



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y PEDIATRÍA

**TESIS
DOCTORAL**

NIVELES DE CITRULINA Y ARGININA EN EL PACIENTE CRÍTICO PEDIÁTRICO

VANESSA ROSA CAMACHO

Directores de tesis

Dr. JAVIER BLASCO ALONSO
Prof. Dr. JAVIER PÉREZ FRÍAS

Málaga 2015


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Vanessa Rosa Camacho

 <http://orcid.org/0000-0002-3432-0665>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y PEDIATRÍA

TESIS DOCTORAL

**NIVELES DE CITRULINA Y
ARGININA EN EL PACIENTE
CRÍTICO PEDIÁTRICO**

Vanessa Rosa Camacho

DIRECTORES DE TESIS

**Dr. Javier Blasco Alonso
Prof. Dr. Javier Pérez Frías**

MÁLAGA 2015

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Dr. D. Javier Blasco Alonso, F.E.A. de Pediatría del Hospital Materno-Infantil Regional Universitario de Málaga, del Servicio de Gastroenterología Pediátrica y el **Dr. D. Javier Pérez Frías**, Catedrático de Pediatría de la Universidad de Málaga.

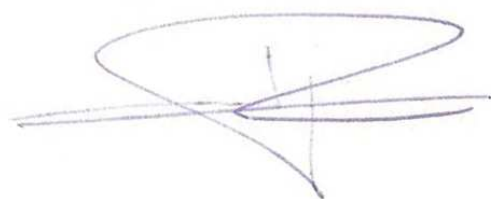
CERTIFICAN:

Que Dña. Vanessa Rosa Camacho ha realizado, bajo la dirección de ellos, una investigación sobre el tema “Niveles de citrulina y arginina en el paciente crítico pediátrico”, recogiendo personalmente el material necesario, efectuando el análisis de casos, la interpretación de resultados y la redacción de la memoria adjunta, que ha sido revisada por los que suscriben, quienes acuerdan que, en su opinión, es factible de ser presentada como Tesis Doctoral para ser defendida ante el Tribunal correspondiente, a lo que dan su conformidad.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman la presente en Málaga.



J. Blasco Alonso



J. Pérez Frías



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AGRADECIMIENTOS

La investigación a la que se refiere la presente Memoria se efectuó en el Servicio Urgencias y Cuidados Críticos Pediátricos del Hospital Materno-Infantil Hospital Regional de Málaga, bajo la dirección del Profesor Dr. Javier Pérez Frías y del Dr. Javier Blasco Alonso, 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 todos los miembros del servicio de Cuidados Críticos de Pediatría su constante colaboración, sobre todo a Pilar Sánchez Yáñez por su implicación; al Hospital, a través del Comité de Ética e Investigación, la evaluación y aprobación del proyecto y, por último, al Servicio de Laboratorio del Hospital Materno Infantil su disposición y eficacia en el análisis de las muestras, en especial a la Dra. Raquel Yahyaoui Macías. Al equipo de FIMABIS por el apoyo estadístico.

A mi familia, por el inmenso tiempo que os he robado, por vuestro apoyo y plena confianza en que podía ser capaz de realizar y llevar a cabo este proyecto. En especial a mi padre, quién me ha enseñado tantos valores en mi vida, y gracias a él he llegado donde estoy con su esfuerzo y dedicación, así como pilar fundamental en las decisiones de estudiar esta maravillosa carrera y especialidad, que me apasiona y me enamora día a día. No solo ha sido un gran padre, marido y amigo, sino mejor abuelo. Nunca lo olvidaremos, y aunque no esté con nosotros ya, siempre estará presente. A mi hermana a la cual adoro y admiro, cuantas cosas me has dado y seguimos compartiendo... A mi madre que tanto me sigue cuidando a pesar de lo que ya he crecido, que ha cuidado de mis hijos mientras trabajaba, estudiaba y no podía estar con ellos, ahora he visto lo que una madre es capaz de querer.

A mis hijos, que me han demostrado el verdadero sentido de esta vida y lo que es el amor incondicional, siento el tiempo que no he podido jugar y reír con vosotros mientras realizaba y redactaba este bonito proyecto, pero que habéis estado ahí, merodeando junto mis piernas, arrugando artículos y dando el toque de color con vuestros garabatos fluorescentes.

A mi esposo, compañero y gran amigo, que me ha demostrado su cariño y gran amor durante todos estos años que llevamos juntos,...media vida,...durante la carrera, el MIR, la especialidad, rotaciones,... y lo duro de nuestro trabajo, faltando tantas horas de casa y sin desconectar del trabajo a ninguna hora. Gracias por tu paciencia, compañía, complicidad, amor y darme lo mejor que tengo en esta vida...esos dos luceros que han hecho que nos volvamos a enamorar de nuevo.

A Javi, mi gran amigo y tutor de tesis, por creer en mí, darme fuerzas y ganas para continuar con esta investigación, por recordarme en cada bajón que era posible terminarlo. Por enseñarme no sólo a encauzar este trabajo, sino también a ser mejor persona y luchar por las injusticias.

A mis amigos, mis enfermeras y auxiliares, siempre ahí presentes en todos los momentos bonitos de mi vida, y también en los difíciles, seguiremos creciendo juntos.

A mis pacientes, que me ponen a prueba cada día, hacen que cada jornada de trabajo sea diferente, llena de retos y gratitudes tanto por parte de ellos, como de sus familias, por los que han colaborado en este trabajo y los que no han podido hacerlo.

A mis hijos Santi y Víctor, y a mi marido, por el tiempo que os he robado.

A mi madre, hermana, y en especial a ti “abuelo Paco”.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INDICE GENERAL





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INDICE GENERAL

	Pág.
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	51
INDICE DE FIGURAS.....	59
INDICE DE TABLAS.....	63
INDICE DE GRÁFICOS.....	67
1. INTRODUCCIÓN.....	37
1.1. LOS AMINOÁCIDOS.....	37
1.2. AMINOÁCIDOS E INTESTINO.....	41
1.2.1. GLUTAMINA.....	43
1.2.2. CITRULINA.....	48
1.2.3. ARGININA.....	49
1.2.4. PROLINA.....	54
1.2.5. OTROS AMINOÁCIDOS.....	55
1.3. METABOLISMO PROTEICO E INTESTINO.....	57
1.4. CITRULINA Y FRACASO INTESTINAL.....	61
1.5. PAPEL DE LA CITRULINA Y ARGININA EN LA INMUNIDAD.....	73
1.6. INMUNONUTRICIÓN E INMUNOMODULACIÓN.....	79
1.7. ARGININA E IMPLICACIONES EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA ANTITUMORAL.....	99
1.7.1. CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS (CMS).....	102
1.7.2. PERSPECTIVAS CLÍNICAS Y APLICACIONES.....	105
1.8. IMPLICACIÓN DE OXIDO NÍTRICO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA.....	109
1.8.1. ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	109
1.8.2. PEROXINITRITOS (ONOO ⁻).....	115
1.8.3. DIÓXIDO DE NITRÓGENO (NO ₂).....	116
1.8.4. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS).....	117

1. 9. SÍNDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA	121
1.9.1 SIRS ASOCIADO A CIRUGÍA CARDIACA	126
1.9.2. FISIOPATOLOGÍA DEL ESTRÉS EN EL PACIENTE CRÍTICO	132
1.9.3. SÍNDROME DE DISFUNCIÓN MULTIORGÁNICA	139
1.9.4. DAÑO ENDOTELIAL Y ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA.....	153
1.10. FENÓMENO DE TRANSLOCACIÓN BACTERIANA INTESTINAL.....	159
1.10.1. BARRERA INTESTINAL.....	160
1.10.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA BARRERA INTESTINAL.....	163
1.10.3. MECANISMO, VÍA Y LOCALIZACIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN BACTERIANA	167
1.10.4. PERMEABILIDAD Y TRANSLOCACIÓN BACTERIANA. SIGNIFICACIÓN CLÍNICA	168
1.10.5. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA TRANSLOCACIÓN BACTERIANA	172
1.11. CAMBIOS EN EL METABOLISMO DURANTE LA ENFERMEDAD CRÍTICA Y LA SEPSIS	177
1.11.1. ENFERMEDAD CRÍTICA Y SEPSIS EN PEDIATRÍA	177
1.11.2. METABOLISMO DE LA ARGININA EN LA SEPSIS	178
1.11.3. CONCENTRACIONES DE ARGININA EN PLASMA EN PACIENTES CRITICAMENTE ENFERMOS Y CON SEPSIS.....	182
1.11.4. CAMBIOS EN LA CINÉTICA DE LA ARGININA DURANTE LA SEPSIS Y LA ENFERMEDAD CRÍTICA.....	185
1.11.5. DEFICIENCIA DE ARGININA EN PACIENTES CRÍTICOS Y SEPSIS ...	189
1.12. ESTRÉS OXIDATIVO EN EL PACIENTE CRÍTICO.....	193
1.12. 1. DAÑO INDUCIDO POR RADICALES LIBRES	195
1.12.2. DAÑO CELULAR	198
1.12.3. ANTIOXIDANTES	199
1.12.4. ROL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LOS ENFERMOS CRÍTICOS.....	200
1.12.5. SEPSIS Y OXIDACIÓN.....	203

1.13. ESCALAS PREDICTORAS DE MORTALIDAD.....	205
2. OBJETIVOS.....	211
2.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	211
2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	211
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	215
3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	215
3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	216
3.3. VARIABLES DE ESTUDIO.....	216
3.4. ASPECTOS ÉTICOS.....	218
3.5. DETERMINACIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL.....	221
3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	221
4. RESULTADOS.....	225
4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	225
4.2. ANÁLISIS BIVARIANTE.....	243
4.3. ESTIMADORES DE RIESGO Y VALORACIÓN DE MARCADORES DE ENFERMEDAD.....	265
5. DISCUSIÓN.....	269
5.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	270
5.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	271
5.3. GRUPO CONTROL.....	273
5.4. EPIDEMIOLOGÍA.....	274
5.5. CINÉTICA DE LOS NIVELES DE ARGININA Y CITRULINA.....	277
5.6. VALOR PRONÓSTICO EN PACIENTES CRÍTICOS.....	283
5.7. ESTIMADORES DE RIESGO Y VALORACIÓN DE MARCADORES DE ENFERMEDAD.....	293
5.8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	297
5.9. LIMITACIONES TEÓRICAS DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS EN ENFERMOS CRÍTICOS.....	303
5.10. PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN.....	307

6. CONCLUSIONES	311
6.1. CINÉTICA DE CITRULINA Y ARGININA EN EL PACIENTE CRÍTICO PEDIÁTRICO	311
6.2. NIVELES DE CITRULINA Y ARGININA COMO FACTOR PRONÓSTICO	313
7. BIBLIOGRAFÍA.....	363
8. PUBLICACIONES.....	363
9. ANEXO	365

ABREVIATURAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AA	Ácidoaraquidónico
AAA	Analizador de aminoácidos
ACCP	<i>American College of Chest Physicians</i> (Colegio Americano de médicos del tórax)
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
APACHE	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i> (Evaluación de la fisiología de la salud aguda y crónica)
ARG	Arginasa
AS	Arginosuccinasa
ASL	Arginosuccinato liasa
ASPEN	<i>American Society for Parenteral and Enteral Nutrition</i> (Sociedad Americana de Nutrición Enteral y Parenteral)
ASS	Arginosuccinato sintetasa
ATP	Adenosintrifosfato
ATS	American Thoracic Society
BH4	Tetrahidrobiopterina
BPI	<i>Bactericidal/ permeability-increasing protein</i> (Proteína bacteriana incrementadora de la permeabilidad)
CAM	Calmodulina
CARS	<i>Compensatory Antiinflammatory Response Síndrome</i> (Síndrome de repuesta antiinflamatoria compensatoria)
CAT	Catalasa
CEC	Circulación extracorpórea
CGT	Test de generación de citrulina

CID	Coagulación intravascular diseminada
CMS	Células mieloides supresoras
COR	Curvas de operación característica del receptor
COX 2	Ciclooxigenasa 2
CrCl	Aclaramiento de creatinina
CSF-1	Factor estimulante de colonias de macrófagos
DE	Desviación estándar
DDAH	Arginina dimetil-amino-hidrolasa
DIM	Dietas inmunomoduladoras
DMA	Dimetilarginina
DVA	Drogas vasoactivas
EC	Enfermedad celíaca
ECr	Enfermedad de Crohn
ECPR	Receptor endotelial de proteína C
EDRF	Factor Relajante Derivado del Endotelio
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
EN	Estrés nitrosativo
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ESICM	<i>European Society of Intensive Care Medicine</i> (Sociedad Europea de Cuidados Intensivos)
ESPGHAN	<i>European Society of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition</i> (Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición)
FAD	Flavina adenina dinucleótido

FEV	Fracción de eyección ventricular
FMN	Flavina mononucleótido
FMO	Fracaso multiorgánico
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
GI	Gastrointestinal
GLA	Ácido gammalinolénico
GLU	Glutamina
GLY	Glicina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GSH	Glutación
Hb	Hemoglobina
HBO ₂	Oxígeno hiperbárico
HLA	Complejo génico mayor de histocompatibilidad
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IFN γ	Interferón gamma
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IMC	Índice de masa corporal
LC-MS/MS	Cromatografía líquida en tándem con espectrómetro de masas
LEU	Leucina
L/M	Lactulosa/ Manitol
L-NAME	L-nitro-arginina metil-éster
LPS	Lipopolisacáridos
LYS	Lisina
M1	Macrófagos tipo 1/ proinflamatorios
M2	Macrófagos tipo 2/ antiinflamatorios

MCT	Triglicéridos de cadena media
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamino dinucleótido reducido
NE	Nutrición enteral
NEC	Enterocolitis necrotizante
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NK	Natural killer
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOHA	N (ω)-hydroxy-L-arginine
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOx	Nitritos y nitratos
NPA	N-propil-L-arginina
NPT	Nutrición parenteral
OAT	Ornitina aminotransferasa
OTC	Ornitina carbamiltransferasa
ODC	Ornitina decarboxilasa
OR	Odds ratio
ORN	Ornitina
PAF	Factor activante de plaquetas
PCR	Proteína C reactiva
PCT	Procalcitonina
PDE5	Fosfodiesterasa 5
PF	Cociente PaO ₂ / FiO ₂

PHE	Fenilalanina
PI	Permeabilidad de la barrera intestinal
PIM	<i>Pediatric Index of Mortality</i> (Índice Pediátrico de Mortalidad)
PMN	Polimorfo nucleares
PRISM	<i>Pediatric Risk of Mortality</i> (Riesgo Pediátrico de Mortalidad)
PRMT6	Proteína arginina metiltransferasa 6
PRO	Prolina
P5CR	Δ 1-pirrolina-5-carboxiloreductasa
P5CS	Pirrolina-5-caboxilatosintasa
RACHS-1	<i>Risk Adjustment in Congenital Heart Surgery</i> (Riesgo ajustado en la cirugía de cardiopatías congénitas)
REDOX	Oxido-reducción
RL	Radicales libres
RLO	Radicales libres de oxígeno
SCCM	<i>Society of Critical Care Medicine</i> (Sociedad de Cuidados Intensivos)
SDMO	Síndrome de disfunción multiorgánica
SDRA	Síndrome de distrés respiratorio agudo
SER	Serina
SIS	<i>Surgical Infection Society</i> (Sociedad de infecciones quirúrgicas)
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SOD	Superoxidodismutasa
SOFA score	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i> (Escala de evaluación secuencial del fracaso multiorgánico)
TAU	Taurina

TB	Translocación bacteriana
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCR	Receptor de las células T
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAP	<i>Total Radical Peroxyl Trappingmethod</i> (Método de captura de los radicales peróxido)
TRE	Treonina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VM	Ventilación mecánica
XO	Xantino oxidasa
ω -3	ácidos grasos omega 3
ω -6	ácidos grasos omega 6

INDICE DE FIGURAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Síntesis endógena de aminoácidos en el enterocito y en el riñón	46
Figura 2. Metabolismo de la arginina	51
Figura 3. Correlación entre citrulina y fallo transitorio y permanente en adultos	68
Figura 4. Correlación entre citrulinemia y lesión enterocitaria	69
Figura 5. Ciclo de la urea	75
Figura 6. Encrucijada de posibles destinos de la L- arginina en macrófagos del sistema inmune a través de la arginina o iNOS	76
Figura 7. Metabolismo arginina-citrulina en condiciones inflamatorias	111
Figura 8. Vía metabólica de producción de NO	112
Figura 9. Esquema de la fase de reoxigenación y reperfusión	131
Figura 10. Evolución de la agresión a SIRS y SDMO	134
Figura 11. Mecanismos del SIRS que pueden conducir a SDMO	137
Figura 12. Mediadores de la inflamación	138
Figura 13. Balance inflamatorio en el SIRS	154
Figura 14. Respuesta del intestino frente la agresión	170
Figura 15. Metabolismo de citrulina y arginina en pacientes críticos	181
Figura 16. Hipótesis de cambios en el metabolismo de la arginina	190



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INDICE DE TABLAS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de aminoácidos	39
Tabla 2. Interpretación de los niveles de citrulina en plasma	65
Tabla 3. Composición de las fórmulas enterales con componentes inmunoactivos	83
Tabla 4. Efectos moduladores de los nutrientes	91
Tabla 5. Efectos inmunes de la arginina	92
Tabla 6. Estudios con inmunonutrición en humanos	95-98
Tabla 7. Alteraciones en el metabolismo de la arginina asociada a enfermedades tumorales	100
Tabla 8. Isoformas de la óxido nítrico sintasa	117
Tabla 9. Grupos de distribución según edad	123
Tabla 10. Variables clínicas y analíticas dependientes de la edad para definir el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)	123
Tabla 11. Fases de la respuesta metabólica al trauma	137
Tabla 12 Criterios de disfunción orgánica	144
Tabla 13. Estudios de la cinética de arginina y citrulina en pacientes críticamente enfermos en niños y adultos	188
Tabla 14. Principales conceptos en estrés oxidativo	194

Tabla 15.Principales daños producidos por radicales libres	196
Tabla 16.Tabla de contingencia distribución de sexo	226
Tabla 17.Tabla de contingencia de tratamiento antibiótico	230
Tabla 18.Tabla de contingencia de necesidad de drogas vasoactivas	231
Tabla 19. Variables analíticas básicas (estadística descriptiva)	233
Tabla 20. Variables analíticas de aminoácidos (estadística descriptiva)	234
Tabla 21.Comparaciones de medias de los analitos de aminoácidos en sus diferentes tiempos	237
Tabla 22. Cinética de las principales variables analíticas, comparando pacientes del grupo control con los enfermos críticos, así como diferenciando los que tienen evolución favorable y desfavorable	240
Tabla 23. Valores demográficos generales y analíticos que presentan diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con evolución favorable y los de desfavorable	244
Tabla 24. Datos de la curva COR para citrulina y arginina a las 0, 12, 24 horas y 3 días, representando el punto de corte, su sensibilidad y especificidad aportada	265
Tabla 25. Tabla con puntos de corte de citrulina y arginina en diferentes momentos y sus resultados de razón de verosimilitudes (odds ratio con intervalo de confianza)	266

INDICE DE GRÁFICOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Frecuencia de aparición evolución favorable/desfavorable	225
Gráfico 2. Diagrama de cajas para comparar la edad respecto a la evolución final	226
Gráfico 3. Diagrama de cajas para comparar las puntuaciones en PRISM respecto a la evolución final	227
Gráfico 4. Diagrama de cajas con la comparativa de días de estancia en UCIP respecto a evolución final	228
Gráfico 5. Diagrama de barras con porcentajes de utilización de ventilación mecánica (VM) y su duración	228
Gráfico 6. Diagrama de cajas con la comparativa de duración de VM (horas) respecto a evolución final	229
Gráfico 7. Diagrama de cajas descriptivo de la duración de VM (horas)	229
Gráfico 8. Diagrama de barras del uso de antibioterapia (%)	230
Gráfico 9. Distribución de pacientes según necesidad de DVA	231
Gráfico 10. Diagrama de barras con las frecuencias de aparición de las principales complicaciones	232
Gráfico 11. Cinética de PCR (mg/L) y PCT (ng/ml)	234
Gráfico 12. Cinética de la citrulina y arginina	235
Gráfico 13. Cinética de la arginina ($\mu\text{mol/L}$) dependiendo de la evolución	238
Gráfico 14. Cinética de la citrulina ($\mu\text{mol/L}$) dependiendo de la evolución	239
Gráfico 15. Niveles de citrulina a las 24 horas según la evolución	245
Gráfico 16. Niveles de citrulina al 3º día según la evolución	246
Gráfico 17. Niveles de citrulina al 7º día según la evolución	247
Gráfico 18. Niveles de arginina a las 12 horas según evolución	248

Gráfico 19. Relación entre arginina a las 12 horas ($\mu\text{mol/L}$) con los días de estancia en UCIP (días)	250
Gráfico 20. Relación entre arginina a las 12 horas ($\mu\text{mol/L}$) con la duración .de ventilación mecánica (horas)	251
Gráficos 21 y 22. Relación entre arginina al 3º día ($\mu\text{mol/L}$) y la citrulina a las 12 horas ($\mu\text{mol/L}$) con duración de la ventilación mecánica (horas)	252
Gráficos 23 y 24. Relación entre citrulina a las 24 horas y al 3º día ($\mu\text{mol/L}$) con duración de la ventilación mecánica (horas)	253
Gráficos 25 y 26. Relación entre citrulina al 7º día ($\mu\text{mol/L}$) con la duración de la ventilación mecánica (horas) y estancia en UCIP (días)	254
Gráfico 27. Relación entre la citrulina a las 12 horas ($\mu\text{mol/L}$) y arginina a las 24 horas ($\mu\text{mol/L}$)	255
Gráfico 28 y 29. Relación entre la arginina a las 24 horas ($\mu\text{mol/L}$) con la citrulina a las 24 horas y al 3º día ($\mu\text{mol/L}$)	256
Gráficos 30 y 31. Relación entre la arginina a las 12 horas ($\mu\text{mol/L}$) y la citrulina al 7º día ($\mu\text{mol/l}$) con la PCR a las 24 horas (mg/L)	257
Gráficos 32 y 33. Relación entre la arginina a las 12 horas ($\mu\text{mol/L}$) y la citrulina al 7º día ($\mu\text{mol/L}$) con la PCT a las 24 horas (ng/mL)	258
Gráficos 34 y 35. Relación entre la citrulina a las 12 horas y al 3º día ($\mu\text{mol/L}$) con la PCR al 3º día (mg/L)	259
Gráficos 36 y 37. Relación entre la citrulina al 7º día ($\mu\text{mol/L}$) y la arginina a las 12 horas ($\mu\text{mol/l}$) con la PCR al 3º día (mg/L)	260
Gráfico 38. Relación entre la larginina a las 24 horas ($\mu\text{mol/L}$) con la PCR al 3º día (mg/L)	261
Gráficos 39 y 40. Relación entre la citrulina al 7º día ($\mu\text{mol/L}$) y la arginina a las 12 horas ($\mu\text{mol/l}$) con la PCT al 3º día (ng/mL)	262
Gráfico 41. Relación entre la arginina a las 24 horas ($\mu\text{mol/L}$) con el ácido úrico al 3º día (mg/L)	263

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. 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 tienen 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* (_OH, o _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 (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los aminoácidos en esenciales/ no esenciales.

AMINOÁCIDOS Y SUS DERIVACIONES	
Aminoácidos esenciales	Aminoácidos que pueden ser sintetizados por el ser humano
Fenilalanina (Phe)	Ácido aspártico (Asp)
Isoleucina (Ile)	Ácido glutámico (Glu)
Leucina (Leu)	Alanina (Ala)
Lisina (Lys)	Asparagina (Asn)
Metionina (Met)	Cisteína (Cys)
Treonina (Thr)	Glicina (Gly)
Triptófano (Trp)	Glutamina (Gln)
Valina (Val)	Prolina (Pro)
Arginina (Arg)	Serina (Ser)
Histidina (His)	Tirosina (Tyr)

1.2. 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 cuerpo¹ y entre un 10% y un 20% del gasto energético total corporal². En varios estudios se ha definido el concepto de tasa de síntesis proteica fraccional, comprobándose que es mayor en el intestino (sobre todo a nivel duodenal), que en el hígado o en el músculo³.

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 sanos³, 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 intestinal (estados catabólicos, trauma, infecciones, medicamentos, ayuno prolongado, nutrición parenteral prolongada...) y existir una translocación bacteriana (TB), 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.

1.2.1. 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 ellos mismos.

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 (figura 1) 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-carboxilato 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), siendo un importante precursor de la misma⁴.

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 hipocitrulinemia⁵.

En diversos estudios⁷ se ha comprobado, 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.

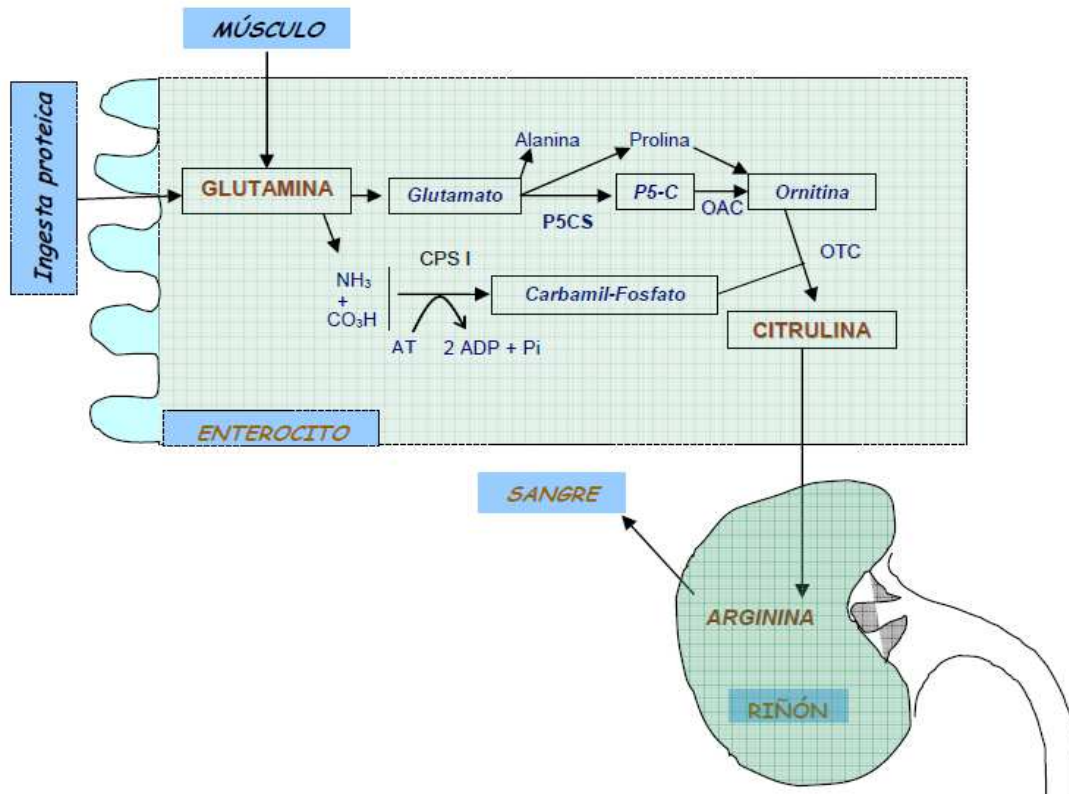


Figura 1. Síntesis endógena de aminoácidos en el enterocito y en el riñón

Formación de citrulina desde glutamina y síntesis renal de arginina a partir de citrulina.

Enzimas limitantes son pirrolina-5-carboxilatosintasa (P5CS) y prolina oxidasa.

[Fuente: Blasco Alonso y cols⁶, 2011]

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 sintetizadas³, sugiriendo estos hallazgos que los aminoácidos diferentes de la glutamina tienen un efecto mínimo en estimular la síntesis proteica en el intestino.

La glutamina es consumida por las células que se replican y es un combustible importante para el mantenimiento y la reparación del tracto gastrointestinal⁸. La deficiencia de glutamina se asocia con atrofia intestinal durante el estrés. El mantenimiento de la integridad del tracto gastrointestinal es un objetivo importante de los pacientes con enfermedad crítica porque la translocación de bacterias y toxinas a través de tracto gastrointestinal se considera una causa de la insuficiencia multiorgánica. Se ha demostrado que las dosis importantes de glutamina previenen la atrofia intestinal, mantienen la integridad intestinal y previenen la translocación bacteriana tras la injuria sobre el intestino. Algunos estudios en animales comunican que la nutrición parenteral (NPT) con suplemento con glutamina mejora la masa intestinal^{9, 10}. Sin embargo la NPT con suplemento con glutamina es menos eficaz que la nutrición enteral (NE) estándar para el mantenimiento de la integridad y la función intestinal. Las soluciones actuales de NPT no contienen glutamina debido a su inestabilidad en solución en periodos prolongados de almacenamiento. Esta ausencia de glutamina contribuye a la atrofia intestinal durante el tratamiento con NPT. Es posible agregar aminoácidos glutamina a la fórmula de NPT inmediatamente antes de la infusión. Los pacientes que reciben fórmula enteral con suplemento de glutamina tuvieron una disminución importante en los incidentes de

neumonía, bacteriemia y sepsis, comparados con el grupo control ¹¹. La alimentación con dietas deficientes en glutamina produce atrofia intestinal y TB en modelos de enfermedad crítica en animales ¹².

Se analiza en un estudio reciente realizado a 7 pacientes pediátricos, que recibieron suplementos perioperatorios intravenosos de glutamina a 0,5g/kg/día, encontrando un aumento de los niveles de glutamina, citrulina y arginina de forma significativa. Se utiliza glutamina con un isótopo marcado encontrando que el 91% de la citrulina sintetizada proviene de la glutamina, mientras que el 49% de la citrulina es usada para la síntesis *de novo* de la arginina. Los riñones, utilizando como precursor la citrulina, fueron los responsables de la producción endógena del 75% de la arginina detectada. Concluyeron que la glutamina y la citrulina son la principal fuente de síntesis *de novo* de la arginina ¹³.

1.2.2. 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 (OAT) y ornitina carbamiltransferasa (OTC), además de la carbamifosfato sintetasa (CPS) para la creación del carbamifosfato 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 NPT 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 glutamina¹⁴.

1.2.3. 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 delgado¹⁵, 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 2). 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 (ARG), arginina-glicina amidinotransferasa, argininodecarboxilasa (ADC)¹⁶.

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 mediante la enzima NOS.

En algunos estudios 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 ¹⁷.

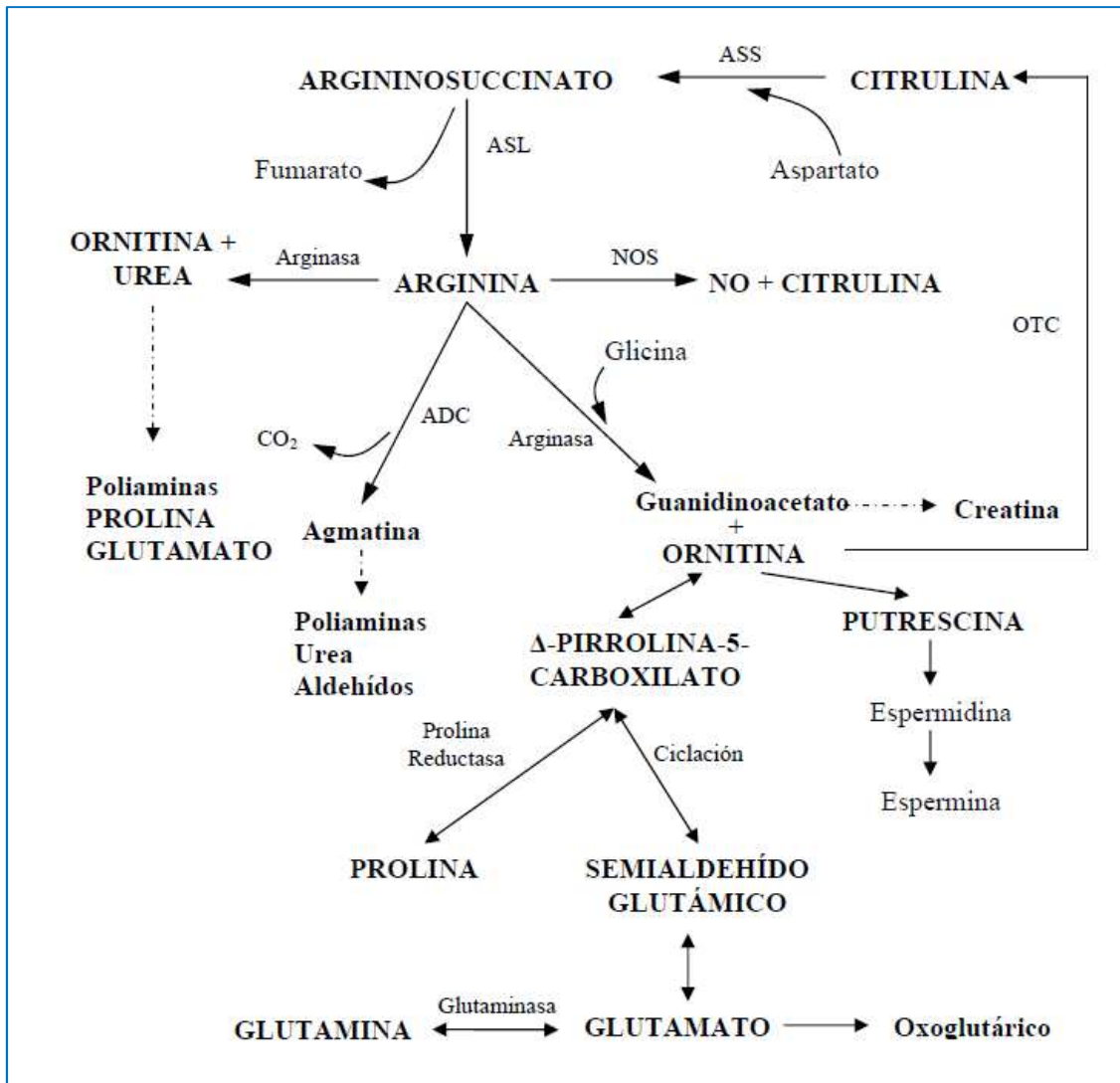


Figura 2. Metabolismo de la arginina

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 nivel de desarrollo, aumentando en situaciones catabólicas como el trauma o la infección¹⁸. 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 riñón¹⁹.

También se encuentra una asociación importante de arginina y asma en diversos estudios, encontrando un déficit de arginina respecto a controles sanos, disfunción en el metabolismo del NO y un aumento de la actividad de arginasa en algunos de ellos^{20, 21}. Por lo que podría ser una nueva estrategia terapéutica en estos pacientes^{20, 21, 22, 23}. Incluso estudios experimentales recientes en modelos murinos con asma, que demuestran beneficios en la administración la L-arginina a altas dosis frente a la hiperreactividad bronquial y la inflamación de la vía aérea²⁴.

- **SISTEMA DE TRANSPORTE DE CITRULINA Y ARGININA**

La producción de arginina tiene un transportador específico que introduce la arginina en el interior de la célula. El transportador más importante de arginina es y+, en una reciente revisión^{25, 26, 27}, el cual consiste en cuatro tipos diferentes de transportadores de amino ácidos catiónicos (CATs): CAT-1, CAT-2a y CAT-2b, CAT-3 y CAT-4^{27, 28}. Los transportadores CAT-2a, CAT-3 y CAT-4 tienen muy baja afinidad por los aminoácidos catiónicos arginina y citrulina²⁹.

CAT-1 está expresado en múltiples células³⁰ como las células endoteliales y epiteliales. En las células endoteliales²⁶, CAT-1 está localizado junto a NOS3 en plasma de la membrana de la caveola con especial afinidad para los

canales de arginina en el endotelio productor de NO. CAT-2b se expresa solamente después de la inducción con citoquinas o lipopolisacáridos (LPS) ante respuesta inflamatoria de las células y está fuertemente asociada a la expresión de NOS2^{28,31}.

En condiciones basales, la arginina se transporta a través de la membrana celular de los monocitos humanos³² y macrófagos murinos derivados de médula ósea, mayormente mediado el transporte a través de y+, asociado a CAT-1, mientras que después de la activación de la respuesta inmune, se incrementa el transporte a través de CAT-2³¹.

La citrulina derivada de la ingesta tiene el transporte regulado por diferentes transportadores sistémicos en los enterocitos del intestino delgado, como los sistemas B⁰⁺, L, y b⁰⁺, La presencia del sistema L en la membrana celular de las células epiteliales realiza el paso de citrulina en ambas direcciones dependiendo del gradiente de concentración. Similar al sistema L, funcionan los sistemas transportadores b⁰⁺ y B⁰⁺, que están localizados en la membrana celular regulando el consumo de citrulina³³. A nivel de las microvellosidades intestinales existen otros transportadores de glutamina del sistema B⁰, el transportador SLC6A19 o B0AT1³⁴.

1.2.4. 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 prolina¹⁹, 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 ARG tipo II se localiza tanto en el citosol como en la mitocondria y la ornitina derivada de la arginina se convierte en prolina, principalmente por las enzimas OAT y 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 humanos³⁵ 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 2).

1.2.5. 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.

1.3. 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 espláncnicos. En estudios in vitro en animales de experimentación, entre un 20% y un 96% de los aminoácidos administrados enteralmente se metabolizan en el intestino³⁶. 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 espláncnico³⁷.

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, en estudios en cerdos³⁸ 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 (NE), 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 glutatión^{39, 40}. En las dos últimas décadas se han realizado múltiples ensayos clínicos en el campo de la inmunonutrición⁴¹ 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 enterocito⁴². 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 NPT 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 inmuno suplementadas. En alguno de ellos⁴³ 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.

1.4. CITRULINA Y FRACASO INTESTINAL

La disfunción gastrointestinal es común en pacientes críticamente enfermos, Reintam y colaboradores⁴⁴ encontraron que el 59% de los pacientes ingresados en UCI tenían al menos un síntoma gastrointestinal durante su estancia en la unidad. En muchos casos, la disfunción intestinal se sospecha por presentar intolerancia digestiva, íleo paralítico, diarrea, sangrado digestivo, o isquemia intestinal. Sin embargo, la valoración del intestino delgado se ve dificultada por dos razones: es un órgano difícil de explorar por encontrarse alejado de la boca y ano, que impide su acceso por medio de endoscopia digestiva y además, los pacientes críticos sedados con otras patologías asociadas con frecuencia no se quejan de dolor abdominal, siendo su valoración clínica complicada durante la fase crítica de la enfermedad. Esto explicaría porque la disfunción intestinal es con frecuencia infradiagnosticada. Asociando los pacientes críticos un peor pronóstico cuando existe disfunción intestinal, con un aumento significativo de la mortalidad. Además, en algunos estudios existe asociación entre la presencia de síntomas gastrointestinales el primer día de ingreso en la UCI con el valor predictivo de mortalidad, reflejando el grado de isquemia que presenta al paciente al ingreso⁴⁵.

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 NPT necesaria y circuito digestivo resultante⁴⁶. Estos términos pueden definirse de la manera siguiente:

– Fracaso intestinal transitorio: Aquél en el que se logra suprimir la NPT 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 NPT o permanece la malnutrición tras un año de supresión de aquélla. En el fallo crónico existen dos posibilidades terapéuticas: trasplante intestinal o NPT domiciliaria. Los requerimientos de la NPT 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 < 15-20cm)⁴⁷. El tratamiento más adecuado del intestino corto con fallo intestinal es la NPT.

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 NPT”.

Entre las causas de atrofia vellositaria destacan celiacía, 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 $\mu\text{mo/l}$, 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 5.2-8.1g 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 NE durante 12 horas, se obtienen resultados algo disminuidos respecto a los obtenidos en condiciones basales normales (Tabla 2).

También un estudio pediátrico reciente, realizado en nuestro centro, se demuestra que la citrulina sirve como marcador de atrofia vellositaria en la Enfermedad Celiaca (EC), 46 pacientes con EC al diagnóstico, 9 con EC con dieta libre de gluten durante 12 meses y 42 controles. Concluyen que la citrulina plasmática en los pacientes con EC es significativamente menor que en los controles, e incluyo mayor descenso aún en los pacientes que tienen mayor grado histológico de atrofia vellositaria. Igual ocurre con los niveles de arginina plasmática, es menor en los casos respecto a los controles ⁶.

Tabla 2. Interpretación de los niveles de citrulina en plasma

SITUACIONES CLÍNICAS	VALORES DE CITRULINA	ADVERTENCIAS	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Adultos caucásicos	40±10 µmol/L	Ayuno	Rabier
Enfermedad/ Fallo intestinal - Sd. Intestino corto - Atrofia vellositaria crónica - Enfermedad celiaca (EC) - Toxicidad intestinal:QT/RT - Trasplante de I. Delgado	↓ ↓ ↓ ↓ Normal salvo complicación	Hidratación normal Reversible Biomarcador no específico de rechazo	Crenn ⁴⁸ , 2000 Crenn ⁴⁹ , 2003 Blasco ⁶ , 2011 Lutgens ⁵⁰ , 2003 Pappas ⁵¹ , 2001
Malnutrición	Normal		Crenn ⁴⁹ , 2003
Estrés metabólico severo	Puede ↓		Jeevanandam ⁵² , 1991
Fallo hepático	Normal		Weber ⁵³ , 1982
Fallo Renal	↑	Si CICr < 50 ml/min	Ceballos ⁵⁴ , 1990
Trastorno ciclo urea	Normalmente ↓	Raro: Déficit de OTC	Zschocke ⁵⁵ , 2004
Envejecimiento	↑ (>70 años)	Chequear función renal	Pitkanen ⁵⁶ , 2003

* QT: Quimioterapia, RT: Radioterapia, CICr: Aclaramiento de creatinina

[Fuente: Crenn y cols⁵⁷, 2008]

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, Crenn⁴⁸ 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 100cm 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 3).

En el año 2003, Crenn⁴⁹ publicó referente a la citrulina como marcador de masa enterocitaria (figura 4). En este estudio se midieron IMC, analítica (albúmina, aclaramiento de creatinina (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 hemoglobina (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.

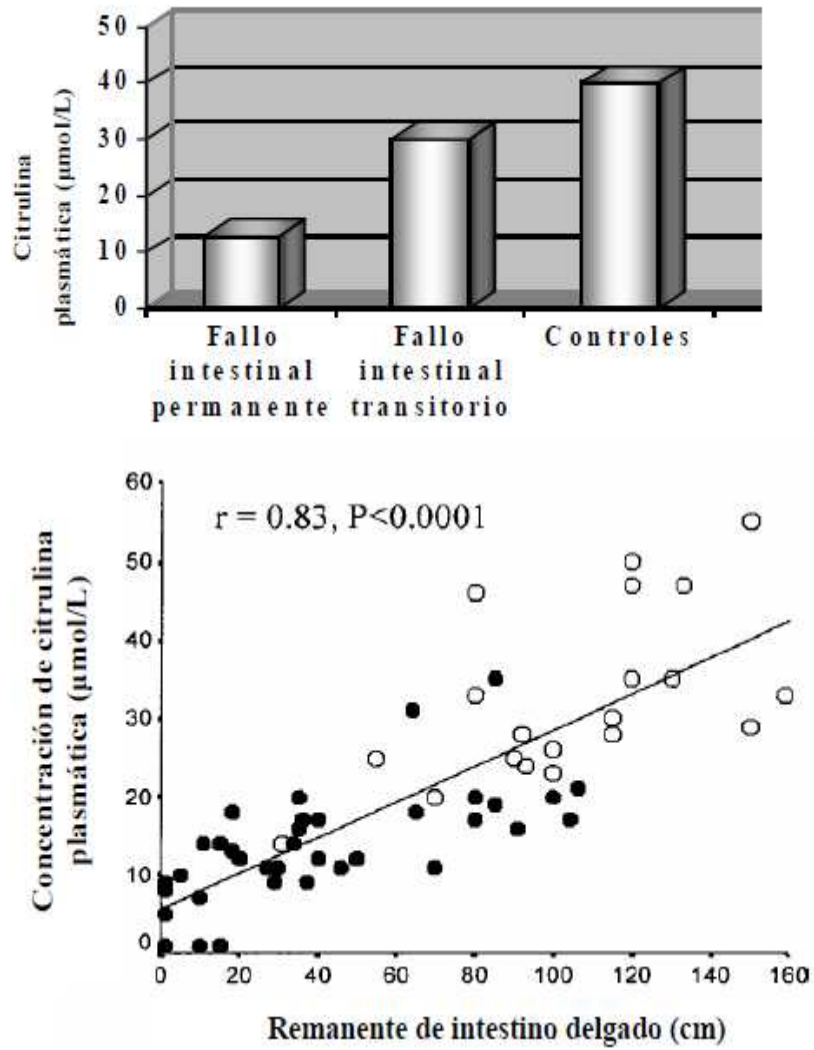


Figura 3. Correlación entre citrulina y fallo transitorio y permanente en adultos

[Fuente: Crenn y cols⁴⁸, 2000]

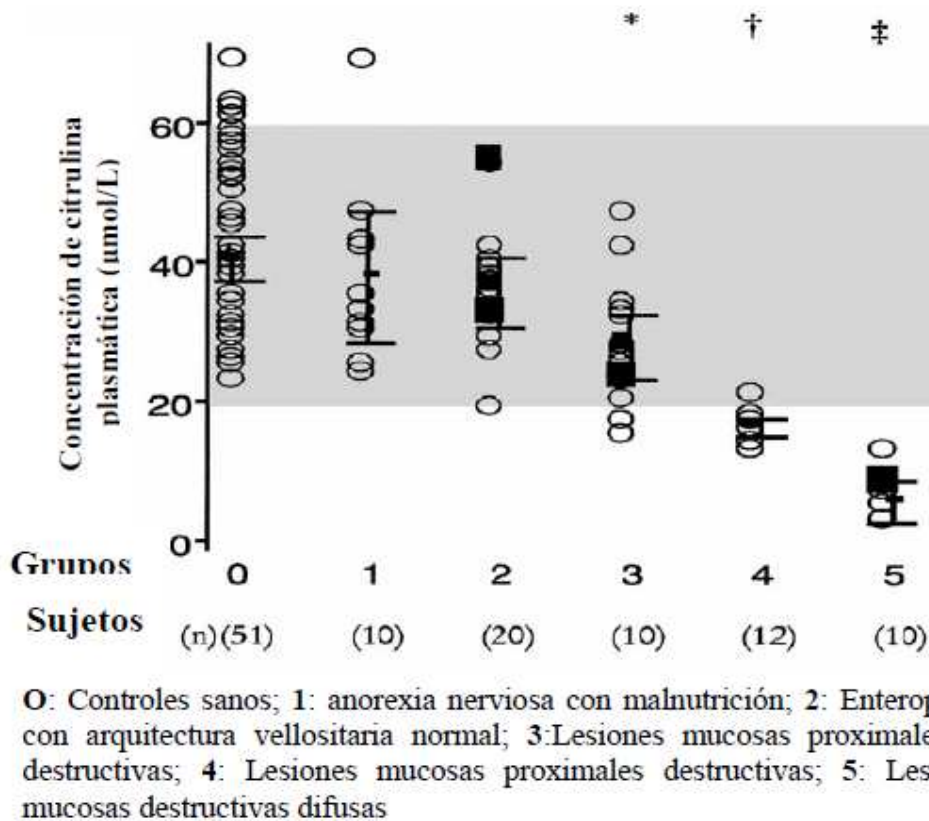


Figura 4. Correlación entre citrulinemia y lesión enterocitaria en adultos

[Fuente: Crenn y cols⁴⁹, 2003]

En otros trabajos recientes^{58,51}, 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. En 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 y cols⁵¹ demostraron que existe una correlación inversamente proporcional entre citrulina plasmática y grado histológico de rechazo del intestino trasplantado.

La irradiación abdominal se puede emplear en múltiples patologías y puede dañar el tejido intestinal con pérdida de masa enterocitaria y de función absorptiva⁵⁰. 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 Galanko⁵⁹ 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 NPT 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 NPT.

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 estudio ⁵⁰ se ha demostrado que la adición de glutamina a la NPT 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 convencional ⁶⁰.

Los trabajos 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. Se comprueba 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 ⁶¹.

David y cols⁶² 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 inicial de rechazo.

Piton y colaboradores⁴⁵, en un estudio reciente, realizan una revisión sistemática de la literatura existente hasta el momento de fracaso intestinal agudo en pacientes críticamente enfermos, y una propuesta de definición de fracaso intestinal agudo. Intentando demostrar que los niveles de citrulina en plasma son un marcador directo del fracaso intestinal⁵⁷.

Lai y colaboradores⁶³, observaron que los suplementos de citrulina atenuaban el daño, y preservaban mejor la masa enterocitaria en yeyuno tras provocar isquemia-reperfusión mediante oclusión de la arteria mesentérica en ratones.

1.5. PAPEL DE LA CITRULINA Y ARGININA EN LA INMUNIDAD

Hace ya 110 años se habló por primera vez de la enzima arginasa (ARG) por Kossel⁶⁴ en 1904, pero no fue hasta 1932, que Francis Krebs descubrió su contribución al ciclo de la urea (figura 5).

Hasta hace unos 20 años la ARG era considerada una enzima que, únicamente, participaba en el ciclo de la urea y que producía ornitina para cerrar el ciclo y urea como vehículo para la desintoxicación del nitrógeno amínico del organismo⁶⁵. En la actualidad, estudios realizados en macrófagos y en células mieloides en general, han permitido considerar la ARG como una enzima que interviene en multitud de funciones celulares muy diversas, que van desde regular la producción de NO, con sus innumerables efectos fisiológicos, hasta participar en respuestas inflamatorias, estrés oxidativo y control de la presión arterial^{66, 67}. La ARG es además diana tanto en el tratamiento de la isquemia-reperfusión del infarto de miocardio, como en fertilidad. Así mismo esta enzima está involucrada en la citotoxicidad sobre células normales, cancerosas o microorganismos⁶⁸. El hecho de que la ARG sea inducible por gran cantidad de citoquinas Th1 (IL-4, IL-10 e IL-13) y por lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana, demuestra su papel central en la respuesta inmune e inflamatoria. Además, la ARG es fundamental en procesos de reparación y proliferación tisular; pues la L-ornitina que se produce puede seguir dos destinos, uno a través de la enzima ornitina aminotransferasa (OAT) hacia L-prolina, que es fundamental en la composición del colágeno; y el

otro mediante la ornitina descarboxilasa (ODC) para la síntesis de poliaminas (Figura 6).

Por tanto, el control de la expresión génica de la ARG en diferentes tejidos y células regula la disponibilidad de arginina para la producción de NO, molécula clave en diferentes procesos celulares, incluida la respuesta inmune, y que se genera por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Como intermediario de esta reacción se produce N(ω)-hydroxy-L-arginine (NOHA), que a su vez es un potente inhibidor de la ARG. De esta manera la producción de NOHA garantiza que no se consuma L-arginina por la ARG, sino que vaya por la vía iNOS. La enzima iNOS es inducida por las citoquinas Th2: interferón gamma (IFN γ), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y beta (TNF β) y por LPS.

Existen dos tipos de macrófagos, los M1, que promueven la actividad inflamatoria; y los M2, que favorecen la reparación de tejidos y disminuyen la inflamación. La opcionalidad de estas funcionalidades en macrófagos depende del estímulo de ambos tipos de citoquinas (Th1 y Th2), que como hemos visto inducen ambas enzimas, ARG e iNOS, respectivamente, de forma que la inducción diferencial controla el equilibrio funcional de la actividad de los macrófagos. Así, por ejemplo, la exposición de cultivos de macrófagos a inductores de iNOS extinguen su habilidad para responder a los inductores de la ARG. Por el contrario, su exposición a inductores de la ARG agotan su capacidad de respuesta a inductores de iNOS. Estas observaciones son consistentes con una competición de ambas enzimas por el sustrato principal, la L-arginina, pero también con una inhibición recíproca en la inducción de

ambos enzimas o incluso con una combinación de ambos fenómenos ^{69, 70}. Existe además una vía de reciclaje de L-arginina a partir de la L-citrulina, mediante dos enzimas de ciclo de la urea, la arginosuccinato sintetasa (ASS) y la arginosuccinasa (AS). Como las poliaminas, son inhibidoras de la iNOS, la acumulación de las mismas inhabilitan la parte del mecanismo de defensa inmune basado en el efecto citotóxico del NO. La urea, producida por la ARG, es inhibidora de la iNOS ⁷¹.

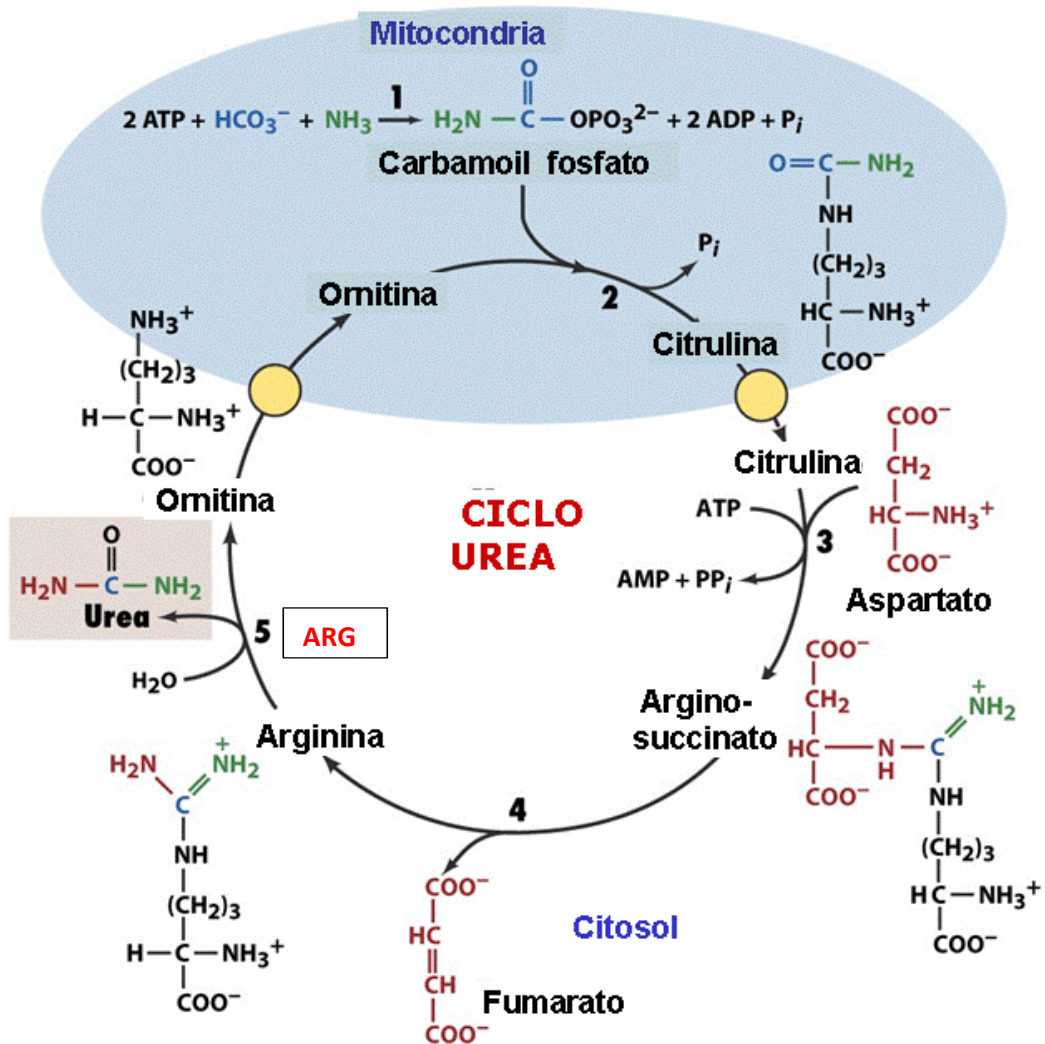


Figura 5. Ciclo de Urea

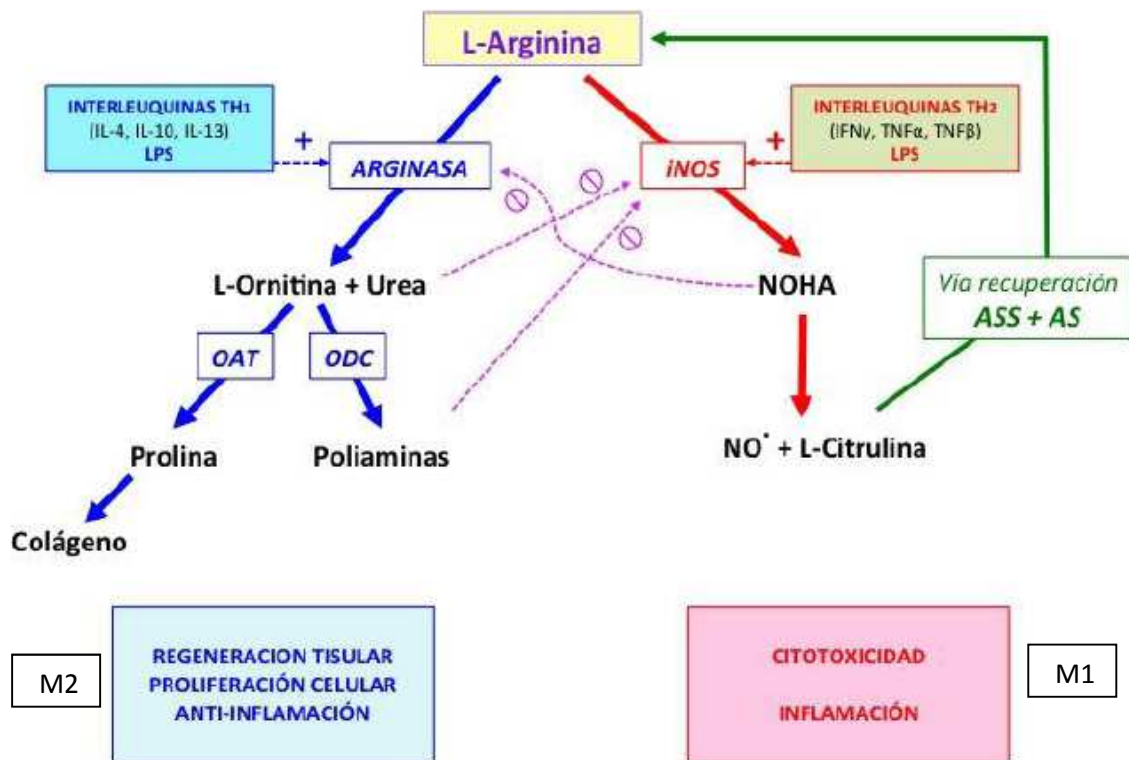


Figura 6. Encrucijada de los dos posibles destinos de la L-arginina en macrófagos del sistema inmune a través de la ARG o de la iNOS.

El primero favorece una función proliferativa, antiinflamatoria, y regenerativa, mientras que el segundo activa los mecanismos de defensa inflamatoria y citotóxica.

[Fuente: Rath y cols⁶⁶, 2014]

En este contexto, debemos enfatizar que la organización de ciclos metabólicos asociados a procesos de diversidad funcional celular demuestra el elevado control de sustratos claves como la L-arginina para permitir a la célula optar por respuestas adecuadas al entorno. Muchas células de mamíferos como neutrófilos, granulocitos, eritrocitos, hepatocitos, miocitos cardiacos, natural killer (NK), células endoteliales y células del musculo liso, entre otras, presentan actividad de ARG y de iNOS a diferentes niveles, lo cual en

combinación con las diferentes formas de activar estas enzimas, confieren al metabolismo de la L-arginina una encrucijada clave en el destino funcional celular⁶⁸.

En el sistema inmune este efecto es decisivo. La inducción de la ARG en células mieloides murinas, como por ejemplo macrófagos por citoquinas Th2 y agentes inflamatorios, participa en una gran variedad de enfermedades inflamatorias por regulación negativa de la síntesis de NO, inducción de fibrosis y regeneración tisular. También, la depleción de la L-arginina, mediada por ARG, suprime la respuesta inmune de las células T, dando lugar a un mecanismo fundamental de inmunosupresión asociada con los procesos inflamatorios.

Es por todo lo que antecede, que la interferencia farmacológica del metabolismo de la L-arginina es una nueva y prometedora estrategia para diferentes tratamientos como el cáncer (la depleción de L-arginina del entorno del tumor favorece su curación por ser un aminoácido esencial para la síntesis de proteínas), la autoinmunidad u otras reacciones inmunes no deseadas como las alergias, ya que al disminuir la accesibilidad a la arginina se frena la proliferación de linfocitos T^{70, 72}.

En pacientes con agresión traumática o intervención quirúrgica, la inmunidad celular suprimida está asociada con una producción disminuida de IFN γ , interleuquina (IL)-2 y una producción aumentada de IL-10, característicos de un patrón de respuesta de células T helper para las respuestas de anticuerpos.

