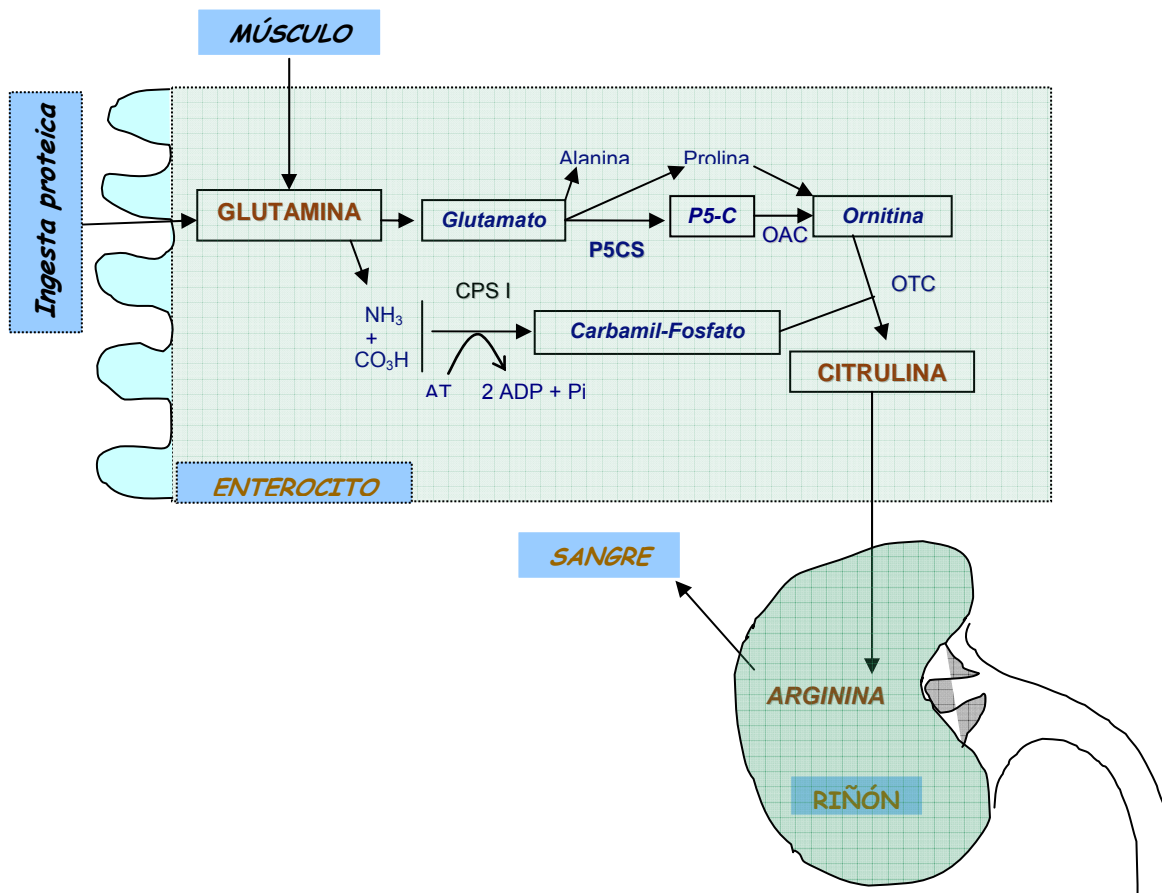


Figura 2. Síntesis endógena de aminoácidos en enterocito

Formación de citrulina desde glutamina y síntesis renal de arginina a partir de citrulina. Enzimas limitantes son pirrolina-5-carboxilato-sintasa (P5CS) y prolina oxidasa.

Se ha comprobado en diversos estudios⁶⁰ que el glutamato es tan efectivo como la glutamina para mantener la masa enterocitaria, demostrándose que las rutas metabólicas que emplean el esqueleto carbonado de la glutamina pueden hacerlo igualmente con el glutamato.

Se ha demostrado gran utilización de la glutamina arterial y la luminal en los enterocitos de ratones en estudios in vivo, objetivándose una extracción en cada paso a través de la circulación esplácica de un 25-33% del total de

glutamina corporal. La principal meta de la glutamina metabolizada en el intestino es la síntesis de purinas, pirimidinas y glutatión, produciéndose en este mecanismo amonio que se convierte posteriormente en urea y es eliminada por el riñón. La glutamina se ha demostrado que tiene efectos en estimular la proliferación celular (mediante estímulo de la fosforilación de ciertas protein kinasas) y en inhibir la apoptosis.

La mayoría del nitrógeno de la glutamina empleada en el intestino delgado se usa para producción de alanina, amonio y citrulina, sin ser incorporada directamente en las proteínas sintetizadas⁵⁸, sugiriendo estos hallazgos que los aminoácidos diferentes de la glutamina tienen un efecto mínimo en estimular la síntesis proteica en el intestino.

1.4.2. CITRULINA

La citrulina es un aminoácido no proteico, producido por la mucosa intestinal (duodeno-yeyuno) en los animales, a partir de la glutamina y aminoácidos derivados. La síntesis entérica de citrulina requiere ornitina y carbamil fosfato, que pueden ser aportados por la glutamina alimentaria. Entre los principales pasos para convertir la glutamina en citrulina en el enterocito podemos destacar la glutaminasa dependiente de fosfato, la P5-C sintasa, ornitina aminotransferasa y ornitina carbamiltransferasa, además de la carbamilfosfato sintetasa para la creación del carbamilfosfato a partir de amonio, HCO_3^- y ATP. La glutaminasa cataliza la conversión de glutamina en glutamato que, subsecuentemente, se convierte en el γ -glutámico semialdehído por la P5-C sintasa, siendo la actividad de esta última enzima la que limita la tasa de síntesis de citrulina.

Debido a esta formación a partir de la glutamina ingerida, es conveniente, para obtener una buena medida, determinar la citrulina tras una noche de ayuno o suspendiendo la nutrición parenteral (NP) al menos 8 horas.

En los mamíferos, la citrulina se utiliza para la síntesis de arginina en varios tipos de células, incluyendo los túbulos renales, las células endoteliales y los macrófagos. Como la arginina es el precursor del óxido nítrico, un pequeño radical libre con gran importancia y versatilidad fisiológicas, la síntesis de citrulina en el intestino juega un papel clave en la homeostasis del cuerpo.

El amonio, la citrulina, la alanina y la prolina que se producen en el intestino constituyen un 37'9%, 27'6%, 24'4% y 7'2%, respectivamente, del nitrógeno metabolizado de la glutamina⁶⁰.

1.4.3. ARGININA

En el ser humano adulto, un 38% de la arginina aportada por la dieta es extraída en el lecho esplácnico, sobre todo por el intestino delgado⁶¹, indicando que una gran cantidad de la arginina ingerida no está disponible para los tejidos extraintestinales y sólo un 0'34% de esa arginina se utiliza para la síntesis de óxido nítrico (16% de la producción diaria de NO). La L-arginina, producto intermedio del ciclo de la urea, tiene múltiples funciones a parte de contribuir a la síntesis de proteínas y óxido nítrico (figura 3). Tiene gran importancia en esferas como la sexual, la inflamación y las enfermedades infecciosas. Es el precursor de la creatinina, importante sustrato del metabolismo energético, y de poliaminas, que actúan como moléculas reguladoras del crecimiento y proliferación tisular. La arginina es sustrato para cuatro enzimas: óxido nítrico

sintasas (NOs), arginasa, arginina-glicina amidinotransferasa, arginino decarboxilasa⁶².

En experimentos con animales se ha comprobado que, en aquellas especies en que no se produce la citrulina a partir de la glutamina, al alimentarlas con dietas pobres en arginina aparecen numerosas anomalías metabólicas, incluso la muerte. También ocurre la síntesis de citrulina en el enterocito a partir de la arginina por medio de la óxido nítrico sintasa.

En algunos estudios⁶³ se ha comprobado que la pancreatitis aguda se puede desencadenar por el bloqueo del flujo de la secreción pancreática hacia el duodeno, que está regulada, entre otros mecanismos, por la relajación del esfínter de Oddi, en la que el óxido nítrico es un importante mediador. También se ha comprobado que los pacientes con pancreatitis aguda presentan disminución de la L-arginina y la L-citrulina plasmáticas, lo que se traduce en una producción disminuida de óxido nítrico, que podría originar obstrucción en el esfínter de Oddi.

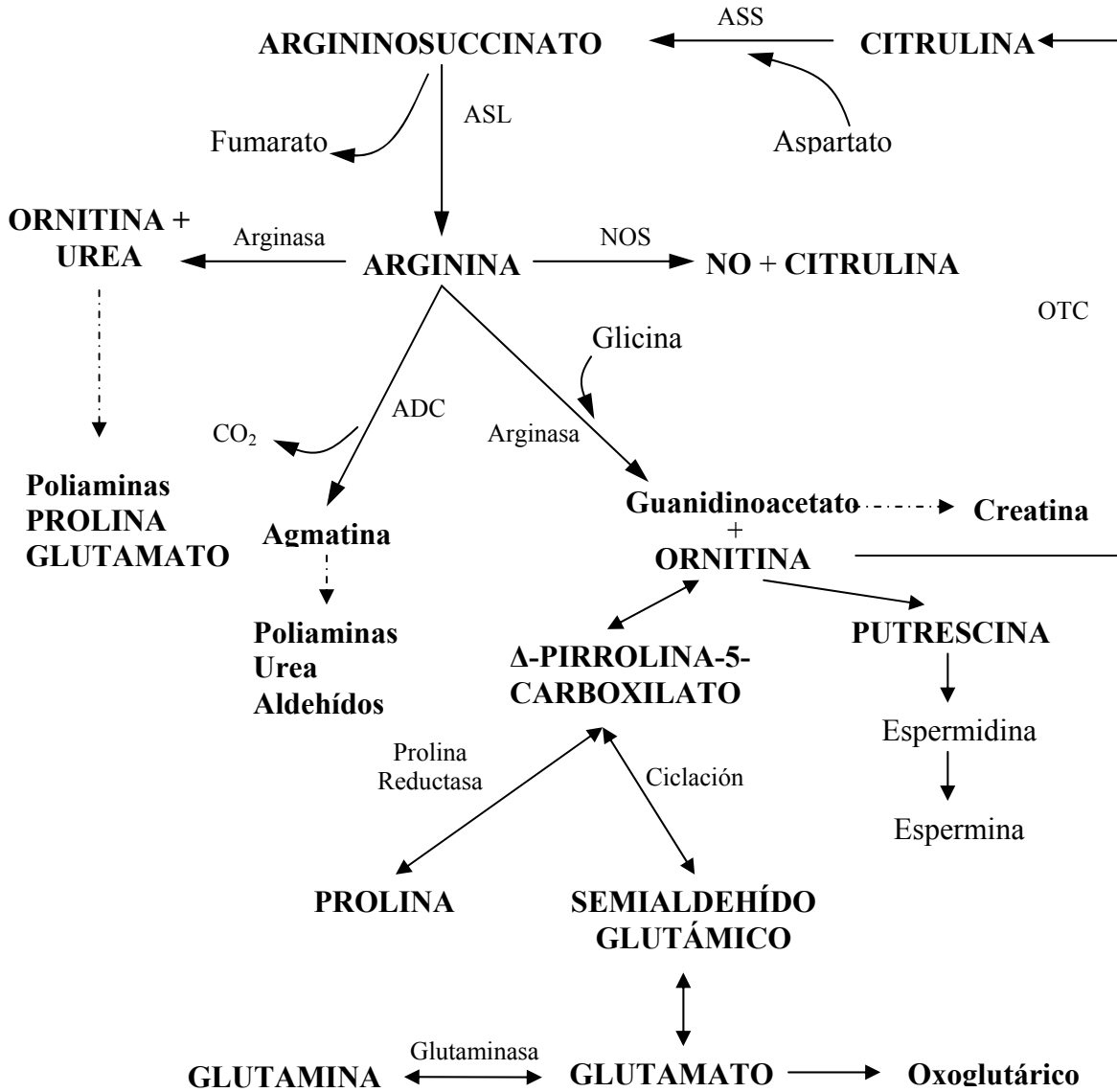


Figura 3. Metabolismo de la arginina

Estos datos sugieren que la arginina es un aminoácido condicionalmente indispensable en los pacientes críticos, sobre todo demostrado en las situaciones de sepsis, ya que sus necesidades varían con el estadio de la enfermedad y los cambios en el estado metabólico. La arginina se puede entender como un aminoácido esencial ya que los requerimientos fisiológicos varían respecto al estadio de desarrollo, aumentando en estados catabólicos como trauma o infección⁶⁴. En general, como ya se ha señalado previamente, en adultos sanos, la arginina se clasifica como un aminoácido no esencial y se sintetiza endógenamente mediante la colaboración entre las células epiteliales del intestino delgado y los túbulos proximales del riñón⁶⁵.

1.4.4. PROLINA

Parece que, tanto in vivo como in vitro, la prolina es más efectiva que la glutamina y el glutamato como sustrato para síntesis de arginina, ornitina y poliaminas. La prolina, es sintetizada por la mucosa intestinal a partir de la arginina, la glutamina, el glutamato y la ornitina de la dieta, así como de la glutamina arterial. Por estas reacciones implicadas en su metabolismo y, dada la gran superficie del intestino, éste juega un papel clave en el inicio de la degradación de la prolina⁶⁶, siendo este aminoácido esencial en casos de destrucción enterocitaria, por lo que se ha considerado a la prolina, junto con la leucina y la isoleucina, marcadores indirectos de aporte proteico exógeno.

En los enterocitos la arginasa tipo II se localiza tanto en citosol como en mitocondria y la ornitina derivada de la arginina se convierte en prolina,

principalmente por la ornitina aminotransferasa y la Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR).

Se ha comprobado la existencia de una marcada deficiencia en citrulina y arginina en niños con lactato elevado en plasma. También está bien documentada la coincidencia de hiperprolinemia con hiperlactacidemia en humanos⁶⁷, debido a que el lactato inhibe la actividad de la prolina oxidasa hepática, aunque el mecanismo de dicha coincidencia no se conoce bien. Se puede suponer que el lactato también inhibirá la prolina oxidasa enterocitaria, suprimiendo por ello el catabolismo de la prolina y la síntesis de citrulina y arginina a partir de aquélla en el intestino (figura 3).

1.4.5. OTROS AMINOÁCIDOS

En la mucosa intestinal existen transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada como por ejemplo la deshidrogenasa alfa-cetoácida de cadena ramificada. En el intestino del adulto humano un 20-30% de la leucina liberada en la luz intestinal tiene un primer paso en la circulación esplácnica.

La lisina, la metionina, la fenilalanina y la treonina son aminoácidos considerados como no metabolizados en mucosa intestinal.

1.4.6. METABOLISMO PROTEICO E INTESTINO

Estudios recientes se han centrado en el papel de las proteínas y los aminoácidos en la alimentación enteral y han descrito las consecuencias de su alteración en las rutas metabólicas de los tejidos espláncicos. En estudios in vitro en animales de experimentación, entre un 20% y un 96% de los aminoácidos administrados enteralmente se metabolizan en el intestino⁶⁸⁻⁷³.

En humanos a los que se administra una cantidad determinada de proteínas marcadas con N¹⁵, se comprueba que un 58% del nitrógeno dietario es extraído por la circulación sanguínea y un 39% se retiene en el lecho vascular esplácnico⁷⁴.

La contribución de la *microflora intestinal* al metabolismo de los aminoácidos es muy importante nutricionalmente, ya que los gérmenes utilizan parte de los aminoácidos para su propio crecimiento, lo cual representaría una pérdida de aportes para el huésped. Como la cantidad de microbiota es menor en los tractos superiores del tubo digestivo que en colon, se supone que el metabolismo bacteriano afecta poco a los aportes de aminoácidos dietarios al huésped, pues casi toda la absorción de estos es en tractos proximales.

Sin embargo, dos estudios recientes^{75,76} en cerdos indican que los aminoácidos esenciales se pueden sintetizar en la microflora intestinal y se absorben predominantemente en el intestino delgado, quedando así de manifiesto la importancia que tiene el metabolismo microbiano intestinal.

La glutamina y la arginina son de gran importancia en la nutrición enteral, debido al papel que juegan como llave metabólica y mitogénica para el epitelio intestinal y las células linfoides y a que permiten la síntesis de los nucleótidos y el glutathione^{77,78}. En las dos últimas décadas se han realizado múltiples ensayos clínicos en el campo de la inmunonutrición⁷⁹ para evaluar los efectos del suplemento nutricional con glutamina y arginina.

Muchos estudios clínicos han intentado comprobar la hipótesis de que la glutamina es el combustible preferido por el enterocito⁸⁰. La utilización de glutamina por el intestino requiere su transformación a glutamato, que en

humanos es mejor metabolizado que su predecesor. Más del 90% de la glutamina intestinal es catabolizada y es muy probable que casi todo el glutamato empleado por los enterocitos provenga de la luz intestinal.

La glutamina se considera un aminoácido condicionalmente esencial para el intestino, lo cual se ha apoyado en los efectos tróficos comprobados en experimentos con animales. Se ha evidenciado una remisión parcial de la atrofia intestinal inducida por la nutrición parenteral total, al administrar un 2% de glutamina a ratas trasplantadas y una remisión completa con un 1% en cerdos. Existen numerosos estudios con pacientes en unidades de cuidados intensivos y sometidos a dietas inmunosuplementadas. En alguno de los más recientes⁸¹ se establece el nexo entre glutamina enteral y función inmunitaria en enfermos críticos, encontrando una reducción de la incidencia de infecciones nosocomiales de un 33% en el grupo control a un 14% en el grupo tratado.

El glutamato, el aspartato, la arginina y la glutamina pueden llegar a representar un tercio e incluso la mitad del contenido aminoacídico de los alimentos y, además, son los aminoácidos más rápidamente aclarados desde el plasma tras su administración intravenosa. Junto con alfa-cetoglutarato, ornitina, asparragina y oxalato, todos se pueden nombrar como homólogos y derivados de la glutamina, ya que químicamente comparten los mismos esqueletos carbonados C4 y C5. Son bioquímicamente intercambiables y sus síntesis a partir de otros sustratos está muy limitada y precisa mucha energía.

Por ello, en los estados postquirúrgicos, la proteólisis muscular se convierte en la principal fuente de estos homólogos de glutamina y juegan un

papel clave en los procesos que precisan de una rápida división celular, curación de heridas, mantenimiento de integridad intestinal, respuesta inmune y crecimiento en la infancia.

1.5. CITRULINA Y ATROFIA VELLOSIARIA. FUNDAMENTOS CIENTÍFICOS Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Se considera fallo intestinal “la reducción de la masa intestinal funcional por debajo de la mínima cantidad necesaria para absorber nutrientes”. Para su definición debemos basarnos en los *tests de absorción* (molestos, por ser un registro completo de ingesta dietética y deposiciones durante 3 días). El fallo intestinal se puede clasificar en *transitorio* o *permanente*, según la masa intestinal restante, la duración de la nutrición parenteral (NP) necesaria y circuito digestivo resultante^{82,83}. Estos términos pueden definirse de la manera siguiente:

- Fracaso intestinal transitorio. Aquél en el que se logra suprimir la NP antes de dos años de evolución y se suministra toda la nutrición por boca (ganancia de peso).
- Fracaso intestinal permanente. Aquél en que no se logra eliminar la NP o permanece la malnutrición tras un año de supresión de aquélla.

En el fallo crónico existen dos posibilidades terapéuticas: trasplante intestinal o NP domiciliaria (3'5/10⁶ habitantes en Francia). Los requerimientos de la NP permiten evaluar la transitoriedad o permanencia del fallo intestinal. Un fallo permanente se presenta con un coeficiente de absorción neto de grasas y proteínas disminuido. La causa más frecuente de fallo intestinal

crónico en adultos y una de las más importantes en niños es el síndrome de intestino corto (longitud restante final < 15-20 cm)⁸³. El tratamiento más adecuado del intestino corto con fallo intestinal es la NP.

La valoración de la función absortiva en el intestino corto se realiza por medio de varios métodos:

1. *Medición del remanente* de intestino delgado postduodenal:

a. Visión directa por cirujano.

b. Examen baritado.

2. *Absorción neta de grasa y proteínas en un período de 3 días*: Se mide como porcentaje de grasa y proteínas no recuperado en las heces.

Para ello se necesita medir:

a. Ingesta alimentaria.

b. Excreción en heces de 3 días:

– Van der Kamer (grasas) y creatorrea por quimioiluminiscencia.

– Contenido de grasas en heces de 24h, medido por infrarrojo cercano (FENIR 24h).

3. *Grado de fracaso intestinal*. Está representado por “el porcentaje del gasto energético que es aportado por la nutrición parenteral”.

Entre las causas de atrofia vellositaria destacan celiaquía, infecciones, síndrome de inmunodeficiencia (primaria o secundaria), enfermedad injerto contra huésped, linfoma T de intestino delgado, y otras. La Enfermedad Celíaca (EC) es, en los países occidentales, la causa principal de atrofia vellositaria

total o subtotal. Su clínica y su bioquímica se relacionan más con la cantidad total de intestino alterado que con la gravedad de las lesiones proximales aisladas. Mediante el *test* de Schilling para la B12 se puede diferenciar la afectación proximal de la distal.

