

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**PANCREATITIS CRÓNICA:**  
**CORRELACIÓN DE PERFILES METABOLÓMICOS**  
**CON SU DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE LA PÉRDIDA DE**  
**FUNCIÓN PANCREÁTICA**

Memoria presentada por D. Carmelo Diéguez Castillo  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Granada, 13 de enero de 2021

**Editor:** Universidad de Granada. Tesis Doctorales

**Autor:** Carmelo Diéguez Castillo

**ISBN:** 978-84-1306-794-0

**URI:** <http://hdl.handle.net/10481/67813>

**Dr. JOSE CARLOS PRADOS SALAZAR,**  
CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA  
HUMANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE  
GRANADA.

**HACE CONSTAR:**

Que D. Carmelo Diéguez Castillo ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“PANCREATITIS CRÓNICA: CORRELACIÓN DE PERFILES METABOLÓMICOS CON SU DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN PANCREÁTICA”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 13 de enero de 2021.

Fdo: Dr. D. José Carlos Prados Salazar

Catedrático de Universidad



**Dr. OCTAVIO CABA PÉREZ,**  
PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS  
DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN.

**HACE CONSTAR:**

Que D. Carmelo Diéguez Castillo ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“PANCREATITIS CRÓNICA: CORRELACIÓN DE PERFILES METABOLÓMICOS CON SU DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN PANCREÁTICA”**.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí, se corresponde fielmente con los resultados obtenidos y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 13 de enero de 2021.

Fdo: Dr. D. Octavio Caba Pérez

Prof. Titular de Universidad



# Índice





	<i>Pág.</i>
<b>I. ABREVIATURAS.....</b>	<b>3</b>
<b>II. RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>III. SUMMARY.....</b>	<b>15</b>
<b>IV. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>1. PÁNCREAS: NOCIONES ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS.....</b>	<b>21</b>
<b>2. PANCREATITIS CRÓNICA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Epidemiología.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2. Etiología.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3. Manifestaciones clínicas y complicaciones.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4. Métodos diagnósticos.....</b>	<b>36</b>
2.4.1. Análisis de sangre.....	36
2.4.2. Estudio anatomopatológico.....	37
2.4.3. Pruebas de imagen y endoscópicas.....	38
2.4.4. Pruebas de función pancreática.....	43

<b>2.5. Valoración nutricional.....</b>	<b>47</b>
<b>2.6. Tratamiento.....</b>	<b>54</b>
2.6.1. Tratamiento enzimático sustitutivo.....	54
2.6.2. Tratamiento médico.....	61
2.6.3. Tratamiento endoscópico.....	63
2.6.4. Tratamiento quirúrgico.....	63
2.6.5. Manejo nutricional.....	65
<b>3. METABOLÓMICA.....</b>	<b>69</b>
<b>3.1. Nociones básicas.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2. Experiencia en patología pancreática.....</b>	<b>70</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>75</b>
<b>VI. METODOLOGÍA.....</b>	<b>79</b>
<b>1. ESTUDIO 1: Nuevos biomarcadores para el diagnóstico y evaluación de la pancreatitis crónica mediante metabolómica no dirigida.....</b>	<b>79</b>

2. ESTUDIO 2: Papel de la insuficiencia exocrina y endocrina en el manejo de pacientes con pancreatitis crónica.....	84
3. ESTUDIO 3: Nuevos biomarcadores para diferenciar entre diabetes mellitus tipo 3c y tipo 2 mediante metabólica no dirigida.....	86
4. ESTUDIO 4: Análisis de los factores implicados en la progresión de la pancreatitis crónica.....	91
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
1. Nuevos biomarcadores para el diagnóstico y evaluación de la pancreatitis crónica mediante metabólica no dirigida.....	95
2. Papel de la insuficiencia exocrina y endocrina en el manejo de pacientes con pancreatitis crónica.....	99
3. Nuevos biomarcadores para diferenciar entre diabetes mellitus tipo 3c y tipo 2 mediante metabólica no dirigida.....	109
4. Análisis de los factores implicados en la progresión de la pancreatitis crónica.....	111
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>119</b>
1. Factores de progresión e insuficiencia pancreática en pancreatitis crónica.....	121
2. Diagnóstico mediante metabólica de pancreatitis crónica.....	125

<b>3. Diagnóstico mediante metabólica de insuficiencia pancreática exocrina (IPE).....</b>	<b>129</b>
<b>4. Diagnóstico diferencial mediante metabólica de diabetes pancreatogénica (tipo 3c) y diabetes tipo 2.....</b>	<b>134</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>141</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>145</b>
<b>PUBLICACIÓN 1.....</b>	<b>165</b>
<b>PUBLICACIÓN 2.....</b>	<b>187</b>
<b>PUBLICACIÓN 3.....</b>	<b>209</b>
<b>PUBLICACIÓN 4.....</b>	<b>229</b>
<b>PUBLICACIÓN 5.....</b>	<b>247</b>

# **Abreviaturas**



## I. ABREVIATURAS

### A

AcN	Acetonitrilo
ACP	Análisis de componentes principales
ADNc	Ácido dextrirribonucleico complementario
ANA	Anticuerpos antinucleares
ANP	Necrotizing acute pancreatitis
ARN	Ácido ribonucleico
AUROC	Área bajo la característica operativa del receptor

### B

BMI	Body mass index
-----	-----------------

### C

CCK	Colecistoquinina
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CFA	Coefficient of fat absorption
cfDNA	Ácidos nucleicos libres
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CID	Collision-induced dissociation
CO <sup>2</sup>	Dióxido de carbono
COR	Característica Operativa del Receptor
CP (español)	Cáncer de páncreas
CP (english)	Chronic pancreatitis
CPP	Conducto pancreático principal
CPRE	Colangiopancreatografía retrógrada endoscópica
CPRM	Colangiopancreatografía por resonancia magnética
CPT2	Carnitine palmitoyltransferase 2
CT	Computed tomography
CTC	Células tumorales circulantes
CTRC	Chymotrypsin C
cRMN	Colangiopancreatografía por resonancia magnética

### D

DEXA	Densitometría ósea
DM3c	Diabetes mellitus tipo 3c
DMA	Dimetilamina
DMO	Densidad mineral ósea

### E

EEUU	Estados Unidos
EF-1	Elastasa fecal 1
EPI	Exocrine pancreatic insufficiency
ESI	Electrospray ionization

EUS Endoscopic ultrasonography

## F

FA (español) Fosfatasa alcalina

FA (english) Fatty acid

FDR False discovery rate

FM Fase móvil

## G

GLP S3 Ganoderma lucidum strain S3

## H

HbA1c Hemoglobina glicosilada

HC Healthy controls

HCC Hepatocellular carcinoma

HDL High Density Lipoprotein

HILIC Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

HIV Human inmunodeficiency virus

HMDB Human Metabolome Database

HOMA-B Homeostatic model assessment for beta-cell dysfunction

HPAC-ER Erlotinib-resistant pancreatic cáncer

HRMS High-resolution mass spectrometry

## I

IC Intervalo de confianza

IDA Information dependent acquisition

Ig Inmunoglobulina

IMC Índice de masa corporal

IOP Inonotus obliquus polysaccharide

IPE Insuficiencia pancreática exocrina

## L

L1 Vértebra lumbar 1

L2 Vértebra lumbar 2

LC-HRMS Chromatography coupled to high resolution spectrometry

LDL Low-density lipoprotein

LEOC Litotricia extracorpórea por ondas de choque

## M

MCT Triglicéridos de cadena media

Mg Magnesio

min Minutos

MVA Multivariate analysis

m/z Masa/carga

## N

NAG N-acetil glicoproteína

NAPS Estudio prospectivo de pancreatitis de Norteamérica

NASH Non-alcoholic steatohepatitis



**O**

Ox-PAPC	1-palmitoil-2-arachidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina
---------	---

**P**

PABA	p-amiobenzoic acid
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PC (español)	Pancreatitis crónica
PC (english)	Pancreatic cancer
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PEG	Gastrostomía endoscópica percutánea
PERT	Pancreatic enzyme replacement treatment
PET	Tomografía de emisión de positrones
PGPC	1-palmitoil-2-glytaroil-sn-glicero-3-fosfocolina
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
PMH	Proyecto Metaboloma Humano
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
ppm	Partes por millón
PSCs	Pancreatic stellate cells
PTH	Parathormona

**Q**

QC	Quality control
QT	Quimioterapia
Q-TOF	Triple Quadrupole Time-of-Flight

**R**

RMN	Resonancia magnética nuclear
RPLC	Reverse-phase liquid chromatography
rpm	Revoluciones por minuto
RSD	Desviación estándar relativa
RT (español)	Radioterapia
RT (english)	Retention time

**S**

sCPRM	Colangiopancreatografía por resonancia magnética tras inyección de secretina IV
SDU	Standard drink unit
SIBO	Small intestinal bacterial overgrowth
SO	Solvente orgánico
SPINK-1	Serine protease inhibitor kazal-type 1

**T**

T1DM	Type 1 diabetes mellitus
T2DM	Type 2 diabetes mellitus
T3cDM	Pancreatogenic diabetes mellitus
TC	Tomografía computarizada
TCM	Triglicéridos de cadena media

TEPs	Tumor-educated platelets
TIC	Total ion chromatograms
TOF	Tiempo de vuelo
TSEP	Terapia sustitutiva con enzimas pancreáticas
TR	Tiempo de retención

## U

UI	Unidades internacionales
UK	United Kingdom
USA	United States of America
USE	Ultrasonografía endoscópica
UVA	Univariate analysis

## V

VIP	Variable importance in projection
VLDL	Very low-density lipoprotein

## W

WHO	World Health Organization
-----	---------------------------

## Z

Zn	Zinc
----	------

## 7

7-HOCA	Ácido 7 $\alpha$ -hidroxi-3-oxo-4-colestenoico
--------	--

# Resumen



## II. RESUMEN

La pancreatitis crónica es una enfermedad inflamatoria crónica del páncreas con fibrosis del parénquima, que provoca una pérdida de tejido funcional y conduce, en fases avanzadas, a una insuficiencia tanto exocrina como endocrina del órgano. Esta patología presenta una gran dificultad para su detección precoz, ya que la mayoría de los síntomas derivados y los criterios diagnósticos específicos aparecen de forma tardía. No obstante, y a pesar de estar infradiagnosticada, esta patología posee una elevada prevalencia entre la población general.

La importancia de la detección precoz de la pancreatitis crónica radica en varios aspectos: en primer lugar, la insuficiencia pancreática exocrina derivada predispone a un alto riesgo de desnutrición, además de constituir un factor de riesgo cardiovascular independiente en estos pacientes; a nivel endocrino, la diabetes pancreatogénica, o tipo 3c, es consecuencia del daño que produce la pancreatitis crónica a este nivel, y se suele catalogar, de forma errónea, como diabetes tipo 2, dado que los criterios diagnósticos para ambas son los mismos, y no se investiga la existencia de una patología pancreática subyacente que la propicie; por último, y muy relevante, está ampliamente demostrado que la pancreatitis crónica constituye uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de una patología tan letal como es el cáncer de páncreas.

Dadas las limitaciones existentes a la hora de la detección precoz de estas patologías pancreáticas, parece clara la existencia de una necesidad urgente de desarrollar nuevas herramientas diagnósticas en este campo. La metabolómica se plantea como una alternativa emergente, que puede aportar soluciones al problema de la detección de patologías de difícil diagnóstico, ya que el metaboloma sérico ha demostrado representar el estado funcional de las células, tejidos, órganos e, incluso, del organismo en su conjunto. De este modo, la identificación de cambios en los patrones de metabolitos en el suero de pacientes proporciona una valiosa información sobre los cambios funcionales que se producen por una enfermedad dada, ayudando a establecer su diagnóstico. Hasta la fecha, los estudios existentes sobre la aplicabilidad clínica en páncreas de la metabolómica se han centrado, fundamentalmente, en el cáncer de

páncreas, tanto a nivel de su diagnóstico temprano como en su seguimiento y respuesta a tratamiento. Sin embargo, pensando en obtener una mayor rentabilidad asistencial, parece mucho más adecuado centrar estos esfuerzos en la identificación precoz de grupos de riesgo para esta patología, como son los pacientes de pancreatitis crónica, y así poder establecer un seguimiento temprano de los mismos.

En la presente tesis doctoral planteamos como hipótesis el valor del estudio del patrón de metabolitos séricos para permitir el diagnóstico precoz de la pancreatitis crónica, así como de la insuficiencia pancreática exocrina asociada. Para ello se utilizó una muestra de 53 pacientes con pancreatitis crónica, 32 con y 21 sin insuficiencia pancreática exocrina, y 60 personas sanas. De todos ellos se extrajo una muestra de sangre periférica, que fue procesada para obtener el suero que posteriormente fue analizado mediante espectrometría de masas de alta resolución.

Mediante análisis multivariante, se han identificado tres metabolitos séricos con capacidad para discriminar entre pacientes con pancreatitis crónica y personas sanas. Estos metabolitos se relacionan con el papel proinflamatorio de la microbiota, la disfunción de células  $\beta$  pancreáticas y mecanismos de inflamación, apoptosis y fibrogénicos. Por otra parte, a partir del estudio del patrón de metabolitos exclusivamente en suero de pacientes con pancreatitis crónica, y diferenciándolos en función de la presencia o no de insuficiencia pancreática exocrina en los mismos, se pudieron determinar cuatro metabolitos con capacidad para discriminar entre ambos grupos.

Además, se reclutó un grupo de 21 pacientes con diabetes pancreatogénica y otro de 19 con diabetes tipo 2. El posterior análisis de los metabolitos séricos de ambos grupos por espectrometría de masas nos mostró un panel de cinco metabolitos que permite distinguir de manera eficaz entre ambas patologías.

En conjunto, todos estos resultados indican que la metabolómica es una herramienta que permite identificar diferentes grupos de riesgo en relación a la patología pancreática, y abre la puerta a disponer de biomarcadores que sean útiles para un diagnóstico precoz de las mismas.

Por otro lado, se ha estudiado en estos pacientes con pancreatitis crónica la implicación de la insuficiencia pancreática, tanto exocrina como endocrina, en la progresión de esta patología, observándose una elevada prevalencia de ambas en el curso de la pancreatitis crónica, y siendo su repercusión clínica variable, en función de su severidad y de la instauración de un tratamiento adecuado. También se advirtió cómo la pérdida de función pancreática exocrina y endocrina se produce de forma paralela a la evolución de la pancreatitis crónica, siendo favorecida su progresión por el consumo de tabaco y alcohol. Además, el tabaco se mostró como un factor proinflamatorio crucial, evidenciado por la elevación de reactantes de fase aguda en pacientes fumadores de pancreatitis crónica.

Por último, con el objetivo de mejorar el diagnóstico y tratamiento precoz de la insuficiencia pancreática exocrina, se ha realizado una revisión y actualización del estado del tema referente a los distintos aspectos etiopatogénicos y terapéuticos de este tipo de insuficiencia. A nivel diagnóstico, se propone la utilización de una combinación de los diferentes datos clínicos, analíticos y pruebas de función pancreática para mejorar su detección. A nivel terapéutico, el tratamiento sustitutivo mediante enzimas pancreáticas se ha mostrado capaz de normalizar los parámetros antropométricos aunque no los nutricionales de estos pacientes.





# Summary



### III. SUMMARY

Chronic pancreatitis is a chronic inflammatory disease of the pancreas with parenchymal fibrosis. It produces a loss of functional tissue and leads in advanced stages to both exocrine and endocrine pancreatic insufficiency. Early detection of this disease is highly challenging, given that most of its specific diagnostic symptoms and signs appear at a late stage. Nevertheless, despite its underdiagnosis, there is an elevated prevalence of this disease in the general population.

The early detection of chronic pancreatitis is important for multiple reasons. First, resulting exocrine pancreatic insufficiency carries a high risk of malnutrition and is an independent risk factor for cardiovascular disease. In addition, endocrine damage produced by the disease can lead to pancreatogenic (type 3c) diabetes, which is usually erroneously classified as type 2 diabetes. This is because diagnostic criteria do not differ between types 3c and 2 at endocrine level and the possible involvement of an underlying pancreatic disease is not considered. Finally, it has been widely demonstrated that chronic pancreatitis is one of the main risk factors for the development of pancreatic cancer.