Los macrófagos son la primera respuesta de la inmunidad innata frente a la infección o inflamación. El equilibrio entre los M1/M2 es el responsable de la resolución del proceso, si existe un incremento a favor de los M2 o macrófagos antiinflamatorios, que activa la vía de la ARG, encargada de la reparación de tejidos, disminución de la inflamación, regula el crecimiento tumoral y la fibrosis en el proceso de cicatrización; suprime la activación de las células T, como ocurre en patologías como la esquistosomiasis o la leishmaniasis ^{73, 74, 75}.

En la patogénesis del choque endotóxico, las citoquinas proinflamatorias, como IL-1b, TNF α , INF γ , factor activador plaquetario (PAF) y los LPS, participan en la respuesta inflamatoria, al inducir a la iNOS para la síntesis de NO. Las interacciones entre los mediadores pro y antiinflamatorios juegan un papel crucial en el control de la respuesta inmune adecuada contra la infección. La falta del balance provocará en el paciente una respuesta proinflamatoria masiva o una inmunosupresión refractaria. La estrategia terapéutica para el tratamiento de la sepsis está basada en la patogénesis molecular del shock séptico y el SDMO; los ensayos clínicos han intentado bloquear los efectos de los LPS y de las citoquinas, pero con limitado éxito ⁷⁶.

1.6. INMUNONUTRICIÓN E INMUNOMODULACIÓN

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) que se produce en el marco de procedimientos quirúrgicos, trauma o infección, conlleva un marcado aumento de las demandas metabólicas que finalmente produce depleción de las reservas de algunos nutrientes esenciales⁷⁷. La modificación de la respuesta inmune en estos pacientes, brinda una oportunidad de disminuir la morbilidad; aunque a la fecha no ha demostrado que disminuya la mortalidad que existe en este tipo de pacientes, además de por el propio estrés de su patología de base ⁷⁸.

Algunos componentes de las fórmulas de nutrición pueden afectar la función inmunológica deprimiéndola, mientras que otros pueden reestablecer dicha función, mejorando la respuesta del paciente ante una serie de agresiones ⁷⁹,
⁸⁰.

La inmunomodulación intenta mejorar la fase hiperinflamatoria temprana del traumatismo o agresión. Al mismo tiempo, la recuperación del paciente debería ser tratada con medidas inmunopotenciadoras, teniendo funciones claves moduladoras que actúan a nivel del sistema inmune, inflamación y las diferentes rutas metabólicas. Las fórmulas actuales de farmaconutrientes contienen básicamente glutamina, arginina, ácidos grasos omega-3 y

nucleótidos^{81, 82}. Por lo tanto, la inmunomodulación debería prevenir la sobreactivación de linfocitos, macrófagos, granulocitos y células endoteliales⁸³.

Esta intervención debería tener los siguientes objetivos:

1. Evitar la excesiva estimulación de macrófagos por endotoxinas circulantes o exotoxinas.
2. Lograr limitación, en corto tiempo (<72h), de la respuesta inflamatoria de las células inmunocompetentes.
3. Reactivar la inmunidad mediada por las células inmediatamente a la “inmunoparálisis postraumática”.

Los investigadores reconocen que la respuesta dentro del intestino y la pérdida de la integridad funcional de la mucosa intestinal secundaria a isquemia y reperfusión, pueden tener consecuencias sistémicas. Xu y cols⁸⁴, en 1997, mediante estudios experimentales han documentado alteraciones significativas en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), en modelos animales tras shock hemorrágico o daño tisular. El GALT está constituido por las placas de Peyer, ganglios linfáticos mesentéricos, linfocitos de la lámina propia e intraepiteliales. Los cambios en la respuesta inmune del GALT pueden contribuir a la disfunción de la mucosa intestinal y una susceptibilidad

incrementada a sepsis de origen intestinal tras la lesión traumática. Se encontró también que el GALT desaparece cuando no hay alimentación enteral y se restaura rápidamente con la administración de nutrientes a través del tracto gastrointestinal. Debido a que el GALT es la fuente de linfocitos que secretan Ig A, el cual es el responsable de la inmunidad de mucosas en todo el organismo, incluyendo vía respiratoria. Es fácil deducir que la alteración del GALT por el uso exclusivo de la nutrición parenteral en pacientes críticamente enfermos podría conducir a una deteriorada resistencia a microorganismos en la vía respiratoria, a menudo el primer órgano que participa en la cadena que conduce al síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO). El mayor beneficio de la alimentación enteral sería la restauración del GALT, el cual contribuye a la formación de la barrera intestinal ⁸⁵. Diversos estudios han demostrado que la intervención con dieta inmunomoduladora (DIM) disminuye la incidencia de infecciones nosocomiales, días de estancia hospitalaria y reducen los costes hospitalarios en pacientes seleccionados. Los efectos más consistentes han sido en pacientes con trauma severo, incluidos pacientes quemados. Aquellos bajo procedimiento quirúrgico importante, y de éstos, especialmente el paciente desnutrido previo al evento quirúrgico ⁸¹.

Datos contradictorios existen en cuanto a la suplementación nutricional durante la sepsis o shock séptico, encontrando algunos estudios en los que incrementa la mortalidad ⁸⁶. Disminuyen los días de estancia en UCI y de ventilación mecánica, pero secundarios a una mortalidad precoz. Si bien, en los estudios existentes, no existe unificación de las dosis administradas, ni vía de administración. Encontrando mayor tendencia a hipotensión arterial al

administrar arginina a alta dosis por vía parenteral y en bolo ⁸⁷, siendo más segura su forma de administración en perfusión continua o por vía enteral. Se objetivó en este grupo de pacientes con sepsis un incremento de los niveles del NO ^{88, 89}, sospechando que el incremento de la producción del NO derivado de la suplementación de arginina, era la causa de perpetuar la vasodilatación arterial, con el agravamiento del shock, y el incremento de la mortalidad. Se intentó inhibir este aumento de síntesis de NO, mediante la inhibición de la NOS en un ensayo clínico ⁹⁰, en el que identifican mejoría de tensión arterial y aumento de resistencias vasculares, pero con un aumento de la mortalidad, por lo que sugieren que el NO puede ser beneficioso durante la sepsis. Necesitando cierto grado de vasodilatación esplácnica para proteger el riñón, así como inhibir la adhesión leucocitaria y agregación plaquetaria ^{91, 92}. A pesar de la multitud de efectos teóricos sobre la utilización de suplementación, no encontramos estudios que avalen su utilización. Galbán⁹³ en el estudio realizado a 181 pacientes con sepsis, compara dos grupos: dieta suplementada con arginina frente a dieta isocalórica e isonitrogenada, encontró una disminución de la mortalidad en el grupo con dieta suplementada, menor número de bacteriemias y de infecciones nosocomiales. Teniendo en cuenta como limitación que son en pacientes con puntuación en la escala de APACHE-II inferior a 15 en los que disminuye la mortalidad, y no en el subgrupo con estrés grave, con dicha escala superior a 15 puntos.

Son muchas las fórmulas con componentes inmunoactivos que encontramos en el mercado, se reflejan en la tabla 3. Incluso algunas de las fórmulas

españolas difieren con las extranjeras, en cuanto a los componentes que incluyen.

Tabla 3. Composición de las fórmulas enterales

NOMBRE COMERCIAL	Kcal/ml	PROTEÍNAS g/100ml (%)	GRASAS g/100ml	H. CARBONO g/100ml (%)	OSMOLARIDAD (osm/l)	ARGININA (g/100ml)	GLUTAMINA (g/100ml)	ω -3 (g/100ml)	OTROS COMPONENTES
Alitrac®	1	5.27 (21) 42% péptido	1.5 (14) 53% MCT	16.4 (65)	480	0.45	1.42	0.15; 4.23	Carnitina, taurina
Impact®	1	5.6 (22)	2.76 (25) 27% MCT	13.4 (53)	477-519	1.25	No tiene	0.34; 0.7	ARN, antioxidantes
Oxepa®	1.52	6.25 (16.6)	9.37 (55.6) 25% MCT	10.6 (27.9)	384	No tiene	No tiene	0.95; 1.85	Carnitina, taurina, GLA, antioxidantes
Perative®	1.3	6.7 (20.5)	3.7 (25.4) 40% MCT	17.7 (54.1)	308	0.85	No tiene	0.16; 4.8	Carnitina, taurina, antioxidantes
ImmunoAid®*	1.5	5.3 (15)	50% MCT	17.2 (48.8)	580	2	1.3	-	Carnitina, taurina
TraumaCal®	1.5	6.8 (22)	6.8 (25) 40% MCT	14.2 (52)	560	0.7	No tiene	0.35; 1.7	Carnitina, taurina

Todos los datos se presentan en gramos por 100ml de producto. Además, aparece entre paréntesis el valor calórico total de proteínas, grasas e hidratos de carbono. En el caso de las grasas, también aparece el porcentaje de grasas que son triglicéridos de cadena media (MCT). En el caso de los ácidos grasos omega-3 (ω -3), aparece su concentración en gramos por cada 100ml de producto, seguido del cociente omega-6/omega-3 (ω -6/ ω -3). GLA: ácido gammalinolénico.

* Sobre de 123g diluido en 350ml

[Fuente: Sanz y cols⁹⁴, 2004]

Kudsk y cols⁹⁵, en 1996, seleccionaron al azar pacientes con traumatismo, comparando una dieta inmunopotenciadora versus una dieta control y encontró complicaciones infecciosas en 6% de los pacientes que recibieron dietas inmunopotenciadoras, frente a 41% en los controles. La estancia hospitalaria, la terapéutica antibiótica y el desarrollo de abscesos intrabdominales fueron más bajos en pacientes con DIM. Este resultado clínico se reflejó también en un menor coste hospitalario.

Senkal y cols⁹⁶, en 1997, concluyen que la inmunonutrición postoperatoria temprana significativamente redujo las complicaciones postquirúrgicas ocurridas después del quinto día postoperatorio. Estos estudios sugieren que la inmunonutrición postoperatoria, para ser efectiva necesita una adecuada dosis y tiempo de administración.

Weimann y cols⁹⁷, en 1998, documentaron que pacientes que recibieron alimentación enteral con dietas inmunopotenciadoras cursaron significativamente con menores días de SIRS, 8 ± 6.3 días vs 13.3 ± 6.7 días, y puntuaciones de fallo multiorgánico (SDMO) significativamente más bajas.

Chuntrasakul y cols⁹⁸, en 1998, alimentando durante 14 días a pacientes con traumatismo severo, quemados y cáncer a base de una fórmula inmune compuesta por arginina, glutamina y ácidos grasos omega-3, encontraron una

mejoría en los parámetros nutricionales vistos a los 7 y 14 días; un incremento en todos los casos del recuento de leucocitos CD4+ (linfocitos T colaboradores), CD8+ (linfocitos T citolíticos), C3 (glucoproteína que desempeña un papel crucial en la activación del complemento), Ig A, Ig G y la proteína C reactiva (PCR) disminuyó significativamente al séptimo día de postoperatorio.

Houdijk y cols⁹⁹, en 1998, compararon una dieta enteral enriquecida con glutamina con una dieta estándar isocalórica e isonitrogenada, administradas durante cinco días seguidos en pacientes politraumatizados graves mediante un estudio prospectivo en el que incluyeron 70 pacientes. El subgrupo suplementado con glutamina tuvo menor incidencia de neumonía, sepsis y bacteriemia.

La NTP total enriquecida con dipéptidos de glutamina tiene efectos beneficiosos después de la cirugía mayor sobre el balance nitrogenado, el mantenimiento de la concentración plasmática de glutamina, la recuperación de los linfocitos, la generación de leucotrienos y sobre la estancia hospitalaria, según un ensayo clínico, prospectivo, doble ciego¹⁰⁰.

Heys y cols¹⁰¹, en 1999. En otro metaanálisis de once ensayos clínicos controlados en los que se comparaba: la nutrición enteral convencional frente a la nutrición enteral enriquecida con nutrientes “clave” (glutamina, arginina,

nucleótidos, ácidos grasos omega-3), solos o en combinación, observó en el segundo grupo una disminución de complicaciones infecciosas y una reducción significativa de la estancia hospitalaria.

Gianotti y cols¹⁰², en 2000, administraron perioperatoriamente (7 días preoperatorios y 8 días postoperatorios), una dieta suplementada con arginina, ácidos grasos omega 3 y ARN a pacientes con cáncer de estómago y colón. Se demostró un incremento significativo de las concentraciones de prealbúmina y proteína enlazante del retinol, además de mejorar la inmunidad celular y la síntesis de proteínas de vida media corta, en relación al grupo control.

Un estudio experimental en ratas, demostró que la administración de 5 días de NPT exclusiva, comparada con una dieta normal, reduce la masa de GALT, los niveles de Ig A en intestino y pulmón, y aumenta la mortalidad infecciosa de origen respiratorio. Esta diferencia se puede revertir si a la NPT se le añade el neuropéptido de bombesina. Lo cual puede conducir a nuevas modalidades terapéuticas en aquellos pacientes que sólo pueden recibir alimentación vía parenteral¹⁰³.

Heylan y cols¹⁰⁴, en 2001, realizan una revisión sistemática de 22 estudios, en 18 se recogen las complicaciones infecciosas, encontrando que los pacientes que reciben inmunonutrición presentan menor número de complicaciones infecciosas: neumonías nosocomiales, infecciones de herida quirúrgica,

abscesos intraabdominales, infecciones urinarias y sepsis relacionadas con catéter. Con un RR 0.66 (IC 95% de 0.54-0.8) y disminución de los días de estancia hospitalaria en 3.3 días (IC 95% de 1-5.6 días). No existen diferencias significativas en cuanto a la mortalidad. Comparan 2 grupos con pacientes enfermos críticos e ingresos programados por cirugía, encontrando beneficio en pacientes ingresados por cirugía electiva con menor incidencia de infecciones, y no se encuentra beneficio en pacientes críticos ingresados por otro motivo. Encontrando en ambos grupos disminución de la estancia hospitalaria.

Montejo y cols¹⁰⁵, en 2003, realizaron un metaanálisis de 26 ensayos clínicos sobre inmunonutrición, y analizaron los resultados clínicos. Encontraron una disminución de la tasa de infecciones en los pacientes que reciben inmunonutrición enteral (abscesos intraabdominales OR 0.26, neumonía nosocomial 0.54 y bacteriemia OR 0.45), no existen diferencias respecto a la mortalidad, pero si encuentran una significación estadística en cuanto a la reducción de días de ventilación mecánica con una media de 2.25 días, días de estancia en UCI 1.6 días y reducción de días estancia hospitalaria en 3.4 días. En cuanto al análisis en los diferentes grupos encontraron descenso de bacteriemias y abscesos intraabdominales en los pacientes ingresados para cirugía electiva, pero no presentaron beneficios frente a la neumonía nosocomial. Sin embargo, en el grupo de pacientes quemados si se evidencia disminución en la incidencia de la neumonía asociada a ventilación mecánica.

Farber y cols¹⁰⁶, en 2005, observaron una reducción significativa de la incidencia de infecciones nosocomiales, reducción de días de ventilación mecánica y estancia hospitalaria, con una reducción considerable de costes respecto al grupo control.

Briassoulis y cols¹⁰⁷, en 2005, concluyen que los pacientes críticamente enfermos, que reciben una dieta enriquecida con arginina, fibra y antioxidantes, presentan una menor incidencia de sepsis relacionadas con catéteres, sin encontrar diferencias en la mortalidad, ni en los días de estancia hospitalaria. Pero en el subgrupo en el que la dieta se mantuvo más de 2 días se observó una menor mortalidad a los 6 meses.

Smith y cols¹⁰⁸, en 2006, realizaron un estudio en niños postoperados de cirugía cardiovascular con bypass, administraron citrulina oral e intravenosa siendo bien tolerada sin repercusión hemodinámica, y los resultados muestran mantenimiento de los niveles de arginina, citrulina y las concentraciones de nitritos y nitratos (NOx), lo que puede disminuir el riesgo de hipertensión pulmonar en el postoperatorio de estos pacientes¹⁰⁹.

La revisión de la Cochrane del 2014, donde Tan y cols¹¹⁰, realizaron una revisión sistemática de los estudios existentes sobre la inmunonutrición en los pacientes quemados, encontraron evidencias en la disminución de la mortalidad en estos pacientes tras administrar glutamina en la dieta. Sin poder

recomendarla sistemáticamente por necesidad de más estudios que así lo avalen. Si concluyen que la glutamina podría disminuir la mortalidad en este grupo de pacientes.

Una óptima situación debería garantizar concentraciones suficientes de nutrientes inmunopotenciadores antes de la cirugía, es decir en el preoperatorio. La ventaja de este tratamiento ha sido demostrada en varios estudios ^{96,102}. La suplementación en el preoperatorio con inmunonutrientes evitó la caída de la fagocitosis, el número absoluto de linfocitos circulantes y la tasa CD4/CD8, y efectivamente moduló la síntesis de leucotrienos ^{111, 112}.

En la respuesta metabólica frente a la injuria, la glutamina proporciona, en un tercio, la fuente de nitrógeno para la función de órganos vitales, reparación de heridas y las defensas del huésped. La glutamina y los nucleótidos ejercen un efecto directo sobre la proliferación de linfocitos e indirectamente sobre el estado antioxidante. En un estudio reciente encontraron que los aportes de glutamina en pacientes perioperatorios pediátricos suponen la principal fuente de regeneración de citrulina y síntesis *de novo* de arginina en el riñón ^{113, 114, 115}.

Otro componente clave en la dieta suplementada es la arginina y sus efectos sobre el sistema inmune que se muestran en las tablas 4 y 5. Ejerce importantes funciones metabólicas ^{116, 117}, algunas de ellas mediadas por la vía L-arginina-NO, La arginina ha sido identificada como el único precursor del NO

y tiene un efecto modulador sobre la mayoría de células del sistema inmune^{118, 119}. A dosis bajas el NO potencia la mitogénesis de las células T, y a altas dosis cumple una función inhibitoria. Aun cuando la arginina facilita la fagocitosis, tanto la arginina como el NO atenúan la adherencia del neutrófilo¹²⁰. Los macrófagos parecen estar en el centro del metabolismo del NO en el sistema inmune. Ellos son los productores primarios de iNOS y NO en respuesta al estímulo inflamatorio¹²¹.

La actividad iNOS en macrófagos ha sido relacionada a mecanismos de destrucción intracelular de bacterias y parásitos^{122, 123}. El NO contribuye a la transformación de las células Th1 hacia el fenotipo Th2, y está acompañado por una disminución de las citoquinas proinflamatorias, con un incremento en la producción de IL-4 e IL-10^{124, 125}. La producción del NO por la iNOS depende de la biodisponibilidad extracelular de arginina, y de la arginina intracelular intercambiable, que puede no ser suficiente para una producción prolongada de NO y, por tanto, para activar mecanismos de transporte de membrana para la arginina¹²⁶.

Braga y cols¹¹¹, en 1996, encontraron que la administración perioperatoria de las dietas enriquecidas condujo a un incremento de los niveles plasmáticos de NO al primer y cuarto día de la cirugía. La administración de la arginina antes y después del traumatismo mejoró la supervivencia del paciente, potenciando el recambio bacteriano intestinal en los pacientes con sepsis¹²⁷, y este efecto fue revertido cuando se administró inhibidores del NO. También la arginina

incrementa la respuesta alogénica y mitogénica del linfocito, la citotoxicidad de las células NK y la producción de IL-2 ¹²⁸.

La administración perioperatoria de inmunonutrientes podría contrarrestar las alteraciones de la respuesta inflamatoria, inmune y función de barrera intestinal de forma efectiva y temprana ^{129, 85}. Sin embargo, estos beneficios son controvertidos en pacientes bien nutridos ¹³⁰, mientras que en pacientes críticamente enfermos no afecta a la mortalidad, pero si mejora la morbilidad ^{131, 132}.

Tabla 4. Efectos moduladores de los nutrientes

ARGININA	<ul style="list-style-type: none"> ↑ La respuesta de las células T, estimulando la mitosis y disminuyendo la respuesta de hipersensibilidad ↑ Número de las NK ↑ Niveles de citoquinas ↑ Producción del NO ↑ Producción de prolactina, insulina y glucagón Estimula cicatrización de heridas y síntesis de colágeno
GLUTAMINA	<ul style="list-style-type: none"> ↑ La respuesta de las células T, estimulando la mitosis ↑ Los linfocitos B, su diferenciación y producción de anticuerpos ↑ Función de neutrófilos y fagocitosis de los macrófagos ↑ Producción de citoquinas Mantenimiento de la función de la barrera intestinal

[Fuente: Heys y cols ¹³³, 2004]

Tabla 5. Efectos inmunes de la arginina

ACCIÓN	ANIMALES	HUMANOS
Respuesta mitogénica del linfocito		
- En Salud	SI	SI
- Injuria/estrés	SI	SI
Rechazo de injertos	SI	NR
Citotoxicidad tumoral in Vitro	SI	SI
Respuesta antitumoral in vivo	SI	NR
Supervivencia en sepsis	SI	NR

*NR: No realizado

[Fuente: Apaza y Calderón¹⁴⁰, 2002]

En la tabla 6 reflejamos un resumen de los principales estudios realizados en humanos con dietas inmunomoduladoras, y sus resultados.

En humanos, un estudio ha sugerido que el estado nutricional perioperatorio es más importante para la cicatrización de las heridas, que el estado nutricional total. Estos datos demuestran un beneficio definido, aun cuando la deprivación nutricional postoperatoria sea de corto tiempo. En sepsis, la terapia nutricional y sus complicaciones pueden afectar la incidencia y curso de la sepsis¹³⁴. Sin embargo, se objetivó que no tenía beneficio e incluso era contraproducente, en pacientes con sepsis severa, SDMO y shock. En estas condiciones severas, se creyó que el SIRS desencadenado podría ser indeseablemente intensificado por la arginina, afectando directamente la defensa celular y respuesta

inflamatoria. Por lo tanto sería recomendable tener precauciones al administrar sustratos inmunopotenciadores a los pacientes que sufre un gran SIRS, porque podría agravarla ¹³⁵.

También en prematuros de bajo peso se han realizado diversos estudios con suplementación de la dieta con arginina vía enteral y/o parenteral, como prevención del desarrollo de enterocolitis necrotizante (NEC), demostrando su eficacia frente al mismo, sin presentar efectos secundarios significativos, sin repercusión hemodinámica ni empeoramiento del desarrollo neurológico a largo plazo ^{5, 136, 137}.

Un estudio experimental reciente, realizado en ratones, a los que les inducen un déficit de arginina mediante la administración de arginasa intraperitoneal, concluye que la suplementación con L-citrulina es más efectiva para aumentar los niveles de arginina en plasma, aumenta la producción de NO, y mejora el flujo de la microcirculación esplácnica con respecto al grupo con suplementos de L-arginina ¹³⁸.

Otro estudio reciente realizado en ratones que suplementan la dieta con L-citrulina versus L-citrulina combinada con glutatión (GSH) vs placebo, demuestran que dicha asociación (L-citrulina+GSH) aumenta los productos derivados del metabolismo del NO, nitritos y nitratos (NOx) tanto *in vivo* como *in vitro* ¹³⁹.

Lai y cols ⁶³ también realizan un estudio en ratones provocando isquemia-reperfusión intestinal, mediante oclusión de la arteria mesentérica superior durante 60 minutos. Administran arginina, citrulina y glutamina 15 minutos antes de la perfusión y a las 3, 9 y 21 horas posteriores a la misma. Observaron disminución de la inflamación sistémica, apoptosis en mucosa yeyunal y nNOS en intestino tras la isquemia-reperfusión. En el grupo que recibe citrulina presenta más atenuación del daño intestinal, preservando más la masa yeyunal, parcialmente por inactivación de la vía NOS y de la vía NF- κ B, que en los grupos que reciben arginina y glutamina.

La inmunomodulación está aún bajo una intensa investigación, puede que sea beneficiosa con agentes combinados, en vez de con uno solo. La única estrategia disponible para el clínico en pacientes con cirugía o traumatismo es la inmunonutrición, que debería ser fuertemente considerada como una ventaja para modular no sólo la respuesta inmune inflamatoria, sino también los mecanismos de defensa del huésped en todos sus aspectos; aparte de mejorar el pronóstico y reducir las complicaciones en pacientes críticos sujetos a agresión traumática, quirúrgica o sepsis. La inmunonutrición debería ser empezada tempranamente para un óptimo efecto beneficioso, preferiblemente por vía enteral.

Tabla 6a. Estudios con inmunonutrición en humanos

ESTUDIO	POBLACION	DIETAS	EFFECTOS	COMENTARIOS
Cerra ¹⁴¹ , 1990	Quirúrgicos n=22	Impact [®] vs Osmolyte [®]	Núm. de infecciones, moratidad ni EH (NS)	Incluido en metaanálisis*
Gottschlich ¹⁴² , 1990	Quemados n=50	Traumacal [®] vs Osmolyte [®]	↓ infecc. herida quirúrgica y EH	Incluido en metaanálisis*
Daly ¹⁴³ , 1992	Quirúrgicos n=85	Impact [®] vs Osmolyte [®]	↓ complicaciones de la herida y EH	Incluido en metaanálisis*
Moore ¹⁴⁴ , 1994	Traumatológicos n= 114	Immun-Aid [®] vs Vivonex [®]	↓ abscesos abdominales y SDMO ↓ Mortalidad (NS)	Incluido en metaanálisis*
Brown ¹⁴⁵ , 1994	Traumatológicos n= 85	Dieta experimental suplementada vs Dieta normal	↓ infecciones tardías ↑ Incidencia neumonía	No incluido > tasa de neumonías grupo a estudio
Daly ¹²⁸ , 1995	Quirúrgicos n= 60	Impact [®] vs Traumacal [®]	↓ infecciones, complicaciones y EH	Incluido en metaanálisis*
Bower ¹⁴⁶ , 1995	Médicos n=36 Quirúrgicos n=60 Traumatológicos n= 248	Impact [®] vs Osmolyte [®]	↓ EH en los que alcanzaron necesidades nutriciones y en sepsis ↑ Mortalidad	Incluido en metaanálisis*
Kudsk ⁹⁵ , 1996	Traumatológicos n=35	Immun-Aid [®] vs Promote [®]	↓ infecciones y EH ↓ Mortalidad (NS)	Incluido en metaanálisis*
Schilling ¹⁴⁷ , 1996	Quirúrgicos n=30	Impact [®] vs Fresubin [®]	NS disminución infecciones ni EH	Incluido en metaanálisis*

NS: No significativa; EH: Estancia hospitalaria. IC: Isocalórica, IN: Isonitrogenada *Metaanálisis de Beale

Tabla 6b. Estudios con inmunonutrición en humanos (cont.)

ESTUDIO	POBLACIÓN	DIETAS	EFECTOS	COMENTARIOS
Senkal ⁹⁶ , 1997	Quirúrgicos n=164	Impact [®] vs IC, IN	↓ infecciones tardías	Incluido en metaanálisis*
Mendez ¹⁴⁸ , 1997	Traumatológicos n=43	Dieta experimental suplementada vs Osmolyte [®]	↑ neumonías, días VM y EH	No incluido Mayor SDRA en el grupo estudio
Hasselman ¹⁴⁹ , 1997	UCI	Impact [®] vs IC, IN	↓ infecciones	No incluido (>nº de infecc. previas)
Saffle ¹⁵⁰ , 1997	Quemados n=50	Impact [®] vs Replete	No efecto	No incluido
Heslin ¹⁵¹ , 1997	Quirúrgicos n=deconocido	Impact [®] vs Dextrosa 5%	No efecto	Dosis inadecuada de dieta administrada
Weimann ⁹⁷ , 1998	Traumatológicos n=32	Impact [®] vs IC, IN	↓ EH y días VM (NS)	No incluido
Braga ¹⁵² , 1998	Quirúrgicos n=110	Impact [®] vs IC, IN	↓ Severidad infecciones	Incluido en metaanálisis*
Atkinson ¹³¹ , 1998	Médicos n=222 Quirúrgicos n=732 Traumatolog n=36	Impact [®] vs Osmolyte	↓ EH y días VM ↑ Mortalidad (NS)	Incluido en metaanálisis*
Galban ⁹³ , 2000	Sépticos n=181	Impact [®] vs Precitene (IC;IN)	↓ Mortalidad	Incluido en metaanálisis*

NS: No significativa; EH: Estancia hospitalaria. IC: Isocalórica, N: Isonitrogenada *Metaanálisis de Beale

Tabla 6c. Estudios con inmunonutrición en humanos (cont.)

ESTUDIO	MÉTODOS	INTERVENCIÓN	EFECTOS
Braga ¹⁵³ , 2002	3 grupos aleatorizados n=50, 50 y 50. Cirugía mayor oncológica	1. Impact® perioperatoria 2. Impact® pre-OP + NC-PO 3. Dieta IC e IN peroperatoria Volumen: 28Kcal/kg/día Inicio 7 días pre-OP al 7º día-PO Consiguen objetivo nutricional 100%	↓ Tasa infecciones (11% vs 24% vs 32%, Grupo 1, 2 y 3 respectivamente) ↓ EH en los grupos suplementados
Di Carlo ¹⁵⁴ , 1999	3 grupos n=33, 35 y 32 Pacientes quirúrgicos	1. Impact® 2. Dieta IC e IN 3. Dieta parenteral Inicio a las 12h PO Objetivo: 25kcal/kg/día (alcanzan 84% del objetivo) Consiguen objetivo nutricional	↓ Mortalidad (Grupo 1: 33%, Grupo 2: 40% y grupo 3: 52%; p < 0.01) ↓ Severidad de las infecciones ↓ Fallos de sutura ↓ EH
Gianotti ¹⁰² , 2000	Doble ciego, aleatorizado 2 grupos paralelos n=102 y 104 Cirugía mayor oncológica	1. Impact® 2. Dieta IC e IN Inicio 7 días pre-OP hasta 7º día PO Volumen 1L/día No objetivo nutricional al 100%	↓ Costes significativos en el grupo suplementado
Gianotti ¹⁵⁵ , 2000	Diseño abierto 3 grupos paralelos Aleatorizados n=71, 73 y 68 Cirugía mayor oncológica	1. Impact® 2. Dieta IC e IN 3. Dieta parenteral Inicio a las 12h PO (Duración 6h) Objetivo: 25kcal/kg/día Consiguen objetivo nutricional	↓ Mortalidad (Grupo 1: 33.8%; Grupo 2: 43.8%, Grupo 3: 58.8%; p < 0.05) ↓ EH

Pre-OP: preoperatorio; PO: postoperatorio; EH: Estancia hospitalaria; IC: Isocalórica, IN: Isonitrogenada

Tabla 6d. Estudios con inmunonutrición en humanos (cont.)

ESTUDIO	MÉTODOS	INTERVENCIÓN	EFECTOS
Gianotti ¹⁵⁶ , 2002	3 grupos paralelos Aleatorizados n=102, 101, 102 Cirugía mayor oncológica	1. Impact [®] pre-OP 2. Impact [®] pre-OP y PO 3. No nutrición 5 días pre-OP o en 12h PO 1L/día pre-OP, 1,5L/día PO Consiguen objetivo nutricional	↓ Tasa de infecciones (Grupo 1: 13.7%; Grupo 2: 15.8%, Grupo 3: 30.4%; p <0.006) ↓ EH
McCarter ¹⁵⁷ , 2000	Doble ciego 3 grupos paralelos n= 17, 16 y 17 Cirugía mayor oncológica	1. Suplemento con arginina + ác. omega 3 2. Suplemento con arginina 3. Suplemento nutricional 7 días pre-OP	No hallan diferencias entre la tasa de infecciones, ni en la morbilidad global, ni la mortalidad No diferencias en la EH
Senkal ¹²⁹ , 1999	Doble ciego 2 grupos paralelos n= 89 y 89 Cirugía mayor oncológica	1. Impact [®] 2. Dieta habitual isoenergica Inicio 5 días pre-OP y 12h PO 3L/día pre-OP y 1,05J/kg/día PO Consiguen objetivo nutricional	↓ Tasa de infecciones (Grupo 1: 14%; Grupo 2: 27%; p <0.05)
Bertolini ⁸⁶ , 2003	Realizado en 33 centros Estratificados 2 grupos n=237 1. Sepsis grave n=36 2. Sepsis no grave n=201	No completado NTP vs Perative [®] (19 vs 17) (101 vs 100)	↑ Mortalidad en el grupo de sepsis grave, interrupción del ensayo
Dent ¹⁵⁸ , 2003	5 centros norteamericanos y canadienses	No completado	↑ Mortalidad relacionada con neumonía previa a inmunonutrición

Pre-OP: preoperatorio; PO: postoperatorio, EH: Estancia hospitalaria; IC: Isocalórica, IN: Isonitrogenada

1.7. ARGININA E IMPLICACIONES EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA ANTITUMORAL

Se han propuesto dos posibles mecanismos por medio de los cuales el aumento de la actividad de ARG podría estar actuando en un proceso tumoral (tabla 7):

El primero de ellos es la *regulación negativa* de la respuesta inmune frente al tumor ^{159, 160}, por disminución en la proliferación de los linfocitos, detención de la progresión del ciclo celular ¹⁶¹, regulación de la función de los linfocitos T ^{162, 163} y disminución en la expresión de la cadena CD3z en los linfocitos T ¹⁶⁴.

El segundo mecanismo sería *promoviendo el crecimiento tumoral* al transformar la arginina en precursores de poliaminas ^{159,160, 165}. Se objetivó que la sobreexpresión de la ornitina descarboxilasa (ODC), enzima que metaboliza la ornitina en putrescina, tuvo como efecto la transformación de la línea celular NIH/3T3 y el aumento en el desarrollo del tumor y en su capacidad invasiva ¹⁶⁶. Se han informado niveles de poliaminas dos a tres veces más altos en cáncer de seno comparado con tejidos sanos; además, se propone que la proteína arginina metiltransferasa 6 (PRMT6) actúa como cofactor de transcripción reprimiendo a p21, que es supresor de tumor y se ha informado que detiene el ciclo celular durante la génesis tumoral del cáncer de mama ^{167, 168}.

Tabla 7. Alteraciones en el metabolismo de la arginina asociadas a enfermedades tumorales

NEOPLASIA	ALTERACIÓN	REFERENCIA
Adenocarcinoma de colón	Incremento de ODC	Viola ¹⁶⁴ , 2007 Wu ¹⁶⁹ , 2009 Appleton ¹⁷⁰ , 2002 Rodríguez ¹⁷¹ , 2008
Carcinoma de células renales	Incremento de ARG por CMS	Zea ¹⁶⁷ , 2005 Tate ¹⁷² , 2012
Carcinoma hepatocelular	Disminución de actividad ARG con respecto al tejido de hígado cirrótico y normal.	Hoechst ¹⁷³ , 2008
Carcinoma pulmonar de células grandes	Altas concentraciones de ARG I	Zakrzewicz ¹⁷⁴ , 2012 Fujita ¹⁷⁵ , 2010
Carcinoma de colón	Incremento de actividad ARG	Kono ¹⁷⁶ , 1998
Carcinoma de células basales Carcinoma de células escamosas	Incremento de actividad ARG y niveles de ornitina en tejido	Appleton ¹⁷⁰ , 2002 Jiao ¹⁷⁷ , 2012
Carcinoma de cabeza y cuello	Incremento de actividad ARG por CMS	Appleton ¹⁷⁰ , 2002 Jiao ¹⁷⁷ , 2012
Carcinoma gástrico	Incremento de actividad ARG	Mauskopf ¹⁹⁶ , 2012 Kono ¹⁷⁶ , 1998
Leucemias	Incremento de actividad ARG	Zea ¹⁶³ , 2004
Carcinoma de próstata	Incremento de actividad ARG y sobreexpresión de NOS2 y ARG I	Gannon ¹⁷⁸ , 2010
Carcinoma de seno	Incremento de actividad de ARG. Inducción de apoptosis en linfocitos T por NOHA (producto intermedio de NOS-NO)	Viola ¹⁶⁴ , 2007 Rodríguez ¹⁶⁸ , 2007

CMS: Células mieloides supresoras

[Fuente: Isaza Correa y cols¹⁷⁹, 2014]

Se ha demostrado que el NO, principal producto de la vía mediada por la NOS, estimula la angiogénesis tumoral y la permeabilización vascular en tumores sólidos. También se ha relacionado la NOS2 con la regulación de la actividad de la COX-2 (ciclooxigenasa 2), molécula que juega un papel importante en la progresión de varios tipos de cáncer por la vía de síntesis de prostaglandinas y la angiogénesis ^{159, 180, 181, 182}. Para el caso del melanoma se ha encontrado que debido al bajo nivel de la enzima argininosuccinato sintetasa (ASS) en las células tumorales, se crea una dependencia a la arginina exógena y que existen ventajas importantes en la terapia de privación de arginina en comparación con la quimioterapia citotóxica convencional ^{160, 182, 184}.

Además de la disminución en la expresión de la cadena CD3z, se han descrito otras alteraciones en la respuesta inmune frente al tumor asociadas al metabolismo de la arginina, por lo que la expresión de la ARG y el agotamiento de la L-arginina se han convertido en una vía inmunosupresora potente ¹⁸⁵.

En los de pacientes con cáncer de pulmón en estadios III y IV, antes y después de la quimioterapia con cisplatino y etopósido, se objetivó una disminución en la producción de IFN- γ en células T y de otras citoquinas proinflamatorias¹⁷², asociadas a la disminución en la expresión de la cadena CD3z ^{184, 186}.

1.7.1. CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS (CMS)

Son una población heterogénea de células de origen mieloide que tiene por función regular negativamente la respuesta de los linfocitos T. Se ha informado que dichas células se generan a partir de precursores hematopoyéticos en respuesta a citoquinas producidas por el tumor, entre ellas GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), IL-3, VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), IL-10 y CSF-1 (factor estimulante de colonias de macrófagos).

Estas citoquinas no solo reclutan las CMS, sino que también favorecen su maduración como un mecanismo para evadir la respuesta inmune ¹⁷⁰. Se ha observado que las CMS se encuentran tanto en el microambiente tumoral como en la periferia, posiblemente generando un microambiente idóneo para que las células malignas proliferen y adquieran nuevas mutaciones que les permitan expandirse y evadir la inmunovigilancia del huésped ^{187, 160, 165, 188}. Las CMS fueron descritas originalmente en cáncer de cabeza y cuello, y posteriormente se las caracterizó en carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células grandes, cáncer de seno, cáncer de colon y melanoma, en estos últimos como un factor clave en la inmunosupresión causada por defectos en las células T ¹⁷⁷.

Las CMS son reguladoras de la respuesta antitumoral, representan un grupo de células con amplia plasticidad en términos de fenotipo y función, la

subpoblación que tiene funciones inmunorreguladoras posee mecanismos supresores específicos del tumor que promueven la tolerancia tumoral en el modelo murino.

Estas células han mostrado la capacidad de bloquear la función efectora de la célula T, inhibiendo la liberación de citoquinas como IFN- γ y disminuyendo la expresión de la cadena CD3z del receptor de células T (TCR); además, las CMS pueden disminuir las propiedades migratorias del linfocito T activado, como se ha informado en casos de cáncer de pulmón, y en el modelo murino promueven la angiogénesis en el tumor ¹⁷⁶.

Los mecanismos de inhibición dependen del tipo de tumor; los más estudiados describen la capacidad para bloquear linfocitos CD4 y CD8, y la reacción antígeno-específica y no específica; también su acción en la inmunidad innata para bloquear la citotoxicidad de las células NK, así como la activación de las células dendríticas y la función de los macrófagos ¹⁸⁹. Se ha propuesto que los mecanismos por los cuales las CMS alterarían la función de los linfocitos T son dependientes de la actividad de ARG I producida por los linfocitos.

Entre los principales efectos desencadenados por la expresión de la enzima sobre los linfocitos T se informan la inhibición por contacto, la inducción de células T reguladoras (Treg) y de apoptosis ¹⁹⁰, todos ellos con el claro propósito de regular negativamente la respuesta inmune frente al tumor ^{183, 173, 168}. La inhibición por contacto requiere la presencia de las dos principales enzimas del metabolismo de arginina, ARG y NOS, en las CMS ¹⁷⁸. Por otra

parte, se informó que la inducción de apoptosis es dependiente de la alta producción de peroxinitritos, derivados del metabolismo de la arginina por NOS2, y las bajas concentraciones de arginina. La NOS2 y la ARG I producidas por las CMS pueden actuar individual o sinérgicamente en la regulación negativa de la función de los linfocitos T ¹⁶⁴.

Los principales efectos de la expresión de ARG I por las CMS demostrados por estos autores fueron la inhibición de la expresión del TCR y de la respuesta de células T antígeno específica ¹⁸⁷. La disminución de la expresión de la cadena CD3z por efecto de las CMS con la consecuente inactivación de los linfocitos efectores y el silenciamiento de LT autorreactivos in vitro¹⁹¹ e in vivo también fueron informados en eczema crónico por Marhaba y cols¹⁹², en 2007.

Rotondo y cols¹⁹⁰, en 2009, describieron una menor expresión intracelular de ARG I en las CMS infiltrantes de tumor frente a las CMS intravasculares y peritumorales, en muestras de pacientes con cáncer de pulmón de células grandes. Se estudió la función de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y la actividad relacionada de ARG I en carcinoma pulmonar no microcítico, en el que linfocitos infiltrantes del tumor mostraron reducción de la proliferación en respuesta a la activación CD3/TCR¹⁷⁹.

La inmunohistoquímica mostró que la infiltración del tumor por leucocitos PMN reduce la ARG I intracelular, en comparación con los PMN intravasculares o peritumorales, lo que sugiere un papel de liberación en el microambiente tumoral de ARG I ¹⁷¹. La inhibición de la acción de las CMS tanto in vivo como

in vitro, por depleción de la subpoblación o uso de inhibidores de las enzimas metabolizadoras de arginina como NOHA y sildenafilo restaura la respuesta inmune, disminuyendo la proliferación de las células Treg y la tolerancia inducida por el tumor y restableciendo la proliferación de LT y la expresión de CD3z.

Los hallazgos muestran que las CMS tienen capacidad para captar y presentar antígenos específicos del tumor a las células T reguladoras con requerimiento de ARG; es así como se establece un rol para las CMS en la inducción de la tolerancia mediante la captación de antígenos ^{193, 70, 187, 163, 190}.

1.7.2. PERSPECTIVAS CLÍNICAS Y APLICACIONES

La gran importancia del metabolismo de la arginina en la modulación de la respuesta inmune frente a algunos tumores convierte a sus enzimas y productos del catabolismo en un blanco terapéutico por excelencia.

Se ha demostrado que los inhibidores de NOS 2: L-nitro-arginina metil-éster (L-NAME) y sildenafilo (de la familia de los inhibidores de fosfodiesterasa 5), y de la ARG I, como NOHA, restringen el crecimiento del tumor al reducir su volumen y vascularización e incrementan la respuesta inmune antitumoral al inhibir la funcionalidad de las CMS y restaurar la respuesta de los linfocitos T ^{193, 194, 164, 178}.

Recientemente Gannon y cols¹⁹⁵, en 2010, muestran que el uso de andrógenos induce la expresión de ARG I y ARG II en líneas celulares derivadas de cáncer de próstata. También se ha demostrado que la terapia antiandrogénica reduce la expresión in vitro de ARG II en el tumor primario de pacientes con este tipo de neoplasia.

Se ha encontrado la ARG modulando la función del linfocito T por agotamiento del sustrato; en un modelo murino de trasplante de aloinjerto corneal, la inhibición de la ARG in vivo aceleró el rechazo y en pequeñas dosis permitió la supervivencia de la piel en el trasplantado; es así como en la inmunología del trasplante de córnea la ARG tiene un papel en la prevención del rechazo y posiblemente este efecto podría observarse en otros aloinjertos¹⁹¹.

La suplementación de la dieta con arginina en dosis bajas (50 mg/kg/día) mostró efectos positivos en modelos murinos en cuanto a la disminución del número total de tumores y el aumento de la tasa de supervivencia de los ratones; sin embargo, otros hallazgos señalan que dicha suplementación puede inhibir o promover el crecimiento del tumor dependiendo del estadio en que se administre. En el cáncer colorrectal la administración de arginina en las etapas iniciales inhibe el crecimiento tumoral, pero cuando el tumor está ya establecido, lo estimula^{169, 170, 171}. Por otra parte, la suplementación oral o enteral con arginina puede ser un apoyo en la inmunonutrición antes y después de cirugía gastrointestinal para ayudar a prevenir complicaciones posquirúrgicas en pacientes oncológicos¹⁹⁶.

Las concentraciones de arginina, ARG y NOS en la sangre periférica o los tejidos tumorales han mostrado tener relevancia clínica en cuanto a la progresión tumoral, el pronóstico y la supervivencia de pacientes con cáncer ¹⁹⁵. Se proponen estos indicadores como una estrategia de seguimiento terapéutico ¹⁶⁴. Se ha informado la disminución de la cadena CD3z como un marcador de pronóstico negativo y menor supervivencia ^{176, 197}, mientras que el aumento en la actividad de la ARG se ha señalado como un marcador de progresión en los cánceres de seno y colorrectal ¹⁶⁴. Otros resultados muestran que el polimorfismo en 27 pb, del intrón 4 del gen eNOS está fuertemente asociado con la supervivencia de pacientes con cáncer pulmonar en etapa avanzada tratados con quimioterapia estándar ¹⁷⁵. También se ha encontrado la reversión de la regulación negativa de la cadena CD3z en las células T tras la adición de inhibidores de la ARG I como Nor-NOHA y fosfodiesterasa 5 (PDE5), entre otros, al incrementar la biodisponibilidad de la arginina en el medio. Se ha observado la reexpresión de la cadena CD3z in vitro en cultivos y líneas celulares tumorales como consecuencia de la regulación del metabolismo de la arginina ^{168,171}. In vivo hay evidencias de un aumento de la respuesta inmune mediada por células como resultado de la regulación de este aminoácido semiesencial en modelos murinos y en humanos con trauma, sepsis y cáncer ^{180, 181, 198}. Estos informes preliminares proponen la regulación del metabolismo de la arginina como una posible herramienta terapéutica contra el cáncer.

1.8. IMPLICACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA

De los tres compuestos derivados del nitrógeno: anión peroxinitrito (ONOO^-), el dióxido de nitrógeno (NO_2) y el óxido nítrico (NO), destaca, por su función, éste último.

Denominamos estrés nitrosativo (EN) al exceso de producción de especies reactivas de nitrógeno (ERN), que es capaz de inducir la peroxidación lipídica, interferir con la señalización celular por nitración de residuos tirosina, oxidar grupos tioles y guanosinas, degradar carbohidratos y de fragmentar ADN¹⁹⁹.

1.8.1. ÓXIDO NÍTRICO (NO)

En 1980, el Dr. Furchgott y el Dr. Zawadzki utilizando preparaciones de musculatura lisa vascular descubrieron que tras estimular con acetilcolina o carbacol, el endotelio vascular producía un factor vasodilatador con una vida media muy corta el cual, a diferencia de las prostaciclina derivadas del endotelio, no era bloqueado por inhibidores de la ciclooxigenasa. Ellos llamaron a este vasodilatador “Factor Relajante Derivado del Endotelio” (EDRF).

En 1987, comparando las propiedades farmacológicas y bioquímicas de este factor, tres grupos independientes demostraron que el óxido nítrico y el EDRF

eran la misma molécula²⁰⁰. Posteriormente se vio que el NO era producido por otros tipos de células y que se podía encontrar en casi todo tipo de tejido.

El NO contiene un electrón desapareado en su capa exterior; por lo que es altamente inestable en el aire, se oxida rápidamente en presencia de oxígeno convirtiéndose en dióxido de nitrógeno. Por esta razón se le considera también como un radical libre. EL NO es sintetizado por una familia de enzimas que son llamadas óxido nítrico sintasas (NOS). Se han identificado tres isoformas de NOS, son hemoflavoproteínas que utilizan L-arginina como substrato y requieren NADPH, dinucleótido de flavina-adenina (FAD) y tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactores^{201, 202}. La neuronal nNOS (NOS1) y la endotelial eNOS (NOS3) están reguladas por la concentración intracelular de calcio. La inducible iNOS (NOS2) se expresa en los macrófagos al ser estimulados por citoquinas, LPS u otras sustancias inmunológicas (Figura 7).

En condiciones fisiológicas el NO es un importante regulador de la función miocárdica y el tono vascular. Inhibe la adhesión leucocitaria y la agregación plaquetaria²⁰³, desempeña una importante función en la modulación de la respuesta inmune, posiblemente a través de la regulación diferencial de la síntesis de citoquinas; y actúa como neurotransmisor. Sin embargo, en situaciones patológicas, como la isquemia miocárdica tiene efectos tanto positivos como negativos²⁰⁴. Pudiendo tener tanto actividad prooxidante o antioxidante, antiinflamatoria como proinflamatoria. En los procesos inflamatorios, al aumentar las concentraciones de NO, puede reaccionar con el

oxígeno o con el radical superóxido, aumentando la formación de metabolitos citotóxicos como los peroxinitritos (Figura 8).

Además la generación aumentada de radicales libres (RL), especialmente del radical superóxido, desvía al NO de su metabolismo normal alternando su disponibilidad y aumentando la producción de otros RLN.

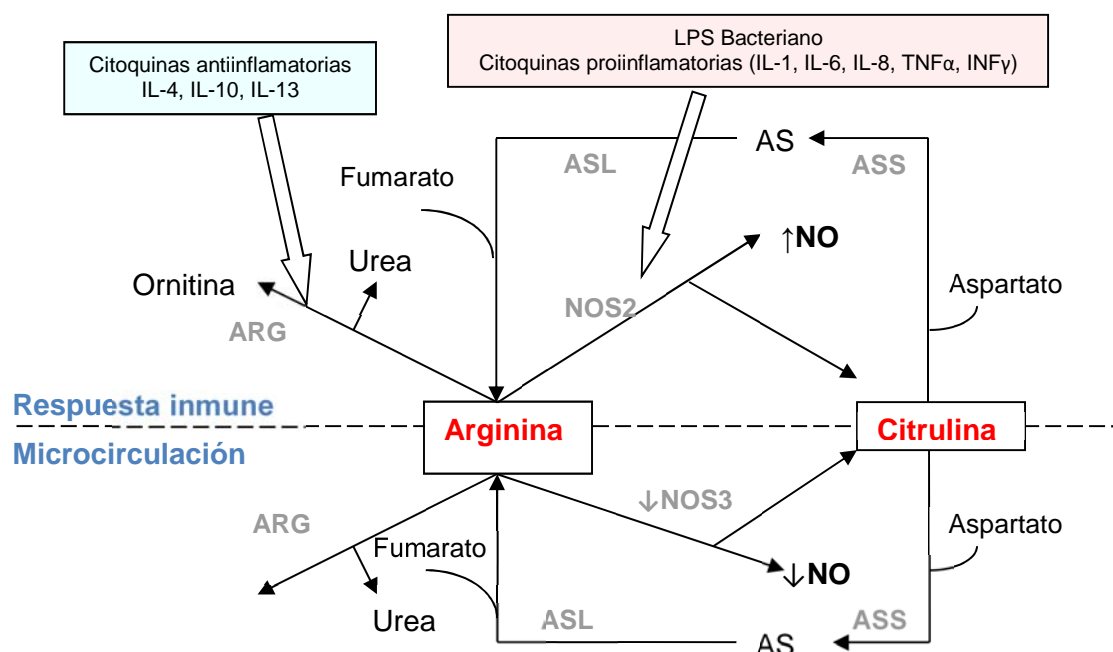


Figura 7. Metabolismo arginina-citrulina en condiciones inflamatorias.

Abreviaturas: NO: óxido nítrico, NOS3: óxido nítrico sintetasa endotelial, NOS2: óxido nítrico sintetasa inducible, AAS: arginosuccinato sintetasa, ASL: arginosuccinato liasa, AS: arginosuccinato

[Fuente: Wijnands y cols¹³⁸, 2015]

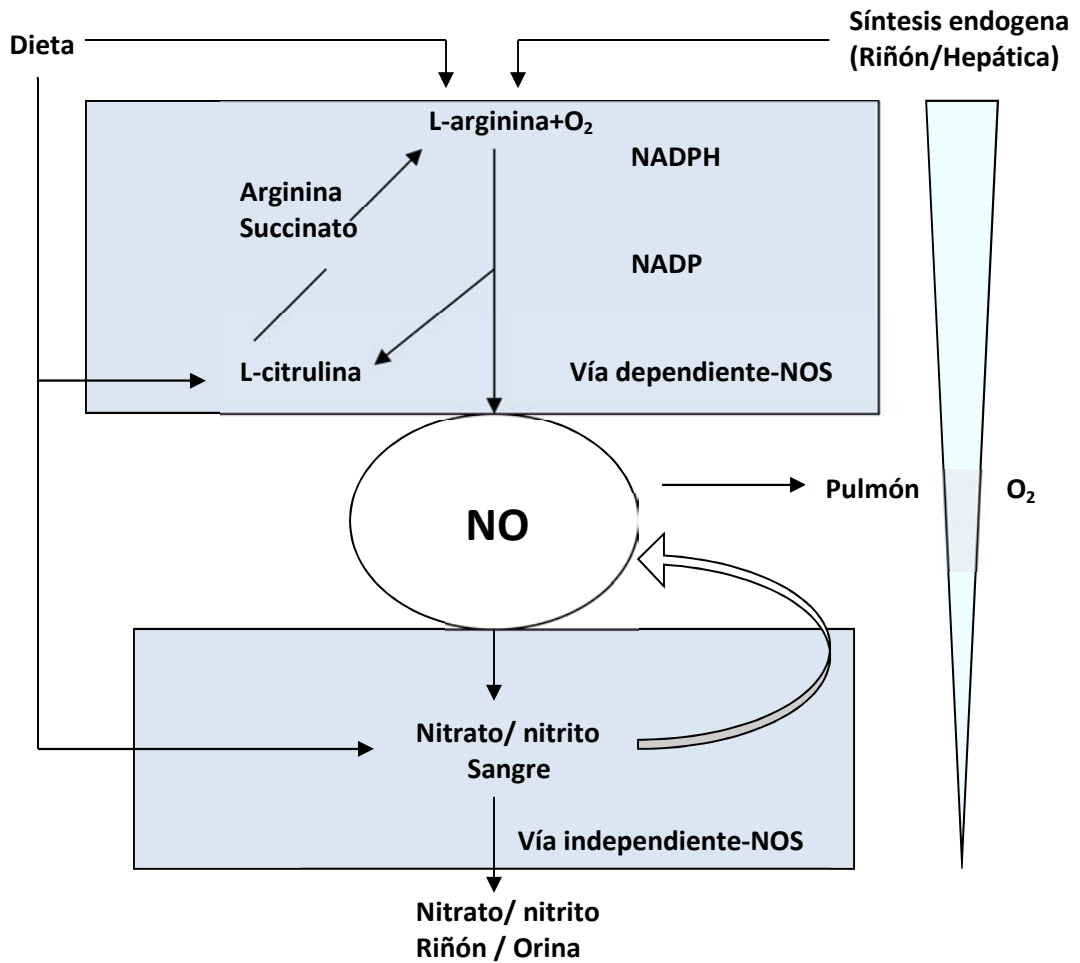


Figura 8. Vía metabólica de producción de NO.

*NADP/NADPH=nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa

*NOS=NO sintasa.

[Fuente: Bescós y cols²⁰⁵, 2012]

1.8.1.1. METABOLISMO Y FUNCIONES DEL OXÍDO NÍTRICO

La síntesis del NO y su efecto vasodilatador se basa en la generación de GMPc, y se hace en respuesta, principalmente, de la existencia de bradiquininas o acetilcolina, o bien, como respuesta a diferentes citoquinas.

Además de la regulación de la vasodilatación que ocasiona el NO, tiene otro tipo de funciones: regula la expresión de células musculares lisas vasculares, efecto antiagregante paquetario y evita la adhesión leucocitaria local.

En la síntesis de NO influyen otros factores. La ingestión importante de grasas saturadas en los alimentos disminuye la síntesis de óxido nítrico. Las concentraciones elevadas de colesterol pero, sobre todo, la mayor coexistencia en las LDL oxidadas, alteran de forma importante el metabolismo del óxido nítrico a través de diferentes rutas:

- Inhiben el transporte de arginina del plasma a la célula endotelial.
- Disminuye la actividad de la eNOS (mediante la formación de cavergolina)
- Interfiere en la expresión de la eNOS.

- Incrementa las concentraciones locales de dimetilarginina asimétrica (ADMA) que funciona como un inhibidor competitivo de las rutas metabólicas de la arginina.
- Disminuye las concentraciones de BH4, cuya función es facilitar la síntesis de NO.

1.8.1.2. OXIDO NÍTRICO Y CARDIOPROTECCIÓN

El NO también participa en la cardioprotección durante eventos graves, al favorecer la expresión de la ciclooxigenasa (COX 2), participa en esa expresión la acción del factor nuclear κ -B (FN κ B). La enzima participante en este aspecto es la iNOS, esperable al encontrarse en dichos procesos una liberación importante de citoquinas.

Esta misma situación explica la disfunción miocárdica observada en pacientes críticamente enfermos, sobre todo los que cursan con sepsis grave o shock séptico²⁰⁶. Aunque la incidencia es difícil de determinar, es muy probable que incluso 50% de los pacientes con shock séptico cursen con disfunción miocárdica definida como fracción de eyección ventricular (FEV) baja. No existe evidencia estructural que explique esta disfunción. Es muy probable que esto sea secundario a problemas microcirculatorios coronarios, o a una disfunción mitocondrial²⁰⁷.

1.8.1.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y RIESGO CORONARIO

Las alteraciones vasodilatadoras dependientes de endotelio demostradas mediante la administración de acetilcolina, conforman la base de muchas enfermedades que contribuyen al riesgo cardiovascular.

La disfunción endotelial secundaria a un traumatismo local, sepsis o alteración del equilibrio de óxido-reducción local, determina alteraciones vaso-reguladores importantes que culminan en disfunción orgánica múltiple ^{207, 208}.

1.8.2. PEROXINITRITOS (ONOO⁻)

El peroxinitrito (ONOO⁻) no es un radical en sí mismo, pero es un agente fuertemente oxidante y nitrante, cuyas acciones tóxicas se han visto involucradas en una gran cantidad de patologías, como las enfermedades neurodegenerativas y las enfermedades cardiovasculares.

Es una especie reactiva del nitrógeno que se forma por la reacción del óxido nítrico con el anión superóxido: $O_2^- + NO \rightarrow ONOO^-$

Es capaz de inducir la peroxidación lipídica, interferir en la señalización celular, degradar carbohidratos y fragmentar el ADN. El ONOO⁻ es capaz de reaccionar con proteínas que tienen iones metálicos como hierro, cobre y manganeso. Estas modificaciones pueden inducir cambios conformacionales en la

estructura tridimensional de las proteínas causando la pérdida de su función. Inactiva a la enzima superóxido dismutasa entre otras.

Puede oxidar a la BH₄, cofactor de la NOS y de la tirosina hidroxilasa, y también puede oxidar al glutatión reducido, cofactor de la glutatión peroxidasa²⁰⁹.

Una vía importante de descomposición del peróxido de nitrógeno *in vivo* es su reacción con el CO₂. Esta reacción origina como compuesto final un potente compuesto nitrante: el trióxido de nitrógeno (N₂O₃).

1.8.3. DIÓXIDO DE NITRÓGENO (NO₂)

El dióxido de nitrógeno (NO₂) es un agente sumamente oxidante, hidrosoluble, constituido por un átomo de nitrógeno y dos átomos de oxígeno en su estructura molecular.

Es un radical libre contaminante que se forma a partir de la oxidación del NO atmosférico y que es capaz de inducir la peroxidación lipídica y la ruptura de cadenas de ADN.

1.8.4. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS)

Los distintos miembros de la familia NOS están codificados por diferentes genes ²¹⁰. La NOS es una de las enzimas más reguladas en la biología. Hay tres isoformas conocidas (tabla 8), dos son constitutivas (nNOS/cNOS) y la tercera es inducible (iNOS) ²¹¹.

Tabla 8. Isoformas de la óxido nítrico sintasa.

NOMBRE	GEN	UBICACIÓN	FUNCIÓN
NOS neuronal (nNOS/NOS1)	NOS1	Tejido nervioso Músculo esquelético tipo II	Comunicación celular
NOS inducible (iNOS/NOS2)	NOS2A	Sistema inmune Sistema cardiovascular	Defensa inmune contra patógenos
NOS endotelial (eNOS/NOS3/cNOS)	NOS3	Endotelio	Vasodilatación
NOS bacteriana (bNOS)	Múltiple	Varias especies Gram (+)	Defensa contra estrés oxidativo, antibióticos y ataque inmune

La clonación de enzimas NOS señala que NOS2 es inducible, mientras que NOS1 y NOS3 son constitutivos, en cerebro y en tejido endotelial

respectivamente ²¹². Recientemente, la actividad de NOS se ha demostrado en varias especies bacterianas, incluyendo los mismos agentes patógenos conocidos como *Bacillus anthracis* y *Staphylococcus aureus* ^{213, 214}. Se ha demostrado que la NOS bacteriana (bNOS) protege contra el estrés oxidativo, los antibióticos diversos y la respuesta inmune ^{213, 215}. Las diferentes formas de NOS han sido clasificados de la siguiente manera:

1.8.4.1. nNOS/NOS1

La NOS neuronal (nNOS) produce NO en tejido nervioso, tanto central como periférico. También realiza un papel en la comunicación celular y se asocia con la membrana plasmática. La acción de nNOS puede ser inhibida por NPA (N-propil-L-arginina). Esta forma de la enzima se inhibe específicamente por 7-nitroindazol ²¹⁶.