La citrulina plasmática normal en adultos se sitúa entre 20 y 50 $\mu\text{mol/l}$, sin ser muy claros los límites en la infancia.

En experimentos con ratas, la citrulina evalúa el funcionamiento absortivo del intestino delgado (grado de fracaso intestinal), así como la longitud funcional del mismo, al ser sintetizada en el enterocito. La ingesta proteica habitual proporciona 5'2-8'1 g de glutamina por cada 100g de proteínas y no tiene efecto en los niveles de citrulina plasmática. Tras un ayuno de más de 5 días, aparece un descenso de la citrulinemia de menos de un 30%. Un fallo renal origina una hipercitrulinemia (si el aclaramiento de creatinina (CrCl) es menor de 50 ml/min), lo que no ocurre en el fallo de otros órganos. Si se mide la citrulinemia tras una comida o durante la administración de nutrición enteral durante 12 horas, se obtienen resultados algo disminuidos respecto a los obtenidos en condiciones basales normales.

En algunos estudios se ha comprobado que la cifra de citrulina es similar en pacientes afectos de anorexia nerviosa que en personas sanas, por lo que la escasa ingesta y la malnutrición secundaria a la misma no expresarían una reducción de la masa enterocitaria. La citrulina y la arginina, por tanto, se convierten en aminoácidos esenciales en el fallo intestinal permanente (por ejemplo, por resección extensa).

En el año 2000, Crenn²⁵ publicó un artículo, que evaluaba a 57 pacientes adultos afectados de intestino corto y correlacionaba su situación clínica con los niveles de citrulina plasmática. Encontró los resultados siguientes:

- En 15 pacientes (12 de ellos con fallo intestinal transitorio) con 100 cm o más de intestino restante, la cifra media de citrulina fue de 34 $\mu\text{mol/l}$.
- En 42 pacientes (33 de ellos con fallo permanente) con menos de 100 cm restantes, la citrulina media fue de 15 $\mu\text{mol/l}$.

Sus principales conclusiones fueron:

1. La citrulina:

- a. Es significativamente menor en el fallo intestinal permanente que en el transitorio (92% de sensibilidad y 90% de especificidad, con 95% valor predictivo positivo y 86% de valor predictivo negativo), con cifra límite significativa de 20 $\mu\text{mol/l}$.
- b. Se correlaciona inversamente con la cantidad de aportes IV.
- c. Se correlaciona directamente con la cantidad de resección en el intestino corto.

2. La arginina desciende en el síndrome de intestino corto.

La cifra de citrulina que permitía diferenciar entre fallo transitorio y permanente, con significación estadística, era **20 $\mu\text{mol/l}$** . La glutamina, sin embargo, no diferenciaba entre ambos tipos de fallo (figura 4).

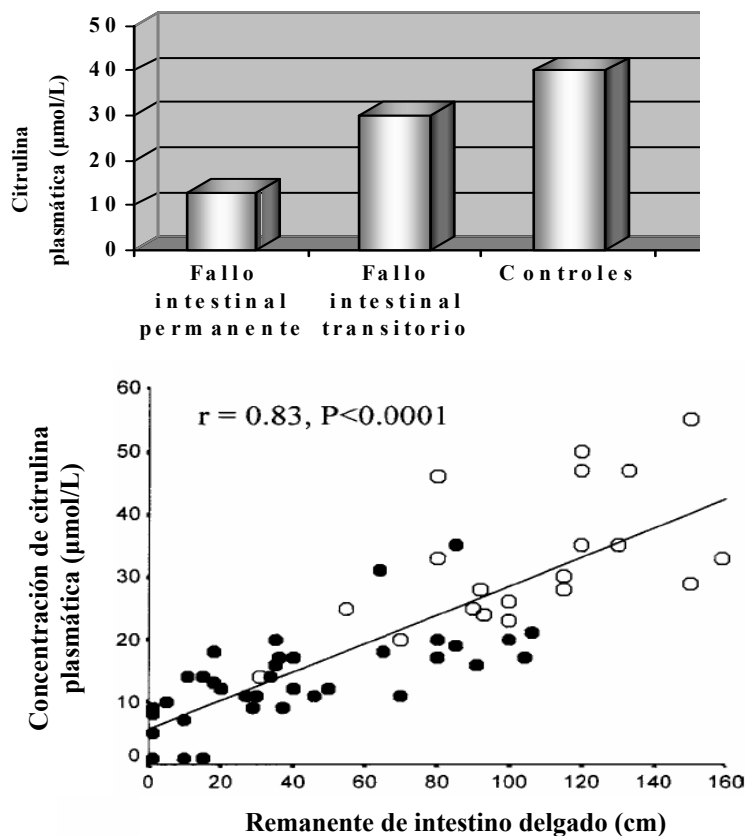
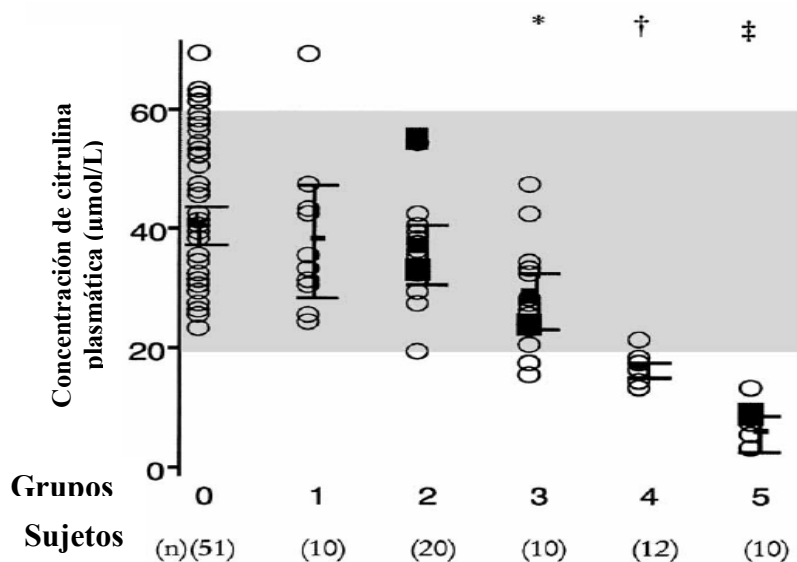


Figura 4. Correlación entre citrulina y fallo transitorio y permanente en adultos (tomado de Crenn et al²⁵)



O: Controles sanos; 1: anorexia nerviosa con malnutrición; 2: Enteropatías con arquitectura vellositaria normal; 3: Lesiones mucosas proximales no destructivas; 4: Lesiones mucosas proximales destructivas; 5: Lesiones mucosas destructivas difusas

Figura 5. Correlación entre citrulinemia y lesión enterocitaria en adultos (tomado de Crenn et al²⁷)

En el año 2003, Crenn publicó un nuevo artículo²⁷ referente a la citrulina como marcador de masa enterocitaria (figura 5). En este estudio se midieron IMC, analítica (albúmina, CrCl, magnesio, calcio, colesterol) y anticuerpos antigluten, en pacientes adultos, incluyendo algunos niños grandes, con afección de intestino corto. Sus conclusiones fueron las siguientes:

1. La atrofia vellositaria produce descenso de citrulina pero no de glutamina y arginina.
2. La citrulinemia se correlaciona directamente con la albuminemia, la calcemia y la Hb, pero no con los demás datos analíticos ni con el IMC.
3. En los celíacos, la citrulina aumenta una vez que toman dieta sin gluten, tras un año.
4. La citrulina aumenta cuando los anticuerpos antigluten se negativizan.

En otros trabajos recientes^{84,85} se afirma que hasta hoy en día la biopsia ha sido la única forma de confirmar un rechazo de un órgano trasplantado y se propone la citrulina como marcador precoz del rechazo intestinal. En el primero de estos estudios, extendido a 10 adultos y 14 niños, tras trasplante intestinal, se midió la citrulina plasmática a los 30, 60, 90 y 365 días del trasplante. Se encontró ascenso de la citrulinemia en los primeros 120 días tras el trasplante. Después del primer año se mantuvieron estables en condiciones adecuadas.

En una superficie intestinal de $\leq 1\text{m}^2$ hay menos citrulina. El cambio la cifra de citrulina en relación con la superficie corporal y el tiempo tras el trasplante puede ser un indicador para hacer biopsia que valore rechazo del intestino. Pappas et al⁸⁵ demostraron que existe una correlación inversamente

proporcional entre citrulina plasmática y grado histológico de rechazo del intestino transplantado.

La irradiación abdominal se puede emplear en múltiples patologías y puede dañar el tejido intestinal con pérdida de masa enterocitaria y de función absorptiva⁸⁶. En ratones, se puede cuantificar la cantidad de pérdida enterocitaria a través de los niveles de citrulina, ocurriendo el mayor descenso de citrulinemia entre 3 y 4 días después de la irradiación.

En el 2005, Rhoads, Plunkett y Galanko⁸⁷ comprobaron en un estudio realizado en lactantes con síndrome de intestino corto por resección quirúrgica, que la longitud del intestino delgado se podía considerar el mejor predictor de independencia de nutrición parenteral en pacientes operados de resección intestinal. Los niños mostraron mayor adaptabilidad intestinal que los adultos. Estos autores comprobaron que los niveles séricos de citrulina no estaban influidos por el IMC o el aclaramiento de creatinina y que una cifra de citrulina igual o superior a 19 $\mu\text{mol/l}$ tenía un 93% de sensibilidad para predecir la independencia de la nutrición parenteral.

Se ha comprobado un aumento en los niveles séricos de aminoácidos como GLU, GLY, LEU, LYS, ORN, PHE, PRO, SER, ARG, TAU y TRE, en pacientes con resección intestinal, lo cual podría corresponder con una menor degradación intestinal.

En otro estudio⁸⁸ se ha demostrado que la adición de glutamina a la nutrición parenteral aumenta la altura vellositaria y la profundidad de las criptas en intestino, mejorando por tanto la citrulina plasmática de forma secundaria.

En 2005, se ha comprobado que la validez del método no invasivo de análisis de la citrulina en una muestra de gota de sangre seca es comparable con la determinación de la citrulinemia en muestra de plasma convencional⁸⁹.

Los trabajos más recientes sobre la citrulina plasmática en enfermedades intestinales siguen centrándose en su relación con la longitud del intestino delgado remanente, tanto en el síndrome de intestino corto como en el rechazo de trasplantes intestinales. Jianfeng et al⁹⁰ comprueban el descenso de la citrulina en los casos de menor cantidad de masa intestinal residual y destacan su correlación con la mejoría intestinal tras terapias coadyuvantes, señalando una recuperación de cierta cantidad de masa intestinal.

David et al⁹¹ demostraron que el rechazo leve en trasplantes intestinales reduce la citrulina frente al período libre de rechazo, aunque sin significación estadística, mientras que, en el rechazo grave o moderado, tiene lugar un mayor descenso de la citrulinemia, estadísticamente significativo, en comparación con las cifras de citrulina durante la fase libre. En la presente investigación, se ha utilizado como cifra de corte para la citrulinemia 18 $\mu\text{mol/l}$, aceptando las cifras inferiores como índice de algún grado de rechazo.

2. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta el estudio bibliográfico y las consideraciones efectuadas en los apartados anteriores, en el presente estudio se han tomado como punto de partida las hipótesis que se detallan a continuación.

1. El descenso de las cifras de citrulina y arginina plasmáticas está correlacionado con la lesión/atrofia enterocitaria en la celiaquía y con la recuperación después de una dieta sin gluten.
2. La citrulinemia y argininemia son menores en los celíacos que toman gluten que en los que siguen dieta exenta del mismo y, a su vez, en éstos son menores que en pacientes no celíacos.
3. Existe una correlación de la citrulina plasmática con los anticuerpos antigluten y otros marcadores de disminución de función absortiva intestinal en enfermedad celíaca (esteatorrea, ferropenia).
4. En los pacientes celíacos, la dieta sin gluten produce normalización de las cifras de citrulina y arginina plasmática.
5. En la enfermedad de Crohn, el descenso de las cifras de citrulina y arginina plasmáticas está correlacionado con la lesión enterocitaria.
6. La citrulinemia y argininemia son menores en los pacientes afectados de enfermedad de Crohn con afectación de intestino delgado que en los que presentan Crohn de colon exclusivo o colitis ulcerosa.

7. Existe una correlación entre la citrulina plasmática y los marcadores sistémicos y fecales de inflamación intestinal (esteatorrea, ferropenia, VSG, PCR, leucocitosis, calprotectina fecal, α 1-antitripsina fecal...).

3. OBJETIVOS

En consecuencia con lo anterior, los objetivos propuestos para la presente investigación fueron los siguientes.

1. Determinar la citrulinemia y argininemia en los pacientes celíacos con atrofia intestinal, previa a la retirada del gluten y tras la misma, así como en niños sanos no afectados de enfermedad intestinal.
2. Correlacionar la cifra de citrulina y arginina plasmáticas con el grado de atrofia intestinal y el infiltrado leucocitario submucoso, objetivados en la biopsia intestinal.
3. Correlacionar la citrulinemia y argininemia con los marcadores serológicos de enfermedad celíaca y la esteatorrea.
4. Determinar el valor predictivo de la citrulina y arginina como indicador del daño enterocitario.
5. Determinar la citrulinemia y argininemia en los pacientes afectados de enfermedad de Crohn con afectación de intestino delgado, en pacientes que presentan Crohn de colon exclusivo o colitis ulcerosa y en niños sanos no afectados de enfermedad intestinal.
6. Correlacionar la cifra de citrulina y arginina plasmáticas con el grado de lesión intestinal, objetivada en la biopsia intestinal.
7. Correlacionar la citrulinemia y argininemia con los marcadores de inflamación intestinal.
8. Valorar si la isoleucina, como marcador de aporte exógeno, cambia en la atrofia intestinal, al ser sintetizada en parte en la microflora intestinal.

4. METODOLOGÍA

4.1. DISEÑO

Estudio longitudinal prospectivo de seguimiento clínico.

4.2. SUJETOS DEL ESTUDIO

Niños con edades entre 10 meses y 14 años con síndrome malabsortivo, probablemente inducido por el gluten, previo a biopsia intestinal y con resultado de atrofia intestinal. Como controles sanos se incorporaron al estudio enfermos celíacos siguiendo dieta sin gluten y pacientes no celíacos y no afectados de ninguna enfermedad orgánica digestiva, que no han sido biopsiados.

Niños entre 2 y 14 años con enfermedad inflamatoria intestinal seguidos prospectivamente desde el momento de diagnóstico de dicha patología y con datos orientadores de patología intestinal. Como controles sanos se incorporaron al estudio pacientes no afectados de ninguna enfermedad orgánica digestiva (no se cuenta entre ellos a los celíacos sin gluten).

4.3. RECLUTAMIENTO DE PACIENTES Y ASPECTOS ÉTICOS

Los pacientes se reclutaron en la consulta de Gastroenterología y Nutrición Infantil del Hospital Materno Infantil Carlos Haya de Málaga. La participación en el proyecto era voluntaria y la solicitud de participación se realizaba como una propuesta de investigación de salud, independiente del proceso asistencial convencional del sistema sanitario. A los padres o tutores legales, se les informaba de la naturaleza de la investigación y del uso que se iba a hacer de la información que se obtuviera. El proyecto ha sido evaluado y aprobado por el comité de Ética y de Investigación del Hospital Universitario “Carlos Haya”.

Para garantizar la confidencialidad de la información todos los datos recogidos en este proyecto son registrados de forma anónima, siguiendo estrictamente las leyes y normas de protección de datos en vigor (Ley 41/2002 de 14 de noviembre; Ley 15/1999 de 15 de diciembre). Con el fin de proteger la confidencialidad de la información personal de los participantes se han tomado las siguientes medidas:

- Todos los datos que puedan identificar al participante se mantienen separados del resto de la información recogida en los diferentes cuestionarios del estudio, así como de la historia clínica.

- Cada caso del estudio cuenta con un número de identificación que es el que figura en las bases de datos.
- El análisis de la información se realiza siempre de forma agregada y nunca individual.
- Todos los investigadores implicados en el proyecto se comprometen a cumplir las normas necesarias para preservar la confidencialidad de la información facilitada por los participantes.
- Los datos personales se han desvinculado permanentemente de los datos clínicos, con el fin de proteger la identidad de los participantes.
- Todas las bases de datos del proyecto están protegidas mediante códigos electrónicos que limitan el acceso exclusivamente a los investigadores del proyecto.

4.4. VARIABLES E INDICADORES

4.4.1. ENFERMEDAD CELÍACA

- **Demográficas:** sexo, edad.
- **Familiares:** antecedentes familiares de enfermedad intestinal.
- **Clínicas:** Peso, Talla, Índice de masa corporal (IMC).
- **Sangre** (ayunas de, al menos, 10 horas): Aminoácidos (especial interés en glutamina, citrulina, arginina e isoleucina) expresados en micromoles por litro ($\mu\text{mol/l}$), hemograma, hierro, ferritina, creatinina, albúmina, anticuerpos antigluten.
- **Heces** de 24 h: grasas y creatorrea mediante FENIR 24h.
- **Estudio histológico** de las muestras de mucosa intestinal por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital, asignando a cada muestra una puntuación de acuerdo con la clasificación de Marsh modificada, agrupando finalmente los casos en atrofia leve (Marsh 1, 2 y 3a) o atrofia grave (Marsh 3b y 3c).

4.4.2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Dadas las características clínicas, analíticas e histológicas de la enfermedad inflamatoria estudiada, cada caso se clasificó según los parámetros que se indican a continuación.

1. **Tipo de enfermedad inflamatoria intestinal**

- Enfermedad de Crohn:
 - ▷ afectación exclusiva colónica.
 - ▷ afectación de intestino delgado con o sin afectación colónica.
- Colitis ulcerosa.

2. **Localización de la enfermedad**

- Afectación de intestino delgado con especial referencia a presencia de ileítis terminal.
- Ileocolitis.
- Colitis.

3. **Actividad de la enfermedad**

- Quiescente.
- Leve.
- Moderada.
- Severa.

Las variables recogidas en los casos de EII son las siguientes:

- **Demográficas**: sexo, edad.
- **Familiares**: antecedentes familiares de enfermedad intestinal.
- **Clínicas**: Peso, talla, índice de masa corporal.
- **Sangre** (ayunas de al menos 8 horas previas):

- ▷ Aminoácidos (glutamina, citrulina, arginina).
- ▷ Hemograma (leucocitos, hemoglobina, plaquetas).
- ▷ VSG, PCR.
- ▷ Albúmina.
- ▷ Ferritina.

– **Heces:**

- ▷ Calprotectina.
- ▷ FENIR en heces de 24 horas: medida de grasa y nitrógeno.

– **Exploraciones complementarias:**

- ▷ Tránsito esófago-gastro-intestinal.
- ▷ Enema opaco.
- ▷ Endoscopia digestiva.
- ▷ Examen histológico.
- ▷ En casos dudosos, gammagrafía con leucocitos marcados.

– **Estudio histológico** de las muestras de mucosa intestinal por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital.

El Laboratorio del Complejo Hospitalario Carlos Haya de Málaga permite la determinación plasmática cuantitativa de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico (*Beckmann 6300 Amino Acid Analyzer, Beckman-Coulter,*

Fullerton, con un volumen de muestra de 50 μ L), así como el resto de las exploraciones enumeradas previamente. El resto de variables se determinan íntegramente en nuestro centro.

Para evitar factores de confusión no relacionados con el daño intestinal, como por ejemplo la posibilidad de que la alimentación reciente aumentara la citrulinemia, la sangre se extrajo siempre tras un ayuno de, al menos, 10 horas.

Las muestras sanguíneas se recogieron, en todos los casos, bajo condiciones de estabilidad clínica sin evidencia clínica de deshidratación o trastorno electrolítico.

La citrulina se recogió tras ayuno de toda una noche, con un mínimo de 10 horas, tanto en los sujetos sanos como en los casos

4.5. PROCEDIMIENTO EN EL ESTUDIO DE CELÍACOS – CONTROLES

En un anexo, al final de la presente Memoria, se ha incluido un diagrama de bloques explicativo del procedimiento seguido para el estudio de los pacientes celíacos y el correspondiente grupo de control. A continuación, se describen las etapas principales de este procedimiento.

4.5.1. RECLUTAMIENTO

- ***Criterios de inclusión:***

- Pacientes menores de 14 años no afectados de enfermedad digestiva de ninguna clase.
- Pacientes menores de 14 años diagnosticados de enfermedad celíaca, siguiendo dieta libre de gluten, con buena situación clínica y marcadores serológicos negativos.
- Pacientes menores de 14 años estudiados en nuestra consulta por presentar datos clínicos o analíticos de sospecha de síndrome malabsortivo y probable relación con el gluten (signos o síntomas de malabsorción intestinal, anticuerpos antigluten elevados, ferropenia rebelde a tratamiento medicamentoso, ser familiar en primer grado de enfermo celíaco) y que estén ingiriendo gluten libremente, bien

antes de la primera biopsia o bien en provocación previa a tercera biopsia.