There is an urgent need to overcome the above limitations by developing novel diagnostic approaches to these pancreatic diseases. Metabolomics is an emerging technique that can facilitate the detection of diseases of difficult diagnosis, because the serum metabolome has been found to represent the functional status of cells, tissues, organs, and even the whole organism. Hence, the identification of changes in metabolic patterns in the serum of patients provides valuable data on functional changes produced by a given disease, helping to establish its diagnosis. To date, studies on the clinical applicability of metabolomics in the pancreas have largely centered on the early diagnosis and follow-up of pancreatic cancer and the response to its treatment. However, there is a need to focus efforts on the early identification of groups at risk of such diseases as chronic pancreatitis in order to implement the early follow-up of patients and improve their clinical outcomes.

The hypothesis of this doctoral thesis is that the study of serum metabolite patterns permits the early diagnosis of chronic pancreatitis and associated exocrine pancreatic insufficiency. For the present study, a sample of peripheral blood was drawn from 32 patients with chronic pancreatitis and exocrine pancreatic insufficiency, 21 patients with chronic pancreatitis but not exocrine pancreatic insufficiency, and 60 healthy individuals. Serum obtained from each participant was analyzed by high-resolution mass spectrometry.

Multivariate analysis was used to identify three serum metabolites with the capacity to discriminate between patients with chronic pancreatitis and healthy individuals. These metabolites are related to the proinflammatory role of the microbiota, the dysfunction of pancreatic  $\beta$  cells, and inflammatory, apoptotic, and fibrogenic mechanisms. Study of metabolite patterns in sera from patients with chronic pancreatitis grouped according to the presence or absence of exocrine pancreatic insufficiency identified four metabolites that discriminated between the groups.

In addition, mass spectrometry analysis of serum metabolites from 21 patients with pancreatogenic diabetes and 9 with type 2 diabetes yielded a panel of five metabolites that distinguished between these diseases in an efficacious manner.

Taken together, these results demonstrate the usefulness of metabolomics as a tool to identify different risk groups for pancreatic disease, opening up the possibility to establish useful biomarkers for their early diagnosis.

An investigation was also conducted into the involvement of exocrine and endocrine pancreatic insufficiency in the progression of chronic pancreatitis, revealing an elevated prevalence of both insufficiencies during the course of the disease, with variable clinical repercussions as a function of their severity and the administration or not of appropriate treatment. The study also showed how the loss of exocrine and endocrine pancreatic function increases in parallel to the progression of chronic pancreatitis and is exacerbated by the consumption of tobacco and alcohol. Furthermore, the tobacco habit proved to be a crucial proinflammatory factor, evidenced by the elevation of acute-phase reactants in the patients with chronic pancreatitis who smoked.

Finally, with the aim of favoring the early diagnosis and treatment of exocrine pancreatic insufficiency, a review was conducted to provide an update of knowledge on different etiopathogenic and therapeutic aspects of this insufficiency. In relation to the diagnosis, the utilization of a combination of clinical, analytical, and pancreatic function test results is proposed to improve its detection. With regard to the therapy, replacement treatment with pancreatic enzymes has proven able to normalize anthropometric but not nutritional parameters in these patients.



# Introducción





## IV. INTRODUCCIÓN

### 1. Páncreas: nociones anatómicas y fisiológicas

Anatómicamente, el páncreas es un órgano impar, de morfología alargada en sentido transversal y mucho más voluminoso en su extremo derecho que en el izquierdo. Forma parte del contenido del espacio retroperitoneal, donde se extiende entre el asa duodenal y el bazo, quedando dorsal al cuerpo del estómago y ventral a la columna vertebral (nivel de L1-L2) y músculos de la pared abdominal posterior. Esta localización hace de este órgano uno de los de más difícil exploración, ya sea mediante técnicas de palpación o de imagen. Su inaccesibilidad es, desde el punto de vista clínico, de gran relevancia tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de las patologías que le afectan.

Su morfología ha hecho que clásicamente se distingan en el tres porciones anatómicas diferenciadas denominadas de derecha a izquierda cabeza, cuerpo y cola. La primera, ancha y parcialmente rodeada por la C duodenal, se caracteriza por presentar un relieve craneal (*tuber omentale*) que representa el límite con el cuerpo, y una escotadura inferior (incisura pancreática) que permite el paso de los vasos mesentéricos craneales. La pequeña porción de páncreas situada por detrás de estos vasos se denomina proceso unciforme. La segunda porción o cuerpo del páncreas, porción central, se prolonga sin solución de continuidad con la tercera porción o cola del páncreas, que constituye la zona más estrecha del órgano y la que realmente entra en contacto con el bazo [1].

El sistema excretor del páncreas está constituido por los conductillos intercalares, que reuniéndose de forma progresiva en conductos cada vez de mayor calibre, terminan por formar un gran conducto central que recorre el eje longitudinal del páncreas y que se denomina conducto principal o de Wirsung. Su desembocadura, junto al colédoco, se produce en la segunda porción duodenal originando un relieve denominado ampolla de Vater o papila duodenal mayor. La parte proximal del páncreas dorsal suele conservar un conducto propio que desemboca por encima del anterior (conducto accesorio o de Santorini) que da lugar a una nueva papila ahora denominada papila duodenal menor. Aunque

habitualmente se origina a partir del conducto principal, desde el punto de vista anatómico, existen variaciones respecto a la disposición de ambos conductos [1,2].

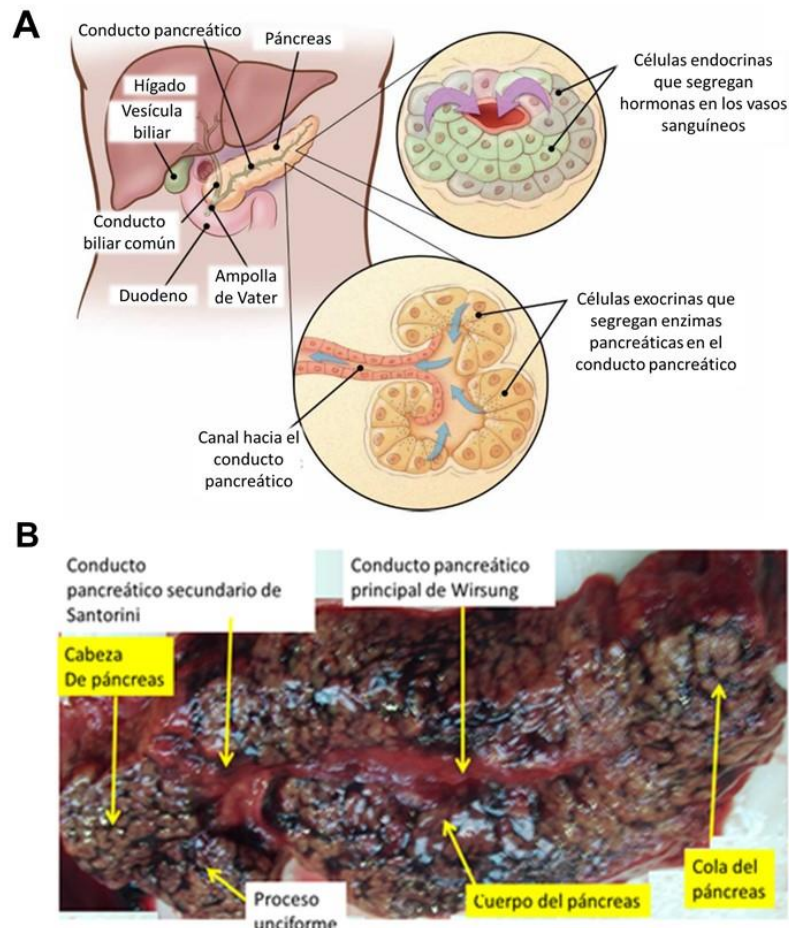
La localización retroperitoneal del páncreas y su disposición alargada hace que este órgano presente gran cantidad de relaciones anatómicas, de gran relevancia desde el punto de vista de la sintomatología, pronóstico y tratamiento, especialmente quirúrgico, para los pacientes que presentan una afección del mismo. Así, cabe destacar la estrecha relación que el cuerpo y la cola del páncreas presentan con la aorta abdominal y los vasos renales izquierdos y la que presenta la cabeza del páncreas, no sólo con el duodeno, sino también con el riñón izquierdo y la vena cava caudal, entre otras.

Por último y en relación a la vascularización del páncreas, cabe destacar su vascularización arterial y venosa, dependientes de la arteria hepática y vena porta, respectivamente, y su red linfática, de gran importancia clínica y que le conecta con las cadenas esplénica, hepática y mesentérica.

Desde un punto de vista fisiológico, el páncreas puede considerarse una glándula mixta con tejido exocrino y endocrino (Figura 1) que representan el 80-85% y el 2% respectivamente, de su volumen total. Los vasos y la matriz extracelular representan tan sólo un 10-15% de dicho volumen [3]. El páncreas exocrino está constituido por los acinos pancreáticos que a su vez están formados por células acinares, centroacinares y ductales. Su secreción es recogida por un sistema ductal que, como ya se ha comentado, termina fusionándose para dar lugar al conducto pancreático principal. Dicha secreción está constituida básicamente por enzimas que intervienen en el proceso digestivo [3]. El tejido endocrino, disperso entre el tejido exocrino aunque más abundante en la cola del páncreas, se encarga de secretar hormonas involucradas fundamentalmente en la homeostasis de la glucosa [4]. La unidad funcional del páncreas endocrino son los islotes de Langerhans, constituidos por varios tipos celulares, siendo los 4 tipos principales: 1) células alfa o A, secretoras de glucagón (15-20% de las células del islote), 2) células beta o B, secretoras de insulina (60-80%), 3) células delta o D, secretoras de somatostatina (5-10%) y 4) células F o PP, secretoras de polipéptido pancreático

(<1%). Además, en la periferia de los islotes de Langerhans existe un tipo celular con características similares a las células de Schwann que representa menos del 1% de su masa y que se ha relacionado con su regeneración [4].

**Figura 1.** Localización e histología del páncreas (A). Imagen obtenida de *American Cancer*



*Society: Pancreatic cáncer*, 2019 [5]. Morfología del páncreas (B). Imagen obtenida de “Manual de Anatomía Humana para Nutrición y Dietética” [6].

## 2. Pancreatitis crónica

La pancreatitis crónica se define como una enfermedad inflamatoria crónica del páncreas, con fibrosis del parénquima y pérdida de tejido funcional que comporta en fases avanzadas insuficiencia exocrina y endocrina de la glándula [7]. La progresión de la fibrosis pancreática y la resultante insuficiencia exocrina y endocrina varía con la etiología [8].

Clásicamente se ha considerado una lesión irreversible, pero el conocimiento más profundo de la enfermedad, sobre todo de sus distintas etiologías, obliga a aceptar la posibilidad de reversibilidad del proceso en

determinados casos. El ejemplo más claro es la pancreatitis crónica autoinmune, cuyas lesiones pueden mejorar e incluso desaparecer con el tratamiento esteroideo [7].

Hay tres formas de pancreatitis crónica basándose en los cambios morfológicos [8]:

- Gran conducto. Se caracteriza por una dilatación del conducto pancreático (> 5 mm) con o sin calcificaciones [8].
- Pequeño conducto. Se caracteriza por la presencia de calcificaciones parenquimatosas y/o piedras intraductales sin dilatación del conducto pancreático (< 5 mm) [8].
- De cambios mínimos. No hay un consenso en su definición. Se define por una historia de pancreatitis agudas recurrentes y/o dolor abdominal tipo pancreatitis crónica con imágenes abdominales que demuestran una apariencia normal del páncreas pero con cambios en ultrasonografía endoscópica (USE), resonancia magnética o colangiopancreatografía por resonancia magnética (CPRM) o pruebas directas de función pancreática endoscópicas. Estos pacientes pueden tener cambios histológicos los cuales sugieren que es un verdadero subtipo morfológico de pancreatitis crónica [8].

La progresión natural de la enfermedad hacia insuficiencia funcional ha sido utilizada para clasificar los estadios evolutivos de la pancreatitis crónica en ABC, sin que esta asignación académica haya conseguido una aceptación universal [9].

El estadio A representa la fase inicial de una pancreatitis crónica donde no se han producido complicaciones ni existe insuficiencia funcional. Se caracteriza por brotes de pancreatitis aguda o dolor pancreático de cualquier tipo de intensidad [9].

El estadio B es el que presenta complicaciones sin insuficiencia funcional, y el estadio C el que ya presenta insuficiencia exocrina (malnutrición, esteatorrea) o endocrina (diabetes mellitus) con o sin complicaciones [9].

## 2.1 Epidemiología

La pancreatitis crónica es una enfermedad claramente poco diagnosticada. Esto se debe por un lado a la dificultad de alcanzar un diagnóstico de certeza de la enfermedad. La mayoría de los criterios diagnósticos que se consideran específicos de la enfermedad son hallazgos tardíos, de forma que el diagnóstico de la pancreatitis crónica en fases tempranas es actualmente infrecuente [10].

Por otra parte, los síntomas de la enfermedad, como dolor epigástrico, síntomas dispépticos o síntomas que simulan un síndrome de intestino irritable, son inespecíficos y exigen un alto nivel de sospecha para poder alcanzar el diagnóstico [10].

La pancreatitis crónica supone hasta el 3% de los pacientes con dispepsia no investigada y la cuarta parte de los pacientes diagnosticados de dispepsia funcional tipo síndrome de dolor epigástrico, lo que da una idea de su elevada prevalencia real [7].

Es interesante reseñar que alrededor del 6% de los pacientes diagnosticados de síndrome de intestino irritable con predominio de diarrea presentan en realidad pancreatitis crónica con insuficiencia pancreática exocrina y, de hecho, el tratamiento enzimático sustitutivo se asocia a la desaparición de los síntomas [7].

Teniendo en cuenta que la supervivencia media de los pacientes diagnosticados de pancreatitis crónica es de 20 años, las cifras de prevalencia publicadas de entre 3 y 35 casos por  $10^5$  habitantes están muy lejos de las esperables para una enfermedad con una incidencia publicada de entre 5 y 14 casos por  $10^5$  habitantes y año [10].

## 2.2 Etiología

La mayoría de los casos de pancreatitis crónica se deben a los siguientes desórdenes.

## **Tóxica por abuso de alcohol y/o tabaco**

El abuso de alcohol ha sido causa del 70 – 80% de los casos de pancreatitis crónicas. El tabaco también parece incrementar el riesgo de progresión de la enfermedad [11].

Sin embargo, solo un 5 – 10 % de los alcohólicos desarrollan pancreatitis crónica por lo que otros factores pueden ser importantes en la patogénesis de la enfermedad. La asociación entre alcohol y pancreatitis crónica es compleja y estos altos porcentajes probablemente sobreestimen la contribución del alcohol [11].

En un estudio de gran cohorte realizado en EEUU, el 45% de los casos fueron atribuidos al alcohol y en las mujeres fue la causa menos frecuente. No obstante, debe puntualizarse dos limitaciones del mismo. Por un lado, no incluyó información sobre la cantidad y duración del consumo de alcohol. Por otra parte, en caso de existir varios factores contribuyentes, se consideró el alcohol como primera causa [12].

La suposición de que una gran proporción de casos de pancreatitis crónica son atribuidos al alcohol lleva a etiquetar de alcohólicos a pacientes cuando no puede encontrarse otra causa alternativa. Por lo tanto, son necesarios más estudios con criterios diagnósticos estrictos que permitan clarificar la verdadera prevalencia de pancreatitis crónicas inducidas por el alcohol [11].

Mientras muchos estudios antiguos sugerían una asociación entre fumar y pancreatitis crónica, los datos que apoyan la asociación independiente entre el tabaquismo y pancreatitis crónica han sido muy fortalecidos por estudios recientes [8], como el estudio prospectivo de Pancreatitis de Norteamérica (NAPS) [13], que describen una asociación dosis y tiempo dependiente entre tabaco y pancreatitis crónica. Imoto y DiMagno encontraron en pacientes diagnosticados de pancreatitis crónica no alcohólica de inicio tardío que fumaban que tenían una mayor prevalencia de calcificaciones [14]. Esta correlación entre fumar y pancreatitis crónica idiopática ha sido descrita en otros estudios [8].