1.8.4.2. iNOS/NOS2

A diferencia de la regulación crítica, dependiente de calcio, de las enzimas NOS constitutivas (nNOS y eNOS), iNOS ha sido descrito como insensible al calcio, probablemente debido a su interacción estrecha no covalente con la calmodulina (CAM) y calcio. Aunque las pruebas de línea de base la expresión de iNOS ha sido difícil de alcanzar, IRF-1 y la activación dependiente de NF-κB del promotor inducible NOS apoya la idea de una estimulación de la transcripción medida por inflamación.

Desde una perspectiva funcional, es importante reconocer que la inducción de la iNOS de alto rendimiento por lo general ocurre en un ambiente oxidativo, por lo que los altos niveles de NO tienen la oportunidad de reaccionar con especies reactivas de nitrógeno de superóxido, que conducen a la formación de peroxinitrito y toxicidad celular.

Estas propiedades pueden definir las funciones de la iNOS en la inmunidad del huésped, lo que permite su participación en actividades microbianas y antitumorales como parte de la explosión oxidativa de los macrófagos ²¹⁷.

Se ha sugerido que la generación patológica de óxido nítrico mediante el aumento de la producción de iNOS puede disminuir el batido ciliar de las trompas y las contracciones del músculo liso y, por tanto, afectan al transporte de embriones, pudiendo acabar en embarazo ectópico ²¹⁸.

1.8.4.3. eNOS/NOS3

NOS endotelial (eNOS), también conocido como óxido nítrico sintasa 3 (NOS3), genera NO en los vasos sanguíneos y está involucrada con la regulación de la función vascular. Un NOS constitutivo dependiente de Ca^{2+} proporciona una liberación basal de NO. La eNOS se asocia con la membrana plasmática que rodea las células y las membranas del retículo de Golgi dentro de las células.

Para NOS1 y NOS3, concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} en las células regulan la unión de la CAM a los dominios *traba*, iniciando así la transferencia de electrones desde el grupo flavin al hemo. Por el contrario, la CAM sigue siendo fuertemente unida a la isoforma inducible e insensible a Ca^{2+} (iNOS o NOS2), incluso en un bajo nivel intracelular de Ca^{2+} , actuando esencialmente como una subunidad de esta isoforma.

El NO puede regular por sí mismo la expresión y actividad de NOS. En concreto, se ha demostrado que el NO desempeña un importante rol regulador negativo (feedback negativo) sobre NOS3 y por consiguiente en la función de las células endoteliales vasculares. Este proceso puede ser importante ya que está regulado por las condiciones redox de la célula y por tanto, puede proporcionar un mecanismo para la asociación entre el estrés oxidativo y la disfunción endotelial. Además de NOS3, tanto NOS1 y NOS2 se han encontrado S-nitrosados, pero la evidencia para la regulación dinámica de las isoformas de NOS por este proceso es menos completa. Además se ha demostrado que tanto NOS1 y NOS2 forman complejos ferrosos nitrosilo en los grupos hemo, que pueden actuar parcialmente para auto-inactivar estas enzimas en determinadas condiciones. El paso limitante para la producción de NO también puede ser la disponibilidad de L-arginina en algunos tipos de células. Esto puede ser particularmente importante después de la inducción de NOS2.

1. 9. SÍNDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA

El término sepsis implica una respuesta clínica que deriva de una infección. Una respuesta similar o idéntica puede ocurrir en ausencia de infección. Se propuso el término síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) para describir este proceso inflamatorio independientemente de su causa. Durante un tiempo los términos infección, sepsis, síndrome séptico, síndrome de disfunción multiorgánica/ fracaso multiorgánico (SDMO), fueron empleados de forma indistinta. Por lo que fue necesaria una unificación de las definiciones empleadas ²¹⁹.

Se define como SIRS al conjunto de fenómenos clínicos y fisiológicos que resultan de la activación general del sistema inmune, con independencia de la causa que lo origine. Este término fue introducido en la conferencia de consenso de la Society of Critical Care Medicine (SCCM) y el American College of Chest Physicians (ACCP) de 1992 ²²⁰. En la Conferencia Internacional para las Definiciones de Sepsis del año 2001 ²²¹, fue revisado por última vez, siendo además avalado por otras sociedades estadounidenses y europeas aparte de las previamente citadas: European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), American Thoracic Society (ATS) y la Surgical Infection Society (SIS).

Se considera que existe SIRS si se cumplen dos o más de las siguientes condiciones, siendo uno de ellos la alteración de la temperatura o el recuento leucocitario, variando los parámetros según la edad (Tabla 9 y 10):

- Temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$ (medición central).

- Taquicardia, definida como frecuencia cardiaca $> 2\text{DS}$ de su rango de edad en ausencia de estímulos externos, drogas o dolor. En niños menores de un año: bradicardia, definida como frecuencia cardiaca inferior al percentil diez por la edad en ausencia de estímulo vagal, beta-bloqueantes o cardiopatía congénita.

- Frecuencia respiratoria $> 2\text{DS}$ para la edad o ventilación mecánica no debido a enfermedad neuromuscular o anestesia general.

- Recuento leucocitario elevado o disminuido por la edad (Leucocitos $> 12.000/\text{mm}^3$, $< 4.000/\text{mm}^3$ o $> 10\%$ formas inmaduras). No inducido por quimioterapia.

Tabla 9. Grupos de distribución según edad

Grupo de edad	Edad
Recién nacido	0-7 días
Neonato	7 días- 1 mes
Lactante	1 mes- 1 año
Preescolar	2-5 años
Escolar	6-12 años
Adolescente	13-18 años

[Fuente: Casado Flores ²²², 2015]

Tabla 10. Variables clínicas y analíticas dependientes de la edad para definir el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)

Grupo de edad	Taquicardia (lpm)	Bradycardia (lpm)	Taquipnea (rpm)	Leucocitos (x10 ³ /mm ³)	TAS (mmHg)
Recién nacido	>180	<100	>50	>34	<65
Neonato	>180	<100	>40	>19.5 o <5	<75
Lactante	>180	<90	>34	>17.5 o <5	<100
Preescolar	>140	NA	>22	>15.5 o <6	<94
Escolar	>130	NA	>18	>13.5 o <4.5	<105
Adolescente	>110	NA	>14	>11 o <4.5	<117

NA: no aplicable; TAS: tensión arterial sistólica

[Fuente: Casado Flores ²²², 2015]

Se ha propuesto la siguiente cronología en la patogénesis de la respuesta inflamatoria sistémica:

1. Estadio-1. Respuesta local.

Ni el SIRS ni la disfunción multiorgánica se desarrollan *de novo* en ausencia de un estímulo. Un foco infeccioso, un traumatismo, quemadura o pancreatitis entre otros, han demostrado la liberación precoz de diversos mediadores inflamatorios (citoquinas, eicosanoides, factor activador de plaquetas (PAF), etc.), a nivel local. A este nivel los efectos beneficiosos de dichos mediadores predominan sobre los posibles perjuicios. Estos mediadores elaboran una red de reacciones encaminadas a limitar el daño. El organismo precozmente pone en marcha una respuesta anti-inflamatoria (IL-10, antagonista del receptor de IL-1, receptor soluble del TNF...). Sin embargo esta reacción en inicio compensadora puede alterar la función de los monocitos creando un estado de inmunosupresión.

2. Estadio-2. Respuesta sistémica inicial.

Cuando el insulto inicial es lo suficientemente severo la respuesta local se refleja en la circulación sistémica. Si la respuesta es adecuada tiene poca traducción clínica y no hay disfunción orgánica.

3. Estadio-3. Inflamación sistémica masiva.

En algunos pacientes la regulación de la respuesta inflamatoria se pierde y ocurre una reacción sistémica masiva. Esta reacción inicialmente es proinflamatoria produciendo hipotensión, fiebre y taquicardia. Existe disfunción endotelial que conduce a una permeabilidad vascular aumentada con disregulación de los mecanismos vasodilatadores y vasoconstrictores, con una profunda vasodilatación. Con frecuencia el resultado neto es un shock profundo con compromiso de órganos vitales y posterior fallo de los mismos.

4. Estadio-4. Inmunosupresión excesiva.

Muchos pacientes con inflamación persistente fallecen rápidamente en shock. En algunos pacientes la reacción antiinflamatoria es tan intensa que provoca una inmunosupresión que se le ha denominado “*parálisis inmune*” o bien CARS (Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome). Esto explica la susceptibilidad incrementada a las infecciones en pacientes operados.

5. Estadio-5. Disonancia inmunológica.

El estadio final del SDMO se alcanza cuando el paciente desarrolla una respuesta fisiopatológica desproporcionada para sus necesidades biológicas.

Los pacientes con disonancia inmunológica pueden recuperar la funcionalidad orgánica si reestablecen el disbalance de lo contrario se establece el SDMO.

1.9.1 SIRS ASOCIADO A CIRUGÍA CARDIACA

La cirugía cardíaca, y concretamente la realizada bajo circulación extracorpórea (CEC), provoca una respuesta inflamatoria vigorosa. La incidencia del SDMO en este contexto se ha estimado en un 11%, con una mortalidad asociada de un 41% ²²³. Los factores que influyen en la incidencia, gravedad y resultado clínico de la respuesta inflamatoria no han sido totalmente elucidados. Todos los pacientes sometidos a CEC presentan una alteración de la homeostasis, pero la respuesta clínica es variable. Esta depende de la interacción entre las moléculas proinflamatorias y anti-inflamatorias, siendo este balance determinante en el desarrollo del SIRS ²²⁴.

Son varios los mecanismos implicados en la fisiopatología del SIRS asociada a CEC:

1. La **activación del sistema de contacto** tras la exposición de la sangre al circuito, recluta factores humorales como el complemento y factores celulares. Los fenómenos de isquemia-reperfusión se han asociado a la magnitud de la respuesta inflamatoria.

También se ha implicado a la endotoxemia secundaria a la hipoperfusión esplácnica como mecanismo activador de la inflamación en la activación del complemento, en relación con la activación de la proteína C tras la reversión de la heparina. El papel que juega el complemento en la respuesta inflamatoria ha sido demostrado a través del efecto de sus inhibidores. El bloqueo del fragmento C3a previene la activación de los neutrófilos, monocitos y plaquetas en modelos de CEC. Anticuerpos anti-C5a disminuyen la disfunción pulmonar, miocárdica, mesentérica y microvascular, asociadas a la CEC. Ambos inhibidores disminuyen la expresión de moléculas de adhesión necesarias para la unión de los neutrófilos al endotelio. El grado de activación del complemento tiene importancia clínica. La activación de la vía clásica se correlaciona con el shunt pulmonar postoperatorio y con la incidencia de arritmias postoperatorias. Los niveles postoperatorios de C3a pueden predecir la probabilidad de disfunción cardíaca, pulmonar, renal y hemostática. El empleo de anticuerpos anti-C5a reduce la lesión miocárdica, las pérdidas sanguíneas y los déficits cognitivos postoperatorios.

2. **Citoquinas.** Son proteínas y polipéptidos producidos por una gran variedad de células con una acción mensajera paracrina. Pueden ejercer un efecto proinflamatorio y antiinflamatorio. Se ha analizado la asociación entre los niveles plasmáticos de citoquinas con el curso evolutivo y la mortalidad, encontrándose que los niveles de IL-6 tienen una alta correlación con la mortalidad de pacientes con shock séptico y distrés respiratorio del adulto. Se ha observado un patrón de liberación de citoquinas tras la CEC, encontrando un pico de IL-6 alrededor de las primeras 4-6 horas ²²⁵. En aquellos pacientes

que desarrollan SIRS niveles más elevados de IL-8 e IL-18 se han asociado con una peor evolución. Aunque el efecto de las citoquinas antiinflamatorias en la CEC permanece confuso, parece que el balance entre citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias puede determinar el pronóstico clínico de dichos pacientes.

3. **Óxido nítrico.** Mediador biológico que entre sus acciones posee una importante acción sobre el tono vasomotor. Podemos distinguir dos formas de NOS, una la constitutiva, beneficiosa, y otra la inducible, perjudicial. Tras un evento isquémico el endotelio produce la sintasa constitutiva del NO (cNOS), a concentraciones picomolares, cuya misión sería la de proteger inicialmente la integridad de la permeabilidad vascular, así como prevenir la adhesión leucocitaria y plaquetaria. Posteriormente si el estímulo persiste, mediado por ejemplo por una producción persistente de citoquinas, o los mecanismos contrarreguladores fallan, tendría lugar la liberación de la iNOS por múltiples estirpes celulares, a concentraciones nanomolares, esta activación continua de estos mecanismos compensadores conllevaría un daño miocárdico y vascular. La administración de precursores del NO (arginina) en la cardioplejia tiene efectos beneficiosos sobre la acumulación de neutrófilos en la post-reperfusión, la función endotelial y miocárdica. La disfunción miocárdica inducida por el aumento de los niveles de citoquinas parece estar mediada por el incremento en la liberación de la iNOS. Como se observa el efecto del NO es dependiente del momento de su liberación, las fuentes de producción y las cantidades que se vierten al torrente sanguíneo, explicando así su acción paradójica.

4. **La respuesta celular.** El proceso de la adhesión leucocitaria al endotelio es esencial en la extensión de la respuesta inflamatoria provocando mayor daño endotelial. Este proceso consta de distintas fases, en un primer momento existe una adhesión al endotelio, y posteriormente comienzan a girar sobre la superficie endotelial. Estos fenómenos son favorecidos por la expresión de la familia de las selectinas (P y E por parte del endotelio; L por los leucocitos), que a su vez parecen ser modulados, entre otros, por las proteínas de la matriz extracelular. Seguidamente se establecerán uniones más firmes, en las que participan las integrinas, para finalmente tener lugar la transmigración de los neutrófilos a través del endotelio. Tras la CEC aumenta la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria, la agregabilidad de los neutrófilos y la liberación de elastasa ²²⁶. La expresión incrementada de CD11b se ha asociado a lesión renal, mientras que la inhibición de su expresión mejora la función miocárdica y disminuye la lesión pulmonar.

5. **Los sistemas de la coagulación y fibrinólisis.** Aunque la coagulación-fibrinólisis y la inflamación en diversos aspectos son procesos separados, existe una interconexión entre ambos sistemas, retroalimentándose uno al otro. En este contexto deberían ser considerados como distintas facetas de la misma respuesta del huésped a la agresión.

La hemostasia es resultado del equilibrio entre factores procoagulantes y anticoagulantes. La activación celular y citoquinas proinflamatorias juegan un

papel determinante, a nivel local, en el inicio de la coagulación en el lugar de la inflamación, activando el endotelio, promoviendo la liberación del factor tisular, de las moléculas de adhesión leucocitaria y la producción de FAP. Este hecho, combinado con un descenso de la actividad y expresión de la trombomodulina, del sistema fibrinolítico y de la vía de la proteína C, resulta en un marcado estado procoagulante. A su vez la vía de la proteína C ejerce sus efectos antiinflamatorios inhibiendo los factores humorales y celulares implicados en la inflamación. La gran mayoría de estas acciones son dependientes del receptor endotelial de proteína C (ECPR).

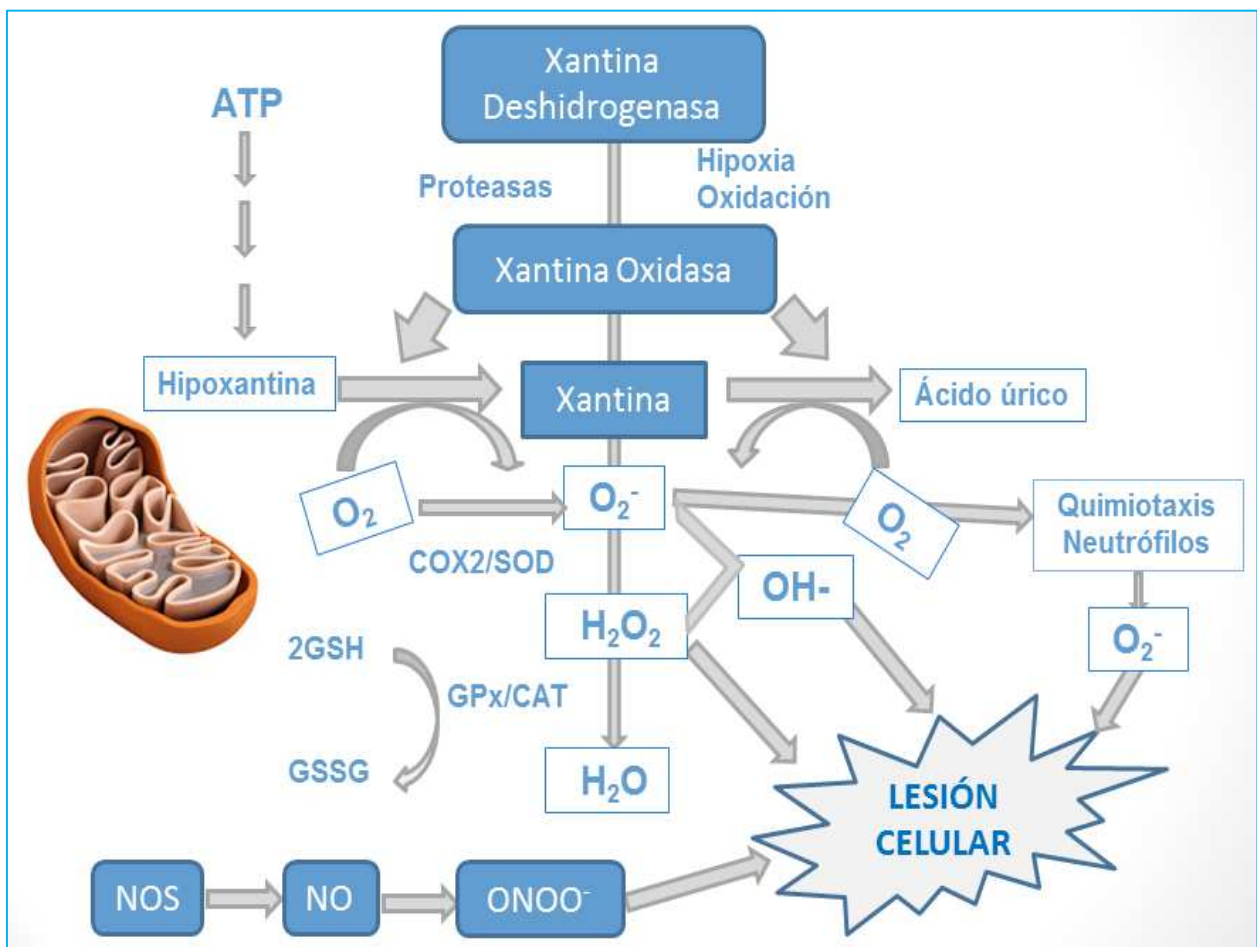
6. **El endotelio.** Pieza dinámica clave en la interacción entre los componentes sanguíneos y los tejidos, siendo su acción reguladora fundamental en la amplificación o inhibición de los procesos inflamatorios y procoagulantes. El endotelio controla el tono vascular y su permeabilidad, regula la coagulación y fibrinólisis, así como la migración celular, a través de la expresión de proteínas de superficie y la secreción de mediadores solubles.

Mediadores como el $TNF\alpha$ y la $IL-1\beta$ se unen específicamente a receptores endoteliales activando mecanismos transcripcionales ($NF-\kappa B$). Este proceso da lugar a la translocación de moléculas de adhesión y citoquinas, amplificando la respuesta inicial. El endotelio activado es el nexo de unión entre los sistemas de coagulación e inflamación por medio de la expresión o supresión de moléculas fundamentales en la regulación de ambos sistemas.

Durante la fase hipóxico-isquémica, se produce un acúmulo de sustratos capaces de aumentar de forma importante la producción de RL, debido fundamentalmente a la presencia de oxígeno durante la reperfusión.

Son importantes dos mecanismos: el acúmulo de derivados purínicos y la activación de la NOS (figura 9).

Figura 9. Esquema de la fase de reoxigenación y reperfusión.



1.9.2. FISIOPATOLOGÍA DEL ESTRÉS EN EL PACIENTE

CRÍTICO

Frente al estrés, independientemente de su etiología, se pone en marcha un proceso inflamatorio mediado por diferentes factores que conducen o intentan conducir hacia la limitación y reparación del proceso nosológico. El efecto de una agresión severa sobre el organismo, es entre otros factores, un estrés metabólico. El organismo pretende conservar la energía sobre órganos vitales, modular el sistema inmunológico y retrasar el anabolismo²²⁷.

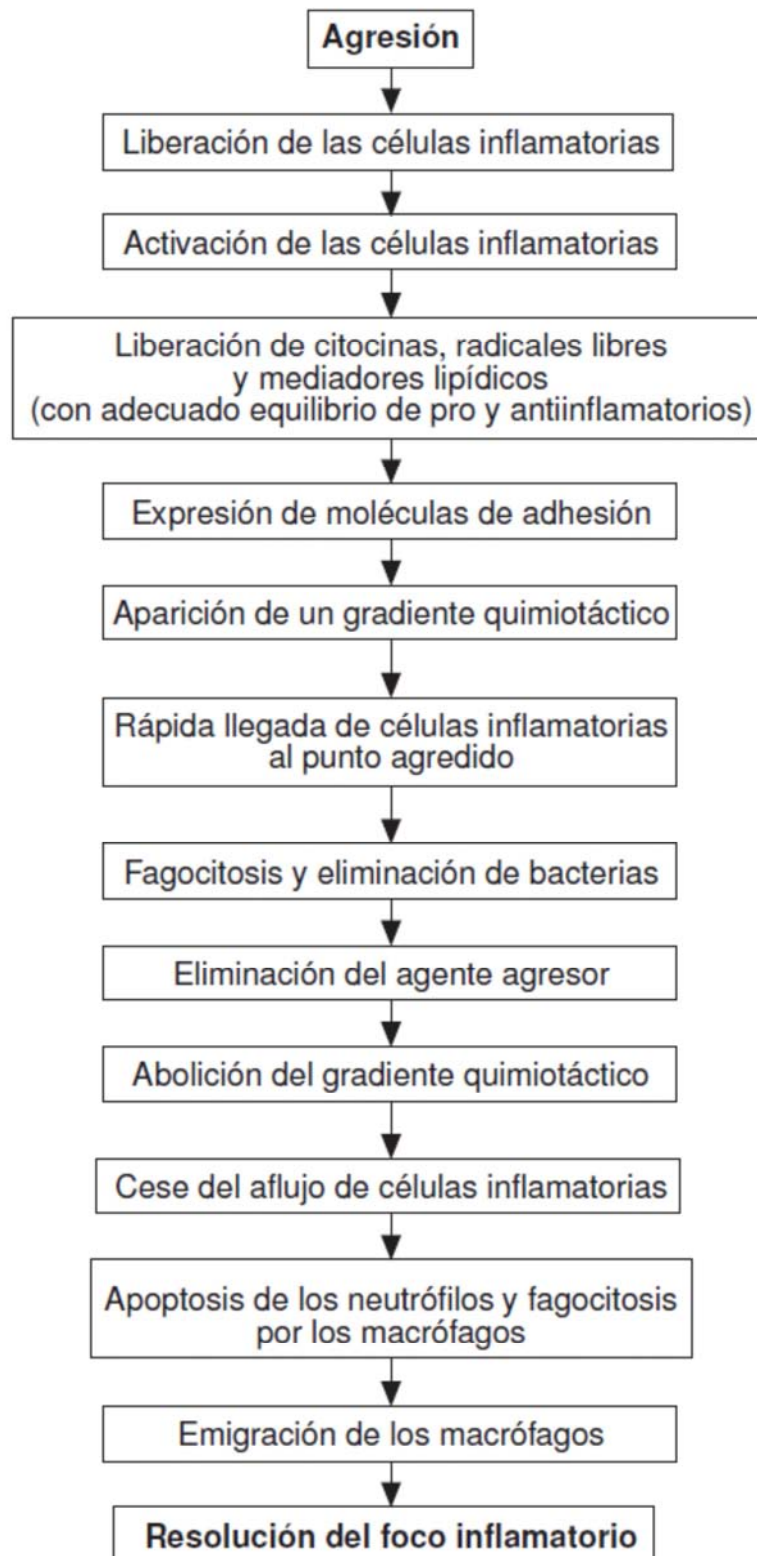
La inflamación localizada es una respuesta fisiológica de protección estrechamente controlada por el organismo en el lugar de la lesión. La pérdida de este control local o la presencia de una respuesta superactivada que condiciona una exagerada respuesta sistémica identificada como SIRS, y se caracteriza por ser una reacción inflamatoria anormal y generalizada de órganos a distancia de la agresión inicial. Una vez iniciada la respuesta inflamatoria se ponen en marcha mecanismos compensatorios concertados siendo la evolución dependiente del balance entre el SIRS y los mecanismos compensadores hacia la resolución del proceso, SDMO o fallecimiento (Figura 10).

La capacidad innata de defensa del organismo se base en tres elementos: barrera externa, sistemas no-específicos y respuestas antígeno-específicas. La inflamación es la respuesta, inicial y no específica, que el organismo produce

ante estímulos mecánicos, químicos o microbianos. La inflamación consiste en una respuesta rápida y ampliada, controlada humoral y celularmente (complemento, cininas, coagulación y cascada fibrinolítica) y desencadenada por la activación conjunta de fagocitos y células endoteliales. Se caracteriza por cuatro eventos importantes: vasodilatación, aumento de la permeabilidad microvascular, activación/adhesión celular y coagulación. Tanto la vasodilatación, como el aumento de la permeabilidad, aumentan la disponibilidad de nutrientes locales y oxígeno produciendo calor, hinchazón y edema tisular en el lugar de la lesión.

La respuesta fisiológica normal al estrés y a la agresión condiciona una serie de cambios cardiovasculares (incremento de la frecuencia cardiaca, contractilidad y gasto cardiaco) y neuroendocrinos (liberación de catecolaminas, cortisol, hormona antidiurética, hormona del crecimiento, glucagón e insulina) ²²⁷. Se presenta una mayor necesidad de líquidos debido al desarrollo de un tercer espacio e hipovolemia relativa, así como el incremento del consumo de oxígeno, que cuando sobrepasa las situaciones de adaptación del organismo adopta la vía anaerobia, con generación de RL, aumento de las necesidades metabólicas y presencia de caída de las resistencias vasculares sistémicas. Si no existe una segunda agresión, generalmente las alteraciones fisiológicas locales y sistémicas duran de 3-5 días y desaparecen en 7-10 días. Cuando existe una nueva agresión, la pérdida de control local o una respuesta desproporcionada a la agresión, condiciona una respuesta exagerada a la que se denomina SIRS.

Figura 10. Evolución de la agresión a SIRS y a SDMO



[Fuente: García de Lorenzo y Mateos²²⁸, 2002]

Cuando la causa desencadenante es una cirugía, traumatismo o quemadura, además de los cambios descritos anteriormente existe dolor asociado a la lesión, poniendo en marcha quimiorreceptores, estímulo frente a la regeneración de tejidos con la activación de las diferentes rutas metabólicas para la cicatrización, alterando los sustratos sanguíneos, cambios en la temperatura corporal e incluso desarrollo de infecciones sobre el lugar lesionado²²⁹.

Bone²²⁰, en 1996, propuso un esquema en tres fases para explicar el desarrollo del SIRS:

Fase I. Como respuesta a la agresión, el medio ambiente local produce citoquinas que evocan la respuesta inflamatoria, reparan los tejidos y reclutan las células del sistema retículo endotelial.

Fase II. Se liberan citoquinas a la circulación para aumentar la respuesta local. Se reclutan macrófagos y plaquetas, y se estimulan la producción de factores de crecimiento. Se inicia una respuesta de fase aguda que es estrechamente controlada por la disminución de mediadores proinflamatorios como por la liberación de antagonistas endógenos. Mantienen la respuesta inflamatoria local inicial, pero vigilando tanto la infrarregulación de la liberación de citoquinas, como contrarrestando los efectos de las citoquinas liberadas. Esta situación se mantiene hasta la fase de cicatrización, la infección quede resuelta y se recupere la homeostasis.

Fase III. No se reestablece la homeostasis o se altera el mecanismo de contrarregulación, provocando una reacción sistémica masiva que puede conducir al SDMO y al exitus.

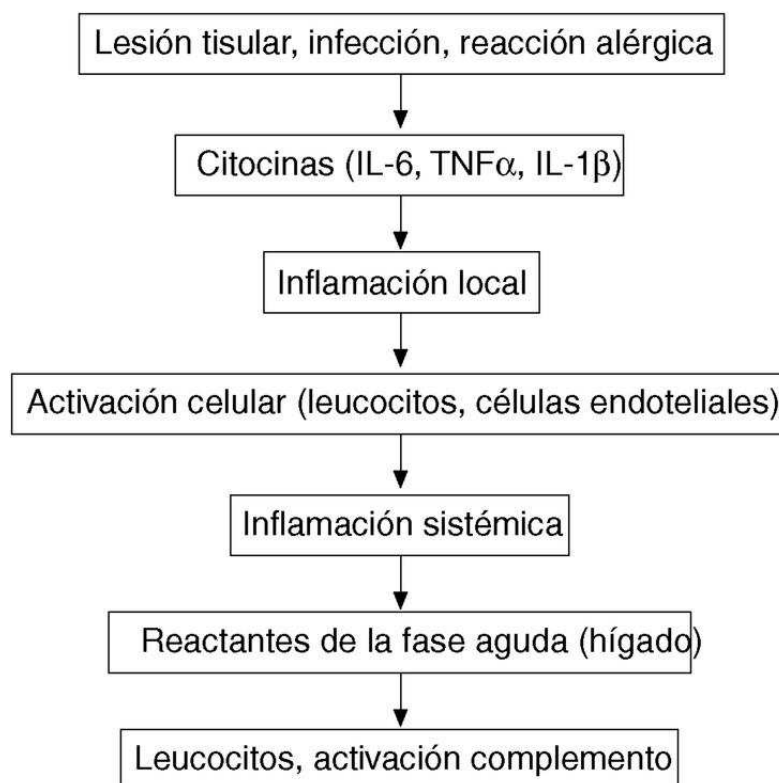
1.9.2.1. MEDIADORES Y REACTANTES EN EL ESTRÉS

La situación de estrés incluye una serie de relaciones entre las defensas del huésped y el agente agresor. La inflamación consta de una fase humoral y otra celular, asociadas a cambios en la permeabilidad del sistema circulatorio para marginar o dirigir la migración de las células circulantes. Las proteínas del grupo de las selectinas de los linfocitos, neutrófilos y monocitos, y las del endotelio son las responsables de acumular linfocitos en el punto inflamado, que a su vez colaboran con las moléculas de adhesión y las series de inmunoglobulinas. Otras sustancias como el NO, los metabolitos del AA y los RLO generados *in situ*, modulan y dirigen la adhesión, migración y activación leucocitarias. Todos estos mecanismos son los responsables junto con las citoquinas proinflamatorias de conducir hacia el SDMO (Figura 11).

Las citoquinas presentan acciones paracrinas y autocrinas, están íntimamente relacionadas con el sistema endocrino clásico, induciendo la liberación de corticoides, sobre todo de cortisol, en la fase postagresión, e interactuando con los glucocorticoides para modular la respuesta al estrés (tabla 11).

Las citoquinas proinflamatorias (figuras 11 y 12) estimulan los factores B, C3 y C4, reactantes de fase aguda del complemento, activando las vías de éste, con incremento del complejo leucocitario CD11b/CD18 y de la β_2 - integrina de los neutrófilos. Al mismo tiempo $TNF\alpha$ y la IL-2 activan a nivel del endotelio vascular la ICAM-I y la E-Selectina del endotelio inflamado, favoreciendo una mayor adhesión de los neutrófilos al endotelio inflamado, el estrés oxidativo y el daño endotelial. Activa los sistemas de la coagulación y la fibrinólisis, con aumento de la anafilatoxina C3b y aparición de complejos trombina-antitrombina III. También aumenta el activador tisular del plasminógeno I, los fosfolípidos A2 y los complejos de elastasa de los PMN- α 1 antitripsina.

Figura 12. Mediadores de la inflamación.



1.9.3. SÍNDROME DE DISFUNCIÓN MULTIORGÁNICA

El término fracaso multiorgánico (FMO) fue acuñado hace más de 25 años para describir la evolución, casi siempre fatal, de pacientes traumatizados hacia la insuficiencia respiratoria, cardíaca, hepática y renal. Posteriormente se vio que otras patologías médicas y quirúrgicas, como sepsis, shock, pancreatitis y quemaduras, evolucionaban hacia FMO, incluso una vez resuelta la patología inicial. Este síndrome ha venido a aglutinar a algunos de los pacientes sobrevivientes de patologías graves, que en el pasado fallecían en la fase aguda de la enfermedad, pero que hoy sobreviven gracias a los tratamientos agresivos desarrollados en las unidades de cuidados intensivos (UCI); algunos de estos evolucionan más tarde, tras un periodo de latencia a la disfunción, insuficiencia y fracaso secuencial de distintos órganos. Actualmente, se denomina síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) porque este término define mejor el carácter progresivo de la disfunción en el que se asocia el fracaso completo de un órgano con la disfunción grave de otro o leve de un tercero.

El SDMO representa la principal causa de muerte en unidades de cuidados intensivos pediátricos (UCIP) y un motivo muy frecuente de ingreso en estas unidades; también es la principal causa de muerte en las UCI de adultos y en consecuencia es un proceso que alarga la hospitalización, incrementando significativamente el costo. La mortalidad permanece muy alta, en cifras

similares a cuando fue descrito posiblemente porque el tratamiento es sólo de soporte, no el de las bases fisiopatológicas.

1.9.3.1. CRITERIOS DE FRACASO DE ÓRGANOS EN EL SDMO

Los criterios que definen SDMO en pediatría y las escalas usadas para cuantificar la disfunción orgánica en pediatría fueron revisados en el año 2002 por un grupo de expertos internacionales.

Aunque los criterios de SDMO para adultos han sido aplicados en pediatría, carecen de evidencia de validez en niños. En la literatura se han descrito varias escalas para medir SDMO: Multiple Organ System Failure score (MOSF) por Wilkinson y cols, en 1985; Pediatric Multiple Organ Dysfunction Score (P-MODS) y Pediatric Logistic Organ Dysfunction score (PELOD) por Leteurtre y cols²³¹, en 1999; y Pediatric-MODS (P-MODS) por Graciano y cols, en 2001. De estas escalas, únicamente la escala PELOD ha sido validada en un estudio multicéntrico²³². De manera que se aboga por no usar una única escala de SDMO y que los criterios diagnósticos de disfunción orgánica (Tabla12) se basen en los usados en las escalas PELOD, P-MODS y MOSF.

Se acepta que el SDMO es el fracaso de dos o más de los siguientes órganos o sistemas: cardiovascular, respiratorio, neurológico, renal, hematológico, gastrointestinal y hepático; algunos autores incluyen el sistema endocrino e inmunológico.

- 1. Sistema cardiovascular.** Para identificar la disfunción y fracaso cardiovascular se ha utilizado la frecuencia cardiaca y la tensión arterial, variables que son fisiológicamente diferentes en las distintas edades pediátricas. También se han utilizado la necesidad de drogas inotrópicas por un periodo superior a 24 horas, la presencia de acidosis metabólica o la elevación de los niveles de lactato arterial. Ninguna variable clínica, hemodinámica ni analítica define con claridad el nivel de disfunción cardiovascular, excepto la hipotensión arterial grave que es un dato muy tardío, pudiendo existir fracaso de este sistema en presencia de tensión arterial normal. En los niños, la hipotensión es un signo de shock tardío.
- 2. Sistema respiratorio.** Su disfunción es definida por la necesidad y/o modo de ventilación artificial, o por variables que reflejan el insuficiente intercambio gaseoso a nivel pulmonar; la que mejor define aisladamente la función pulmonar es el índice $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, independientemente del tipo de ventilación, FiO_2 o grado de PEEP.
- 3. Afectación neurológica.** La escala de coma de Glasgow es la que mejor evalúa el estado de conciencia, definiendo disfunción neurológica cuando la puntuación sea inferior o igual a 11, o cuando exista un cambio agudo acompañado de una disminución brusca de 3 puntos.

- 4. Disfunción hematológica.** Aunque se ha empleado la existencia de leucopenia, anemia, aumento del tiempo de protrombina o la presencia de coagulación intravascular diseminada (CID), es el recuento de plaquetas el criterio más aceptado, tanto en niños como en adultos. Las cifras de disfunción se sitúan por debajo de 80.000 plaquetas/mm³.
- 5. Disfunción renal.** Definida como oliguria (diuresis inferior a 0,5 mL/kg/hora), necesidad de depuración extrarrenal o incapacidad del riñón para mantener el equilibrio hidroelectrolítico, el parámetro aislado que mejor lo define y que es más ampliamente aceptado es el valor de creatinina sérica.
- 6. Disfunción hepática.** Es considerado por algunos como alteración enzimática (fosfatasa alcalina, láctico deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa, alanin aminotransferasa), disminución de la síntesis de albúmina o de factores de coagulación (protrombina, fibrinógeno) o la presencia de encefalopatía hepática. El parámetro bioquímico que mejor define la función hepática, en ausencia de hemólisis, es el nivel de bilirrubina sérica.
- 7. Sistema gastrointestinal.** Su disfunción se menciona en muchas publicaciones de SDMO, pero los criterios que la definen son poco precisos y no aceptados por todos. Incluye hemorragia gástrica que requiera transfusión, íleo paralítico, diarrea e intolerancia alimenticia, enterocolitis necrotizante, perforación cólica y colecistitis alitiásica.

Aproximadamente el 25% de los niños que ingresa en UCIP presentan SDMO, y la mortalidad asociada varía entre el 26 y el 50%.

La mortalidad del SDMO en niños, aunque elevada, es inferior a la del adulto. En un estudio retrospectivo se encontró que la mortalidad del SDMO en niños con sepsis fue del 66%, aumentando al 84% en el shock séptico con SDMO. El riesgo de que los niños con síndrome séptico y shock séptico evolucionen a SDMO es elevado, 25 y 52% respectivamente. Algunas infecciones tienen una alta probabilidad de desarrollar SDMO y muerte, lo que sucede cuando éstas presentan signos de insuficiencia circulatoria (hipotensión arterial persistente o recurrente que requiera una expansión superior a 20 mL/kg y/o moderada o altas dosis de drogas inotropas vasopresoras); recuento de leucocitos en sangre periférica inferior a 10.000/mm³ y coagulopatía²³³.

En la sepsis ha sido demostrado que un predictor precoz del desarrollo de SDMO es el grado de perfusión tisular esplácnico (tonometría gástrica, capnografía sublingual). El pH arterial, pH venoso mixto, pH intramural gástrico (pHi), ácido láctico, índice cardiaco, resistencias sistémicas. El índice cardiaco valorado en el momento del ingreso ha mostrado ser un mal predictor de evolución hacia SDMO.

TABLA 12. CRITERIOS DE DISFUNCIÓN ORGÁNICA

ORGANO AFECTO	CRITERIOS DE DISFUNCIÓN
CARDIOVASCULAR	<p>A pesar de la administración de fluido intravenoso ≥ 40 mL/kg en 1 hora:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hipotensión < percentil 5 para su edad o presión arterial sistólica < 2 SD para su rango de edad. • Necesidad de drogas vasoactivas para mantener la presión arterial (dopamina > 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ o dobutamina, adrenalina o noradrenalina a cualquier dosis). • Dos de los siguientes criterios: <ul style="list-style-type: none"> - Acidosis metabólica: déficit de base ≥ 5 mEq/L. - Incremento de ácido láctico dos veces superior al límite normal. - Oliguria: diuresis < 0,5 mL/kg/h. - Relleno capilar > 5 segundos. - Gradiente de temperatura > 3°C.
RESPIRATORIO	<ul style="list-style-type: none"> • $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ en ausencia de cardiopatía congénita o de enfermedad pulmonar previa • $\text{PaCO}_2 > 65$ mmHg o 20 mmHg por encima de la línea basal de PaCO_2 • Necesidad de ventilación mecánica invasiva o no invasiva
NEUROLÓGICO	<ul style="list-style-type: none"> • Escala de coma de Glasgow ≤ 11. • Cambios agudos con descenso ≥ 3 puntos en la escala de coma de Glasgow.
HEMATOLÓGICO	<ul style="list-style-type: none"> • Plaquetas < 80.000/mm³ o descenso del 50% en el recuento plaquetario más elevado de los tres días previos en los pacientes hemato-oncológicos crónicos. • Tiempo de tromboplastina parcial elevado.
RENAL	<ul style="list-style-type: none"> • Elevación de la creatinina dos veces por encima del límite superior normal correspondiente a la edad o doblar el nivel sérico basal de creatinina.
HEPÁTICO	<ul style="list-style-type: none"> • Bilirrubina total ≥ 4 mg/dL (no aplicable en el recién nacido). • Elevación de ALT por encima del límite superior normal correspondiente a la edad.

[Fuente: Nieto Moro²³³, 2015]

La mayoría de las muertes en pediatría ocurren en los primeros días tras el diagnóstico de SDMO y el 50% de todas ellas en las primeras 24 horas. Los predictores de gravedad y muerte en niños con SDMO han podido ser identificados mediante análisis multivariante y fueron el máximo número de órganos fracasados, la edad inferior a 12 meses, gravedad en el momento del ingreso y la escala de gravedad valorada por Pediatric Risk of Mortality Score (PRISM). La escala PELOD está validada recientemente para niños y ha demostrado una buena capacidad de discriminación pronóstica. Se asocia mayor mortalidad cuando los órganos afectados son el cardiovascular, respiratorio y neurológico.

1.9.3.2. SDMO PRIMARIO Y SECUNDARIO

Parecen existir diferencias en la cronología del SDMO del niño y adulto. En niños, los órganos fracasan rápidamente, de forma que el día de la admisión en UCIP el 86% cumplen los criterios diagnósticos, apareciendo la mayor afectación en los primeros tres días.

- **SDMO primario.** Es la respuesta sistémica a una lesión o insulto que produce disfunción simultánea de los órganos dentro de la primera semana de admisión en UCIP, sin afectación posterior, secuencial de otros órganos. En ellos la respuesta inflamatoria no es tan evidente.

- **SDMO secundario.** Es la disfunción debida a la respuesta inflamatoria por parte del paciente dentro de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, manifestándose como uno de los siguientes:

- 1) Aparición de SDMO después de la primera semana de ingreso en UCIP o
- 2) Diagnóstico de SDMO en la primera semana de admisión en UCIP, pero con la disfunción o fracaso secuencial de otros órganos de forma que transcurre más de 72 horas entre el diagnóstico de SDMO y el máximo número de órganos afectados.

En niños, el SDMO primario es más frecuente, el secundario se asocia a mayor afectación de órganos, mayor tiempo de estancia en cuidados intensivos y a cifras más elevadas de mortalidad (74% vs. 30%) que el primario.

Los adultos adoptan también dos patrones, uno de aparición precoz, sin embargo menos frecuente, se produce en los primeros 2-3 días después de la agresión (politraumatismo, shock); otro más frecuente, tardío, que se manifiesta una o dos semanas después del factor desencadenante y afecta al pulmón (SDRA) y riñón principalmente. El SDMO precoz en adultos tiene globalmente menor mortalidad (50%) que el tardío (70-90%).

1.9.3.3. FISIOPATOLOGÍA DEL SDMO

El SDMO se produce por la activación del sistema inflamatorio de manera generalizada, persistente y anárquica, lo que representa el último eslabón, el más grave del SIRS. Tras cualquier agresión se activan los mecanismos inflamatorios fisiológicos, cuyo objetivo es producir inflamación para la defensa eficaz; cuando la respuesta inflamatoria es excesiva, descontrolada, aparece SIRS y más tarde SDMO. Esta respuesta inflamatoria, que persiste una vez que la causa inicial ha desaparecido, produce disfunción de los órganos, translocación bacteriana, respuesta séptica en presencia o ausencia de infección, y más tarde fracaso multiorgánico y muerte. El SDMO es, por tanto, un proceso sistémico producido por mediadores inflamatorios cuyos efectos permanecen una vez que la causa desencadenante ha finalizado; es el precio que el organismo paga por tener un sistema de defensa contra la agresión eficaz, ya que cuando los mecanismos fisiológicos de control de la inflamación se alteran, rompiéndose el equilibrio entre los mediadores proinflamatorios, tales como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y los mediadores antiinflamatorios (IL-4, IL-10, IL-13), se inicia una cascada de migración de leucocitos y macrófagos que conducen a la agresión de los tejidos.

El SDMO puede iniciarse a través de infección (bacteria, virus, hongos,...), lesión tisular (trauma, quemadura) o shock. Los microorganismos juegan un papel desencadenante muy importante ya que activan los mediadores inflamatorios a través del lípido A de la endotoxina (bacterias gram negativas) o

del ácido teicoico (gram positivas). Éstas producen en el huésped el mismo efecto que la inoculación de gérmenes vivos, esto es, alteraciones cardiovasculares (taquicardia, hipotensión arterial), alteración de la termorregulación (fiebre, hipotermia) y alteraciones metabólicas (acidosis, hipoxemia, hipermetabolismo), todas ellas características del shock séptico. La endotoxina además activa la coagulación y el complemento, por las dos vías, la alternativa y la clásica, lo que produce CID, que aumenta la hipoxia tisular por microtrombosis.

La activación del complemento conduce a vasodilatación (histamina, bradiginina) y activación de los macrófagos y PMN, lo que tiene una gran trascendencia en el desarrollo del cuadro.

Los microorganismos o sus productos (endotoxina, ácido teicoico) activan la fosfolipasa A2 de las células endoteliales y macrófagos, que produce metabolitos del ácido araquidónico (sistema eicosanoide) que tienen potentes efectos vasomoduladores y permeabilizadores de la pared vascular, permitiendo la pérdida de líquidos del lecho vascular hacia el intersticio. La endotoxina libera también citoquinas (TNF, IL) que juegan un papel fundamental en la respuesta inflamatoria. Son capaces de activar la respuesta inflamatoria primaria (citoquinas, AA, activador de PMN) que aunque inicialmente tiene un efecto beneficioso, cuando es excesiva o persiste conduce a daño tisular y fracaso del funcionamiento de algunos sistemas, especialmente el cardiocirculatorio.

La respuesta séptica aparece también en ausencia de infección. En el pasado se creía que la infección oculta existía aunque no fuera posible demostrarla, actualmente se conoce que la respuesta séptica aparece también ante cualquier agresión intensa o persistente (quemadura, traumatismo, pancreatitis), en ausencia de infección, ya que la activación de los mediadores inflamatorios (citoquinas, complemento, activación macrófagos,...), sucede de idéntica forma ante estímulo infeccioso o no infeccioso. Esto explica que en muchos pacientes aparentemente sépticos, no se encuentren gérmenes, siendo imposible distinguir clínicamente entre respuesta séptica (shock séptico sin sepsis) e infección clásica que conduce a shock.

Por tanto, la endotoxina, otros productos microbianos, así como algunas situaciones de agresión aguda, tales como necrosis tisular, estimulan la producción y la activación de los macrófagos, incrementan los niveles de complemento sérico, inducen la granulocitosis y facilitan la respuesta inflamatoria. Cuando ésta es excesiva o persistente, algunos de sus componentes generan toxicidad lejos del lugar de producción; la liberación de citoquinas y otros productos tóxicos procedentes de los macrófagos activados simulan los síndromes infecciosos (síndrome séptico, shock séptico) de manera tan fidedigna que los hace indistinguibles. La liberación descontrolada de citoquinas ha sido documentada, tanto en los procesos infecciosos como no infecciosos (shock, hipoxia, lesión tisular, quemados). Estas pueden estimular la inflamación, citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e INF- γ cuyos efectos son sinérgicos entre sí. Su inoculación a animales de experimentación o al hombre produce los mismos cambios clínicos,

hemodinámicos, metabólicos y de alteración de la termorregulación que la administración de endotoxina o bacterias, bien directamente por citotoxicidad o bien induciendo la activación de otros mediadores (eicosanoides, RLO, PAF, proteasas,...).

Se sabe que algunas citoquinas potencian la producción de otras proinflamatorias, pero se conoce poco de los mecanismos que permiten al organismo la sobreproducción y el fracaso en el control de ésta, de forma que mientras las citoquinas proinflamatorias están aumentadas otras antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13) están disminuidas. Se ha comprobado que la falta de respuesta de IL-13, en la fase precoz de los niños con sepsis, se asocia a una mala evolución.

El endotelio juega un importante papel en la regulación del tono vascular y de la hemostasia. Cuando sus células son activadas (endotoxina, citoquinas) adquieren funciones procoagulantes y protrombóticas por la liberación de tromboplastina y PAF. Además, las células endoteliales sintetizan y expresan moléculas de contacto para la adhesión y activación de PMN. Cuando las células endoteliales son activadas, producen citoquinas, FAP, prostaglandina-I₂, endotelina (sustancia vasoconstrictora) y NO. Durante la sepsis se produce una sobreproducción de NO que es responsable de vasodilatación e hipotensión arterial. Los niños sépticos con niveles plasmáticos elevados de nitrato y nitrito, el primer día de sepsis desarrollan síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA). Por último, la lesión endotelial y algunas sustancias vasomoduladoras (metabolismo del AA, LT) aumentan la permeabilidad capilar,

lo que permite la salida de fluido al intersticio y edema, que es especialmente dañino para el pulmón. Por diversos mecanismos se produce insuficiencia cardiocirculatoria: escape de agua al intersticio, que aumenta el daño tisular; hipotensión arterial secundaria a la vasodilatación con secuestro de la volemia en los capilares persistentemente abiertos; disminución de la contractilidad miocárdica por depresores miocárdicos circulantes, etc. Todo ello produce insuficiencia en la perfusión de los órganos y tejidos corporales que perpetúa el SDMO.

Ha cobrado importancia el papel del *intestino* en el desarrollo y establecimiento del SDMO. Básicamente, cuando el organismo necesita redistribuir el flujo sanguíneo (shock cardiogénico, hipovolemia, politraumatismo, quemaduras,...), con el objeto de mantenerla perfusión tisular de los órganos vitales, se produce una autotransfusión desde el área esplácnica a la circulación general, lo que produce isquemia del tracto gastrointestinal, pérdida de la integridad anatómica y funcional de la mucosa, y paso de las bacterias o sus antígenos desde la luz hacia el torrente sanguíneo (translocación bacteriana).

Estas bacterias o sus endotoxinas estimulan la producción local, en la lámina propia, de citoquinas proinflamatorias que llegan a la circulación general a través de la vena porta, del sistema linfático o de la cavidad peritoneal. Estudios experimentales y clínicos han demostrado que existe pérdida de la barrera intestinal en los pacientes con riesgo de desarrollar SDMO, lo que podría explicar por qué no se encuentra foco infeccioso en las autopsias de más de la tercera parte de los fallecidos por SDMO con datos de bacteriemia.

En resumen, el SDMO es el resultado de una excesiva respuesta del huésped frente a la agresión, microbiana o no. Aunque los mecanismos de defensa son habitualmente beneficiosos, a veces producen daño tisular por excesiva activación. Existe evidencia de que las citoquinas proinflamatorias son liberadas a la circulación y estimulan la actividad de distintas células, endotelio, plaquetas, macrófagos y neutrófilos, y que las citoquinas antiinflamatorias son desbordadas en su papel de modular la respuesta inflamatoria. Además, son activados los sistemas del complemento, coagulación, fibrinólisis y eicosanoides, se producen y se liberan productos tóxicos y RLO. Aunque no se conoce con exactitud la interrelación que existe entre esta compleja red de células activadas, mediadores, productos tóxicos y moduladores antiinflamatorios, es seguro que las citoquinas cumplen un papel fundamental en el desarrollo del shock y SDMO.

1.9.4. DAÑO ENDOTELIAL Y ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA

El endotelio juega un papel muy importante en la lesión por isquemia-reperfusión. El daño al endotelio vascular coronario comienza en los primeros minutos de la perfusión y progresa con el tiempo. Durante este proceso se produce una activación de la superficie endotelial que conlleva la secreción de mediadores de la inflamación.

Estos mediadores facilitarán posteriormente la penetración de los neutrófilos en el intersticio. En la superficie endotelial se observan receptores para mediadores inflamatorios (interleuquinas, complemento,...) que participan en el desarrollo de la lesión. Entre los mediadores implicados cabe destacar algunas citoquinas pro-inflamatorias: IL1, IL6 y TNF α (figura 13). Estas citoquinas inducen la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1) en la superficie endotelial y de los neutrófilos²³⁴.

Los neutrófilos participan activamente en la respuesta inflamatoria que acontece durante la perfusión. Existe una correlación directa entre la duración de la isquemia, el tamaño del infarto y el acúmulo de neutrófilos en el miocardio. Los neutrófilos se unen a las células miocárdicas a través de moléculas especializadas denominadas moléculas de adhesión intercelular, como la ICAM-1, que aparece en la superficie de los miocitos como resultado de la estimulación de éstos por la IL.

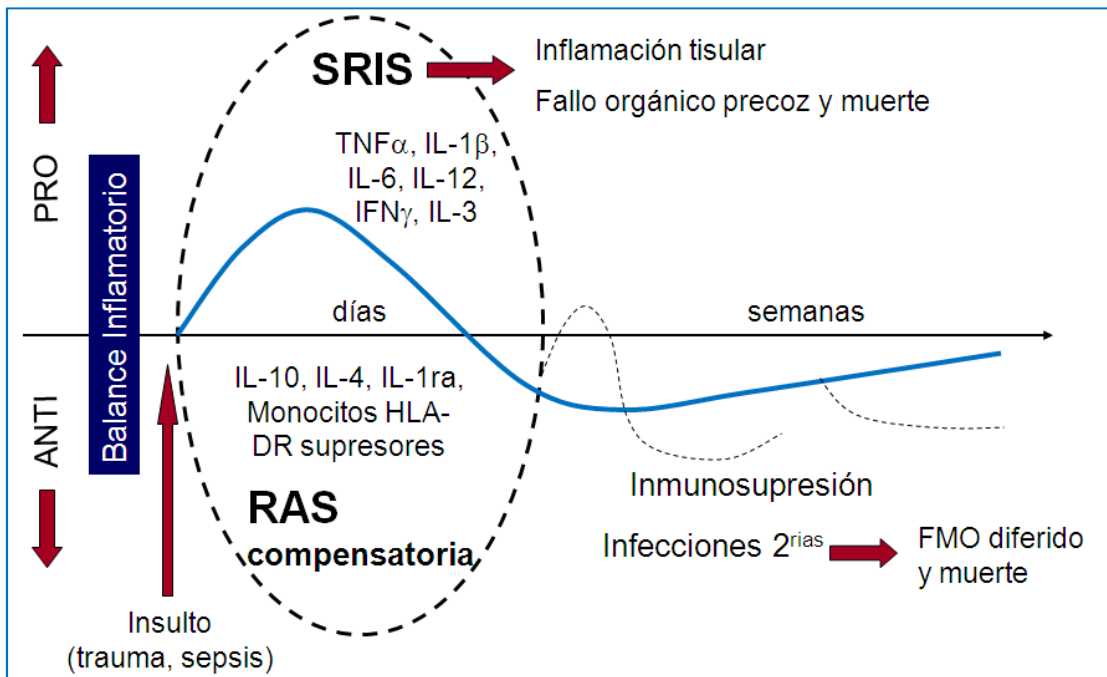


Figura 13. Balance inflamatorio en el SIRS

[Fuente: Griffiths y cols²³⁵, 2002]

Los neutrófilos y monocitos activados y llevados hacia el miocardio durante la reperfusión liberan diversas sustancias tóxicas para las células endoteliales y miocárdicas, incluidos RL, proteasas, elastasas y colagenasas. El daño a las células endoteliales produce alteraciones en la vasorrelajación, interfiere con los mecanismos antitrombóticos del endotelio y es capaz de inducir una respuesta inflamatoria que condiciona el incremento de la permeabilidad capilar, y favorece la adhesión plaquetaria y la infiltración de más leucocitos hacia el miocardio.

Para poder ejercer su efecto tisular los neutrófilos son conducidos al sitio de acción (quimiotaxis). El óxido nítrico junto con los factores quimiotácticos (PAF, LTB₄, C5a) y las citoquinas TNF- α y IL-1 promueven el reclutamiento de polimorfonucleares al sitio de reperfusión y la adherencia al endotelio disfuncional. Esta adherencia es facilitada por las moléculas adhesivas ICAM-1 y ELAM-1, promoviendo la diapédesis de los PMN a través del endotelio al espacio subendotelial e intersticio tisular. Los neutrófilos se adhieren bien a nivel precapilar o en las vénulas poscapilares, provocando un aumento de la viscosidad sanguínea que podría explicar en parte el fenómeno de “no reflujo” que a veces sucede en la reperfusión. La IL-8 activa a los neutrófilos. Los neutrófilos y monocitos activados, en su camino fuera de la luz vascular, liberan diversas sustancias tóxicas para las células endoteliales y miocárdicas como colagenasas, elastasas y RLO.

La importancia de la disfunción endotelial consiste en que es el punto de partida de la disminución del flujo coronario después de la reperfusión, fenómeno denominado como de “no reflujo”.

En 1974 Kloner²³⁶ describió el fenómeno de “no reflujo” como la imposibilidad de reperfundir el miocardio previamente isquémico. Demostró que tras la oclusión durante 60-90 minutos y posterior reperfusión de una arteria coronaria, persistían defectos de perfusión subendocárdicos cuando se inyectaba un colorante en la circulación. Asimismo, las zonas de “no reflujo” aumentaban a medida que se alargaba el tiempo de reperfusión, demostrando que la

disfunción endotelial debida a la reperfusión era el punto de partida de este fenómeno.

Estudios posteriores han demostrado que los PMN activados y su interacción con el endotelio microvascular y las plaquetas tienen un papel importante en el fenómeno de “no reflujo”.

El fenómeno de no-reflujo limita el efecto beneficioso de la reperfusión e impide que las drogas administradas durante la misma lleguen al tejido que ha estado sometido a un periodo de isquemia.

Este fenómeno se puede deber a varios factores:

1. Obstrucción mecánica de los capilares por la adhesión leucocitaria y la pérdida de elasticidad de su membrana inducida por la activación.
2. La menor capacidad de vasodilatación debida a la inhibición en la producción de NO y prostaciclina, y la vasoconstricción con contractura del musculo liso derivada de una liberación aumentada de endotelina y una degeneración de β receptores, que disminuyen también la perfusión capilar. Al persistir la vasoconstricción se produce un gradiente de presión transcapilar, por el que se acumulan más neutrófilos.
3. El daño endotelial produce fugas capilares con edema miocárdico y agregados de fibrina, que contribuyen también al no-reflujo. Aparte del aumento

de la permeabilidad capilar, el edema miocárdico se produce por edema miocítico y endotelial en sí mismo, por aumento de la permeabilidad y edema del sarcolema y disfunción del transporte de sodio, potasio y cloro.

4. También se puede producir apilamiento (*fenómeno de "Rouleaux"*) de los glóbulos rojos que impide su movimiento y la oxigenación tisular, así como agregación plaquetaria y formación de microémbolos.

1.10. FENÓMENO DE TRANSLOCACIÓN BACTERIANA INTESTINAL

Aunque el fenómeno de translocación bacteriana intestinal (TB) se conoce desde hace 100 años, todavía no tenemos una explicación clara sobre el mecanismo de transporte microbiano. Se ha propuesto como posible mecanismo de paso de bacterias de la luz intestinal a los ganglios y a los territorios distales, la captación epitelial activa y transporte mediante fagocitos. A la translocación se le atribuye un papel fundamental en el origen de la sepsis por gérmenes presentes en la luz intestinal en pacientes gravemente enfermos y con sistema inmunitario deprimido ²³⁷. En este mecanismo parece tener un papel importante la integridad de la mucosa intestinal. La TB se produce en presencia de hipotensión, endotoxemia y grandes quemaduras. La glutamina es el agente nutritivo preferido por el enterocito y por los linfocitos, y en los pacientes con situación grave de estrés se produce una depleción muy importante de glutamina y arginina.

A pesar de los avances en los métodos de diagnóstico y en las estrategias de tratamiento, las infecciones nosocomiales sigue constituyendo un problema frecuente en el enfermo grave, que condiciona un aumento de la morbimortalidad, prolonga la estancia y aumenta los costes ²³⁸.

En las dos últimas décadas, el intestino ha sido un importante foco de investigación en la patología crítica y el órgano diana responsable en la génesis de complicaciones infecciosas no determinadas y el desencadenante final en el desarrollo del SDMO.

La disfunción intestinal se ha relacionado, en parte, con una disminución en la competencia inmune y con la pérdida de la integridad anatómica y funcional del tracto gastrointestinal. Su resultado es un incremento de la permeabilidad de la barrera intestinal (PI), que favorece el paso y la translocación de gérmenes gram negativos o TB desde la luz del intestino hacia el medio interno, con la aparición de bacteriemias endógenas y de infecciones a distancia, especialmente en el pulmón, y de sepsis abacteriémicas por absorción de endotoxinas y otros productos bacterianos.

