



ORIGINAL

Valor de la citrulina plasmática como biomarcador de función intestinal en el síndrome de intestino corto y en el trasplante intestinal

R. Vecino López^{a,*}, A.M. Andrés Moreno^b, E. Ramos Boluda^a,
E. Martínez-Ojinaga Nodal^a, A. Hernanz Macías^c, G. Prieto Bozano^a,
M. Lopez Santamaria^b y J.A. Tovar Larrucea^b

^a Servicio de Gastroenterología Infantil, Hospital Infantil La Paz, Madrid, España

^b Departamento de Cirugía Pediátrica, Hospital Infantil La Paz, Madrid, España

^c Unidad de Neuroquímica, Servicio de Bioquímica, Hospital Infantil La Paz, Madrid, España

Recibido el 19 de noviembre de 2012; aceptado el 8 de febrero de 2013

Disponible en Internet el 23 de marzo de 2013

PALABRAS CLAVE

Citrulina;
Biomarcador;
Fracaso intestinal;
Síndrome de intestino corto;
Trasplante intestinal;
Nutrición parenteral

Resumen

Introducción: La citrulina es un aminoácido producido exclusivamente por los enterocitos. Se estudió su valor como biomarcador de masa enterocitaria funcionante en pacientes con fracaso intestinal por síndrome de intestino corto (SIC) y su relación con la tolerancia digestiva.

Material y métodos: Se determinó la concentración plasmática de citrulina por cromatografía líquida de alta resolución (normal > 15 $\mu\text{mol/L}$) en 57 pacientes (edad 0,5-18 años) con fracaso intestinal en distintas situaciones evolutivas. Fueron excluidos pacientes deshidratados, con insuficiencia renal u otras situaciones que pudieran alterar los resultados. Se clasificaron en grupos: I: SIC extremo dependientes de nutrición parenteral (NP); II: SIC en alimentación mixta enteral-parenteral; III: SIC adaptados y autónomos sin NP; IV: trasplantados y autónomos sin NP.

Resultados: Los valores medios \pm DE de citrulina plasmática fueron: grupo I (n = 15): $7,1 \pm 4,1$; grupo II (n = 11): $15,8 \pm 8,9$; grupo III (n = 13): $20,6 \pm 7,5$; grupo IV (n = 25): $28,8 \pm 10,1$. Los valores resultaron inferiores en el grupo I comparados con los grupos II-III-IV ($p < 0,001$) y en el grupo II comparados con los grupos III-IV ($p < 0,001$). Se observó una fuerte correlación entre la citrulinemia y la longitud del intestino delgado remanente ($r = 0,85$; $p < 0,001$). En el grupo IV la citrulina descendió > 50% coincidiendo con rechazo moderado-severo en 3 pacientes y con enteritis viral en un paciente.

Conclusiones: 1. La citrulina plasmática puede ser un biomarcador sensible y específico del intestino funcional residual. 2. Se relaciona con la tolerancia a la alimentación enteral. 3. Debe confirmarse su valor pronóstico en el proceso de adaptación intestinal y como marcador de rechazo en pacientes trasplantados.

© 2012 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: rvecinolopez@gmail.com (R. Vecino López).

KEYWORDS

Citrulline;
Biomarker;
Intestinal failure;
Short bowel
syndrome;
Intestinal
transplantation;
Parenteral nutrition

Plasma citrulline concentration as a biomarker of intestinal function in short bowel syndrome and in intestinal transplant

Abstract

Introduction: Citrulline is a non-essential amino acid produced solely in the enterocyte. The aim of this study was to analyse the role of serum citrulline as a biomarker of enterocyte load in children with intestinal failure due to short bowel syndrome (SBS) and its relationship to enteral adaptation.

Material and methods: Plasma citrulline concentration was determined by chromatography (normal value $> 15 \mu\text{mol/L}$) in 57 patients (age 0.5-18 years) admitted to our Intestinal Rehabilitation Unit with intestinal failure. Those who were dehydrated, with renal insufficiency, or other conditions able to modify the results were excluded. Patients were divided into 4 groups: group I: SBS totally dependent on parenteral nutrition (PN); group II: SBS under mixed enteral-parenteral nutrition; group III: IF weaned from PN after a rehabilitation period; group IV: small bowel transplanted patients weaned from PN and taking a normal diet.