Fumar parece acelerar el desarrollo de calcificaciones pancreáticas y diabetes en pacientes con pancreatitis alcohólica, independientemente de la

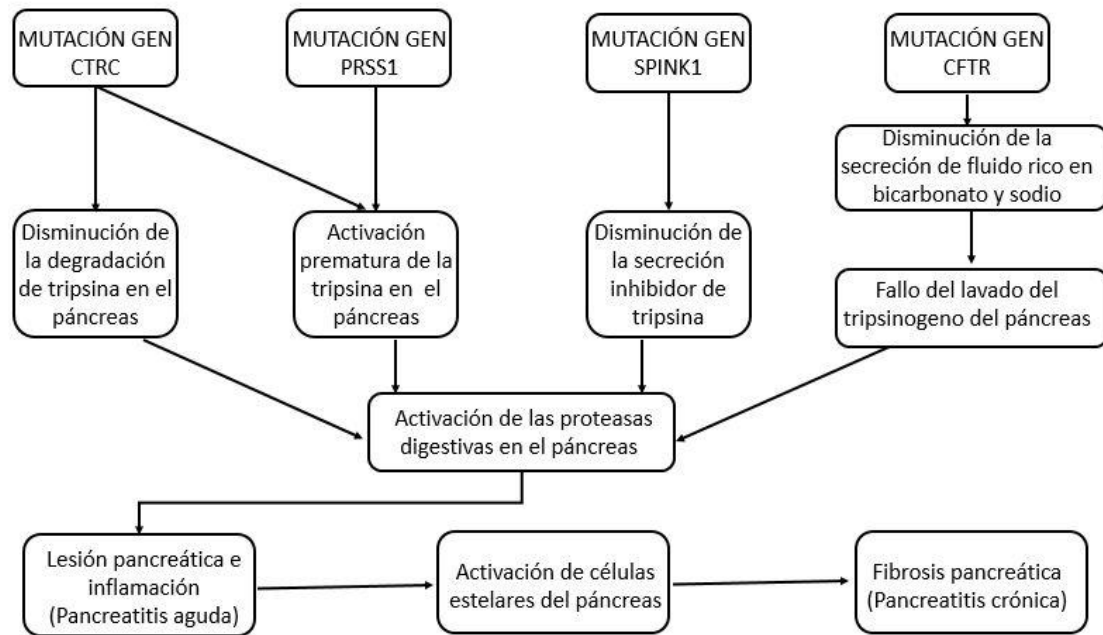
cantidad de alcohol consumido. Estos datos sugieren que muchos pacientes con pancreatitis crónica, los cuales han sido previamente considerados como una etiología idiopática, probablemente desarrollen pancreatitis crónica debido a fumar [8].

### **Causas genéticas**

En los últimos años se han asociado mutaciones genéticas con la pancreatitis crónica. Entre estos genes se han incluido el gen CFTR responsable de la fibrosis quística; SPINK-1, el cual codifica el inhibidor del tripsina; PRSS-1, gen asociado a la pancreatitis hereditaria; y CTSC [11, 8]. Sin embargo, los análisis genéticos de rutina no están recomendados dado que son caros y no suponen un cambio en el manejo de la enfermedad [11].

La pancreatitis hereditaria es transmitida con carácter autosómico dominante [11] y se debe a mutaciones del gen PRSS1 [8]. La mayoría de los individuos afectados desarrollan síntomas antes de los veinte años y a menudo antes de los cinco [11]. Tienen su episodio inicial de pancreatitis aguda de media a los 10 años y muestran signos de pancreatitis crónica en la siguiente década. Esta mutación ha sido observada por encima del 3% de los pacientes con pancreatitis crónica en los Estados Unidos [8]. Se asocia con un marcado incremento del riesgo de adenocarcinoma de páncreas [11].

Mutaciones en el gen de la fibrosis quística (CFTR) han sido identificadas en algunos adultos con pancreatitis crónica idiopática que no tienen otra evidencia de fibrosis quística [11, 8]. Estos pacientes son suficientes pancreáticamente, y son susceptibles de pancreatitis agudas recurrentes y tienen un riesgo mayor de pancreatitis crónica [8]. La mayoría de los test de cribado genético solo identifican las mutaciones de CFTR más severas que causan la fibrosis quística en niños. Es posible que un número de mutaciones más leves del locus de CFTR puedan asociarse con la pancreatitis crónica [11].



**Figura 2.** Diagrama que ilustra mutaciones genéticas y vías de acción en pancreatitis crónica. Modificado de Afghani y cols, 2014 [8].

Pacientes con mutaciones heterocigóticas de SPINK1 en conjunción con PRSS1, CFTR o CTRC incrementan el riesgo de pancreatitis crónica. Variantes heterocigóticas de CFTR y SPINK1 son halladas más comúnmente en pacientes con pancreatitis crónica. Variantes heterocigóticas de CTRC en conjunción con PRSS1, CFTR o SPINK1 también incrementan el riesgo de pancreatitis crónica [8].

### Obstrucción ductal

Asociada a traumatismo, pseudoquistes, piedras, tumores, páncreas divisum, disfunción del esfínter de Oddi [11].

### Enfermedades sistémicas

Lupus eritematoso sistémico, hipertrigliceridemia, hiperparatiroidismo, fibrosis quística [11].

### Autoinmune

El desorden se asocia con una elevación de las concentraciones de Ig G4 [11].



## **Tropical**

Es una condición de etiología desconocida que se da comúnmente en el sur de la India y otras áreas de los trópicos [11].

## **Idiopática**

La mayoría de los casos de pancreatitis crónica que se relacionan con el abuso de alcohol son idiopáticos. Entre los factores que pueden ser factores contribuyentes se encuentran la ingesta de alcohol oculta, la hipersensibilidad a la ingesta de pequeñas cantidades de alcohol, traumatismos desapercibidos, y mutaciones en el gen del tripsinógeno catiónico (responsables de pancreatitis hereditaria) y el gen de la fibrosis quística [11].

## **2.3 Manifestaciones clínicas y complicaciones**

Las dos principales manifestaciones clínicas de la pancreatitis crónica son el dolor abdominal y la insuficiencia pancreática.

### **Dolor abdominal**

El dolor abdominal es un síntoma debilitante y es la primera razón por la que los pacientes afectados por esta condición buscan atención médica [8].

El dolor abdominal de tipo pancreático se localiza de forma característica en epigastrio, a menudo se irradia hacia la espalda [15], y típicamente empeora después de las comidas (15 – 30 minutos), especialmente después del consumo de comidas con gran contenido en grasas, y puede asociarse con disminución del apetito, malnutrición y pérdida de peso [8].

Se distinguen dos patrones de dolor: episodios de dolor de menos de 10 días con intervalos libres de dolor de meses a un año y períodos prolongados de dolor diario con exacerbaciones de dolor severo [15].

### **Insuficiencia pancreática exocrina**

La insuficiencia pancreática exocrina (IPE) es directamente atribuible a la pérdida de masa de células acinares y/u obstrucción de los conductos pancreáticos en pancreatitis crónica [8]. Se produce cuando el grado de destrucción del parénquima pancreático es tan importante que la producción de

enzimas digestivas (amilasa, lipasa, tripsina) no puede mantenerse en el nivel necesario [16], así como la reducción de secreción ductal de bicarbonato [8] que es requerida en el lumen duodenal, para digerir adecuadamente las comidas ni absorber compuestos parcialmente digeridos [17] siendo causante de mala digestión, esteatorrea y desnutrición [16].

La mayor parte de los pacientes con pancreatitis crónica acaban presentando una insuficiencia pancreática exocrina (IPE) tras una mediana de 12 años después del diagnóstico de pancreatitis crónica [16].

La malabsorción de grasas se manifiesta con heces malolientes y grasientas (esteatorrea) [17, 18]. Ocurre principalmente tras la ingesta de comidas de gran contenido graso y a veces no es un síntoma diario. Como la esteatorrea ocurre después de las comidas, esto típicamente ocurre de dos a tres veces al día en individuos con contenido normal de lípidos en la dieta [18]. La esteatorrea suele ser la primera y más prominente de las manifestaciones de IPE que se producen cuando la secreción de lipasa pancreática desciende por debajo del 10% de la actividad normal. La IPE se instaura de forma lenta a lo largo del tiempo, y los pacientes pueden adaptarse a la disminución de la capacidad de digestión de las grasas reduciendo de manera inconsciente y progresiva el consumo de grasas en la dieta [16].

La reducción de la secreción de bicarbonato y/o la obstrucción de los conductos pancreáticos en la pancreatitis crónica conduce a una bajada del pH intestinal, causando desnaturalización e inactivación de la lipasa. La mala digestión resultante de las grasas lleva a un incremento de la liberación de lípidos en el intestino delgado distal, una insuficiente formación de micelas y precipitación de ácidos biliares debido a una acidificación en el intestino proximal causando esteatorrea. Dado el elevado aporte calórico de las grasas (38 KJ/g), la malabsorción de grasas es también responsable de la pérdida de peso en la pancreatitis crónica [8].

La disminución de la secreción de amilasa lleva a la mala digestión de los carbohidratos o amilorrea, lo cual puede causar distensión abdominal, flatulencias, heces sueltas y pérdida de peso. Amilorrea puede ocurrir en pancreatitis crónica severa, dando lugar a una pérdida calórica fecal [8].

El descenso de la secreción de tripsina desencadena en la mala digestión de proteínas y azotorrea, lo cual ocurre cuando la pérdida fecal de proteínas es > 2.5 g de nitrógeno, y puede causar edema y retención de líquido en el abdomen [8].

Sin embargo, la esteatorrea típicamente ocurre antes de amilorrea y azotorrea dado que la lipasa es más susceptible al ácido y la degradación proteolítica [8]. La deficiencia de proteínas y grasas no se hace clínicamente significativa hasta que se ha perdido el 90% de la función pancreática [17].

La malabsorción de vitaminas liposolubles y vitamina B12 también puede ocurrir, aunque es raro que se manifieste clínicamente el déficit vitamínico [3]. La deficiencia de estas vitaminas se correlaciona con la severidad de la esteatorrea. El déficit de vitamina E puede ser visto más a menudo que las deficiencias de vitaminas A, D y K [17]. Sin embargo, un reciente estudio prospectivo que evaluó a 40 pacientes con PC reveló que la deficiencia de vitamina K fue más común afectando al 63% de la cohorte, seguido de la vitamina D con un 53%, vitamina E con un 10%, y vitamina A con un 3% [19]. La osteopatía (osteoporosis, osteomalacia, osteopenia) puede ocurrir en hasta el 25% de los pacientes con pancreatitis crónica. Los cambios de fibrosis así como la atrofia y cambios ductales se asocian con la insuficiencia exocrina tal como se refleja en la deficiencia de vitamina D. Deficiencias de calcio, magnesio, tiaminas y ácido fólico también se han descrito [17]. La siguiente tabla muestra las deficiencias de vitaminas y minerales comunes, los métodos para su diagnóstico y las consecuencias asociadas a su depleción [8].

<b>Deficiencia nutricional</b>	<b>Parámetros analíticos</b>	<b>Consecuencias</b>
<b>Vitamina A</b>	Proteína fijadora de retinol	Xeroftalmia (sequedad de conjuntiva y córnea)
	Niveles séricos de retinol	Ceguera nocturna
	Carotenos	Retinopatía
		Alteraciones dermatológicas, incluido hiperqueratosis folicular y destrucción de folículos
		Disfunción inmune

<b>Vitamina D</b>	25-hidroxi vitamina D	Osteomalacia  Convulsiones  Tetania
<b>Vitamina E</b>	Niveles séricos tocoferol	Síndrome espinocerebeloso, incluyendo ataxia, hiporreflexia, menor sensación de vibración, pérdida de propiocepción  Neuropatía periférica  Miopatía esquelética
<b>Vitamina K</b>	INR/ tiempo protrombina	Diátesis hemorrágica
<b>Vitamina B12</b>	Vitamina B12 serica	Degeneración combinada subaguda (neuropatía periférica, ataxia, pérdida destreza)  Debilidad  Anemia macrocítica  Glositis  Estomatitis  Osteoporosis
<b>Calcio</b>	Calcio ionizado	Osteoporosis
<b>Folato</b>	Ácido fólico sérico	Anemia macrocítica  Glositis  Queilosis  Estomatitis  Fatiga
<b>Zinc</b>	Zinc sérico	Alteración del gusto y el olfato  Pérdida de pelo  Disminución actividad antioxidante  Disfunción inmune  Deficiencia agregación plaquetaria

<b>Cobre</b>	Cobre sérico	Mielopatía
	Niveles ceruloplasmina	Ataxia sensorial, espasticidad, neuropatía periférica
		Pérdida visión
		Anemia, leucopenia
<b>Magnesio</b>	Niveles séricos magnesio	Vinculado a hipocalcemia e hipoparatiroidismo
	PTH	Cambios electrocardiográficos
		Tetania, convulsiones

**Tabla 1.** Deficiencias nutricionales en pancreatitis crónica. Modificado de Afghani y cols, 2014 [8].

### **Insuficiencia pancreática endocrina**

El desarrollo de diabetes mellitus (tipo 3c) en pancreatitis crónica es directamente atribuible a la progresiva destrucción del parénquima pancreático, lo que conlleva la pérdida de los islotes alfa y beta, los cuales producen glucagón e insulina respectivamente [8].

La intolerancia a la glucosa ocurre con frecuencia en la pancreatitis crónica, pero el desarrollo de diabetes mellitus sucede normalmente al final de la enfermedad [15]. La diabetes mellitus tipo 3c se observa en el 5 – 10 % de todos los casos de diabetes mellitus, y el 75 – 80 % de estos pacientes tienen pancreatitis crónica [8].

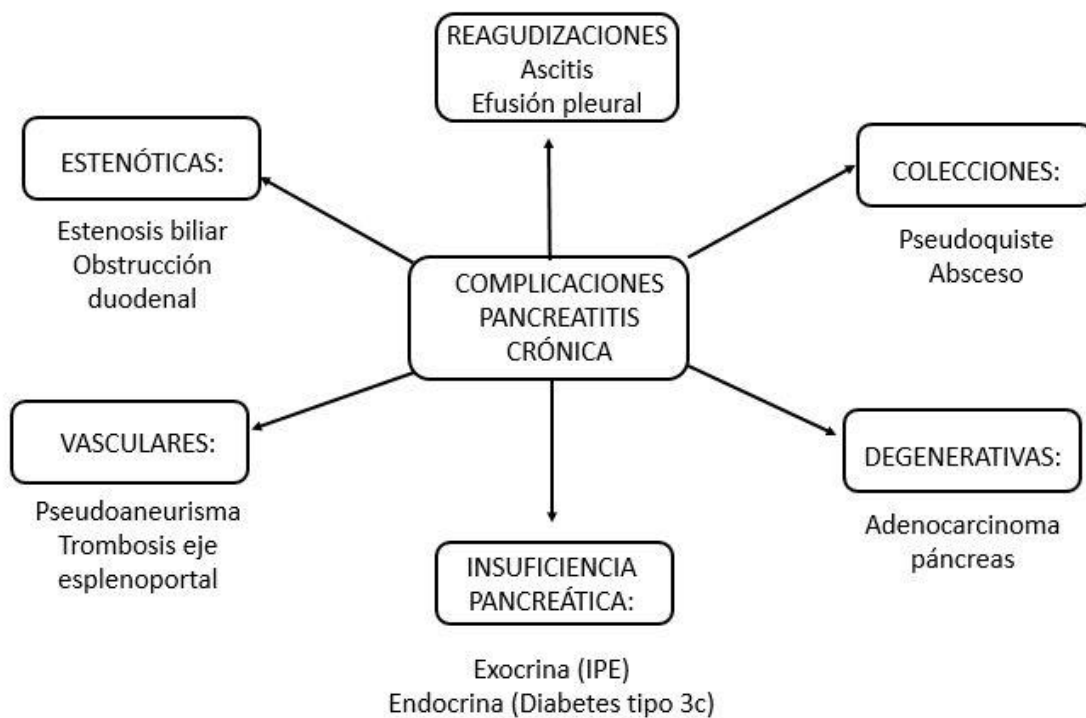
La aparición precoz de calcificaciones, la pancreatitis crónica de larga duración, y la pancreatectomía parcial previa son factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 3c [8].

La diabetes mellitus (tipo 3c) es dependiente de insulina. La cetoacidosis diabética y la nefropatía son raras, pero la neuropatía y la retinopatía ocurren con más frecuencia. Hay un riesgo mayor de hipoglucemias [15]. La alteración del metabolismo de la glucosa, los hábitos de comidas erráticos, la ingesta variable de alcohol y la malabsorción asociada incrementan los episodios de hipoglucemias [8].

Se observa una deficiencia de zinc en asociación con la diabetes [15].