1.10.1. BARRERA INTESTINAL

El intestino tiene funciones endocrinas e inmunológicas, además de las habituales de digestión, metabolismo y absorción de nutrientes. Normalmente el intestino delgado es estéril, a diferencia del intestino grueso donde existe una interacción competitiva entre las distintas especies de bacterias, adecuadas a la disponibilidad de sustratos metabólicos. Otra importante función, es la de actuar de barrera entre los medios interno y externo.

La mucosa intestinal es especialmente resistente a la acción proteolítica de las enzimas y la invasión de la flora residente y es prácticamente impermeable a las macromoléculas. A nivel local el paso de bacterias y endotoxinas a través de la pared del intestino está controlado por dos tipos de mecanismos: a) *mecánicos*, que incluyen la empalizada intestinal y el mucus, que facilitan el barrido de antígenos e interfieren con la adherencia y proliferación de bacterias sobre la superficie del epitelio, y b) *inmunológicos*, cuyo componente inmunológico está representado por el GALT: las placas de Peyer, linfocitos B y T, plasmocitos y macrófagos distribuidos por la lámina propia, linfocitos intraepiteliales y ganglios linfáticos mesentéricos. Los plasmocitos de la lámina propia son los encargados de sintetizar las inmunoglobulinas y en especial la Ig A secretora, que interviene en la eliminación de antígenos e inhibe la adherencia bacteriana.

La mucosa del tracto gastrointestinal se compone de un epitelio en columna o empalizada que contiene células inmaduras y adultas maduras. Las células inmaduras predominan en la porción baja de los villi y su función es primariamente secretora. Las células maduras se localizan en la parte superior de los villi y su función es fundamentalmente absorptiva. Entre las células del epitelio existen elementos de unión que hacen que pueda actuar como barrera o como puente.

Estas células epiteliales no solo tienen, una función absorbente y secretora sino que también sirven como puerta protectora entre la luz intestinal contaminada y el ambiente estéril del organismo.

El sistema inmune intestinal es un complejo grupo de estructuras altamente especializadas y tipos de células que desarrolla su función en áreas continuamente expuestas a antígenos ambientales. Juega un papel primordial en la protección del huésped frente al ambiente exterior. Se calcula que el 25% de la mucosa intestinal es tejido linfoide y que entre el 70-80% de las células inmunosectoras están localizadas en el intestino.

Al conjunto de células inmunes se denomina GALT, formado por placas de Peyer. Sobresaliendo en el interior de la luz intestinal, las placas de Peyer son análogas a los nódulos linfáticos. Unas células epiteliales especializadas, las células M, revisten las placas de Peyer y actúan como linfáticos aferentes. Los antígenos son transportados, a través de las células M, los macrófagos, conocidos como células presentadoras de antígenos, iniciando la respuesta inmune intestinal. Las placas de Peyer constituyen el principal lugar para la presentación de antígenos así como para la iniciación y expresión de la inmunidad de la mucosa. En ellas se distinguen distintas zonas. El área intrafolicular y la cúpula contienen principalmente linfocitos T, aunque la cúpula también es rica en células plasmáticas y macrófagos. Los linfocitos T presentes en las placas de Peyer poseen marcadores de superficie para CD4 y CD8, es decir, T helper y T citotóxico/supresor.

Células linfoides de la lámina propia. Incluyen linfocitos T y B, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos y células cebadas. El 80% de las células plasmáticas producen Ig A, solo un 15% Ig M y una pequeña fracción Ig E.

Los linfocitos intraepiteliales se localizan dentro de la lámina propia en una proporción de un linfocito por cada seis células epiteliales. Aunque la estimulación antigénica no es precisa para su desarrollo, su número se ve influenciado por los antígenos y los microorganismos de la luz intestinal ²³⁹.

1.10.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA BARRERA INTESTINAL

En una amplia variedad de patologías graves, como quemados críticos ^{240, 241}, bypass cardiovascular ²⁴², politraumatismo grave y más recientemente en trasplante de intestino ²⁴³, ictericia obstructiva y cirrosis alcohólica ²⁴⁴, se produce una pérdida de esta función de barrera, con la consiguiente entrada y translocación de bacterias (muertas o vivas) y productos bacterianos (como endotoxinas, exotoxinas y fragmentos de la pared celular) desde la luz del intestino a otros territorios extraintestinales, con la consiguiente reducción en la absorción de nutrientes ^{245, 246}, la disminución en la respuesta inmune y secreción de sustancias inmunológicas que generan aumento en la PI y episodios de SIRS.

Su alteración viene mediada por tres factores: la hipoxia celular; la lesión tisular inducida por mediadores, como RLO, NO, citoquinas, etc; y el efecto tóxico de

algunas bacterias sobre la luz intestinal. El resultado final, es la aparición de episodios de isquemia y reperfusión, y modificaciones en los flujos en diferentes zonas intestinales.

- Hipoxia celular: las lesiones histológicas de la mucosa intestinal, en diferentes modelos experimentales de shock hemorrágico, son prácticamente idénticas a las encontradas en los estudios necrópsicos de pacientes fallecidos en shock e incluyen: edema y descamación de los enterocitos, interrupción de la lámina propia con focos hemorrágicos y ulceraciones y, ocasionalmente, presencia de bacterias atravesando la mucosa.

- Mediadores tóxicos: durante el periodo de isquemia los depósitos intracelulares de adenosintrifosfato, son sucesivamente hidrolizados a adenosina 5-difosfato, adenosina monofosfato y, finalmente, a adenosina que a su vez puede ser convertida en hipoxantina. Tras la reperfusión, la hipoxantina reacciona con la xantinaoxidasa y el oxígeno, generando gran cantidad de RL derivados, que cuando superan la capacidad defensiva local amplifican la lesión de la mucosa intestinal. Así mismo, la isquemia también promueve la conversión de la xantinaoxidasa en xantinaoxidasa, que en presencia de oxígeno, facilita aún más la producción de RL.

La síntesis de radicales hidroxilo a partir de O_2 y H_2O_2 con la participación de un catalizador metálico (un ión férrico) podría dar lugar también a graves

alteraciones en la mucosa intestinal dada su gran capacidad oxidante. Otros mediadores, como el TNF, el NO y el PAF, también han sido implicados en la lesión de la mucosa intestinal.

- Patógenos: también la interacción entre los diferentes gérmenes no habituales y la barrera intestinal, producen un diferente grado de virulencia. La forma más habitual de vulneración y posterior penetración es a través de la unión de las células epiteliales, debido a una disminución en su resistencia; tal es el caso del *escherichia coli*, *salmonella* o *bacteroides*. Otras formas son las producidas por fosforilación de la membrana, o los cambios en el cytoskeleton III, en la zona apical de las células epiteliales. Finalmente algunos agentes patógenos, modularía un cambio en la permeabilidad sin aparentes cambios estructurales.

Estos cambios morfológicos, aumentan la adhesión y la paracelular migración de gérmenes gram negativos, como *proteus*, *enterobacterias* o *clostridium*.

En resumen, la hipoperfusión de la mucosa, y el íleo concomitante ²⁴⁷, es un hecho de fundamental importancia en el desarrollo de la TB y el posible factor desencadenante en la aparición complicaciones infecciosas sistémicas. La isquemia resultante de la hipoperfusión mesentérica, se manifiesta de mayor a menor intensidad desde las capas más superficiales de la pared del intestino (las vellosidades intestinales) a las más profundas (la muscularis mucosa) y en relación directa con la severidad y duración del compromiso isquémico. Si la

isquemia es suficientemente prolongada, se produce edema subepitelial seguido de denudación de las células epiteliales inicialmente en la parte más distal de las vellosidades. En fases más avanzadas, aparece una necrosis completa de la mucosa, seguida de disrupción de la submucosa e incluso de la muscularis mucosa completándose la necrosis transmural del intestino.

En situaciones de sepsis grave existe una paradójica reducción, disponibilidad y extracción de oxígeno con aumento en la demanda. Este desbalance, provoca una disminución en la concentración de oxígeno intracelular mitocondrial, que induce una limitación en la respiración aeróbica a favor de la anaeróbica, favoreciendo la acidosis, que incrementa el daño de barrera y aumenta aún más la PI. La acidosis local, activa los fenómenos de reperfusión, que activan aún más la formación de mediadores incrementando la formación de radicales superóxido. El exceso en radicales superóxido, generan secundariamente alteraciones en la microcirculación, que activan la formación de neutrófilos que a su vez favorecen aún más la formación de radicales peróxidos ²⁴⁸. El resultado es un aumento en el daño tisular secundario por alteración de la microcirculación que agrava aún más la isquemia intestinal.

1.10.3. MECANISMO, VÍA Y LOCALIZACIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN BACTERIANA

Los principales mecanismos afectos en la TB son: alteración en la microflora gastrointestinal normal que condiciona sobrecrecimiento bacteriano; disrupción física de la barrera mucosa intestinal por lesión directa de los enterocitos (radiación o toxinas) o por un reducido flujo sanguíneo intestinal; alteraciones de las defensas del huésped.

Existen múltiples vías por las que un organismo puede translocar fuera del intestino a localizaciones extra-intestinales: migración retrógrada a los pulmones, migración transmural directa a través de la barrera intestinal, migración a través de las placas de Peyer, de los nódulos linfáticos mesentéricos, del conducto torácico y de la circulación sistémica o la vía de los canales vasculares hasta alcanzar el sistema porta.

La localización de la TB no ha sido nunca bien estudiada y puede depender tanto del modelo experimental empleado como de la causa. En la endotoxemia, parece que la lesión mucosa es mayor en el íleo y ciego que en el yeyuno. Durante la NPT se objetiva pérdida de la función de barrera a través de todo el intestino delgado y del ciego (pero no del colon) mientras que las dietas elementales aumentan la PI sólo en el íleo. En modelos de quemaduras se han

objetivado grupos aislados de asas con alteración en la permeabilidad en el yeyuno, íleo y colon proximal.

Finalmente, no podemos olvidar que el sumatorio de sobrecrecimiento bacteriano más alteraciones de la PI en el intestino delgado, son las principales circunstancias promotoras conocidas de TB ²⁴⁹.

1.10.4. PERMEABILIDAD Y TRANSLOCACIÓN BACTERIANA. SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

Un gran número de estudios experimentales, han demostrado la relación entre aumento en la PI, el fenómeno de TB y el aumento de infección:

En un modelo de shock hemorrágico ²⁵⁰ en ratas, en situación de hipoperfusión, se demostró que a los 90 minutos, un 100% de cultivos positivos en ganglios linfáticos mesentéricos y un 60% de diseminación de enterobacterias a hígado y bazo. Los gérmenes más frecuentemente aislados fueron *E. coli*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Enterococo*. Tan solo un 30% de los hemocultivos fueron positivos.

Navaratnam²⁵¹ en un estudio realizado en ovejas, a las que administra endotoxina, encuentra una disminución del 50% del flujo vascular mesentérico,

con aumento de las resistencias vasculares. Los cultivos de los ganglios mesentéricos fueron positivos en el 100% de los casos. Sus resultados sugieren que la vasoconstricción y la isquemia intestinal inducida por la endotoxina es la causa de TB (figura 14).

Estudios en cerdos sometidos a quemaduras, se observó una vasoconstricción esplánica selectiva, con disminución del consumo de oxígeno en territorio vascular mesentérico, acidosis de la mucosa y evidencia de TB y endotoxemia.

Si bien, en los estudios experimentales, la TB ha sido ampliamente reproducida, los resultados en estudios clínicos han sido muy limitados. La evidencia de contaminación linfática mesentérica (y del papel de la IL-2) es un argumento suficiente para la demostración de la TB para algunos autores²⁵², y poco concluyente para otros, ya que representa una respuesta normal inmunitaria en las situaciones de gravedad:

Uno de los primeros estudios clínicos fue realizado por Ziegler²⁵³, que midió el grado de permeabilidad intestinal, mediante la administración digestiva de una mezcla de lactulosa/manitol (L/M) en enfermos quemados graves, donde comparó la PI entre el grupo de enfermos con y sin sepsis. Sus resultados demostraron que en el grupo con sepsis, el cociente L/M, estaba aumentado, frente a los sin sepsis, concluyendo que un aumento en la PI, era sinónimo de infección y de TB.

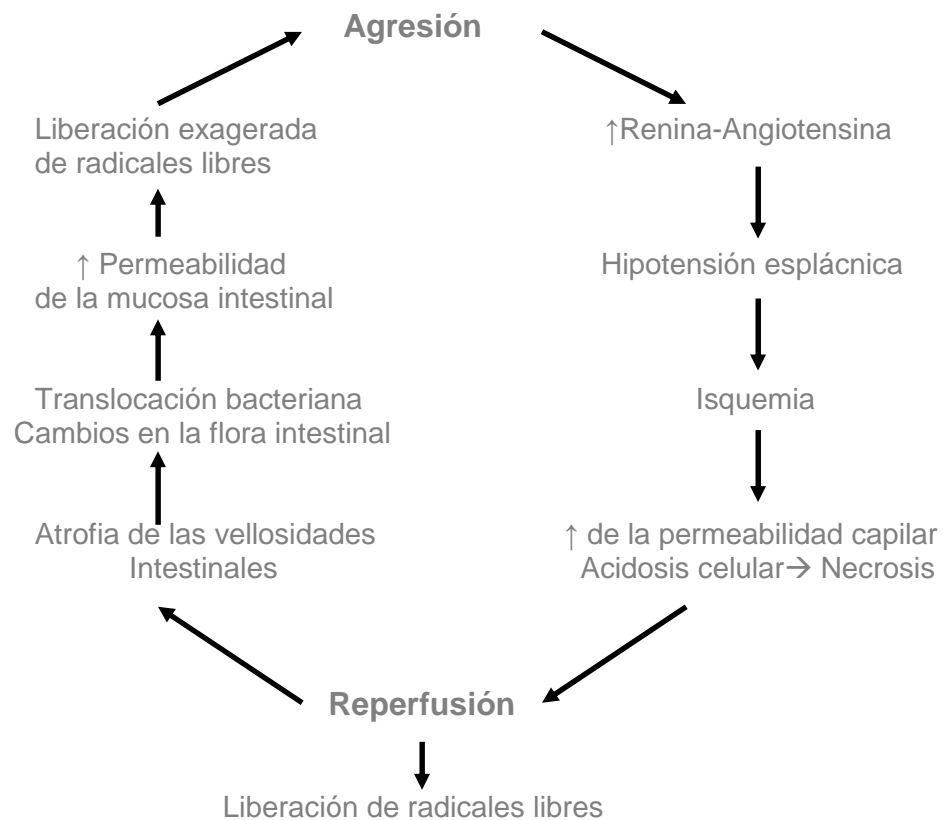


Figura 14. Respuesta del intestino frente la agresión.

Doig²⁵⁴ demostró que la PI medida por el cociente L/M, solo fue una variable predictiva en la aparición de SDMO. En enfermos politraumatizados graves, con shock, la presencia de bacterias en la vena porta fue un hallazgo casual, tanto en fase precoz como tardía²⁵⁵. Por el contrario, Faries²⁵⁶, en enfermos con lesiones traumáticas múltiples, encontró una significativa correlación entre el aumento de la PI y las diferentes variables de gravedad, además un elevado nivel de PI se correlacionó con mayor incidencia de SIRS, infección y SDMO.

Basándose en los estudios experimentales, otros autores compararon la NE y NPT, evaluando parámetros de mortalidad e infección, sus conclusiones demostraron que la NE, redujo de forma significativa la incidencia de infección, pero en ninguno de los dos estudios se contabilizaron la diferencia en el aporte ni se realizó un control estricto de glucemia. Una reciente encuesta donde se evaluaron las complicaciones de la NE y NPT, en enfermos graves ²⁵⁷ y donde se controló el aporte calórico, no se observaron diferencias significativas en la incidencia de infección, mortalidad con ambos tipos de aporte. En esta línea, recientes trabajos indican que la glutamina (independientemente de la vía de administración) puede ayudar a controlar una PI alterada ²⁵⁸.

También la medicación vasoactiva, puede alterar el flujo intestinal, su efecto sobre el flujo sanguíneo esplácnico e intestinal, puede no ser paralelo y su distribución por los diferentes territorios del intestino y ser cambiante dependiendo del tipo de medicación vasoactiva y de la dosis administrada.

Así, la dobutamina incrementa el flujo de la mucosa intestinal y gástrica a expensas de una disminución de la perfusión de la mucosa; en cambio la dopamina a dosis bajas puede precipitar el desarrollo de isquemia intestinal por su acción vasoconstrictora precapilar y redistribución del flujo hacia la mucosa. Quizá nuevos agentes inotrópicos, como el levosimendán, puedan ayudar a controlar estos eventos. Sin embargo, la interacción entre catecolaminas y NE, no ha demostrado cambios sustanciales en enfermos postoperados, en situación de inestabilidad hemodinámica ni un empeoramiento de la PI.

1.10.5. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA TRANSLOCACIÓN BACTERIANA

Una amplia variedad de estrategias terapéuticas se han investigado en el tratamiento de la TB^{249, 259, 260}, aunque la mayor parte ha sido en animales de experimentación y cuando se ha efectuado en humanos lo publicado son series pequeñas no controladas y difícilmente reproducibles.

Aunque lo más efectivo es el controlar la enfermedad de base, la dieta es una de las medidas más probadas para controlar tanto una PI alterada como la TB. Y dentro de las dietas, son las modificadas en nutrientes (glutamina, arginina, ácidos grasos, fibra...) las que presentan resultados más prometedores. Otras maniobras enterales incluyen el aporte de Ig A e Ig G (enterocolitis en neonatos), ornitina-alfa-cetoglutarato (estructura y función intestinal e inmunidad celular) o aceite de pescado (flujo sanguíneo intestinal y capacidad del huésped de matar bacterias translocadas por aumento en la síntesis de prostaglandinas vasodilatadoras).

Los probióticos (diferentes especies de *Lactobacillus*) pueden proteger al intestino de la TB inhibiendo el crecimiento de gram negativos y de bacterias patógenas, atenuando la adherencia y la invasión de bacterias enterovirulentas

en las líneas celulares intestinales humanas, mejorando la secreción de Ig A y estabilizando la barrera epitelial intestinal.

El oxígeno hiperbárico (HBO₂) previene la TB en modelos experimentales de obstrucción intestinal, quemadura, inflamación sistémica e ictericia obstructiva. Se atribuye su acción beneficiosa tanto a su efecto bacteriostático sobre algunas cepas de *E coli* previniendo el sobrecrecimiento bacteriano como a un efecto antiinflamatorio. Mejora la defensa del huésped aumentando la capacidad de los fagocitos y neutrófilos (que requieren oxígeno molecular para desarrollar su actividad).

La posibilidad de neutralizar las endotoxinas con péptidos neutralizadores (polimixina) no ha demostrado repercusión clínica posiblemente debido a que los anticuerpos unidos a la endotoxina no neutralizan completamente sus efectos. Además, la inmunoparálisis inducida puede ser excesiva en algunos pacientes. En esta línea, una proteína fisiológica con propiedades anti-endotoxina es la BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) que es parte del sistema de defensa de los neutrófilos. Por ello, la BPI neutraliza y acelera el aclaramiento de los LPS, suprime la activación celular mediada por endotoxinas y presenta propiedades antibactericidas. La BPI recombinante (rBPI) parece reducir la incidencia de TB y atenúa la lesión de órganos vitales (animales de experimentación, niños con meningocemia grave y trauma hemorrágico).

El efecto de la acumulación y activación de los neutrófilos sobre la función de la barrera intestinal y la TB es conocido en la situación de agresión grave. La interferencia con la función de los neutrófilos reduce la TB y mejora la supervivencia a nivel experimental. Sin embargo, en el proceso de la TB, el papel de las especies reactivas de oxígeno, derivadas de los neutrófilos activados, se mantiene por los barredores de RLO, inhibidores de la xantina, que decrecen la lesión mucosa y la TB. La inhibición de la adherencia de los leucocitos, administrando anticuerpos monoclonales frente al ICAM-I, parece ser una línea de futuro.

La activación de *los toll-like receptors* por los microorganismos comensales juega un papel crítico en la prevención de la lesión mucosa. Los toll-like receptors son capaces de reconocer tanto a las bacterias patógenas y comensales como al LPS. Los modelos animales que rompen la capacidad del microorganismo comensal para activar los toll-like receptors condicionan mayor mortalidad a través de la lesión de la mucosa.

Una actuación generalmente aceptada en muchas UCIs es la descontaminación intestinal selectiva con antibióticos no absorbibles (tobramicina, polimixina E, anfotericina o cefotaxima) frente a *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y hongos. Recientes trabajos indican que reduce significativamente la incidencia de infecciones nosocomiales en los pacientes críticos ventilados mecánicamente, en los trasplantados de hígado y en los trasplantes de médula ósea.

Finalmente, el control de la hipertensión intraabdominal en los pacientes traumáticos y en los sometidos a agresivas terapias de fluidos resucitadores; de la diarrea; y de los efectos de la ventilación mecánica sobre el flujo esplácnico, puedan ayudar a entender mejor este problema.

La PI es un signo clínico inherente a la propia lesión y es proporcional a su intensidad y extensión. No existen estudios clínicos, que relacionen el aumento de la PI, con la aparición de TB, aunque una afectación mantenida de la PI, se ha relacionado con una mayor incidencia de SDMO. La PI y los episodios de infección, son dos situaciones relacionadas con la gravedad de las lesiones en el paciente críticamente enfermo, pero no consecuentes.

El conjunto de medidas encaminadas a disminuir la intensidad y duración de la lesión, como la disminución de los períodos de inestabilidad hemodinámica, el uso precoz de medicación vasoactiva, la administración precoz de sustratos, etc., pueden reducir los episodios de hipoperfusión (isquemia/ reperfusión), que a su vez disminuirían la extensión de la PI y el tiempo en su reparación.

El concepto de que la TB contribuye a la morbilidad permanece como una atractiva línea de investigación. En particular el papel del hígado y del pulmón modulando la respuesta inflamatoria debe de ser más profundamente investigado. También deben de realizarse estudios sobre los cambios o

modificaciones de la permeabilidad cólica, en la vía linfática de la TB y en la liberación de mediadores inflamatorios por los nodos linfáticos mesentéricos. La TB no debe de ser considerada como un fenómeno de “todo o nada” que, bajo cualquier circunstancia, condicione cambios clínicos definidos. Aunque en animales existe una extensa documentación que indica incrementos en la TB en diferentes situaciones patológicas con variable impacto en la evolución, en humanos los datos son escasos y los resultados publicados indican una gran variabilidad. Sabemos que la TB puede ocurrir en individuos sanos y en pacientes críticamente enfermos, así como en la cirrosis terminal. Pero trasladar estos conceptos a su repercusión clínica presenta dificultades debido a problemas metodológicos, a falta de acuerdo sobre el impacto clínico y pronóstico de la TB una vez que ha ocurrido y, a una indefinición sobre el efecto y el beneficio que se puede conseguir con la prevención y/o el tratamiento de la TB²³⁷.

1.11. CAMBIOS EN EL METABOLISMO DURANTE LA ENFERMEDAD CRÍTICA Y LA SEPSIS

La sepsis se considera un proceso habitual en pacientes críticamente enfermos, bien porque sea la causa de ingreso en la unidad o que por la situación de estrés a la que se encuentran expuestos sean más susceptibles a sufrir procesos infecciosos durante su estancia en la UCI. Lo que va asociado a una gran morbilidad y mortalidad en estos pacientes.

1.11.1. ENFERMEDAD CRÍTICA Y SEPSIS EN PEDIATRÍA

La sepsis es definida como el SIRS asociado a sospecha de infección o infección probada. Cuando la sepsis se complica con disfunción de algún órgano, se considera sepsis severa. Si existe disfunción del sistema cardiovascular, caracterizado por signos de hipoperfusión y/o hipotensión arterial (en niños no está necesariamente presente la hipotensión arterial en estadios iniciales), se determina como shock séptico²⁶¹.

La sepsis en pediatría es un importante problema de salud, asociado a gran morbimortalidad, con un sustancial consumo de recursos sanitarios^{262, 263}. Ya en 1995, la incidencia de la sepsis severa en niños en Estados Unidos fue de más de 42.000 casos (0.56 casos/1.000 habitantes/año), con 10 veces mayor riesgo para lactantes que en niños mayores y con una enfermedad subyacente

en el 49% de los casos. El porcentaje de mortalidad hospitalaria era de 10.3%²⁶². En todo el mundo, la sepsis es la causa más común de mortalidad en la infancia. La sepsis en pediatría es diferente a la del adulto en cuanto a la epidemiología, fisiopatología y manejo hospitalario debido a las comorbilidades asociadas, diferentes localizaciones de infección, así como patógenos y diferencias fisiológicas de niños respecto a adultos²⁶³.

En adultos, la arginina presenta un gran papel en el contexto de la enfermedad crítica y la sepsis, sobre todo por su involucración en la función inmunitaria y como precursor de la formación de moléculas como el NO, que está implicado en la tensión arterial generando vasodilatación.

1.11.2. METABOLISMO DE LA ARGININA EN LA SEPSIS

El déficit de arginina se encuentra presente en los procesos sépticos debido al severo catabolismo que este proceso provoca, y la disfunción endotelial asociado al mismo²⁶⁴. La suplementación exógena con arginina en estos pacientes es un punto no aclarado, tanto en los estudios realizados en animales con resultados controvertidos y en humanos, los cuales son escasos y siendo muy variables las dosis administradas, vías de administración, cuando iniciar la suplementación en la dieta, etc. La mejoría del metabolismo para la producción del NO podría tener efectos en detrimento para la situación cardiovascular, incrementando la inestabilidad hemodinámica, con agravamiento de la hipotensión arterial y potenciar el estrés oxidativo. Mientras que la administración exógena de arginina tendría como efectos

potencialmente beneficiosos durante la sepsis: la mejoría del metabolismo proteico, dada la situación de catabolismo existente, mejoría de la microcirculación por efecto vasodilatador, efectos beneficiosos sobre el sistema inmune con efecto antibacteriano, reestablecer la función intestinal regenerando la atrofia causada por situaciones de isquemia-reperfusión, y el papel antioxidante de la arginina.

La arginina es considerado un aminoácido no esencial en situaciones de salud, pero se convierte en esencial bajo situaciones de enfermedad, implicada en múltiples rutas metabólicas que se ponen en marcha ante el estrés de una cirugía, trauma o como es el caso de la sepsis, encontrado niveles disminuidos de arginina en plasma ^{7, 77, 267}.

Existe un importante cambio en el metabolismo de la arginina durante la sepsis, caracterizado por una disminución de los niveles de arginina tanto en plasma como en los tejidos, comparados con enfermos no críticos, controles sanos o con pacientes críticamente enfermos pero que no están cursando ningún proceso séptico ²⁶⁶⁻²⁷⁰.

La arginina puede seguir dos rutas metabólicas:

- 1) Vía arginasas: la cual es metabolizada hacia urea y ornitina. La arginasa (ARG) I se encuentra expresada abundantemente en el hígado, donde es detoxificado a amonio vía síntesis de la urea en el ciclo de la urea. La ARG I se encuentra expresada de forma limitada en otros tejidos. ARG II

se encuentra presente en los tejidos extrahepáticos, como por ejemplo: riñón, cerebro, intestino delgado y macrófagos, y directamente transforma la arginina en ornitina, poliaminas y prolina ¹⁵. Estos productos finales son responsables de crecimiento y diferenciación celular, y posterior formación del tejido conectivo, implicados en la cicatrización.

- 2) Vía óxido nítrico sintasas (NOS): generando NO, con tres isoformas existentes. NOS1 y NOS3 son enzimas constitutivas necesarias para la función del NO como neurotransmisor y tensión arterial respectivamente. NOS2, se encuentra en los macrófagos, y generalmente no se expresa, pero es inducida y genera liberación de citoquinas durante los procesos inflamatorios, y por tanto juega un papel fundamental en la función inmune. El NO producido por la NOS2 contribuye a activar a los macrófagos con acción citotóxica, modular la producción de citoquinas, desarrollo de linfocitos T-helper y eliminar los RL ²⁶⁵. Sin embargo es el encargado de provocar el exceso de vasodilatación sistémica durante la sepsis ²⁷¹. La inducción de la NOS2 durante la sepsis, disminuye la actividad de la NOS3, siendo esta inhibida.

La arginina deriva de la dieta y se correlaciona con el catabolismo proteico. Esta es sintetizada *de novo* por su único precursor que es la citrulina, que se encuentra principalmente en el túbulo proximal del riñón. Citrulina es un aminoácido no proteico, que es sintetizado en el intestino a partir de la

glutamina y la prolina ¹⁵. También la citrulina se forma como un subproducto durante la síntesis del NO (Figura 15).

En adultos sanos, la síntesis *de novo* de la arginina es suficiente, no considerándose un aminoácido esencial. Sin embargo, en situaciones con incremento de las necesidades metabólicas, como es durante el crecimiento de los lactantes y niños, en situaciones de estrés, cirugía, pacientes críticamente enfermos o sepsis, donde el catabolismo proteico se encuentra aumentado, se considera un aminoácido esencial.

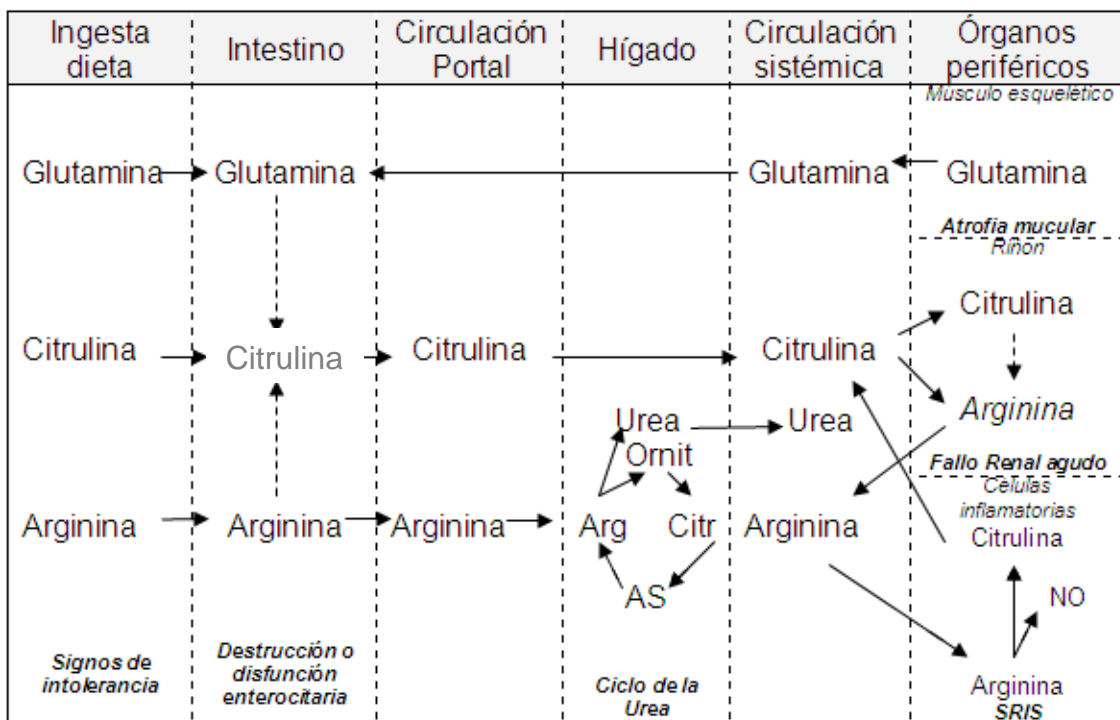


Figura 15. Metabolismo de citrulina y arginina en pacientes críticos

[Fuente: Piton y cols⁴⁵, 2011]

1.11.3. CONCENTRACIONES DE ARGININA EN PLASMA EN PACIENTES CRITICAMENTE ENFERMOS Y CON SEPSIS.

En adultos, la sepsis está asociada a concentraciones reducidas de aminoácidos en plasma, y un aumento del aclaramiento de los mismos ^{266, 268}. Las concentraciones de arginina en plasma, en individuos sanos, son de aproximadamente 80-120 $\mu\text{mol/L}$, y pueden disminuir a cifras de 40 $\mu\text{mol/L}$, durante la sepsis ^{266, 272, 273}. En un metaanálisis realizado de los estudios existentes de las concentraciones de arginina en plasma durante la sepsis, muestran que en la sepsis, no asociada a trauma o cirugía, existe ciertamente un estado de hipoargininemia profundo, con reducción de la arginina hasta cifras de 33.9 $\mu\text{mol/L}$ comparado con controles no sépticos ²⁷⁴. Un dato muy importante, es que los pacientes que fallecen por sepsis, presentan unas concentraciones plasmáticas de arginina mucho menores que los supervivientes ²⁶⁶. También los pacientes críticamente enfermos por otras causas diferentes a la sepsis, por ejemplo: pancreatitis, traumatismo, rotura de aneurisma aórtico, etc., mostraban reducción en plasma de las concentraciones de los aminoácidos y no eran diferentes respecto a pacientes con sepsis ²⁷⁵. Además, tanto el traumatismo como la cirugía son considerados desencadenantes del estado deficiente de arginina ²⁷⁶.

Las concentraciones plasmáticas de citrulina están también reducidas en pacientes sépticos comparados con controles sanos, y en menor medida en controles de cuidados intensivos ingresados por otra patología (insuficiencia

respiratoria, hemorragia subaracnoidea, traumatismo craneoencefálico) ²⁷². En enfermos críticos adultos con diferentes diagnósticos al ingreso, existen bajas concentraciones plasmáticas de citrulina, siendo considerado como un factor independiente de mortalidad.

Otro estudio realizado en adultos con sepsis severa comparado con controles sanos, encuentran niveles bajos de arginina, citrulina y ornitina en pacientes con sepsis severa versus controles. Así como una disminución en el ratio arginina/ dimetilarginina (DMA) en los pacientes sépticos, el cual se correlacionaba con la gravedad de la enfermedad, encontrando una asociación independiente con la mortalidad hospitalaria y la mortalidad global a los 6 meses ²⁷⁰.

En niños críticamente enfermos, apenas existen estudios que midan las concentraciones plasmáticas de arginina y citrulina. Van Waardenburg y colaboradores²⁷⁸ comparan niveles plasmáticos de arginina y citrulina en pacientes pediátricos con sepsis o traumatismo con otro grupo de pacientes pediátricos ingresados por infecciones víricas, encontrando niveles de ambos aminoácidos mucho más bajos en el grupo con sepsis. Además, encuentran una correlación inversa entre las concentraciones de arginina y de citrulina con los niveles de proteína C reactiva (PCR) como marcador de inflamación. La asociación entre arginina y PCR persiste incluso durante la recuperación, y las cifras de PCR son un fuerte predictor del nivel de arginina en plasma, más incluso que la ingesta proteica. El ratio arginina/ ornitina se encuentra

disminuido en pacientes con sepsis, que puede ser indicador de un incremento de la actividad de la ARG.

Sólo otro estudio reciente evalúa las concentraciones de arginina y citrulina en pacientes pediátricos con sepsis, y ciertamente los niveles de ambos aminoácidos en plasma se encuentran significativamente disminuidos en pacientes con sepsis comparados con controles sanos, pero no existen diferencias con controles febriles. Además en este estudio el ratio arginina/ornitina también se encuentra disminuido en pacientes sépticos ²⁷⁹. Cabe señalar que las concentraciones de arginina en el último estudio ya eran muy bajas en los sujetos control, posiblemente debido a un método diferente para determinar las concentraciones de arginina. Por tanto la comparación cuantitativa de los niveles de este estudio comparados con otros se debe de hacer con precaución.

1.11.4. CAMBIOS EN LA CINÉTICA DE LA CITRULINA Y ARGININA DURANTE LA SEPSIS Y LA ENFERMEDAD CRÍTICA

Las concentraciones disminuidas de aminoácidos en plasma nos informan de los cambios que acontecen en las diferentes rutas metabólicas, desencadenadas por el aumento del catabolismo. Con métodos de medición con isótopos estables podemos cuantificar los cambios en la arginina tanto su anabolismo como su catabolismo.

Se describen a continuación los diferentes estudios realizados en adultos y en pediatría sobre la cinética de la arginina y citrulina (tabla 12). Se han realizado tres estudios en adultos ^{272, 273, 280}, que muestran la cinética de la arginina y las bajas concentraciones de arginina y citrulina en plasma en pacientes sépticos. El flujo de arginina no es diferente entre los pacientes con sepsis y los controles en dos estudios ^{272, 280}, pero se encuentra disminuido en pacientes con sepsis e hipotensión respecto a los controles sanos en otro estudio ²⁷³, el flujo de citrulina fue significativamente más bajo ^{272, 280} y la síntesis *de novo* de arginina se encontraba severamente disminuida en pacientes sépticos ²⁷². En los pacientes sépticos se encuentra una degradación de las proteínas de todo el organismo por el estado de catabolismo, comparado con controles sanos, y la degradación de proteínas se encuentra asociada a una disminución de la producción de arginina, aumento de su catabolismo y aclaramiento de la misma ²⁸⁰ e incremento de la actividad de la ARG en pacientes sépticos ²⁷². A pesar del aumento en la concentración de nitratos y nitritos (NOx), no existen

diferencias en la producción del NO en los controles sanos ²⁸⁰ e incluso en otro estudio se encuentra disminuido el NO en pacientes sépticos ²⁷². En el estudio de Villalpando y cols ²⁷³, vemos que existe un aumento de las concentraciones de NOx en pacientes sépticos que están negativamente correlacionados con el filtrado glomerular, lo que no indica un aumento en la producción del NO, sino un descenso en la eliminación de los productos de su degradación por la alteración en la función renal frecuentemente asociada en pacientes sépticos.

Es interesante la línea de investigación que correlaciona las concentraciones en plasma de citrulina y arginina con los niveles de PCR en pacientes críticos pediátricos, como dato de reacción inflamatoria ²⁷⁸, en el estudio de Luiking y cols ²⁷² parecía que había un efecto asociado de los cambios metabólicos con la inflamación. Encontraron una reducción moderada de arginina y citrulina en plasma y una moderada elevación de PCR en los controles de UCI (PCR 85mg/l) comparado con los controles sanos (PCR 1.4mg/l), y un aumento de estos cambios, asociados a descenso de la citrulina, disminución de la producción *de novo* de arginina e incremento de la actividad de la ARG, se observa en pacientes sépticos con inflamación severa (PCR 219mg/l).

En pacientes pediátricos críticamente enfermos, solo se ha publicado un estudio donde se haya determinado la cinética de la arginina con un método con isótopo estable ¹⁶. Donde compara niños sépticos (6-16 años) con pacientes adultos jóvenes sanos, encontrando similar flujo de arginina entre ambos grupos, pero diferencias con los adultos sépticos, encontrando un

aumento del flujo de citrulina, similar síntesis *de novo* de arginina y actividad de ARG y aumento de la síntesis de NO respecto a los adultos sanos.

Betue y cols²⁸¹ estudian la cinética de la arginina en 10 niños críticamente enfermos (1-10 años de edad) con diferentes grados de inflamación (shock séptico, meningitis, empiema pleural, neumonía y laringitis bacteriana). Encontrando una fuerte relación inversa entre la PCR y las concentraciones de arginina en plasma, así como entre PCR y flujo de citrulina. El flujo de citrulina está directamente correlacionado con la síntesis *de novo* de arginina. También el aclaramiento de arginina está directamente relacionado con la PCR. Sin embargo, el flujo de arginina y la degradación proteica no están correlacionados con la PCR. Estos resultados están en línea con los resultados que existen descritos previamente en adultos²⁷², y de nuevo subrayar que los cambios en el metabolismo de la arginina son proporcionales a la severidad de la inflamación.

Un estudio muestra las concentraciones de nitratos y nitritos (NOx) en niños, las cuales se encuentran aumentadas en pacientes sépticos al ingreso comparado con pacientes que se sometían de forma electiva a cirugía cardiaca, y con sepsis severa en niños con disfunción de órganos a las 48 horas, con aquellos que no tenían disfunción de órganos²⁸². No se encontró relación con marcadores tisulares de hipoperfusión o con la supervivencia. No queda claro a través de qué proceso, la medición de NOx se aproxima a la producción NO²⁸³.

Tabla 13: Estudios de la cinética de arginina y citrulina en pacientes críticamente enfermos en niños y adultos.

ESTUDIO	GRUPOS A ESTUDIO	EDAD (años)	PCR (mg/L)	Flujo arginina $\mu\text{mol/kg/h}$	Flujo citrulina $\mu\text{mol/kg/h}$	Síntesis de novo arginina $\mu\text{mol/kg/h}$	Síntesis NO $\mu\text{mol/kg/h}$	[Arg] plasma $\mu\text{mol/L}$	[Citr] plasma $\mu\text{mol/L}$
Pediátricos Argaman ¹⁶	Sepsis (n=10) Adultos sanos	11±4	-	67±21	25±7 ^{**}	9.6±4.2	1.58±0.7 [*]	-	-
		21±3	-	68±10	15±5	9.2±1.4	0.96±0.1	-	-
Adultos Kao ²⁸⁰	Sepsis (n=13) Adultos sanos (n=7)	54±10	-	53±5.5	4.4±0.5 ^{**}	-	0.20±0.04	40.2±3.8 ^{**}	10.2±3.8 ^{**}
		49±6	-	48.7±2.8	10.6±0.8	-	0.15±0.04	85.5±3.3	21.4±2.5
Adultos Luiking ²⁷²	Sepsis (n=10) Enfermos críticos(n=7) Adultos sanos (n=16)	56±12	219±123 ^{***}	59±23	4.5±2.1 ^{*,†}	3.3±3.7 ^{**}	0.8±0.6 ^{**}	49±12 ^{**}	18±6 ^{**}
		58±11	85±69 ^{**}	64±19	10.1±2.9	10.9±9.4	1.5±1.0	69±37	21±10 ^{**}
		61±6	1.4±1.8	72±15	13.7±4.1	11.9±6.6	2.2±1.2	92±17	41±7
Adultos Villalpando ²⁷³	Sepsis e hipotensión (n=6) Adultos sanos (n=10)	54±5.2	-	54±5.2	-	-	-	40±11 ^{**}	-
		40±8.6	-	40±8.6	-	-	-	75±8	-

* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. controles sanos en el mismo estudio. † p <0.01 vs. controles críticamente enfermos del mismo estudio.
Valores expresados en media±SEM en Kao y Villalpando, y media ±SD para Argaman y Luiking. Arg=Arginina; Citr=citrulina.

[Fuente: Betue y cols²⁸¹, 2013]

1.11.5. DEFICIENCIA DE ARGININA EN PACIENTES CRÍTICOS Y SEPSIS

En conjunto, los datos obtenidos con las concentraciones de aminoácidos plasmáticos medidos mediante tecnología de isótopos estables en adultos y niños, sugieren que la arginina se encuentra disminuida durante la enfermedad crítica y la sepsis, lo que lo convierte en un aminoácido esencial en estas condiciones. Existe un incremento de la utilización de la arginina, en parte por el aumento de la actividad de la ARG y la síntesis proteica, que a pesar de la degradación proteica no es suficiente para mantener la síntesis *de novo* de la arginina, probablemente por la reducida disponibilidad de la citrulina. La deficiencia de arginina puede dar lugar a alteraciones en la síntesis de NO, y eventualmente alterar la microcirculación mediante la disminución de la actividad de la NOS3. Las concentraciones de NOx puede ser un indicador de síntesis del NO engañoso en este contexto. Los resultados sugieren que el NO no es el responsable de la hipotensión en los pacientes con sepsis, y que el empeoramiento de la función renal es el que contribuye al incremento en las concentraciones de NOx por un problema en el aclaramiento de los mismos (figura 16).

La reducida disponibilidad de la citrulina puede resultar de un descenso en la producción de citrulina por el intestino. Este puede ser causado por disminución de su precursor como es la glutamina, la cual también se encuentra baja en plasma^{272, 278}, o por reducción de la masa intestinal⁴⁵, como resultado de la inflamación y/o hipoperfusión del territorio esplácnico durante la sepsis.

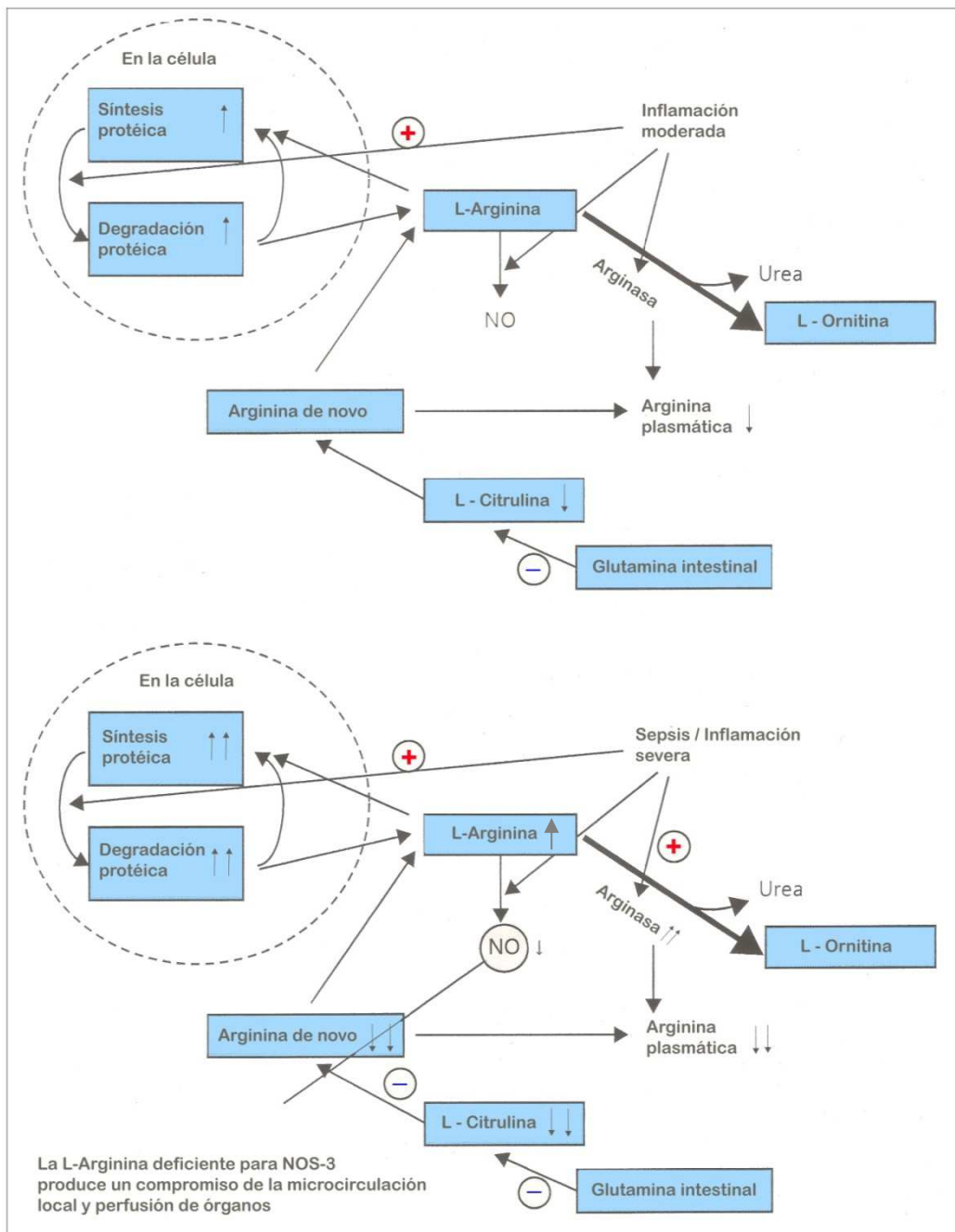


Figura 16. Hipótesis de cambios en el metabolismo de la arginina.

[Fuente: de Betue y cols²⁸¹, 2013]

En un estudio reciente, realizado en 135 pacientes con sepsis, en el que incluyen pacientes con disfunción de órganos, incluyendo a pacientes con síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), encuentran niveles bajos de citrulina en plasma en todos los pacientes con sepsis, siendo significativamente menores en el subgrupo de pacientes afectados de SDRA, comparado con el de pacientes sin SDRA ²⁸⁴.

1.12. ESTRÉS OXIDATIVO EN EL PACIENTE CRÍTICO

Algunos de estos mecanismos, como la hipoxia, la hipoperfusión, el daño endotelial y la activación celular, dan origen a grandes cantidades de RL capaces de participar en la defensa frente a noxas infecciosas, pero también capaces de producir daño sobre estructuras celulares y tejidos, activando y perpetuando la respuesta inflamatoria ²⁸⁵.

La producción de la energía necesaria para los diferentes procesos celulares requiere oxígeno, el cual es finalmente reducido a agua, aceptando cuatro electrones por acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial. El oxígeno molecular (O_2) posee dos electrones no apareados con espines paralelos, esto hace difícil que capte dos electrones simultáneamente en las reacciones que interviene y explica la facilidad con que participa en reacciones univalentes. Normalmente, aproximadamente 2% del O_2 es reducido en forma incompleta al aceptar un menor número de electrones, dando origen así a compuestos intermedios inestables, llamados especies reactivas de oxígeno (EROs) (tabla 14). Estos son capaces de escapar de la mitocondria y producir daño sobre estructuras celulares, particularmente sobre membranas, proteínas, lípidos y ADN ²⁸⁶ (tabla 15).

Tabla 14. Principales conceptos en estrés oxidativo.

TERMINO	DEFINICIÓN
RADICALES LIBRES (RL)	Moléculas que contiene 1 o más electrones no apareados en la órbita externa, capaz de reaccionar con otras moléculas y generar reacciones químicas que pueden conducir a daño molecular y celular.
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs)	Moléculas formadas por la reducción incompleta del oxígeno. Los más estudiados son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peroxinitrito ($ONOO^-$).
OXIDACIÓN	Es la pérdida de electrones en una reacción química.
REDUCCIÓN	Es la ganancia de electrones en una reacción química.
EQUILIBRIO OXIDO-REDUCCIÓN (REDOX)	Representa el balance en las reacciones de oxidación-reducción que ocurren en un medio.
ESTRÉS OXIDATIVO (EO)	Corresponde a la pérdida del equilibrio REDOX que ocurre por acción de una noxa, que estimula la producción de RL o genera destrucción o consumo de los antioxidantes.
ANTIOXIDANTES	Compuestos enzimáticos y no enzimáticos capaces de destruir o neutralizar RL evitando el daño oxidativo celular.

[Fuente: Andersen y cols²⁸⁶, 2006]

El equilibrio REDOX intracelular supone la presencia de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos capaces de destruir o neutralizar a estos RL. El desbalance entre EROs y antioxidantes por la acción de alguna

noxa, que estimule la producción de RL, genere destrucción o consumo de los antioxidantes, se conoce como estrés oxidativo.

1.12. 1. DAÑO INDUCIDO POR RADICALES LIBRES

Los mecanismos que explican el daño inducido por radicales libres son principalmente la activación del sistema monocito/macrófago y de neutrófilos, la activación mitocondrial intracelular y el mecanismo de isquemia y reperfusión.

El anión superóxido (O_2^-) es producido por todas las células, sin embargo, en el paciente crítico se genera mayoritariamente en los polimorfonucleares activados. Actúa como un agente proinflamatorio, siendo capaz de reclutar neutrófilos, inducir liberación de factores quimiotácticos y otros mediadores proinflamatorios, como TNF- α e IL-1, generar daño sobre ADN e iniciar peroxidación lipídica. Modula señales de transducción intracelular por la activación del NF-kB²⁸⁷ y *heat shock factor-1*. El H_2O_2 no posee electrones no apareados, sin embargo, se considera un EROs por su capacidad de inactivar enzimas, atravesar membranas celulares y reaccionar tanto con átomos de hierro (Fe) como de cobre (Cu) para producir $OH\cdot$ a través de la reacción de Fenton.

El radical hidroxilo (OH·) es un potente radical libre, varias miles de veces más reactivo que el O₂⁻. Produce daño principalmente sobre ADN, proteínas y lípidos, induciendo peroxidación lipídica y daño sobre membranas capaz de estimular la respuesta inflamatoria (tabla 15).

Tabla 15. Principales daños producidos por radicales libres.

CONDICIÓN	DAÑO ESPECÍFICO
Daño sobre ADN	Alteración de bases, cortes en una hebra, intercambio de cromátides hermanas, entrecruzamientos de ADN y proteína. Esto conduce a mutaciones y pérdidas en el control celular.
Peroxidación lipídica	Reacción en cadena en la cual un OH· quita un átomo de hidrógeno de un grupo metileno de un ácido graso de la membrana celular, transformándolo en un nuevo radical libre (radical peroxilo). Este, a su vez, sustrae un átomo de hidrógeno metilénico de un ácido graso vecino, proceso que se repite en cadena hasta la muerte celular.
Daño sobre proteínas	Los RLO alteran la conformación y la función de proteínas oxidando aminoácidos específicos, como lisina, serina, arginina y prolina. La pérdida de función frena procesos celulares e inducen la producción de autoanticuerpos.
Señal REDOX	La alteración del balance REDOX cambia las señales intracelulares pudiendo inducir proliferación, apoptosis, disregulación génica y necrosis.

[Fuente: Andersen y cols²⁸⁶, 2006]

El peroxinitrito se forma por la interacción entre O_2^- y NO. Perpetúa la acción del anión superóxido, actuando como agente proinflamatorio, inactiva la superóxido dismutasa (SOD), induce peroxidación lipídica y produce depleción de glutatión ²⁸⁷. Además, genera daño sobre ADN con depleción de nicotinamida adenin dinucleótido (NAD) y adenosin trifosfato (ATP). Su degradación no depende de una enzima específica, sino del ambiente químico celular; aunque su capacidad oxidativa puede ser bloqueada por antioxidantes como el glutatión y las vitaminas C y E ²⁸⁸.

Los RLO no sólo participan en el daño celular por toxicidad directa, sino que también contribuyen a la hiporreactividad vascular resistente a vasopresores propia del shock séptico ^{289, 290}.

La isquemia y reperfusión se asocia a la producción de RL. Durante la isquemia, se consumen las reservas de ATP con formación de AMP, luego adenosina, inosina e hipoxantina y se induce también la enzima xantino oxidasa (XO) endotelial a partir de la xantino deshidrogenasa. Durante la reperfusión, con la llegada del oxígeno, la XO es capaz de transformar hipoxantina + O_2 en xantina + ácido úrico + O_2^- . En este escenario los antioxidantes endógenos, particularmente aquellos intracelulares, se consumen rápidamente. El ácido úrico se transforma en un marcador de daño oxidativo por este mecanismo ²⁹¹ (figura 9).

1.12.2. DAÑO CELULAR

La peroxidación lipídica es el daño oxidativo, producido particularmente por radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. Inicialmente, un ácido graso se oxida por salida de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno hacia el $\text{OH}\cdot$ que actúa como agente oxidante, produciéndose radical peroxilo. Este, a su vez, repite el proceso en cadena hasta la apoptosis y muerte celular. El daño sobre lípidos puede ser medido a través de la detección de TBARS (del inglés *thiobarbituric acid-reactive substances*) en plasma u orina. Los TBARS podrían participar no sólo como marcadores de peroxidación lipídica, sino como inductores del SDMO a distancia.

El daño sobre aminoácidos determina alteraciones en la conformación de la proteína y su función. La pérdida de función cambia o frena procesos celulares y puede, además, inducir la producción de autoanticuerpos. La oxidación proteica puede estimarse por carbonilos, que derivan de la oxidación directa de cadenas laterales de aminoácidos y de la ruptura oxidativa de proteínas. Los carbonilos son aparentemente difíciles de inducir y pueden, por lo tanto, indicar estrés oxidativo más severo. Existen estudios de la última década que asocian carbonilación a sepsis severa y SDRA ²⁹².

La metionina aparece como un nuevo marcador de daño oxidativo sobre proteínas. El primer paso en su oxidación genera metionina sulfóxido ²⁹³, reversible por acción de reductasas (metionina sulfóxido reductasa); el segundo paso genera sulfonas, corresponde a una reacción irreversible. Numerosas proteínas y péptidos son oxidados en sus residuos de metionina, en algunas proteínas esto tiene poco o ningún efecto biológico, pero en otras puede llevar a inactivación. Los niveles de metionina sulfóxido han sido propuestos como un biomarcador de estrés oxidativo *in vivo* ²⁹⁴. La oxidación de residuos de metionina sin repercusión en procesos celulares y su reciclamiento por las reductasas, pudiese corresponder a un mecanismo de protección frente al estrés oxidativo ²⁹⁵.

1.12.3. ANTIOXIDANTES

La SOD es una enzima intracelular distribuida en todo el organismo, capaz de transformar el O_2^- en H_2O_2 . Existen dos tipos, la intramitocondrial (SOD2) y la citoplasmática (SOD1); la primera es esencial para la vida. La catalasa (CAT) es también un enzima intracelular, presente también en el interior de los glóbulos rojos, es capaz de transformar el H_2O_2 en $OH\cdot$ y agua. El balance en la actividad de la CAT respecto de SOD es fundamental en mantener la homeostasis REDOX intracelular ²⁹⁶. Glutación peroxidasa es un complejo enzimático que contiene selenio y glutatión, está presente en el citoplasma y al interior de la mitocondria, participa activamente en la protección celular contra las EROs, metabolizando H_2O_2 y radicales peróxido. Este sistema enzimático

se recicla constantemente y la razón glutatión/glutatión disulfuro (reducido) permite estimar el grado de estrés oxidativo existente.

La vitamina C (ácido ascórbico) tiene funciones como cofactor enzimático. Su función antioxidante deriva de su capacidad de actuar como donante de electrones. Disminuye la peroxidación lipídica, los niveles de O_2^- , H_2O_2 y del ión hipoclorito y mantiene estables los niveles de glutatión peroxidasa y de vitamina E, participando en su reciclamiento. La vitamina C se recicla a su vez desde ácido dehidroascórbico. La vitamina E (alfa tocoferol) actúa unida a membrana, es el principal antioxidante capaz de prevenir y bloquear la peroxidación lipídica y se asocia a una respuesta inmune apropiada. La suplementación en pacientes con sepsis puede servir para modular la excesiva respuesta inflamatoria coordinada por los macrófagos, preservando la capacidad de respuesta a la infección.

1.12.4. ROL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LOS ENFERMOS CRÍTICOS

Diferentes trabajos han descrito EO en sepsis, en shock cardiogénico y distributivo, en el SDRA, en la coagulación intravascular diseminada (CID), en el SDMO, en pancreatitis, en quemados y asociado a fatiga diafragmática.

Estudios en animales mostraron inicialmente que los niveles séricos y tisulares del alfa tocoferol (vitamina E), caen rápidamente en las primeras 24 h luego de inducir shock séptico por infusión de endotoxinas o por ligadura cecal y punción. Esto sugirió que esta vitamina se consumía precozmente durante la sepsis, probablemente por participación en la inactivación de la peroxidación lipídica asociada a una elevada producción de EROs durante el shock séptico. Goode y cols ²⁹⁷, en un estudio prospectivo con 16 pacientes en shock séptico y SDMO, mostraron que los niveles de vitamina E, A y beta caroteno estaban significativamente disminuidos respecto de los controles sanos. En los pacientes con 3 o más disfunciones de órganos, los niveles de ácido tiobarbitúrico (TBARS), como marcador de peroxidación lipídica, estaban significativamente aumentados y se correlacionan en forma negativa con los niveles de vitaminas. Este grupo con 3 o más órganos afectados incluyó sólo 5 pacientes. Sin embargo, los estudios en pacientes críticos con sepsis y SDRA han sido menos constantes en sus hallazgos respecto a vitamina E, aunque la mayoría muestra aumento en la peroxidación lipídica y consumo de alfa tocoferol ²⁹⁷, también existen estudios en que los niveles de vitamina E permanecen estables en el tiempo ²⁹⁸, asociado a caída en los niveles de vitamina C.

Andresen y colaboradores²⁹⁹, compararon 21 pacientes con shock séptico con controles sanos, observando que los niveles de vitamina E al ingreso fueron similares a los valores del grupo control y se mantuvieron estables en el tiempo, a pesar de existir clara evidencia de peroxidación lipídica al ingreso y

que tendió a aumentar significativamente en el tiempo. Esto puede explicarse por un activo y persistente reciclamiento de vitamina E oxidada desde vitamina C. La regeneración de la vitamina E a partir del ácido ascórbico, sumado a la actividad antioxidante de esta última en el plasma, determina caída en los niveles plasmáticos de vitamina C, lo que se asocia a mayor gravedad.