Results: The mean \pm SD plasma citrulline values were: group I ($n = 15$): 7.1 ± 4.1 ; group II ($n = 11$): 15.8 ± 8.9 ; group III ($n = 13$): 20.6 ± 7.5 ; group IV ($n = 25$): 28.8 ± 10.1 . Values were significantly lower in group I in comparison with groups II-III-IV ($P < .001$), and in group II in comparison with groups III-IV ($P < .001$). A low citrulline was associated with remnant small bowel length ($P < .001$, $r = 0.85$). In group IV citrulline levels decreased $> 50\%$ in 3 patients who developed moderate-severe rejection, and in one patient who developed viral enteritis.

Conclusions: 1. Plasma citrulline could be a sensitive and specific biomarker of the residual functional enterocyte load. 2. It is related to enteral feeding tolerance. 3. Its prognostic value in the process of intestinal adaptation and as a rejection marker in small bowel transplanted patients needs to be confirmed.

© 2012 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El fracaso intestinal (FI) se define como la reducción de la masa intestinal funcional por debajo del mínimo necesario para mantener las necesidades fisiológicas de absorción de fluidos y nutrientes, precisando nutrición parenteral (NP) para la supervivencia¹. La causa más frecuente de FI permanente en niños y adultos es el síndrome de intestino corto (SIC)^{2,3}. La adaptación del intestino residual es el proceso que trata de restablecer la absorción intestinal total de micro y macronutrientes a aquella previa a la resección intestinal y que determina si el FI va a ser permanente o transitorio⁴. El tiempo máximo de adaptación intestinal estimado en adultos es de 2 años, pero en niños puede durar hasta más de 3 años^{2,5}.

Al igual que en el fracaso renal o hepático, en los que existen marcadores de la función como la creatinina o las transaminasas, en el caso del intestino se ha buscado algún biomarcador en suero de la masa enterocitaria funcionante que pueda facilitar el diagnóstico y el pronóstico en los pacientes con FI^{6,7}. Se han propuesto diferentes biomarcadores relacionados con el metabolismo enterocitario, siendo la citrulina plasmática uno de los más recientes, de fácil determinación y con alta reproductibilidad⁸.

La citrulina es un aminoácido producido exclusivamente por los enterocitos, que no se incorpora a las proteínas⁹. Se sintetiza a partir de la glutamina, se libera desde el enterocito hacia la circulación y se metaboliza después en arginina gracias al riñón¹⁰. Sus niveles plasmáticos son independientes del estado nutricional o de la hepatopatía¹¹, y en situaciones de inflamación se produce un leve descenso

no significativo⁸. Por otro lado, sí es importante considerar que en la insuficiencia renal con aclaramiento de creatinina inferior a 50 ml/min aumentan los niveles de forma significativa¹². Se han realizado varios estudios con el objetivo de determinar si la citrulina plasmática podría diferenciar entre pacientes con SIC y FI transitorio con posibilidades de alcanzar la autonomía digestiva y el destete de la NP, y pacientes con SIC y FI permanente, que probablemente precisen trasplante intestinal¹³⁻¹⁵, pero existen algunas controversias al respecto¹⁶⁻¹⁸.

Por otro lado, pese a los avances producidos en el trasplante intestinal a lo largo de las últimas décadas, el rechazo agudo sigue siendo la complicación más común y la causa más frecuente de pérdida del injerto¹⁹. Su diagnóstico suele ser demasiado tardío, ya que las herramientas diagnósticas disponibles hasta el momento son la combinación de la evolución clínica con el estudio endoscópico y la histología de las biopsias, método invasivo y con potenciales complicaciones graves²⁰. Se ha propuesto la determinación de citrulina plasmática como prueba de cribado para detectar precozmente la disfunción del injerto, ya que en esta situación se produce un descenso significativo de su valor²⁰⁻²⁴.