● **Crterios de exclusión:**

- Tener más de 14 años; tener coagulopatía o enfermedad con riesgo potencial de sangrado intestinal; negativa de los padres a la inclusión; haber padecido gastroenteropatía en las 3 semanas previas.

4.5.2. TOMA DE MUESTRAS Y DATOS CLÍNICOS (véase ANEXO)

- Celíacos de nuevo diagnóstico:
 - Fase inicial, previa a retirada de gluten.
 - Evaluaciones tras 6 y 12 meses de dieta sin gluten o negativización de anticuerpos antigluten.
- Celíacos ya diagnosticados previamente y que están siguiendo dieta sin gluten, sin síntomas y con marcadores serológicos negativos.
- Celíacos a los que se realiza provocación. Evaluaciones previa y posterior a inicio de dieta con gluten.

4.5.3. EVALUACIONES POSTERIORES

En todos los casos incluidos se realizó una evaluación clínico-analítica cada seis meses de seguimiento durante el primer año, para valorar la adherencia al tratamiento, la desaparición de los autoanticuerpos y la calidad de vida.

4.6. PROCEDIMIENTO EN EL ESTUDIO DE EII-CONTROLES

- **Criterios de inclusión:**

- Grupo A (enfermedad de Crohn con afectación significativa de intestino delgado).
- Grupo B (colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn de afectación exclusiva de intestino grueso).
- Grupo C: casos de enfermedad inflamatoria intestinal agrupados (grupo A + grupo B).
- *GRUPO D* (grupo control): Niños sanos, sin ninguna patología digestiva actual o pasada conocida.

- **Criterios de exclusión:**

- Tener más de 14 años, tener coagulopatía o enfermedad con riesgo potencial de sangrado intestinal, negativa de los padres a la inclusión, haber padecido gastroenteropatía en las 3 semanas previas.

4.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo de las variables, con estimación puntual e intervalo de confianza para el 95% de seguridad. Las variables continuas se trataron como medias más desviación estándar. Las variables categóricas se presentan en frecuencias y porcentajes. El análisis bivariado intermedio de la distribución de personas según variables de interés se realizó mediante la prueba de t de Student.

Finalmente, se efectuó un análisis multivariante con regresiones logísticas para identificar variables predictoras de las variables dependientes de interés, controlando por factores de confusión e interacciones. Se realizó un estudio de sensibilidad y especificidad de la citrulina y arginina como predictores del daño enterocitario.

Se han propuesto puntos de corte de citrulinemia y argininemia que resultaran predictivos de pérdida de masa enterocitaria. Se correlacionó cada variable clínica y analítica con las cifras de citrulina y arginina, con especial hincapié en el IMC, la evaluación nutricional y la esteatorrea como marcador de mala función absorptiva enterocitaria.

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS CELÍACOS

De los 104 pacientes que inicialmente cumplían los criterios de selección, 7 se excluyeron del seguimiento por diferentes motivos (1 por diagnosticarse de gastroenteritis enteroinvasiva durante el proceso de estudio y 6 por fallo en la extracción de las muestras sanguíneas iniciales), quedando para el análisis final 97 pacientes. La distribución en grupos es la siguiente (figuras 6 y 7):

- *GRUPO CONTROL* (*grupo C = A+B*): 51 pacientes:
 - ▷ *Grupo A*. NO celíacos : 42 pacientes.
 - ▷ *Grupo B*. Celíacos sin gluten: 9 pacientes.
- *CASOS*. *Grupo F = D+E*. Celíacos al diagnóstico, con BIP patológica: 46 pacientes.
 - ▷ *Grupo D*. Atrofia leve (Marsh 1, 2, 3a) de vellosidades: 28 pacientes.
 - ▷ *Grupo E*. Atrofia grave (Marsh 3b y 3c) de vellosidades: 18 pacientes.

En la tabla 3 se muestran el índice de masa corporal, la determinación de grasa en heces de 24h (FENIR 24h) y los aminoácidos plasmáticos estudiados, reflejando la media y la desviación típica.

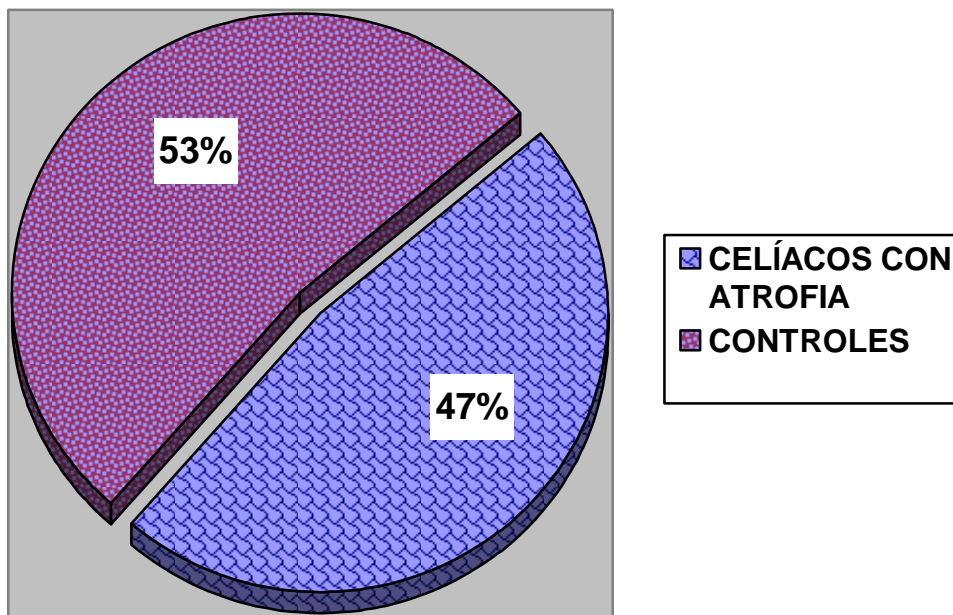
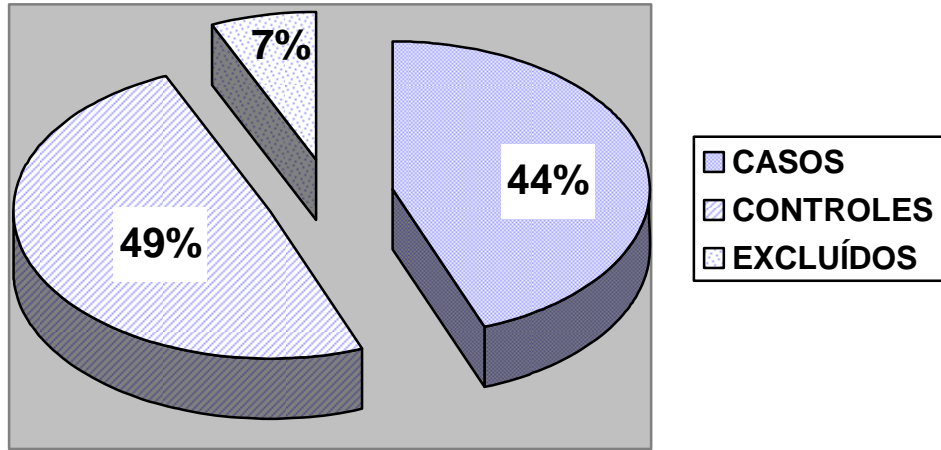


Figura 6. Distribución porcentual de los grupos estudiados

5. Resultados

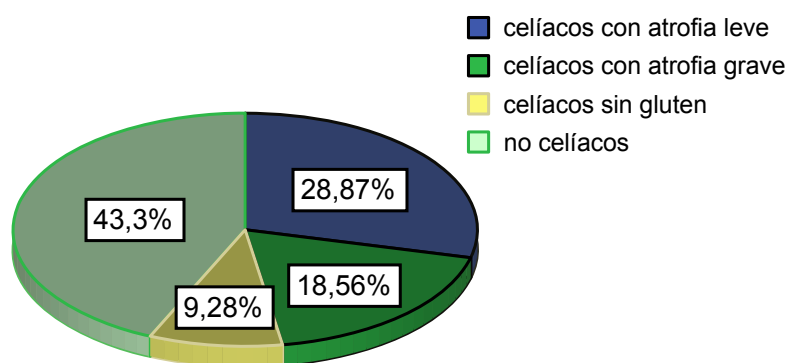
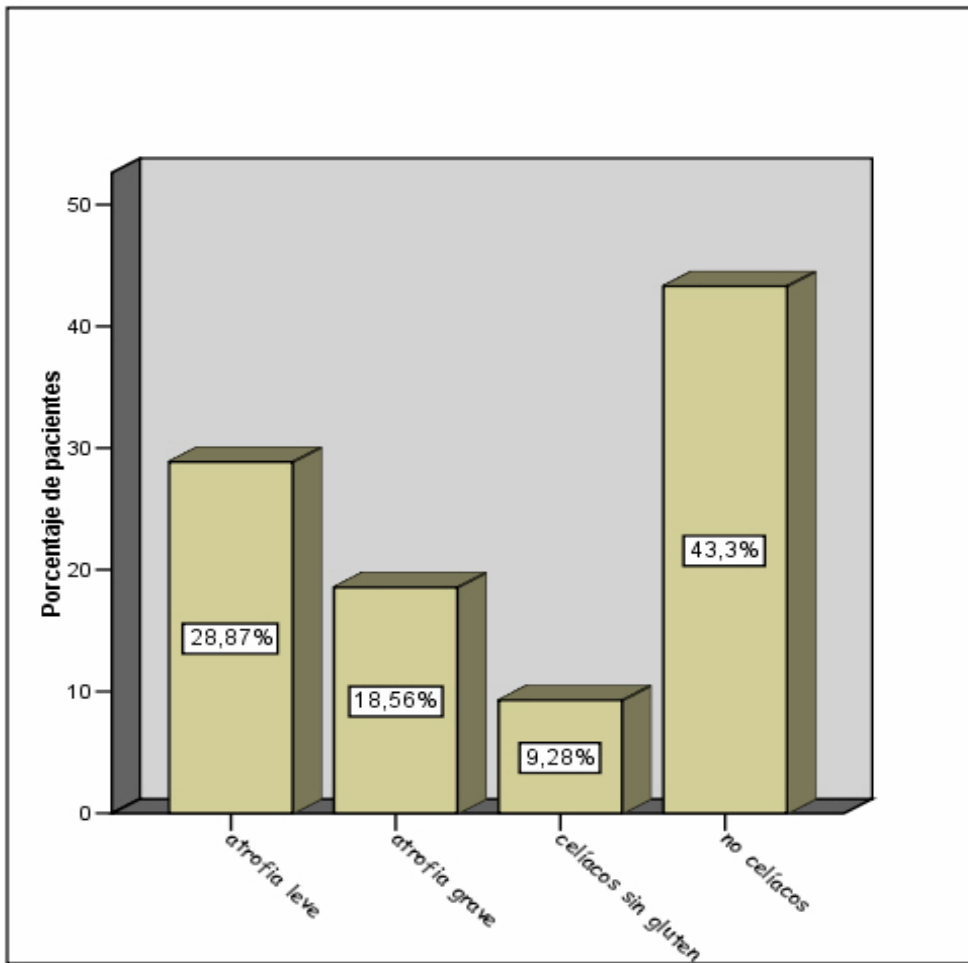


Figura 7. Distribución porcentual según grupos concretos de patología

Tabla 3. Frecuencias descriptivas de las variables numéricas estudiadas (media \pm DE)

Grupos: (A) Controles sanos sin biopsia intestinal, (B) Celíacos sin gluten (biopsia normal), (C) A+B,

(D) Atrofia vellositaria parcial, (E) Atrofia vellositaria severa, (F) D+E.

Grupo	Número de pacientes	IMC (Kg/m ²)	Creatinina (mg/dl)	Grasa fecal (g/24h)	Citrulina (μmol/l)	Glutamina (μmol/l)	Arginina (μmol/l)	Isoleucina (μmol/l)
A	42	16.5 \pm 2.6	0.37 \pm 0.15	2.1 \pm 1.4	28.9 \pm 11.6	565.0 \pm 150.0	57.3 \pm 26.4	59.3 \pm 19.8
B	9	16.4 \pm 1.0	0.43 \pm 0.15	2.5 \pm 0.5	29.0 \pm 12.7	548.1 \pm 112.8	47.1 \pm 16.7	44.5 \pm 16.8
C	51	16.5 \pm 2.4	0.38 \pm 0.15	2.2 \pm 1.3	28.9 \pm 11.8	563.7 \pm 144.2	56.2 \pm 24.9	56.7 \pm 20.1
D	28	16.1 \pm 2.0	0.35 \pm 0.16	3.9 \pm 2.1	19.7 \pm 10.7	480.4 \pm 111.2	38.6 \pm 16.2	45.2 \pm 16.0
E	18	15.8 \pm 1.8	0.32 \pm 0.12	4.2 \pm 2.2	13.8 \pm 4.8	478.5 \pm 189.3	39.8 \pm 22.3	57.2 \pm 21.5
F	46	15.9 \pm 1.9	0.34 \pm 0.14	4.0 \pm 2.3	17.7 \pm 9.4	479.6 \pm 143.2	38.7 \pm 18.6	50.1 \pm 18.9
<i>p</i> (C, F)		n.s.	n.s.	0.002	0.0001	0.005	0.0001	n.s.
<i>p</i> (D,E)		n.s.	n.s.	n.s.	< 0.05	n.s.	n.s.	n.s.

No existe diferencia en cuanto al **sexo** entre los casos y los controles, encontrándose porcentajes similares de varones (48'5%) y mujeres (51'5%) (figura 8).

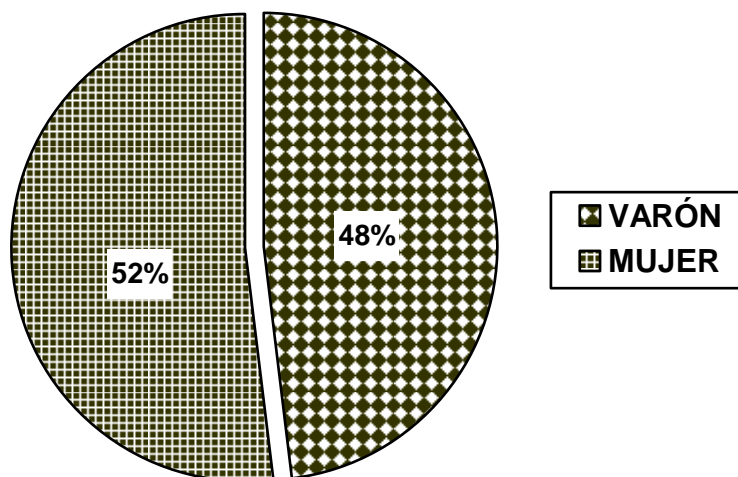


Figura 8. Sexo de forma global

En cuanto a la **edad** (media de 3'3 años en los casos y de 4'9 años en los controles), se puede aceptar que los grupos estudiados son similares, pues no existe diferencia significativa en este parámetro. Existe un 20% de casos menores de 2 años, un 60% tiene entre 2 y 5 años y cerca de un 20% tiene más de 5 años (figuras 9 y 10).

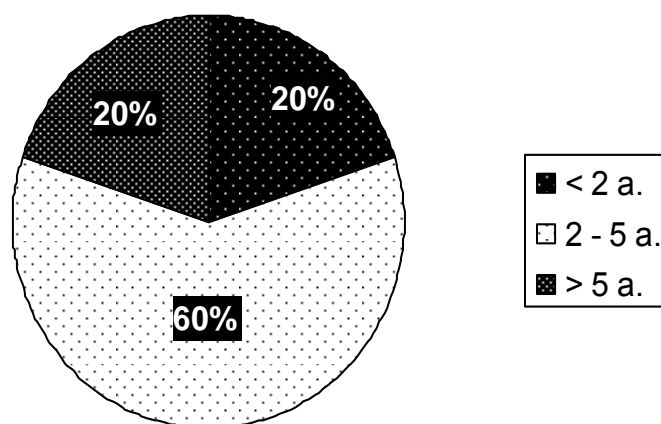


Figura 9. Edad de forma global

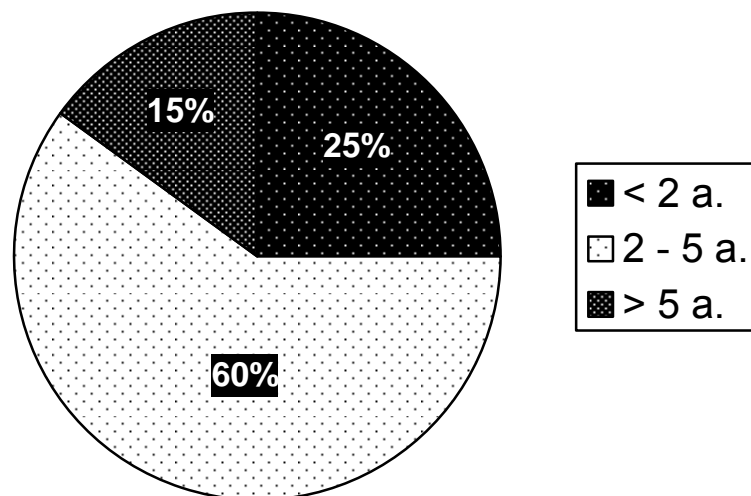


Figura 10. Edades de enfermos celíacos

En el **índice de masa corporal** (IMC) no se ha hallado diferencia significativa entre los diferentes grupos; todos los pacientes celíacos estudiados presentan valores de IMC normales, aunque en percentil 25 (media de 15'9 kg/m²) y los controles seguidos poseen valores similares a aquéllos (media de 16'5 kg/m²).

La **albúmina** se ve afectada en pocos casos de enfermos celíacos seguidos (figura 11). La **grasa en heces de 24h** en pacientes celíacos ingiriendo gluten es de 4 g/24h (considerándose lo normal \leq 3'5g) frente a los 2'2 g/24h de los controles.

La **creatinina** resultó similar en ambos grupos (0'34 mg/dl en casos y 0'38 mg/dl en controles), ocurriendo lo mismo con el **aclaramiento** de creatinina.

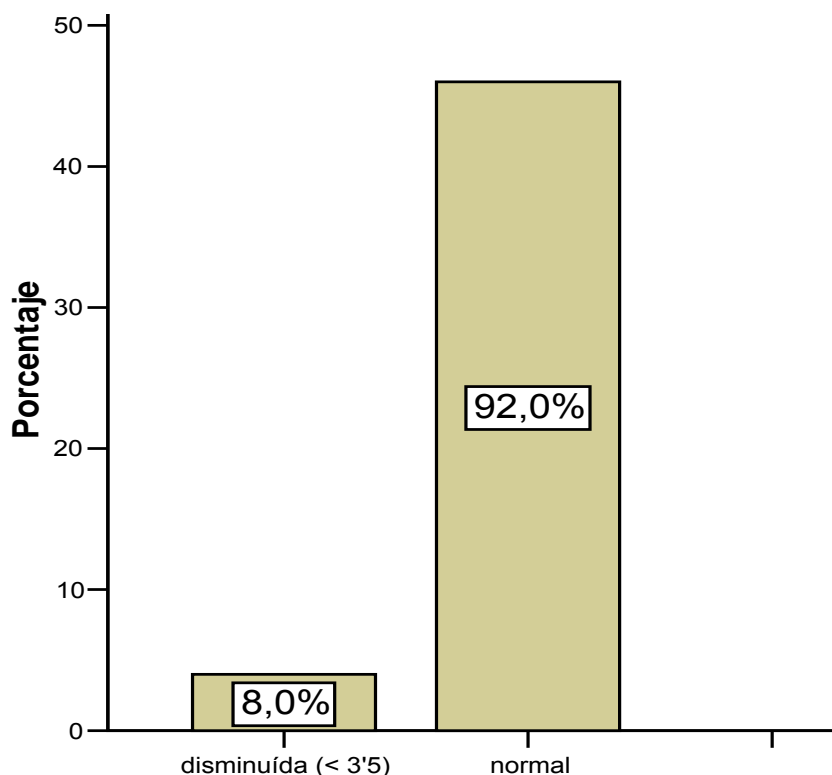


Figura 11. Gráfico descriptivo de las cifras de albúmina plasmática en los casos
(expresada en g/l)

En la tabla 3 se aprecian las cifras medias para los 4 principales aminoácidos plasmáticos analizados, según los grupos estudiados. Comparando los casos con los controles se puede apreciar que la **glutamina** es significativamente menor en casos que en controles (479'6 $\mu\text{mol/l}$ frente a 563'7 $\mu\text{mol/l}$ respectivamente, $p = 0'005$), pero con un coeficiente de regresión de Pearson de 0'28 ($p < 0'05$). Sin embargo, no hay diferencia significativa entre la glutamina de celíacos con atrofia leve (480'4 $\mu\text{mol/l}$) y de aquéllos con atrofia grave (478'5 $\mu\text{mol/l}$).