### Complicaciones [15, 20]

- Pseudoquiste pancreático
- Mala digestión/malabsorción
- Diabetes mellitus
- Estenosis biliar
- Obstrucción duodenal
- Ascitis pancreática y efusión pleural
- Trombosis de la vena esplénica
- Trombosis portal
- Pseudoaneurisma
- Absceso pancreático
- Enfermedades extrapancreáticas
- Cáncer de páncreas



**Figura 3.** Complicaciones de pancreatitis crónica

Aunque la complicación más frecuente es el pseudoquiste, en este apartado nos centramos en el cáncer de páncreas al constituir la complicación

más grave que hace necesario un seguimiento periódico de los pacientes con esta patología.

Hay datos que sugieren que la pancreatitis crónica está asociada con un incremento del riesgo de desarrollar carcinoma pancreático [15]. Un estudio de cohortes prospectivo de 373 pacientes con pancreatitis crónica halló que el riesgo de desarrollar cáncer pancreático fue más marcado que en los controles sin pancreatitis crónica emparejados por sexo y edad [21].

El riesgo de desarrollar cáncer pancreático en pancreatitis crónica también varía según la etiología. Fumar se asocia con incremento del riesgo al doble y los fumadores desarrollan cáncer pancreático 20 años antes comparándolos con los pacientes no fumadores con pancreatitis crónica [8].

Hallazgos sugestivos de cáncer de páncreas en un paciente diagnosticado de pancreatitis crónica incluyen la edad avanzada, la ausencia de una historia de uso de alcohol, pérdida de peso, una exacerbación extensa de los síntomas o el inicio de síntomas constitucionales significativos. Marcadores como Ca 19-9 y antígeno carcinoembrionario (CEA) son de ayuda si son anormales, pero valores normales no excluyen el diagnóstico [15].

La realización de analítica completa y ecografía abdominal con periodicidad anual es un seguimiento adecuado para la mayoría de los pacientes con pancreatitis crónica. Puede ser recomendable la realización de una ecoendoscopia cada 2 – 3 años para la detección precoz de complicaciones, aunque la evidencia a este respecto es limitada [20].

En caso de cambio en el curso clínico de la enfermedad (aparición de nuevos síntomas o signos, o intensificación de los presentes) debe realizarse una ecoendoscopia con el fin de descartar complicaciones y, básicamente, el desarrollo de cáncer de páncreas. El TAC dinámico multicorte abdominal es la técnica alternativa, aunque menos sensible en este contexto. Además, la ecoendoscopia permite la realización de técnicas asociadas (elastografía, contrastes ecográficos) y la toma de biopsia [20].

La demostración de la presencia de una masa pancreática obliga a la realización de una punción – aspiración o biopsia con aguja fina para el

diagnóstico diferencial entre masa inflamatoria y cáncer. Con este mismo fin, el desarrollo de la elastografía guiada por ecoendoscopia y de la aplicación de medios de contraste ecográficos ayudan a incrementar la eficacia diagnóstica de la ecoendoscopia [20].

Un resultado cito-histológico negativo para malignidad debe ser reevaluado a corto plazo mediante nueva ecoendoscopia y punción, sobre todo si la elastografía es compatible con malignidad. En casos en los que tanto la cito-histología como la elastografía sean compatibles con masa inflamatoria, la probabilidad de malignidad es baja y puede demorarse el control ecoendoscópico a 6 meses y posterior seguimiento habitual [20].

#### **2.4. Métodos diagnósticos**

El diagnóstico de la pancreatitis crónica sigue basándose en la demostración de los cambios morfológicos y/o funcionales que son consecuencia de las lesiones histológicas [7]. Por tanto, se basa en una combinación de síntomas clínicos confirmados por criterios morfológicos, funcionales y/o histológicos, pero no hay una prueba de referencia universalmente aceptado para el diagnóstico [8].

No hay un estudio único de laboratorio, radiográfico o endoscópico único que pueda diagnosticar con fiabilidad la pancreatitis crónica temprana, porque las características fácilmente identificables de pancreatitis crónica pueden tardar muchos años en desarrollarse y, en algunos pacientes, pueden no desarrollarse en absoluto. El diagnóstico de la pancreatitis avanzada, por el contrario, es relativamente sencillo porque las pruebas de imagen abdominales de rutina pueden demostrar cambios ductales y calcificaciones en la glándula [8].

Así pues, las pruebas diagnósticas pueden dividirse en dos grupos: aquellas que evalúan la estructura pancreática y las que evalúan la función pancreática [22].

##### **2.3.1 Análisis de sangre**

##### **Amilasa y lipasa**



Pueden elevarse un poco, pero no tienen valor diagnóstico ni pronóstico en la pancreatitis crónica [15].

### **Bilirrubina y fosfatasa alcalina.**

Su elevación sugiere compresión de la porción intrapancreática del colédoco [15].

### **Marcadores de autoinmunidad**

IgG4, ANA, anticuerpos anti músculo liso, factor reumatoide [15].

### **Vitaminas y minerales.**

La medición de sus niveles séricos permite diagnosticar la depleción de los mismos [8].

### **Parámetros nutricionales séricos**

Pueden ayudar al diagnóstico de insuficiencia pancreática exocrina en pacientes con pancreatitis crónica [8]. En un estudio la insuficiencia pancreática endocrina fue diagnosticada en caso de diabetes manifiesta (clasificada como HbA1c > 48 mmol/mol o glucosa en ayunas > 7.0 mmol/l) secundaria a insuficiencia pancreática por pancreatitis crónica [23].

## **2.3.2 Estudio anatomopatológico**

Las pruebas histológicas han sido a menudo sugeridas como la prueba de referencia para el diagnóstico de pancreatitis crónica. Sin embargo, la toma de biopsias de páncreas no se realiza en la práctica clínica diaria debido al riesgo de pancreatitis aguda, especialmente en pacientes con enfermedad precoz o leve [8].

Adicionalmente, la pancreatitis crónica puede ser focal, una enfermedad irregular y no hay un acuerdo universal entre patólogos sobre cuanta fibrosis es requerida para el diagnóstico de pancreatitis crónica, así como los cambios que ocurren en el páncreas con la edad y con el alcohol y el tabaco en la mayoría de los pacientes [8].

### 2.3.3 Pruebas de imagen y endoscópicas

La pancreatitis crónica determina la aparición de lesiones histopatológicas de curso progresivo que condicionan alteraciones tanto ductales como parenquimatosas. Las primeras pueden detectarse por colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE), colangiopancreatografía por resonancia magnética (CPRM) o ultrasonografía endoscópica (USE). Las segundas pueden demostrarse por USE, tomografía computarizada (TC) o resonancia nuclear magnética (RNM). Tanto unas como otras pueden definirse de acuerdo con la clasificación de Cambridge [7].

	<b>Criterios ductales</b>	<b>Criterios parenquimatosos</b>
Cambios equívocos	CPP normal y < 3 ramas colaterales anormales	Ligero aumento del tamaño glandular
Cambios leves	CPP normal y > 3 ramas colaterales anormales	Ligero aumento del tamaño glandular y parénquima heterogéneo
Cambios moderados	CPP irregular y/o ligeramente dilatado	Contorno glandular irregular, y/o quistes < 10 mm, y/o pancreatitis focal
Cambios graves	CPP marcadamente irregular y dilatado y/o calcificaciones intraductales	Calcificaciones y/o quistes > 10 mm y/o afectación de órganos vecinos

**CPRE:** colangiopancreatografía retrógrada endoscópica; **sCPRM:** colangiopancreatografía por resonancia magnética tras inyección iv de secretina; **TC:** tomografía computarizada; **RNM:** resonancia nuclear magnética; **CPP:** conducto pancreático principal

**Tabla 2.** Criterios para el diagnóstico morfológico de la pancreatitis crónica. Modificado de Domínguez, 2012 [7].

### Radiografía simple de abdomen

Es útil si extensas calcificaciones pancreáticas están presentes [8]. Las calcificaciones del conducto pancreático están presentes en aproximadamente el 30% de los pacientes con pancreatitis crónica, siendo más común en los casos de pancreatitis alcohólica, hereditaria y tropical [15].

## **Ecografía abdominal**

La sensibilidad y especificidad son del 60-70% y 80-90% respectivamente [15]. La ecografía abdominal al igual que la radiografía simple de abdomen muestra una sensibilidad muy baja limitándose prácticamente a los casos avanzados de calcificaciones pancreáticas [7]. Puede ser usada también para evaluar cambios del conducto pancreático y pseudoquistes. Sin embargo, su uso es a menudo limitado porque la interposición de aire puede impedir la visualización del páncreas [8].

## **Tomografía computarizada (TC) de abdomen**

La sensibilidad y especificidad son del 75-90% y 85% respectivamente [15]. La TC muestra una sensibilidad claramente inferior a la USE y a la sCPRM/RMN en casos no avanzados de la enfermedad [7]. Los hallazgos valorables incluyen las calcificaciones parenquimatosas e intraductales y la dilatación del conducto pancreático. También es útil para excluir otras condiciones asociadas con dolor en abdomen superior así como descartar otras lesiones pancreáticas [8].

La presencia de calcificaciones parenquimatosas tiene una sensibilidad del 96% y una especificidad del 67% para el diagnóstico de pancreatitis crónica, mientras que la presencia de calcificaciones intraductales tiene una sensibilidad del 43% y una especificidad del 88% [8].

La dilatación del conducto pancreático principal > 3 mm en cabeza y > 2 mm en cuerpo y cola de páncreas tiene una baja sensibilidad y especificidad del 56% y 57% respectivamente [8].

El TC puede ser usado también para valorar complicaciones que pueden asociarse a la pancreatitis crónica como pseudoquistes, estenosis duodenal, estenosis de la vía biliar y trombosis de la confluencia esplenoportal [8].

## **Colangiopancreatografía por resonancia magnética (CPRM)**

Puede detectar los cambios precoces de pancreatitis crónica, incluyendo pérdida de señal en T1 o la irregularidad de las ramas colaterales del conducto pancreático principal, así como cambios más pronunciados de pancreatitis

crónica incluidos la dilatación del conducto pancreático principal, ectasia de ramas colaterales y atrofia [8].

Ha llegado a ser el test diagnóstico de elección desde que puede demostrar calcificaciones y obstrucción del conducto pancreático compatible con pancreatitis crónica [15].

La mejora con secretina ha sido cada vez más estudiada para evaluar la función exocrina del páncreas y en el diagnóstico precoz de la pancreatitis [15]. La CPRM con secretina asociada a la RNM con gadolinio ofrecen una eficacia diagnóstica similar a la USE [7].

La CPRM mejorada con secretina produce más distensión fisiológica del conducto pancreático y ha mostrado ser una herramienta potencialmente útil en el diagnóstico de pancreatitis crónica ya que permite visualizar las ramas colaterales que de otra manera no podrían verse en la CPRM de rutina [8].

### **Colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE)**

Es considerada una prueba sensible para el diagnóstico de pancreatitis crónica y tiene la capacidad de mostrar dilatación o estenosis del conducto pancreático principal y sus ramas colaterales así como las características precoces de pancreatitis crónica [8].

Ha sido frecuentemente la técnica de elección en el diagnóstico cuando las calcificaciones no están presentes en la radiografía simple de abdomen y no hay evidencia de esteatorrea. Sin embargo, con los avances en la calidad de la MRCP para visualizar los conductos pancreáticos (con o sin secretina), se ha limitado el uso de la CPRE a los casos con la necesidad potencial de intervención terapéutica<sup>3</sup>. La CPRE no debe ser usada para el diagnóstico de pancreatitis crónica desde que hay pruebas de imagen menos invasivas y debido a un incremento del riesgo de pancreatitis post-CPRE [8].

La clasificación de Cambridge es usada para tipificar los cambios en la pancreatitis crónica basados en el pancreatograma obtenido durante la CPRE. La clasificación califica los cambios basados en la presencia de dilatación, estenosis y el número de dilataciones de ramas colaterales. Divide a los pacientes en tres categorías basándose en los cambios ductales: cambios

equivocos (Cambridge I), leves y moderados cambios (Cambridge II) y cambios graves (Cambridge III) (3). Sin embargo, la primera limitación de esta clasificación es que no correlaciona con los hallazgos histológicos [8]. Además, algunos pacientes en estadios tempranos de la enfermedad tienen una CPRE normal de manera que otros estudios de imagen (ecoendoscopia) o test de función pancreática deben ser considerados [15].

### **Ultrasonografía endoscópica (USE).**

Puede ser tan sensible como la CPRE o pruebas de función pancreática, pero requiere una gran habilidad del gastroenterólogo [15]. En la actualidad se considera como el método más sensible y eficaz para el diagnóstico de la pancreatitis crónica [7]. Evalúa las anomalías morfológicas del parénquima pancreático y conductos [8].

La clasificación estándar define las anomalías del parénquima pancreático las cuales incluyen focos hiperecogénicos, bandas hiperecogénicas, quistes y lobularidad; así como las anomalías del conducto pancreático que incluyen cálculos en conducto pancreático principal, irregularidad del conducto pancreático principal, ramas colaterales visibles, dilatación del conducto pancreático principal y márgenes hiperecogénicos del conducto principal [8].

<b>Criterios parenquimatosos</b>	<b>Criterios ductales</b>
Puntos hiperecogénicos con sombra acústica	Cálculos en conducto pancreático principal
Lobularidad con o sin patrón en panal de abeja	Contorno irregular del conducto pancreático principal
Puntos hiperecogénicos sin sombra acústica	Dilatación de ramas colaterales
Quistes	Dilatación del conducto pancreático principal
Bandas hiperecogénicas	Márgenes hiperecogénicos del conducto pancreático principal

**Tabla 3.** Criterios ecoendoscópicos de pancreatitis crónica. Modificado de Domínguez, 2012 [7].

La primera limitación de la ultrasonografía es el pobre acuerdo interobservador entre gastroenterólogos y el hecho de identificar las características de pancreatitis crónica es dependiente de la experiencia del operador [8].

Recientemente un grupo de expertos ha dividido los criterios ecoendoscópicos en mayores y menores en la denominada clasificación de Rosemont [7]. Muchos ecoendoscopistas consideran la presencia de cuatro o más de estos hallazgos muy sugerentes de pancreatitis crónica [15].

---

**Criterios mayores:**

---

A1. Focos hiperecoicos parenquimatosos de 2 mm o más con sombra acústica

---

A2. Cálculos en el conducto principal

---

B. Lobularidad difusa del páncreas (3 lóbulos contiguos o más)

---

**Criterios menores:**

---

1. Quistes

---

2. Conducto principal dilatado (> 3.5 mm en cabeza o > de 1.5 mm en cola)

---

3. Contorno del conducto principal irregular

---

4. 3 o más conductos secundarios dilatados (> 1 mm)

---

5. Pared del conducto principal hiperecoica en más del 50% en cuerpo o cola

---

6. Estrías (líneas hiperecoicas de 3 mm o más en al menos dos direcciones de plano diferentes)

---

7. Focos hiperecoicos sin sombra posterior de 2 mm o menos

---

8. Lobularidad focal (lóbulos no contiguos)

---

**Hallazgos consistentes con pancreatitis crónica:**

---

A. A1 + A2

---

B. Un criterio mayor A + criterio mayor B

---

C. Un criterio mayor A y 3 criterios menores o más

---

**Hallazgos indicativos de pancreatitis crónica:**

---

A. (A1 o A2) y menos de 3 criterios menores

---

B. Criterio mayor B y 3 criterios menores o más

---

C. Cinco criterios menores o más sin ningún criterio mayor

---

**Pancreatitis crónica indeterminada:**

---

A. Tres o 4 criterios menores sin ningún criterio mayor

---

B. Criterio mayor B con menos de 3 criterios menores

---

**Páncreas normal:**

---

A. Dos o menos criterios menores

---

**Tabla 4.** Criterios de Rosemont para el diagnóstico de pancreatitis crónica a través de ecoendoscopia. Modificado de Vaquero y Molero, 2011 [9].

Sin embargo, recientemente no se ha demostrado mejorar el acuerdo interobservador con la clasificación de Rosemont comparado con la clasificación estándar y se ha mostrado que la clasificación de Rosemont es más compleja que el sistema de clasificación estándar [8].