Pacientes y métodos**Pacientes**

Desde octubre de 2010 hasta marzo de 2012 se ha determinado de forma rutinaria la concentración plasmática de citrulina en los pacientes con FI secundario a SIC y en los

trasplantados intestinales pertenecientes a la Unidad de Rehabilitación Intestinal del Hospital Infantil La Paz. Se hicieron determinaciones seriadas en distintas situaciones evolutivas, clasificando los pacientes en 4 grupos:

- I: SIC en dependencia absoluta de NP.
- II: SIC en alimentación mixta enteral-parenteral en el periodo de adaptación intestinal.
- III: SIC con FI transitorio que han alcanzado la adaptación intestinal y la autonomía digestiva (alimentación exclusiva por vía digestiva).
- IV: Portadores de trasplante intestinal más de 3 meses y autónomos.

Se excluyeron del estudio a los pacientes en situaciones que pudieran alterar los resultados como insuficiencia renal moderada-grave o deshidratación. La composición de la nutrición parenteral y enteral fue similar en todos los pacientes, sin empleo de suplementos o fórmulas enriquecidas de glutamina. La inmunosupresión de los pacientes trasplantados se ha realizado atendiendo al protocolo de la Unidad.

Determinación de la citrulina plasmática

Se utilizó una muestra de sangre que se obtuvo aprovechando el estudio analítico de rutina en las visitas programadas para el seguimiento cada 3 meses o durante los ingresos hospitalarios por complicaciones o disfunción del injerto en trasplantados. Se realizó la cuantificación de citrulina plasmática tras 6 h de ayuno enteral mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico, que es el método de referencia²⁵. Los valores normales validados en esta Unidad para pacientes pediátricos son entre 15 y 40 $\mu\text{mol/L}$.

Estimación de la longitud del intestino residual

En los grupos I, II y III se basó en los hallazgos encontrados durante el acto quirúrgico, completando el estudio con pruebas radiológicas baritadas.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el programa Statview. Los valores cuantitativos se expresaron en forma de media \pm desviación estándar o mediana y rango. Las concentraciones plasmáticas de citrulina se compararon entre los distintos grupos mediante el análisis de la varianza para muestras independientes. Con el fin de encontrar una relación lineal entre los parámetros, se empleó la regresión lineal para calcular el coeficiente de correlación de Pearson. Los resultados se mostraron mediante gráficos de dispersión. El nivel de significación estadística se definió en $p < 0,05$.

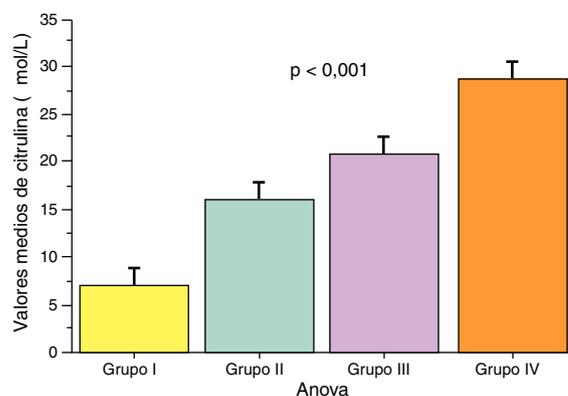


Figura 1 Niveles de citrulina plasmática en los 4 grupos de pacientes ($n=57$). Las diferencias son significativas entre los grupos I y II-III-IV y entre el grupo II comparado con los grupos III y IV ($p < 0,001$).

Resultados

Masa intestinal funcional y niveles de citrulina

Cincuenta y siete pacientes fueron tratados por FI: 32 varones y 25 mujeres. Quince pertenecían al grupo I, 11 al grupo II, 13 al grupo III y 25 al grupo IV. Ocho se incluyeron en 2 grupos diferentes, ya que la medición de la citrulina se realizó en momentos evolutivos distintos. Cuatro consiguieron la autonomía digestiva y pasaron del grupo II al III, y 4 recibieron trasplante, 3 del grupo I y uno del grupo II, pasando al grupo IV y obteniendo muestras de citrulina antes y después del trasplante.