En el caso de la **citruлина** (figura 12), los pacientes celíacos con afectación intestinal presentaron una cifra media de 17'7 $\mu\text{mol/l}$, significativamente menor que en los controles, que aparecen con cifras de 28'9

$\mu\text{mol/l}$ ($p = 0'0001$), con un coeficiente de regresión de Pearson de 0'52 ($p < 0'05$). Así mismo, en los casos con atrofia grave es significativamente menor que en los casos con atrofia leve ($13'8 \mu\text{mol/l}$ frente a $19'7 \mu\text{mol/l}$, $p = 0'016$).

La **arginina** (figura 13) se comporta de forma paralela a la citrulina, siendo menor en los casos que en los controles ($38'7 \mu\text{mol/l}$ vs $56'2 \mu\text{mol/l}$, $p = 0'0001$), aunque similar en ambos grupos de atrofia, leve y grave ($39'8 \mu\text{mol/l}$ y $38'6 \mu\text{mol/l}$, n.s.).

Entre los aminoácidos plasmáticos que han demostrado significación estadística comparando casos y controles, ésta es mayor en los niveles de citrulina ($p = 0'0001$) y arginina ($p = 0'0001$) que en los de glutamina ($p = 0'005$).

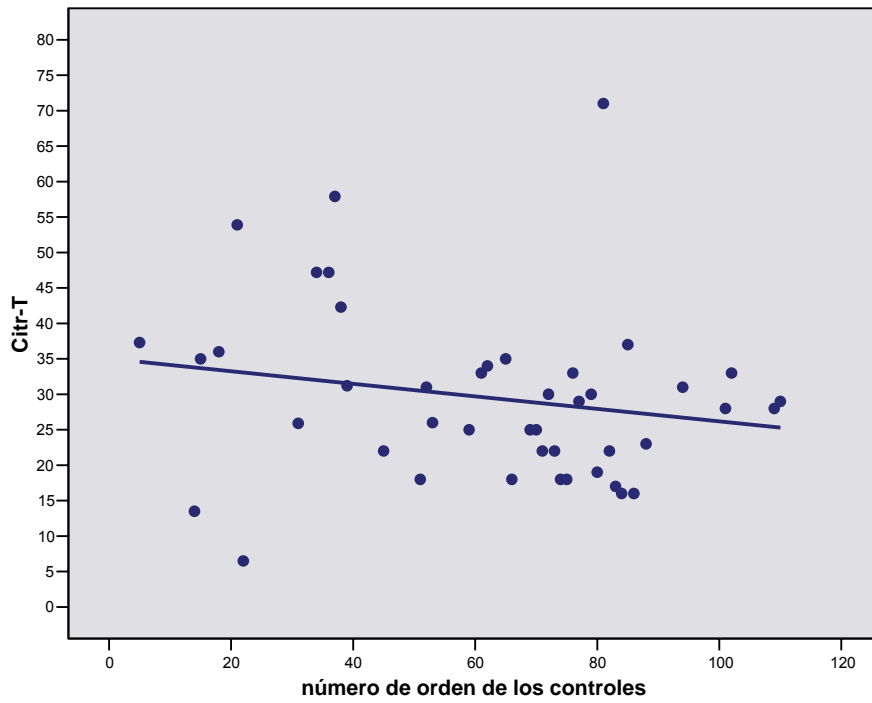
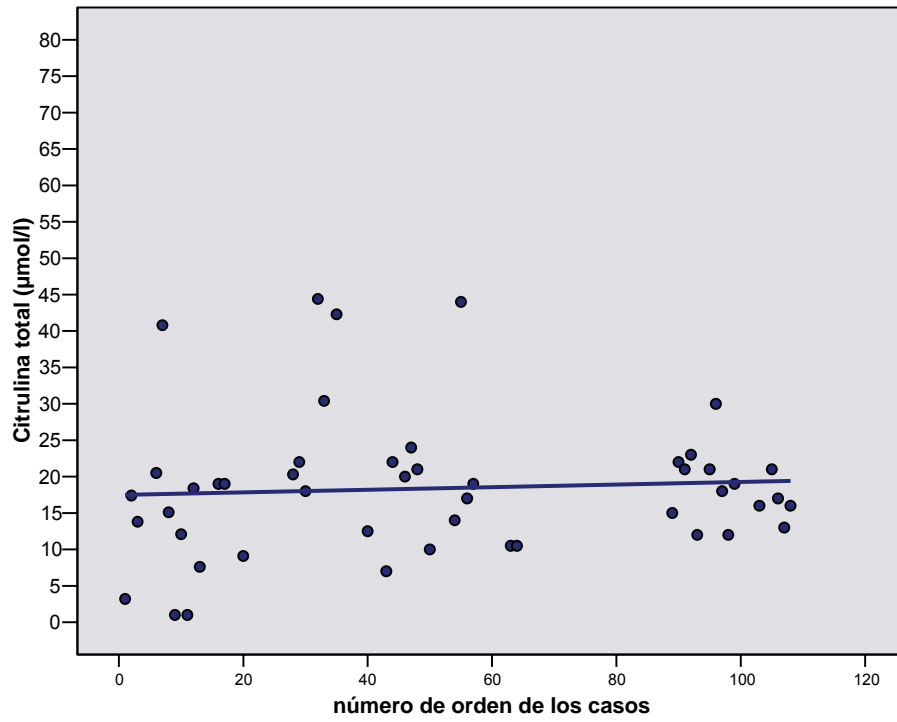


Figura 12. Citrulinemia (expresada en µmol/l) en casos y controles

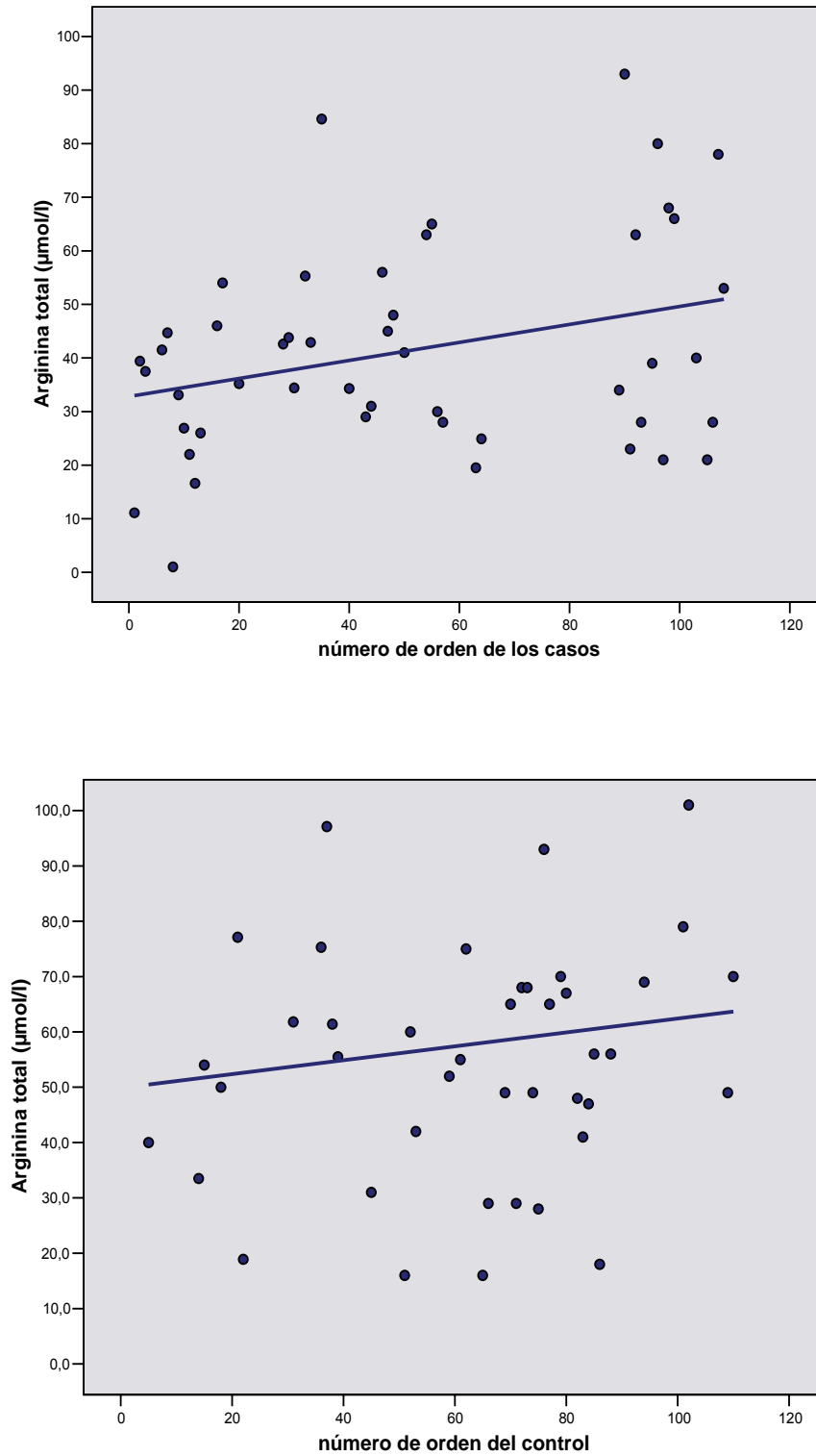


Figura 13. Argininemia (expresada en µmol/l) en casos y controles

Los valores de **isoleucina plasmática** resultaron similares en ambos casos (50'1 $\mu\text{mol/l}$ frente a 56'7 $\mu\text{mol/l}$). Algunos aminoácidos esenciales (leucina, metionina, treonina, triptófano y valina) presentan diferencias entre casos y controles, no ocurriendo así entre pacientes celíacos con atrofia leve y casos con atrofia grave.

Si se agrupan los casos y controles en diversos grupos según la afectación histológica en la biopsia intestinal (BIP), se obtiene la distribución porcentual reflejada en las figuras 14, 15 y 16:

1. **BIP normal** (MARSH 0): 2 casos.
2. **BIP patológica:**
 - a. Aumento de la infiltración de polimorfonucleares en lámina propia exclusivamente (MARSH 1 y 2): 5 casos.
 - b. Atrofia subtotal de vellosidades e infiltrado > 40% (MARSH 3a): 21 casos.
 - c. Atrofia total e hiperplasia críptica (MARSH 3b y 3c): 18 casos.
3. **BIP no realizada:** 51 casos.

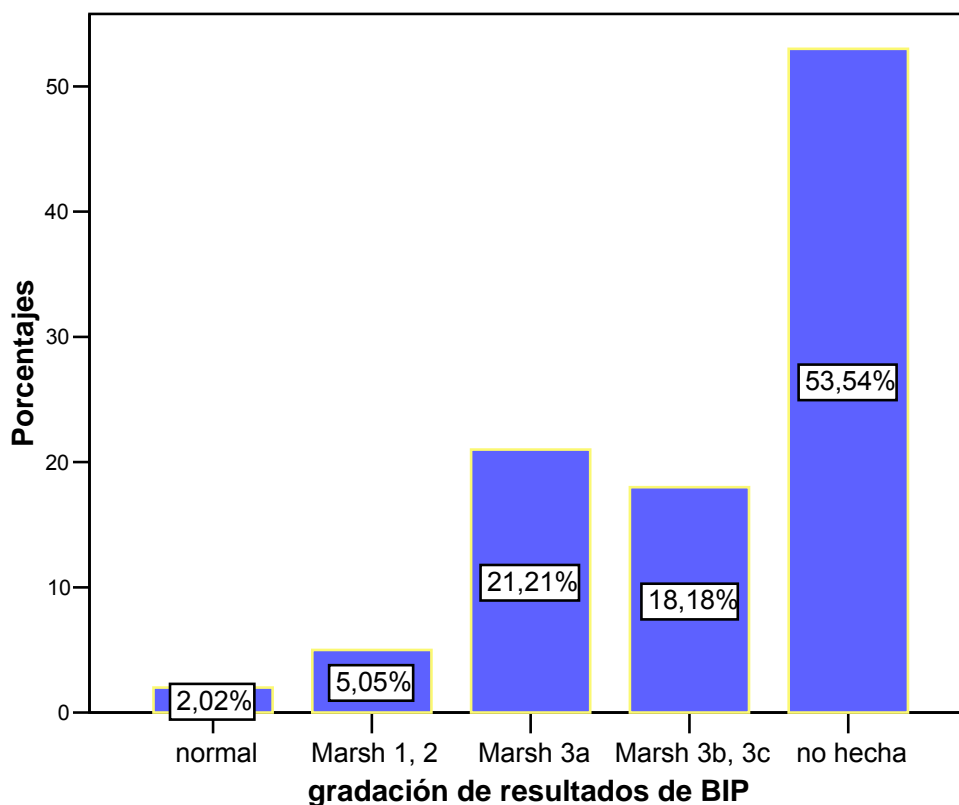


Figura 14. Distribución de grupos según el grado de lesión histológica encontrado en la biopsia intestinal

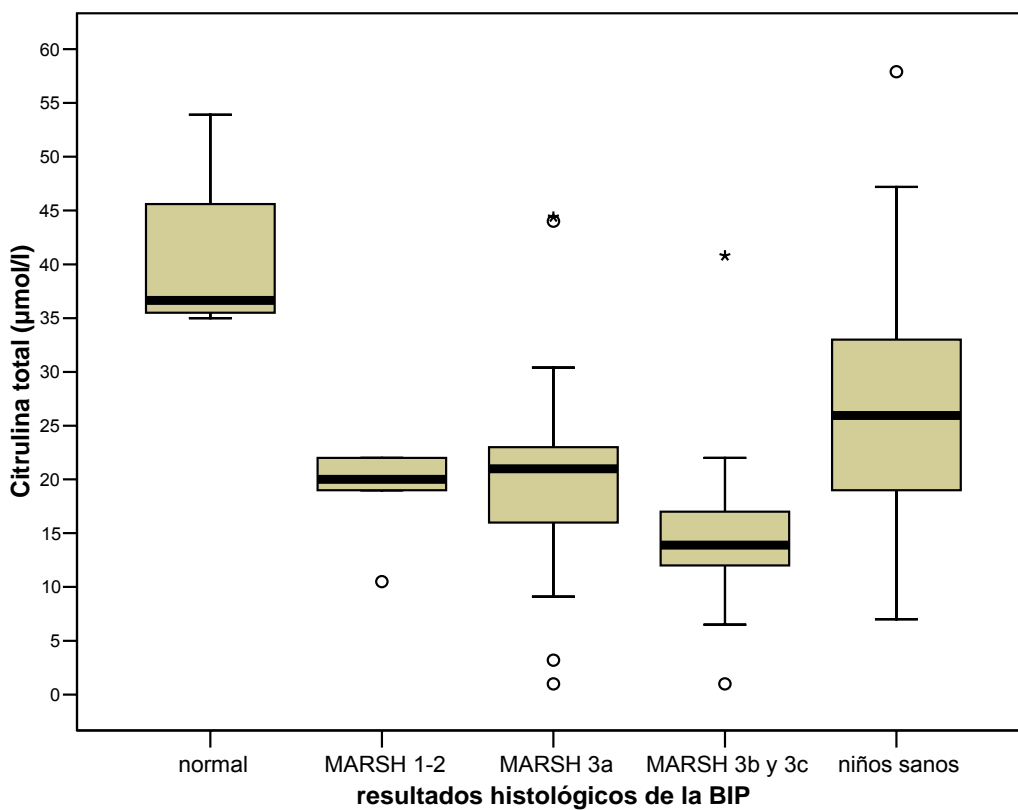


Figura 15. Citrulina plasmática (expresada en μmol/l) según resultados histológicos de la biopsia intestinal

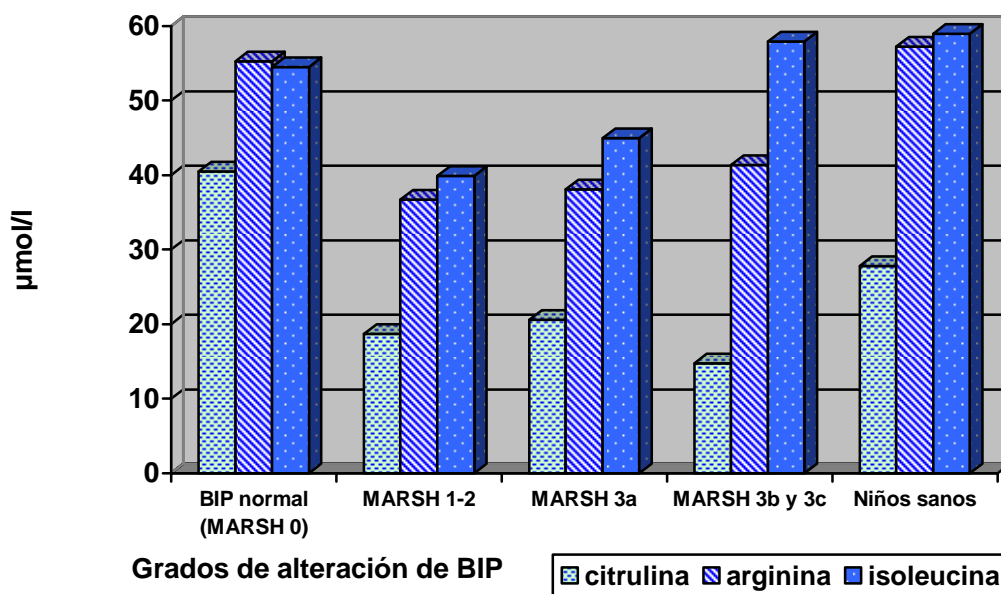


Figura 16. Aminoácidos plasmáticos según el grado de alteración histológico

Se aprecia claramente que la media de *citrulinemia* en los controles es mayor de forma significativa que en los que presentan alguna alteración histológica (figura 15).

A su vez, en la tabla 4 se detecta que en ninguna de las variables analizadas hay diferencia significativa entre los que tienen biopsia normal y los niños controles sanos catalogados como tales sin biopsia. Entre los MARSH 1-2 y los MARSH 3a no hay diferencia significativa en ningún parámetro analizado, por lo que se pueden entender como dos grupos similares a afectos estadísticos.

Tabla 4. Media (DE) de principales aminoácidos plasmáticos y esteatorrea según el grado de alteración histológica en BIP

	N	Citrulina plasmática	Arginina plasmática	Glutamina plasmática	FENIR 24h
A) BIP normal	2	36'1 (1'6)	47'0 (9'8)	536'5 (24'7)	2'5 (1'9)
B) BIP no hecha	51	26'5 (11'7)	55'5 (25'2)	548'1 (157'9)	2'6 (2'0)
C) MARSH 1-2	5	18'7 (4'7)	36'7 (12'9)	426'3 (61'1)	5'9 (6'2)
D) MARSH 3a	21	20'5 (10'7)	39'1 (19'3)	490'2 (115'9)	3'6 (1'9)
E) MARSH 3b y 3c	18	13'8 (4'8)	39'8 (22'3)	478'5 (189'3)	3'3 (1'4)
		<p>p (A, B) > 0'05</p> <p>p (A+B, C+D+E) = 0'0001</p> <p>p (C, D) > 0'05</p> <p>p (C+D, E) < 0'05</p> <p>p (B, C+D+E) < 0'05</p>	<p>p (A, B) > 0'05</p> <p>p (A+B, C+D+E) = 0'0001</p> <p>p (C, D) > 0'05</p> <p>p (C+D, E) > 0'05</p> <p>p (B, C+D+E) < 0'05</p>	<p>p (A, B) > 0'05</p> <p>p (A+B, C+D+E) = 0'005</p> <p>p (C, D) > 0'05</p> <p>p (C+D, E) > 0'05</p> <p>p (A+B, C+D+E) < 0'002</p>	

Entre los grados de baja y elevada alteración histológica (MARSH 3b y 3c) sólo la **citrulina** plasmática (menor cuanto mayor es la afectación histológica) presenta diferencia significativa, no ocurriendo así con las demás variables analizadas.

Las cifras plasmáticas de **arginina**, **isoleucina** y los valores de **esteatorrea** no muestran diferencia entre los diferentes grados de alteración histológica, pero si se agrupan, considerándolas en conjunto, aparece diferencia respecto a los controles (como ya se había indicado anteriormente).

Si se elije un valor de **citrulinemia** de 20 $\mu\text{mol/l}$ como punto de corte de cribaje de atrofia vellositaria, se obtiene la tabla de contingencia que se muestra en la tabla 5. Con estos datos se obtiene una sensibilidad para la detección de atrofia intestinal de un 72%, con una especificidad de un 76%, un valor predictivo positivo del 73%, un valor predictivo negativo del 75%, con tasa de falsos positivos de 27% y de falsos negativos de 25%.