#### **2.3.4 Pruebas de función pancreática**

La función pancreática exocrina es actualmente diagnosticada usando dos grupos de pruebas, directas e indirectas [18]. Las directas consisten en estimular el páncreas (células acinares y ductales) usando secretagógos como secretina o colecistoquinina para después recoger y analizar la cantidad normal de contenido de la secreción pancreática. La función principal es el diagnóstico temprano de la pancreatitis crónica [15]. Son los test más sensibles [18]. Tienen el inconveniente de ser laboriosas, invasivas, costosas y molestas para el paciente [16]. Solo está disponible en unos pocos centros y no está indicado en la práctica clínica [18].

##### **Test de intubación duodenal**

Cuantificación de la secreción pancreática de enzimas y/o bicarbonato en muestras de jugo duodenal obtenidas mediante intubación duodenal con sonda nasoduodenal durante la estimulación submáxima del páncreas con secretina y/o CCK o ceruleína [7].

##### **Test endoscópico**

Cuantificación de la concentración de bicarbonato tras inyección de secretina obteniendo el jugo pancreático mediante la aspiración en el curso de una endoscopia digestiva alta [7]. Dichas pruebas de función pancreática endoscópica son más sensibles para la detección de pancreatitis crónica que la CPRE en pacientes con imágenes negativas o no concluyentes para pancreatitis crónica [8].

Las pruebas indirectas miden las consecuencias de la insuficiencia pancreática y están más disponibles. Las consecuencias de la mala digestión

pancreática no aparecen hasta la secreción normal enzimática ha declinado más de un 90%, por lo que son insensibles a la insuficiencia pancreática precoz [15]. Incluyen la medida de la excreción de la grasa fecal o bioproductos de la digestión de enzimas pancreáticas en la sangre u orina. Típicamente, estas medidas son exactas solo en pancreatitis crónica avanzada cuando hay mala digestión [8].

### **Cuantificación de grasa fecal**

Sigue siendo la prueba de referencia para el diagnóstico de insuficiencia pancreática exocrina con mala digestión grasa (esteatorrea). Se basa en el cálculo del coeficiente de absorción de grasa mediante el conocimiento de la grasa ingerida y excretada durante 72 horas consecutivas [7]. Este método requiere que el paciente siga una dieta estricta de 100 g de grasa al día durante cinco días y la recogida y conservación del volumen completo de heces durante los últimos tres días. Las restricciones alimentarias y el manejo de volúmenes elevados de heces hacen que el método sea laborioso e incómodo tanto para los pacientes como para el personal de laboratorio [16].

### **Test de aliento con triglicéridos mixtos marcados con carbono-13**

Dicha prueba mide los niveles de CO<sub>2</sub> marcado en intervalos de 30 minutos durante 6 horas después de la ingestión de triglicéridos marcados con una comida sólida que contiene 16 g de grasa [8]. El objetivo es el diagnóstico de insuficiencia pancreática exocrina con mala digestión grasa. Este test permite reemplazar a la cuantificación de grasa fecal en la práctica clínica, es muy eficaz en el diagnóstico de mala digestión grasa, así como en el control de la eficacia del tratamiento enzimático sustitutivo [7]. Por ello, se ha recomendado su empleo para el diagnóstico y el seguimiento del tratamiento de la IPE en pacientes con pancreatitis crónica, puesto que es fácil de realizar y sus resultados muestran una buena correlación con los de la cuantificación de la grasa fecal [16].

En pacientes con insuficiencia pancreática exocrina, la producción del CO<sub>2</sub> será baja. Sin embargo, las enfermedades del hígado, los pulmones y los intestinos pueden afectar la exactitud de esta prueba. Dado que la prueba también requiere la medición de los niveles de CO<sub>2</sub> marcado durante un periodo



de tiempo prolongado de 6 horas, es poco probable para ganar la aceptación clínica generalizada [8].

### **Medida de elastasa fecal**

La elastasa 1 es una enzima pancreática específica que no se degrada durante el transporte intestinal y puede por lo tanto ser medida en las heces [22, 24]. Su concentración en las heces refleja por tanto el estado de la función pancreático exocrina [24]. Es considerado el test de elección para evaluar la disfunción pancreática exocrina [15,18]. Puede ser usado para el diagnóstico pero no para la monitorización de la respuesta al tratamiento [8]. Es fácil de realizar y ampliamente accesible [8]. La determinación se puede hacer aún si el paciente está en terapia con enzimas pancreáticas [18] ya que los anticuerpos monoclonales que se usan en la prueba no tienen reacción cruzada con elastasas de origen animal, que son las que se emplean en los preparados de enzimas para terapia de sustitución [16]. La pancreatina del KREON procede de tejido pancreático porcino [20]. Valores menores de 200 mcg/g son sugestivos de insuficiencia pancreática [15, 18]. Valores menores de 100 mcg/g son indicativos de insuficiencia exocrina severa [15, 22]. Estas concentraciones se refieren a una muestra de heces formada. En caso de una muestra de heces acuosa, el examen se deberá repetir en una segunda muestra de heces formada [24]. Los niveles de elastasa fecal pueden estar disminuidos en pacientes con enfermedades de la mucosa de intestino delgado y diabetes mellitus tipo 1 [8]. Sin embargo, la elastasa fecal puede ser más exacta en la pancreatitis crónica avanzada (sensibilidad del 90 – 95 %) que en la enfermedad leve a moderada (sensibilidad del 60%) [22].

### **Quimotripsina fecal**

Un nivel menor de 3 unidades por gramo es sugestivo de insuficiencia pancreática exocrina. Sin embargo, los niveles pueden verse disminuidos por enfermedades de la mucosa de intestino delgado y en pacientes con pH fecal bajo. A diferencia de la elastasa fecal, se puede usar para evaluar la eficacia del tratamiento y cumplimiento con suplementación con enzimas pancreáticas exocrinas [8].

### **Tripsinógeno sérico**

Su elevación es muy inespecífica pudiendo elevarse en pancreatitis aguda, diabetes mellitus, fallo renal o con la edad avanzada [8].

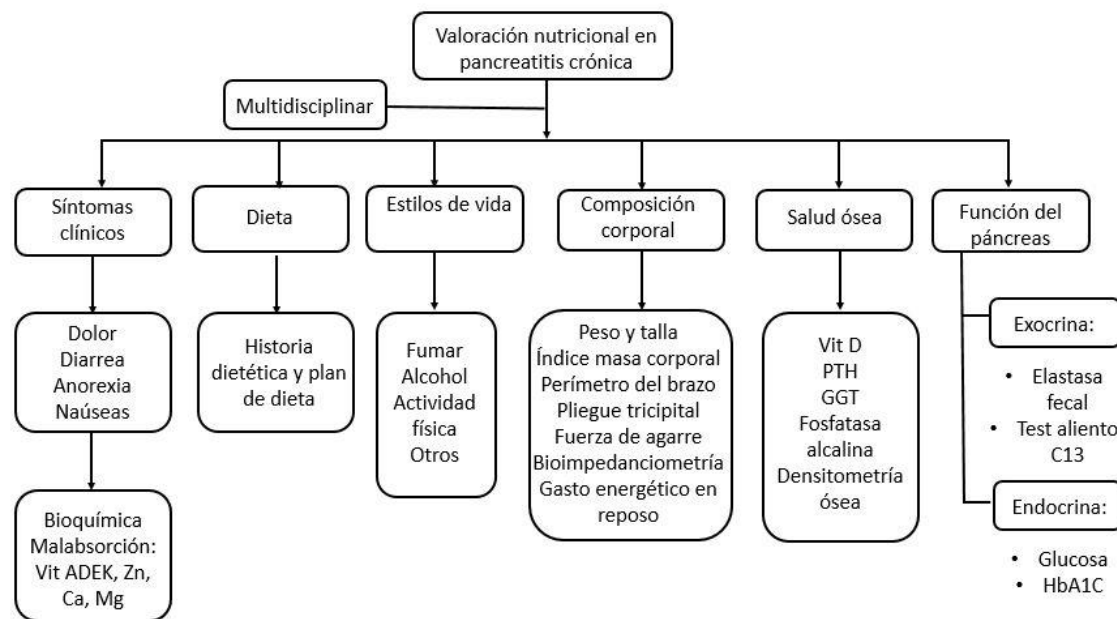
Test	Sensibilidad	Especificidad	Ventajas	Inconvenientes
<b>Directo</b>				
<b>Estimulación con secretina</b>	86 – 94 %	67 – 79 %	Puede ser usado para diagnóstico de mínimos cambios de pancreatitis crónica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimiento invasivo</li> <li>• Requiere anestesia y endoscopia</li> <li>• Caro</li> </ul>
<b>Estimulación con CCK</b>	83 %	87 %	Puede ser usado para diagnóstico de mínimos cambios de pancreatitis crónica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procedimiento invasivo</li> <li>• Requiere anestesia y endoscopia</li> </ul>
<b>Indirecto</b>				
<b>Elastasa fecal</b>	0 -65 % (enfermedad moderada)  33 – 100 % (enfermedad severa)	83 – 93 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensible y específico en enfermedad severa</li> <li>• Resultados no alterados por uso de enzimas pancreáticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No puede ser usada para evaluar la eficacia ni cumplimiento del tratamiento</li> <li>• Anormal en pacientes con enfermedades del intestino delgado</li> </ul>
<b>Quimotripsina fecal</b>	50 – 80 %	50 – 100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Barato</li> <li>• Puede ser usado para valorar cumplimiento y eficacia del tratamiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No fiable para IPE moderada</li> <li>• Valores influenciados por enzimas pancreáticas y pH duodenal</li> <li>• Anormal en pacientes con enfermedades del intestino delgado</li> </ul>
<b>Tripsinógeno sérico</b>	33 – 65 %	80 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Test sérico</li> <li>• Sensible y específico en enfermedad severa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevado en pancreatitis aguda</li> <li>• Falso positivo en paciente con resección pancreática</li> <li>• No válido en pacientes mayores y diabéticos</li> </ul>
<b>Test de aliento con triglicéridos</b>	89 %	81 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede ser usado para valorar cumplimiento y</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Valores afectados en malabsorción intestinal, enfermedad</li> </ul>

<b>marcados con 13-C</b>	eficacia del tratamiento <ul style="list-style-type: none"> <li>Sensibilidad incrementada para enfermedad moderada respecto otros tests indirectos</li> </ul>	hepática y/o respiratoria <ul style="list-style-type: none"> <li>6 horas de examen</li> </ul>
CCK: colecistoquinina; IPE: insuficiencia pancreática exocrina		

**Tabla 5.** Pruebas de función pancreática: Modificado de Afghani y cols, 2014 [8].

## 2.4 Valoración nutricional

La valoración y manejo nutricional en la pancreatitis crónica continúa siendo problemática y poco estudiada [25]. La valoración del estado nutricional debe incluir una aproximación multidisciplinar, incluyendo una valoración de los síntomas clínicos, función pancreática exocrina y endocrina, composición corporal, estado de salud óseo, evaluación dietética y estilos de vida como se ilustra en la figura 4 [17].



GGT: gamma-glutamyl transferase; PTH: Parathyroid hormone.

**Figura 4.** Valoración nutricional en pacientes con pancreatitis crónica. Modificado de Rasmussen y cols, 2013 [17].

En un estudio se realizó una completa valoración antropométrica, bioquímica, clínica y dietética intentando buscar los diferentes parámetros de malnutrición a fin de determinar el mejor método o las mejores combinaciones de métodos. Se halló que la elastasa fecal se correlacionaba con la excreción de grasa fecal y el IMC [26].

### **Síntomas clínicos**

Debe incluir una historia médica y una exploración física rutinarias prestando especial énfasis en los síntomas y factores de riesgo relacionados con la nutrición (nauseas, anorexia, dolor, alcohol, tabaco) [17,22]. Estos signos de malnutrición a menudo aparecen solo en los estadios avanzados de deficiencia [22].

La malabsorción crónica da lugar a pérdida de peso y falta de grasa subcutánea. La leuconiquia de las uñas asociada a hipoalbuminemia puede estar presente en los estadios avanzados. Los signos de falta de vitaminas liposolubles pueden aparecer, como la equimosis debida a alteraciones de la coagulación en el caso de déficit de vitamina K; ataxia y neuropatía periférica similar a la ataxia de Friedreich debida a déficit de vitamina E; anomalías como la ceguera nocturna y xeroftalmia (sequedad de las córneas) debidas a déficit de la vitamina A; y contracción o espasmos musculares, osteomalacia y osteoporosis pueden también ocurrir debido a hipocalcemia [18].

Las deficiencias de vitaminas clínicas y subclínicas pueden resultar a largo plazo en problemas de salud como deficiencias visuales, deficiencias neurológicas y pobre salud ósea. Una detección precoz y tratamiento podría servir para reducir el riesgo de dichas deficiencias [23]. Por ello, el estado de los micronutrientes debe ser medido 1-2 veces al año incluyendo malabsorción de vitaminas liposolubles, minerales y elementos traza [17, 18].

La deficiencia de micronutrientes puede estar presente en pancreatitis crónica incluso en pacientes con aparentemente razonable estado nutricional. Dicha deficiencia puede ser causada por varios mecanismos diferentes, incluyendo

ingesta dietética no óptima, incremento de pérdidas, incremento de requerimientos, malabsorción [22].

La deficiencia de vitamina E puede ser más prevalente ante la presencia de esteatorrea, malnutrición y pancreatitis alcohólica independientemente de la ingesta dietética. La deficiencia de vitamina B12 puede ocurrir por una inadecuada secreción de una proteasa por el páncreas, la cual es requerida para su absorción en íleon terminal. Sin embargo, esta deficiencia es relativamente poco frecuente. En sujetos sanos, un componente fijador de zinc originado en el páncreas facilita la absorción intestinal del zinc. En pancreatitis crónica, la deficiencia de zinc clínicamente significativa puede ocurrir, particularmente cuando se asocia con diabetes [22].

### **Función del páncreas**

Las pruebas para valorar la función pancreática ya se han mencionado en el apartado de diagnóstico de la pancreatitis crónica.

### **Composición corporal**

Muchos pacientes con pancreatitis crónica experimentan pérdida de peso durante el curso de su enfermedad. Un IMC menor de 18.5 kg/m<sup>2</sup> ha sido comúnmente usado como punto de corte de malnutrición [23]. El IMC puede ser malinterpretado ante alteraciones de los fluidos como presencia de ascitis y edemas [17, 22]. Pacientes con un IMC normal puede tener una pérdida de masa muscular que conduzca a una pérdida funcional y a un incremento de la morbilidad [17].

En estudio en pacientes con pancreatitis crónica la forma más común de malnutrición fue el exceso de peso, presentando solo un 10% bajo peso. Las consecuencias clínicas de la obesidad en pancreatitis crónica son inciertas, aunque la obesidad es también un factor de riesgo conocido para el desarrollo de comorbilidades, inflamación y pancreatitis crónica alcohólica. Es también conocido que los pacientes obesos presentan comúnmente deficiencia de micronutrientes a pesar del exceso de macronutrientes [25].

La valoración debe realizarse con medidas antropométricas o bioimpedancia [17]. Debe incluir no solo el IMC sino también historia del peso corporal, medición de grasa y músculo, y empuñadura de fuerza [25].

Medidas antropométricas como la circunferencia braquial que estima la masa magra corporal y el pliegue cutáneo del tríceps que estima la grasa subcutánea. Estas medidas son muy útiles en pacientes con edemas o ascitis y para seguimiento a largo de plazo del estado nutricional [17, 22].

La bioimpedancia es fácil, no invasiva, relativamente barata y puede realizarse en casi todos los sujetos al ser portátil. Aporta datos del índice de masa libre de grasa, grasa y cantidad de agua diferenciando entre extracelular e intracelular. Sin embargo, el uso en sujetos con rangos extremos de IMC o con anomalías de la hidratación no se recomienda en la valoración rutinaria de pacientes.

La reducción de la fuerza muscular y resistencia física se ha asociado con una pérdida de la funcionalidad física y con un impacto negativo en la recuperación de la salud después de estar enfermo o cirugía, lo cual explica el gran poder predictivo de los test de función muscular. Del mismo modo que la composición corporal ofrece un valor cualitativo del estado nutricional, la función muscular es un indicador de la masa muscular. La medida de la función muscular como indicador de funcionalidad así como del estado nutricional ha ganado una considerable atención en los últimos años [17]. La pérdida de función se correlaciona con peor respuesta clínica y es indicativo de pérdida de masa magra [23]. La empuñadura de fuerza puede ser usada para medir la fuerza. Los rangos de referencia específicos por género y edad permiten clasificar la capacidad funcional de los pacientes como un porcentaje con respecto a la normalidad. Valores del 85% o menos pueden indicar malnutrición proteica [22].