La causa de SIC fue: enterocolitis necrotizante en 11, vólculo en 10, isquemia intestinal tras cirugía abdominal en 7, gastrosquis en 6, atresia intestinal aislada en 4 y enterectomía tras un trasplante intestinal previo en 4. En el grupo de trasplantados se incluyeron otras causas de FI como pseudoobstrucción intestinal en 7 pacientes, enfermedad de Hirschsprung extensa en 4, displasia intestinal en 3 y tumor desmoide en uno. La instauración del FI se produjo durante el periodo neonatal en el 37%. La mediana de edad en la primera determinación fue de 36 meses (4 meses-19 años); la mediana de edad al final del seguimiento de 49 meses (8 meses-22 años). Se realizaron un total de 146 determinaciones de citrulina plasmática: 33 del grupo I, 40 del grupo II, 26 del grupo III y 47 del grupo IV. Se descartaron 8 determinaciones: 4 en pacientes en insuficiencia renal, 2 en trasplantados en el periodo de reperfusión del injerto y 2 por fallo de la técnica. Cada paciente se sometió a una media de 3 determinaciones (rango 1-7). Los valores medios de citrulina en plasma para cada grupo fueron: 7,1 \pm 4,1; 15,8 \pm 8,9; 20,6 \pm 7,5 y 28,8 \pm 10,1 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente (fig. 1).

Grupo I ($n=15$): es el grupo de menor edad con una mediana de edad en la primera determinación de 8 meses (rango 4-104). Once pacientes se consideraron anentéricos, 7 tras resecciones masivas y 4 tras enterectomía post-trasplante por rechazo. La mediana de citrulina en estos pacientes fue aun menor que en el grupo I global (6 $\mu\text{mol/L}$). De ellos, 3 fallecieron en lista de trasplante, 6 están en

lista actualmente y otros 2 han sido ya trasplantados con éxito, pasando al grupo IV. De los 4 niños con intestino residual (mediana de citrulina $9 \mu\text{mol/L}$), 3 están en lista de trasplante y uno ha recibido un trasplante multivisceral con éxito.

Grupo II (n=11): la mediana de edad en la primera determinación fue de 3,1 años (rango 7 meses-13 años). Dos pacientes presentaron cifras normales de citrulina ($\geq 15 \mu\text{mol/L}$) al inicio del estudio, mientras que evolutivamente fueron 6. A lo largo del seguimiento 4 pacientes consiguieron la autonomía digestiva pasando al grupo III y un paciente con una hepatopatía avanzada recibió un trasplante multivisceral. Los 6 restantes permanecen estables con nutrición parenteral ciclada domiciliaria.

Grupo III (n=13): la mediana de edad en la primera determinación fue de 20 meses (rango 4 meses-5,5 años). Todos los pacientes consiguieron autonomía digestiva gracias a un proceso de rehabilitación intestinal multidisciplinar, siendo la citrulina normal en todos ellos al final del estudio.

Grupo IV (n=25): recibieron un trasplante de intestino aislado 6 pacientes, hepatointestinal 8 y multivisceral 11. Veinte trasplantes fueron primarios y 5 retrasplantes. Fue el grupo de mayor edad, con una mediana en la primera determinación de 7,2 años (rango 5 meses - 19 años). Durante este estudio una paciente falleció por una histoplasmosis y 2 pacientes perdieron el injerto por rechazo agudo severo, precisando trasplantectomía y pasando nuevamente a la lista de trasplante. En 4 pacientes se realizaron determinaciones antes y después de evidenciarse insuficiencia renal moderada-severa secundaria a la medicación inmunosupresora y en todos ellos prácticamente se duplicaban los niveles de citrulina (de 25 a 44, de 30 a 90, de 17 a 125 y de 14 a 30, respectivamente). En los 4 pacientes en los que se obtuvo una determinación antes del trasplante se objetivó un aumento significativo a partir de los 3 meses postrasplante (de 4 a 25, de 6 a 21, de 5 a 41 y de 10 a 32, respectivamente). La citrulina disminuyó $>50\%$ coincidiendo con rechazo moderado-severo en 3 pacientes y enteritis por rotavirus en uno.

Longitud intestinal y niveles de citrulina

En el grupo I predominaron los pacientes con SIC secundario a resección intestinal masiva. La máxima longitud intestinal fue de 50 cm en un paciente, aunque llegó a la Unidad en situación de dependencia absoluta de NP. En el grupo II la longitud intestinal osciló entre 35 y 90 cm. En 2 pacientes se realizó una enteroplastia seriada a lo largo del seguimiento, elongando de 85 a 165 y de 15 a 97 cm el intestino residual respectivamente, pero no se disponen de determinaciones antes y después de la intervención. En el grupo III, la longitud fue más variada, osciló entre 30 y 150 cm de intestino. En el grupo IV consideramos la longitud intestinal de todos los pacientes trasplantados como normal, ya que ninguno precisó resección quirúrgica intra ni postrasplante. La correlación entre los niveles de citrulina y la longitud intestinal residual de los pacientes de los grupos I, II y III se muestra en la figura 2.