Tabla 5. Tabla de contingencia para citrulina plasmática (considerando como positivo a citrulinemia $\leq 20 \mu\text{mol/l}$)

	CELÍACOS	CONTROLES	
TEST +	33	12	45
TEST -	13	39	52
	46	51	97

Sensibilidad: 72%, Especificidad 76%, VPP 73%, VPN 75%, TFP 27%, TFN 25%

Como puede apreciarse en las figuras 17 a 19, entre las cifras de citrulina y de cada uno de los tres aminoácidos glutamina, arginina e isoleucina, existe una correlación directa estadísticamente significativa. La correlación es algo

mejor entre la citrulina y la arginina (coeficiente de Pearson $R = 0'669$, $p < 0'0001$) que entre la citrulina y la glutamina (coeficiente de Pearson de $R = 0'499$, $p < 0'0001$) o entre la citrulina y la isoleucina ($R = 0'416$, $p < 0'0001$).

En las tablas 6 y 7 se presentan las medias y desviaciones estándar de los demás aminoácidos estudiados, comparando casos y controles y los diversos grados de atrofia intestinal en celíacos.

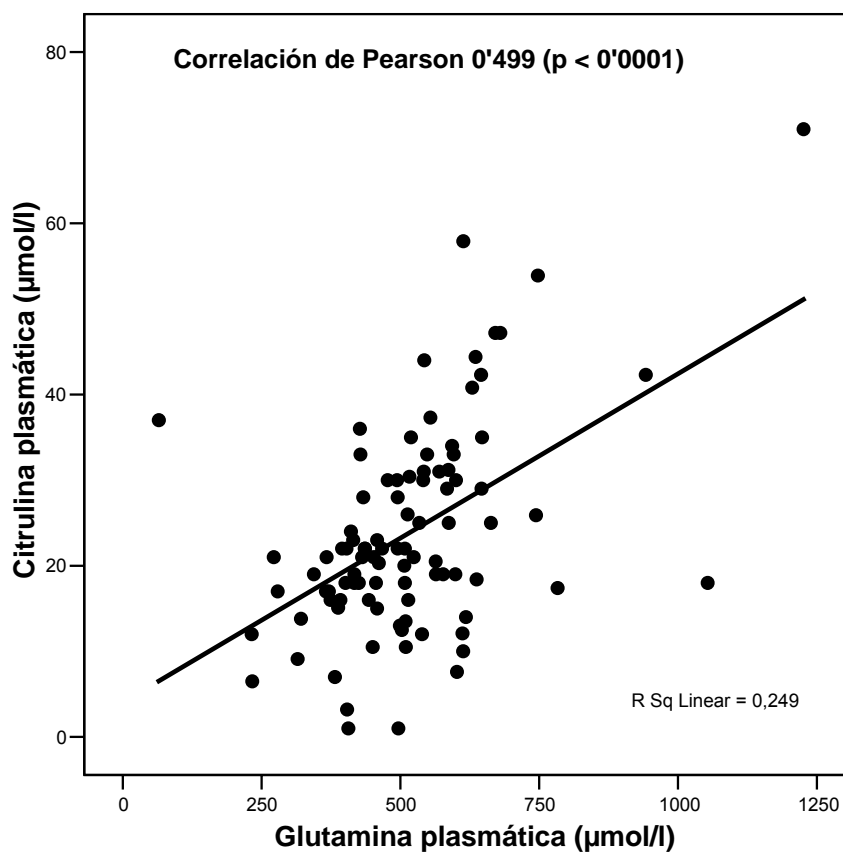


Figura 17. Correlación entre citrulinemia y glutamina plasmática en celíacos

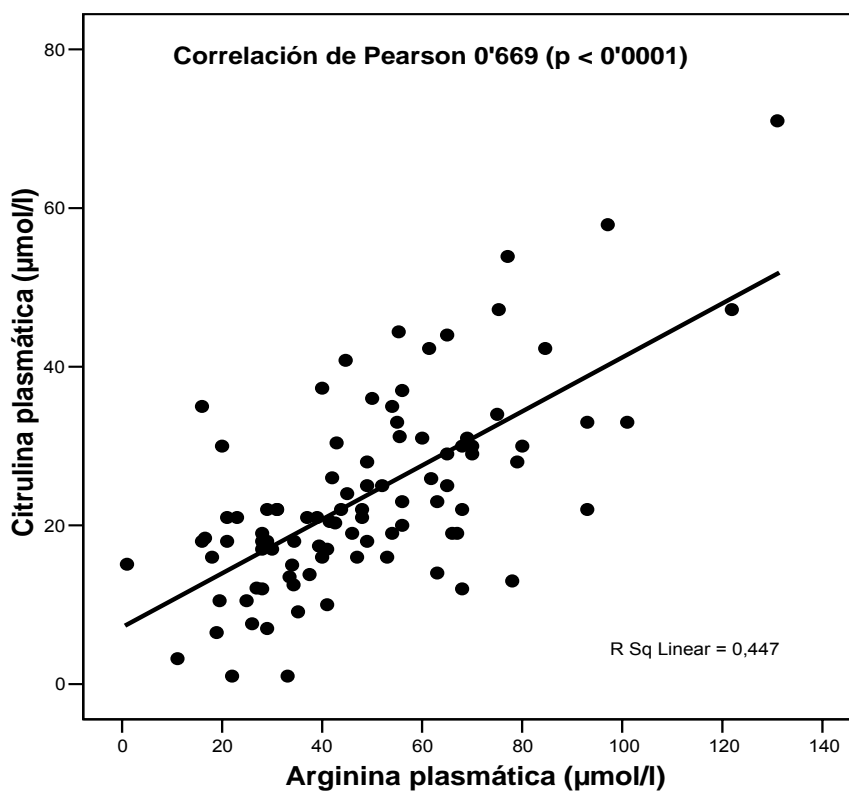


Figura 18. Correlación entre citrulinemia y arginina plasmática en celíacos

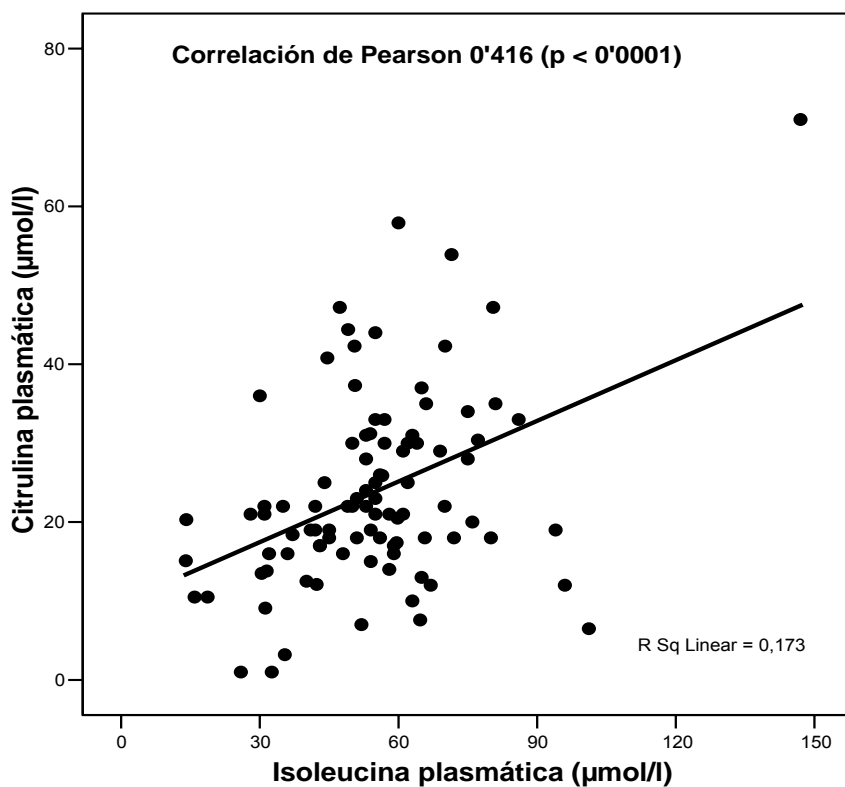


Figura 19. Correlación entre citrulinemia e isoleucina plasmática en celíacos

Tabla 6. Cifras de otros aminoácidos plasmáticos en grupos de casos y controles

Aminoácidos analizados	GRUPO	Nº	Media (µmol/l)	Desviación estándar	Error estándar de la media
TAURINA	celíacos con atrofia	44	50,80	51,149	7,711
	controles	50	44,68	39,071	5,525
ASPARRAGINA	celíacos con atrofia	44	11,37	11,434	1,724
	controles	50	11,24	7,774	1,099
TREONINA	celíacos con atrofia	44	81,60	29,852	4,500
	controles	50	110,32	41,805	5,912
SERINA	celíacos con atrofia	44	93,96	30,690	4,627
	controles	50	98,92	31,384	4,438
GLUTAMATO	celíacos con atrofia	44	33,55	25,834	3,895
	controles	50	28,14	15,325	2,167
GLICINA	celíacos con atrofia	44	160,48	49,207	7,418
	controles	50	195,18	45,993	6,504
ALANINA	celíacos con atrofia	44	244,19	98,393	14,833
	controles	50	290,78	90,236	12,761
ÁCIDO AMINOBUTÍRICO	celíacos con atrofia	44	9,84	10,091	1,521
	controles	50	9,12	12,062	1,706
VALINA	celíacos con atrofia	44	178,89	46,724	7,044
	controles	50	215,14	75,498	10,677
CISTEÍNA	celíacos con atrofia	44	9,72	9,059	1,366
	controles	50	10,40	9,564	1,353
METIONINA	celíacos con atrofia	44	15,66	5,087	0,767
	controles	50	21,66	8,388	1,186
LEUCINA	celíacos con atrofia	44	92,69	27,335	4,121
	controles	50	107,54	36,815	5,206
TIROSINA	celíacos con atrofia	44	48,74	13,527	2,039
	controles	50	67,04	22,279	3,151
TRIPTÓFANO	celíacos con atrofia	44	44,51	15,106	2,277
	controles	50	59,98	23,571	3,334
ORNITINA	celíacos con atrofia	43	36,53	19,360	2,952
	controles	50	42,36	24,125	3,412
LISINA	celíacos con atrofia	44	117,66	36,803	5,548
	controles	50	132,82	51,114	7,229
HISTIDINA	celíacos con atrofia	44	63,96	21,195	3,195
	controles	50	70,58	24,813	3,509
ARGININA	celíacos con atrofia	47	38,74	18,630	2,717
	controles	50	56,28	24,929	3,525
ASPARTATO	celíacos con atrofia	44	50,85	20,788	3,134
	controles	50	58,94	22,203	3,140
PROLINA	celíacos con atrofia	43	137,19	60,642	9,248
	controles	50	135,58	58,450	8,266

Tabla 7. Cifras de otros aminoácidos plasmáticos en grupos con atrofia leve y atrofia grave

Aminoácidos analizados	GRUPO CELÍACOS	Nº	Media (µmol/l)	Desviación estándar (µmol/l)	Error estándar de la media
TAURINA	atrofia leve	25	58,41	61,749	12,350
	atrofia grave	18	38,99	31,189	7,351
ASPARRAGINA	atrofia leve	25	10,68	10,566	2,113
	atrofia grave	18	12,17	13,089	3,085
TREONINA	atrofia leve	25	82,24	22,624	4,525
	atrofia grave	18	76,97	35,227	8,303
SERINA	atrofia leve	25	89,80	15,972	3,194
	atrofia grave	18	97,57	43,514	10,256
GLUTAMATO	atrofia leve	25	31,72	28,512	5,702
	atrofia grave	18	34,83	22,452	5,292
GLICINA	atrofia leve	25	160,65	40,188	8,038
	atrofia grave	18	153,38	53,792	12,679
ALANINA	atrofia leve	25	222,80	72,140	14,428
	atrofia grave	18	264,20	119,357	28,133
ÁCIDO AMINOBUTÍRICO	atrofia leve	25	11,52	11,592	2,318
	atrofia grave	18	7,89	7,545	1,778
VALINA	atrofia leve	25	174,48	39,695	7,939
	atrofia grave	18	183,29	56,494	13,316
CISTEÍNA	atrofia leve	25	10,19	8,461	1,692
	atrofia grave	18	9,44	10,170	2,397
METIONINA	atrofia leve	25	15,53	4,633	0,927
	atrofia grave	18	15,39	5,564	1,311
LEUCINA	atrofia leve	25	87,26	19,221	3,844
	atrofia grave	18	99,61	35,591	8,389
TIROSINA	atrofia leve	25	48,06	13,193	2,639
	atrofia grave	18	48,56	13,866	3,268
TRIPTÓFANO	atrofia leve	25	45,77	15,852	3,170
	atrofia grave	18	42,28	14,511	3,420
ORNITINA	atrofia leve	25	34,27	15,914	3,183
	atrofia grave	18	39,67	23,465	5,531
LISINA	atrofia leve	25	107,57	25,703	5,141
	atrofia grave	18	129,17	45,633	10,756
HISTIDINA	atrofia leve	25	61,42	16,004	3,201
	atrofia grave	18	66,78	27,327	6,441
ARGININA	atrofia leve	28	38,68	16,256	3,072
	atrofia grave	18	39,89	22,302	5,257
ASPARTATO	atrofia leve	25	47,49	15,829	3,166
	atrofia grave	18	55,28	26,475	6,240
PROLINA	atrofia leve	24	126,38	37,322	7,618
	atrofia grave	18	152,39	82,337	19,407

5.2. RESULTADOS ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

Se seleccionaron 25 pacientes afectados de enfermedad inflamatoria intestinal para ser seguidos durante el período de estudio, de los cuales 6 se excluyeron del seguimiento por fallo en la extracción de las muestras sanguíneas iniciales y otro se sacó del estudio por diagnosticársele enfermedad celíaca coincidente con el debut de colitis ulcerosa, quedando para el análisis final 18 casos. La distribución en grupos se muestra en la figura 20.

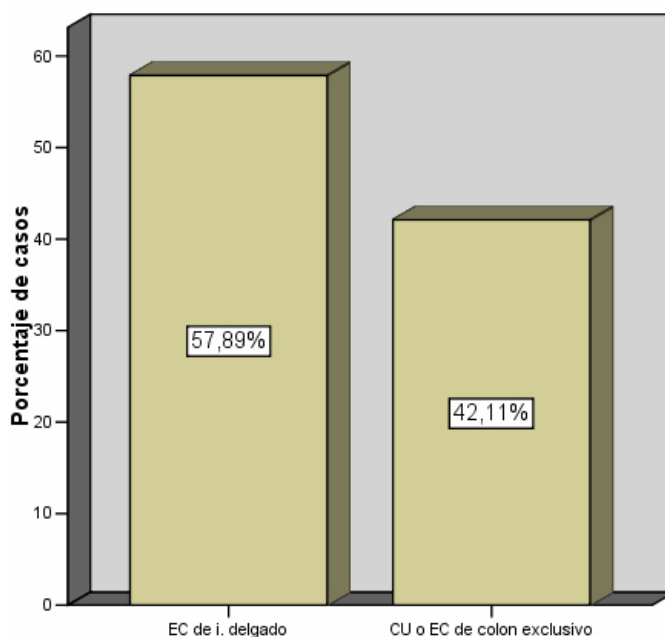


Figura 20. Porcentaje de casos estudiados

En la tabla 8 se presentan, para cada uno de los grupos, los valores de la media, la desviación estándar y la significación estadística de las principales variables consideradas en este estudio: edad, índice de masa corporal, grasa en heces de 24h (FENIR 24h), calprotectina fecal y los cuatro aminoácidos plasmáticos estudiados.

Tabla 8. Variables analizadas comparando los grupos estudiados

	Grupo	N	Media	Desviación Estándar	Significación estadística
Edad (años)	A	10	11'2	2'6	p (A,B) ns p (C,D) ns
	B	8	10'7	3'0	
	C	18	11'0	2'7	
	D	42	5'1	2'6	
IMC (kg/m ²)	A	10	17'8	3'4	p (A,B) ns p (C,D) ns
	B	8	18'4	3'0	
	C	18	18'1	3'1	
	D	42	16'5	2'6	
Calprotectina (µg/g)	A	10	526'6	291'3	p (A,B) ns p (C,D) < 0'05
	B	8	464'7	426'9	
	C	18	499'1	347'8	
	D	42	37	21	
Grasa fecal (g/24h)	A	8	3'6	2'0	p (A,B) ns p (C,D) = 0'008
	B	6	3'7	2'1	
	C	18	3'7	2'0	
	D	42	2'1	1'4	
Citrulina (µmol/l)	A	10	19'4	7'1	p (A,B) = 0'026 p (A,D) = 0'021 p (B,D) ns p (C,D) ns
	B	8	28'2	7'7	
	C	18	23'3	8'5	
	D	42	28'9	11'6	
Glutamina (µmol/l)	A	10	518'0	136'6	p (A,B) ns p (C,D) ns
	B	8	562'3	137'1	
	C	18	537'7	134'7	
	D	42	565'0	150'0	
Arginina (µmol/l)	A	10	54'6	18'1	p (A,B) ns p (C,D) ns
	B	8	62'8	21'9	
	C	18	58'2	19'7	
	D	42	57'6	23'4	
Isoleucina (µmol/l)	A	10	67'5	23'0	p (A,B) ns p (C,D) = 0'037
	B	8	69'6	14'6	
	C	18	68'4	19'2	
	D	42	56'7	19'8	

A) Crohn con i. delgado afecto; B) Colitis ulcerosa o Crohn de colon exclusivo;
C) A+B; D) Controles.

Analizando los grupos de EII como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa independientemente de la afectación o no de intestino delgado, se aprecia claro predominio del **sexo** femenino en la enfermedad de Crohn (66'6%) y del masculino en la colitis ulcerosa (62'5%). Pero no hay diferencia

5. Resultados

importante en cuanto al sexo entre casos y controles, encontrándose porcentajes similares de varones (47'3%) y mujeres (52'6%) (figura 21).

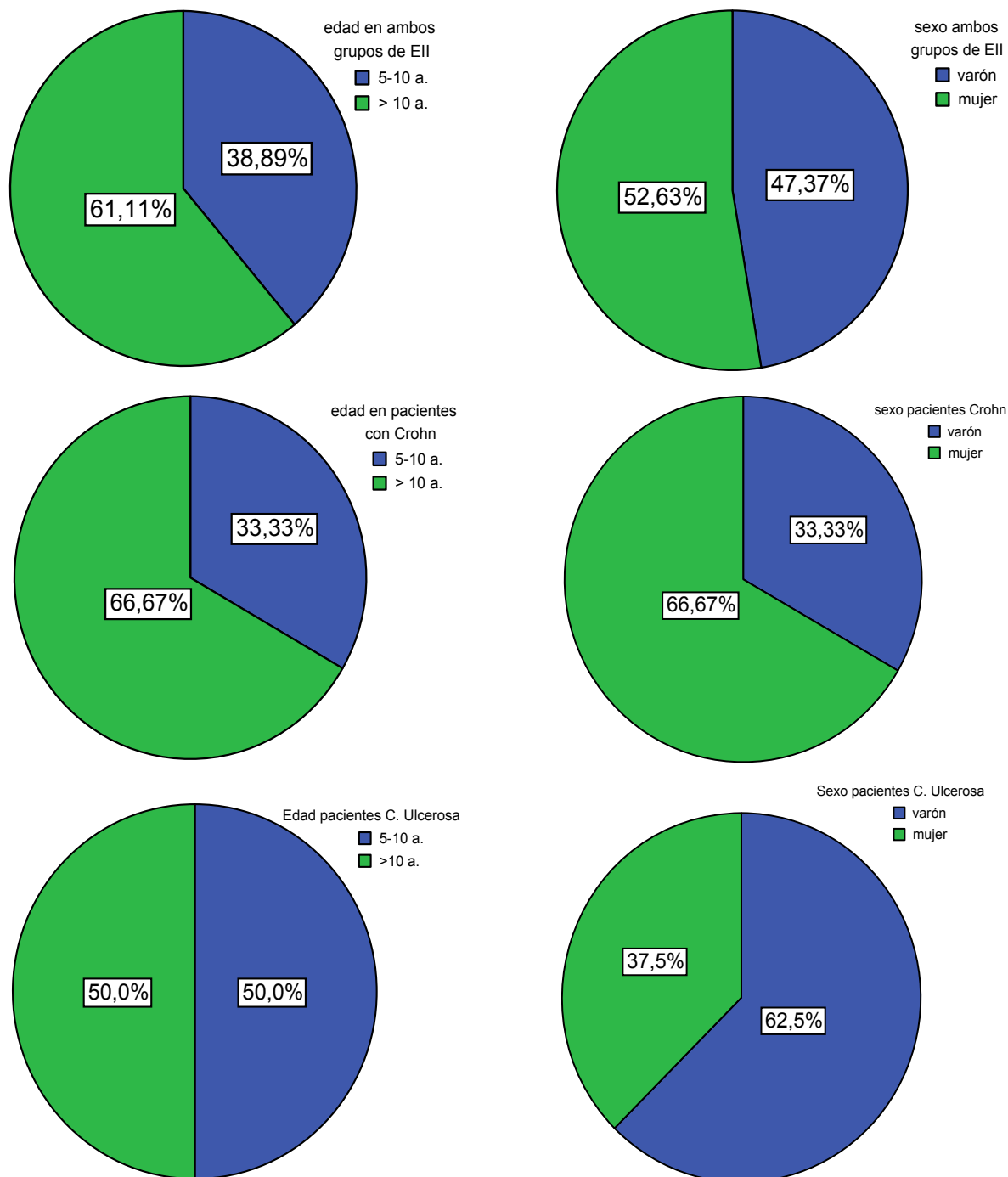


Figura 21. Descriptiva de edades y sexos en los casos de EII (total y agrupados)

En cuanto a la **edad** (media de 11'0 años en los casos y de 5'1 años en los controles) se aprecia que los dos grupos de EII estudiados son similares pues no existe diferencia significativa en este parámetro. Existe un 38'8% de casos menores de 10 años con ligero predominio de éstos entre los afectados de colitis ulcerosa (50% de colitis ulcerosas entre 5 y 10 años, frente a 33'3% de Crohn).