Un estudio en pacientes con pancreatitis crónica indicó no solo una pérdida de peso sino también de la función y masa muscular, lo cual implica un evidente riesgo de malnutrición y un empeoramiento generalizado de la calidad de vida [23].

Los datos sobre la medida del metabolismo basal en pacientes con pancreatitis crónica son muy limitados, pero han mostrado que la pérdida de peso es acompañada de un hipermetabolismo, y que entre el 30% y el 50% de los pacientes con pancreatitis crónica tiene incrementado el metabolismo basal [27].

### **Salud ósea**

Dada la alta incidencia de osteopenia en las pancreatitis crónicas, la suplementación con calcio y vitamina D así como el seguimiento periódico la salud ósea debe ser un parte integral de la valoración nutricional de las pancreatitis crónicas de manera que la bioquímica y el DEXA deben realizarse regularmente (una vez al año) [17].

La osteopatía (osteoporosis, osteomalacia, osteopenia) puede ocurrir en uno de cada 4 pacientes con pancreatitis crónica, probablemente debido a malabsorción de vitamina D y calcio, pobre ingesta diaria y otros factores, incluyendo tabaco. La vitamina D es esencial para la absorción intestinal de calcio, jugando un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis del calcio y la integridad del esqueleto. La falta de tomar de sol incrementa la necesidad de las fuentes dietéticas de vitamina D, las cuales incluyen pescados grasos e hígado así como comidas fortificadas con vitamina D como la leche, zumo y cereales. La suplementación puede ser requerida si la dieta y toma de sol son inadecuadas. En la mayoría de los casos, la deficiencia o insuficiencia de vitamina D es asintomática. En osteomalacia con deficiencia prolongada, el dolor óseo y debilidad muscular pueden estar presentes. Bioquímicamente, los niveles séricos de vitamina D, calcio y fosforo pueden estar bajos, y la fosfatasa alcalina puede estar elevada. La hipersecreción de hormona paratiroidea (PTH) con su consiguiente elevación puede ser uno de los primeros signos de insuficiencia de vitamina D. En las pancreatitis crónicas, la insuficiencia de vitamina D parece relacionarse con la degradación de la insuficiencia exocrina y la severidad de la enfermedad. Sin embargo, incluso ante la presencia de función exocrina residual, los pacientes con pancreatitis crónica pueden tener de manera significativa bajos niveles séricos de vitamina D, baja densidad mineral ósea (DMO) y bajo contenido mineral óseo. Con la enfermedad avanzada y

esteatorrea puede tener deficiencias más marcadas que individuos con pancreatitis crónica leve. Dado que la osteoporosis es una enfermedad prevenible, las guías de salud ósea para otras enfermedades gastrointestinales (como la enfermedad inflamatoria intestinal y la enfermedad celíaca) recomiendan valoraciones de la DMO rutinarias y suplementación para reducir el riesgo de osteopatía. A pesar de la gran incidencia de osteopatía en pancreatitis crónica, no existen guías para la misma. Sin embargo, extrapolando de las guías de otros trastornos de malabsorción, la suplementación con calcio y vitamina D así como una regular monitorización de la salud ósea deber ser una parte integral del manejo nutricional de la pancreatitis crónica [22].

## **Dieta**

Una evaluación detallada de la ingesta alimentaria habitual debe ser realizada por un dietista todos los pacientes en riesgo nutricional [17]. La ingesta de nutrientes puede ser medida por un recuerdo 24 horas o una historia de la dieta, y se analizan utilizando software especializado que proporciona información detallada sobre la energía y la ingesta de proteínas, así como grasas y micronutrientes [17, 22]. Para la evaluación de determinados alimentos un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos puede ser utilizado [17]. Éste último tiene la ventaja de ser el que menos tiempo requiere, aunque necesita ser validado para ser empleado en un determinado país, región o grupo específico de pacientes [22].

Debe realizarse un plan dietético específico y las visitas de seguimiento evaluar la ingesta en comparación con la energía y proteínas recomendadas. Se ha demostrado, que el asesoramiento dietético y los suplementos orales en los pacientes con pancreatitis crónicas en riesgo nutricional pueden mejorar el peso, índice de masa corporal y disminuir la excreción de grasa fecal [17].

## **Estilos de vida**

Para reducir al mínimo los factores de riesgo nutricionales en pacientes con pancreatitis crónica, se debe hacer un esfuerzo por investigar para eliminar los factores de riesgo como fumar y el abuso de alcohol, asegurar el cumplimiento del tratamiento médico (enzimático) y evaluar el tratamiento del



dolor. La actividad física debe fomentarse junto con la terapia nutricional para un resultado óptimo [17].

Dado que el alcohol es uno de las causas principales de pancreatitis crónica, el efecto del alcohol en el estado nutricional debe ser considerado [22]. Dicho estado de malnutrición puede ser debido a una reducción de la ingesta de comida [25] o a los efectos de la ingesta en exceso de alcohol, siendo un factor de riesgo independiente para malnutrición [22]. La malnutrición se asocia con morbilidad y mortalidad significativas. El alcohol causa la desnutrición a través de efectos sobre la ingesta alimentaria, absorción, la digestión y gasto energético en reposo [6]. Los individuos alcohólicos suelen tener una pobre ingesta de nutrientes, debido al desplazamiento de las comidas o por los efectos sobre el apetito [22].

Una gran ingesta de alcohol ha sido también asociada con osteoporosis, debido a efectos tóxicos directos sobre los osteoblastos. El alcohol puede causar malabsorción de nutrientes manifestándose con diarrea. Las razones de las disfunciones en la absorción pueden ser debido a daños o alteraciones de la función biliar y pancreática y efectos directos del alcohol sobre el tracto gastrointestinal [22].

Un consumo excesivo de alcohol sostenido, sin enfermedad hepática, se asocia con una serie de deficiencias de macro y micronutrientes. Los adultos con tal ingesta son más propensos a perder peso debido a los cambios metabólicos asociados con el consumo excesivo de alcohol, especialmente en aquellos en los cuales la ingesta de alcohol excesiva es del 30% de su ingesta calórica total. En adultos con consumo severo mantenidos las deficiencias de micronutrientes más comunes son tiamina (vitamina B1), piridoxina (vitamina B6) y ácido fólico [28].

Se considera consumo severo de alcohol a más de cuatro bebidas al día o más de 14 bebidas a la semana en hombres y más de tres bebidas al día o más de 7 bebidas por semana en mujeres. En adultos con un trastorno del consumo de alcohol o ingesta excesiva, se recomienda la suplementación con multivitamínicos que contengan un mínimo de 100 mg de tiamina, 2 mg de vitamina B6 y de 400 mcg a 1 mg de ácido fólico diarios (Grado 1C) [28].

## 2.5 Tratamiento

Los objetivos del tratamiento incluyen el manejo del dolor, la corrección de la insuficiencia pancreática y el manejo de las complicaciones [29]. Dado el papel fundamental de los suplementos con enzimas pancreáticas tanto en el control del dolor como de la insuficiencia pancreática exocrina se dedica un apartado específico para evaluar las distintas consideraciones al respecto.

En el manejo del dolor se debe proceder de forma escalonada. Inicialmente el tratamiento comienza con recomendaciones generales consistentes en dejar el alcohol y el tabaco y comer pequeñas cantidades de comida [29]. Los métodos médicos, endoscópicos y quirúrgicos se utilizan para el alivio del dolor en pancreatitis crónicas con diferentes tasas de éxito. La mayoría de los pacientes requieren analgésicos narcóticos orales para el manejo del dolor y en última instancia requerirá tratamiento endoscópico o quirúrgico cuando la terapia médica resulte en gran medida ineficaz [8].

### 2.5.1 *Tratamiento enzimático sustitutivo*

Con el objetivo de ayudar en la digestión de proteínas, grasas y carbohidratos [8], así como evitar la diarrea y la mala digestión y mejorar el estado nutricional de los pacientes con insuficiencia pancreática exocrina, la piedra angular del tratamiento es la terapia con suplementos de enzimas pancreáticas [18].

Asegurando un adecuado tratamiento enzimático en los pacientes con pancreatitis crónica puede mejorar la calidad de vida, la función social, la confianza, así como la ganancia de peso y la reducción del número de deposiciones [22].

Aunque hay una deficiencia de las tres enzimas pancreáticas (amilasa, tripsina y lipasa) en pancreatitis crónica, el metabolismo de los carbohidratos y las proteínas no se ve tan severamente comprometido como el metabolismo de las grasas porque el 90% de la grasa es digerida por la lipasa pancreática [8].

La suplementación con enzimas pancreáticas debe ser iniciada en pacientes que padecen de pancreatitis crónica y esteatorrea. En particular, el beneficio es mayor en pacientes que experimentan pérdida de peso y excretan más de 15 g

de grasa fecal por día [30]. La indicación terapéutica es el tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina [31].

Antes de comenzar la terapia con suplementos de enzimas pancreáticas, la evaluación de los niveles de glucosa y cuantificación de la malabsorción es recomendable si es posible. Por otra parte, la determinación de la glucosa en ayunas durante las dos primeras semanas de tratamiento también es recomendable [18].

### **Preparaciones y formulaciones**

Las enzimas pancreáticas de origen porcino son la preparación estándar del tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina [30]. La lipasa bovina ha sido comercializada como una alternativa potencial en pacientes de la población que rechazan la ingesta de productos porcinos por motivos religiosos o principios éticos. La lipasa bovina solo logra un 25% de la actividad de la lipasa porcina y hay preocupación por que pueda transmitir patógenos causantes de enfermedades con la encefalopatía espongiiforme [8, 30]. Las preparaciones de enzimas pancreáticas microbianas también existen [30] siendo la lipasa fúngica y la lipasa bacteriana otras alternativas a la lipasa porcina [8]. Los genes de la lipasa humana han sido transcritos y expresados usando adenovirus de modo que estos genes producen grandes cantidades de lipasa humana y en el futuro la expresión ectópica de lipasa humana en el sistema pancreatobiliar puede llegar a ser una modalidad terapéutica disponible [30]. En el momento actual, ninguno de estos productos está comercializado [8].

La colipasa es una proteína cofactor de la lipasa que es requerida en suficientes cantidades en el intestino delgado para la digestión de las grasas. Por ello, todas las preparaciones de suplementos enzimáticos comercializados contienen una adecuada cantidad de colipasa para la efectiva digestión lipídica [30].

El hecho de que los ácidos gástricos desnaturalizan las enzimas pancreáticas está bien descrito. Junto al uso concomitante de medicación supresora del ácido gástrico, variedades con recubrimiento entérico se han diseñado para resistir la

degradación en el lumen gástrico [30] y que se disuelve solo con un aumento de los niveles de pH [22].

El recubrimiento entérico previene la liberación de las enzimas pancreáticas a pH < 5.5 y por lo tanto optimiza la actividad lipolítica de la preparación en el duodeno porque la lipasa pancreática es inactiva a pH < 4.5. Hay varios tipos de recubrimientos entéricos de enzimas pancreáticas: microesferas, mini-microesferas [8]. La disponibilidad de formulaciones que contienen enzimas pancreáticas encapsuladas en microgránulos o minimicroesferas con una cubierta pH sensible previene la liberación y la consiguiente inactivación de las enzimas por el ácido gástrico y liberar las enzimas en el lumen intestinal donde el pH es más elevado y óptimo para la digestión y absorción de la comida [18]. Las mini-microesferas aseguran una mezcla óptima y liberación sincronizada con la comida. La más reciente innovación en la formulación ha sido el desarrollo de un recubrimiento entérico con microesferas que contienen 1.5 – 2.5 mEq de bicarbonato por cápsula [30].

Las variedades sin recubrimiento entérico pueden ser usadas en pacientes que han sido intervenidos previamente de estómago o con hipoclorhidria [8]. Cuando las enzimas con recubrimiento entérico no son usadas, la terapia con supresores ácidos puede ser recomendada en adición a la suplementación con enzimas pancreáticas para evitar que baje el pH gástrico y duodenal, el cual puede desactivar la lipasa [22].

### **Posología**

La dosis de enzimas pancreáticas depende de la severidad de la insuficiencia exocrina, de la composición de la comida ingerida y del peso corporal [8]. La dosis necesaria por comida varía entre alrededor de 25.000 a 80.000 unidades de lipasa y la mitad de la dosis individual en el caso de comidas ligeras [31].

La liberación máxima postprandial de lipasa en el duodeno en un estado normal es de 140000 unidades internacionales (UI) por hora durante 4 horas. La mala digestión se piensa que ocurre cuando se produce una liberación de enzimas menor 5 – 10 % de lo normal. Para corregir este déficit, 30000 UI de lipasa deben ser liberadas durante los períodos prandiales y postprandiales [22].

Típicamente, 25000 – 75000 unidades de lipasa son necesarios por comida y 25000 unidades por tentempié [8]. Una dosis de 25 – 40000 UI es recomendada para la digestión de una comida regular la cual puede incrementarse en casos donde aparezca falta de efecto terapéutico. La dosis inicial recomendada es 40000 – 50000 unidades de lipasa por comida y 25000 unidades por tentempié, y esta dosis debe ser progresivamente incrementada hasta que la esteatorrea es total o suficientemente reducida, y mantener dicha dosis en el tiempo [18]. Altas dosis de lipasas pueden ser requeridas para la completa normalización de la digestión de las grasas. Sin embargo, dosis altas pueden causar efectos adversos graves [30].

La sincronización de la ingesta de los suplementos de enzimas pancreáticas con la ingesta de la comida es importante para la eficacia del mismo. La eficacia es mayor cuando las enzimas pancreáticas son tomadas durante o después de las comidas [8]. Es extensamente aceptado que la suplementación con enzimas pancreáticas debe darse en el momento de las comidas [30]. Por lo tanto, los pacientes deben ser instruidos en el momento adecuado de la administración de las enzimas aconsejándoles contra el uso de las enzimas antes de las comidas [8] y recomendando tomar los enzimas durante o inmediatamente después de las comidas [31].

### **Eficacia y monitorización del tratamiento**

El éxito de la suplementación con enzimas pancreáticas es medido por la mejoría de los síntomas y el peso corporal y la reducción de la excreción fecal de grasa y el número de movimientos intestinales [8].

Sin embargo, no hay una técnica estandarizada para valorar el tratamiento adecuado en pacientes que reciben suplementos con enzimas pancreáticas. Varios parámetros clínicos e indicadores de laboratorio pueden ser usados, pero la mejoría de los síntomas clínicos solo puede no predecir exactamente la adecuación del tratamiento con suplementos y mejores indicadores son necesarios para asegurar los beneficios terapéuticos con la suplementación enzimática [30].

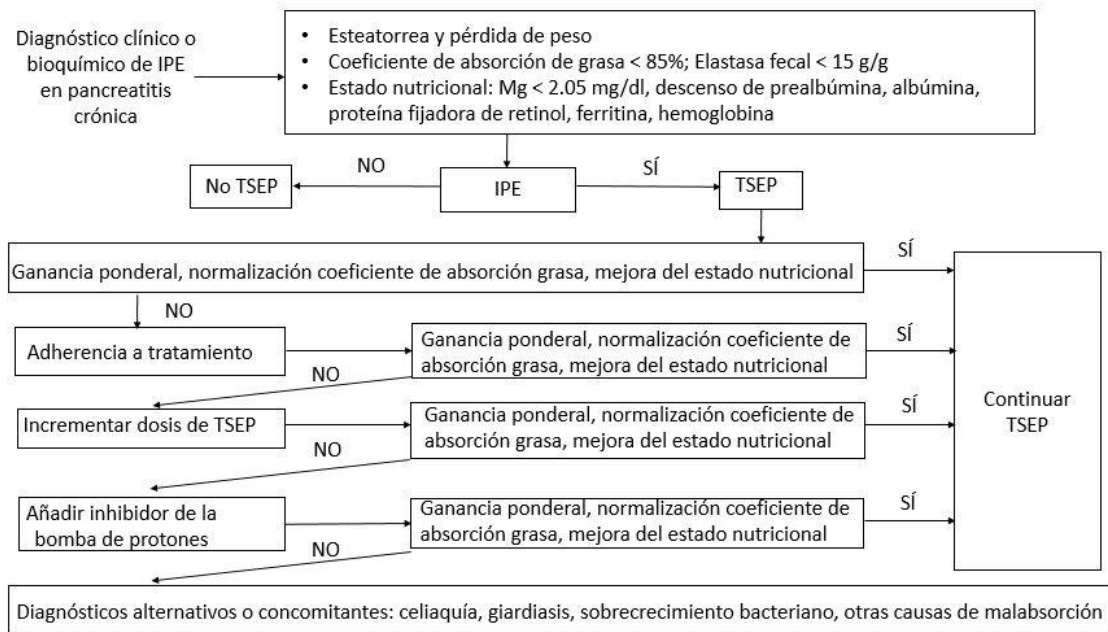
La quimotripsina fecal puede ser elegida para valorar la respuesta. La suplementación con enzimas pancreáticas reduce de forma significativa la excreción fecal de grasa pero no normaliza excreción fecal de grasa completamente. La no mejoría en quimotripsina fecal es una indicación del inadecuado tratamiento de la esteatorrea y/o falta de cumplimiento de la terapia por el paciente [8].