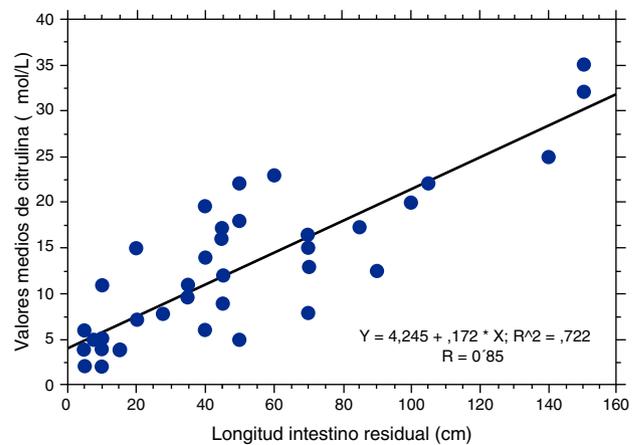


Figura 2 Scatter spots mostrando la relación de la citrulina plasmática con la longitud del intestino residual. El coeficiente de correlación de Pearson es $r=0,85$ y los valores de p son $p < 0,001$.

Análisis estadístico

Los valores resultaron significativamente inferiores en el grupo I comparados con los grupos II-III-IV ($p < 0,001$), en el grupo II comparados con los grupos III-IV ($p < 0,001$) y en el grupo III comparado con el IV ($p < 0,001$) (fig. 1). Se observó una fuerte correlación entre el nivel de citrulina plasmática y la longitud del intestino delgado residual ($r=0,85$; $p < 0,001$) (fig. 2).

Discusión

El SIC es la causa principal de NP prolongada y FI permanente en niños^{2,3}. La longitud intestinal es el principal factor predictivo para conseguir la autonomía digestiva en adultos²⁶, pero en niños la correlación es mucho menor, por presentar mayor potencial de adaptación. Esto lo demuestra que niños que desarrollan SIC como complicación de su prematuridad con resecciones largas consiguen la autonomía digestiva^{27,28}.

El estudio del área de absorción intestinal y de su capacidad continúa siendo un reto para las unidades de rehabilitación que tratan a niños con FI. El desarrollo de una prueba pronóstica o biomarcador que pueda relacionar la cantidad y la función intestinal y que pueda predecir el desdete de la NP sería de gran ayuda. Con este objetivo se han estudiado el test de la D-xilosa²⁹, el test de absorción de 3-O-metilglucosa³⁰, el ratio de digestión de macronutrientes^{31,32} o la actividad de la diamina oxidasa tras heparina³³, pero han resultado ser muy laboriosos con poco éxito en la práctica clínica⁸. Otros más recientes como el test de FABP-1³⁴ o la calprotectina fecal⁸ han demostrado utilidad solo en la medición del daño intestinal por isquemia o inflamación respectivamente.

En el año 2000, Crenn et al. publicaron el primer estudio que evaluaba adultos con SIC correlacionando su situación clínica con el nivel de citrulina plasmática, concluyendo que este es menor en pacientes con FI permanente que con FI transitorio, y que se correlaciona con la longitud de intestino remanente y con el porcentaje total de energía aportada mediante NP¹³. Posteriormente se han publicado

nuevos estudios tanto en niños como en adultos con FI secundario a SIC realizando mediciones de citrulina plasmática y con resultados dispares respecto a su utilidad. La mayoría han demostrado que existe una estrecha correlación entre la citrulinemia y la longitud intestinal residual^{13,15-18,35}, incluso con el diámetro y área de superficie estimada de intestino remanente^{13,16}. También se ha observado que tras procedimientos quirúrgicos de elongación del intestino en niños, se incrementaba el nivel de citrulina plasmática en un 90% de los casos al año de la enteroplastia³⁶. En nuestra serie, observamos un descenso significativo en los niveles de citrulina en aquellos pacientes con SIC, comparado con los que tenían longitud normal, y una fuerte correlación entre los niveles de citrulina plasmática y la longitud del intestino residual.