No se encontró diferencia significativa en lo referente al **índice de masa corporal** (IMC) entre los diferentes grupos. Todos los pacientes estudiados estaban en valores de IMC normales, en percentil 50-75 (media de 18'1 kg/m²) y los controles seguidos tenían IMC similares a aquéllos, en percentil 50 (media de 16'5 kg/m²).

En cuanto a la **albúmina**, su valor estaba disminuido en 12 de los casos (8 de ellos enfermos de Crohn con afectación de intestino delgado). La **grasa en heces de 24h** en pacientes con EII es de 3'7 g/24h de media (considerándose lo normal $\leq 3'5$ g), sin encontrar diferencia significativa entre Crohn y colitis ulcerosa, frente a los 2'2 g/24h de los controles, siendo esta diferencia significativa estadísticamente.

En la tabla 8 se muestran las cifras medias de los 4 principales **aminoácidos** plasmáticos analizados, según los grupos estudiados.

Comparando estadísticamente los casos con los controles se puede considerar que la **glutamina** es similar en ambos grupos (537'7 μ mol/l frente a 565'0 μ mol/l respectivamente). No hay tampoco diferencia significativa entre la glutamina de enfermos con afectación de intestino delgado (518'0 μ mol/l) y de aquéllos con afectación exclusiva de colon (562'3 μ mol/l).

En el caso de la **citulina** (figuras 22 y 23), en los pacientes con Crohn y afectación significativa de intestino delgado la cifra media es de 19'4 $\mu\text{mol/l}$, significativamente menor que en los que tienen exclusiva afectación colónica (28'2 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0'026$) y que en los controles (28'9 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0'021$), con un coeficiente de correlación de Spearman de 0'53 ($p < 0'04$).

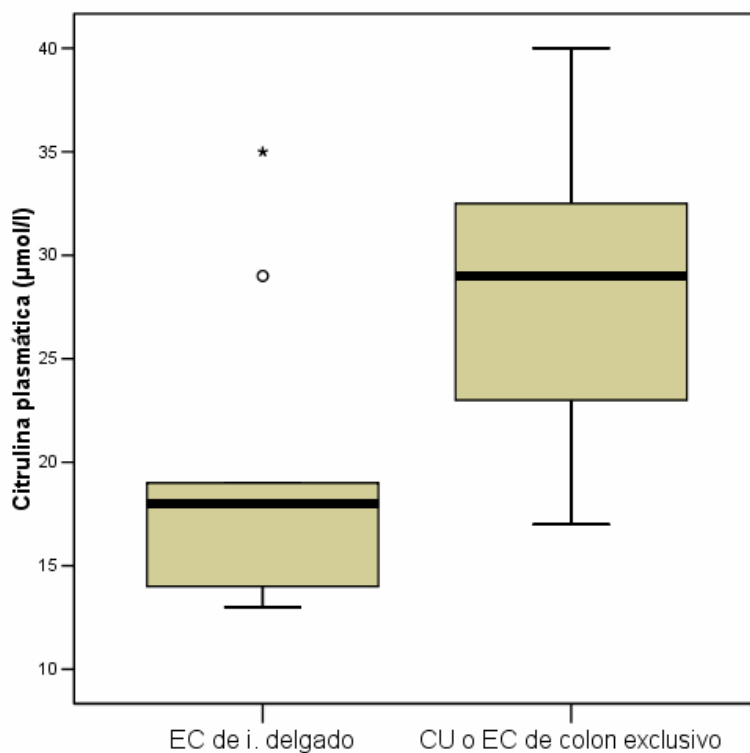


Figura 22. Citrulina plasmática en casos

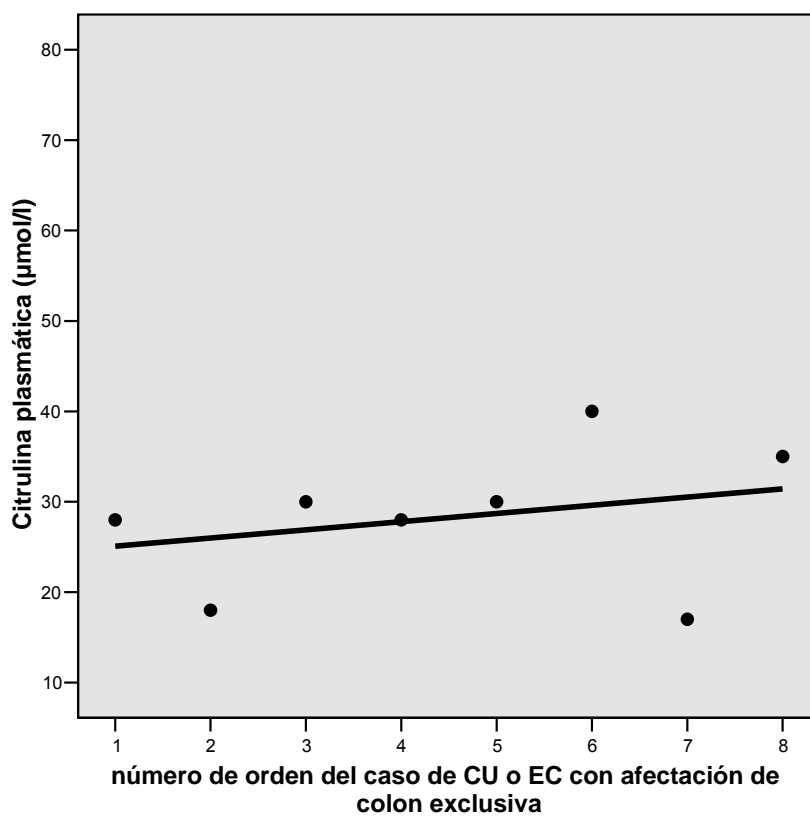
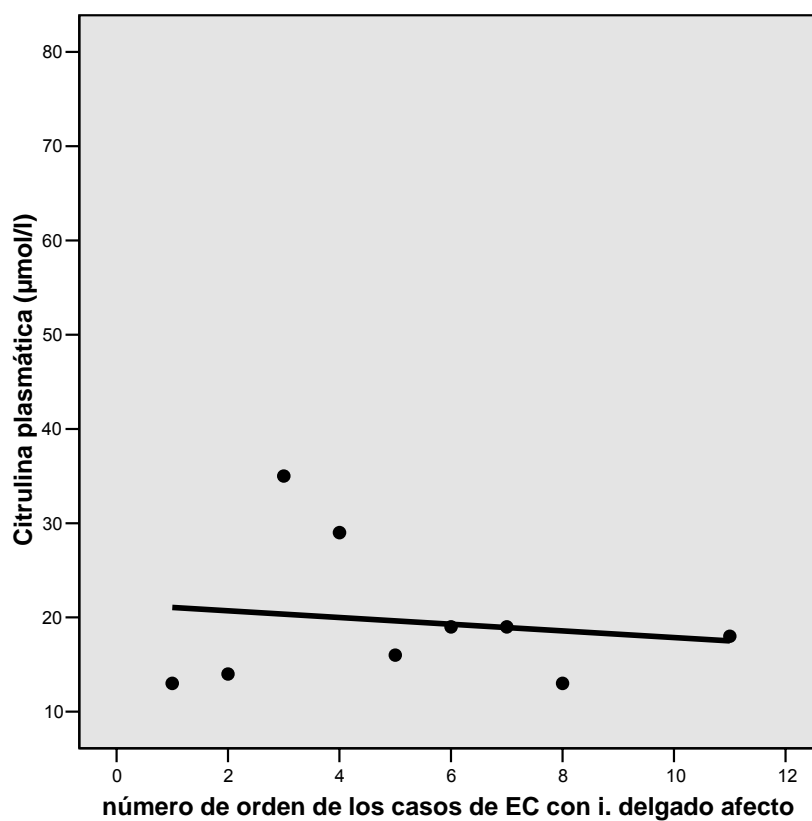


Figura 23. Citrulina comparada entre casos en gráfico de dispersión

Las cifras de **arginina** (tabla 8) son menores en los casos de afectación de intestino delgado que en los de colon exclusivo o en los controles, aunque sin significación estadística.

La **isoleucina** es similar en ambos casos de Crohn (67'5 $\mu\text{mol/l}$ frente a 69'6 $\mu\text{mol/l}$), y en ambos es mayor que en los controles (56'7) de forma significativa.

Tomando como base estudios de resección intestinal masiva^{25,56,61}, se eligió una citrulinemia de 20 $\mu\text{mol/l}$ como punto de corte de screening de lesión grave de intestino delgado en la enfermedad de Crohn. Se obtiene así la tabla de contingencia que se representa en la tabla 9. Con estos datos, la sensibilidad para la detección de lesión enterocitaria es de un 70%, con una especificidad del 75%, un valor predictivo positivo del 78%, un valor predictivo negativo del 67%, con tasa de falsos positivos de 22% y de falsos negativos de 33%.

Tabla 9. Tabla de contingencia para citrulina plasmática (considerando como positivo a citrulinemia $\leq 20 \mu\text{mol/l}$)

	ECr de i. delgado	CU o ECr con afectación de colon exclusiva	
TEST +	7	2	9
TEST -	3	6	9
	10	8	18

Sensibilidad: 70%, Especificidad 75%, VPP 78%, VPN 67%, TFP 22%, TFN 33%

Se intentó la correlación de los distintos aminoácidos entre sí. Como puede apreciarse en las figuras 24 a 26, entre la citrulina y los aminoácidos glutamina, arginina e isoleucina existe poca correlación. Entre la citrulina y la

glutamina la correlación directa es significativa estadísticamente, pero poco potente (coeficiente de Pearson de 0'488, $p < 0'04$). Entre la citrulina y la arginina la correlación directa es algo menor y sin significación estadística (coeficiente de Pearson de 0'414, $p < 0'088$). Entre la citrulina y la isoleucina se puede afirmar que no existe correlación directa (coeficiente de Pearson de 0'115, $p < 0'65$).

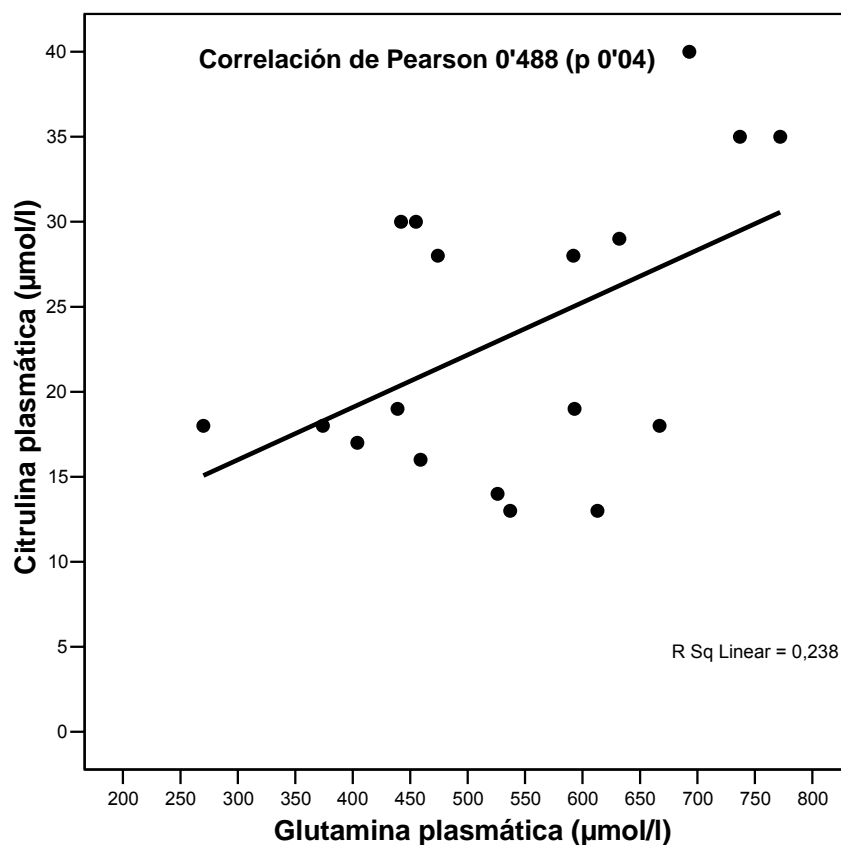


Figura 24. Correlación entre citrulina y glutamina plasmáticas en enfermedad inflamatoria intestinal globalmente

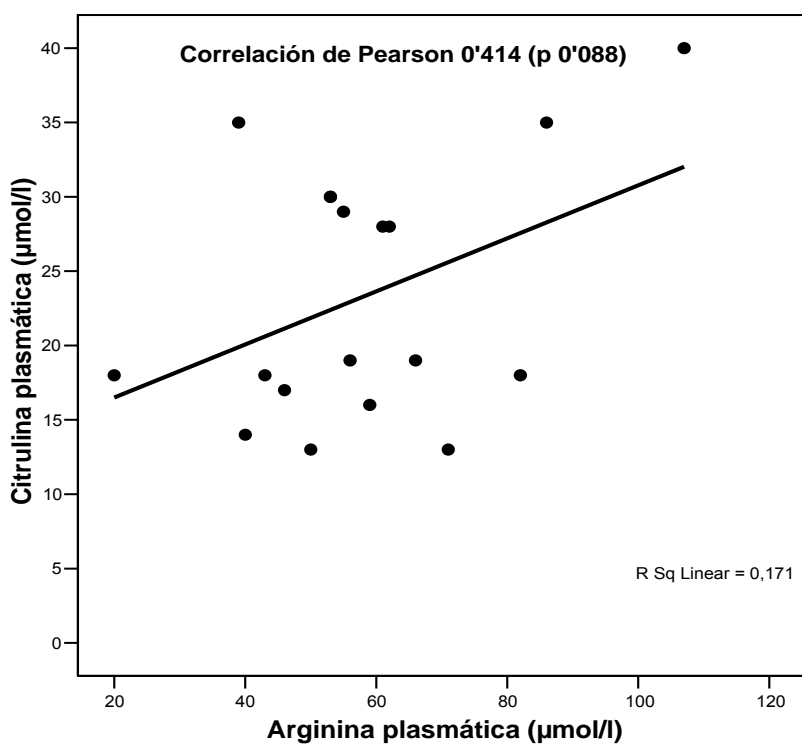


Figura 25. Correlación entre citrulina y arginina plasmáticas en enfermedad inflamatoria intestinal globalmente

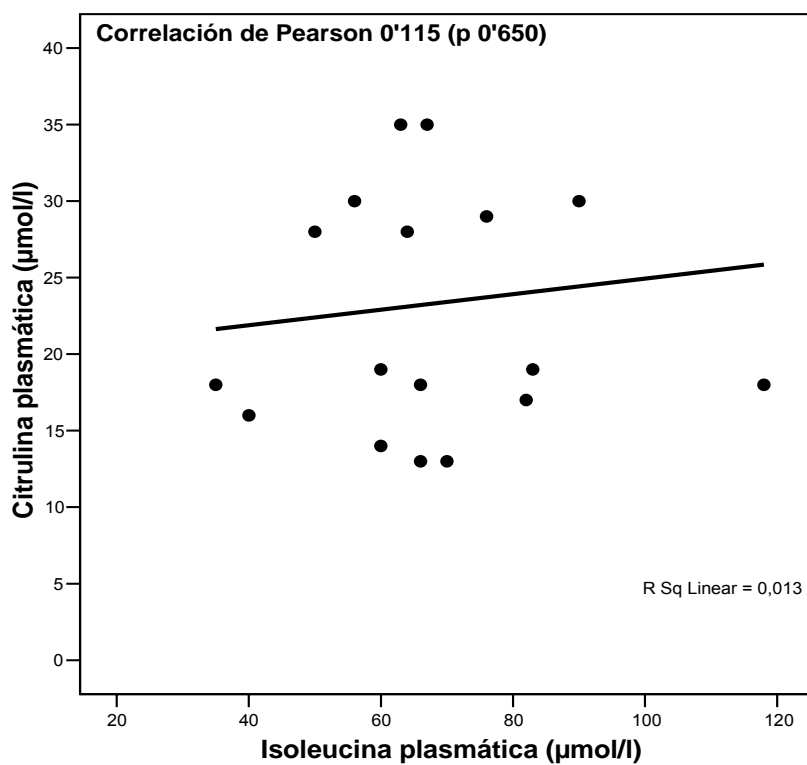


Figura 26. Correlación entre citrulina e isoleucina plasmáticas en enfermedad inflamatoria intestinal globalmente

Tampoco existe una correlación directa estadísticamente significativa (coeficiente de Pearson de 0'39, p 0'103) entre la calprotectina y la citrulina en ninguna de las enfermedades inflamatorias asociadas, como puede apreciarse en la figura 27.

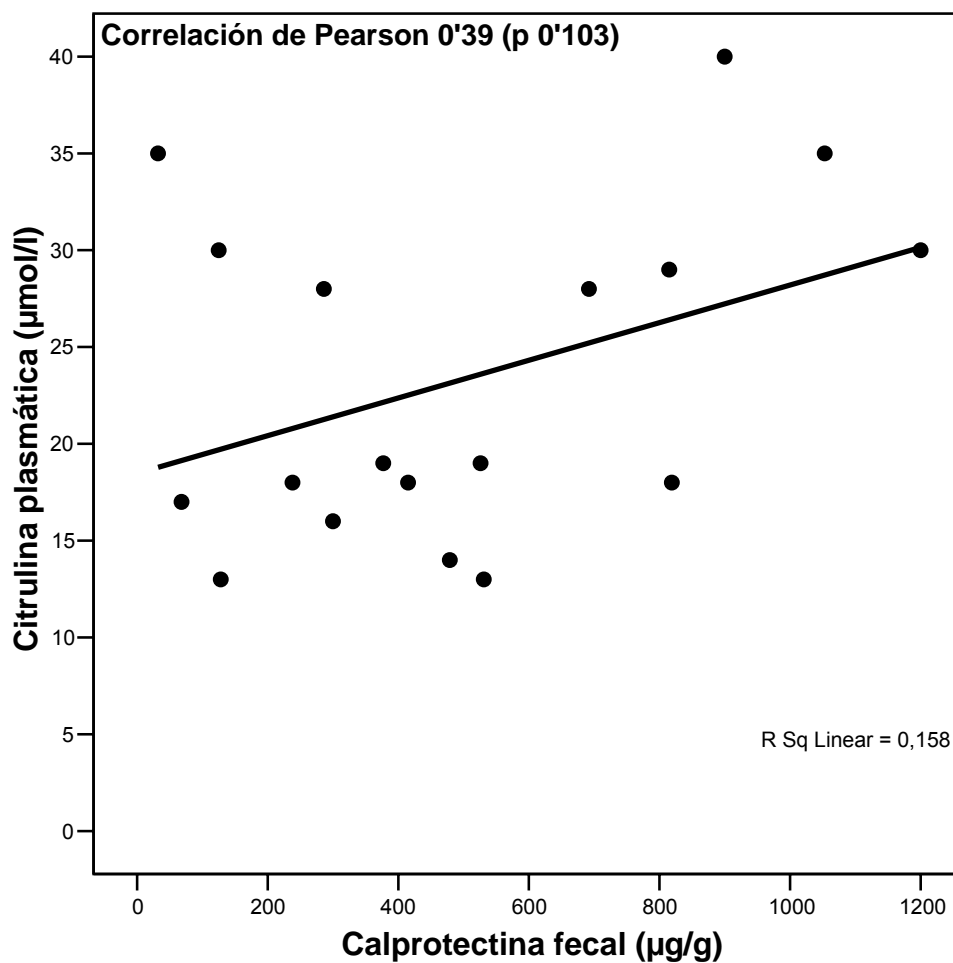


Figura 27. Correlación entre citrulina plasmática y calprotectina en enfermedad inflamatoria intestinal globalmente

En enfermedad de Crohn, existe una clara correlación directa estadísticamente significativa (coeficiente de Pearson de 0'804, p 0'009) entre la calprotectina y la citrulina, como puede apreciarse en la figura 28.