Capacidad antioxidante total y ácido úrico. La capacidad antioxidante total refleja la capacidad global del plasma para prevenir el daño por RL. El elevado consumo de antioxidantes presente en los enfermos críticos hace esperable que los niveles de CAT estuviesen disminuidos en estos enfermos, sin embargo, Pascual y cols³⁰⁰ encontraron que la CAT, en pacientes en shock séptico, no estaba disminuida respecto de los controles usando el método TRAP (*Total Radical Peroxyl Trapping method*). Observaron que existía un cambio en los componentes responsables de mantener la CAT estable, fundamentalmente por aumento de bilirrubina y ácido úrico plasmáticos. Los niveles de CAT caen a partir del tercer día, probablemente por mayor consumo de antioxidantes, tal vez en relación al aumento en la peroxidación lipídica, que no es compensado por un mayor aumento en los niveles de ácido úrico plasmático.

Los niveles de ácido úrico se elevan por activación de xantino oxidasa (XO) en tejidos sometidos a fenómenos de isquemia y reperfusión. Se elevan también los niveles plasmáticos de XO, sin embargo, los pacientes más graves

presentan niveles más bajos de XO plasmática y mayores niveles de lactato, lo que se explica porque estos pacientes conservan áreas de isquemia sin reperfundir y por tanto elevan lactato, pero no liberan XO al plasma ³⁰¹.

1.12.5. SEPSIS Y OXIDACIÓN

Son muchos los trabajos que demuestran que durante la sepsis existe elevación de los niveles de oxidación lipídica, proteica y de ADN, asociados a consumo concomitante de antioxidantes ²⁹⁷. Winterbourn y cols ³⁰² mostraron en un estudio prospectivo en 22 pacientes con sepsis severa (APACHE 15-34) que los niveles de carbonilos ascendían precozmente en plasma, para luego caer en los siguientes días, manteniéndose sobre los valores de los controles.

Metnitz y cols ²⁹⁸ observaron que los pacientes con SDRA presentaban caída en los niveles de antioxidantes plasmáticos (vitamina E y C, beta caroteno y selenio) y aumento de los productos de peroxidación lipídica. Otro estudio ³⁰³, en enfermos críticos a los cuales se les midió alfa-tocoferol y TBARS, mostró que la concentración de alfa tocoferol fue más baja en pacientes críticos respecto de los controles y el promedio del TBARS fue significativamente más alto en pacientes de UCI. Los pacientes sépticos y de cirugía cardiaca presentaron también niveles más elevados que los controles, además los niveles de TBARS aumentó significativamente la aparición de CID.

El proceso de destete de ventilación mecánica también se asocia a estrés oxidativo. Anzueto y cols³⁰⁴, usando ratones depleccionados de vitamina E, observaron que durante la respiración contra resistencia, éstos presentaban una disminución en la capacidad contráctil del diafragma, aumento de la peroxidación lipídica y aumento en la activación de glutatión.

Aún no es claro cuáles marcadores de estrés oxidativo son los que mejor se correlacionan con la evolución clínica del paciente crítico. En el estudio de Anderson y colaboradores²⁸⁶ los pacientes más graves evaluados por escalas de gravedad, con mayor compromiso hemodinámico, presentan mayores valores de daño oxidativo sobre lípidos y proteínas, mayores valores de vitamina C y de ácido úrico, todos los cuales aparecen como marcadores precoces y sensibles que pudiesen usarse individualmente o integrados como índice, para evaluar la intensidad del daño.

1.13. ESCALAS PREDICTORAS DE MORTALIDAD

Determinar el riesgo de mortalidad de los pacientes internados en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP) según la gravedad y el compromiso hemodinámico, permite estimar la probabilidad de muerte según el estado clínico. Para cuantificar dicho riesgo de mortalidad, se desarrollaron puntajes pronósticos de mortalidad que permiten comparar el funcionamiento de la unidad con otras UCIP y determinar la eficacia de los cuidados intensivos brindados a nuestros pacientes, al comparar la mortalidad observada en nuestra población con la estimada por el modelo de predicción.

Los predictores más utilizados son el PRISM (*Pediatric Risk of Mortality*: Riesgo Pediátrico de Mortalidad) que constituye el patrón de referencia de los predictores de mortalidad y el PIM 2 (*Pediatric Index of Mortality*: Índice Pediátrico de Mortalidad) que es un modelo más reciente, por lo que refleja el nivel de los cuidados de la práctica intensiva actual. El PRISM fue publicado en 1988 con los datos obtenidos de 9 UCIP de Estados Unidos, creada a partir de la escala *Physiologic Stability Index*, y determina la probabilidad de fallecimiento en base al análisis de 14 variables fisiológicas que recogen el peor valor en las primeras 24 h de ingreso a los cuidados intensivos. Los datos fueron evaluados mediante análisis de regresión logística, con un excelente resultado predictivo (Área bajo la curva ROC de 0.95). El PRISM está influenciado por la calidad del cuidado recibido en las primeras 24 h y no tiene en cuenta la presencia de comorbilidades de base que puedan influir en el

pronóstico del paciente. El PRISM indica el estado clínico del enfermo sin considerar la enfermedad de base, lo que puede influir en el pronóstico. Es más sencillo de aplicar, pero tiene también algunos inconvenientes: la primera valoración de las constantes fisiológicas al ingresar puede tener amplias variaciones, por lo que puede no reflejar la gravedad del niño, pues en cierta forma puede indicar un estado transitorio del paciente por las condiciones en las que se hizo su traslado a la Unidad. La fórmula ideada para el cálculo de la probabilidad de muerte es compleja, por lo que su validez puede ser débil.

Según algunos estudios el puntaje PRISM en pacientes pediátricos no resultó útil para predecir mortalidad, ya que la mayoría de los fallecidos fueron clasificados al ingreso en la UCIP moderado-bajo riesgo. Indicando que un predictor de mortalidad es la baja edad al ingreso ³⁰⁵. Resultados similares a los hallados por Martínez³⁰⁶, que encontró que un 51.8% de los fallecidos eran menores de un año y 56.3% masculinos.

En un estudio diseñado específicamente para precisar la severidad y evolución del traumatismo craneoencefálico en 477 pacientes ingresados en la UCIP, encontró que la mortalidad en el menor de un año fue significativamente superior ³⁰⁷. Pollack³⁰⁸ encontró que la presencia de una enfermedad crónica fue una de las variables predictoras en sus pacientes.

En otro estudio detectan que el mayor número de pacientes fallecidos corresponden a niños con una enfermedad de base ³⁰⁹.

Las alteraciones cardiovasculares al ingreso son citadas por Tamborlini³¹⁰ y Aguirre³⁰⁵ entre los predictores de riesgo inminente para la vida en la edad pediátrica.

En la serie de Martínez³⁰⁶ la frecuencia cardíaca fue el tercero entre los parámetros más alterados del PRISM, y apareció en el 62.9% de los fallecidos, para una relación muy altamente significativa. En distintos estudios encuentran que los trastornos pupilares y el estado de conciencia, medido por la escala de Glasgow, como variables de predicción de muerte^{306, 308, 310}.

El incremento de la frecuencia respiratoria y la consecuente hipocapnia es el primero de los criterios de Bone²²⁰ que se reconoce como plenamente vigentes para toda la conceptualización del SIRS, ya sea por sepsis o no; y en los últimos años, estos criterios han sido adecuados a los distintos grupos de edades por Fischer y Fanconi, por lo que constituye un instrumento de incalculable valor para todos los médicos, y en particular para la edad pediátrica^{305, 510}.

Las enfermedades respiratorias son la mayor causa de muerte en pediatría, y ocurren en más de la mitad en menores de un año, y en más de la tercera parte en niños menores de 15 años. Otro estudio realizado en 980 pacientes con insuficiencia respiratoria ingresados en UCIP, encontró que la frecuencia respiratoria elevada, unido a la presencia de anomalías neurológicas, fueron variables de predicción independientes de la mortalidad³¹¹.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal de este trabajo es determinar la cinética de los valores de arginina y citrulina en los pacientes pediátricos críticamente enfermos, comparándola con controles sanos.

2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Determinar la evolución de los pacientes con niveles bajos de citrulina y arginina, y si tienen peor pronóstico durante su estancia en la unidad de cuidados intensivos, con una mayor morbilidad y mortalidad asociadas.
2. Analizar si los parámetros que cuantifican la respuesta inflamatoria sistémica indican precozmente la evolución que va a desarrollar el paciente (reactantes de fase aguda).
3. Valorar la existencia de factores que diferencien el metabolismo y morbimortalidad entre los enfermos críticos adultos y pediátricos.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio observacional prospectivo unicéntrico. Los pacientes reclutados fueron divididos en dos grupos: un grupo de niños críticamente enfermos (Grupo A) y un grupo control sano (Grupo B). El grupo A estuvo formado por los pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos pediátricos (UCIP) del Hospital Materno-Infantil, Complejo Hospitalario Regional de Málaga, y que cumplían los criterios de inclusión, y no presentaban ningún criterio de exclusión. Se recogieron los pacientes en 2 fases desde enero de 2012 a diciembre de 2014. El Grupo B está formado por niños sanos no hospitalizados, sin enfermedad conocida y sin infección activa en el mes anterior, no presentan afectación intestinal, con funciones hepática y renal normales, con cuantificación normal de grasa fecal en muestra de 24 horas. El ajuste de edad se realizó por métodos directos.

3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los criterios de inclusión fueron:

- Edad de 7 días a 14 años.
- Estancia mínima esperada al ingreso de 3 días.
- No ingreso para monitorización.
- Firma del consentimiento informado por el tutor legal del paciente.

3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Los criterios de exclusión fueron:

- Cirugía intestinal, la radioterapia abdominal, inflamación o necrosis intestinal (enterocolitis, mucositis...).
- Desarrollo de hipertensión pulmonar.
- Edad menor de 7 días y mayor 14 años.

3.3. VARIABLES DE ESTUDIO

Se revisaron datos sociodemográficos (edad, sexo, peso, raza), datos clínicos (motivo de ingreso, días de estancia en UCIP, la duración de la ventilación mecánica (VM), disfunción pulmonar, inestabilidad hemodinámica y el apoyo vasoactivo, insuficiencia renal, infección nosocomial, exitus) y valores de laboratorio (leucocitos, plaquetas, ácido úrico, ácido láctico, gasometría, proteína C reactiva (PCR), procalcitonina (PCT), urea, creatinina, albúmina, arginina y citrulina). Las muestras para la determinación de citrulina y arginina se recogieron sobre papel seco S & S 903 y se analizaron por espectrometría de masas en tándem, todos ellos al final de la colección, y con realización de determinaciones por duplicado para el control de la variabilidad de prueba. Las muestras de sangre en papel se almacenaron congeladas a una temperatura de -20°C, manteniéndolos secos y protegidos de la luz. Las muestras para los aminoácidos y para los otros reactantes de fase aguda se recogieron en el momento de ingreso (primeras 2 horas), a las 12h, a las 24h, a los 3 días y a los 7 días. Se recogieron todas las muestras siempre después de, al menos, 3

horas de condiciones de ayuno. Por lo que los resultados de los aminoácidos representan condiciones postabsorción (ver Anexo).

El sistema de puntuación de Riesgo de Mortalidad Pediátrica (PRISM-II) es un sistema de puntuación pronóstico que se desarrolló para establecer las variables fisiológicas necesarias para la evaluación del riesgo de mortalidad pediátrica en una unidad de cuidados intensivos (UCIP) y obtener una ponderación objetiva de las variables analizadas. Los resultados se ajustan por edad (meses) y se expresan como porcentaje (dando un riesgo de mortalidad). La gravedad de la disfunción respiratoria se midió por el cociente $\text{PaO}_2 / \text{FiO}_2$ (PF), que requieren una medición de gases en sangre arterial, siendo dato de disfunción pulmonar si <300 (SDRA).

Hemos considerado como disfunción neurológica si se ha desarrollado alguna lesión vascular cerebral (valorada por prueba de imagen) o si la saturación regional cerebral de oxígeno disminuye a menos del 20% del valor basal durante al menos 15 segundos (desaturación cerebral). Se ha elegido como marcador de morbilidad el requerir al menos 1 semana de estancia en la unidad de cuidados intensivos. La disfunción pulmonar se ha establecido cuando el cociente $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ fue <300 y disfunción renal cuando la creatinina plasmática se incrementó más de un 20% al comparar con el basal. Se definió como “evolución desfavorable” cuando se diagnosticó disfunción pulmonar, renal y/o neurológica, cuando había una necesidad de dos o más fármacos vasoactivos (inestabilidad hemodinámica) o si finalmente se produjo el

fallecimiento. Por lo tanto, hemos dividido el grupo A en dos subgrupos (A1: condición favorable; A2: condición desfavorable).

3.4. ASPECTOS ÉTICOS

La participación en el proyecto es voluntaria y la solicitud de participación es realizada como una propuesta de investigación de salud, independiente del proceso asistencial convencional del sistema sanitario. A los participantes, o en su caso, a los padres o tutores legales, se les informa por escrito de la naturaleza de la investigación y del uso que se va a hacer de la información que se obtenga. Además de la información verbal y escrita, a los participantes se les presentará un consentimiento informado por escrito. El proyecto ha sido aprobado por el comité de Ética y de Investigación del Complejo Hospitalario Regional de Málaga.

Hemos seguido todos los principios de la Declaración de Helsinki (actualización del 2008) como un conjunto de principios éticos para la investigación médica que involucre seres humanos, incluyendo el material biológico que se emplee en el trabajo. Se han seguido, tanto en el diseño como en el método, las normas de Buena Práctica Clínica más actualizadas, garantizando públicamente la protección de los derechos, seguridad y bienestar de los sujetos que participan en el estudio, y asegura la integridad y credibilidad de los datos obtenidos en un ensayo clínico. Es deber de los investigadores promover y salvaguardar la salud de los pacientes, incluyendo aquellos que se incluyan

en el estudio y los que se excluyan. El objetivo primordial de la investigación es entender las causas, proceso y efectos de la enfermedad, para mejorar el tratamiento o la prevención de secuelas o daños secundarios. El médico debe informar completamente al individuo sujeto del estudio qué aspectos de su cuidado se relacionan con la investigación. El rechazo por el individuo de la participación o el deseo manifiesto de abandonar la misma una vez empezada nunca deberá interferir en el cuidado ulterior del paciente por el profesional sanitario.

Para garantizar la confidencialidad de la información todos los datos recogidos en este proyecto serán 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 mantendrán separados del resto de la información recogida en los diferentes cuestionarios del estudio así como de la historia clínica.

- Cada caso del estudio contará con un número de identificación que será el que figure en las bases de datos.

- El análisis de la información se hará 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 desvincularán permanentemente de los datos clínicos con el fin de proteger la identidad de los participantes.

- Todas las bases de datos del proyecto estarán protegidas electrónicamente con códigos que limiten el acceso únicamente a los investigadores del proyecto.

Plan de contingencia: el art 27 del RD 1716/2011 indica el destino de las muestras una vez finalizada la investigación o el proyecto de investigación concreto, que son:

- La destrucción de la muestra una vez finalizado el proyecto
- La anonimización.
- La posterior cesión gratuita de la muestra a un biobanco.
- La posterior utilización de la muestra integrada en una colección para una línea de investigación relacionada con la inicialmente propuesta.

En nuestro caso, el destino de las muestras será la anonimización. Aseguramos el tratamiento de las muestras y datos asociados, de acuerdo a la legislación vigente: Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y su desarrollo en el Real Decreto 1716/2011, Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente y de

derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y Ley 15/1999 de Protección de Datos Personales, entre otra normativa aplicable y teniendo en cuenta normas internacionales.

3. 5. DETERMINACIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

Para conseguir una potencia del 80% para detectar diferencias en el contraste de la hipótesis nula $H_0: P=0$ mediante una Prueba T-Student bilateral para el coeficiente de correlación de Pearson entre dos variables, teniendo en cuenta que el nivel de significación es del 5%, será necesario incluir unos 37 sujetos en el estudio. Si se ajusta el tamaño muestral a la espera de tener un 10% de pérdidas por diversas razones (abandono, no respuesta...), sería necesario reclutar para el estudio un mínimo de 42 sujetos.

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Inicialmente se realizará un análisis descriptivo de las variables del estudio, los valores de las variables continuas se resumirán en una tabla donde las variables continuas como mediana, rango de valores (máximo y mínimo) y rango intercuartílico (RIQ) y las variables categóricas como frecuencias, medias y desviación estándar, así como porcentajes.

Las variables con una distribución normal e igualdad de las varianzas se compararon entre sí mediante una prueba t de muestras independientes. Cuando una variable no pasó los tests de normalidad o las pruebas de igualdad

de varianza, se utilizó la prueba de Mann-Whitney para la comparación. La comparación de medias para los sujetos de evolución favorable, desfavorable y de control se realizó por medio de una prueba de ANOVA. El test de Spearman se utilizó para correlacionar variables no normales (no paramétricos) y el de Pearson para las normales. La significación estadística se definió como una $p < 0,05$.

Para analizar la relación entre dos variables continuas se calculará el coeficiente de correlación lineal de Pearson en caso de que se cumplan las condiciones de normalidad de las variables, en caso contrario se calculará el coeficiente de Spearman. Se calculará su correspondiente significación para determinar si tal valor obtenido muestra que las variables están relacionadas en realidad o tan solo presentan dicha relación como consecuencia del azar.

En el caso de que se obtengan resultados estadísticamente significativos se calcularán los intervalos de confianza al 95% de la diferencia, lo cual nos permitirá estimar entre qué valores se encuentra la diferencia de valores de estas variables. Para analizar si las diferencias observadas en las frecuencias de las variables de interés son estadísticamente significativas, en el caso de variables cualitativas se evaluarán mediante el test de la Chi-cuadrado o a través de la prueba exacta de Fisher en el caso de que el porcentaje de valores esperados menores de 5 supere el 20%. Se calculará la razón de ventajas (odds ratio) y sus correspondientes intervalos de confianza al 95% para el caso de tablas bidimensionales.

RESULTADOS

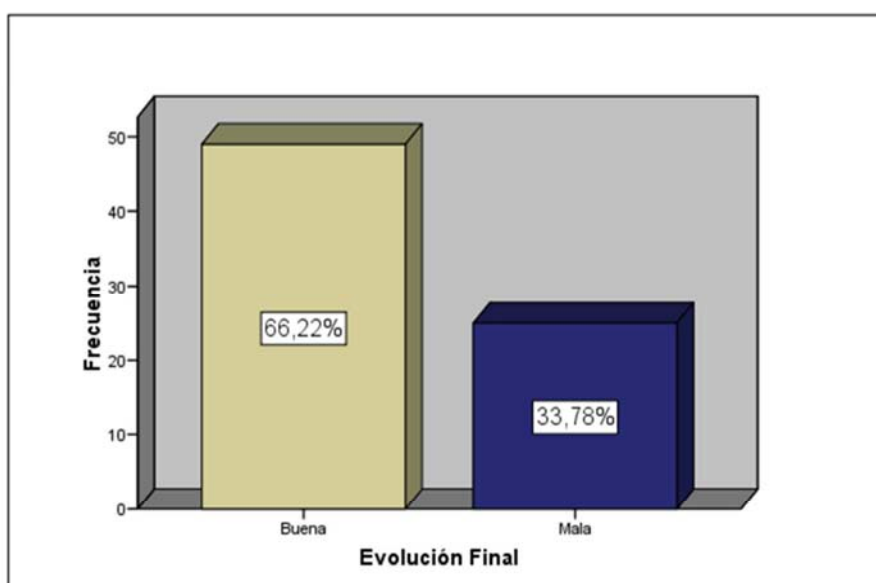
4. RESULTADOS

En el período de estudio finalmente hubo 85 pacientes candidatos que cumplían criterios de inclusión y exclusión, de los cuales en 7 hubo problemas con la obtención del consentimiento informado, por lo que fueron eliminados del análisis final, y en otros 4 casos hubo problemas con la sangre obtenida en la primera muestra (escasez o mal procesamiento o ausencia de analítica concreta), por lo que finalmente quedaron incluidos para el análisis 74 pacientes.

4. 1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Tuvieron mala evolución final 25 pacientes (un 33.8%), siendo considerada aquella cuando se cumplían los criterios definidos en material y métodos previamente.

Gráfico 1. Frecuencia de aparición evolución favorable/desfavorable.



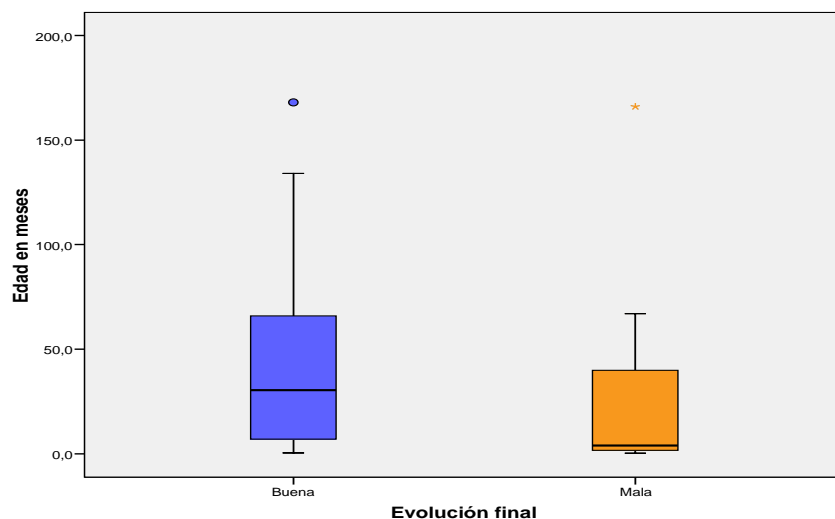
De los pacientes con evolución favorable, 40 eran varones y 34 mujeres, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Tabla 16. Tabla de contingencia Sexo * Evolución Final

		EVOLUCIÓN FINAL		
		Buena	Mala	
SEXO	varón	54%	55%	54,7%
	mujer	46%	45%	45,3%
p		ns	ns	

La mediana de edad de nuestra serie es de 13.5 meses (RIQ 5.7-61.7), habiendo en ella 35 varones (54.7%). En el grupo de pacientes con buena evolución, la edad media fue de 46.35 ± 7.12 meses y en los que tuvieron mala evolución fue de 22.79 ± 9.59 meses, demostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

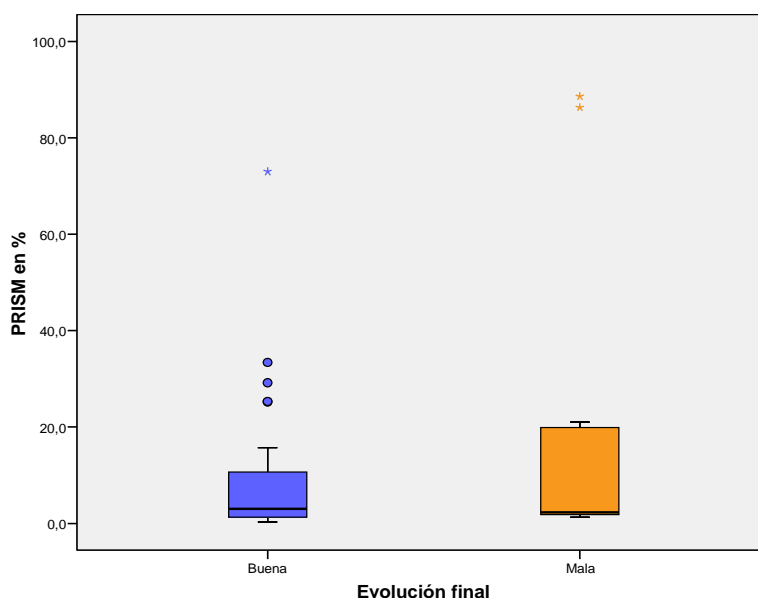
Gráfico 2. Diagrama de cajas para comparar la edad respecto a la evolución final.



Del total de pacientes hay 14 (18.9%) niños de origen magrebí. El motivo de ingreso más frecuente fue el paciente postquirúrgico 75.65% (tras cirugía cardiovascular 66.2%, neurocirugía 8.1%, y otros postoperatorios 1.35%), seguido de insuficiencia respiratoria (10.81%) y sepsis (5.4%).

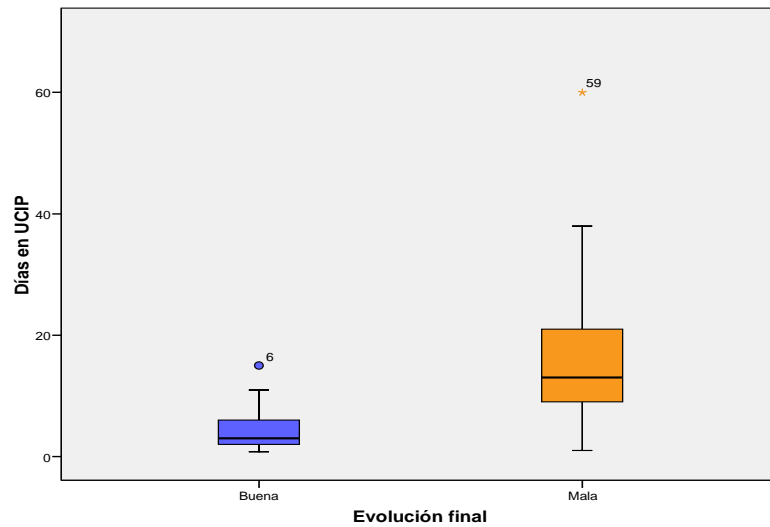
El PRISM-II score medio fue del 12.9% (con una desviación típica de 11.9%), pero siendo la mediana del 3% (RIQ 1.7-14.5). En el grupo de pacientes con buena evolución, el PRISM-II medio fue de 9.50 ± 2.76 % y en los que tuvieron mala evolución fue de 21.22 ± 10.09 %, demostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Gráfico 3. Diagrama de cajas para comparar las puntuaciones en PRISM-II respecto a la evolución final.



La mediana de duración del ingreso en UCIP es de 5.5 días (RIQ 2-11.7), siendo de 3.0 (RIQ 2-5.5) días en los que tienen buena evolución y de 18 (RIQ 10-21) en los que la tienen mala finalmente.

Gráfico 4. Diagrama de cajas con la comparativa de días de estancia en UCIP respecto a evolución final.



En lo referente a la utilización de ventilación mecánica, ésta estuvo presente en un 81.1% de los pacientes, de los cuales sólo un 39.1% la requirió durante más de 6 horas y un 32.4% durante más de 24 horas, habiendo una mediana de su uso global de 6 horas (RIQ 3.2-120).

Gráfico 5. Diagrama de barras con porcentajes de utilización de ventilación mecánica y su duración.

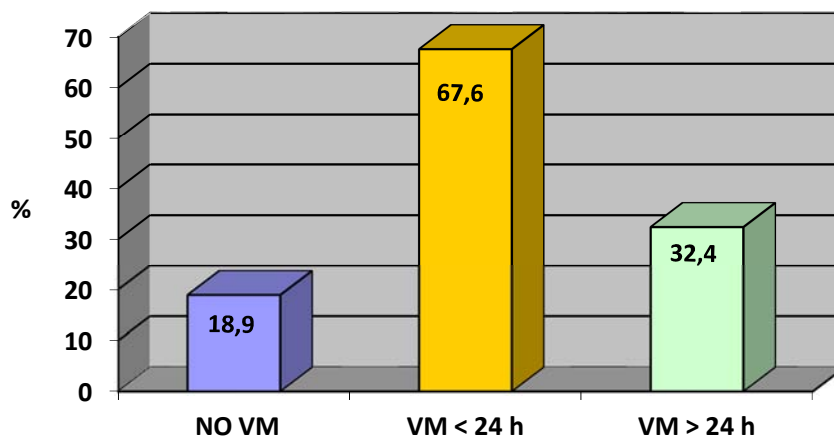


Gráfico 6. Diagrama de cajas con la comparativa de duración de ventilación mecánica (horas) respecto a evolución final.

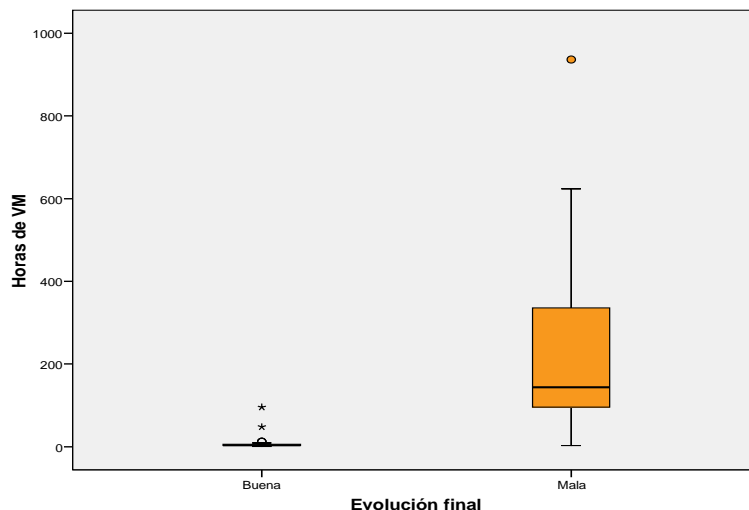
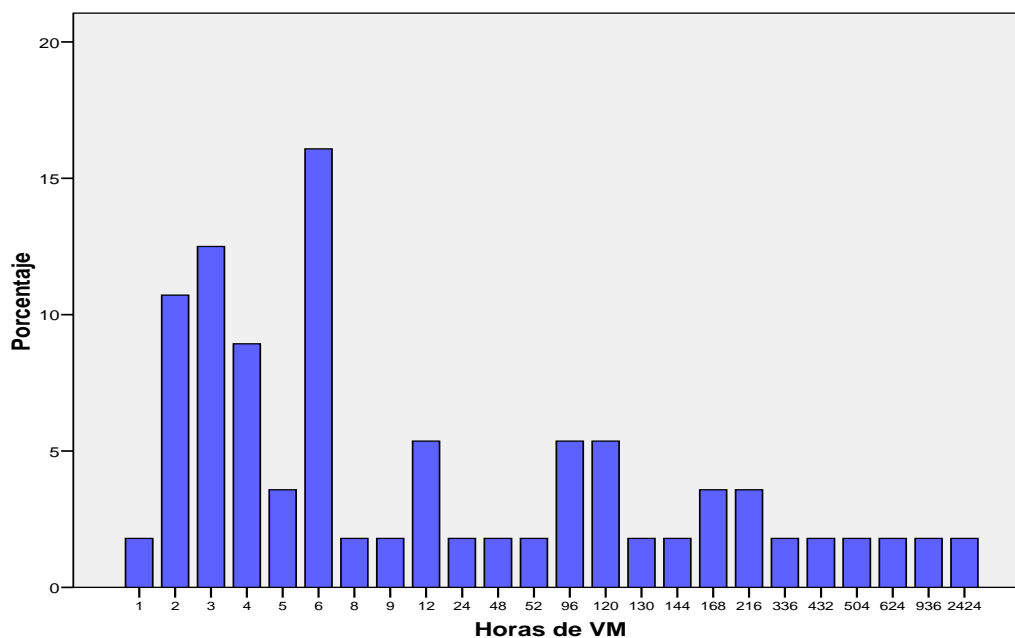


Gráfico 7. Diagrama de barras con la descriptiva de la duración de la ventilación mecánica (horas).



Un 47.1% recibió antibioterapia (26.5% como tratamiento y 20.4% como profilaxis quirúrgicas) y un 48.6% necesitó drogas vasoactivas de alguna clase, siendo 17 casos (22.9%) con dos o más de ellas.

Gráfico 8. Diagrama de barras del uso de antibioterapia (%).

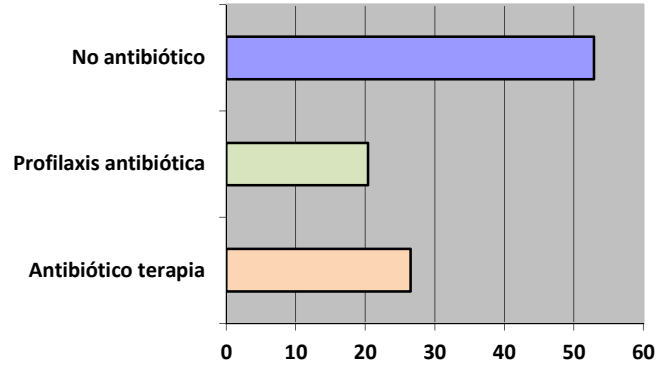


Tabla 17. Tabla de contingencia tratamiento antibiótico

		EVOLUCIÓN FINAL		TOTAL
		FAVORABLE	DESFAVORABLE	
ANTIBIÓTICOS	NO ANTIBIÓTICOS	20	6	26
	SI ANTIBIÓTICOS	3	10	13
PROFILAXIS QUIRÚRGICA		8	2	10
TOTAL		31	18	49

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12.326(a)	2	,002
Razón de verosimilitudes	12.294	2	,002
Asociación lineal por lineal	0.483	1	,487
N de casos válidos	49		

a 2 casillas (33.3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3.67.



Gráfico 9. Necesidad de drogas vasoactivas (DVA)

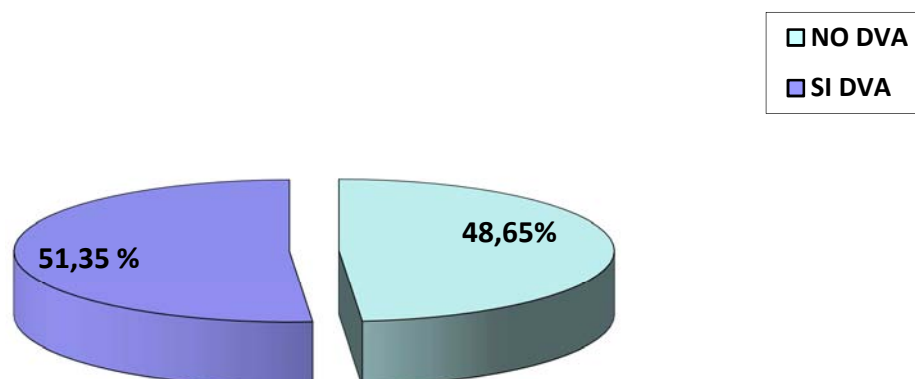


Tabla 18. Tabla de contingencia DVA

		EVOLUCIÓN FINAL		TOTAL
		FAVORABLE	DESFAVORABLE	
DVA	No DVA	31	7	38
	SI DVA	18	18	36
TOTAL		49	25	74

Pruebas de chi-cuadrado

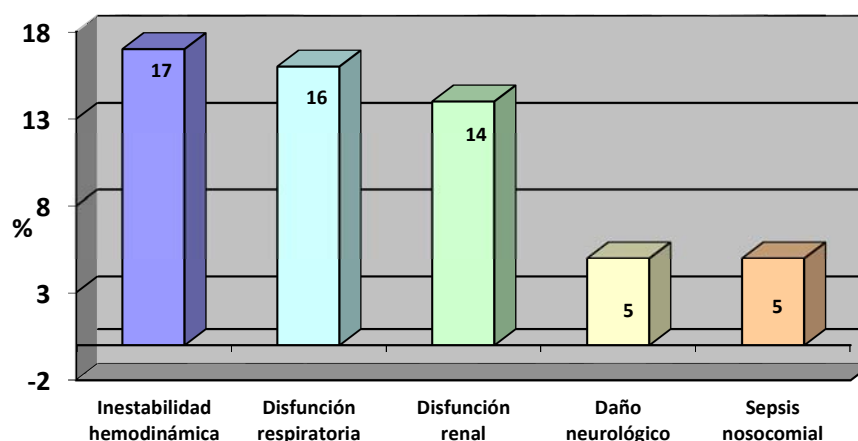
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8.241(b)	1	.004		
Corrección por continuidad(a)	6.890	1	.009		
Razón de verosimilitudes	8.446	1	.004		
Estadístico exacto de Fisher				.006	.004
Asociación lineal por lineal	8.130	1	.004		
N de casos válidos	74				

a Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b 0 casillas (.0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 12.16.

La inestabilidad hemodinámica fue la complicación principal (17%), seguido de dificultad respiratoria (16%), disfunción renal (14%), deterioro neurológico (5%) y sepsis nosocomial (5%), con ninguna complicación significativa en 54% (24 pacientes); un paciente falleció durante el seguimiento.

Gráfico 10. Diagrama de barras con las frecuencias de aparición de las principales complicaciones



El grupo de control B estaba formado por 51 niños sanos, sin afectación intestinal, con el hígado normal, así como la función renal (media de creatinina de 0.38 mg/dl) y una edad media de 4.9 ± 2.4 años, con cuantificación normal de grasa fecal en una muestra de 24 horas (2.2 g/24 h). El ajuste de edad se ha realizado por métodos directos.

Tabla 19. Variables analíticas básicas (estadística descriptiva)

Variable		Media	Desviación típica
Albúmina (g/dL)	Ingreso	3.49	1.08
	24h	3.29	2.77
	3 días	2.72	2.10
	7 días	2.58	2.00
Leucocitos (mm ⁻³)	Ingreso	12828.4	6902.5
	24h	15458.2	10930.0
	3 días	11173.0	5076.8
	7 días	14551.6	6800.9
PCR (mg/L)	Ingreso	15.0	14.0
	24h	68.4	47.6
	3 días	78.8	66.0
	7 días	61.5	51.6
PCT (ng/ml)	Ingreso	12.8	11.3
	24h	22.2	17.5
	3 días	7.0	6.5
	7 días	1.6	1.4
Ácido úrico (mg/dL)	Ingreso	4.7	1.9
	24h	4.2	2.2
	3 días	3.4	1.6
	7 días	2.3	0.6

Gráfico 11. Cinética de PCR (mg/L) y PCT (ng/ml)

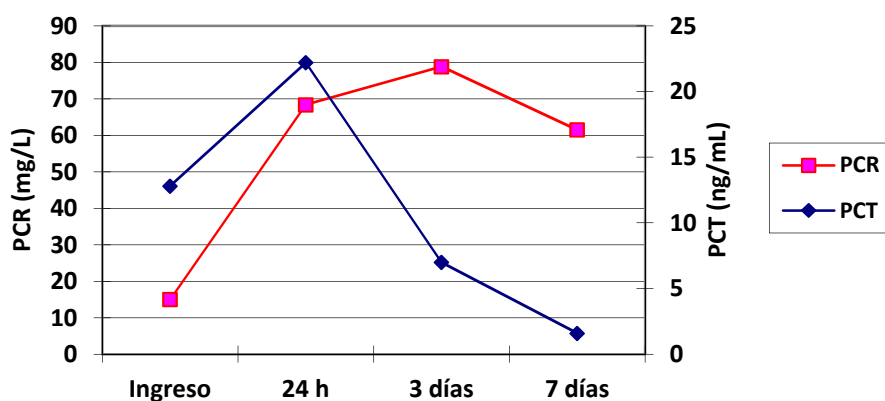
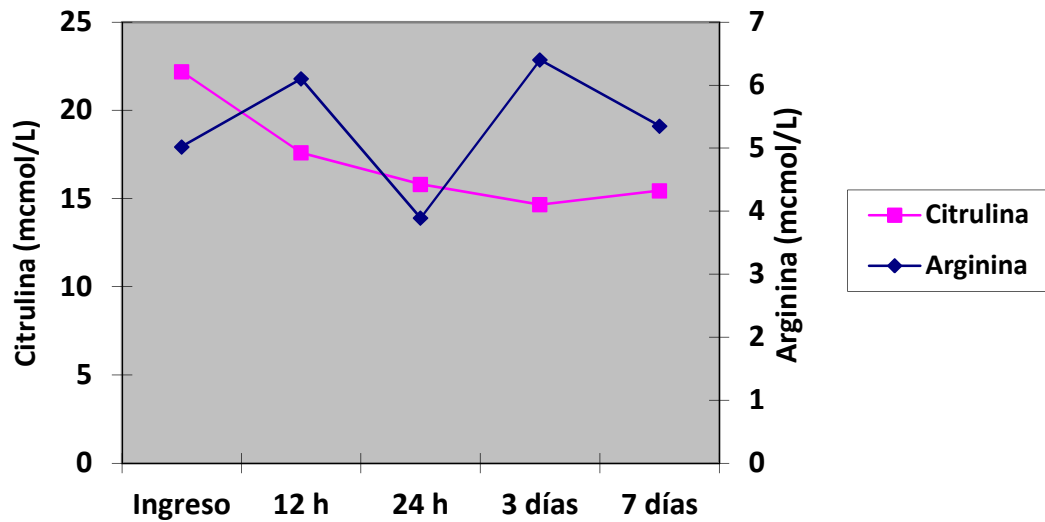


Tabla 20. Variables analíticas de aminoácidos (estadística descriptiva)

Variable		Media	Mediana	Desviación típica	p25	p75
Citrulina ($\mu\text{mol/L}$)	Ingreso	22.20	21.34	12.14	14.27	26.77
	12 h	17.60	15.49	10.44	11.26	19.50
	24 h	15.81	14.20	7.49	11.73	19.49
	3 días	14.66	11.65	7.29	10.20	20.26
	7 días	15.45	13.38	6.38	10.93	18.58
Arginina ($\mu\text{mol/L}$)	Ingreso	5.02	3.88	3.37	3.01	5.76
	12 h	6.10	2.99	5.86	1.88	6.01
	24 h	3.89	2.47	3.61	1.98	4.09
	3 días	6.34	2.94	5.42	2.01	8.93
	7 días	5.35	3.58	4.96	2.26	7.01

Gráfico 12. Cinética de la arginina y citrulina



El gráfico 11 se representa la cinética de la PCR y PCT, con una elevación de PCT precoz a las 24 horas y una más tardía de la PCR al 3º día. En el gráfico 12 se muestra la cinética de la arginina y citrulina en los pacientes críticos pediátricos durante su estancia en UCIP. Los gráficos 13 y 14 muestran las diferencias en la cinética de citrulina y arginina cuando se mira en la evolución final, con una mayor disminución en ambas variables cuando hay una evolución desfavorable.

El análisis de la cinética de citrulina y arginina mostró:

1. La citrulina al ingreso aún es similar a la del grupo control y posteriormente ya cae de forma significativa (p 0.002) a las 12 horas de ingreso, con un nuevo descenso al tercer día (p 0.047) y manteniéndose sin ascender aún a los 7 días, siendo más marcada la diferencia entre los que tienen mala evolución.

2. La arginina está descendida ya en las primeras 2 horas del ingreso, manteniéndose similarmente baja a las 12h y con un nuevo descenso a las 24h, aunque se produce un ascenso más precoz (3^o día) manteniéndose estable posteriormente al 7^o día, aunque nunca llegando a ser similar al del grupo control.

3. El descenso de citrulina en las primeras 24 h tras el ingreso se correlaciona de forma estadísticamente significativa con el de arginina (Rho 0.504, p <0.001).

Tabla 21. Comparaciones de medias de los analitos de aminoácidos en sus diferentes tiempos.

		Media	Desviación Típica	p
Par 1	Citrul.0h	22.17	10.79	0.002
	Citrul.12h	17.60	10.44	
Par 2	Citrul.0h	22.55	12.40	<0.001
	Citrul.24h	15.86	7.54	
Par 3	Citrul.0h	22.52	11.72	<0.001
	Citrul.3d	14.66	7.29	
Par 4	Citrul.0h	23.38	13.66	0.006
	Citrul.7d	15.45	6.38	
Par 5	Citrul.12h	17.50	10.85	NS
	Citrul.24h	15.51	8.45	
Par 6	Citrul.12h	18.14	12.73	0.047
	Citrul.3d	13.92	7.52	
Par 7	Citrul.12h	20.77	13.70	NS
	Citrul.7d	16.18	6.42	
Par 8	Citrul.24h	15.82	9.39	NS
	Citrul.3d	14.52	7.48	
Par 9	Citrul.24h	15.53	9.98	NS
	Citrul.7d	15.258	6.72	
Par 10	Citrul.3d	15.34	8.24	NS
	Citrul.7d	16.49	6.65	
Par 11	Argin.0h	5.30	3.80	NS
	Argin.12h	6.10	4.86	
Par 12	Argin.0h	5.29	3.46	0.025
	Argin.24h	3.83	3.61	
Par 13	Argin.0h	5.46	3.84	NS
	Argin.3d	6.45	4.48	
Par 14	Argin.0h	5.11	3.95	NS
	Argin.7d	5.35	4.96	
Par 15	Argin.12h	6.48	5.63	NS
	Argin.24h	4.40	4.27	
Par 16	Argin.12h	5.98	4.73	NS
	Argin.3d	6.14	5.32	
Par 17	Argin.12h	4.41	4.03	NS
	Argin.7d	5.50	5.01	
Par 18	Argin.24h	3.67	2.87	0.020
	Argin.3d	6.55	5.55	
Par 19	Argin.24h	3.10	1.54	0.047
	Argin.7d	5.43	5.18	
Par 20	Argin.3d	5.26	5.22	NS
	Argin.7d	5.58	5.25	

Gráfico 13. Cinética de arginina ($\mu\text{mol/L}$) dependiendo de la evolución.

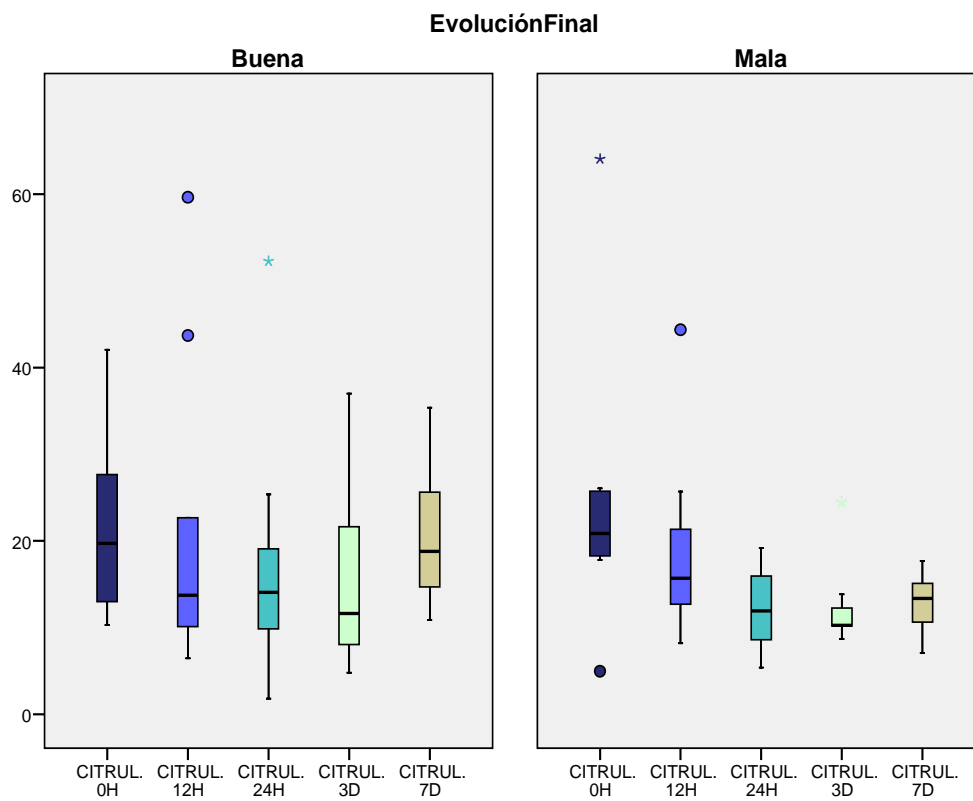


Gráfico 14. Cinética de la citrulina ($\mu\text{mol/L}$) dependiendo de la evolución

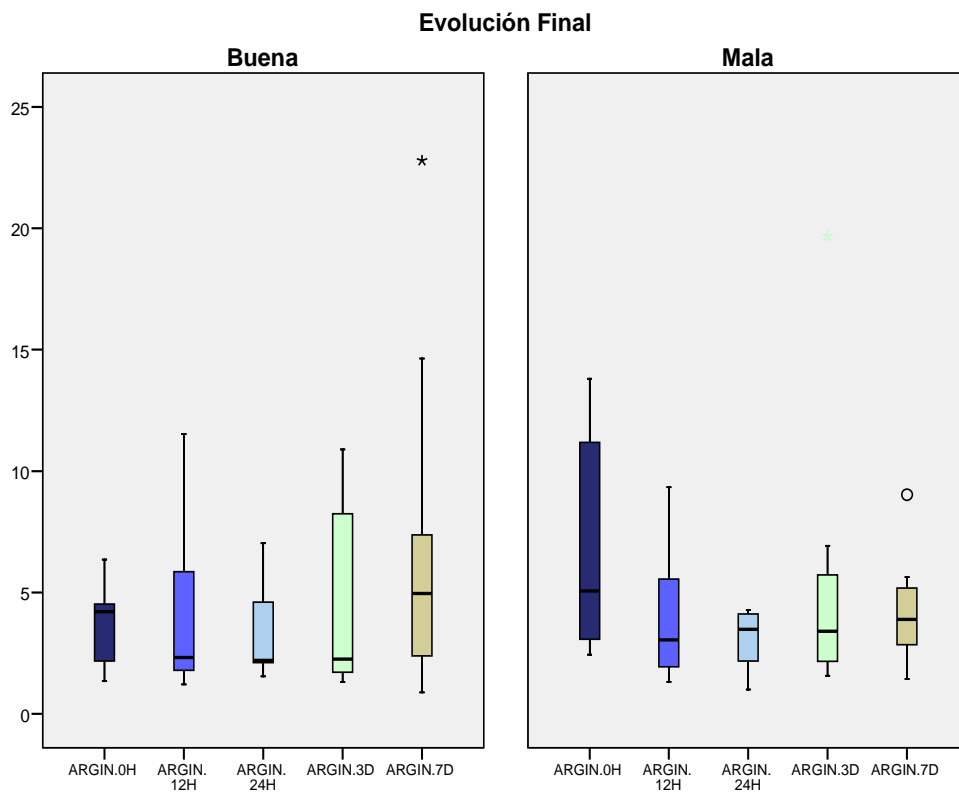


Tabla 22. Cinética de las principales variables analíticas, comparando pacientes del grupo control con los enfermos críticos, así como diferenciando los que tienen evolución favorable y desfavorable (subgrupo A1: condición favorable; subgrupo A2: condición desfavorable).

Variables analíticas	Pacientes críticamente enfermos (GRUPO A) n = 74						Niños sanos (GRUPO B) n = 51
	Evolución	0-6 horas	12 horas	24 horas	3 días	7 días	
CITRULINA ($\mu\text{mol/L}$)	Favorable	22.29 \pm 11.81	18.31 \pm 10.75 [‡]	17.02 \pm 8.27 [‡]	15.98 \pm 7.88 [‡]	18.65 \pm 7.00 [‡]	28.9 \pm 11.6
	Desfavorable	22.02 \pm 13.05	16.03 \pm 9.92 [‡]	13.44 \pm 5.05 ^{‡*}	12.12 \pm 5.40 [‡]	11.98 \pm 3.19 ^{‡*}	
ARGININA ($\mu\text{mol/L}$)	Favorable	4.80 \pm 2.77 [‡]	7.70 \pm 3.05 [‡]	4.32 \pm 4.10 [‡]	7.30 \pm 6.94 [‡]	6.82 \pm 6.37 [‡]	57.3 \pm 26.4
	Desfavorable	5.46 \pm 4.37 [‡]	2.98 \pm 2.18 ^{‡*}	3.04 \pm 2.17 [‡]	4.49 \pm 4.04 [‡]	3.76 \pm 2.05 [‡]	
PCR (mg/L)	Favorable	11.05 \pm 6.91	-	60.99 \pm 41.37	57.42 \pm 53.63	61.55 \pm 51.67	2.7 \pm 0.3
	Desfavorable	24.68 \pm 22.59	-	90.25 \pm 59.60	114.91 \pm 76.36 [*]	51.40 \pm 44.03	
PCT (ng/mL)	Favorable	3.95 \pm 2.16	-	9.01 \pm 5.00	4.31 \pm 3.17	0.55 \pm 0.65	0.2 \pm 0.05
	Desfavorable	33.45 \pm 22.61 [*]	-	57.91 \pm 55.32 [*]	13.16 \pm 6.55	2.64 \pm 2.09	
Ácido Úrico (mg/dL)	Favorable	4.51 \pm 1.31	-	4.20 \pm 2.07	3.26 \pm 1.47	2.20 \pm 0.36	3.3 \pm 1.1
	Desfavorable	5.36 \pm 2.93 [*]	-	4.26 \pm 2.77	3.80 \pm 2.05	2.4 \pm 0.87	
Albúmina (g/dL)	Favorable	3.69 \pm 1.06	-	3.39 \pm 0.67	2.91 \pm 0.92	3.10 \pm 0.65	4.1 \pm 0.3
	Desfavorable	2.97 \pm 0.98 [*]	-	2.98 \pm 0.61	2.46 \pm 0.67	2.64 \pm 0.09	

[‡] p < 0.05 comparando con sujetos sanos

^{*} p < 0.05 comparando con aquellos de evolución favorable

La Tabla 22 muestra la cinética de citrulina y arginina en plasma, lo que permite comparaciones entre sujetos sanos y los niños críticamente enfermos. El grupo control mantiene los niveles de citrulina plasmática siempre mayor que los niños críticamente enfermos ($p < 0.05$) con una media de 28.9 ± 11.6 mmol/L, y lo mismo vale para la arginina con una media de 57.3 ± 26.4 mmol/L ($p < 0.05$).

Al comparar ambos grupos de niños críticamente enfermos (aquellos con evolución favorable y desfavorable) se puede observar que existen diferencias estadísticamente significativas en arginina en 12h ($p 0.049$), la citrulina a las 24 horas ($p 0.035$) y la citrulina al séptimo día ($p 0.006$) (tabla 22).

4.2. ANÁLISIS BIVARIANTE

Mediante análisis bivalente con resto de parámetros clínico-analíticos se evidencia:

1. Correlación de elevación de citrulina al 7º día con menor duración de ventilación mecánica, menor estancia en UCIP y menor aparición de complicaciones. En cambio, los niveles de citrulina aún descendidos al 7º día se relacionan con mayor elevación de PCR y PCT a las 24 horas.
2. El mayor descenso de arginina en las primeras 12 horas está relacionado con mayor estancia en UCIP y mayor número de complicaciones, así como con mayor ascenso de RFA como PCR y PCT a los 3 días.

Tabla 23. Valores demográficos generales y analíticos que presentan diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con evolución favorable y los de evolución desfavorable.

	Condición favorable Subgrupo A1	Condición desfavorable Subgrupo A2	Significación estadística p
N	49	25	-
Edad (meses)	46.35±7.12	22.79±9.59	0.049
PRISM-II score (%)	9.50±2.76	21.22±10.09	0.048
V. Mecánica (horas)	8.77±7.07	330.19±53.86	0.012
Estancia en UCIP (días)	4.14±3.05	21.76±13.66	0.008
Ácido Úrico al ingreso (mg/dL)	4.51±1.31	5.36±2.93	0.048
Albúmina al ingreso (g/dL)	3.69±1.06	2.97±0.98	0.012
PCT al ingreso (mg/L)	3.95±2.16	33.45±22.61	0.035
PCT 24 horas (ng/mL)	9.01±5.00	57.91±55.32	0.021
PCR 3º día (mg/L)	57.42±53.63	114.91±76.36	0.04
Arginina 12 horas (µmol/L)	7.70±3.05	2.98±2.18	0.049
Citrulina 24 horas (µmol/L)	17.02±8.27	13.44±5.05	0.035
Citrulina 7º día (µmol/L)	18.65±7.00	11.98±3.19	0.006

Gráfico 15. Niveles de citrulina ($\mu\text{mol/L}$) a las 24 horas según la evolución

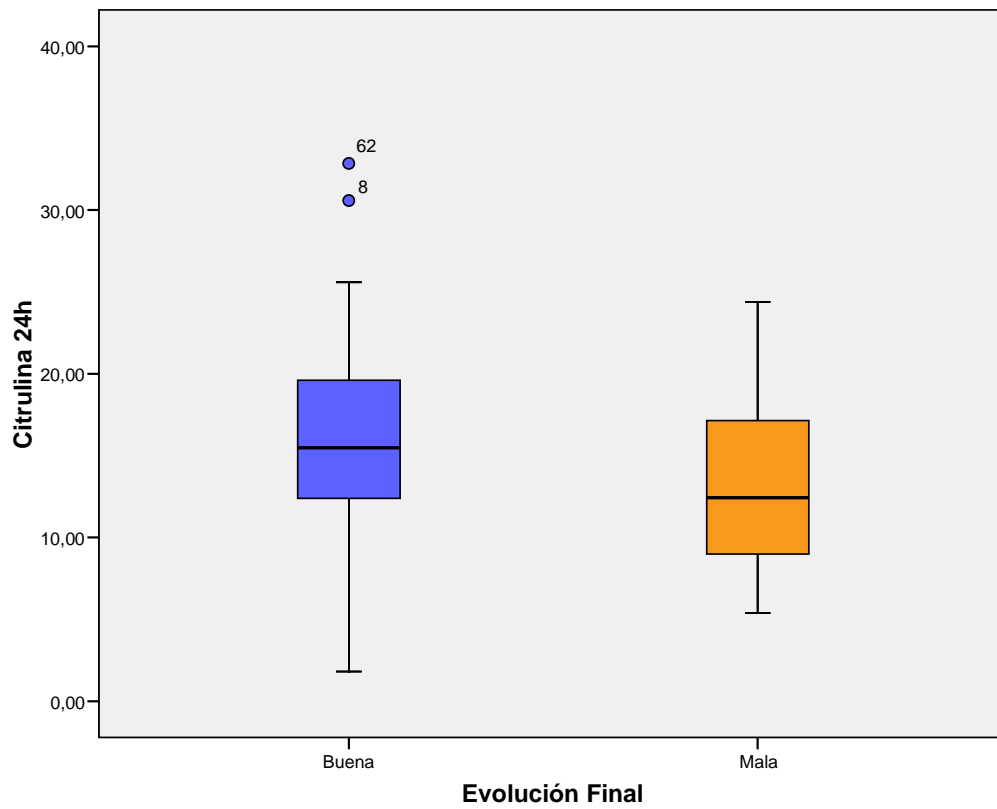


Gráfico 16. Niveles de citrulina ($\mu\text{mol/L}$) al 3º día según la evolución

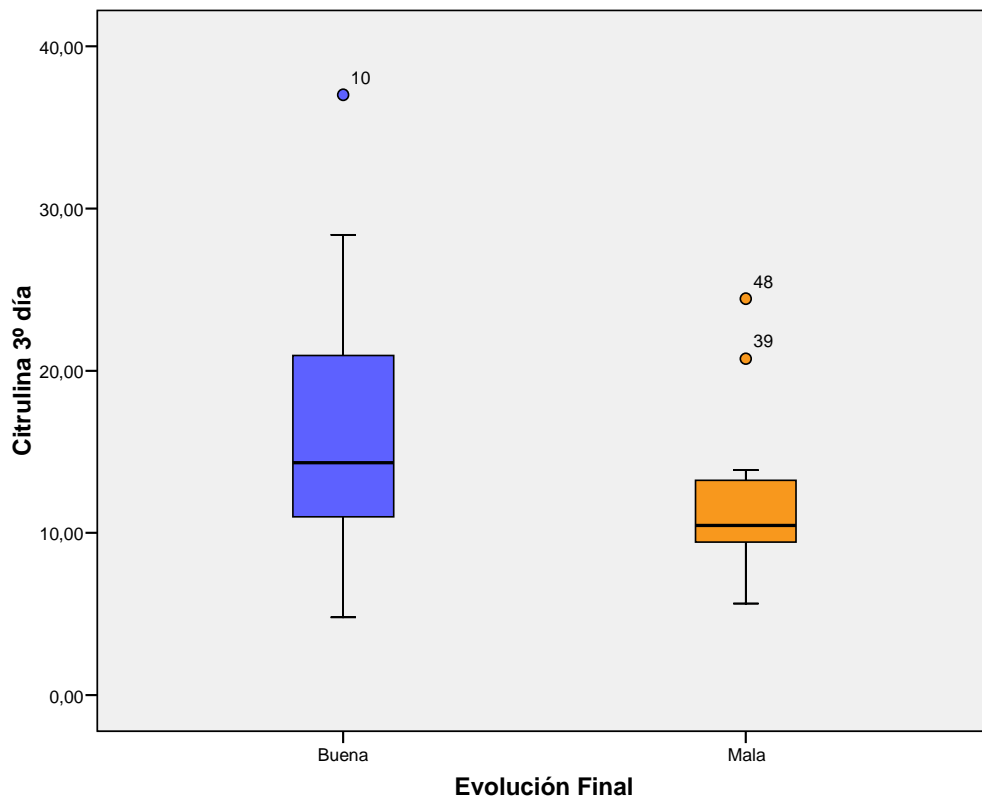
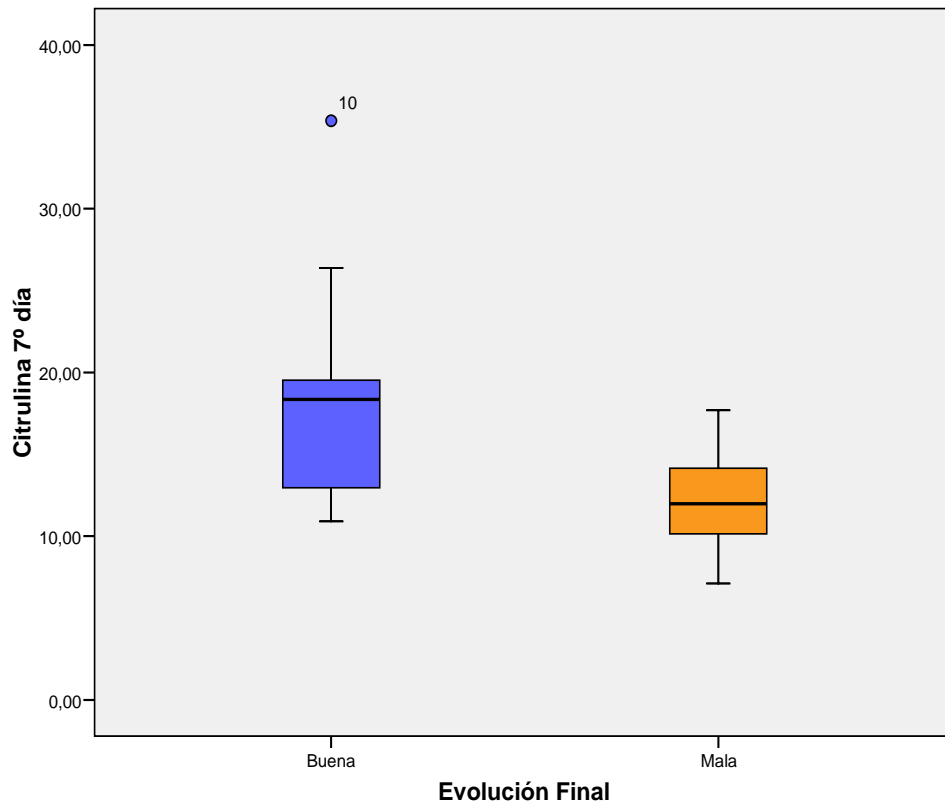
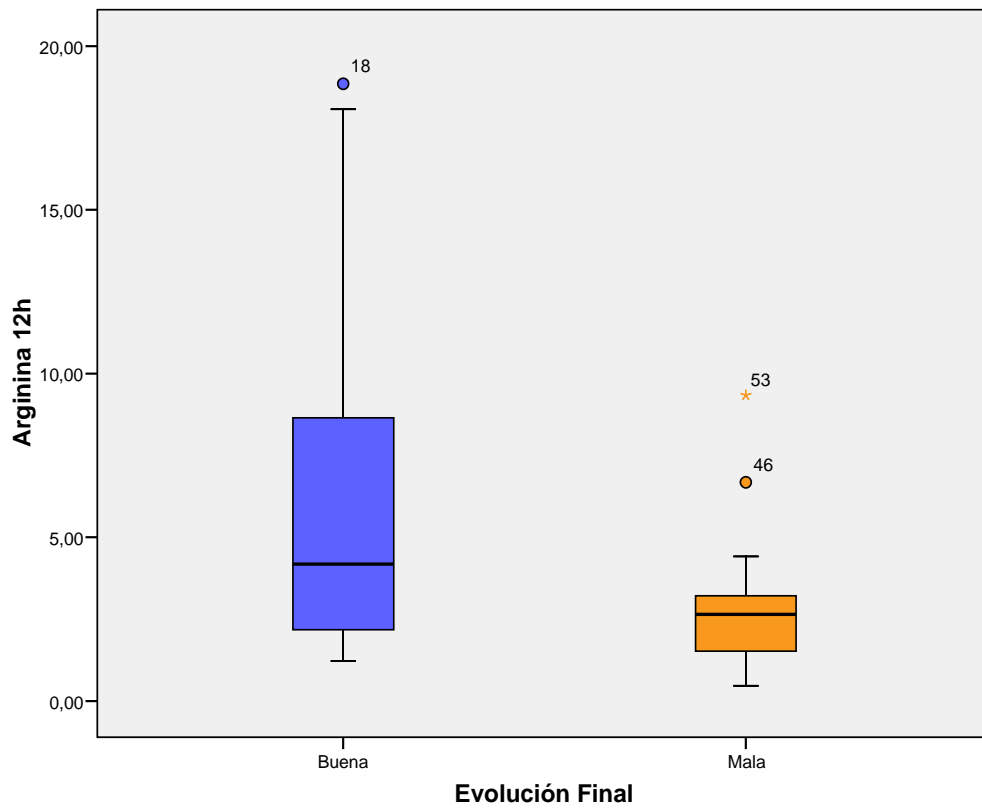


Gráfico 17. Niveles de citrulina ($\mu\text{mol/L}$) al 7º día según la evolución



Gáfico 18. Niveles de arginina ($\mu\text{mol/L}$) a las 12 horas según evolución



Existe una clara correlación negativa entre la citrulina al 7º día (gráficos 25 y 26) con la duración de VM (Rho de Spearman $\rho = -0.646$, $p = 0.007$), y con la estancia en UCIP (Rho de Spearman $\rho = -0.49$, $p = 0.013$). También hay una correlación negativa estadísticamente significativa mayor entre el descenso de arginina en las primeras 12 horas y la estancia más larga en la UCIP ($\rho = -0.27$, $p = 0.05$) y la duración de ventilación mecánica ($\rho = -0.38$, $p = 0.025$), gráficos 19 y 20.