La utilidad de la citrulinemia para diferenciar entre FI permanente y transitorio se ha intentado demostrar con estudios que correlacionaban citrulina plasmática y el porcentaje de aporte energético total necesario mediante NP¹³⁻¹⁵ o el porcentaje de nutrición enteral tolerada^{11,18}. Inicialmente se realizaron determinaciones aisladas dentro del tiempo estimado de adaptación tras establecerse el SIC, buscando niveles de corte que fueran un buen marcador pronóstico para valorar la posibilidad de conseguir la adaptación intestinal (20 $\mu\text{mol/L}$ en adultos¹³, 15 $\mu\text{mol/L}$ en niños¹⁸). En la muestra del estudio presentado, considerando un nivel de corte de 13 $\mu\text{mol/L}$, observamos que el 84,6% de los pacientes del grupo I y II tienen cifras iniciales menores (todos los del grupo I y 7 de 11 del grupo II), mientras que el 92,3% de los pacientes del grupo III tienen cifras iguales o superiores. Los estudios más recientes se basan en que la determinación secuencial podría ser más útil para confirmar si se está produciendo el proceso de adaptación intestinal. El estudio pediátrico de Bailly-Botuha et al. del 2009 indica que la asociación de una longitud de intestino residual menor de 50 cm y un nivel de citrulina menor de 11 $\mu\text{mol/L}$ que no aumenta en el tiempo predice un FI permanente¹⁵, resultado que concuerda con los hallazgos encontrados en nuestra muestra de estudio por el momento.

En cuanto al trasplante intestinal, también se busca un biomarcador de disfunción aguda del injerto para evitar o minimizar las biopsias intestinales en el estudio del rechazo agudo y para conseguir un diagnóstico precoz. Al igual que en el SIC se han propuesto varios biomarcadores, siendo la citrulina plasmática uno de los más prometedores³⁷. Los primeros estudios preliminares en 2002 por los grupos de Miami y Nueva York objetivaron un descenso de los niveles de citrulina en los episodios de rechazo, aun más marcado conforme aumentaba la severidad de este^{21,22}. En 2004 se estudió el valor normal en pacientes trasplantados en su primer año, siendo mínimo en las primeras 2 semanas (periodo de isquemia-reperfusión del injerto) y aumentando progresivamente después hasta mantenerse estable a partir de los 90 días en valores similares a sujetos sanos. Los últimos estudios al respecto indican que el descenso significativo de citrulina plasmática medida de forma seriada tras el periodo de perfusión del injerto solo se produce en situación de daño de la mucosa intestinal por rechazo agudo moderado o severo, no si es leve, y no se puede diferenciar por el momento de otras causas de enteritis como las secundarias a infecciones virales²⁰. La diferenciación entre rechazo

agudo y enteritis viral, 2 de las complicaciones más frecuentes y graves tras el trasplante intestinal, son el objetivo en el estudio de biomarcadores de disfunción del injerto puesto que el abordaje terapéutico es totalmente opuesto. Puede ser precisa la combinación de la determinación de citrulina con otros biomarcadores en estudio como la calprotectina fecal³⁸ o la determinación de granzyme B y perforina en linfocitos^{39,40} para poder aumentar la especificidad del estudio hacia un rechazo agudo como causa de la disfunción intestinal.

Este trabajo es una confirmación más de que la concentración de citrulina sérica parece ser un marcador sensible y específico de la masa enterocitaria residual, y que se relaciona con la tolerancia a la alimentación por vía enteral en niños con SIC, pero los resultados son preliminares y debe confirmarse su valor pronóstico en el proceso de adaptación intestinal. Es una prueba sencilla, fácilmente realizable mediante simples análisis de sangre, repetible y relativamente barata.