La falta de eficacia de la suplementación con enzimas pancreáticas puede ser debido al incumplimiento [30], la degradación de la lipasa por los ácidos gástricos, la administración de las enzimas en el momento inapropiado, la coexistencia de enfermedades de la mucosa del intestino delgado y/o rápido tránsito intestinal [8].

En pacientes cumplidores que no responden a los suplementos enzimáticos, se recomienda aumentar la dosis con la distribución de las calorías en 5 – 6 comidas pequeñas [8, 18, 30]. El uso de un inhibidor de la bomba de protones concomitante puede mejorar la eficacia de las enzimas pancreáticas [8].

Si el paciente continúa teniendo esteatorrea a pesar de cumplir con el tratamiento y estar con la dosis adecuada [30], entonces el paciente debe ser evaluado para descartar enfermedades de la mucosa del intestino delgado [8]. En no respondedores debe descartarse sobrecrecimiento bacteriano intestinal presente en el 40% de los pacientes con pancreatitis crónica, giardiasis intestinal u otros desórdenes de malabsorción intestinal [18].

El tratamiento también puede fallar por la sustitución de una marca por la formulación genérica de suplementos de enzimas pancreáticas. La falta de bioequivalencia entre las diferentes preparaciones se atribuye a las diferencias en las propiedades físico-químicas del recubrimiento entérico [30].



**Figura 5.** Algoritmo de monitorización de terapia sustitutiva con enzimas pancreáticas (TSEP) en insuficiencia pancreática exocrina (IPE). Modificado de Pezzilli y cols, 2013 [18].

## Interacciones

La ingesta de fibra se asocia con un pequeño pero significativo incremento de la excreción de grasa fecal. El consumo de alcohol disminuye la actividad de la lipasa [30]. Los antiácidos que contienen calcio y magnesio deben ser evitados ya que producen saponificación precipitando conjugados de sales biliares en el intestino y empeorando la esteatorrea [18, 30].

## Efectos adversos

Incluyen distensión abdominal, calambres abdominales y flatulencias [8]. Los efectos adversos más comúnmente vistos incluyen náuseas y diarreas [30].

Complicaciones infrecuentes incluyen reacciones alérgicas, hiperuricemia e hiperuricosuria, deficiencia de ácido fólico [8, 30] e hierro e infecciones por Salmonella [8]. El polvo fino de las enzimas pancreáticas puede también ser irritante de la mucosa nasal y puede desencadenar ataques de asma. Dosis extremadamente altas de extractos pancreáticos han sido asociados con hiperuricemia e hiperuricosuria [18].

El efecto adverso más grave pero raro es la colonopatía fibrosante, la cual ha sido descrita en niños con fibrosis quística que reciben grandes dosis de

suplementación con enzimas pancreáticas [8, 30]. La ingesta de grandes dosis de copolímero de ácido metacrílico usado como revestimiento entérico puede ser también causa de colonopatía fibrosante [30]. A modo de precaución deben estudiarse clínicamente los síntomas abdominales no habituales o los cambios en los síntomas abdominales para excluir la posibilidad de que exista una colonopatía fibrosante, sobre todo si el paciente está tomando más de 10.000 unidades de lipasa/kg/día [18, 31].

En la siguiente tabla se exponen los efectos adversos clasificados por órganos y sistemas y en función de la frecuencia [31].

Órgano-Sistema	Muy frecuente ≥ 1/10	Frecuente > 1/100 a < 1/10	Poco frecuente ≥ 1/1000 a < 1/100	Frecuencia no conocida
Trastornos gastrointestinales	Dolor abdominal	Naúseas, vómitos, estreñimiento, distensión abdominal, diarrea		Estenosis ileocecales y de intestino grueso (colonopatía fibrosante)
Trastornos de la piel y tejido subcutáneo			Rash	Prurito, urticaria
Trastornos del sistema inmunológico				Hipersensibilidad (reacciones anafilácticas)

**Tabla 6.** Efectos adversos de enzimas pancreáticas: [Modificado de KREON, 2012 \[31\]](#).

Los suplementos de enzimas pancreáticas son definidos como fármacos de categoría B en el embarazo y las evidencias no son concluyentes para su uso en la lactancia [30].

No se dispone de datos clínicos en mujeres embarazadas expuestas al tratamiento con enzimas pancreáticas. Los estudios realizados en animales no muestran indicios de absorción de las enzimas pancreáticas porcinas. Por tanto, no se prevé ninguna toxicidad para la reproducción ni el desarrollo. Deben



tomarse precauciones a la hora de prescribir esta medicación a las embarazadas [31].

No se prevé ningún efecto en los lactantes puesto que los estudios realizados en animales no indican exposición sistémica a las enzimas pancreáticas en las mujeres durante el período de lactancia. Las enzimas pancreáticas pueden emplearse durante la lactancia [31].

### 2.5.2 Tratamiento médico

#### **Analgésicos no narcóticos y narcóticos**

Muchos pacientes requieren agentes analgésicos para aliviar el dolor abdominal en pancreatitis crónica. Por desgracia, algunos se convierten en dependientes de narcóticos [8].

Analgésicos como opiáceos y/o antiinflamatorios no esteroideos pueden ser considerados si la terapia con enzimas pancreáticas falla en el control del dolor [29].

Un pequeño ensayo ha demostrado que el tramadol puede ser equivalente a la morfina y debe ser considerados de primera línea. Sin embargo, la dosis de tramadol requerida fue casi 2 veces mayor que la recomendada en la práctica clínica [32].

La mayoría de los pacientes requieren analgésicos narcóticos para el alivio del dolor. Es importante ser conscientes de los efectos secundarios de los narcóticos, que incluyen depresión del sistema nervioso central, dependencia y alteraciones en la motilidad intestinal. Por ello, se recomienda el uso de la terapia adyuvante para reducir al mínimo la dosis de narcóticos necesaria para el control del dolor. La terapia adyuvante incluye antidepresivos tricíclicos (nortriptilina, amitriptilina), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, inhibidores selectivos de la recaptación de norepinefrina y serotonina (duloxetina), o inhibidores  $\alpha 2\delta$  (Pregabalina, gabapentina). Estos medicamentos son efectivos porque los pacientes con PC pueden desarrollar sensibilización central con el tiempo [8].

La terapia adyuvante con pregabalina puede ser considerada en aquellos pacientes cuyo dolor no se controla adecuadamente con opiáceos y/o antiinflamatorios no esteroideos [29]. Un estudio reciente demostró que los pacientes con CP que reciben dosis de 150 mg dos veces al día de pregabalina muestran un alivio más eficaz del dolor en comparación con placebo después de 3 semanas de tratamiento [33]. A menudo requieren la asistencia de especialistas en dolor crónico [8].

### **Suplementos con enzimas pancreáticas**

Se ha demostrado que las enzimas pancreáticas cuando se liberan en la luz intestinal, ejercen una retroalimentación negativa sobre la secreción pancreática exocrina [8].

Slaff y colaboradores observaron una correlación entre los niveles elevados de colecistoquinina y el incremento del dolor en pancreatitis crónica y postularon que los suplementos con enzimas pancreáticas podían ser potencialmente usados para disminuir el dolor en pancreatitis crónica ejerciendo una retroalimentación negativa sobre el páncreas exocrino [34].

Una revisión sistemática y meta-análisis realizada por Taylor y otros encontró reducciones en el dolor con la administración de suplementos de enzimas pancreáticas con una tendencia hacia la significación [35].

Los resultados del estudio NAPS2 informaron que las enzimas pancreáticas son beneficiosas para el tratamiento del dolor en pacientes con pancreatitis crónica con insuficiencia pancreática exocrina en comparación con aquellos que presentan solo dolor, lo que sugiere que un componente del dolor de la pancreatitis crónica es debido a la mala digestión [36].

Así pues, el uso de suplementos de enzimas pancreáticas en pacientes con dolor persistente después de las recomendaciones generales antes descritas alivia el dolor en algunos pacientes y son generalmente seguros [29].

### **Antioxidantes**

Hay datos conflictivos con respecto al papel de los antioxidantes en la mejora del dolor y la calidad de vida en las pancreatitis crónicas [8]. Un ensayo clínico

aleatorizado controlado reciente que compara el efecto de la terapia antioxidante en comparación con el placebo en 70 pacientes con CP no encontraron una reducción significativa del dolor o la mejora en la calidad de vida [37].

### **2.5.3 Tratamiento endoscópico**

La terapia intervencionista endoscópica puede ser útil para aliviar el dolor abdominal crónico en pancreatitis crónica. Las opciones terapéuticas incluyen la descompresión ductal endoscópica mediante esfinterotomía, la dilatación y colocación de stent y litotricia extracorpórea por ondas de choque (LEOC) para la disolución de piedras intraductales. Sin embargo, el tratamiento endoscópico de repetición es típicamente requerido en pacientes con PC, ya que hasta el 50% todavía tienen recurrencia del dolor después de la terapia endoscópica inicial exitosa [8].

El bloqueo del plexo celíaco también se utiliza en la gestión del dolor en pancreatitis crónica. Esteroides y un anestésico se inyectan en el plexo celíaco o ganglio mediante punción guiada por tomografía computarizada, ecografía o fluoroscopia o ecoendoscopia para proporcionar alivio del dolor. El abordaje endoscópico permite una mejor visualización del plexo y, posiblemente, los ganglios y potencialmente proporciona un seguro punto de inyección. Sin embargo, sólo 55% de los pacientes con pancreatitis crónica que se someten a bloqueo del plexo celíaco experimentan un alivio del dolor inmediatamente después del procedimiento. Debido a la naturaleza efímera del alivio del dolor resultante del bloqueo del plexo celiaco, los pacientes a menudo se someten al procedimiento repetidas veces, pero los datos que apoyan esta práctica son limitados [8].

### **2.5.4 Tratamiento quirúrgico**

La cirugía ha sido generalmente considerada para pacientes en los que la terapia médica ha fallado [29]. Las indicaciones para el tratamiento quirúrgico incluyen la obstrucción del conducto biliar o duodenal, el fracaso del tratamiento médico y endoscópico en el manejo del dolor y la sospecha de cáncer de páncreas [8].

Tres abordajes quirúrgicos han sido descritos, basándose la elección del procedimiento en el tamaño de los conductos pancreáticos y las regiones del páncreas que están afectadas [29].

### **Operaciones de descompresión y drenaje**

El drenaje quirúrgico del conducto pancreático ha demostrado ser más eficaz que el drenaje endoscópico con respecto al alivio del dolor alivio y del estado de salud general [8].

La cirugía más común para PC de gran conducto es el Puestow o pancreático-yeyunostomía lateral, donde se realiza una incisión longitudinal del conducto pancreático y luego se anastomosa a un bucle de yeyuno, aliviando así la hipertensión de la obstrucción del conducto pancreático. El procedimiento Frey combina la pancreaticoyeyunostomía con una excavación local de la cabeza pancreática. El Puestow tiene la ventaja de preservar parénquima pancreático lo que reduce el riesgo de diabetes mellitus. Sin embargo, sólo una minoría de los pacientes tienen una PC de gran conducto y pocos solicitan la cirugía inicial, sobre todo porque la terapia endoscópica es una opción segura y viable [8].

### **Resecciones pancreáticas**

Los pacientes con PC de conducto pequeño no son considerados candidatos para procedimientos de drenaje quirúrgico. Una terapia quirúrgica alternativa en estos pacientes es la resección pancreática como el procedimiento denominado Whipple o pancreático-duodenectomía con preservación del píloro, pancreatectomía distal o pancreatectomía total [8].

La pancreatectomía total con autotrasplante de islotes se ha vuelto más atractivo en los últimos años como un tratamiento para pancreatitis crónica, ya que elimina por completo el riesgo de cáncer de páncreas y el uso de autotrasplante de islotes preserva la función de células  $\beta$  para reducir al mínimo el riesgo de diabetes [8]. Los pacientes jóvenes que no han tenido una cirugía previa de drenaje pancreático tienen una respuesta más favorable a la cirugía en términos de un mayor rendimiento de las células de los islotes [8]. En un estudio de cohortes de 409 pacientes que se sometieron a pancreatectomía total y

autotrasplante de islotes, el 85% logró mejoría del dolor a los 6 meses, y el 59% dejaron de usar analgésicos narcóticos por 2 años [38]. Sin embargo, sólo centros altamente especializados realizan estos procedimientos, y el desarrollo de diabetes frágil/inestable debido a la ausencia de glucagón es una complicación frecuente [8].

### **Procedimientos de denervación**

Otra alternativa quirúrgica consiste en el bloqueo del plexo celíaco.

#### **2.5.5 Manejo nutricional**

En la fase terminal de la pancreatitis crónica ocurre frecuentemente una desnutrición proteico-calórica, parcialmente debida a la anorexia inducida por el dolor y la continuación del abuso de alcohol. Las medidas terapéuticas generales incluyen la abstinencia de alcohol y el control del dolor. Con estas medidas generalmente se puede conseguir una mejora del estado nutricional [38].

El principal objetivo de las intervenciones nutricionales es garantizar la suficiente ingesta de macro y micronutrientes, para disminuir la mala digestión, la malabsorción y otros factores de riesgo con el fin de prevenir o tratar la malnutrición [17].

Alrededor del 80% de los pacientes pueden ser manejados por una combinación de analgésicos, recomendaciones dietéticas y suplementos de enzimas pancreáticas, mientras que un 10 – 15% necesita suplementos de nutrición oral, un 5% necesita alimentación por sonda enteral y sobre un 1% requiere nutrición parenteral [8, 17].

### **Recomendaciones dietéticas**

Las recomendaciones dietéticas comienzan con la abstinencia total de alcohol [17].

La estimación del gasto metabólico basal es esencial en todos los pacientes para calcular la adecuada ingesta calórica por el riesgo de un aumento del gasto energético en reposo [17]. Por ello, incluso si una dieta pobre en grasas reduce la esteatorrea y mejora la mala digestión, la restricción de la ingesta calórica no es una buena opción [18]. El gasto energético en reposo en pancreatitis crónica

puede ser hasta un 30 – 50% mayor de lo normal. En las pancreatitis crónicas, un gran ingesta calórica de 35 kcal/kg/día debe estar garantizada [8, 22]. Puede ser incluso mayor en paciente de bajo peso con respecto a los pacientes con pancreatitis crónica con peso normal [22].

Frecuentes comidas de poca cantidad (4-8 veces al día) es importante para lograr una adecuada ingesta [8, 17]. La ingesta de comidas debe ser distribuida entre tres comidas principales por día y dos o tres tentempiés. Los extractos pancreáticos deben ser ingeridos durante las comidas [18].

La dieta debe ser rica en carbohidratos y proteínas, aunque la ingesta de carbohidratos puede verse limitada con la manifestación de la diabetes mellitus. Una ingesta proteica de 1 – 1.5 g/kg es generalmente suficiente y bien tolerada [17, 22, 38].

Con la ingesta de enzimas pancreáticas con las comidas un contenido normal de grasas (30% del total de la ingesta calórica) puede darse siendo bien toleradas, especialmente en el caso de grasas vegetales [17, 22, 38].