Hay una diferencia significativa en los niveles de citrulina a las 24h entre los que tienen complicaciones y los que no las tienen (U Mann Whitney $p = 0.049$).

Entre las correlaciones analíticas, la citrulina que se mantiene baja en el día 7 se asocia con un aumento de la PCR ($\rho = -0.47$, $p = 0.033$) y PCT a las 24h ($\rho = -0.67$, $p = 0.002$). La disminución más importante de los niveles de arginina es en las primeras 12h, y se correlaciona con un mayor aumento de la PCR a los 3 días ($\rho = 0.42$, $p = 0.038$) y PCT a los 3 días ($\rho = -0.497$, $p = 0.019$), gráficos 37 y 40.

Tras aplicar las correlaciones bivariadas se llevó las variables independientes, que habían demostrado diferencias estadísticamente significativas, a un modelo de regresión lineal, permitiendo confirmar como verdadera la influencia de cada variable factor (PCR, PCT, estancia en UCIP y tiempo de VM) y en la variable de estado (nivel de aminoácido citrulina al 7º día y de arginina a las 12 horas).

Gráfico 19. Relación entre arginina a las 12 horas ($\mu\text{mol/l}$) con los días de estancia en UCIP (días)

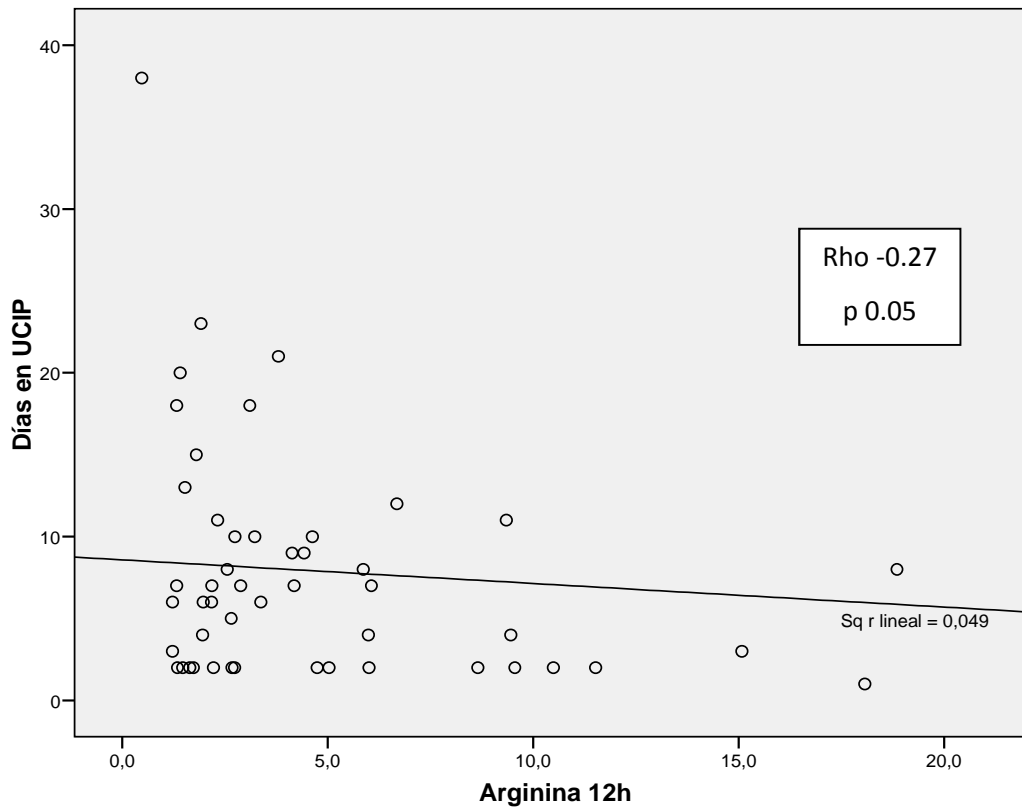
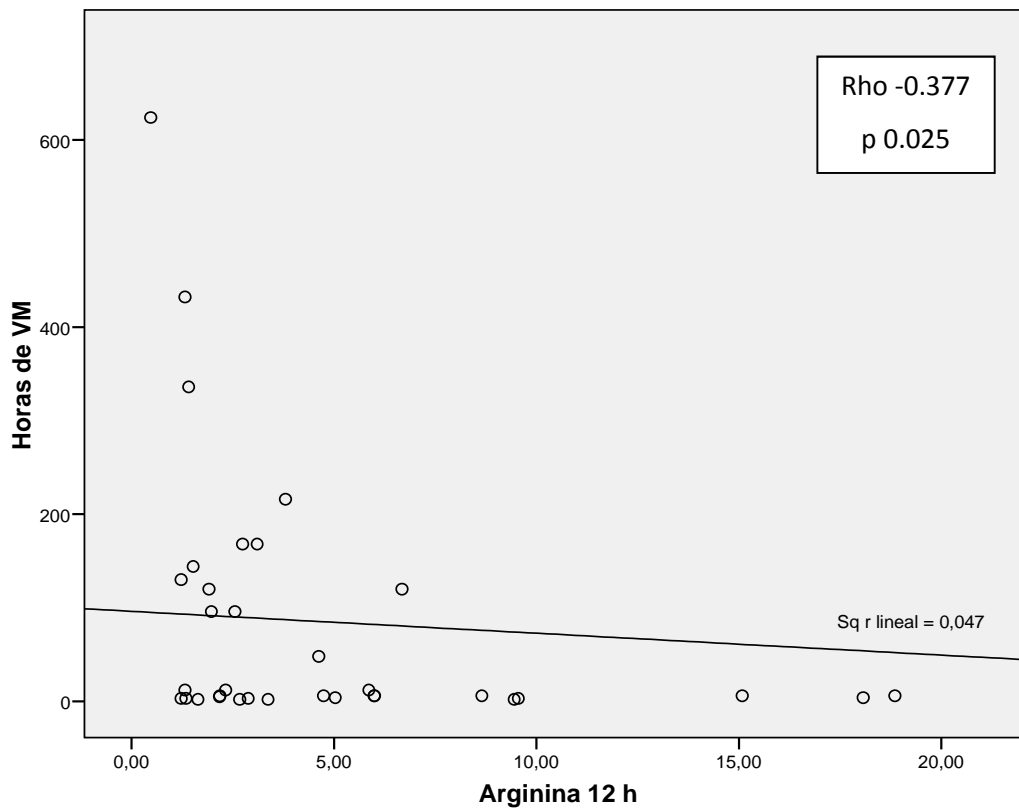
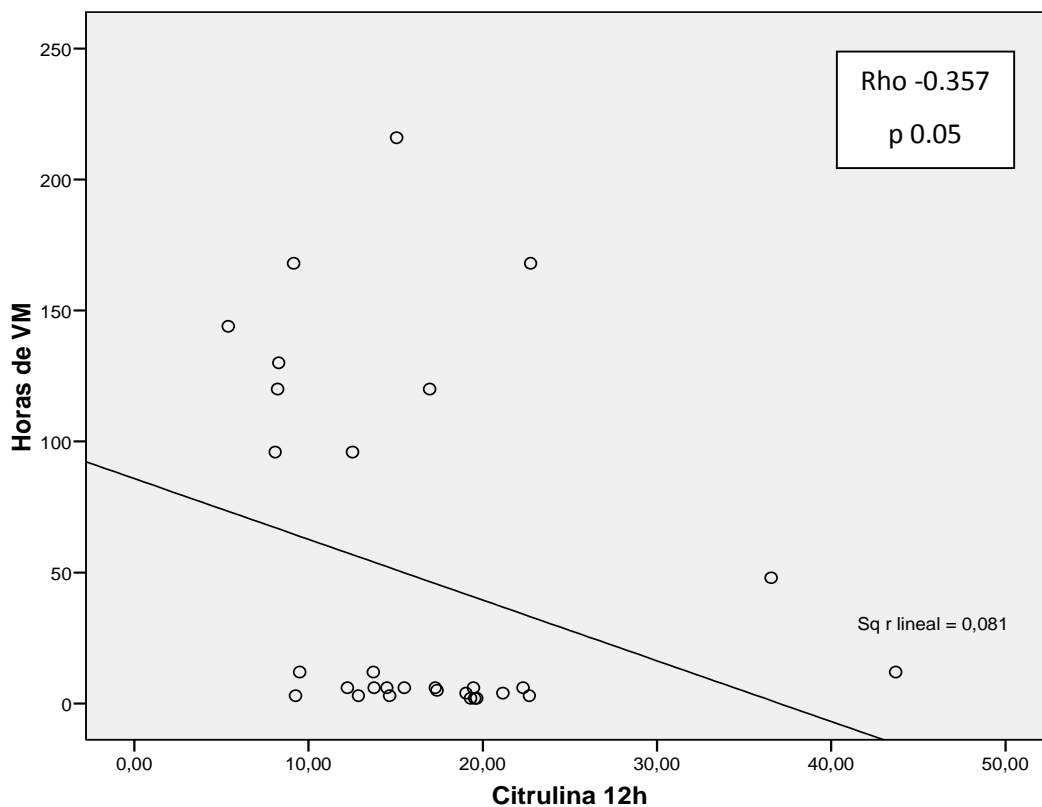
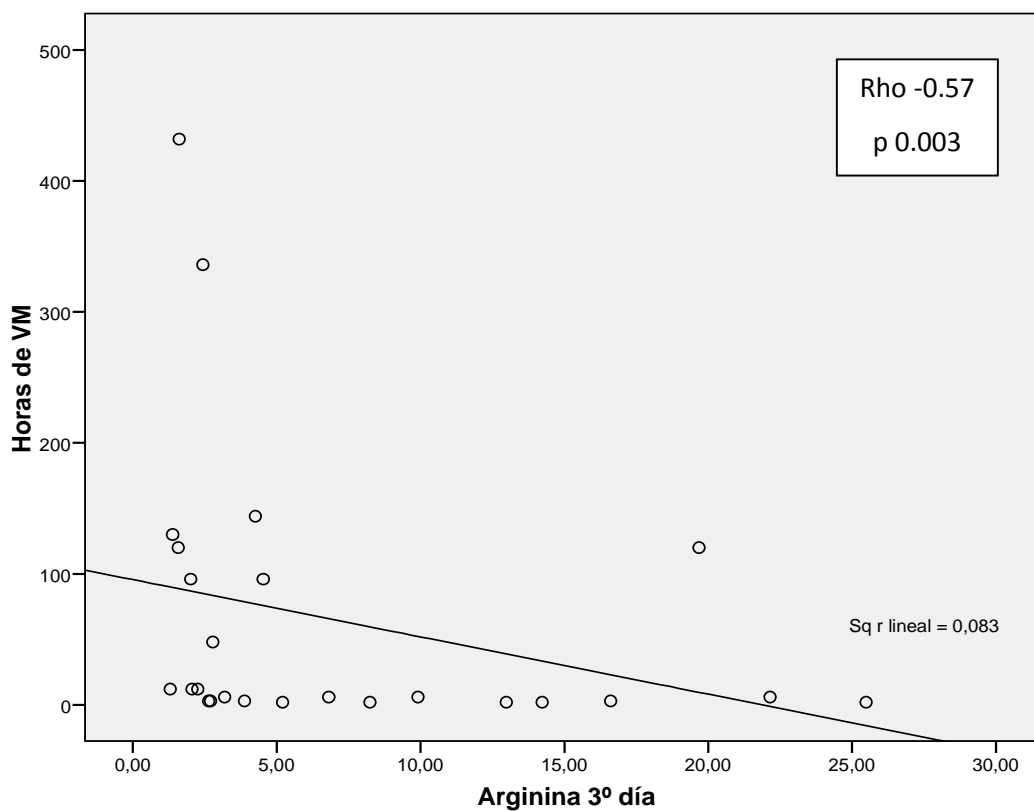


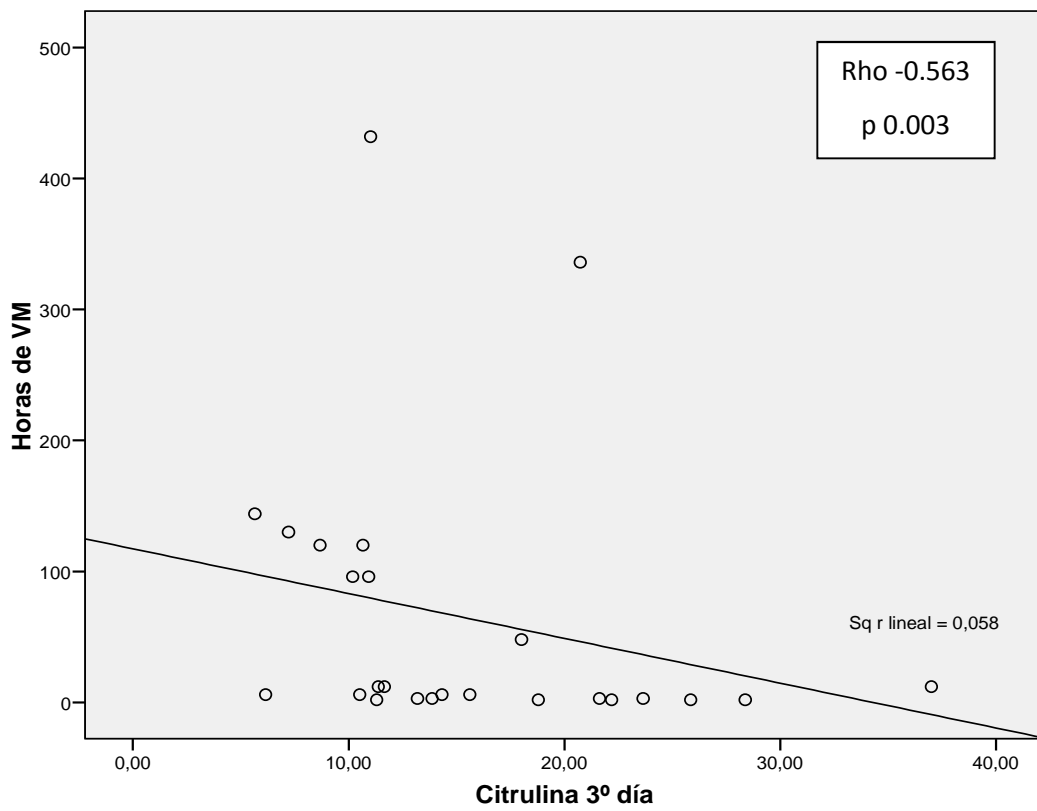
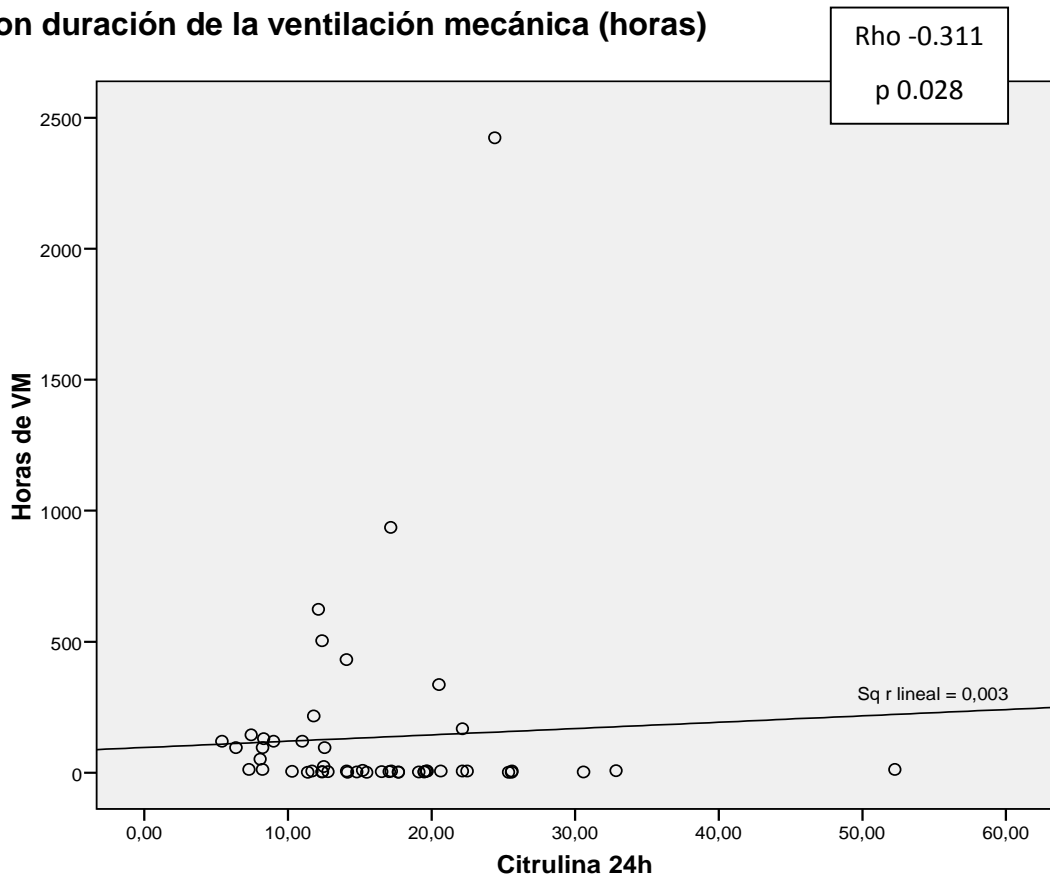
Gráfico 20. Relación entre arginina a las 12 horas ($\mu\text{mol/L}$) con la duración de ventilación mecánica (horas)



Gráficos 21 y 22. Relación entre arginina al 3º día ($\mu\text{mol/L}$) y la citrulina a las 12 horas ($\mu\text{mol/L}$) con duración de la ventilación mecánica (horas)



Gráficos 23 y 24 Relación entre citrulina a las 24 horas y al 3º día ($\mu\text{mol/L}$) con duración de la ventilación mecánica (horas)



Gráficos 25 y 26. Relación entre citrulina al 7º día ($\mu\text{mol/L}$) con la duración de la ventilación mecánica (horas) y estancia en UCIP (días)

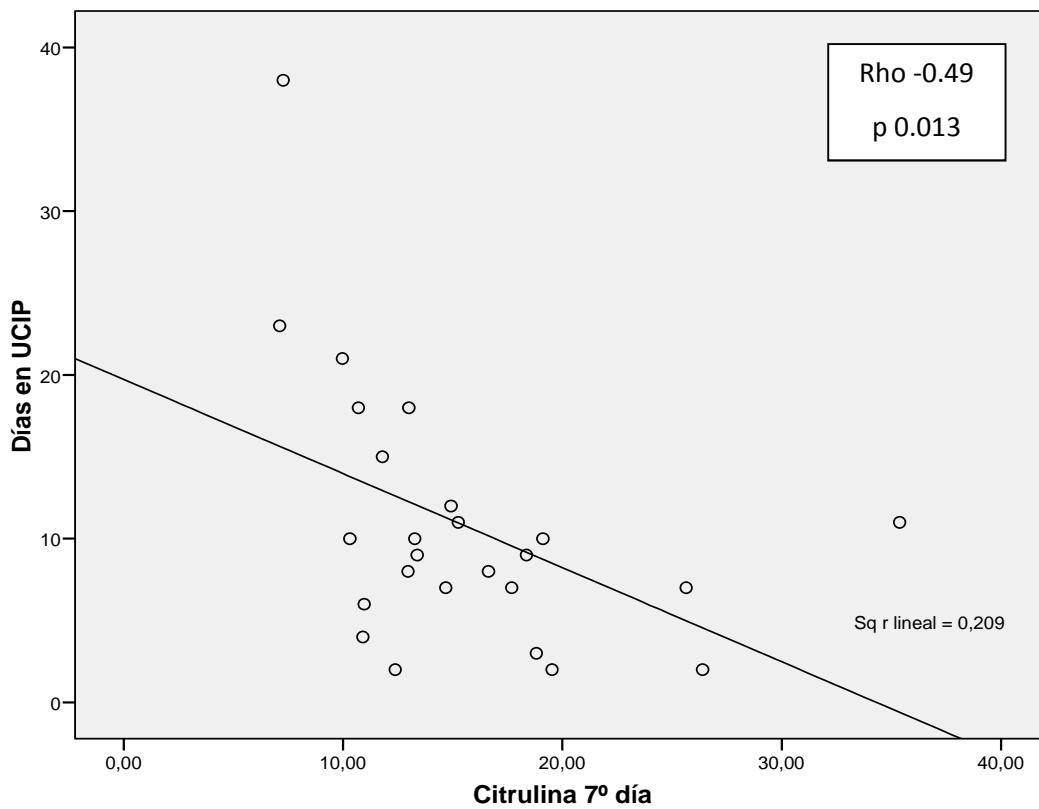
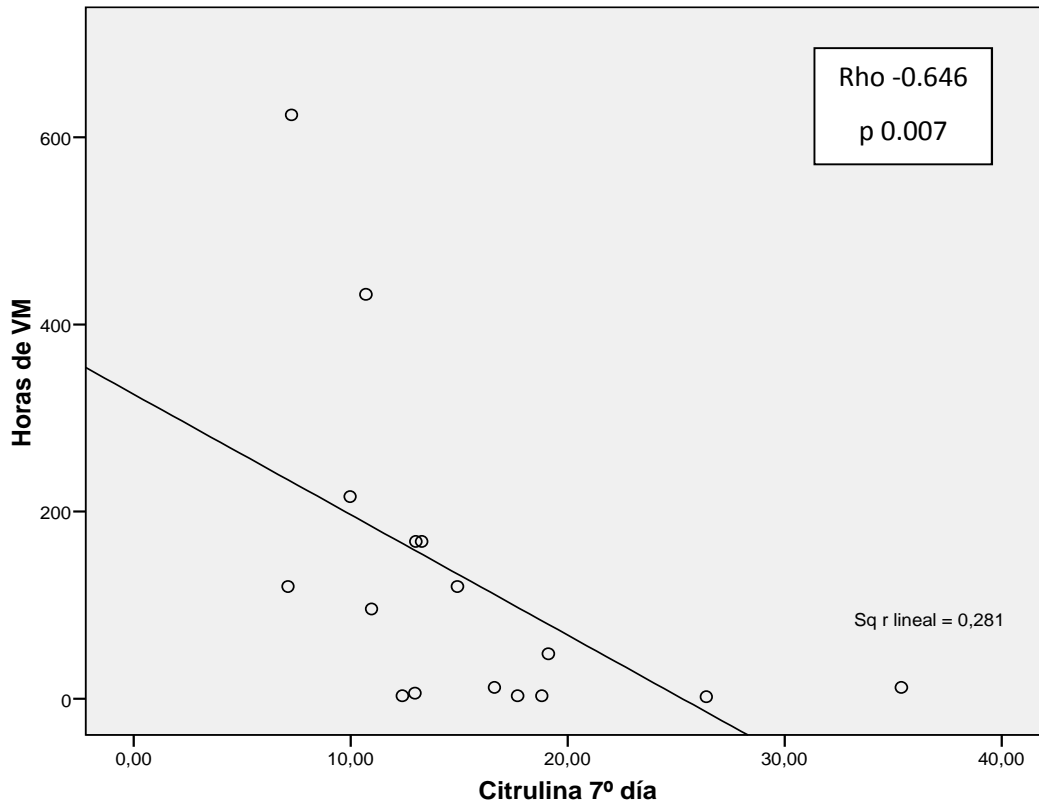


Gráfico 27. Relación entre la citrulina a las 12 horas ($\mu\text{mol/L}$) y arginina a las 24 horas ($\mu\text{mol/L}$)

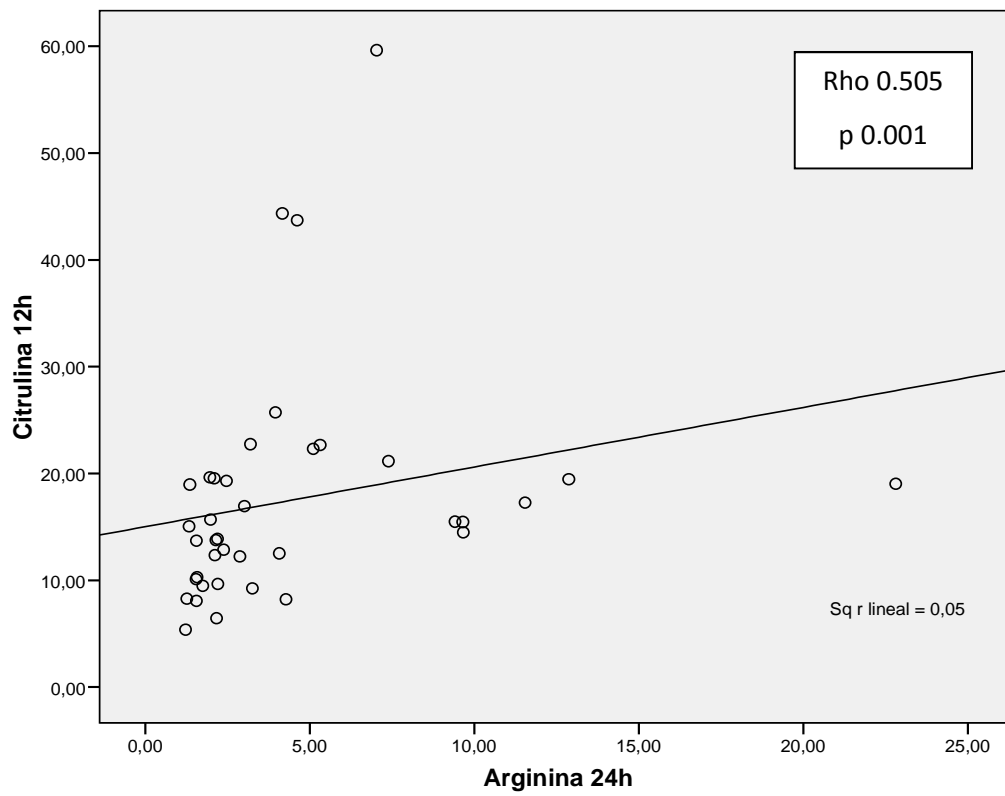
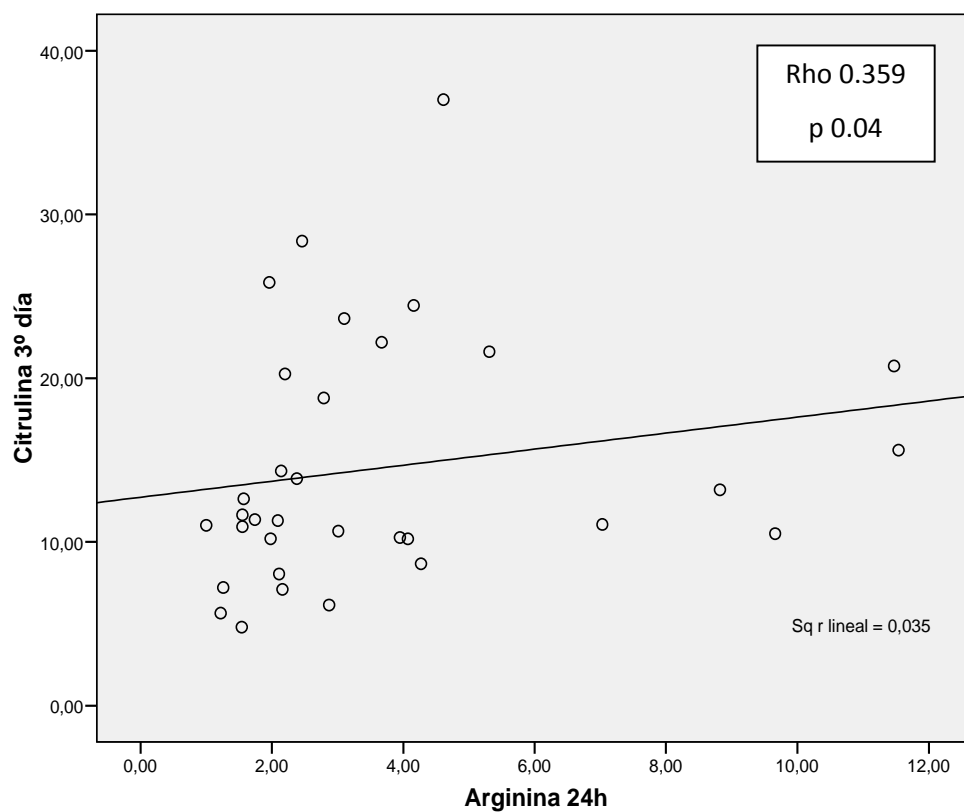
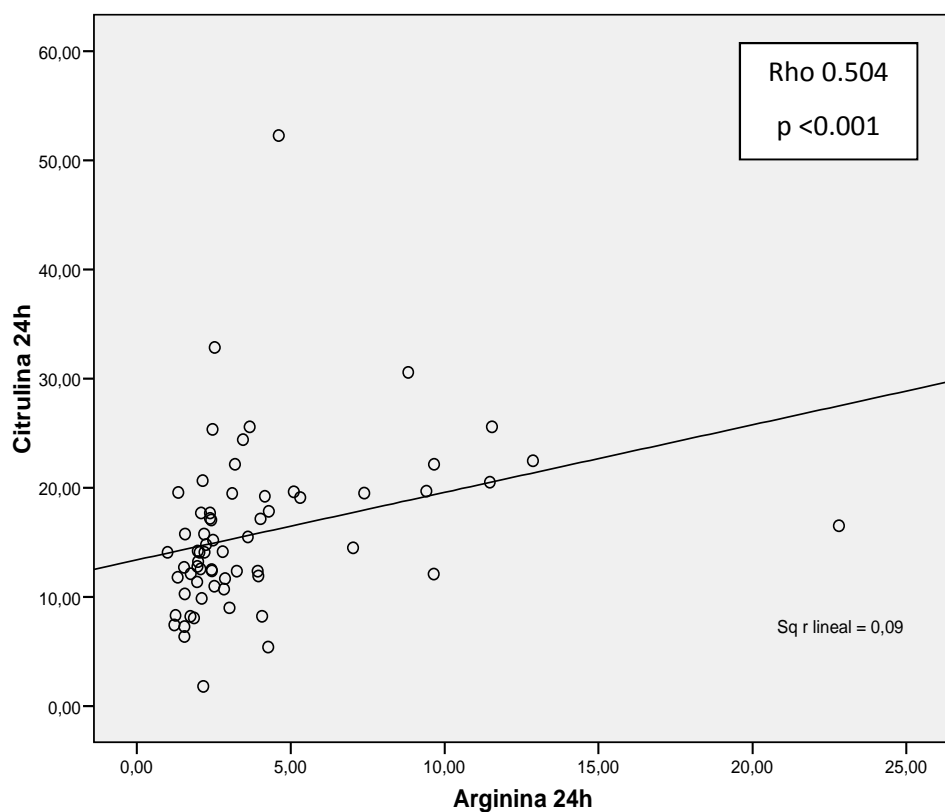
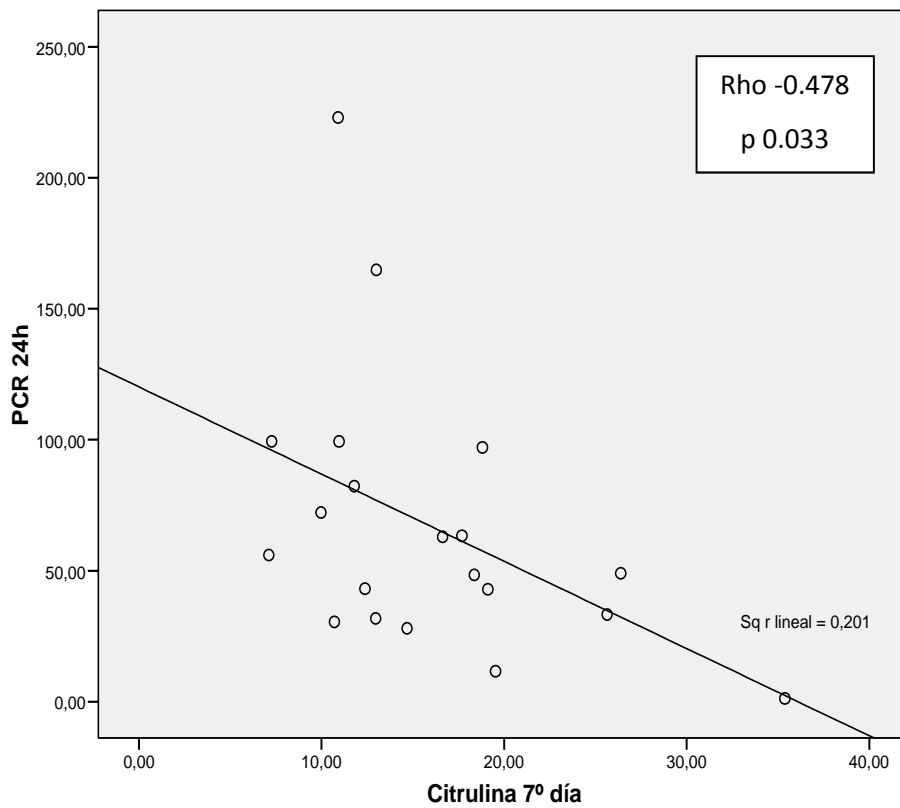
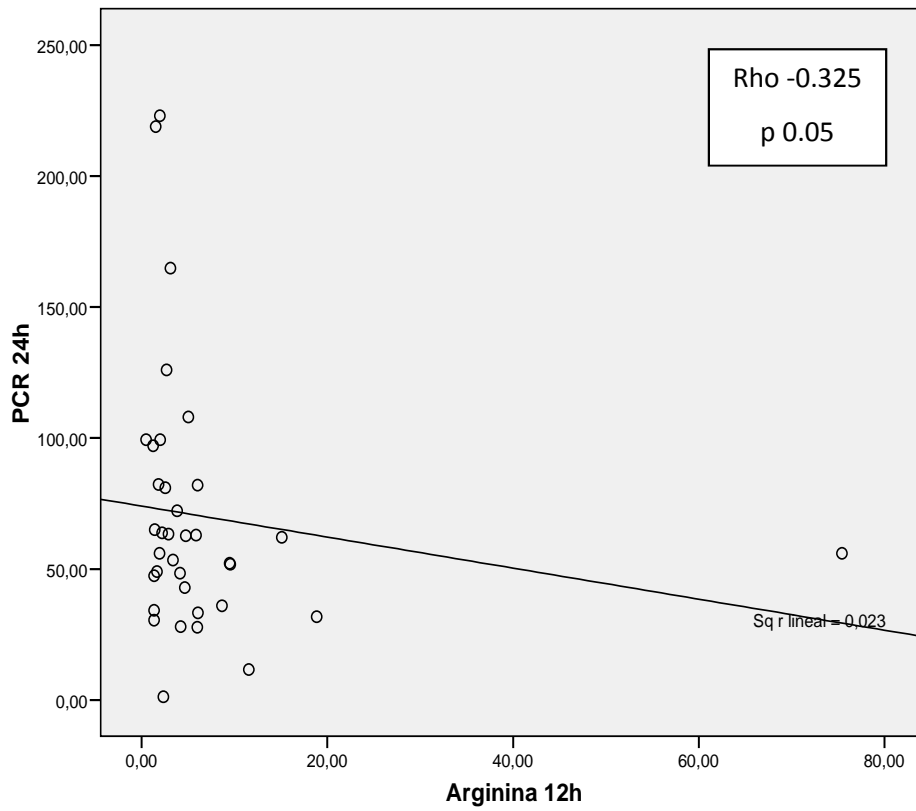


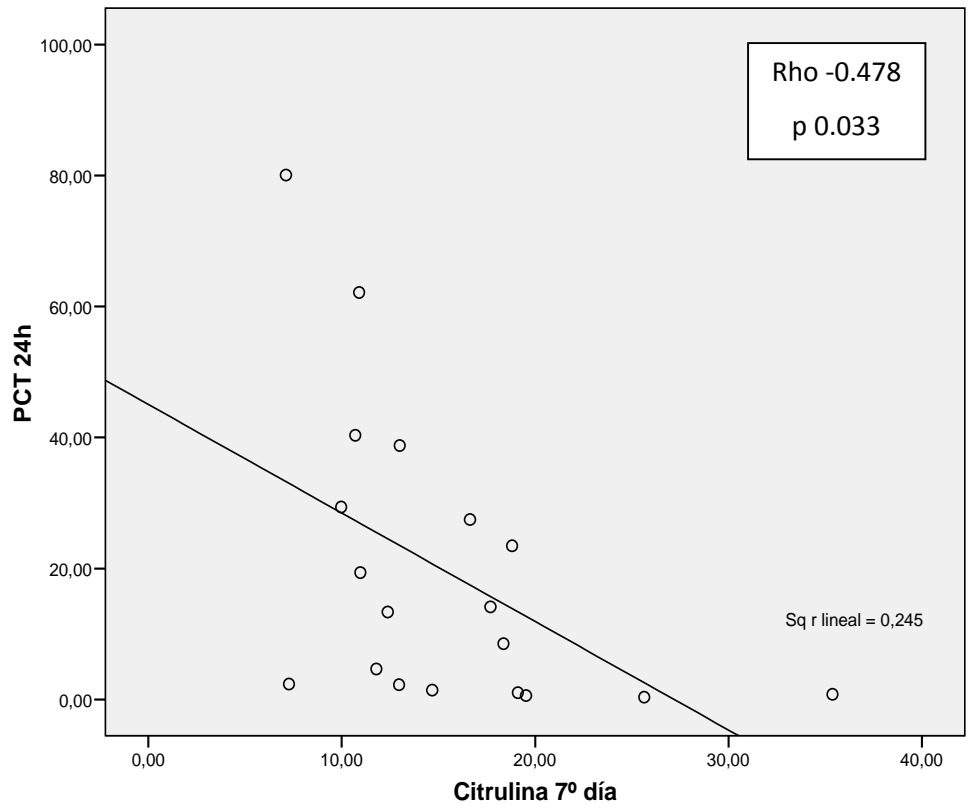
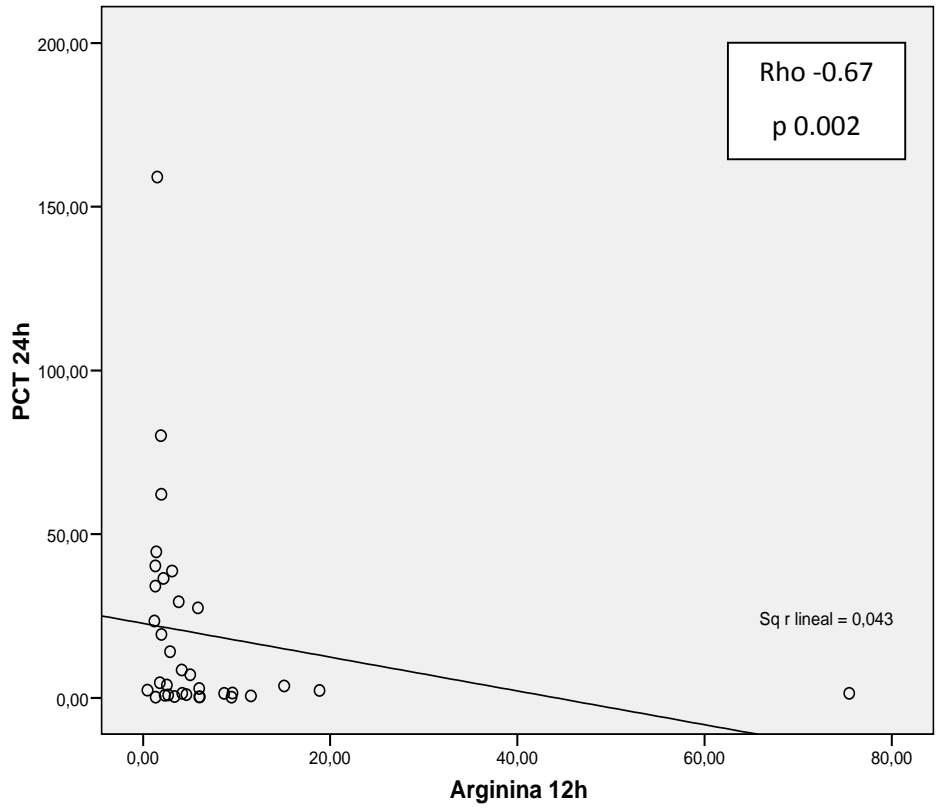
Gráfico 28 y 29. Relación entre la arginina a las 24 horas ($\mu\text{mol/L}$) con la citrulina a las 24 horas y al 3º día ($\mu\text{mol/L}$)



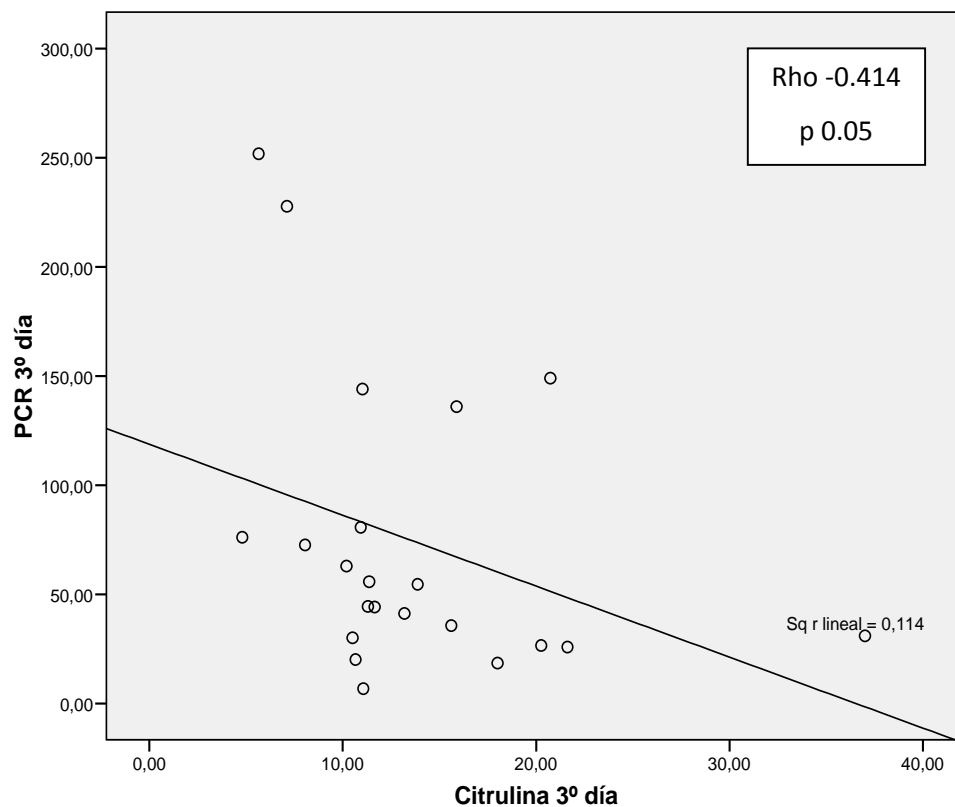
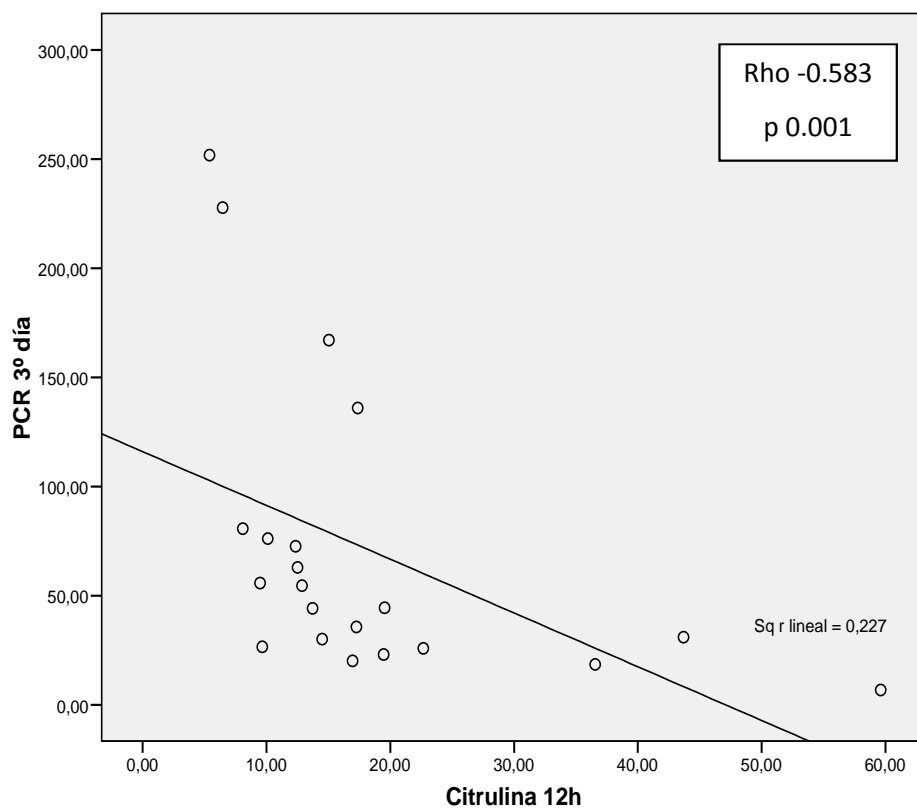
Gráficos 30 y 31. Relación entre la arginina a las 12 horas ($\mu\text{mol/L}$) y la citrulina al 7º día ($\mu\text{mol/L}$) con la PCR a las 24 horas (mg/L)



Gráficos 32 y 33. Relación entre la arginina a las 12 horas ($\mu\text{mol/L}$) y la citrulina al 7º día ($\mu\text{mol/L}$) con la PCT a las 24 horas (ng/mL)



Gráficos 34 y 35. Relación entre la citrulina a las 12 horas y al 3º día ($\mu\text{mol/L}$) con la PCR al 3º día (mg/L)



Gráficos 36 y 37. Relación entre la citrulina al 7º día (µmol/L) y la arginina a las 12 horas (µmol/L) con la PCR al 3º día (mg/L)

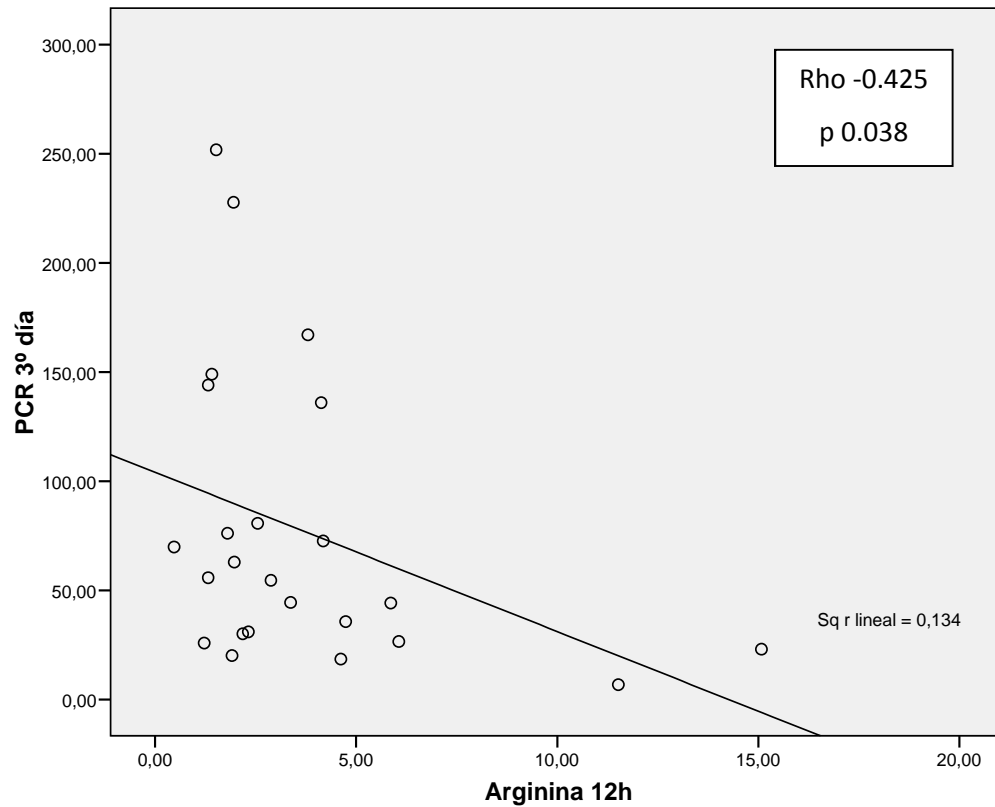
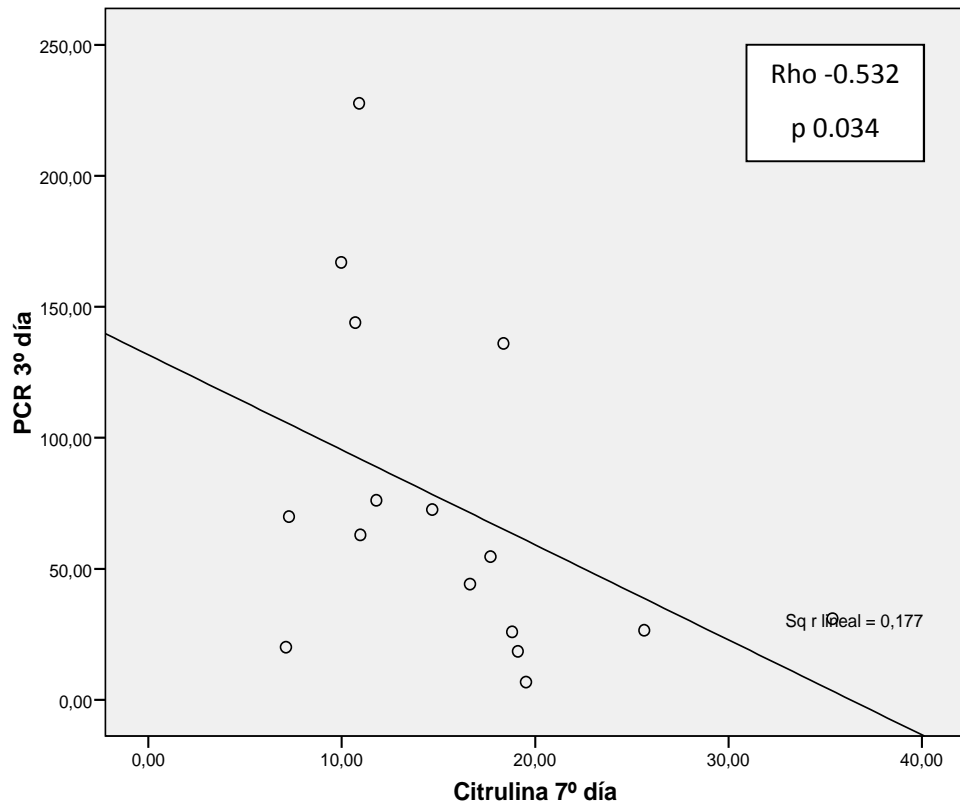
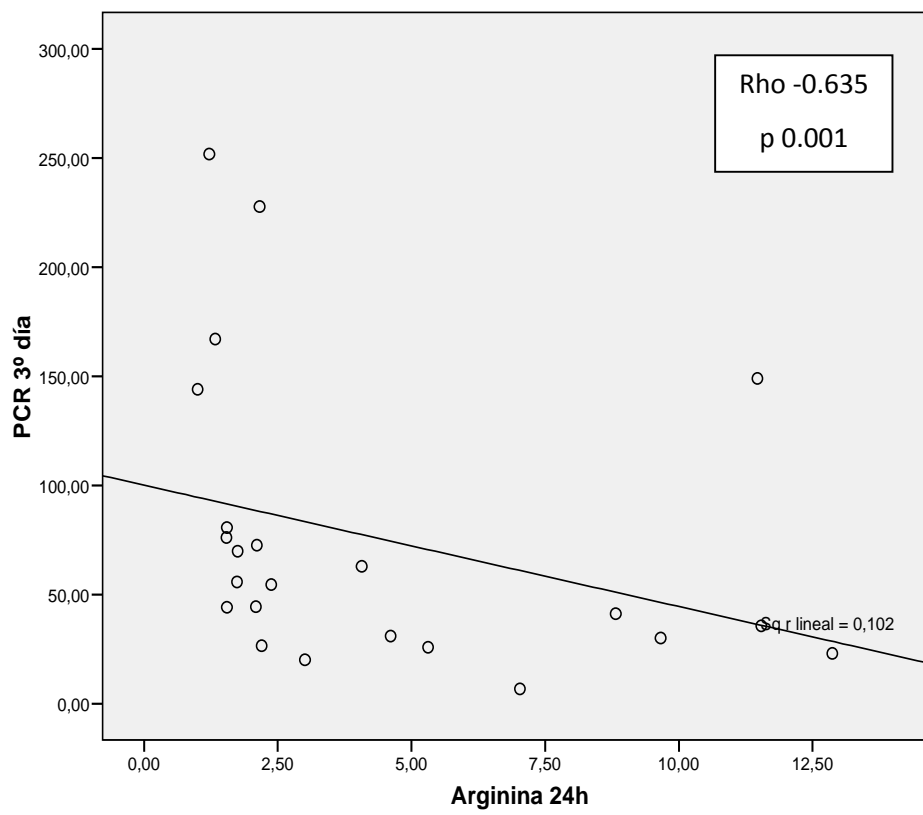


Gráfico 38. Relación entre la arginina a las 24 horas ($\mu\text{mol/L}$) con la PCR al 3º día (mg/L)



Gráficos 39 y 40. Relación entre la citrulina al 7º día ($\mu\text{mol/L}$) y la arginina a las 12 horas ($\mu\text{mol/L}$) con la PCT al 3º día (ng/mL)

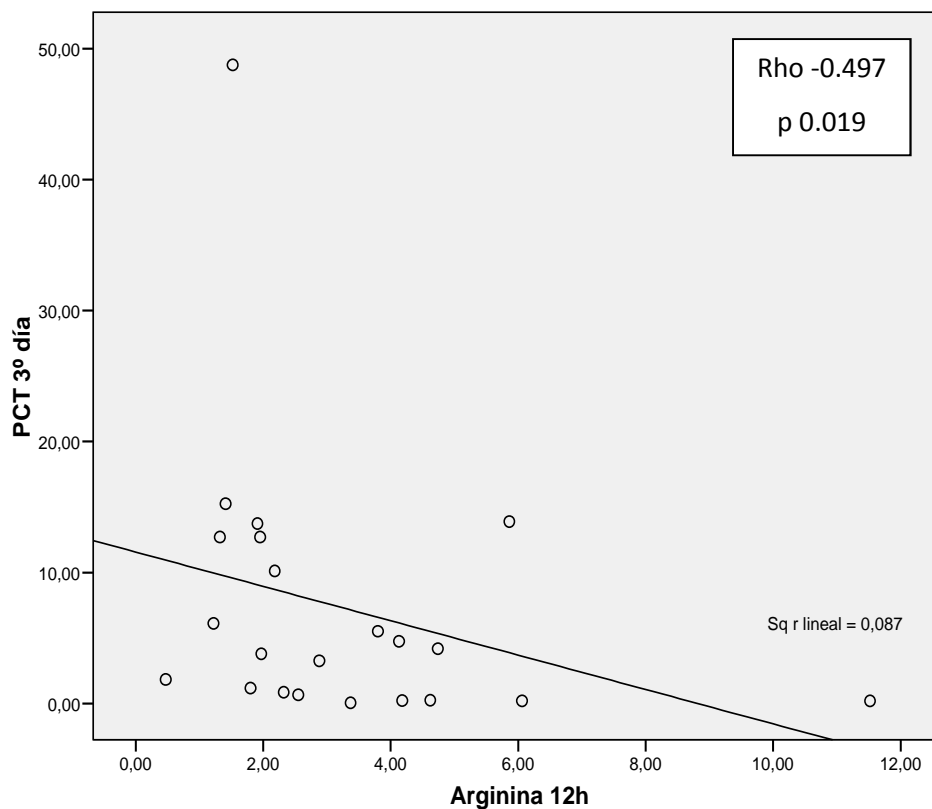
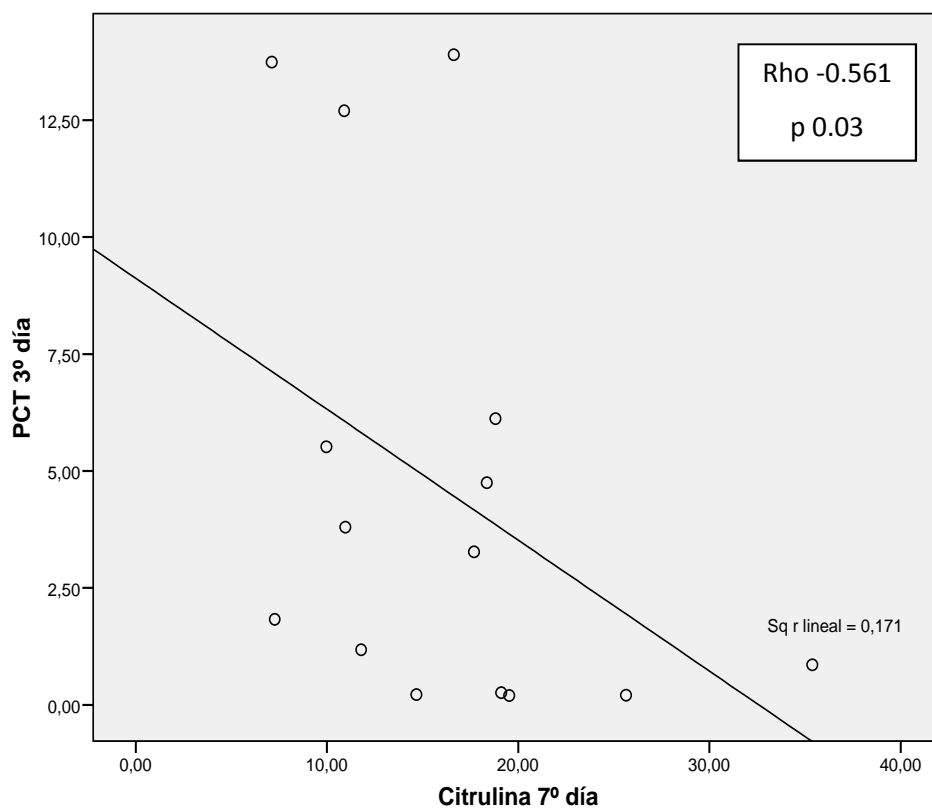
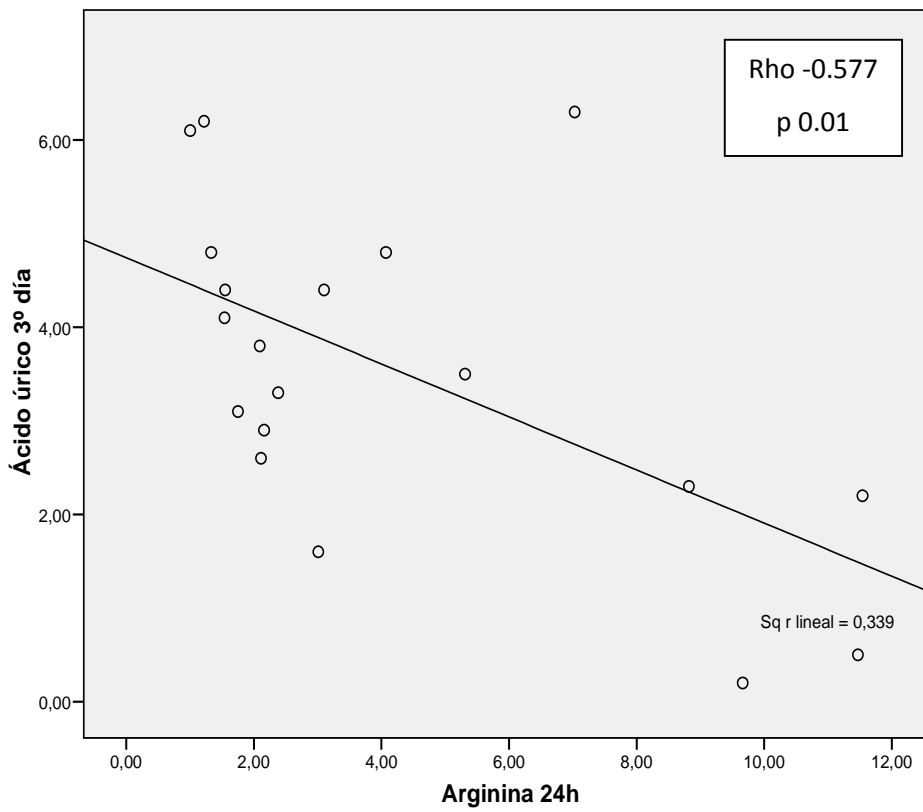


Gráfico 41. Relación entre la arginina a las 24 horas ($\mu\text{mol/L}$) con el ácido úrico al 3º día (mg/L)



4.3. ESTIMADORES DE RIESGO Y VALORACIÓN DE MARCADORES DE ENFERMEDAD

CURVAS COR

Tabla 24. Datos de la curva COR para citrulina y arginina a las 0, 12, 24 horas y 3 días, representando el punto de corte, su sensibilidad y especificidad aportada.