El estudio presentado tiene limitaciones, siendo la más importante que es un estudio transversal, con una muestra de pacientes reducida hasta el momento, en la que se ha realizado la medición de citrulina plasmática en diferentes fases evolutivas del FI. Son necesarios estudios más a largo plazo de muestras más amplias y homogéneas en diferentes estadios evolutivos para poder extender su valor diagnóstico a la práctica clínica, con un valor pronóstico más fiable. En el trasplante intestinal la identificación de uno o una combinación de biomarcadores con valor predictivo de disfunción intestinal y su relación con el rechazo del injerto sigue siendo una prioridad.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

A todo el equipo que forma parte de la Unidad de Rehabilitación Intestinal del Hospital Infantil La Paz, incluyendo gastroenterólogos pediátricos, cirujanos pediátricos, enfermeras, auxiliares y psicóloga infantil. A los profesionales que trabajan en la Unidad de Neuroquímica del Servicio de Bioquímica del centro.

Bibliografía

- O'Keefe SJ, Buchman AL, Fishbein TM, Jeejeebhoy KN, Jeppesen PB, Shaffer J. Short bowel syndrome and intestinal failure: consensus definitions and overview. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006;4:6-10.
- Goulet O, Ruemmele F, Lacaille F, Colomb V. Irreversible intestinal failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:250-69.
- Duro D, Kamin D, Duggan C. Overview of pediatric short bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47:33-6.
- Nightingale JM. Management of patients with a short bowel. *World J Gastroenterol.* 2001;7:741-51.
- DiBaise JK, Young RJ, Vanderhoof JA. Intestinal rehabilitation and the short bowel syndrome: part 2. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:1823-32.