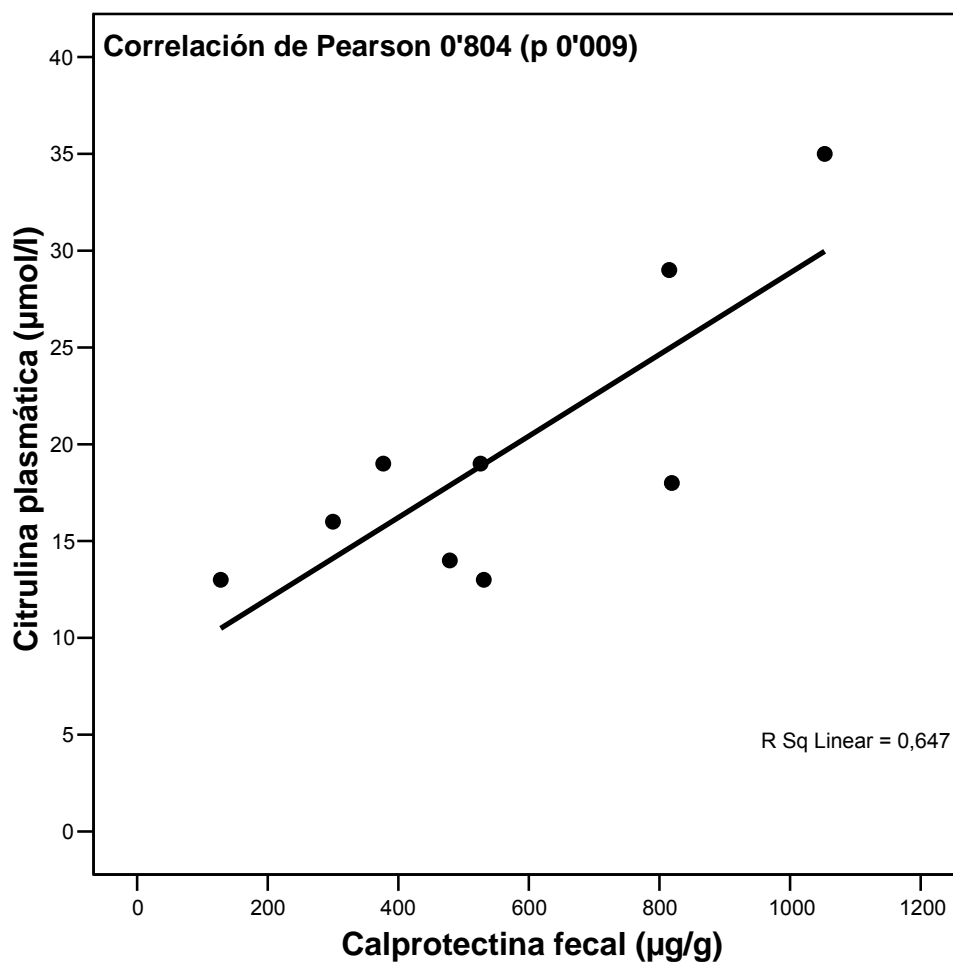


Figura 28. Correlación entre citrulina plasmática y calprotectina en enfermedad inflamatoria intestinal tipo Crohn

6. DISCUSIÓN

6.1. CITRULINA Y ENFERMEDAD CELÍACA

En los pacientes con enfermedad celíaca, dada la similitud en cuanto a la **edad** media, que no presenta diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos estudiados, se puede aceptar que las diferencias que se encuentren en los valores de los aminoácidos no lo serán por diferencia en la cantidad de masa intestinal en función de la edad.

El **IMC** es similar en pacientes celíacos y en controles en este estudio, lo que quizá podría explicarse porque los controles han sido seleccionados entre pacientes derivados en algún momento a la consulta de gastroenterología y nutrición infantil, si bien habiéndose completado un estudio de despistaje de enfermedad orgánica, en especial intestinal o renal, con resultado normal. Tanto en los casos como en los controles el IMC está dentro de los límites normales, pudiendo deducirse de este dato que nuestros enfermos celíacos tienen, al diagnóstico, una afectación no muy profunda del índice peso/talla, probablemente debido a que la enfermedad celíaca se diagnostica cada vez más en sus formas asintomática u oligosintomática en la sociedad actual, dada la amplia utilización de marcadores antigluten en medicina primaria.

Por el mismo motivo, la **albúmina**, como marcador nutricional primario, se afecta en pocos casos en nuestro estudio, lo que se correlaciona con la escasa afectación del IMC.

El aumento en la grasa y el nitrógeno fecal en **heces de 24h** en los casos da idea de la malabsorción, secundaria al daño intestinal, que existe en los celíacos que están tomando gluten. Son, por ello, marcadores indirectos que se deben correlacionar con la intensidad de pérdida de masa enterocitaria y su síndrome malabsortivo secundario.

Los **aminoácidos plasmáticos** elegidos inicialmente para ser analizados fueron la citrulina (ya que en el intestino se sintetiza únicamente en el enterocito), la arginina (que es sintetizada en el riñón, en gran parte, a partir de la citrulina), la glutamina (como marcador de estado proteico adecuado y precursor de la citrulina a través, principalmente, de la ruta enzimática de la P5CS) y la isoleucina (que hemos considerado como aminoácido control de ingesta proteica, al ser un aminoácido esencial que debe ingerirse del exterior, valorando la digestión y la absorción proteicas y no metabolizado en enterocito).

Puesto que las cifras de **glutamina** son menores en el grupo de celíacos con atrofia, se puede aceptar que hay ciertas deficiencias en la ingesta proteica o, más probablemente, en la digestión o absorción de proteínas y péptidos a nivel intestinal. Sin embargo, sus niveles están dentro del margen normal de referencia del laboratorio para la glutamina (420-730 $\mu\text{mol/l}$), por lo que no puede afirmarse que exista un verdadero déficit del aminoácido y aceptamos que la *ingesta* alimentaria no es menor en los enfermos que en los controles. En estos pacientes con enfermedad celíaca, la glutamina se convierte en aminoácido esencial para poder poner en marcha diferentes reacciones de síntesis de aminoácidos. Por tanto, aunque no desciende a niveles tan bajos

como para precisar aporte extra, en general, deberán monitorizarse sus niveles pues, en algunos casos, pueden estar tan bajos que no sea suficiente el aporte dietético normal para la correcta síntesis de citrulina.

El nivel de **citrulina** es significativamente menor en los casos que en los controles y, además, su valor está por debajo de los considerados como normales (18-35 $\mu\text{mol/l}$), lo que sugiere considerar al valor de la citrulina plasmática como marcador de reducción de masa enterocitaria. Además, en los casos con atrofia grave la cifra de citrulinemia es menor, de forma significativa, que en los casos con atrofia leve. Por ello, se puede afirmar que existe correlación entre la pérdida de masa enterocitaria del celíaco enfermo y la disminución de la producción de citrulina por el enterocito, lo que concuerda con lo publicado por Crenn en 2000 aplicado al intestino corto²⁵ y en el 2003 tras estudiar un pequeño grupo de pacientes adultos afectados de enfermedad celíaca²⁷.

La **argininemia** también es menor de forma significativa en los casos que en los controles, lo que puede explicarse por su íntima relación con la deficiencia de citrulina que induce una menor síntesis renal. La arginina podría, pues, servir de marcador indirecto, siempre que se mantenga una función renal normal, que se debe comprobar en todo paciente. Sin embargo, en los pacientes con atrofia intestinal, una vez que hayan descendido sus niveles no hay una correlación clara con el grado de atrofia, por lo que no podría servir para valorar el grado de ésta ni para estimar el momento ideal para hacer la biopsia previendo mayor daño histológico.

En cuanto a los demás aminoácidos (figuras 20 y 21), en aquéllos que son derivados de la glutamina sin pasar por la formación previa de citrulina (glutamato, ornitina y prolina) no hay diferencia significativa entre casos y controles. Entre los aminoácidos esenciales (precisan ser aportados por la alimentación y absorbidos por el enterocito), se ha elegido la ***isoleucina*** como modelo, por no tener ningún punto de su metabolismo en común con la citrulina o glutamina y por ser un aminoácido esencial que se debe ingerir desde el exterior, por lo que puede ser marcador de estado proteico, tanto de aporte externo como de capacidad absorbiva. El nivel de isoleucina no es significativamente menor en celíacos con atrofia, lo que puede indicar la existencia de una similar ingesta proteica, ya que son pacientes no severamente afectados, dada la precocidad de su diagnóstico (índice de masa corporal normal pese a leve síndrome malabsortivo). No obstante, hay que indicar que lo que verdaderamente podría marcar similar ingesta proteica y, por tanto, de aminoácidos esenciales, sería un registro dietético que, sin embargo, no se ha realizado en este estudio, pudiendo ser ello causa de un pequeño sesgo en cuanto a los resultados de aminoácidos esenciales. En cambio, no es de esperar la existencia de sesgo en la citrulina, ya que ésta deriva del exterior pero también es sintetizada a partir de la glutamina endógena, como es el caso de la presente en la masa muscular. El que la albúmina plasmática se mantenga normal indica la suficiencia del “pool” proteico corporal que permite la síntesis de citrulina en los enterocitos, si éstos no sufren daño.

En las gráficas que muestran la correlación entre citrulina y otros aminoácidos se aprecia que existe una clara relación directamente proporcional entre citrulina y glutamina (ésta es el precursor de aquélla) y entre citrulina y

arginina (ésta deriva de la primera). Entre la citrulina plasmática y la isoleucina, pese a que los niveles de ésta sigan normales, se aprecia una correlación directa que indica que, a medida que la citrulinemia desciende (por atrofia intestinal), hay un leve descenso de la isoleucina, probablemente relacionado con la menor ingesta, pero que no llega a hacer descender las cifras por debajo de lo normal.

Es interesante señalar que ante la existencia de alteración histológica en la biopsia intestinal, por leve que sea, la citrulinemia desciende lo suficiente como para diferenciarse de la de los controles y, además, se puede afirmar que existe una relación inversamente proporcional entre mayor afectación histológica y menores cifras de citrulina, teniendo los grados altos de lesión histológica menor citrulinemia que los grados bajos, lo que no ocurre con los demás aminoácidos.

En la tabla de contingencia se aprecia que la citrulina, como predictor de atrofia vellositaria, tiene una sensibilidad del 72% y una especificidad del 76%, si se considera el punto de corte en 20 $\mu\text{mol/l}$. La citrulinemia tiene la capacidad de identificar como pacientes con presunta atrofia (citrulina ≤ 20 $\mu\text{mol/l}$) a un 73% de los que realmente sufren atrofia y de identificar como sanos no atróficos (citrulina > 20 $\mu\text{mol/l}$) a un 75% de los que realmente lo son. Esta sensibilidad y especificidad, aunque no muy altas de forma aislada, sugieren valorar la realización de esta analítica asociada a la determinación de grasa en heces de 24h y a los autoanticuerpos. Esto permitiría elevar la sensibilidad y hacer más específica la valoración analítica, pudiéndose llegar a casos de un 99% de sensibilidad y 100% de especificidad, en los que quizás

podría, incluso, llegar a evitarse la biopsia intestinal. Por otro lado, en aquellos casos en los que la clínica y la determinación analítica de anticuerpos antigluten hicieran sospechar la presencia de una enfermedad celíaca, la citrulinemia ayudaría a predecir el grado de atrofia, permitiendo valorar el mejor momento para realizar la biopsia para encontrar daños más claros. Por esto se puede deducir que la citrulina plasmática reduciría los diagnósticos de enfermedad celíaca latente y potencial, aumentando el de enfermedad cierta.

Diversos estudios han planteado la hipótesis de que la composición corporal o el estado dietético no tienen un efecto directo en los niveles sanguíneos de citrulina, hipótesis que nuestro trabajo confirma al encontrar que el índice de masa corporal y la albúmina plasmática son similares en casos y controles.

La disfunción renal podría tener un impacto negativo en los niveles de citrulina pero otros estudios han constatado que no es un parámetro estadísticamente significativo hasta que el aclaramiento de creatinina baja de 50 ml/min, lo cual no ocurre en nuestros pacientes.

Los niveles normales de citrulina plasmática pueden variar según la población estudiada, por lo que cada estudio debe basarse, como referencia, en el grupo control de sus mismas características. En el estudio de Crenn^{25,27} se daba un margen de normalidad de 20 a 60 $\mu\text{mol/l}$ (con una media de 40 $\mu\text{mol/l}$) en 51 controles sanos, mientras que estudios en población china dan como normales valores de 17 y 18 mol/l ⁹⁰.

Todo esto indica que la citrulina plasmática puede considerarse como un buen marcador de lesión intestinal en cuanto a pérdida de masa enterocitaria,

atreviéndonos a afirmar que es un buen predictor del momento en que se encontrará mayor atrofia en el intestino, lo que contribuirá a programar más acertadamente el momento *de hacer la biopsia intestinal*, pudiendo llegar a ser una de sus aplicaciones, en un futuro cercano, la de eliminar la obligación de realizar la biopsia en todos los casos.

6.2. CITRULINA Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La idea de ampliar este estudio a la enfermedad inflamatoria intestinal surgió con la práctica diaria. En muchas ocasiones, el debut que presenta la enfermedad inflamatoria intestinal no permite valorar la implicación de la afectación de intestino delgado por la clínica y analítica básica y resulta obligado esperar a la realización de colonoscopia y endoscopia digestiva superior para poder poner, finalmente, la etiqueta. Esta diferenciación tiene importancia clínica ya que, en los casos de enfermedad de Crohn con afectación significativa de intestino delgado, se debe empezar un tratamiento diferente al de los casos de colitis exclusiva, pudiendo en aquéllos emplear el tratamiento nutricional primario, que permite retrasar e incluso evitar el inicio de los corticoides.

Dado que la afectación intestinal en la enfermedad de Crohn es parcheada, puede haber zonas con diferentes niveles de inflamación. La citrulina se produce en el enterocito, como ya se explicó anteriormente, por lo que, siempre que la afectación de intestino delgado sea suficiente como para destruir una considerable cantidad de masa enterocitaria, se producirá una disminución en la síntesis de citrulina, que podrá valorarse en sangre periférica como un descenso de la citrulinemia.

Nuestro centro es referencia para el control y el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal infantil en una amplia zona, diagnosticándose al año unos 10 — 12 casos nuevos, entre enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Esto permitió que, en el período de tiempo en que transcurrió el estudio, se hayan podido seleccionar pacientes en sus dos primeros años tras el debut, evitando así que los resultados se vieran interferidos por tratamientos prolongados o incluso resecciones quirúrgicas.

Entre los parámetros seleccionados podemos ver que la **edad** media de los enfermos de Crohn y la de los afectos de colitis ulcerosa son similares, siendo en general más frecuente que debuten en la pubertad o años finales de la infancia. Los controles elegidos son niños sanos de unos 5 años de edad media, que no presenta diferencia estadísticamente significativa con la de los casos en estudio.

Análogamente a lo que ocurría con los pacientes de enfermedad celíaca, los afectos de enfermedad inflamatoria intestinal que se diagnostican precozmente no presentan una gran alteración del **índice de masa corporal**. En los casos diagnosticados tardíamente aparece sólo una leve disminución del IMC, lo que se puede explicar porque, aunque pueda haber pérdida de peso, también existe marcada afectación de la talla, como trastorno crónico inflamatorio que es.

Se ha realizado la determinación de **calprotectina fecal** como marcador inflamatorio. La calprotectina es una proteína de 36 KD de peso molecular, encargada de fijar el calcio y el zinc, que también tiene actividad antimicrobiana y que deriva, principalmente, de los neutrófilos y monocitos. Constituye cerca

del 60% de las proteínas citoplasmáticas solubles de los granulocitos, desempeñando un papel primordial en la defensa neutrofílica. En consecuencia, se puede deducir que su concentración en las deposiciones estará directamente relacionada con la intensidad del infiltrado neutrofílico en la mucosa intestinal y, por ello, con la gravedad de la inflamación. Los niveles de calprotectina fecal aceptados en la bibliografía como normales para niños mayores de un año son de 50 µg/g, con una sensibilidad del 90% y una especificidad del 83% en su correlación con procesos inflamatorios intestinales^{92,93}. Su principal utilidad en la clínica diaria es la de diferenciar los casos de colon irritable y diarreas funcionales de los de enfermedades inflamatorias intestinales. Por supuesto, al no ser sintetizada en el intestino, pues deriva de las células inmunitarias presentes en éste, la elevación de nivel se produce tanto en la inflamación del intestino delgado como en la del intestino grueso. Se trata, pues, de un marcador de inflamación no específico de ninguna etiología en concreto, por lo que era de esperar el hallazgo de que las cifras medias de calprotectina fecal fueran similares en la enfermedad de Crohn y en la colitis ulcerosa. Los controles eran niños sanos desde el punto de vista digestivo, por lo que su cifra de calprotectina fecal fue normal en todos los casos y francamente diferente, con gran significación estadística, de la de los enfermos. Por lo tanto, la calprotectina es un marcador muy sensible de inflamación intestinal, con escasa especificidad, siendo un excelente diferenciador de enfermedad inflamatoria intestinal, pero no distinguiendo una forma de otra.

La lesión de intestino delgado debe implicar mayor malabsorción de grasa, lo que se puede constatar en heces de 24h. En nuestros enfermos de

Crohn de intestino delgado se objetiva mayor **esteatorrea** que en los sanos, aunque no se trata de una pérdida de grasa comparable con la presente en otras patologías digestivas/absortivas de intestino delgado, como la fibrosis quística.

La **glutamina** en plasma no aparece disminuida, pues el estado proteico corporal de los pacientes está aceptablemente conservado pese a que puedan presentar descenso de albuminemia. Esto se explica porque, en cualquier caso, se puede utilizar la glutamina muscular o, incluso en fases iniciales del diagnóstico, se puede aportar mayor cantidad de glutamina en la dieta de los enfermos, pues se suelen emplear fórmulas poliméricas, en ocasiones hiperproteicas, como suplemento calórico. La cifra de glutamina plasmática no se correlaciona con la afectación intestinal ni es reactante de fase aguda.

La **citrulina** plasmática aparece disminuida en la enfermedad de Crohn con lesión de intestino delgado, incluso hasta cifras comparables con la citrulinemia de los celíacos en fase sintomática. Esto se explica perfectamente por su fisiopatología y confirma a la citrulina como atractivo marcador de afectación de intestino delgado en la enfermedad inflamatoria. La determinación de citrulina plasmática no evitará la realización de la endoscopia y la toma de biopsias pues, en esta enfermedad, es clave averiguar la extensión de la afectación y su localización exacta. Sin embargo, ayudará, mientras se programa dicha exploración, a valorar qué tratamiento se debe iniciar según se sospeche enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa, ya que pone en aviso de la afectación de un segmento significativo de intestino

delgado, permitiendo formular una sospecha diagnóstica de enfermedad de Crohn, aunque sin poder con ello localizar la afectación enterocitaria.

La **arginina** plasmática, derivada de la citrulina por metabolismo renal, predominantemente, es levemente menor en los enfermos de Crohn con afectación de intestino delgado, pero muy similar a la que presentan los casos de colitis ulcerosa y no permite diferenciar ambas entidades entre sí.

Entre los aminoácidos esenciales (precisan ser aportados por la alimentación y absorbidos por el enterocito), se ha elegido la **isoleucina** como modelo por no tener ningún punto de su metabolismo en común con la citrulina o glutamina. Sus cifras plasmáticas son similares en ambos casos de enfermedad inflamatoria intestinal (67'5 $\mu\text{mol/l}$ en enfermedad de Crohn con afectación de intestino delgado frente a 69'6 $\mu\text{mol/l}$ en Colitis Ulcerosa), siendo en ambos mayores que en los controles sanos (56'7 $\mu\text{mol/l}$) de forma significativa, lo cual se podría explicar por una menor metabolización de dicho aminoácido en su primer paso por el intestino.

Al analizar las correlaciones entre citrulina y los demás aminoácidos, se aprecia que no existe correlación estadísticamente significativa en la enfermedad inflamatoria intestinal, probablemente debido al escaso número de casos, pero sí se existe una correlación directa.

Entre citrulina y calprotectina, no se encontró correlación al analizar la enfermedad inflamatoria intestinal globalmente, agrupando los casos de enfermedad de Crohn y de colitis ulcerosa. En cambio, si se analiza la enfermedad de Crohn aisladamente, se aprecia que la cifra de citrulina aumenta al hacerlo la de calprotectina. Este hecho, aparentemente paradójico,

podría explicarse por la propia patogenia de la enfermedad en la que, en ocasiones, predomina el efecto de la actividad inflamatoria, pudiendo llegar a ser mayor que el de la reducción enterocitaria. Así, la citrulina es un marcador de atrofia vellositaria y la calprotectina es identificador de inflamación.

Sería de gran interés continuar la presente línea de trabajo en un futuro inmediato, para confirmar estos datos con estudios extendidos a muestras más amplias y que incluyan en las correlaciones más marcadores absortivos, tratando de comparar los datos según número de lesiones macroscópicas en las endoscopias digestivas superiores.

Posteriormente, sería de interés incluir aplicación de la tecnología de detección del óxido nítrico (NO) sanguíneo en los pacientes con enfermedad celíaca, ya que diferentes estudios *in vitro* y alguno realizado *in vivo*⁹⁴ han evidenciado un aumento del NO sérico en fase clínica y un descenso posterior tras un año de dieta exenta de gluten. De hecho, se ha encontrado que los niños celíacos que no siguen bien la dieta presentan cifras mayores de NO, lo que puede hacer pensar en el NO como un marcador de adherencia al tratamiento, junto con la citrulinemia.