Marcador	Área bajo la curva	Punto de corte	Sensibilidad	Especificidad	
Citrulina	0 h	0.541	21.3	60%	53%
	12 h	0.565	13.2	60%	59%
	24 h	0.621	12.3	60%	59%
	3 días	0.653	10.7	70%	70%
Arginina	0 h	0.465	3.18	50%	65%
	12 h	0.526	3.05	60%	47%
	24 h	0.541	2.42	50%	42%
	3 días	0.553	4.07	60%	47%

En cuanto a la aplicación de curvas COR en los aminoácidos de estudio, se ha elegido los valores de citrulina y arginina en los primeros 3 días al ser posibles marcadores de riesgo de mala evolución, anticipándose a la aparición de la misma. En la tabla 24 se puede apreciar que en todos los casos el área bajo la curva está por encima de 0.5 y para los puntos de corte representados se ha adjuntado la mejor sensibilidad y especificidad correspondientes posibles.

Tabla 25. Tabla con puntos de corte de citrulina y arginina en diferentes momentos y sus resultados de razón de verosimilitudes (odds ratio (OR) con intervalo de confianza).

Marcador	Punto de corte	Marcadores de evolución			
		Mala evolución	VM > 6 h	VM > 24 h	Estancia > 6 días
Citrulina 12 h	12.69	2.15 (0.57-8.14)	8.7 (1.39-54.79)	2.57 (0.66-9.94)	1.84 (0.51-6.61)
	8.15	1.11 (0.09-13.42)	-	5.63 (0.46-68.46)	2.4 (0.20-28.80)
Citrulina 24 h	11.7	1.76 (0.55-5.62)	6.15 (1.43-26.39)	2.76 (0.86-8.89)	2.03 (0.64-6.36)
Arginina 12 h	2.8	1.93 (0.59-6.35)	4.76 (1.13-19.97)	1.62 (0.49-5.39)	0.84 (0.27-2.57)
	3.58	3.9 (1.04-14.05)	4.12 (0.96-17.63)	2.20 (0.62-7.70)	1.20 (0.39-3.67)
Arginina 24 h	2.29	1.1 (0.38-3.12)	2.3 (0.70-7.57)	1.23 (0.43-3.54)	2.16 (0.79-5.93)
Arginina 3 d	2.7	1.1 (0.26-4.60)	11.0 (1.60-75.50)	1.11 (0.268-4.60)	1.21 (0.31-4.73)

OR: Odds ratio (IC 95%)

Los valores más significativos que aportan Odds ratio valorable son la arginina a las 12h con cifras inferiores a 3.58 $\mu\text{mol/L}$, tiene 3.9 veces más riesgo de presentar mala evolución, y la arginina a los 3 días con cifras inferiores a 2.7 $\mu\text{mol/L}$ con una OR de 11 veces mayor de tener VM más de 6 horas. Así como las cifras de citrulina inferiores a 12.69 $\mu\text{mol/L}$ a las 12 horas de ingreso con un OR de 8.7 veces mayor de tener VM más de 6 horas (tabla 25).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Se han realizado pocos estudios que analicen en profundidad la cinética y los cambios en el metabolismo de la arginina y la citrulina en pacientes adultos con enfermedad crítica y sepsis. El metabolismo de la arginina en pacientes pediátricos con sepsis se ha estudiado a fondo en un estudio usando isótopos estables ¹⁶, convirtiéndose en un aminoácido esencial bajo situaciones de estrés, donde su síntesis endógena es insuficiente y se postula la necesidad de suplementación para restaurar los niveles de arginina hacia la normalidad, y mantenimiento de sus funciones. El ajuste por edades es una técnica ampliamente empleada en epidemiología para eliminar el sesgo de confusión, introducido por la diferente composición por edad de varias poblaciones y para presentar un resumen de datos para edades específicas. El método más empleado, conocido como ajuste directo, fue propuesto por Neison en 1844 y consiste en calcular la media ponderada de las tasas específicas por edad, empleando como pesos la composición de una población de referencia arbitraria.

La síntesis endógena de la arginina se realiza fundamentalmente en el riñón a partir de la citrulina procedente del intestino, y de un donante de nitrógeno, que generalmente es el ácido aspártico. En condiciones de normalidad y sin enfermedad, la síntesis endógena de arginina supone aproximadamente un 20% del consumo diario, viéndose incrementada en situaciones que implican un aumento del catabolismo proteico.

5. 1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se ha tenido en cuenta los pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos pediátricos que ingresaran con una expectativa de estancia mínima de 3 días en la unidad y no ingresaran para vigilancia clínica solamente, considerando así pacientes con un estrés desencadenante: patología médica grave, accidente, cirugía o traumatismo, que generara una respuesta inflamatoria sistémica con entidad suficiente como para valorar cambios en los aminoácidos objetivo de nuestro estudio (citrulina y arginina).

Con 7 pacientes hubo problemas con la obtención del consentimiento informado, y a pesar de que cumplían los criterios de inclusión, fueron eliminados del análisis final. Otros 4 pacientes fueron eliminados por mal procesamiento de la muestra o ausencia de analítica en más de 2 determinaciones.

Un sesgo de inclusión de pacientes en nuestra muestra puede ser el hecho de tener 2 periodos de recogida de pacientes, en años diferentes, aunque se realizaron ambos en la misma estación del año, otoño e invierno, en la que se agrupa el mismo tipo de patología médica, con predominio de procesos respiratorios, y sin encontrar diferencias significativas en la cirugía programada y urgente durante ambos periodos.

5. 2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

No se incluyó a los recién nacidos menores de 7 días, ya que no disponemos de valor de referencia de arginina y citrulina en este grupo de edad con el que comparar nuestros resultados. Por otro lado, en neonatos se conoce que existe un aumento en la *filtración transmucosa* en el intestino, fenómeno que finaliza en el tercer trimestre de vida, en un proceso llamado “de cierre”. Este proceso de filtración transmucosa se puede medir por medio de la determinación de la permeabilidad intestinal^{312, 313}. Se sabe que la permeabilidad intestinal está elevada en los primeros días de vida, comprobado por van Elburg y colaboradores³¹⁴, y que desciende posteriormente en la primera semana de vida, sin encontrar diferencia significativa según la edad gestacional, llamándose primer cierre intestinal.

Se excluye a los pacientes a los que se les realiza cirugía abdominal, con resección intestinal amplia y con necesidad de nutrición parenteral por este motivo, por la influencia de la patología de base y la resección intestinal en los niveles de citrulina y arginina, evidenciándose en diversos estudios que los pacientes con resección intestinal amplia^{48, 49, 51, 59, 315} y atrofia intestinal presentan cifras de citrulina y arginina disminuidas⁶, así como los pacientes que reciben radiación abdominal⁵⁰, secundarias a la pérdida de masa enterocitaria por el daño directo y no secundaria a la respuesta inflamatoria que genera la patología de base y factores estresantes desencadenantes.

Los pacientes ingresados con hipertensión pulmonar también fueron excluidos, ya que la implicación de L-arginina en la vía metabólica del NO se encuentra fuertemente asociada, por lo que puede alterar los niveles de arginina, y se encuentra influenciada por polimorfismos de la carbamilfosfato sintetasa (CPS) y la activación de eNOS³¹⁶.

5.3. GRUPO CONTROL

Formado por 51 niños sanos, no hospitalizados, sin enfermedad conocida y sin infección activa en el mes anterior. Presentan una edad media 4.9 ± 2.4 años.

Son niños que no presentaban afectación intestinal ni hepática, así como con la función renal normal (media de creatinina de 0,38 mg/dL) y una cuantificación normal de grasa fecal en una muestra de 24 horas 2,2g/24h, con ajuste de edad por métodos directos.

Existe la posibilidad de sesgo por no encontrarse pareados casos y controles.

Analizando los controles sanos, las cifras de arginina y citrulina eran similares en los lactantes menores de un año (eran menor número) que en los mayores. Si bien, es un grupo de edad homogénea en torno a la edad preescolar como el de nuestros pacientes, sin diferencias estadísticamente significativas con el grupo de estudio.

5.4. EPIDEMIOLOGÍA

En nuestro estudio finalmente se incluyeron un total de 74 pacientes, sin encontrar diferencia significativa en el sexo, igual que ocurre en los estudios realizados en pacientes adultos con enfermedad crítica, por Piton²⁷⁷ y Ware²⁸⁴, y en un estudio reciente realizado en pacientes pediátricos con sepsis²⁷⁹. En el estudio realizado por Luiking y colaboradores²⁷², si encontraron predominio de varones en el subgrupo de pacientes con sepsis, sin encontrar tampoco diferencias en el grupo de pacientes ingresados en UCI.

Existe un claro predominio en nuestra serie de pacientes caucásicos. También en el estudio de Ware y colaboradores²⁸⁴, del Critical Care, existe un predominio de la raza caucásica 73%, 76.7% en la serie de Weiss²⁷⁹ realizada en pacientes pediátricos con sepsis y 90% en el estudio pediátrico de Smith y colaboradores¹⁰⁸, realizada en pacientes intervenidos de cirugía cardiaca.

Del total de nuestros pacientes, 14 (18.9%) son de origen magrebí, debido a que nuestra unidad es centro de referencia del Hospital Comarcal de Melilla, y un porcentaje no despreciable de pacientes que recibimos provienen de dicha región. No encontramos diferencias entre las cifras de arginina y citrulina en estos pacientes con respecto al resto, observando que la mayoría de estos pacientes presentan un estado de malnutrición basal, influenciada por las condiciones socio-económicas y culturales en las que se encuentran, recibiendo dieta hipoproteica e hipocalórica. Lo que coincide con la literatura, donde estudios realizados en pacientes con anorexia, a los que se ha

comparado con controles sanos, la cifra de citrulina es similar, por lo que la escasa ingesta y la malnutrición secundaria por la baja ingesta proteico-calórica no expresarían una reducción de la masa enterocitaria ⁴⁹.

La media de edad de los pacientes es de $39,3 \pm 45,5$ meses, pero como mejor medida de tendencia central, al no ser una distribución normal por tener muchos lactantes, se expresa la mediana de edad, que es de 13,5 meses, equivalente a 1,13 años (RIQ 0,48-5,14). Es el estudio con edad media más baja descrito en la revisión bibliografía de pacientes críticos, solo se encuentra un estudio de cinética de citrulina y arginina en pacientes pediátricos con sepsis ¹⁶, en los que los pacientes son de mayor edad 11 ± 4 años ($x \pm SD$), pero que se podrían correlacionar mejor los valores obtenidos respecto a los adultos jóvenes o estudio realizados en adultos. También en la serie de van Waardenburg²⁷⁸ la media de edad fue superior, divide a la población a estudio en 3 grupos: afectos de VRS ($2,2 \pm 0,7$ años), ingresos por accidentes o cirugía ($10,3 \pm 1,4$ años) y el grupo con sepsis ($2,7 \pm 0,6$ años). Weiss y colaboradores²⁷⁹, en un estudio reciente realizado en pacientes pediátricos con sepsis tienen una mediana de edad de 7.2 años (RIQ 2.4-15.4).

Los pacientes que tienen evolución desfavorable tienen una media de edad inferior ($22,79 \pm 9,59$ meses vs. $46,35 \pm 7,12$ meses), con más tasa de complicaciones infecciosas, probablemente porque la respuesta inflamatoria en estos pacientes es más severa y presentan una peor respuesta inmunitaria frente a la agresión, por inmadurez de la respuesta adquirida, con disfunción leucocitaria y una mayor vulnerabilidad frente las agresiones.

La mediana de duración del ingreso en UCIP en nuestra serie fue de 5.5 días, con una mayor estancia de los pacientes con evolución desfavorable (18 vs. 3 días). Estancias inferiores a las que encontramos descritas por Weiss²⁷⁹, con una mediana de estancia en UCIP de 11 días (RIQ 8-18) en su serie de pacientes sépticos, y en el estudio realizado en adultos de pacientes críticos por Piton²⁷⁷, en 2010, con una estancia media en UCI de 10 ± 9 días, y estancia hospitalaria global de 26 ± 24 días, siendo en el grupo de evolución desfavorable la estancia en UCI inferior (6 ± 7 días), lo que indica una mortalidad muy precoz de los pacientes, frente a 11 ± 10 días de ingreso en UCI de los pacientes supervivientes a los 28 días.

5.5. CINÉTICA DE LOS NIVELES DE ARGININA Y CITRULINA

El descenso en los niveles plasmáticos de aminoácidos en la inflamación se atribuye, en gran parte, por el catabolismo acelerado con incremento de la degradación proteica, y a un aumento del aclaramiento metabólico de los aminoácidos liberados. Probablemente se lleve a cabo el hígado para la síntesis de proteínas hepáticas, la gluconeogénesis y la síntesis de urea.

Todo este hipercatabolismo desencadenado por el fenómeno de respuesta inflamatoria sistémica y activación del sistema inmune, generando liberación de citoquinas proinflamatorias que estimulan e inducen las diversas enzimas de las rutas metabólicas hacia la proteólisis. El equilibrio de este trastorno en la homeostasis se llevará a cabo si el sistema inmune, y el síndrome de respuesta antiinflamatoria sistémica (CARS) se pone en marcha, liberando citoquinas antiinflamatorias que contengan al SIRS, apaciguando la respuesta local y sistémica generada ante una agresión, con resolución del problema hacia la fibrosis y cicatrización de la lesión. De lo contrario, se produce una hiperrespuesta exagerada con una suelta masiva de citoquinas que perpetúan la situación, degenerando en SIRS severo que puede conducir finalmente a la disfunción de órganos (SDMO) y exitus.

En nuestra serie, los niveles plasmáticos de citrulina descendieron rápidamente y se situaron significativamente por debajo de los niveles normales (grupo de control) a las 12 horas (se suelen considerar normales si se encuentran entre 18 y 35 $\mu\text{mol/L}$), manteniendo niveles menores que los controles hasta el

séptimo día. La arginina ya había disminuido en las primeras horas en comparación con los controles, y aumentó con mayor rapidez (tercer día). En un estudio similar realizado por Piton G y colaboradores²⁷⁷, en 2010, en Intensive Care Medicine, realizado en adultos en un estudio unicéntrico de pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos, en el que estudian cifras de citrulina y arginina al ingreso, 12 horas, 24 horas, 48 horas y 7º día de ingreso, encuentran que las cifras de citrulina ya descienden el primer día de 18.8 $\mu\text{mol/L}$ a 13.5 $\mu\text{mol/L}$. Descenso de citrulina en plasma a las 24 horas asociado con niveles bajos de glutamina (p 0.01) y arginina (p 0.04). La arginina como sustrato principal de 2 enzimas como son la arginasa y la NOS, ante procesos patológicos, en los que se induce la NOS2 o iNOS, activada por citoquinas proinflamatorias y endotoxinas, aumenta la producción de NO durante el estrés, de hecho la arginina es el principal precursor de NO. Molécula de vida media ultracorta, pero que es ubicua y con gran número de efectos sobre muchos tejidos del organismo, principalmente ser un potente vasodilatador de la circulación sistémica y esplácnica, de forma que regula la presión arterial, conserva perfusión de órganos, así como la interacción del endotelio vascular con las plaquetas y leucocitos plasmáticos. Además de estar implicado en la neurotransmisión y el sistema inmunológico¹⁶.

Encontramos en nuestros pacientes niveles basales de arginina más bajos que los descritos en los estudios realizados en pacientes críticos pediátricos²⁷⁹ y adultos^{50, 273, 280}, y niveles de citrulina más elevados, también cuantificados con espectrometría de tandem masas. Weiss y colaboradores²⁷⁹ encuentran en los pacientes sépticos cifras de arginina una mediana de 10 (RIQ 7-20 $\mu\text{mol/L}$) y de

citrulina una mediana de 8 (RIQ 4-10 $\mu\text{mol/L}$). En los estudios realizados en pacientes críticos adultos, sin sepsis, encontramos cifras de citrulina similares a nuestro estudio, con valores de citrulina que oscilan de 19 a $29 \pm 2-3 \mu\text{mol/L}$ ($x \pm \text{DS}$), realizados en plasma por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ^{17, 52, 89}. Por otro lado, sí que se encuentran cifras inferiores en los estudios realizados en pacientes críticos sépticos adultos ^{89, 317}, traumatológicos sin sepsis ³¹⁸ y quemados ³¹⁹, con cifras de citrulina inferiores a 15 $\mu\text{mol/L}$. Incluso en un estudio amplio realizado en 114 pacientes críticos adultos sin sepsis ³²⁰, encuentran cifras de citrulina $< 15 \mu\text{mol/L}$. En los últimos estudios descritos no existe grupo control disponible con el que comparar las cifras de citrulina. Posiblemente encontremos diferencias en las cifras de citrulina respecto al estudio pediátrico de Weiss ²⁷⁹, porque la citrulina en los pacientes con sepsis sufre un descenso más marcado, comparado con controles febriles incluso en controles sanos, secundario a una mayor activación de la respuesta inflamatoria sistémica, con degradación y rotura proteica incrementada, disminución de la síntesis del NO por la escasa biodisponibilidad de la arginina; comprometiendo la microcirculación local y la perfusión de órganos esplácnicos, con una mayor afectación intestinal por hipoperfusión, descrito en el estudio de Betue ²⁸¹ (figura 16) y Peters ³²¹.

Es por todo lo anterior, por lo que la citrulina sería un parámetro de valoración de disfunción intestinal, en pacientes críticos, sobre todo los afectos de sepsis. Sin poder encontrar explicación lógica a las diferencias encontradas en los niveles de arginina más bajos en nuestra serie, con respecto a los descritos en los diferentes estudios realizados en pacientes críticos pediátricos ²⁷⁹ y adultos.

Si bien, en todos ellos se encontraban disminuidos respecto a los controles de forma significativa ^{272, 273, 280} (tabla 12). Una posible hipótesis es las variaciones por cuestiones técnicas de la determinación, aunque los controles sanos se realizan bajo el mismo procesamiento y extracción de la muestra, sin presentar diferencias con los valores de arginina descritos en población sana ni con los pacientes controles utilizados en los estudios reflejados previamente ^{17, 52, 317}. Por todo ello, debemos considerar como real la bajada de arginina más allá de la técnica de medición empleada, siendo una explicación plausible la del aumento del catabolismo que ocurre en el proceso de SIRS. Los cambios endocrinos, paracrinos y autocrinos del SIRS inducen un espectro de alteraciones metabólicas en la que se ve implicado todo el metabolismo intermediario con hipermetabolismo, hipercatabolismo, incremento de la proteólisis, con aumento de la síntesis de proteínas reactantes de fase aguda, menor síntesis hepática de proteínas viscerales, con depleción de los aminoácidos esenciales y semiesenciales reseñados previamente. Aumento de la neoglucogénesis, intolerancia al aporte de glucosa, y perturbación del metabolismo lipídico con hipocolesterolemia e hipertrigliceridemia ³²².

Esta respuesta biológica a la agresión, de carácter defensivo, precisa ser modulada para evitar la lesión secuencia a nivel de los diversos órganos y degenerar en el SDMO. Algunos de los mecanismos de control se desencadenan inmediatamente, pero otros son dependientes de los aportes o carencias de algunos sustratos consumidos durante esta situación hipercatabólica establecida, donde la inmunonutrición presenta un eslabón importante.

Los niveles séricos normales de citrulina y arginina en niños sanos de uno a 48 meses varían entre los 4 y los 52 $\mu\text{mol/L}$ y entre los 14 y los 147 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente según los estudios publicados³²³, cifras muy similares a las obtenidas en nuestro grupo de control.

La glutamina es la mayor fuente de energía en los enterocitos, y otro de sus destinos metabólicos es su conversión a citrulina. Como el SRIS afecta potencialmente a la función e integridad intestinales, puede alterar el metabolismo de la glutamina y llevar a una reducción en la producción de citrulina. Nuestros resultados muestran que los pacientes con SRIS presentan niveles de citrulina sérica inferiores, algo que en parte podría deberse a un defecto en la conversión metabólica de la glutamina a citrulina, con captación reducida de glutamina por parte de los enterocitos pero aumentada en el hígado, o desviación de la glutamina a otras rutas metabólicas.

Un estudio publicado por Kao y colaboradores²⁸⁰, en la revista Clinical Science en 2009, asocia un aumento de la proteólisis en la sepsis, con una concentración plasmática de arginina disminuida, lo que indicaría una síntesis *de novo* insuficiente causada por una la disminución en la producción de citrulina. Otros estudios en adultos han demostrado que un estado grave de inflamación aumenta considerablemente la degradación de proteínas y la actividad de la arginasa, reduciendo la producción de citrulina y la síntesis *de novo* de arginina^{271, 272}. Estas alteraciones metabólicas limitan considerablemente la disponibilidad de la arginina, sobre todo para la

producción de NO por parte de la enzima NOS3. Todo ello explica por qué la producción de citrulina, como fuente de producción *de novo* de arginina, se puede considerar una ruta metabólica importante y uno de los parámetros bioquímicos principales a evaluar al comienzo del estudio. Por un lado, la isquemia del intestino delgado se asocia a una reducción aguda de la masa enterocitaria y una pérdida de función de la barrera intestinal por el levantamiento epitelial de las vellosidades. Por otro, el SRIS y la sepsis podrían asociarse a una disfunción aguda de los enterocitos, con alteración en la barrera intestinal, aumento de la permeabilidad del intestino y translocación bacteriana, sin que exista una reducción de la masa enterocitaria ⁴⁵. Por tanto, el intestino juega un papel fundamental durante la progresión de la sepsis y el síndrome de disfunción multiorgánica. La enfermedad crítica altera la integridad de la mucosa intestinal, por el incremento de la apoptosis epitelial y el descenso de la proliferación del mismo. La microbiota endógena que existe habitualmente en simbiosis con el epitelio intestinal, ante severos insultos se altera esta relación con inducción de factores de virulencia en los microorganismos, que puede perpetuar el empeoramiento clínico de la enfermedad crítica y la respuesta inflamatoria ³²⁴.

Hemos comparado los niveles de citrulina y arginina en pacientes quirúrgicos programados y en pacientes con patologías médicas no quirúrgicas, y encontramos nulas diferencias estadísticamente significativas, pese a niveles algo más bajos de citrulina en los primeros.

5.6. VALOR PRONÓSTICO EN PACIENTES CRÍTICOS

El PRISM II score medio de la muestra fue el 12.9%, pero siendo la mediana del 3% (RIQ 1.7-14.5). Para valorar la evolución de nuestros pacientes respecto a la respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) desencadenada por la agresión o situación clínica que provoca su ingreso en UCIP, y poder correlacionarlo con la cinética y niveles de arginina y citrulina, se dividen nuestros pacientes en dos grupos:

1. Evolución favorable: no desarrolla disfunción de órganos.
2. Evolución desfavorable: cuando se diagnosticó al paciente de disfunción pulmonar, renal o neurológica, si tienen necesidad de dos o más drogas vasoactivas (por inestabilidad hemodinámica) o si finalmente se produjo fallecimiento.

De los pacientes incluidos en el estudio, 25 presentaron evolución desfavorable, con un PRISM-II medio superior (tabla 23). En los estudios pediátricos descritos se utilizan como escalas de mortalidad el PIM-2 y de grado de disfunción de órganos la escala PELOD ²⁷⁹. Solamente el estudio de Van Waardenburg ²⁷⁸, realizado en población pediátrica, refleja el PRISM score con resultados similares a nuestra serie, en los pacientes afectos de infección respiratoria vírica ($16 \pm 2.8\%$) y en los postoperados de cirugía ($12 \pm 2\%$), con cifras superiores en los pacientes con sepsis ($20.2 \pm 2.2\%$), como ocurre en nuestro subgrupo de evolución desfavorable. Sin embargo en estudios

realizados en adultos, toman como escalas de gravedad la escala APACHE-II y la escala de SOFA para determinar la gravedad de los pacientes, el grado de respuesta inflamatoria sistémica y de disfunción multiorgánica que presentan al ingreso ^{270, 284, 325}. No pudiendo comparar resultados con nuestro estudio por no existir unificación del uso de escalas de valoración de riesgo de mortalidad y de disfunción multiorgánica.

El uso de *ventilación mecánica* es elevado en nuestra serie, produciéndose retirada precoz en las primeras horas de ingreso, gran parte de los pacientes antes de las 24 horas de ingreso (gráfico 5 y 7). Dato a tener en cuenta ya que la mayoría de nuestros pacientes procedían intubados de quirófano tras cirugía programada o urgente. Si encontramos que las horas de ventilación mecánica fueron superiores en el grupo de casos con evolución desfavorable (gráfico 6 y tabla 23). Datos comparables encontramos en las series de Piton ²⁷⁷, del 2010, con un 94.02% de necesidad de ventilación mecánica y un 69.49% en el estudio de Van Waardenburg ²⁷⁸, sin tener información sobre la duración de la misma.

Recibieron *antibioterapia* la mitad de los pacientes (26.5% como tratamiento empírico o dirigido a gérmenes conocidos, y un 20.4%, como profilaxis quirúrgica; ver gráfico 8 y tabla 17). Similares a los descritos en la bibliografía, en el estudio de Piton de 2010 ²⁷⁷, un 49.25% de los pacientes recibieron antibióticos, y en el estudio de 2013 ³²⁵ recibieron antibioterapia un 57% de los pacientes. En los estudios realizados en pacientes críticos adultos con sepsis o shock séptico, la necesidad de antibioterapia fue muy superior, por encontrarse

cursando infección en el momento de ingreso en la unidad de cuidados intensivos.

En cuanto a la necesidad de *soporte vasoactivo*, encontramos discordancia de nuestros pacientes (gráfico 9), con el resto. En el estudio pediátrico de van Waardenburg²⁷⁸ en el que utilizan DVA sólo un 22.03%, siendo superior en el subgrupo de pacientes con sepsis. Muy superior fue la necesidad de utilizar soporte vasoactivo en los estudios realizados en pacientes adultos con shock séptico o sepsis, por presentar hipotensión arterial la gran mayoría de los pacientes a pesar de la expansión volumétrica, con un 71% de necesidad de DVA en el estudio descrito por Gough y colaboradores²⁷⁰. Y en el estudio de Piton²⁷⁷, en 2010, realizado en pacientes críticos adultos la necesidad de soporte vasoactivo con catecolaminas fue de un 71.64%.

La principal complicación que encontramos en nuestros pacientes es la inestabilidad hemodinámica, tal vez por este motivo tengamos cifras más elevadas del uso de DVA que los estudios descritos en la bibliografía, posiblemente debido a que un 66.2% de los pacientes ingresados provienen tras postoperatorio de cirugía cardiovascular; seguido de la disfunción respiratoria y disfunción renal. Menos frecuente fue la afectación neurológica y sepsis nosocomial (gráfico 10). Las complicaciones descritas en estudios realizados en pacientes adultos fueron superiores, debido probablemente a la edad y las comorbilidades asociadas previas al ingreso en UCI, que hacen más factible su agravamiento ante situaciones de estrés, trauma o cirugía, generando una respuesta inflamatoria más severa y desencadenado en

situación de SDMO. Encontrando mayor insuficiencia renal, insuficiencia hepática, infección nosocomial y coagulopatía que en la edad pediátrica^{277, 284}. Gough y colaboradores²⁷⁰, en los pacientes adultos con sepsis, encuentran disfunción de órganos marcada, presentando afectación de 2 o más órganos el 83% de los pacientes.

Solamente un paciente falleció durante el seguimiento (incluido en el grupo de pacientes de evolución desfavorable). *Mortalidad* muy inferior a la descrita por otros autores, si bien es cierto, que el SDMO supone una mayor mortalidad en los pacientes adultos respecto a los pediátricos, encontrando en la serie de Piton²⁷⁷, una mortalidad a los 28 días del 34.33%, Ware y colaboradores²⁸⁴ describen un 36% de mortalidad global a los 28 días y 39% en el subgrupo de pacientes con SDRA, y en el estudio de Luiking²⁷², del 2009, una mortalidad a los 28 días global de los pacientes ingresados en UCI del 29.41%, y del 50% en el subgrupo de los pacientes con sepsis. Gough²⁷⁰ en el estudio realizado en pacientes adultos con sepsis describe una mortalidad del 28.44%. Van Waardenburg²⁷⁸ en el estudio realizado en pacientes pediátricos no describen datos sobre la mortalidad, y Weiss²⁷⁹ en pacientes sépticos pediátricos, refiere una mortalidad del 6.7%.

Se analizan los *parámetros inflamatorios* para cuantificar la respuesta inflamatoria sistémica (tabla 19 y gráfico 11). En los reactantes de fase aguda, la PCT se encuentra aumentada a las horas de ingreso con pico máximo a las 24 horas y se mantiene elevada hasta el tercer día que comienza a disminuir. La PCR empieza a aumentar a las 24 horas, con un pico máximo al tercer día y

no es hasta el séptimo día de ingreso cuando comienza a disminuir. Encontramos que el subgrupo de pacientes con peor evolución presentó cifras de PCT más elevadas respecto a los que tienen evolución favorales (tabla 22). Lo mismo ocurre con la PCR al tercer día de ingreso, existe mayor aumento significativo de PCR en el grupo de evolución desfavorable comparado con los pacientes con evolución favorable. Lo que indica una mayor respuesta inflamatoria sistémica con aumento de RFA en los pacientes con peor evolución, y se correlacionan con menores cifras de arginina y citrulina en este subgrupo como veremos a continuación (tabla 22). Similares resultados encontramos en el estudio de Van Waadenburg y colaboradores ²⁷⁸, realizado en pacientes críticos pediátricos (pacientes afectos de infección vírica respiratoria presentaban una PCR media de 21 ± 5 mg/L ($x \pm DS$), ingresos por cirugía/trauma 117 ± 22 mg/L, sepsis 242 ± 24 mg/L; $p < 0.001$). Y en el estudio de Luiking²⁷², realizado en adultos, el grupo de pacientes utilizados como control presentaban cifras de 1.4 ± 1.8 mg/L ($x \pm DS$), los pacientes de UCI sin sepsis una media de PCR 85 ± 69 mg/L, y en los pacientes de UCI con sepsis 219 ± 123 mg/L con significación estadística entre los 2 últimos grupos comparados con el grupo control ($p < 0.001$). Solamente encontramos en la literatura, realizado en la edad pediátrica, el estudio de van Waanderburg²⁷⁸, que correlaciona las cifras de arginina y citrulina bajas con el grado de inflamación, medido como determinación de PCR. Basada la correlación existente de estos hallazgos en estudios previos realizados en edad pediátrica con otras enfermedades de la infancia asociadas a gran grado de inflamación, como ocurre en la enterocolitis necrotizante del prematuro ³²⁶, malaria cerebral

³²⁷, enfermedad de células falciformes durante las crisis vasooclusivas ³²⁸ y durante la exacerbaciones del asma ³²⁹.

No existen descritos en la literatura resultados comparables del descenso de aminoácidos con las cifras de procalcitonina (PCT) ni en población pediátrica ni en adultos, por lo que es una gran aportación debido a la precocidad de la elevación de las cifras de PCT en las primeras horas, indicando severidad de la inflamación, respuesta inflamatoria y gravedad del proceso desde el ingreso en la unidad, y la fuerte correlación inversamente proporcional que existe entre el incremento de PCT y los bajos niveles de arginina y citrulina.

Mayores descensos de la arginina en las primeras 12 horas del ingreso se correlacionan con un número mayor de complicaciones (gráfico 18 y tabla 22), estancias más largas en la UCIP (gráfico 19), mayor duración de VM (gráfico 20) y una elevación superior de los niveles de reactantes de fase aguda como la PCR y la PCT al tercer día (gráficos 37 y 40). Además, el nivel de citrulina sérica que continúa disminuido el séptimo día se asocia a la elevación de la PCR y la PCT a las 24 horas (gráficos 31 y 33), una mayor duración de la VM y la estancia en la UCIP (gráficos 25 y 26), con una mayor incidencia de complicaciones (gráfico 17 y tabla 22).

En discordancia con los hallazgos encontrados por van Waardenburg²⁷⁸, en American Journal of Clinical Nutrition, donde encontraron que las concentraciones plasmáticas bajas de arginina y citrulina en la fase aguda de la enfermedad crítica en niños, se normalizaron durante la fase recuperación y se

producía incremento de las cifras en la determinación de aminoácidos realizados al 7º día. En nuestra serie encontramos que dicho ascenso es menos marcado, que al 7º día aunque se encuentran en aumento, persisten disminuidos los niveles de citrulina sin llegar a normalizarse, y los niveles de arginina empiezan a incrementarse a partir del tercer día, sin llegar a alcanzar las cifras del grupo control en la determinación realizada al 7º día. Probablemente estos hallazgos sean derivados de que las cifras de citrulina y arginina basales de nuestros pacientes críticos, sean más bajas que las descritas en el estudio de van Waardenburg²⁷⁸. Si bien, no creemos que sea por problema en la determinación de la muestra, porque en los casos control se realizó el mismo procesamiento de la muestra y método de extracción, sin encontrar diferencias de los niveles plasmáticos de citrulina y arginina en los pacientes sanos con los descritos en la bibliografía.

Todos estos datos indican que la inflamación induce cambios en el perfil de aminoácidos, mediados por citoquinas inflamatorias que se liberan durante la fase de respuesta inflamatoria frente a la agresión o estrés desencadenado en el paciente, y que estos cambios en el metabolismo de arginina y citrulina son más profundos y pronunciados cuando la inflamación es más severa. Por esto, en los estudios realizados en pacientes con sepsis y SRIS existe una mayor depleción de estos aminoácidos, con una relación inversa con las cifras de RFA (PCR).

Encontramos un aumento significativo del ácido úrico en pacientes que tenían una evolución desfavorable frente a los que presentan evolución favorable. La

isquemia-reperfusión en el SRIS se asocia a la activación del estrés oxidativo y producción de radicales libres. Durante la fase de isquemia se consumen las reservas de ATP con formación de AMP, luego adenosina, inosina e hipoxantina y se induce también la enzima xantino oxidasa (XO) endotelial a partir de la xantino deshidrogenasa. Durante la reperfusión, con la llegada del oxígeno, la XO es capaz de transformar hipoxantina + O₂ en xantina + ácido úrico + O₂⁻. En este escenario los antioxidantes endógenos, particularmente aquellos intracelulares, se consumen rápidamente. El ácido úrico se transforma en un marcador de daño oxidativo por este mecanismo ²⁹¹, por este motivo se encuentra aumentado en los pacientes que presentan una respuesta inflamatoria más severa, con mayor grado de SDMO y peor evolución.

La albúmina se encuentra más disminuida en el grupo de evolución desfavorable, respecto a los que evolucionan bien, pero sin presentar significación estadística salvo al ingreso. Sin embargo, en los estudios realizados en adultos si se objetivó una disminución significativa de los pacientes afectos de sepsis respecto al grupo de pacientes ingresados en UCI por otra patología, posiblemente por la alteración de la permeabilidad vascular marcada que existe durante la sepsis, con paso de albúmina al intersticio, originando una depleción plasmática mayor ²⁷².

En la serie sólo hay dos casos con insuficiencia renal, sin poder aportar por ello diferencias estadísticamente significativa en cuanto a los niveles de citrulina o arginina, lo cual hubiera sido menor descenso de citrulina y mayor bajada de la

segunda. La disfunción renal definida como aumento de creatinina en un 20% respecto al valor basal ha sido calculada en los pacientes operados de forma programada y no ha generado cambios en las cifras de citrulina ni de arginina.

Hay que seguir estudiando la influencia del SRIS y la insuficiencia renal aguda en la concentración plasmática de citrulina, y el valor de dicha concentración como indicador de insuficiencia intestinal en pacientes críticamente enfermos, ya que hay estudios en los que se objetivan aumento de los niveles de citrulina por acúmulo renal y disminución del aclaramiento de la citrulina^{54, 330}. Así como una asociación con el aumento de las cifras de tensión arterial y tendencia a hipertensión arterial en los pacientes con insuficiencia renal crónica en estadios avanzados (estadio 2-3) por la influencia en la regulación a nivel del endotelio hacia la vasoconstricción y su implicación con el NO^{331, 332}. Otro hecho que avala la importancia del intestino, es que la disminución de la función renal no afecta a la producción *de novo* de arginina, a pesar de que el riñón es el principal lugar de producción *de novo* de la citrulina³³⁰. Ware y colaboradores²⁸⁴ tampoco encuentran diferencia entre las cifras de citrulina y arginina en pacientes con SDRA que presentan insuficiencia renal. Estas alteraciones metabólicas contribuyen a la reducción de la disponibilidad de la citrulina y la arginina, y ofrecen posibilidades de intervención para restaurar el metabolismo de la arginina en el SRIS. Por tanto, en los pacientes con insuficiencia renal con CLCr < 50ml/min, podemos encontrar una limitación para aplicar las cifras de citrulina como un marcador de la función intestinal. Sin embargo, si encontramos cifras inferiores a 20µmol/L, es compatible con disminución de la

producción de citrulina por disfunción de los enterocitos, incluso en presencia de insuficiencia renal³²¹.

5.7. ESTIMADORES DE RIESGO Y VALORACIÓN DE MARCADORES DE ENFERMEDAD

Aunque la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos han sido usados por mucho tiempo como indicadores de la precisión de una prueba diagnóstica, existen métodos modernos, como las curvas de operación característica del receptor (COR), la regresión logística y la razón de verosimilitud, que son considerados indicadores más robustos, pues superan muchas de las limitaciones de los índices tradicionales.

El área bajo la curva COR es el mejor indicador global de la precisión de una prueba diagnóstica, como son los marcadores aminoacídicos en nuestro trabajo. La curva COR hace factible expresar el desempeño de la prueba mediante un número simple.

Esta área es siempre adecuada si es mayor o igual a 0.5. El rango de valores se mueve entre 1 (discriminación perfecta) y 0.5 (no hay diferencias en la distribución de los valores de la prueba entre los 2 grupos). La interpretación del valor del área sería del modo siguiente: un área de 0.65, como ocurre en la citrulina a los 3 días, significa que un individuo seleccionado aleatoriamente tiene mala evolución en el 65 % de los casos si tiene citrulina de 10.7 mmol/L o menos (tabla 24).

El uso de las curvas COR en la evaluación de estas pruebas analíticas de aminoácidos presenta las siguientes ventajas:

1. Son una representación fácilmente comprensible de la capacidad de discriminación de la analítica en todo el rango de puntos de corte.
2. Son simples, gráficas y fáciles de interpretar visualmente.
3. No requieren un nivel de decisión particular porque está incluido todo el espectro de puntos de corte y sólo hay que analizar el punto que aporte mejor sensibilidad sin perder especificidad.
4. Son independientes de la prevalencia, ya que la sensibilidad y la especificidad se obtienen en distintos subgrupos.

Por tanto, no es necesario tener cuidado para obtener muestras con prevalencia representativa de la población. Las curvas COR en nuestro caso son índices de la exactitud diagnóstica y proporcionan un criterio unificador en el proceso de evaluación de los aminoácidos. Las pruebas diagnósticas son utilizadas para ayudar a responder preguntas en relación con la atención de los pacientes.

Para la citrulina en su capacidad de predecir mala evolución global del paciente, el mejor punto de corte en cuanto a sensibilidad (70%) y especificidad (70%) es tener citrulina al tercer día por debajo de 10.7 $\mu\text{mol/L}$. Resultados

similares encontramos en el estudio de Piton y colaboradores³²⁵, del 2013, estableciendo como punto de corte 12.2 $\mu\text{mol/L}$, y consideran que cifras de citrulina inferiores a 10 $\mu\text{mol/L}$ son representativas de fracaso intestinal en pacientes críticos.

Para la arginina sería la de las 12 horas por debajo de 3.05 (sensibilidad 60% y especificidad de 47%) y para la arginina por debajo de 4.07 al tercer día (sensibilidad 60% y especificidad de 47%), tabla 24. No existen estudios que realicen puntos de corte de arginina que exprese sensibilidad y especificidad máxima en pacientes críticos.

El *Odds ratio* (OR) que es un concepto ampliamente utilizado en la investigación biomédica se ha traducido de múltiples formas al español: razón de oportunidades, razón de posibilidades, oportunidad relativa, razón de probabilidades o razón de productos cruzados, e incluso algo tan extraño como «razón de momios». Una buena opción que sirve para evitar confusiones y se ha hecho mayoritaria es incorporar directamente el término inglés y decir siempre “*Odds ratio*”.

Para poder interpretar una OR es necesario siempre tener en cuenta cuál es el factor o variable predictora que se estudia y cuál es el resultado o desenlace. Aquí el factor es el resultado del aminoácido correspondiente, y la respuesta o desenlace es la buena o mala evolución.

En nuestro trabajo, se aprecia que tener una arginina a las 12 horas inferior a 3.58 $\mu\text{mol/L}$ hace que sea 3.9 veces más probable tener evolución desfavorable y tener una arginina a los 3 días inferior a 2.7 $\mu\text{mol/L}$ hace que sea 11 veces más probable tener ventilación mecánica mayor de 6 horas. Así como las cifras de citrulina inferiores a 12.69 $\mu\text{mol/L}$ a las 12 horas de ingreso con un OR de 8.7 veces mayor de tener VM más de 6 horas (tabla 25). En los estudios descritos, solamente Piton³²⁵ hace referencia al OR de mortalidad a los 28 días de ingreso, con un OR de 8.7 cuando las cifras de citrulina son inferiores a 10 $\mu\text{mol/L}$ a las 24 horas, no pudiendo ser comparado con nuestra serie por la escasa mortalidad, sólo un paciente.

5.8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Según nuestros datos, la suplementación con citrulina, como precursor de la arginina, puede mejorar la disponibilidad de la citrulina y la arginina en niños críticamente enfermos y contribuir a reducir la disminución temprana de los niveles de arginina a las 12 horas, que se correlaciona con una evolución peor. No obstante, se requieren más estudios para determinar si la citrulina exógena puede realmente apoyar el metabolismo de la arginina en el SRIS ^{138, 264}.

Existen estudios recientes ^{110, 113, 115} que apoyan el aporte de glutamina como principal precursor de la citrulina, con necesidad de estudios multicéntricos y en edad pediátrica que cumplan criterios uniformes en cuanto a los inmunonutrientes que aportar en el paciente crítico, a que dosis, bajo que condiciones clínicas, cuando iniciar el tratamiento y la duración del mismo.

No existen datos claros en si utilizar suplementos en los pacientes con sepsis, pero si está clara la indicación en pacientes críticos adultos perioperatoria ^{113, 114, 129, 155} y con quemaduras extensas ¹¹⁰, en los que aunque no exista evidencia de la disminución de la mortalidad, si se evidencia un descenso en la morbilidad, con disminución del número de días de ventilación mecánica, disminución del número de infecciones nosocomiales y asociadas a la cirugía, con una reducción de días de estancia hospitalaria y secundariamente de los costes ^{105, 106}. En pacientes postoperatorios pediátricos de cirugía cardiovascular, demostraron que son fármacos seguros sin repercusión hemodinámica, y que los suplementos podrían disminuir la incidencia de

hipertensión pulmonar en el postoperatorio de estos pacientes ¹⁰⁸. Incluso hay estudios como el de Briassoulis y cols, en 2005, que demuestran un descenso de la mortalidad global a largo plazo ¹⁰⁷.

Son muchos los estudios que objetivaron la depleción de aminoácidos esenciales y semiesenciales como la citrulina y arginina, debido a la situación de catabolismo, proteólisis y liberación de radicales libres, ante procesos que generan situaciones estresantes, sepsis o tras una agresión sea por accidente o cirugía, que incrementan los requerimientos nutricionales. Los suplementos con glutamina, como precursor de la citrulina, y arginina disminuyen la morbilidad en pacientes críticos, con descenso en la tasa de infecciones derivadas de la cirugía, como son infecciones de herida quirúrgica y abscesos intraabdominales, como las infecciones nosocomiales, a las que estos pacientes son más susceptibles debido a la situación de inmunosupresión que se encuentran. También disminuyen los días de estancia hospitalaria y secundariamente, el gasto sanitario. No evidenciando descenso de la mortalidad en pacientes críticos ni beneficios en pacientes sépticos. Necesitando realizar estudios en pediatría multicéntricos, aleatorizados y controlados con unificación de criterios respecto a los pacientes subsidiarios de beneficiarse de esta suplementación en la dieta.

La desnutrición tiene un papel fundamental en la aparición de complicaciones en el paciente crítico, ya que entorpece los mecanismos de la respuesta inmune y se modifica la respuesta inflamatoria, con lo que los procesos de síntesis, de regeneración de tejidos y la lucha contra la infección se ven

alterados. Infección y desnutrición se encuentran íntimamente relacionadas, y cada una por separado, pueden inducir o potenciar a la otra. De esta forma, las intervenciones en cada uno de los factores tendrán repercusión en la evolución de nuestros pacientes.

Los procesos infecciosos continúan siendo un problema significativo tanto en pacientes quirúrgicos, como médicos críticamente enfermos. Se estima que entre un 10 a un 15% de los pacientes hospitalizados presentarán una infección de tipo nosocomial. En este tipo de situación, obviamente, se incrementa los días de estancia hospitalaria, la morbimortalidad y los costes de atención de estos pacientes.

La morbilidad y la mortalidad de los pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos ha disminuido gracias no sólo a las mejoras de reanimación, soporte y la utilización de antibióticos, sino también, y especialmente, al mejor control metabólico y soporte nutricional que contrarresta de manera importante los graves deterioros nutricionales de estos pacientes. La nutrición por vía enteral, en etapas tempranas, ha logrado reducir la mortalidad en forma importante y aunque los estudios existentes no muestran resultados uniformes, el uso de inmunonutrientes podría estar recomendado.

Los pacientes traumatizados se encuentran en un estado de inmunosupresión con disminución en la producción de anticuerpos, la función de las células fagocíticas y los niveles de complemento. Además se afecta la respuesta

mediada por linfocitos T de manera adversa con la consiguiente disminución citoquinas y mayor susceptibilidad a las infecciones. El soporte nutricional con fórmulas especiales en estos pacientes, restaura la capacidad de la respuesta inmune adaptativa e innata facilitando la curación después del trauma.

La glutamina es el aminoácido no esencial, que actúa como precursor en la síntesis de nuevo de la arginina, más abundante en el organismo jugando un papel importante en diferentes procesos metabólicos. Es un precursor de sustratos para la gluconeogenesis hepática, es el combustible preferido por los enterocitos y neutrófilos, participando en las funciones de sistemas como el gastrointestinal, inmunológico y muscular.

Durante la evolución de una enfermedad crítica, se ha demostrado una depleción importante de los niveles séricos de glutamina convirtiéndose en un aminoácido condicionalmente esencial, ya que los requerimientos del organismo durante un periodo de estrés importante, sobrepasan la cantidad de síntesis endógena. La dosis eficiente de glutamina como suplemento debe ser de al menos 0,2g/kg y administrada durante varios días. En los resultados de diferentes estudios, se ha observado que existe una disminución en la incidencia de bacteriemia en los pacientes a quienes se les administra glutamina^{333, 334}.

Algunos metaanálisis han evaluado el beneficio de su administración en pacientes quirúrgicos y médicos críticos, en cuanto a días de estancia, complicaciones infecciosas y la mortalidad investigando además diferencias en

la respuesta según la ruta de administración y la dosis. Se ha encontrado disminución en la incidencia de complicaciones infecciosas y reducción en los días de estancia hospitalaria ⁸⁵.

La arginina, de forma similar, es un aminoácido semiesencial que se convierte en esencial durante situaciones hipermetabólicas y sépticas. La síntesis endógena de este aminoácido se ve superado por el incremento en los requerimientos. Representa la mayor fuente de urea en el organismo gracias a la eliminación del organismo de compuestos no esenciales que contienen nitrógeno, es necesaria para la síntesis del colágeno en la cicatrización de heridas, modifica la inducción y desarrollo de tumores malignos a través de sus efectos sobre el sistema inmunológico, tiene capacidad de estimular el timo. Además favorece la liberación de diferentes hormonas como la hormona del crecimiento, insulina, glucagón, somatostatina, catecolaminas, aldosterona y vasopresina ^{334, 335}. El uso de arginina como inmunonutriente podría mejorar la respuesta de las células T y aumenta la fagocitosis. La arginina modula la respuesta inflamatoria e inmunológica. A pesar de que se ha evidenciado una mejoría clínica en pacientes quirúrgicos, el beneficio de los pacientes en unidades de cuidados críticos con respuesta inflamatoria sistémica, sepsis y SDMO es menos claro. La dosificación también es importante, las concentraciones por debajo de 6g/L no han demostrado beneficios, pero concentraciones mayores de 12g/L han demostrado efectos favorables ³³⁵.

Durante los últimos 25 años, más de 30 ensayos clínicos se han llevado a cabo sobre inmunonutrición, incluyendo cerca de 2.000 pacientes, con resultados

variables. La mayoría de estudios han usado diferentes combinaciones de nutrientes, pero con baja calidad en su metodología, que no ha permitido demostrar diferencias significativas entre los grupos de estudio ³³⁶. En los últimos años existen una serie de ensayos clínicos con el fin de demostrar que mediante la administración preoperatorio y postoperatoria de una dieta enriquecida con inmunonutrientes a pacientes que requieren ser intervenidos quirúrgicamente, disminuye la incidencia de complicaciones postoperatorias. Se fortalece el sistema inmune, se protege contra la actividad oxidativa y la cascada excesiva de citoquinas liberadas en el SRIS, aunque no existe un consenso generalizado sobre el momento ideal para el inicio de este tipo de terapia. No existe una dosis óptima de estos farmaconutrientes ni un tiempo establecido en cuanto a su duración. Aunque la vía enteral ha demostrado algunos beneficios frente a la parenteral, y se debe preferir que exista un tracto gastrointestinal funcionando, diferentes estudios no han demostrado diferencias significativas en cuanto a que vía se debe usar para obtener mayores beneficios con el uso de la inmunonutrición ^{133, 337, 338}. Además no existe una composición homogénea de las fórmulas que existen disponibles en el mercado, ni en las sustancias que las componen, ni en el número de nutrientes, así como en la cantidad. Por lo que es difícil establecer que fórmula es la ideal para realizar la suplementación en los pacientes críticos.

El concepto de inmunonutrición e inmunomodulación abre una nueva dimensión en el manejo de pacientes y la nutrición moderna en el paciente crítico.

5.9. LIMITACIONES TEÓRICAS DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS EN ENFERMOS CRÍTICOS

Bajo condiciones fisiológicas, las concentraciones plasmáticas de citrulina reflejan la síntesis intestinal desde la glutamina. Sin embargo, en pacientes críticos existen dos condiciones que pueden aumentar los niveles de citrulina:

1. Estímulo de la iNOS en el SIRS, que puede generar un aumento de la citrulina generada extraintestinalmente, procedente de la arginina³³⁹.
2. Fallo renal agudo, una condición frecuente en los pacientes críticos, que puede disminuir la síntesis de arginina desde citrulina, y causar una falsa hipercitrulinemia por disminución en el aclaramiento renal. Por lo que un valor normal de citrulina en el paciente crítico ($\geq 20 \mu\text{mol/L}$) no descarta afectación intestinal.

Si los niveles de citrulina plasmática están bajos en pacientes expuestos a situación de estrés, indican descenso en la síntesis intestinal de glutamina. Ciertamente, dos estudios recientes observan esto mismo en pacientes críticos

272, 280

La Espectrometría de tándem masas (MS/MS) es la técnica elegida en nuestro trabajo para la determinación de la arginina y la citrulina, principalmente basado en su rapidez de obtención de resultados (24h) lo que permitiría su uso como marcador pronóstico en el futuro, y en el menor gasto que si se hubiera elegido cromatografía líquida mediante HPLC. La Espectrometría de Masas es una técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas. Requiere cantidades pequeñas de muestra y obtiene información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica de separación de sustancias más ampliamente utilizada.

En la Espectrometría de masas la muestra es ionizada (y por tanto destruida) usando diversos procedimientos para ello. De todos ellos el más usual y/o utilizado es la técnica denominada de Impacto Electrónico consistente en el bombardeo de la muestra (previamente vaporizada mediante el uso de alto vacío y una fuente de calor) con una corriente de electrones a alta velocidad. Mediante este proceso, la sustancia pierde algunos electrones y se fragmenta dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Los iones (moléculas o fragmentos cargados) son entonces conducidos mediante un acelerador de iones a un tubo analizador curvado sobre el que existe un fuerte campo magnético, y conducidos a un colector/analizador sobre el que se recogen los impactos de dichos iones en función de la relación carga/masa de los mismos.

Cada compuesto es único, y cada uno de los compuestos se ionizará y fragmentará de una determinada manera, y en este principio se basa la espectrometría de masas para identificar cada analito.

En 2015 se ha hecho algún trabajo para comparar la desviación de niveles de diversos aminoácidos entre ambas técnicas, la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y un analizador de aminoácidos (AAA)³⁴⁰. Se realizaron 207 pares de mediciones; los niveles de fenilalanina obtenidos por el MS / MS fueron en promedio 26.1% más bajos y los niveles de tirosina eran, en promedio 15.5% inferior en comparación con el AAA; la diferencia entre el método podría tener implicaciones para el diagnóstico y el manejo clínico de los pacientes con hiperfenilalaninemia.

Son varios los estudios que utilizan la espectrometría por tándem-masas para cuantificar los niveles de citrulina y arginina, realizados en sangre seca, encontrando una aceptable correlación con los niveles en plasma^{60, 341,342}.

No debemos olvidar que nuestro método pretende poder servir como marcador pronóstico precoz, por lo que se debe hacer en sangre seca, obteniendo resultados en 24-48 horas, y así podría ser reevaluado por otros trabajos futuros.

5.10. PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Nuestro proyecto actual nos ha llevado a programar dos nuevos trabajos de investigación, que actualmente ya están en marcha, de entrada limitados a pacientes postoperatorios de cirugía cardiovascular mediante circulación extracorpórea. El primero relacionado con la *neopterina* como marcador de SIRS y el segundo con la *permeabilidad* como mecanismo implicado en la activación intestinal del SIRS.

La neopterina es un derivado pteridínico sintetizado a partir de la guanosina y producido por monocitos y macrófagos activados. Su síntesis se estimula sobre todo por interferón gamma a partir de linfocitos T. La monitorización de la neopterina es útil en el seguimiento de condiciones patológicas asociadas con la activación de inmunidad mediada por células. También se han descrito elevaciones de neopterina en pacientes con síndrome de Down. Son muy limitados los datos sobre niveles de neopterina en cirugía cardiaca diferente de la coronaria. Nos planteamos la hipótesis de que la citrulina y la arginina plasmáticas sufren una evolución diferente en sus cifras plasmáticas durante los primeros días de un enfermo crítico pediátrico según la gravedad del cuadro, se pueden correlacionar con los niveles de neopterina, así como con otros parámetros clínicos y analíticos asociados a la respuesta inflamatoria sistémica. Para ello nos planteamos determinar la existencia de un ascenso de neopterina y de un descenso mantenido de los niveles de arginina y citrulina,

más marcado en base al grado de respuesta inflamatoria sistémica de pacientes pediátricos ingresados en cuidados críticos.

La cirugía extracorpórea (CEC) supone una situación de hipoperfusión intestinal relativa con posterior reperfusión y genera disfunción intestinal, valorada por un aumento en la permeabilidad intestinal, estando ésta muy relacionada con activación del complemento, elevación de citoquinas proinflamatorias, PCR y PCT, sin asociarse a destrucción enterocitaria (normalidad de *citulina* plasmática), y sí con aumento de respuesta inflamatoria intestinal monitorizada por medio de la calprotectina y alfa-1-antitripsina fecales. Pretendemos valorar el posible aumento en las primeras 24 horas postoperatorias en la permeabilidad intestinal en pacientes afectos de cardiopatía congénita que se hayan sometido a CEC, así como su correlación con los sistemas de puntuación de riesgo cardiovascular (RACHS-1 y Aristóteles), los niveles plasmáticos de PCR y PCT, los niveles de citulina y arginina plasmáticas, de calprotectina y de alfa-1-antitripsina en heces pre y postoperatorios.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en la presente investigación, y teniendo en cuenta los objetivos de la misma, pueden establecerse las conclusiones siguientes:

6.1. CINÉTICA DE CITRULINA Y ARGININA EN EL PACIENTE CRÍTICO PEDIÁTRICO

- 1.- El déficit de citrulina y arginina en pacientes críticos pediátricos es muy prevalente.
- 2.- Las cifras de citrulina al ingreso son similares a la del grupo control.
- 3.- La citrulina cae de forma significativa a las 12 horas de ingreso, con un nuevo ascenso al tercer día.
- 4.- Los niveles de citrulina se mantienen sin ascender aún a los 7 días de ingreso, siendo más marcada la diferencia entre los que tienen evolución desfavorable.