6. Crenn P, Matuchansky C, Messing B. Clinical and biochemical modelization of postsurgical intestinal failure in human adults. *Clin Nutr.* 1997;16:133-5.
7. Crenn P, Coudray-Lucas C, Cynober L, Messing B. Post-absorptive plasma citrulline concentration: a marker of intestinal failure in humans. *Transplant.* 1998;30:2528.
8. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr.* 2008;27:328-39.
9. Windmueller HG, Spaeth AE. Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol.* 1981;241:473-80.
10. Rabier D, Kamoun P. Metabolism of citrulline in man. *Amino Acids.* 1995;1:299-316.
11. Rhoads JM, Plunkett E, Galanko J, Lichtman S, Taylor L, Maynor A, et al. Serum citrulline levels correlate with enteral tolerance and bowel length in infants with short bowel syndrome. *J Pediatr.* 2005;146:542-7.
12. 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;188:101-8.
13. 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. *Gastroenterology.* 2000;119:1496-505.
14. Papadia C, Sherwood RA, Kalantzis C, Wallis K, Volta U, Fiorini E, et al. Plasma citrulline concentration: a reliable marker of small bowel absorptive capacity independent of intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol.* 2007;102:1474-82.
15. Bailly-Botuha C, Colomb V, Thioulouse E, Berthe MC, Garcette K, Dubern B, et al. Plasma citrulline concentration reflects enterocyte mass in children with short bowel syndrome. *Pediatr Res.* 2009;65:559-63.
16. Jianfeng G, Weiming Z, Ning L, Fangnan L, Li T, Nan L, et al. Serum citrulline is a simple quantitative marker for small intestinal enterocytes mass and absorption function in short bowel patients. *J Surg Res.* 2005;127:177-82.
17. Luo M, Fernandez-Estivariz C, Manatunga AK, Bazargan N, Gu LH, Jones DP, et al. Are plasma citrulline and glutamine biomarkers of intestinal absorptive function in patients with short bowel syndrome? *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2007;31:1-7.
18. Fitzgibbons S, Ching YA, Valim C, Zhou J, Iglesias J, Duggan C, et al. Relationship between serum citrulline levels and progression to parenteral nutrition independence in children with short bowel syndrome. *J Pediatr Surg.* 2009;44:928-32.
19. López-Santamaría M, Hernández F. Trasplante intestinal. *Am Pediatr Contin.* 2006;4:271-81.
20. Gondolesi G, Ghirardo S, Raymond K, Hoppenhauer L, Surlillo D, Rumbo C, et al. The value of plasma citrulline to predict mucosal injury in intestinal allografts. *Am J Transplant.* 2006;6:2786-90.
21. Gondolesi G, Fishbein T, Chehade M, Tschernia A, Magid M, Kaufman S, et al. Serum citrulline is a potential marker for rejection of intestinal allografts. *Transplant Proc.* 2002;34:918-20.
22. Pappas PA, Saudubray JM, Tzakis AG, Rabier D, Carreno MR, Gomez-Marin O, et al. Serum citrulline as a marker of acute cellular rejection for intestinal transplantation. *Transplant Proc.* 2002;34:915-7.
23. Pappas PA, Tzakis AG, Saudubray JM, Gaynor JJ, Carreno MR, Huijing F, et al. Trends in serum citrulline and acute rejection among recipients of small bowel transplants. *Transplant Proc.* 2004;36:345-7.
24. David AI, Selvaggi G, Ruiz P, Gaynor JJ, Tryphonopoulos P, Kleiner GI, et al. Blood citrulline level is an exclusionary marker for significant acute rejection after intestinal transplantation. *Transplantation.* 2007;84:1077-81.
25. Bartolomeo MP, Maisano F. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *J Biomol Tech.* 2006;17:131-7.
26. Carbonnel F, Cosnes J, Chevret S, Beaugerie L, Ngo Y, Malafosse M, et al. The role of anatomic factors in nutritional autonomy after extensive small bowel resection. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1996;20:275-80.
27. Spencer AU, Neaga A, West B, Safran J, Brown P, Btaiche I, et al. Pediatric short bowel syndrome: redefining predictors of success. *Ann Surg.* 2005;242:403-9.
28. Goulet O, Baglin-Gobet S, Talbotec C, Fourcade L, Colomb V, Sauvat F, et al. Outcome and long-term growth after extensive small bowel resection in the neonatal period: a survey of 87 children. *Eur J Pediatr Surg.* 2005;15:95-101.
29. Bjarnason I, MacPherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology.* 1995;108:1566-81.
30. Sigalet DL, Martin GR, Meddings JB. 3-O methylglucose uptake as a marker of nutrient absorption and bowel length in pediatric patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2004;28:158-62.
31. Jeppesen PB, Mortensen PB. Intestinal failure defined by measurements of intestinal energy and wet weight absorption. *Gut.* 2000;46:701-6.
32. Messing B, Pigot F, Rongier M, Morin MC, Ndeindoum U, Rambaud JC. Intestinal absorption of free oral hyperalimentation in the very short bowel syndrome. *Gastroenterology.* 1991;100:1502-8.
33. Rokkas T, Vaja S, Murphy GM, Dowling RH. Postheparin plasma diamine oxidase in health and intestinal disease. *Gastroenterology.* 1990;98:1493-501.
34. Kanda T, Fujii H, Tani T, Murakami H, Suda T, Sakai Y, et al. Intestinal fatty acid-binding protein is a useful diagnostic marker for mesenteric infarction in humans. *Gastroenterology.* 1996;110:339-43.
35. Santarpia L, Catanzano F, Ruoppolo M, Alfonsi L, Vitale DF, Pecce R, et al. Citrulline blood levels as indicators of residual intestinal absorption in patients with short bowel syndrome. *Ann Nutr Metab.* 2008;53:137-42.
36. Wales PW, de Silva N, Langer JC, Fecteau A. Intermediate outcomes after serial transverse enteroplasty in children with short bowel syndrome. *J Pediatr Surg.* 2007;42:1804-10.
37. Mercer DF. Hot topics in postsmall bowel transplantation: noninvasive graft monitoring including stool calprotectin and plasma citrulline. *Curr Opin Organ Transplant.* 2011;16:316-22.
38. Cagnola H, Scaravonati R, Cabanne A, Bianchi C, Gruz F, Errea A, et al. Evaluation of calprotectin level in intestinal content as an early marker for graft rejection. *Transplant Proc.* 2010;42:57-61.
39. Corti B, Altimari A, Gabusi E, Pinna AD, Gruppioni E, Lauro A, et al. Two years' experience of acute rejection monitoring of intestinal transplant recipients by real-time PCR assessment of granzyme B and perforin up-regulation: considerations on diagnostic accuracy. *Transplant Proc.* 2006;38:1726-7.
40. Altimari A, Gruppioni E, Capizzi E, Bagni A, Corti B, Fiorentino M, et al. Blood monitoring of granzyme B and perforin expression after intestinal transplantation: considerations on clinical relevance. *Transplantation.* 2008;85:1778-83.