7. CONCLUSIONES

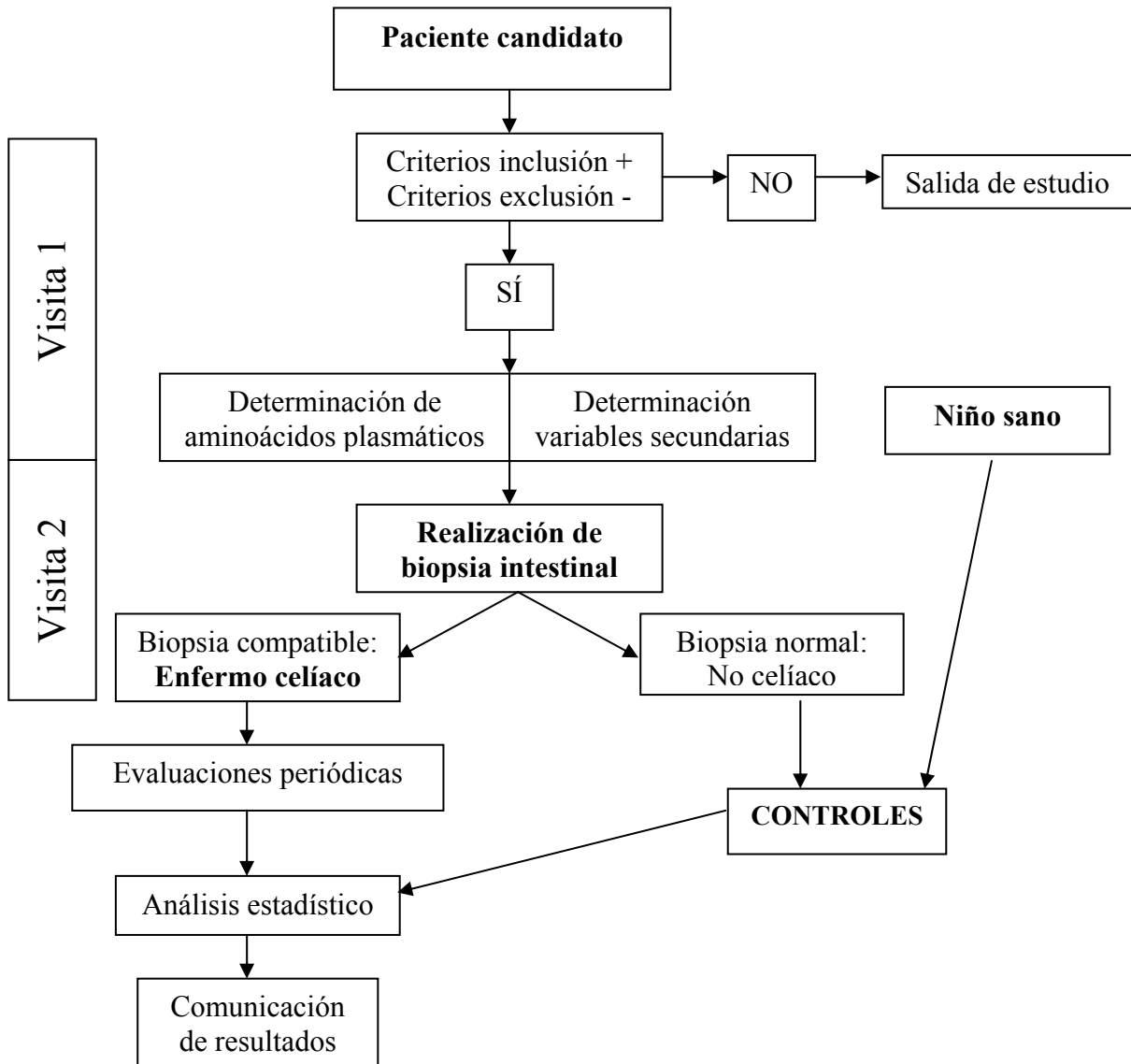
Del análisis de los resultados obtenidos en la presente investigación puede deducirse la corrección de las hipótesis de partida y darse por probada la tesis propuesta, pudiendo establecerse las conclusiones siguientes.

1. La citrulina es un excelente marcador de fallo intestinal, pues existe una correlación entre el descenso de sus cifras plasmáticas y la lesión/atrofia enterocitaria en la celiaquía.
2. La citrulina permite monitorizar la recuperación intestinal en el paciente celíaco tras retirada del gluten, sin necesidad de otras pruebas más invasivas, como la biopsia intestinal.
3. Pese a que existe una correlación entre glutamina, citrulina y arginina plasmáticas, ni la arginina ni la glutamina permiten diferenciar los diferentes grados de atrofia vellositaria como sí hace la citrulina.
4. La citrulina plasmática se correlaciona con el grado de esteatorrea, y ambos pueden utilizarse como marcadores de daño enterocitario, tanto en la enfermedad celíaca como en la enfermedad de Crohn con afectación de intestino delgado.
5. El descenso de las cifras de citrulina plasmática está correlacionado con la lesión enterocitaria en la enfermedad de Crohn con afectación de intestino delgado, en comparación con las formas exclusivas de colitis (colitis por enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa).

6. En la enfermedad inflamatoria intestinal existe correlación entre la citrulina plasmática y marcadores de afectación intestinal, como esteatorrea o calprotectina fecal.
7. La enfermedad celíaca y la enfermedad de Crohn con afectación de intestino delgado son modelos similares en cuanto a pérdida de masa enterocitaria. La citrulina plasmática muestra comportamiento similar en ambos casos.
8. La determinación de citrulina plasmática es un útil marcador de lesión enterocitaria, por su eficacia y simplicidad metodológica.

8. ANEXO

Procedimiento para el estudio de celíacos y el grupo de control



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Walker J, Smith A. Celiac disease. En: *Disease of the Small Intestine in Childhood*, 3rd ed. London: Butterworths, 1988:88-143.
2. Dicke WK, Weijers HA, Van De Kamer JH. Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr.* 1953;42(1):34-42.
3. Hourigan CS. The molecular basis of coeliac disease. *Clin Exp Med.* 2006;6(2):53-9.
4. Howdle PD. Gliadin, glutenin or both? The search for the Holy Grail in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006;18(7):703-6.
5. Troy R, Torgerson. Regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Springer Seminars in Immunopathology* 2006;28:1,63.
6. Carton J, Byrne B, Madrigal-Estebas L, O'Donoghue DP, O'Farrelly C. CD4+CD8+ human small intestinal T cells are decreased in coeliac patients, with CD8 expression downregulated on intra-epithelial T cells in the active disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004;16(10):961-8.
7. Susan Leech. Molecular mimicry in autoimmune disease. *Arch Dis Child* 1998;79:448-451.
8. Papadopoulos G, Wijmenga C, Koning F. Interplay between genetics and the environment in the development of coeliac disease: perspectives for a healthy life. *J Clin Invest* 2001;108:1261-6.

9. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in coeliac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993;105:910–22.
10. Ludvigsson JF, Eylert M, Ilonen J, Ludvigsson J, Vaarala O. Effect of HLA DQ2, dietary exposure and coeliac disease on the development of antibody response to gliadin in children. *Scand J Gastroenterol.* 2006;41(8):919-28.
11. Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, et al. Prevalence of Coeliac disease among children in Finland. *N Eng J Med* 2003; 348:2517-2524.
12. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994;343:200-203.
13. Meewisse G. Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Pediatr Scand* 1970;59:461-463.
14. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, et al. Revised criteria for the diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990;65:909-911.
15. Gandolfi L, Pratesi R, Cordoba JCM, Tauil PL, Catassi C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol* 2000;95:689-92.
16. Vitoria JC, Zubillaga P, Sojo A. Diagnóstico de la enfermedad celíaca. *An Esp Pediatr* 1999;51: 602-608.
17. National Institutes of Health. Consensus Development Conference Statement on Celiac Disease, June 28–30, 2004. *Gastroenterology* 2005; 128 (4 suppl 1):S1–S9. This conference of international experts on celiac disease summarized current knowledge of celiac disease, laid

- groundwork for standardization of diagnosis and treatment of celiac disease and recommended areas for future research
18. Leffler, Daniel A, Kelly, Ciaran P. Update on the evaluation and diagnosis of celiac disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6:191–196.
 19. Brown I, Mino-Kenudson M, Deshpande V, Lauwers GY. Intraepithelial lymphocytosis in architecturally preserved proximal small intestinal mucosa: an increasing diagnostic problem with a wide differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130(7):1020-5.
 20. Troncone R, Greco L, Mayer M, et al. Latent and potential coeliac disease. *Acta Paediatr* 1996; Suppl 412:10-14.
 21. Farrell RJ, Nelly CP. Celiac Sprue. *N Engl J Med* 2002;346(3):180-188.
 22. Grzybowska-Chlebowczyk U, Wos H, Wiecek S, Kajor M, Szymanska M, Staszewska-Kwak A, Piatkowska M, Golka D. Clinical picture of celiac disease in children. *Pol Merkuriusz Lek.* 2005;18(103):49-53.
 23. Cellier C, Delabesse E, Helmer C, et al. Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Lancet* 2000;356:203-208.
 24. Alpers DH. Is glutamine a unique fuel for small intestinal cells? *Current Opinion in Gastroenterol* 2000;16:155–159.
 25. Crenn P, Coudray–Lucas C, Thuillier F, Cynober L, Messing B. Postabsorptive Plasma Citrulline Concentration Is a Marker of Absorptive Enterocyte Mass and Intestinal Failure in Humans. *Gastroenterol* 2000;119:1496–1505.

26. Bienvenu F. Will serologic tests allow to diagnose coeliac disease in children? *Arch Pediatr*. 2006;13(6):574-5.
27. Crenn P, Vahedi K, Lavergne-Slove A, Cynober L, Matuchansky C, Messing B. Plasma Citrulline: A Marker of Enterocyte Mass in Villous Atrophy-Associated Small Bowel Disease. *Gastroenterol* 2003;124:1210-1219.
28. Gondolesi GE, Kaufman SS, Sansaricq C, Magid MS, Raymond K, Iledan LP, Tao Y, Florman SS, LeLeiko NS, Fishbein TM. Defining normal plasma citrulline in intestinal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2004;4(3):414-418.
29. Lutgens LC, Deutz NE, Gueulette J, Cleutjens JP, Berger MP, Wouters BG, von Meyenfeldt MF, Lambin P. Citrulline: a physiologic marker enabling quantitation and monitoring of epithelial radiation-induced small bowel damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;57(4):1067-1074.
30. Campieri M. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut* 2001;48:132-135.
31. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GO: Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *JAMA* 1932;99: 1323-1329.
32. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med* 2000 May;67(3):263-268.
33. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*. 1999 Nov;5(4):285-94.
34. Friedman S, Blumberg RS: Inflammatory bowel disease. In: Braunwald E, ed. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Vol 2. 15th ed. McGraw-Hill Professional Publishing; 2001: 1679-1691.

35. Farrell RJ, Peppercorn MA. Ulcerative colitis. *Lancet* 2002;359:331-340.
36. Sands BE. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2004;126:1518-1532.
37. Sandler RS, Golden AL. Epidemiology of Crohn's Disease. *J Clin Gastroenterol* 1986;8(2):160-165.
38. Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 2000 Sep;35(3):154-167.
39. Montgomery SM, Ekbom A. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2002;18(4):416-420.
40. Ravikumara M, Sandhu BK. Epidemiology of inflammatory bowel diseases in childhood. *Indian J Pediatr* 2006;73(8):717-721.
41. Russell RK, Satsangi J. IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18(3):525-539.
42. Fidder HH, Heijmans R, Chowers Y, Bar-Meir S, Avidan B, Pena AS, Crusius JB. TNF-857 polymorphism in Israeli Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Int J Immunogenet* 2006;33(2):81-85.
43. Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 2000 Sep;35(3):154-167.
44. Chen W, Li D, Wilson I, Chadwick VS. Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay in

- intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(9):987-993.
45. Chen W, Li D, Paulus B, Wilson I, Chadwick VS. High prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *Dig Dis Sci* 2001;46(11):2529-2535.
46. Rudwaleit M, Baeten D. Ankylosing spondylitis and bowel disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006;20(3):451-471.
47. Turkcapar N, Toruner M, Soykan I, Aydintug OT, Cetinkaya H, Duzgun N, Ozden A, Duman M. The prevalence of extraintestinal manifestations and HLA association in patients with inflammatory bowel disease. *Rheumatol Int* 2006;26(7):663-668.
48. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379(6568):821-823.
49. Satsangi J, Jewell DP, Bell JI. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 1997;40(5):572-574.
50. Jantchou P, Monnet E, Carbonnel F. Environmental risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis (excluding tobacco and appendectomy). *Gastroenterol Clin Biol* 2006;30(6-7):859-867.
51. Stawarski A, Iwanczak B, Krzesiek E, Iwanczak F. Intestinal complications and extraintestinal manifestations in children with inflammatory bowel disease. *Pol Merkur Lekarski* 2006;20(115):22-25.

52. Turkcapar N, Toruner M, Soykan I, Aydintug OT, Cetinkaya H, Duzgun N, Ozden A, Duman M. The prevalence of extraintestinal manifestations and HLA association in patients with inflammatory bowel disease. *Rheumatol Int* 2006;26(7):663-668.
53. Rufo PA, Bousvaros A. Current therapy of inflammatory bowel disease in children. *Paediatr Drugs* 2006;8(5):279-302.
54. Zachos M, Tondeur M, Griffiths AM. Enteral nutritional therapy for inducing remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001;(3):CD000542.
55. Hanauer SB, Present DH. The state of the art in the management of inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2003;3(2):81-92.
56. Stoll B, Henry J, Reeds PJ, Yu H, Jahoor F, Burrin DG. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J Nutr* 1998;128:606–614.
57. van Goudoever JB, Stoll B, Henry JF, Burrin DG, Reeds PJ. Adaptive regulation of intestinal lysine metabolism. *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.* 2000;97:11620–11625.
58. Bouteloup-Demange C, Claeysens S, Maillot C, Lavoine A, Lerebours E, Dèchelotte P. Effects of enteral glutamine on gut mucosal protein synthesis in healthy humans receiving glucocorticoids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G677-G681.
59. Bouteloup-Demange C, Boirie Y, Dèchelotte P, Gachon P, Beaufrère B. Gut mucosal protein synthesis in fed and fasted humans. *Am J Physiol* 1998;274:E541–E546.

60. Wu G, Flynn NE, Knabe DA. Enhanced intestinal synthesis of polyamines from proline in cortisol-treated piglets. *Am J Physiol* 2000;279:E395–E402.
61. Wu G. Intestinal Mucosal Amino Acid Catabolism. *J Nutr* 1998;128:1249–1252.
62. Argaman Z, Young VR, PhD, Noviski N, Castillo-Rosas L, Xiao-Ming Lu, Zurakowski D, Cooper M, Davison C, Tharakan JF, Ajami A, Castillo L. Arginine and nitric oxide metabolism in critically ill septic pediatric patients. *Crit Care Med* 2003;31(2): 591-597.
63. Sandstrom P, Gasslander T, Sundqvist T, Franke J, Svanvik J. Depletion of serum L-arginine in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2003;27(3):261-6.
64. Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism in mammals. In: Cynober LA, editor. *Amino acid metabolism and therapy in health and nutritional diseases*. Boca Raton: CRC Press; 2004. pp.153–167.
65. Morris SM. Recent advances in arginine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7:45–51.
66. Wu G. Synthesis of citrulline and arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs. *Am J Physiol* 1997;272:G1382–G1390.
67. Dillon EL, Knabe DA, Wu G. Lactate inhibits citrulline and arginine synthesis from proline in pig enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest* 1999;276:1079-1086.
68. Battezzati A, Brillon DJ, Matthews DE. Oxidation of glutamic acid by the splanchnic bed in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1995;269:E269–E276.

69. Haisch M, Fukagawa NK, Matthews DE. Oxidation of glutamine by the splanchnic bed in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E593–E602.
70. Battezzati A, Haisch M, Brillon DJ, Matthews DE. Splanchnic utilization of enteral alanine in humans. *Metabolism* 1999;48:915–921.
71. Matthews DE, Marano MA, Campbell RG. Splanchnic bed utilization of leucine and phenylalanine in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1993;264:E109–E118.
72. Raguso CA, Ajami AM, Gleason R, Young VR. Effect of cystine intake on methionine kinetics and oxidation determined with oral tracers of methionine and cysteine in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 1997;66:283–292.
73. Castillo L, Chapman TE, Yu YM, et al. Dietary arginine uptake by the splanchnic region in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1993;265:E532–E5299.
74. Fouillet H, Gaudichon C, Bos C, et al. Contribution of plasma proteins to splanchnic and total anabolic utilization of dietary nitrogen in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E88–E97.
75. Torrallardona D, Harris CI, Fuller MF. Lysine synthesized by the gastrointestinal microflora of pigs is absorbed, mostly in the small intestine. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E1177–E1180.
76. Torrallardona D, Harris CI, Fuller MF. Pigs' gastrointestinal microflora provide them with essential amino acids. *J Nutr* 2003;133:1127–1131.

77. Newsholme P, Procopio J, Lima MM, et al. Glutamine and glutamate: their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct* 2003;21:1–9.
78. Huang Y, Shao XM, Neu J. Immunonutrients and neonates. *Eur J Pediatr* 2003;162:122–128.
79. McCowen KC, Bistrain BR. Immunonutrition: problematic or problem solving? *Am J Clin Nutr* 2003; 77:764–770.
80. Douglas G. Burrin and Teresa A. Davis. Proteins and amino acids in enteral nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7:79–87.
81. Conejero R, Bonet A, Grau T, et al. Effect of a glutamine-enriched enteral diet on intestinal permeability and infectious morbidity at 28 days in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome: a randomized, single-blind, prospective, multicenter study. *Nutrition* 2002; 18:716–721.
82. Goulet O, Jan D. Intestinal failure: causes and management in children. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2004, 9:192–200.
83. Goulet O, Ruemmele F, Lacaille F, Colomb V. Irreversible Intestinal Failure 2004; 38:250–269.
84. Gondolesi GE, Kaufman SS, Sansaricq C, Magid MS, Raymond K, Iledan LP, Tao Y, Florman SS, LeLeiko NS, Fishbein TM Defining normal plasma citrulline in intestinal transplant recipients. *Am J Transplant.* 2004; 4(3): 414-418.
85. Pappas PA, Saudubray JM, Tzakis AG, Rabier D, Carreno MR, Gómez-Marín O et al. Serum citrulline and rejection in small bowel

- transplantation: a preliminary report. *Transplantation* 2001;72(7):1212-1216.
86. Lutgens LC, Deutz NE, Gueulette J, Cleutjens JP, Berger MP, Wouters BG, von Meyenfeldt MF, Lambin P. Citrulline: a physiologic marker enabling quantitation and monitoring of epithelial radiation-induced small bowel damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57(4):1067-1074.
87. Rhoads JM, Plunkett E, Galanko J et al. Serum citrulline levels correlate with enteral tolerance and bowel length in infants with SBS. *J Pediatr* 2005;146:542-547.
88. Ziegler T, Bazargan N, Leader LM, Martindale G. Glutamine and the gastrointestinal tract. *Curr Op Clin Nutr Metabol Care* 2000;3:355-362.
89. Yu HC, Tuteja S, Il Moon J, Kleiner GI, Conanan L, Gaynor JJ et al. Utilization of dried blood spot citrulline level as a noninvasive method for monitoring graft function following intestinal transplantation. *Transplantation* 2005;80:1729–1733.
90. Jianfeng G, Weiming Z, Ning L, Fangnan Liu, Li T, Nan L, Jieshou L. Serum Citrulline Is A Simple Quantitative Marker for Small Intestinal Enterocytes Mass and Absorption Function in Short Bowel Patients. *Journal of Surgical Research* 2005;127,177–182.
91. David AI, Gaynor JJ, Zis PP, Conanan L, Goldsmith L, Esquenazi V, Selvaggi G, Wepler D, Nishida S, Moon J, Madariaga JR, Ruiz P, Kato T, Levi DM, Kleiner G, Tryphonopoulos P, Tzakis AG. An association of lower serum citrulline levels within 30 days of acute rejection in patients following small intestine transplantation. *Transplant Proc* 2006;38(6):1731-1732.

92. Berni Canani R, Rapacciuolo L, Romano MT, Tanturri de Horatio L, Terrin G, Manguso F, Cirillo P, Paparo F, Troncone R. Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Dig Liver Dis.* 2004;36:467-470.
93. Costa F, Mumolo MG, Bellini M, Romano MR, Ceccarelli L, Arpe P, Sterpi C, Marchi S, Maltinti G. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Dig Liver Dis.* 2003;35:642-647.
94. Ertekin V, Selimoğlu MA, Türkan Y, Akçay F. Serum Nitric Oxide Levels in Children with Celiac Disease. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:782–785.