5.- La arginina está ya descendida en las primeras horas de ingreso (0-6h).

6.- Los niveles de arginina se mantienen disminuidos a las 12 horas de ingreso, presentando un nuevo descenso a las 24 horas.

7.- Se produce un ascenso de arginina más precoz al tercer día, manteniéndose estable hasta el 7º día.

8.- Las cifras de arginina no llegan a normalizarse, quedando disminuidas respecto al grupo control.

9.- El descenso de citrulina en las primeras 24 horas tras el ingreso se correlaciona de forma estadísticamente significativa con el de arginina.

6.2. NIVELES DE CITRULINA Y ARGININA COMO FACTOR PRONÓSTICO

1.- Existe correlación entre la elevación de la citrulina al 7^o día con menor duración de ventilación mecánica, menor estancia en UCIP y menor aparición de complicaciones.

2.- Los niveles bajos de citrulina al 7^o día se correlacionan de forma inversamente proporcional a las cifras de reactantes de fase aguda (RFA) a las 24 horas, presentando cifras de PCR y PCT más altas.

3.- El mayor descenso de arginina en las primeras 12 horas está relacionado con mayor estancia en UCIP y mayor número de complicaciones.

4.- Cifras disminuidas de arginina a las 12 horas de ingreso, se correlacionan con mayor ascenso de RFA (PCR y PCT) a los 3 días.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. 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;128:606–14.
2. Van Goudoever JB, Stoll B, Henry JF, Burrin DG, Reeds PJ. Adaptive regulation of intestinal lysine metabolism. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2000;97:11620–5.
3. 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:E541–6.
4. Ligthart-Melis GC, Van de Poll MC, Boelens PG, Dejong CH, Deutz NE y Van Leeuwen PA. Glutamine is an important precursor for de novo synthesis of arginine in humans. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1282-9.
5. Shah PS, Shah VS. Arginine supplementation for prevention of necrotising enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database of Syst Rev* 2007. Issue 2. [DOI: 10.1002/14651858.CD004339.pub3]
6. Blasco Alonso J, Serrano Nieto J, Navas López VM, Barco Gálvez A, Vicioso I, Carazo Gallego B, et al. Citrulina plasmática como marcador de pérdida de masa enterocitaria en la enfermedad celíaca en la infancia. *Nutr Hosp* 2011;26(4):807-13.
7. Wu G, Meininger CJ, Knabe DA, et al. Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3: 59-66.

8. Souba WW. Glutamine: Physiology, Biochemistry, and Nutrition in Critical illness. Austin, Texas. R G Landes, 1995, p. 93-105.
9. Klimberg VS, Souba WW, Dolson DJ, et al. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer* 1990;66:62-8.
10. O'Dwyer ST, Smith RJ, Kripke SA, et al. New fuels for the gut. In: *Clinical Nutrition: Enteral and Tube Feeding*, 2nd. Ed. Rombeau JL, Caldwell, MD (Eds). Philadelphia. 1990, p.540-55.
11. Houdijk AP, Rijnsburger RS, Jansen J, Wesdrop RIC, Weiss JK, McCamish MA, et al. Randomised trial of glutamine enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet* 1998;352:772-6.
12. O'Riordain MG, De Beaux A. Fearon KCH. Effect of glutamine on immune function in the surgical patients. *Nutrition* 1996;12:S82-4.
13. Buijs N, Brinkmann SJ, Luttikhoud J, Schierbeek H, Wisselink W, Beishuizen A, et al. Intravenous glutamine supplementation enhances renal de novo arginine synthesis in humans: a stable isotope study. *Am J Clin Nutr* 2014;100(5):1385-91.
14. Wu G, Flynn NE, Knabe DA. Enhanced intestinal synthesis of polyamines from proline in cortisol-treated piglets. *Am J Physiol* 2000;279:E395-402.
15. Wu G. Intestinal Mucosal Amino Acid Catabolism. *J Nutr* 1998;128:1249-52.

16. Argaman Z, Young VR, Noviski N, Castillo-Rosas L, Xiao-Ming L, Zurakowski D, et al. Arginine and nitric oxide metabolism in critically ill septic pediatric patients. *Crit Care Med.* 2003;31(2):591-7.
17. 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.
18. 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 2004:153–67.
19. Wu G. Synthesis of citrulline and arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs. *Am J Physiol* 1997; 272: G1382–G1390.
20. Maarsingh H, Zaagsma J, Meurs H. Arginine homeostasis in allergic asthma. *Eur J Pharmacol* 2008; 585 (2-3): 375-84.
21. Maarsingh H, Bossenga BE, Bos IS, Volders HH, Zaagsma J, Meurs H. L-arginine deficiency causes airway hyperresponsiveness after the late asthmatic reaction. *Eur J Pharmacol* 2009;34(1):191-9.
22. Morris CR. Arginine and asthma. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 2013;77:1-15.
23. Kraj L, Krawiec M, Koter M, Graboń W, Kraj G, Chołojczyk M, et al. Altered L-arginine metabolism in children with controlled asthma. *Allergy Asthma Proc* 2014;35(5):80-3.
24. Mabalirajan U, Ahmad T, Leishngthem GD, Joseph DA, Dinda AK, Agrawal A, et al. Beneficial effects of high dose of L-arginina on airway hiperresponsiveness and airway inflammation in a murine model of asthma. *J Allergy ClinImmunol* 2010; 125(3): 626-35.

25. Schwartz D, Ozery Y, Schwartz IF, Wollman Y, Chernichovsky T, Blum M, Iaina A. Glomerular arginine transport is attenuated in chronic renal failure in rats. *J Med.* 2003;34(1-6):113-20
26. Closs EI, Boissel JP, Habermeier A, Rotmann A. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J Membr Biol* 2006;213(2):67-77.
27. Fotiadis D, Kanai Y, Palacín M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med* 2013;34(2-3):139-58.
28. Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 2004;447(5):532-42.
29. Rath M, Müller I, Kropf P, Cross EI, Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol* 2014;5:532.
30. Shen LJ, Beloussow K, Shen WC. Accessibility of endothelial and inducible nitric oxide synthase to the intracellular citrulline-arginine regeneration pathway. *Biochem Pharmacol* 2005;69(1):97-104.
31. Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, McLeod C, et al. Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. *Eur J Immunol* 2006;36(6):1516-26.
32. Rotoli BM, Bussolati O, Sala R, Barilli A, Talarico E, Gazzola GC, et al. INF gamma stimulates arginine transport through system y+L in human monocytes. *FEBS Lett* 2004;571(1-3):177-81.

33. Bahri S, Curis E, El Wafi FZ, Aussel C, Chaumeil JC, Cynober L, et al. Mechanisms and kinetics of citrulline uptake in a model of human intestinal epithelial cells. *Clin Nutr* 2008;27(6):872-80.
34. Pochini L, Scalise M, Galluccio M, Indiveri C. Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health. *Front Chem* 2014;2:61.
35. Dillon EL, Knabe DA, Wu G. Lactate inhibits citrulline and arginine synthesis from proline in pig enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest* 1999;276:1079-86.
36. 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.
37. 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.
38. Torralardona 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:E1177–80.
39. 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.
40. Huang Y, Shao XM, Neu J. Immunonutrients and neonates. *Eur J Pediatr* 2003;162:122–8.
41. McCowen KC, Bistran BR. Immunonutrition: problematic or problem solving? *Am J Clin Nutr* 2003;77:764–70.

42. Douglas GB and Davis AT. Proteins and amino acids in enteral nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7:79–87.
43. 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;18:716–21.
44. Reintam A, Parm P, Kitus R, Kern H, Starkopf J. Gastrointestinal symptoms in intensive care patients. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009;53(3):318-24.
45. Piton G, Manzon C, Cypriani B, et al. Acute intestinal failure in critically ill patients: is plasma citrulline the right marker? *Intensive Care Med* 2011; 37:911-17.
46. Goulet O, Jan D. Intestinal failure: causes and management in children. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2004,9:192–200.
47. Goulet O, Ruemmele F, Lacaille F, Colomb V. Irreversible Intestinal Failure 2004;38:250–69.
48. 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;119:1496–505.
49. 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;124:1210-19.

50. 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):1067-74.
51. 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):1212-16.
52. Jeevanandam M, Ramias L, Schiller WR. Altered plasma free amino acid levels in obese traumatized man. *Metabolism* 1991;40(4):385-90.
53. Weber FL, Reiser BJ. Relationship of plasma amino acids to nitrogen balance and portal-systemic encephalopathy in alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 1982;27:103-10.
54. Ceballos I, Chauveau P, Guerin V, Bardet J, Parvy P, Kamoun P, et al. Early alterations of plasma free amino acids in chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 1990;188:101-1.
55. Zschocke J, Hoffman GF. *Vademecum metabolicum*, 2nd Ed. Shattauer, Friedrichsdorf. Germany 2004.
56. Pitaken HT, Oja SS, Kemppainen, Seppa JM, Mero AA. Serum amino acid concentration in aging men and women. *Amino Acids* 2003;24:413-21.
57. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Cin Nutr* 2008;27:328-339.

58. Gondolesi GE, Kaufman SS, Sansaricq C, Magid MS, Raymond K, Iledan LP, et al. Defining normal plasma citrulline in intestinal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2004; 4(3):414-8.
59. 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;146:542-7.
60. 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;80:1729–33.
61. 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. *J Surg Res* 2005;127(2):177-82.
62. David AI, Gaynor JJ, Zis PP, Conanan L, Goldsmith L, Esquenazi V, et al. An association of lower serum citrulline levels within 30 days of acute rejection in patients following small intestine transplantation. *Transplant Proc* 2006;38(6):1731-2.
63. Lai CH, Lee CH, Hung CY, Lo HC. Oral Citrulline Mitigates Inflammation and Jejunal Damage via the Inactivation of Neuronal Nitric Oxide Synthase and Nuclear Factor- κ B in Intestinal Ischemia and Reperfusion. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2015. DOI: 0148607115590661
64. Kossel A y Daikin HD. Über die arginase. *Hoppe-Seylers Zeitschrift F. Physiol. Chemie* 1904,XLV:322-31.
65. Berg JM, Stryel L y Tymoczko JL. *Bioquímica*. 2007.Ed. Reverte.

66. Rath M, Müller I, Kropf P, Cross EI, Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front immunol* 2014;5:532.
67. Dzik JM. Evolutionary roots of arginase expression and regulation. *Front immunol* 2014;5:544.
68. Yang Z, Ming XF. Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Frontiers in Immunology* 2014;5:533.
69. Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G and Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *European Journal Immunology* 1995.4:1101-14.
70. Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G y Modolell M. TH1/TH2-Regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *Journal Immunology* 1999.163:3771-7.
71. Munder M. Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system. *British Journal Pharmacology* 2009.158: 638-51.
72. Thomas AC and Mattila JT. Of mice and man: arginine metabolism in macrophages. *Frontier Immunology* 2014.5:479.
73. Herbert DR, Orekov T, Roloson A, Ilies M, Perkins C, O'Brien W, et al. Arginase I suppresses IL12/IL23p40-driven intestinal inflammation during acute schistosomiasis. *J Immunol* 2010;184:6438-46.
74. Lewis ND, Asim M, Barry DP, de Sablet T, Singh K, Piazuelo MB, et al. Immune evasion by *Helicobacter pylori* is mediated by induction of macrophage arginase II. *J immunol* 2011;186:3632-41.

75. Pesce JT, Ramalingam TR, Mentik-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, et al. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000371.
76. Karima R, Matsumoto S, Higashi H, Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today* 1999;5(3):123-32.
77. Hol JW, van Lier F, Valk M, Klimek M, Stolker RJ, Fekkes D. Effect of Major and Minor Surgery on Plasma Levels of Arginine, Citrulline, Nitric Oxide Metabolites, and Ornithine in Humans. *Ann Surg* 2013;258:1071-8.
78. Uscátegui H. Inmunonutrición: Enfoque en el paciente quirúrgico. *Rev Chilena de Cirugía* 2010;62(1):87-92.
79. Grimble R. Basics in clinical nutrition: Immunonutrition-Nutrients which influence immunity: Effect and mechanism of action. *Eur J Clin Nutr and Metabolism* 2009;4:10-3.
80. Klek S, Kulig J, Sierzega M, Szczepanek K, Szybinski P, Walewska, et al. Standard and immunomodulating enteral nutrition in patients after extended gastrointestinal surgery-A prospective, randomized, controlled clinical trial. *Clin Nutr* 2008;27:504-12.
81. Calder P. Immunonutrition in surgical and critically ill patients. *Br J Nutr* 2007;98(1):S133-9.
82. Kreymann G. Early nutrition support in critical care: a European perspective. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:156-9.

83. Napolitano LM, et al. Immune dysfunction in trauma. *Surg Clin N Am* 1999;79(6):1385-416.
84. Xu YX, et al. Mechanism of intestinal mucosal dysfunction following trauma-hemorrhage: Increased apoptosis associated with elevated Fas expression in Peyer's patches. *J Surg Res* 1997;70:55-60.
85. Culebras-Fernández JM, Paz-Arias R, Jorquera-Plaza F, García de Lorenzo A. Nutrición en el paciente quirúrgico: inmunonutrición. *Nutr Hosp* 2001;16:67-77.
86. Bertolini G, Iapichino G, Radriazzi D, Facchini R, Simini B, Bruzzone P, et al. Early enteral immunonutrition in patients with severe sepsis: results of an interim analysis of randomized multicentre clinical trial. *Intensive Care Med* 2003;29(5):834-40.
87. Bower RH, Cerra FB, Bershadsky B, Licari JJ, Hoyt DB, Jensen GL, et al. Early enteral administration of a formula (Impact) supplemented with arginine, nucleotides, and fish oil intensive care unit patients: results of a multicenter, prospective, randomized, clinical trial. *Crit Care Med* 1995 Mar;23(3):436-49.
88. Evans TJ, Cohen J. Immunotherapy of sepsis. *J Med Microbiol* 1993;38(4):237-9.
89. Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991;214(5):621-6.
90. López A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts B, et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2004;32(1):21-30.

91. Cauwels A. Nitric oxide in shock. *Kidney Int* 2007;72:557-65.
92. Van Eijk HMH, Luiking YC, Deutz NEP. Methods using stable isotopes to measure nitric oxide synthesis in the L-arginine/NO pathway in health and disease. *J Chromotogr* 2007.B851;172-185.
93. Galbán C, Montejo JC, Mesejo A, Marco P, Celaya S, Sánchez-Segura JM, et al. An immune-enhancing enteral diet reduces mortality rate and episodes of bacteremia in septic intensive care unit patients. *Crit Care Med* 2000;28(3):643-8.
94. Sanz A, Celaya S, Gracia P, Gracia ML y Albero R. Inmunonutrición. *Endocrinol Nutr* 2004;51(4):202-17.
95. Kudsk KA, Minard G, Croce MA, Brown RO, Lowrey TS, Pritchard FE, et al. A randomized trial of isonitrogenous enteral diets after severe trauma. An immune-enhancing diet reduces septic complications. *Ann Surg* 1996;224(4):531-40.
96. Senkal M, Mumme A, Eickhoff U, Geier B, Spath G, Wilfert D, et al. Early postoperative enteral immunonutrition: clinical outcome and cost-comparison analysis in surgical patients. *Crit Care Med* 1997;25:1489-96.
97. Weimann A, et al. Influence of arginine, omega-3 fatty acids and nucleotide-supplemented enteral support on systemic inflammatory response syndrome and multiple organ failure in patients after severe trauma. *Nutrition* 1998;14:314-20.
98. Chuntrasakul C, Siltharm S, Sarasombath S, Sittapirochana C, Leowattana W, Chockvivatanavanit S, et al. Metabolic and immune effects of dietary arginine, glutamine and omega-3 fatty acids

- supplementation in immunocompromised patients. *J Med Assoc Thai* 1998;81(5):334-43.
99. Houdijk AP, Rijnsburger E, Jansen J, Waldrop RI, Weiss JK, McCamish MA, et al. Randomized trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *The Lancet* 1998; 325:772-6.
100. Morlion BJ, Stehle P, Whactler P, Siedhoff HP, Koller M, König W, et al. Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery. A randomized, double-blind, controlled study. *Ann Surg* 1998;227:302-8.
101. Heys SD, Walker LG, Smith I y Eremin O. Enteral nutritional supplementation with key nutrients in patients with critical illness and cancer. A metaanalysis of randomized controlled clinical trials. *Ann Surg* 1999;229:467-77.
102. Gianotti L, Braga M, Frei A, Greiner R y Di Carlo V. Health care resources consumed to treat postoperative infections: cost saving by perioperative immunonutrition. *Shock* 2000;14:325-30.
103. Witt RC, Wu Y, Renegar KB, King BK, Li J y Kudsk KA. Bombesin recovers gut-associated lymphoid tissue and preserves immunity to bacterial pneumonia in mice receiving total parenteral nutrition, *Ann Surg* 2000;231:1-8.
104. Heyland DK, Novak F, Drover JW, et al: Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA* 2001;286:944-53.

105. Montejo JC, Zaragoza A, López-Martínez J, Urrútia G, Roqué M, Blesa A, et al. Immunonutrition in the intensive care unit. A systematic review and consensus statement. *Clin Nutr* 2003;22(3):221-33.
106. Farber MS, Moses J, Korn M. Reducing costs and patient morbidity in the enterally fed intensive care unit patient. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2005;29(1):S62-9.
107. Briassoulis G, Filippou O, Hatzi E, Papassotiriou I, Hatzis T. Early enteral administration of immunonutrition in critically ill children: results of a blinded randomized controlled clinical trial. *Nutrition* 2005;21:799-807.
108. Smith HA, Canter JA, Christian KG, et al. Nitric oxide precursors and congenital heart surgery: a randomized controlled trial of oral citrulline. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132: 58-65.
109. Romero MJ, Platt DH, Caldwell RB, Calwell RW. Therapeutic Use of Citrulline in Cardiovascular Disease. *Cardiovasc Drug Rev* 2006; 24(3-4):275-90.
110. Tan HB, Danilla S, Murray A, Serra R, El Dib R, Henderson TO, et al. Immunonutrition as an adjuvant therapy for burns. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;12:CD007174. DOI: 10.1002/14651858.CD007174.pub2.
111. Braga M, Gianotti L, Radaelli G, Vignali A, Mari G, Gentilini O, et al. Perioperative immunonutrition in patients undergoing cancer surgery. Results of a randomized double blind phase III trial. *Arch Surg* 1999;134:428-33.
112. Wachtler P, Axel R, König W, Bauer H, Kemen M, Köller M. Influence of a pre-operative enteral supplementation on

- functional activities of peripheral leukocytes from patients with major surgery. *Clin Nutr* 1995;14:275- 82.
- 113.Ligthart-Melis GC, Van de Poll MC, Vermeulen MA, Boelens PG, van den Tol MP, van Schaik C, et al. Enteral administration of alanyl-[2-(15)N] glutamine contributes more to the novo synthesis of arginine than does intravenous infusion of the dipeptide in humans. *Am J Clin Nutr* 2009;90(1):95-105.
- 114.Ligthart-Melis GC, Marini JC, Engelen MP, Deutz NE. Glutamine supplementation, citrulline production, and de novo arginine synthesis: is there a relation? *Am J Clin Nutr* 2015;101(4):890-2.
- 115.Buijs N, Brinkmann SJ, Luttikhoud J, Schierbeek H, Wisselink W, Beishuizen A, et al. Intravenous glutamine supplementation enhances renal de novo arginine synthesis in humans: a stable isotope study. *Am J Clin Nutr* 2014;100(5):1385-91.
- 116.Wilmore DW. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. *Journal of Nutrition* 2001;131, 2543S-9S.
- 117.Grimble RF. Nutritional modulation of immune function. *Proc Nutr Soc* 2001;60(3):389-97.
- 118.Moncada S, Higgs A. The L-arginine - nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 2003;329:2002-12.
- 119.Efron D, Barbul A. Role of arginine in immunonutrition. *J Gastroenterol* 2000;35(suppl 12):20–3.
- 120.Efron D, Barbul A. Modulation of inflammation and immunity by arginine supplements. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;1:531–8.

121. Albina JE, Henry WL Jr, Mastrofrancesco B, Martin BA, Reichner JS. Macrophage activation by culture in an anoxic environment. *J Immunol* 1995;155(9):4391-6.
122. Norris KA, Schrimpf JE, Flynn JL, Morris SM. Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 1995;63(7):2793-6.
123. Arias M, Rojas M, Zabaleta J, Rodriguez JI, París SC, Barrera LF, et al. Inhibition of Virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Bcg^r and Bcg^s, macrophages Correlates with Nitric Oxide Production. *J Infect Dis* 1997;176(6):1552-8.
124. Benbernou N, Esnault S, Shin HC, Fekkar H, Guenounou M. Differential regulation of IFN-gamma, IL-10 and inducible nitric oxide synthase in human T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. *Immunology* 1997;91(3):361-8.
125. Chang RH, Feng MH, Liu WH, Lai MZ. Nitric oxide increased interleukin-4 expression in T lymphocytes. *Immunology* 1997;90(3):364-9.
126. Cendan JC, Topping DL, Pruitt J, Snowdy S, Copeland EM 3rd, Lind DS. Inflammatory mediators stimulate arginine transport and arginine-derived nitric oxide production in a murine breast cancer cell line. *J Surg Res* 1996;60(2):284-8.
127. Gianotti L, Alexander J W, Pyle T, and Fukushima R. Arginine-supplemented diets improve survival in gut derived sepsis and peritonitis

- by modulating bacterial clearance: the role of nitric oxide. *Ann Surg* 1993;217:644-54.
128. Daly JM. Specific nutrients and the immune response: From research to clinical practice. *J Crit Care Nutr* 1995;2:24-9.
129. Senkal M, Zumtobel V, Bauer KH, Marpe B, Wolfram G, Frei A, Eickhoff U, Kemen M. Outcome and cost-effectiveness of perioperative enteral immunonutrition in patients undergoing elective upper gastrointestinal tract surgery: a prospective randomized study. *Arch Surg* 1999;134(12):1309-16.
130. MacFie J, Woodcock NP, Palmer MD, Walker A, Townsend S, Mitchell CJ. Oral dietary supplements in pre- and postoperative surgical patients: a prospective and randomized clinical trial. *Nutrition* 2000;16(9):723-8.
131. Atkinson S, Sieffert E, Bihari, D. A prospective, randomized, double-blind, controlled clinical trial of enteral immunonutrition in the critically ill. *Crit Care Med* 1998;26:1164-72.
132. Hielan DK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U. Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA* 2001;286:944-53.
133. Heys S, Schofield A, Wahle K. Immunonutrition in clinical practice: what is the current evidence? *Nutr Hosp* 2004;19:325-32.
134. Hawker FH. How to feed patients with sepsis. *Curr Opin Crit Care* 2000;6(4):247-52.
135. Suchner U, Kuhn KS, Fürst P. The scientific basis of immunonutrition. *Proc Nutr Soc* 2000;59(4):553-63

136. Polycarpou E, Zachaki S, Tsofia M, Papaevangelou V, Polycarpou N, Briana DD, et al. Enteral L-arginine supplementation for prevention of necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates: a double-blind randomized pilot study of efficacy and safety. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2013;37(5):617-22.
137. Mitchell K, Lyttle A, Amin H, Shaireen H, Robertson HL, Lodha AK. Arginine supplementation in prevention of necrotizing enterocolitis in the premature infant: an updated systematic review. *BMC Pediatr* 2014;14:226.
138. Wijnands KA, Meesters DM, van Barneveld KW, Visschers RG, Briedé JJ, Vandendriessche B, et al. Citrulline supplementation improves organ perfusion and arginine availability under conditions with enhanced arginase activity. *Nutrients* 2015;7:5217-38.
139. McKinley-Barnard S, Andre T, Morita M, Willoughby D. Combined L-citrulline and glutathione supplementation increases the concentration of markers indicative of nitric oxide synthesis. *J Int Soc Sports Nutr* 2015;12:27. DOI: 10.1186/s12970-015-0086-7.
140. Apaza J y Calderón D. Inmunomodulación e inmunonutrición. *Ginecol Obstet (Perú)* 2002;48:46-50.
141. Cerra FB, Lehman S, Konstantinides N, Konstantinides F, Shronts EP, Holman R. Effect of enteral nutrient on in vitro tests of immune function in ICU patients: a preliminary report. *Nutrition* 1990;6(1):84-7.
142. Gottschlich MM, Jenkins M, Warden GD, Baumer T, Havens P, Snook JT, et al. Differential effects of three enteral dietary regimens on selected

- outcome variables in burn patients. JPEN J Parenter Enteral Nutr 1990;14(3):225-36.
143. Daly JM, Weintraub FN, Shou J, Rosato EF, Lucia M. Enteral nutrition during multimodality therapy in upper gastrointestinal cancer patients. Ann Surg 1995;221(4):327-38.
144. Moore FA, Moore EE, Kudsk KA, Brown RO, Bower RH, Koruda MJ, Baker CC, et al. Clinical benefits of an immune-enhancing diet for early postinjury enteral feeding. J Trauma 1994;37(4):607-15.
145. Brown RO, Hunt H, Mowatt-Larssen CA, Wojtysiak SL, Henningfield MF, Kudsk KA. Comparison of specialized and standard enteral formulas in trauma patients. Pharmacotherapy 1994;14(3):314-20.
146. Bower RH, Cerra FB, Bershadsky B, Licari JJ, Hoyt DB, Jensen GL, et al. Early enteral administration of a formula (Impact) supplemented with arginine, nucleotides, and fish oil in intensive care unit patients: results of a multicenter, prospective, randomized, clinical trial. Crit Care Med 1995;23(3):436-49.
147. Schilling J, Vranjes N, Fierz W, Joller H, Gyurech D, Ludwig E, et al. Clinical outcome and immunology of postoperative arginine, omega-3 fatty acids, and nucleotide-enriched enteral feeding: a randomized prospective comparison with standard enteral and low calorie/low fat i.v. solutions. Nutrition 1996;12(6):423-9.
148. Méndez C, Jurkovich GJ, Garcia I, Davis D, Parker A, Maier RV. Effects of an immune-enhancing diet in critically injured patients. J Trauma 1997;42(5):933-40.

149. Hasselman M, Kummelen C, Bryg DJ, et al. Enteral feeding supplemented with arginine, fish oil and nucleotides (IMPACT) reduces infection rate and improves immune status in critically ill patients. *Intensive Care Med* 1997;23(2):136.
150. Saffle JR, Wiebke G, Jennings K, Morris SE, Barton RG. Randomized trial of immune-enhancing enteral nutrition in burn patients. *Trauma* 1997;42(5):793-800.
151. Heslin MJ, Latkany L, Leung D, Brooks AD, Hochwald SN, Pisters PW, et al. A prospective, randomized trial of early enteral feeding after resection of upper gastrointestinal malignancy. *Ann Surg* 1997;226(4):567-77.
152. Braga M, Gianotti L, Vignali A, Cestari A, Bisagni P, Di Carlo V. Artificial nutrition after major abdominal surgery: impact of route of administration and composition of the diet. *Crit Care Med* 1998;26(1):24-30.
153. Braga M, Gianotti L, Nespoli L, Radaelli G, Di Carlo V. Nutritional approach in malnourished surgical patients: a prospective randomized study. *Arch Surg* 2002;137(2):174-80.
154. Di Carlo V, Gianotti L, Balzano G, Zerbi A, Braga M. Complications of pancreatic surgery and the role of perioperative nutrition. *Dig Surg* 1999;16(4):320-6.
155. Gianotti L, Braga M, Gentilini O, Balzano G, Zerbi A, Di Carlo V. Artificial nutrition after pancreaticoduodenectomy. *Pancreas* 2000;21(4):344-51.
156. Gianotti L, Braga M, Nespoli L, Radaelli G, Beneduce A, Di Carlo V. A randomized controlled trial of preoperative oral supplementation with a

- specialized diet in patients with gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 2002;122(7):1763-7.
157. McCarter MD, Gentilini OD, Gomez ME, Daly JM. Preoperative oral supplement with immunonutrients in cancer patients. *JPEN* 2000;22(4):206-11.
158. Dent D, Heyland DK. Increased mortality in patients with pneumonia receiving an immune-enhancing diet. *Crit Care Med* 2003 (in press).
159. Peranzoni E, Marigo I, Dolcetti L, Ugel S, Sonda N, Taschin E, et al. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology* 2007;212(9-10):795–812.
160. Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol* 2003;24(6):302–6.
161. Raber P, Ochoa AC, Rodríguez PC. Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives. *Immunol Invest* 2012 Jan;41(6-7):614–34.
162. Marik PE, Flemmer M. The immune response to surgery and trauma: Implications for treatment. *J Trauma Acute Care Surg* 2012;73(4):801–8.
163. Zea AH, Rodríguez PC, Culotta KS, Hernández CP, De Salvo J, Ochoa JB, et al. L-Arginine modulates CD3 zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes. *Cell Immunol* 2004;232(1-2):21–31.
164. Viola A, Bronte V. Metabolic mechanisms of cancer-induced inhibition of immune responses. *Semin Cancer Biol* 2007;17(4):309–16.

165. Yan X, Takahara M, Xie L, Gondo C, Setsu N, Oda Y, et al. Arginine metabolism in soft tissue sarcoma. *J Dermatol Sci* 2011;61(3):211–5.
166. Morris SM. Recent advances in arginine metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7:45–51.
167. Zea AH, Rodríguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* 2005;65(8):3044–8.
168. Rodríguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 2007;109(4):1568–73.
169. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 2009;37(1):153–68.
170. Appleton J. Arginine: Clinical potential of a semi-essential amino acid. *Altern Med Rev* 2002;7(6):512–22.
171. Rodríguez PC, Ochoa AC. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev* 2008;222:180–91.
172. Tate DJ, Patterson JR, Velasco-González C, Carroll EN, Trinh J, Edwards D, et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide inhibits the proliferation of murine renal cell carcinoma cells. *Int J Biol Sci* 2012;8(8):1109–20.
173. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Krüger C, Manns MP, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in

- hepatocellular carcinoma patients induces CD4 (+) CD25 (+) Foxp3 (+) T cells. *Gastroenterology* 2008;135(1):234–43.
174. Zakrzewicz D, Zakrzewicz A, Preissner KT, Markart P, Wygrecka M. Protein Arginine Methyltransferases (PRMTs): Promising Targets for the Treatment of Pulmonary Disorders. *Int J Mol Sci* 2012;13(10):12383–400.
175. Fujita S, Masago K, Hatachi Y, Fukuhara A, Hata A, Kaji R, et al. Genetic polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene correlate with overall survival in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. *BMC Med Genet* 2010;11:167.
176. Kono K, Ichihara F, Iizuka H, Sekikawa T, Matsumoto Y. Expression of signal transducing T-cell receptor zeta molecules after adoptive immunotherapy in patients with gastric and colon cancer. *Int J Cancer* 1998;78(3):301–5.
177. Jiao Z-J, Gao J-J, Hua S-H, Chen D-Y, Wang W-H, Wang H, et al. Correlation between circulating myeloid-derived suppressor cells and Th17 cells in esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 2012;18(38):5454–61.
178. Gannon PO, Godin-Ethier J, Hassler M, Delvove N, Aversa M, Poisson AO, et al. Androgen-regulated expression of arginase 1, arginase 2 and interleukin-8 in human prostate cancer. *PLoS One* 2010;5(8):e12107.
179. Isaza Correa JM, Vasco Gutierrez CM, Velásquez Lopera MM. Arginina y cáncer. Implicaciones en la regulación de la respuesta antitumoral. *IATREIA* 2014;27(1):63-72.

180. Sipahi S, Gungor O, Gunduz M, Cilci M, Demirci MC, Tamer A. The effect of oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine and glutamine on wound healing: a retrospective analysis of diabetic haemodialysis patients. *BMC Nephrol* 2013;14:8.
181. Neilly PJ, Kirk SJ, Gardiner KR, Rowlands BJ. The Larginine/nitric oxide pathway--biological properties and therapeutic applications. *Ulster Med J* 1994;63(2):193–200.
182. Munder M, Schneider H, Luckner C, Giese T, Langhans C-D, Fuentes JM, et al. Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood* 2006;108(5):1627–34.
183. Kropf P, Baud D, Marshall SE, Munder M, Mosley A, Fuentes JM, et al. Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur J Immunol* 2007;37(4):935–45.
184. Phalke S, Mzoughi S, Bezzi M, Jennifer N, Mok WC, Low DHP, et al. p53-Independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by PRMT6. *Nucleic Acids Res* 2012;40(19):9534–42.
185. Cohen J, Chin w DN. Nutrition and sepsis. *World Rev Nutr Diet* 2013;105:116–25.
186. Serafini P, Borrello I, Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 2006;16(1):53–65.
187. Choi BS, Martínez-Falero IC, Corset C, Munder M, Modolell M, Müller I, et al. Differential impact of L-arginine deprivation on the activation and

- effector functions of T cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 2009;85(2):268–77.
188. Yoon JK, Frankel AE, Feun LG, Ekmekcioglu S, Kim KB. Arginine deprivation therapy for malignant melanoma. *Clin Pharmacol* 2013;5:11–9.
189. Ciszak L, Kosmaczewska A, Werynska B, Szteblich A, Jankowska R, Frydecka I. Impaired zeta chain expression and IFN-gamma production in peripheral blood T and NK cells of patients with advanced lung cancer. *Oncol Rep* 2009;21(1):173–84.
190. Rotondo R, Barisione G, Mastracci L, Grossi F, Orengo AM, Costa R, et al. IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 2009;125(4):887–93.
191. Fu H, Khan A, Coe D, Zaher S, Chai J-G, Kropf P, et al. Arginine depletion as a mechanism for the immune privilege of corneal allografts. *Eur J Immunol* 2011;41(10):2997–3005.
192. Marhaba R, Vitacolonna M, Hildebrand D, Baniyash M, Freyschmidt-Paul P, Zöller M. The importance of myeloid-derived suppressor cells in the regulation of autoimmune effector cells by a chronic contact eczema. *J Immunol* 2007;179(8):5071-81.
193. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res* 2008;68(13):5439–49.

194. Gökmen SS, Aygit AC, Ayhan MS, Yorulmaz F, Gülen S. Significance of arginase and ornithine in malignant tumors of the human skin. *J Lab Clin Med* 2001;137(5):340–4.
195. Wang SR, Hou S, Wang A, Chang YJ, Liu CT, Tsay GJ, et al. The significance of arginase I administration on the survival of mice bearing NS-1 myeloma cells. *J Surg Res* 2009;151(1):28–32.
196. Mauskopf JA, Candrilli SD, Chevrou-Séverac H, Ochoa JB. Immunonutrition for patients undergoing elective surgery for gastrointestinal cancer: impact on hospital costs. *World J Surg Oncol* 2012;10:136.
197. Whiteside TL. Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol Immunother* 2004;53(10):865–78.
198. Odunsi K, Mhaweche-Fauceglia P, Andrews C, Beck A, Amuwo O, Lele S, et al. Elevated expression of the serine-arginine protein kinase 1 gene in ovarian cancer and its role in Cisplatin cytotoxicity in vitro. *PLoS One* 2012;7(12):e51030.
199. Beckman KB, Ames BN. Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci* 1998;854:118-27.
200. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84(24):9265-9.
201. Wei CC, Wang ZQ, Wang Q, et al. Rapid kinetic studies link tetrahydrobiopterin radical formation to heme-dioxy reduction and

- arginine hydroxylation in inducible nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2001;276:315–319.
202. Gorren AC, Mayer B. Tetrahydrobiopterin in nitric oxide synthesis: a novel biological role for pteridines. *Curr Drug Metab* 2002; 3:133–157.
203. King AJ, Brenner BM. Endothelium-derived vasoactive factors and the renal vasculature. *Am J Physiol* 1991; 260:653-62.
204. Andelová E, Barteková M, Pancza D, Styk J, Ravingerová T. The Role of NO in Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart. *Gen Physiol Biophys* 2005;24:411-26.
205. Bescós R, Sureda A, Tur JA, Pons A. The Effect of Nitric-Oxide-Related Supplements on Human Performance. *Sports Med* 2012;42(2):99-1117.
206. Qianhong L, Hiru G. Cardioprotection afforded by Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Therapy is Mediated by Cyclooxygenase-2 via a Nuclear Factor-B Dependent Pathway. *Circulation* 2007;116:1-8.
207. Kirk SJ, Barbul A. Role of arginine in trauma, sepsis, and immunity. *JPEN* 1990;14(5 suppl):226S-229S.
208. Rudiger A. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Car Med* 2007;35:1599-608.
209. Chirino YI. Participación del peroxinitrito en diferentes enfermedades. *Rev Invest Clin* 2006;58(4):350-8.
210. Tylor BS, Kion YM, Wang Q, Sharpio RA, Billiar TR y Geller DA. Nitric oxide down regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. *Arco Surg* 1997;1(32):1177-82.
211. Majano P, Lara-Pezzi E, López-Cabrera M, Apolinario A, Moreno-Otero R y García-Monzón C. Hepatitis B virus X protein transactivates inducible

- nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor kappa B-binding site: evidence that cytoplasmatic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology* 2000;34(6):1218-24.
212. Gilkeson G, Mudgetts J, Seldin MC, Ruiz P, Alexander A, et al. Clinical and serologic manifestation of autoimmune disease in MRL-Mice lacking Nitric Oxide Synthase Type 2. *J exp Med* 1997;186(4):365-73.
213. Gusarov I, Starodubtseva H, Wang ZQ, McQuade L, Lippard SJ, Stuehr DJ y Nudler E. Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner. *L Biol Chem* 2008;283(19):13140-7.
214. Shatalin K, Gusarov I, Avetissova E, Shatalina Y, Mcquade LE, et al. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(3):1009-13.
215. Gusarov I, Shatalin K, Starodubtseva H y Nudker E. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science* 2009;325(5946):1380-4.
216. Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol* 1996;51(4):283-94.
217. Mungrue IN, Husain M, Stewart DJ. The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart Fail Rev* 2002;7(4):407-22.
218. Al-Azemi M, Refaat B, Amer S, Ola B, Chapman N, Ledger W. The expression of inducible nitric oxide synthase in the human fallopian tube during the menstrual cycle and in ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2009;94(3):833-40.

219. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992;101:1481-3.
220. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101(6):1644–55.
221. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med* 2003; 31(4):1250–6.
222. Casado Flores J. Fiebre e hipotensión. Sepsis, shock séptico y SRIS. En: *Urgencias y tratamiento del niño grave*. 3ª ed. Madrid: Ergon; 2015: p.127-9.
223. Kollef MH, Wragge T, Pasque C. Determinants of mortality and multiorgan dysfunction in cardiac surgery patients requiring prolonged mechanical ventilation. *Chest* 1995;107:1395-401.
224. McBride WT, Armstrong MA, Gilliland H, et al. The balance of pro and antiinflammatory cytokines in plasma and bronchoalveolar lavage (BAL) at paediatric cardiac surgery. *Cytokine* 1996;8:724-9.
225. Sablotzki A, Mann V, Simm A et al. Changes in the cytokine network through escalating SIRS after heart surgery. *Anesthesiol Intensiv Med Notfallmed Schmerzther* 2001;36:552-9.
226. Kawahito K, Kobayashi E, Ohmori M et al. Enhanced responsiveness of circulatory neutrophils after cardiopulmonary bypass: increased

- aggregability and superoxide producing capacity. *Artif Organs* 2000;24:37-42.
227. Gibson SC, Hartman DA, Schenck JM. The endocrine response to critical illness: update and implications for emergency medicine. *Emerg Med Clin North Am* 2005;23(3):909-29.
228. García de Lorenzo y Mateos A, Rodríguez Montes JA. Fisiología de la respuesta metabólica. En: Ruza Tarrío F. *Tratado de cuidados intensivos pediátricos*. Vol 2. 3ª ed. Madrid: Norma-Capitel; 2002.p.1289-1297.
229. Marin Armenta JA. Respuesta metabólica al trauma. *Cirugía Digestiva y endocrinología*. Web.grupohispavista.2004.
230. Ramírez Medina S, Gutiérrez Vázquez IR, Domínguez Maza A, Barba Fuentes C. Respuesta metabólica al trauma. *Medcrit* 2008;5(4): 130-3.
231. Leteurtre S, Martinot A, Duhamel A, Gauvin F, Grandbastien B, Nam TV et al. Development of a pediatric multiple organ dysfunction score: use of two strategies. *Med Decis Making* 1999;19(4):399-410.
232. Leteurtre S, Martinot A, Duhamel A, Proulx F, Grandbastien B, Cotting J, et al. Validation of the paediatric logistic organ dysfunction (PELOD) score: prospective, observational, multicentre study. *Lancet* 2003;362(9379):192-7.
233. Barreiro O, Sánchez-Madrid F. Bases moleculares de las interacciones leucocito-endotelio durante la respuesta inflamatoria. *Rev Esp Cardiol* 2009;62:552-6.
234. Nieto Moro M, Casado Flores J. Disfunción multiorgánica. En: Casado Flores, J, Serrano A. *Urgencias y tratamiento del niño grave*. 3ª ed. Madrid: Ergon; 2015: p.1661-6.

- 235.Griffiths RD. Specialized nutrition support in the critically ill: whom and when? *Netsle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programe*. 2002;7:199-214.
- 236.Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974;54(6):1496-508.
- 237.Edmiston CE Jr, Condon RE. Bacterial translocation. *Surg Gynecol Obstet* 1991;173(1):73-83.
- 238.Nguyen HB, Rivers EP, Abrahamian FM, et al. Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann Emerg Med* 2006; 48:28-54.
- 239.García de Lorenzo y Mateos A, Acosta Escribano J, Rodríguez Montes JA. Clinical importance of bacterial translocation. *Nutr Hosp* 2007;22(2):50-5.
- 240.Banning M. Bacteria and the gastrointestinal tract: beneficial and harmful effects. *Br J Nurs* 2006;15:144-9.
- 241.Deitch EA. Intestinal permeability is increased in burn patients shortly after injury. *Surgery* 1990; 107:411-6.
- 242.Riddington DW, Venkatesh B, Boivin CM, et al. Intestinal permeability, gastric intramucosal pH, and systemic endotoxemia in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *JAMA* 1996; 275:1007-12.
- 243.Johansson JE, Ekman T. Gastro-intestinal toxicity related to bone marrow transplantation: disruption of the intestinal barrier precedes clinical findings. *Bone Marrow Transplant* 1997;19:921-5.

244. Keshavarzian A, Holmes EW, Patel M, et al. Leaky gut in alcoholic cirrhosis: a possible mechanism for alcohol-induced liver damage. *Am J Gastroenterol* 1999;94:200-7.
245. Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: Bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996; 20:411-7.
246. Rombeau JL, Takala J. Summary of round table conference: Gut dysfunction in critical illness. *Intensive Care Med* 1997; 23:476-9.
247. Madl C, Druml W. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Systemic consequences of ileus. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:445-56.
248. Fink MP: Intestinal mucosal hyperpermeability in critical illness. En: *Gut Dysfunction in Critical Illness*. Rombeau JL, Takala J (Eds). Berlin, Springer-Verlag, 1996, p.12-24.
249. Wiest R, Rath HC. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:397-425.
250. Brathwite CEM, Ross E, Nagele R. Bacterial translocation occurs in humans after traumatic injury: evidence using immunofluorescence. *J Trauma* 1993;34:586-9.
251. Navaratnam N, Herndon DN, Woodson LC, et al. Endorphin mediation of mesenteric blood flow after endotoxemia in sheep. *Crit Care Med* 1992;20:402-8.
252. Wazna E, Gorski A. Bacterial translocation and its clinical significance. *Postepy Hig Med Dosw* 2005 (Online); 59:267-75.

- 253.Ziegler TR, Smith RJ, O'Dwyer ST, et al. Increased intestinal permeability associated with infection in burn patients. Arch Surg 1988; 123:1313-9.
- 254.Doig CJ, Sutherland LR, Sandham JD, et al. Increased intestinal permeability is associated with the development of multiple organ dysfunction syndrome in critically ill ICU patients. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:444-51.
- 255.Moore FA. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. Am J Surg 1999;178:449-53.
- 256.Faries PL, Simon RJ, Martella AT. Intestinal permeability correlates with severity of injury in trauma patients. J Trauma 1998;44:1031-6.
- 257.Grau T, Bonet A. Estudio multicéntrico de incidencia de las complicaciones de la nutrición enteral total en el paciente grave. Estudio ICOMEP 2ª parte. Nutr Hosp 2005;20:278-85.
- 258.De Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. Crit Care Med 2005;33:1125-35.
- 259.Alberdi J, Zaborina O, Wu L. The impact of stress and nutrition on bacterial-host interactions at the intestinal epithelial surface. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2005;8:205-9.
- 260.Beale R. Paying attention to the gastrointestinal system is critical. Curr Opin Crit Care 2006;12:124-5.
- 261.Goldstein B, Giroir B, Randolph A; International Consensus Conference on Pediatric Sepsis. International pediatric sepsis consensus conference:

- definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6(1):2-8.
262. Watson RS, Carcillo JA, Linde-Zwirble WT, et al. The epidemiology of severe sepsis in children in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;6:2-8.
263. Riley C, Basu RK, Kisson N, et al. Pediatric sepsis: preparing for the future against a global scourge. *Curr Infect Dis Rep* 2012;14:503-11.
264. Luiking YC, Poeze M, Ramsay G and Deutz NE. The Role of Arginine in Infection and Sepsis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2005;29:S70-4.
265. Luiking YC, Poeze M, Dejong CH, et al. Sepsis: An arginine deficiency state?. *Crit Care* 2004;32:2153-45.
266. Freund H, Atamian S, Holroyde J, et al. Plasma amino acids as predictors of the severity and outcome of sepsis. *Ann Surg* 1979;190:571-6.
267. Milewski PJ, Threlfall CJ, Heath DF, et al. Intracellular free amino acids in undernourished patients with or without sepsis. *Clin Sci (Lond)* 1982;62:83-91
268. Druml W, Heinzel G, Kleinberger G. Amino acids kinetics in patients with sepsis. *Am J Clin Nutr* 2001;73:908-13
269. Luiking YC, Steens L, Poeze M, et al. Low plasma arginine concentration in septic patients is related to diminished de novo arginine production from citrulline. *Clin Nutr* 2003; 22 (suppl 1):S26.
270. Gough MS, Morgan MA, Mack CM, Darling DC, Frasier LM, Doolin KP, et al. The ratio of arginine to dimethylarginines is reduced and predicts

- outcomes in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2011;39(6):1351-8.
271. Luiking YC, Ten Have GA, Wolfe RR, et al. Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;303:E1177-89.
272. Luiking YC, Poeze M, Ramsay G, Deutz NE. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am J Clin Nutr*. 2009 Jan;89(1):142-52.
273. Villalpando S, Gopal J, Balasubramanyam A, Bandi VP, Guntupalli K and Jahoor F. In vivo arginine production and intravascular nitric oxide synthesis in hypotensive sepsis. *Am J Clin Nutr* 2006;84:197-203.
274. Davis JS, Anstey NM. Is plasma arginine concentration decreased in patients with sepsis? A systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2011;39:380-5.
275. Vente JP, Von Meyenfeldt MF, Van Eijk HM, et al. Plasma-amino acid profiles in sepsis and stress. *Ann Surg* 1989; 209: 57-62.
276. Popovic PJ, Zeh HJ 3rd, Ochoa JB. Arginine and immunity. *J Nutr* 2007;137(2):1681S-6S.
277. Piton G, Manzon C, Monnet E, et al. Plasma citrulline kinetics and prognostic value in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2010;36:702-6.
278. Van Waardenburg DA, de Betue CT, Luiking YC, et al. Plasma arginine and citrulline concentrations in critically ill children: strong relation with inflammation. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1438-44.

279. Weiss SL, Haymond S, Ralay Ranaivo H, et al. Evaluation of asymmetric dimethylarginine, arginine, and carnitine metabolism in pediatric sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2012;13(4):e210-8.
280. Kao CC, Bandi V, Guntupalli KK, Wu M, Castillo L and Jahoor F. Arginine, citrulline and nitric oxide metabolism in sepsis. *Clin Sci* 2009;117:13-30.
281. de Betue CT, Deutz NE. Changes in arginine metabolism during sepsis and critical illness in children. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 2013;77:17-28.
282. Duke T, South M, Stewart A. Activation of the L-Arginine nitric oxide pathway in severe sepsis. *Arch Dis Child* 1997;76:203-9.
283. Luiking YC, Engelen MP, Deutz NE. Regulation of nitric oxide production in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13:97-104.
284. Ware LB, Magarik JA, Wickersham N, Cunningham G, Rice TW, Christman BW, et al. Low plasma citrulline levels are associated with acute respiratory distress syndrome in patients with severe sepsis. *Crit Care* 2013;17:R10.
285. Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys* 1995;316:70-6.
286. Andersen M, Regueira T, Leighton F. Estrés oxidativo en el paciente crítico. *Rev Med Chile* 2006;134:649-56.

287. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Caputi AP. Role of peroxynitrite and poly (ADP-ribosyl) synthetase activation in cardiovascular derangement induced by zymosan in the rat. *Life Sci* 1998;63:923-33.
288. Vatassery GT. Oxidation of vitamin E, vitamin C, and thiols in rat brain synaptosomes by peroxynitrite. *Biochem Pharmacol* 1996;52:579-86.
289. Salvemini D, Riley DP, Lennon PJ, Wang ZQ, Currie MG, MacArthur H et al. Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage. *Br J Pharmacol* 1999;127:685-92.
290. MacArthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9753-8.
291. Nishino T. The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J Biochem* 1994;116:1-6.
292. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003;9:169-76.
293. Moskovitz J, Poston JM, Berlett B, Nosworthy N, Szczepanowski R, Stadtman E. Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. *J Biol Chem* 2000;275:14167-72.
294. Mashima R, Nakanishi-Ueda T, Yamamoto Y. Simultaneous determination of methionine sulfoxide and methionine in blood plasma using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 2003;313:28-33.

- 295.Hoshi T, Heinemann S. Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol*2001;531(Pt 1):1-11.
- 296.Bayne AC, Sohal RS. Effects of superoxide dismutase/catalase mimetics on life span and oxidative stress resistance in the housefly, *Musca domestica*. *Free Radic Biol Med* 2002;32:1229-34.
- 297.Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med*1995;23:646-51.
- 298.Metnitz PG, Bartens C, Fischer M, Fridrich P, Steltzer H, Druml W. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome.*Intensive Care Med* 1999;25:180-5.
- 299.Andresen M, Requeira T. Myocardial dysfunction in sepsis. *Rev Med Chil* 2010;138(7):888-96.
- 300.Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Oberhoffer M, Horn A, Bredle D et al. Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. *Crit Care Med* 1998; 26:705-9.
- 301.Galley HF, Davies MJ, Webster NR. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1996;24:1649-53.
- 302.Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med* 2000;28:143-9.
- 303.Ho CT, Chan AC. Regeneration of vitamin E in rat polymorphonuclear leucocytes. *FEBS Lett* 1992;306:269-72.

304. Anzueto A, Andrade FH, Maxwell LC, Levine SM, Lawrence RA, Jenkinson SG. Diaphragmatic function after resistive breathing in vitamin E-deficient rats. *J Appl Physiol* 1993;74:267-71.
305. Aguirre Roque A, Fernández Fernández MC, Cartaya Irastorza JM, Machado Lubián MC, San Blas Valdés R, García Oliva JO. Valoración del paciente pediátrico grave y hallazgos clínico-epidemiológicos a su ingreso. *Rev Cub Med Int Emerg* 2005;5(1):1-7.
306. Martínez Alonso T, Aguirre Roque A, Guerra Pardo A, García Gómez N, Sánchez Iglesias G, San Blas Valdés R. Ingresos y fallecimientos en una UCIP. *Bol Pediatr* 2000; 40(173):166-72.
307. Tilford JM, Simpson PM, Lensing S, Aitken ME, Green JW, Fiser DH. Variation in therapy and outcome for pediatric head trauma patients. *Crit Care Med* 2001;29(5):1056-61.
308. Pollack MM, Ruttimann VE, Gets PR. Pediatric risk of mortality acute physiology score (PRISM III APS): A method of assessing physiologist instability for P.I.C.U. patients. *J Pediatr* 1997;131:575-81.
309. Balakrishnan G, Aitchison T, Hallworth D, Morton NS. Prospective evaluation of the Paediatric Risk of Mortality (PRISM) score. *Arch Dis Child* 1992;67(2):196-200.
310. Tamborlini G. Acción rápida salva vidas. *Diálogo sobre Atención Infantil* 1998;3:3-4.
311. Hsu CW, Wann SR, Chiong HT, Lin CU, Kun MH, Lin SL. Comparison of the apache III scoring system in patient with respiratory failure in medical care unit. *J Formos Med Assoc* 2001;7:437-42.

312. Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G, Berstad A. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. *Acta Paediatr* 2002;91:45–50.
313. Carroll D, Corfield A, Spicer R, et al. Faecal calprotectin concentrations and diagnosis of necrotising enterocolitis. *Lancet* 2003;361:310–1.
314. Van Elburg RM, Fetter WP, Bunkers CM, Heymans HS. Intestinal permeability in relation to birth weight and gestational and postnatal age. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2003;88(1):F52-5.
315. Osowska S, Neveux N, Nakib S, Lasserre V, Cynober L, Moinard C. Impairment of arginine metabolism in rats after massive intestinal resection: effect of parenteral nutrition supplemented with citrulline compared with arginine. *Clin Sci (Lond)* 2008;115(5):159-66.
316. Wood KC, Cortese-Krott MM, Kovacic JC, Noguchi A, Liu VB, Wang X, et al. Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Aug;33(8):1861-71.
317. Jensen GL, Miller RH, Talabiska DG, Fish J, Gianferante L. A double-blind, prospective, randomized study of glutamine-enriched compared with standard peptide-based feeding in critically ill patients. *Am J Clin Nutr* 1996;64(4):615-21.
318. Long CL, Borghesi L, Stahl R, et al. Impact of enteral feeding of a glutamine-supplemented formula on the hypoaminoacidemic response in trauma patients. *J Trauma* 1996;40(19):97-102.

319. Yu YM, Young VR, Castillo L, et al. Plasma arginine and leucine kinetics and urea production rates in burn patients. *Metabolism* 1995;44(5):659-66.
320. Dechelotte P, Hasselmann M, Cynober L, et al. L-alanyl-L-glutamine dipeptide-supplemented total parenteral nutrition reduces infectious complications and glucose intolerance in critically ill patients: the French controlled, randomized, double-blind, multicenter study. *Crit Care Med* 2006;34(3):598-604.
321. Peters JHC, Beishuizen A, Keur MB, Dobrowolski L, Wierdsma NJ, von Bodegraven A. Assessment of Small Bowel Function in Critical Illness: Potential Role of Citrulline Metabolism. *J Int Care Med* 2011;26(2):105-10.
322. Judge BS, Eisenga BH. Disorders of fuel metabolism: Medical complications associated with starvation, eating disorders, dietary fads and supplements. *Emer Med Clin N Am* 2005;23:789-813.
323. Malaver Ortega LF, Alméciga-Díaz CJ, Morales Monsalve¹ IS, Echeverri Peña OY, Guevara Morales J, Zuluaga Torres E, et al. Plasma amino acid quantification using High Performance Liquid Chromatography. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2009;43(4):647-61.
324. Mittal R and Coopersmith CM. Redefining the gut as the motor of critical illness. *Trends Mol Med* 2014;20(4):214-23.
325. Piton G, Belon F, Cypriani B, Regnard J, Puyraveau M, Manzon C, Navellou JC, Capellier G. Enterocyte damage in critically ill patients is associated with shock condition and 28-day mortality. *Crit Care Med* 2013;41(9):2169-76.

326. Zamora SA, Amin HJ, McMillan DD, et al. Plasma L-arginine concentrations in premature infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1997;131:226–32.
327. Lopansri BK, Anstey NM, Weinberg JB, et al. Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. *Lancet* 2003;361:676–8
328. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Vichinsky EP, Styles LA. Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vasoocclusive crisis and acute chest syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000;22:515–20.
329. Morris CR, Poljakovic M, Lavrisha L, Machado L, Kuypers FA, Morris SM Jr. Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:148 – 53.
330. Lau T, Owen E, Yu YM, et al. Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism in end-stage renal disease patients. *J Clin Invest* 2000;105:1217-25.
331. Benavides Trujillo MC y Pinzón Tovar A. Oxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. *Rev Col Anest* 2008;36:45-52
332. Lin YJ, Hsu CN, Lo MH, Huang CF, Chien SJ, Tain YL. High Citrulline-to-Arginine Ratio Associated with Blood Pressure Abnormalities in Children with Early Chronic Kidney Disease. *Circ J* 2013;77:181-7.
333. Dupertuis Y, Raguso A, Pichard C. Basics in clinical nutrition: Nutrients which influence immunity-Clinical and experimental data. *Eur J Clin Nutr and Metabolism* 2009;4:7-9.

334. Tsoras M, Jacobi J. Immunonutrition as a Part of the Nutritional Support if Critically Ill Patients. *Contemp Crit Care* 2008;5:1-10.
335. Stechmiller J, Porter T. Arginine immunonutrition in critically ill patients: a clinical dilemma. *Am J Crit Care* 2004;13:17-23.
336. Jones N, Heyland D, Pharmaconutrition: a new emerging paradigm. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:215-22.
337. Peter J, Moran J, Hughes J. A metaanalysis of treatment outcomes early enteral versus early parenteral nutrition in hospitalized patients. *Crit Care Med* 2005;33:213-20.
338. Grimble R. Immunonutrition. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:216-22.
339. Hersch M, Scott JA, Izbicki G, McCormack D, Cepinkas G, Ostermann M, Sibbald WJ. Differential inducible nitric oxide synthase activity in circulating neutrophils vs. mononuclears of septic shock patients. *Intensive Care Med* 2005;31:1132-5.
340. Groselj U, Murko S, Zerjav Tansek M, Kovac J, Trampus Bakija A, Repic Lampret B, et al. Comparison of tandem mass spectrometry and amino acid analyzer for phenylalanine and tyrosine monitoring--implications for clinical management of patients with hyperphenylalaninemia. *Clin Biochem* 2015;48(1-2):14-8.
341. Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;798(2):231-9.

342. Lai X, Kline JA, Wang M. Development, validation, and comparison of four methods to simultaneously quantify l-arginine, citrulline, and ornithine in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 201;1005:47-55.

PUBLICACIONES

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



8. PUBLICACIONES: TRABAJOS QUE AVALAN LA TESIS

8. 1. COMUNICACIÓN ORAL

Valor pronóstico de la cinética de la citrulina y arginina plasmáticas en pacientes críticos pediátricos. Resultados provisionales.

Sánchez Yáñez P, Blasco Alonso J, Rosa Camacho V, Camacho Alonso JM, Gil Gómez R, Milano Manso G.

XXVIII Congreso SECIP, Mayo 2013. Pamplona

8. 2. PUBLICACIÓN EN REVISTA

Cinética de citrulina y arginina, y su valor como factor pronóstico en pacientes pediátricos críticamente enfermos.

Blasco-Alonso J, Sánchez Yáñez P, Rosa Camacho V, Camacho Alonso JM, Yahyaoui Macías R, Gil-Gómez R, Milano Manso G.

An Pediat (Barc) 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anpedi.2014.10.032>

ANEXO

9. ANEXO

1. DATOS SOCIO-DEMOGRÁFICOS

- Edad: cuantitativa, continua (meses).
- Sexo: cualitativa, dicotómica (hombre/mujer).
- Raza: Variable cualitativa polidicotómica (caucásico, asiático, magrebí, africano)

2. DATOS CLÍNICOS

- Motivo de ingreso: cualitativa, nominal.
- Estancia en UCIP: cuantitativa, continua (días).
- Duración de la VM: cuantitativa, continua (horas).
- Apoyo vasoactivo: cualitativa, polidicotómica (1, 2, ≥ 2).
- Complicaciones (alteraciones hemodinámicas, afectación neurológica, disfunción pulmonar, infecciones nosocomiales, insuficiencia renal, exitus): cualitativas, dicotómicas (Sí/No)
- Puntuación en PRISM-II: cuantitativa, continua (%)

3. DATOS ANALÍTICOS: cuantitativas, continuas

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| - Leucocitos (mm^{-3}) | - Proteína C reactiva (mg/L) |
| - Plaquetas (mm^{-3}) | - Procalcitonina (ng/ml) |
| - Ácido láctico (mmol/L) | - Albúmina (g/dl) |
| - Ácido úrico (mg/dl) | - Arginina ($\mu\text{mol/L}$) |
| - Urea (mg/dl) | - Citrulina ($\mu\text{mol/L}$) |
| - Creatinina (mg/dl) | |

4. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS

Al ingreso (0-6h), a las 12 horas, a las 24 horas, a las 72 horas y al 7º día