Si el aumento de peso es insuficiente y / o la esteatorrea persiste, los triglicéridos de cadena media (MCT) pueden ser administrados para intentar aumentar la absorción de grasa. MCT son absorbidos directamente a través del intestino delgado en la vena portal, incluso en ausencia de la lipasa, co-lipasa y sales biliares. Sin embargo, los MCT tienen baja densidad de energía y un sabor desagradable [8, 17, 22, 38]. Su pobre palatabilidad y gran coste reduce el cumplimiento del paciente. La cantidad de energía administrada por MCT es limitada (8.3 Kcal/g) y la dosis debe ser incrementada lentamente para lograr la adaptación intestinal, incluso cuando se usa en nutrición enteral [18]. Puede darse un máximo de aproximadamente 50 g / día ya que dosis más altas pueden ser cetogénicas y están asociados con efectos secundarios tales como calambres, náuseas y diarrea [17]. Fuentes de MCT incluyen el aceite de coco, el aceite de palmiste [22] y las drupas del árbol de alcanfor [8]. Productos comerciales también están disponibles que incluyen emulsiones con MCT y formulas enterales que contienen MCT con preferencia sobre los triglicéridos de cadena larga [22].

Las vitaminas liposolubles (A, D, E y K), vitamina B12 y otros micronutrientes deben complementarse si los niveles séricos indican deficiencias [17] o si dicho déficit se manifiesta clínicamente [38].

En general, se recomienda una dieta baja en fibra, porque fibra puede absorber enzimas y retrasar la absorción de nutrientes [17, 38]. Interfiere con la actividad enzimática proteolítica y amilolítica, siendo la actividad lipolítica [8] la más afectada [18].

Una cantidad adecuada de enzimas pancreáticas exógenas son necesarias para corregir la mala digestión de proteínas y lípidos. En el 10% -15% de los pacientes los suplementos orales puede ayudar a atenuar la pérdida de peso y retrasar el uso de alimentación por sonda enteral [17].

En los casos de resistencia a la terapia tras comprobar una adecuada dieta, buena adherencia, correcta preparación farmacológica y dosis de suplementos enzimáticos, se pueden administrar antagonistas H2 o inhibidores de la bomba de protones [38].

Los mejores parámetros de seguimiento clínico para la monitorización del éxito terapéutico del asesoramiento dietético son la mejora del estado general del paciente y la ganancia de peso [17].

### **Nutrición enteral**

La causa de la ingesta calórica inadecuada en pancreatitis crónicas puede ser anatómica (debido a estenosis pilórica-duodenal o compresión por pseudoquiste) o inflamatoria con complicaciones agudas (nuevo ataque de pancreatitis o desarrollo de fístulas) [17, 22]. Dichos pacientes que sufren una ingesta calórica insuficiente grave pueden beneficiarse de suplementos orales o nutrición enteral.

Para probar si la nutrición enteral se tolera y mejorar el estado nutricional se recomienda dar la nutrición a través de una sonda naso-yeyunal. Sin embargo, para la terapia a largo plazo (superior a 2-3 semanas) un gastrostomía endoscópica percutánea (PEG) con un tubo de extensión yeyunal es más conveniente [17, 22].

El apoyo nutricional antes de la cirugía de páncreas puede ser beneficioso [17, 22]. Los datos de los pacientes sometidos a cirugía abdominal general han proporcionado pruebas de que el apoyo nutricional enteral u oral preoperatorio mejora los resultados en comparación con los pacientes desnutridos al reducir morbilidad postoperatoria y la estancia hospitalaria [39]. Por lo tanto, la cirugía para control del dolor o por cualquier causa de obstrucción gastrointestinal debe ser una indicación primaria de dicha terapia nutricional.

El potencial de modular la actividad del sistema inmunológico mediante intervenciones con nutrientes específicos se denomina inmunonutrición. Este concepto se aplica normalmente a cualquier situación en la que se completan las fórmulas nutricionales con nutrientes específicos tales como arginina, glutamina, ácidos grasos omega 3, nucleótidos.

En un meta-análisis de ensayos aleatorios controlados en los cuales proporcionaban una combinación de ácidos grasos omega 3 y arginina durante los 5-7 días previos a la intervención se observó una reducción tanto la tasa de infección postoperatoria como de la duración de la estancia hospitalaria en los pacientes que se sometieron a cirugía mayor [40]. Sin embargo, no hay disponibles ensayos específicos en pacientes con pancreatitis crónica. Otro estudio reciente mostró que la inmunonutrición enteral dada después de la operación frente a una nutrición enteral estándar mostró una reducción de las complicaciones infecciosas y la tasa de fuga anastomótica [41].

En base a dichos estudios se recomienda inmunonutrición en la semana previa a la cirugía electiva de pacientes con pancreatitis crónica. La nutrición enteral postoperatoria temprana es factible y puede mejorar adicionalmente en el resultado después de la cirugía [17].

### **Nutrición parenteral**

La nutrición parenteral se utiliza con poca frecuencia en pacientes con pancreatitis crónica. La nutrición parenteral aumenta el riesgo de infecciones de catéteres y sepsis [17]. Por tanto, sólo se emplea cuando es imposible utilizar la nutrición enteral (< 1% de los casos) [17, 22].



Indicaciones de nutrición parenteral incluyen la obstrucción del vaciamiento gástrico, fístulas pancreática complejas [22] o en la desnutrición severa antes de cirugía pancreática si la alimentación enteral es incompleta [17, 22].

No hay estudios de pacientes con insuficiencia pancreática crónica que han sido tratados con una nutrición parenteral durante un largo periodo de tiempo [17].

### **3. Metabolómica**

#### **3.1. Nociones básicas**

La metabolómica es un campo emergente de las 'ómicas' que se dedica a la identificación, cuantificación y caracterización de las pequeñas moléculas denominadas metabolitos del metaboloma. Éste puede ser definido como el conjunto de todas las moléculas pequeñas (<1500 Da) encontradas en una célula, órgano u organismo específico. Es un homólogo del genoma, el transcriptoma y el proteoma [42].

Gracias al Proyecto Genoma Humano la mayor parte del genoma humano, transcriptoma y proteoma son ahora conocidos y los datos están disponibles electrónicamente. Por desgracia, no puede decirse lo mismo del metaboloma humano. Para remediar esta situación, el Proyecto Metaboloma Humano (HMP) fue lanzado en 2004 como parte de un esfuerzo para identificar y cuantificar todos los metabolitos detectables (> 1 mM) en el cuerpo humano. Además de la identificación y cuantificación de cientos de metabolitos en diferentes fluidos corporales de forma experimental, este proyecto de varios años también se encargó formalmente de rellenar y validar la información de todos los metabolitos identificados previamente y proporcionar esta información como una base de datos electrónica de libre acceso llamada Human Metabolome Database (HMDB: <http://www.hmdb.ca/>) [42].

En la actualidad una de las principales estrategias en este campo son los perfiles metabólicos. La comparación de perfiles de distintos fenotipos se utiliza para identificar cambios metabólicos que nos ayudan a conocer la fisiología y la forma en la que se desarrolla una enfermedad. La aproximación desde la metabolómica, menos complicada, fácilmente cuantificable y específica

bioquímicamente, ha confirmado tener mayores ventajas respecto a otras tecnologías como la genómica, transcriptómica y proteómica y está creciendo de forma exponencial en algunos campos como el diagnóstico de enfermedades.

### **3.2. Experiencia en patología pancreática**

La investigación y aplicación de la metabolómica en el campo de la patología pancreática se ha centrado fundamentalmente en conseguir biomarcadores para el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas.

En animales de experimentación estudios como el de Zyromski y cols en 2009 valoran las implicaciones de la obesidad en la pancreatitis y el riesgo de cáncer. Se estudió la composición de grasas en la glándula pancreática tanto en ratones delgado como obesos congénitos, mostrando estos últimos un mayor contenido de triglicéridos y ácidos grasos libre y menor cantidad de fosfolípidos y colesterol [43]. Otros estudios en animales de experimentación se han focalizado en el diagnóstico de pancreatitis crónica. En la búsqueda de correlacionar metabolitos con el grado de pancreatitis crónica y los hallazgos anatomopatológicos se han identificado betaína que se correlacionó positivamente con fibrosis e infiltración celular inflamatoria, mientras que el aspartato y los ácidos grasos se correlacionaron negativamente con fibrosis [44].

Por otra parte, se han encontrado en modelos porcinos el aumento de colina y disminución de glicerofosfocolina, fosfocolina, betaína y glicina en estadios precoces de la pancreatitis crónica [45]. De esta manera se permitiría intervenciones precoces que impidan la destrucción irreversible del parénquima pancreático.

En humanos los estudios de metabolómica se han aplicado tanto en pancreatitis aguda, pancreatitis crónica y fundamentalmente en adenocarcinoma de páncreas.

En la búsqueda de potenciales biomarcadores para el diagnóstico de pancreatitis aguda se han identificado algunos metabolitos como ácido 3-hidroxi-butírico, ácido fosfórico, glicerol, ácido cítrico, D-galactosa, D-manosa, D-glucosa, ácido hexadecanoico y serotonina [46]. Otros estudios se han orientado a encontrar biomarcadores metabolómicos para diferenciar entre las distintas causas de pancreatitis aguda (biliar, por hiperlipemia y alcohólica) consiguiendo identificar grupos de metabolitos descendidos respecto a controles sanos en los

distintos tipos de pancreatitis aguda [47]. Sin embargo, tendría una mayor utilidad en la práctica clínica intentar diferenciar pancreatitis aguda edematosa de necrotizante. Ésta segunda implica un mayor grado de severidad y mayor posibilidad de fracaso multiorgánico en las primeras 48 horas del ingreso con la posibilidad de requerir cuidados intensivos. El conseguir un perfil de metabolitos permitiría predecir la gravedad al inicio de cuadro y adoptar las medidas de soporte más precozmente. Actualmente existen muchas escalas pronósticas (BISAP, APACHE,...) señal de que ninguna de ellas es suficientemente buena para predecir la gravedad de la enfermedad

Los estudios en la bibliografía actual sobre metabolómica en pancreatitis crónica orientados a la búsqueda de biomarcadores para su diagnóstico son escasos.

En un estudio se intentó identificar el perfil de proteínas en plasma en sujetos con pancreatitis crónica, cáncer de páncreas y controles sin enfermedad pancreática. Se identificó una proteína llamada AZGP1 que podría servir como biomarcador para la pancreatitis crónica [48].

Paulo y colaboradores estudiaron las proteínas expresadas en la pancreatitis crónica, cáncer de páncreas y pancreatitis autoinmunitaria y se encontraron con que 29 proteínas se expresaban exclusivamente en la pancreatitis crónica [49].

La gran mayoría de los estudios realizados para la detección de biomarcadores metabolómicos se han orientado al diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma pancreático ductal y pancreatitis crónica [50, 51, 52, 53, 54].

Zhang y colaboradores identificaron en sujetos con cáncer de páncreas niveles elevados de N-acetil glicoproteína (NAG), dimetilamina (DMA), VLDL y acetona; y niveles bajos de 3-hidroxiacetato, lactato, HDL, LDL, citrato, alanina, glutamato, glutamina, histidina, isoleucina, lisina y valina; como metabolitos que podrían ser biomarcadores para diferenciar de pancreatitis crónica y sujetos sanos [51].

Kobayashi y colaboradores en 2013 desarrollaron un modelo diagnóstico de cáncer de páncreas basado en metabolitos en sangre usando el análisis de regresión logística múltiple. Aunque ningún biomarcador por si solo pudo ser

diagnóstico, la combinación de metabolitos específicos sirvió como marcador para el diagnóstico; siendo más preciso que marcadores tumorales tradicionales especialmente en la detección de tumores de pacientes sometidos a resección. Con ello se permitiría mejorar el pronóstico mediante la detección temprana cáncer cuando todavía es curable [52].

En esta línea Mayerle y colaboradores en 2017 publicaron un conjunto de 9 metabolitos que unido al CA 19.9 permitía diferenciar entre adenocarcinoma pancreático ductal y PC. Las implicaciones de dichos hallazgos en la práctica clínica hubiesen permitido mejorar el tratamiento de un tercio de los sujetos estudiados [53].

Lindahl y colaboradores identificaron 3 metabolitos que de forma aislada (Glycocholic acid, N-palmitoyl glutamic acid and Hexanoylcarnitine) y un panel de 5 metabolitos (Chenodeoxyglycocholate, Glycocholic acid, PAGN, N-palmitoyl glutamic acid, Hexanoylcarnitine) tenían la capacidad de discriminar adenocarcinoma pancreático ductal y PC [54].

Sin embargo, una de las principales limitaciones que presentan los estudios expuestos es el tamaño de muestra reducido por lo que se necesitan cohortes de pacientes mayores.

# Objetivos



## V. OBJETIVOS

1. Identificar, mediante tecnología de metabolómica, un panel de nuevos biomarcadores séricos que permitan el diagnóstico preciso y precoz de la pancreatitis crónica.
2. Determinar un panel de metabolitos séricos que pueda usarse como biomarcador para el diagnóstico de la insuficiencia pancreática exocrina en pacientes de pancreatitis crónica.
3. Estudiar la existencia de un panel de biomarcadores séricos que permitan diferenciar entre diabetes tipo 2 y diabetes pancreatogénica, o tipo 3c, mediante técnicas de metabolómica.
4. Valorar la implicación de la insuficiencia pancreática, tanto exocrina como endocrina, en la progresión de la pancreatitis crónica.
5. Revisar de forma conjunta los distintos aspectos etiopatogénicos y terapéuticos de la insuficiencia pancreática exocrina, con el objetivo de mejorar su diagnóstico y tratamiento precoz.
6. Analizar la validez de la terapia sustitutiva con enzimas pancreáticas en el control de la progresión de la pancreatitis crónica.





# Metodología



## VI. METODOLOGÍA

### ESTUDIO 1: Nuevos biomarcadores para el diagnóstico y evaluación de la pancreatitis crónica mediante metabolómica no dirigida.

#### Reclutamiento de las muestras

Nuestro estudio incluyó un total 113 muestras: 53 de pacientes con PC (grupo PC) y 60 de controles sanos (grupo Control). Las características basales de ambos grupos se detallan en la tabla 7.

Característica	Pacientes PC	IPE	No IPE	Control
<b>N</b>	53	32	21	60
<b>Edad (años)</b>	55.7	56.7	54.3	57.1
<b>Sexo</b>				
Hombres	44	30	14	29
Mujeres	9	2	7	31
<b>Test diagnóstico</b>				
Ecografía endoscópica	38	21	17	-
Tomografía computerizada	10	6	4	-
Ultrasonido abdominal	3	3	0	-
Estudio anatomopatológico	2	2	0	-
<b>Hábito alcohólico</b>				
Sí	34	23	11	21
No	19	9	10	39
<b>Hábito tabáquico</b>				
Sí	34	27	7	18
No	19	5	14	42
<b>Índice de Masa Corporal</b>				
Sobrepeso/Obesidad (>25)	24	10	14	24
Normopeso (18>IMC<25)	28	21	7	36
Sobrepeso (<18)	1	1	0	0
<b>Eventos cardiovasculares</b>				
Sí	4	2	2	60
No	49	30	19	0
<b>Dolor abdominal</b>				
Sí	24	16	8	-
No	29	16	13	-
<b>Diarrea</b>				
Sí	12	10	2	-
No	41	22	19	-
<b>Complicaciones</b>				
Sí	31	19	12	-
No	22	13	9	-
<b>Reingreso hospitalario</b>				
Sí	21	13	8	-

No	32	19	13	-
<b>Tratamiento</b>				
Endoscópico	8	6	2	-
Quirúrgico	13	10	3	-
Analgésico	30	21	9	-
Enzimas sustitutivas	29	22	7	-
Antidiabéticos orales	26	20	6	-
Estatinas/Fibratos	16	11	5	-

**Tabla 7.** Características basales de los controles sanos y pacientes con pancreatitis crónica. PC: Pancreatitis crónica; IPE: Insuficiencia pancreática exocrina; IMC: Índice de masa corporal.

Con el fin de obtener la máxima reproducibilidad en nuestro estudio, se minimizó la variación en los parámetros relacionados con los pacientes y el muestreo (estado de ayuno, hora del día de muestreo, etc.). Así, se obtuvieron muestras de sangre de pacientes en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada entre febrero y septiembre de 2017. El estudio fue aprobado por el comité ético del hospital (código de aprobación: 1269-M1-19), y todas los estudios se realizaron de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. El Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía suministró las muestras de suero del grupo Control. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes antes de su inscripción en el estudio.

La coagulación de las muestras se activó recolectando la sangre de los pacientes en tubos BC Vacutainer SSTII Advance con sílice (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), centrifugando durante 10 minutos (min) a 2450 revoluciones por minuto (rpm) y luego aspirando el sobrenadante y almacenándolo a  $-80^{\circ}$  C.

### **Evaluación de la insuficiencia pancreática exocrina**

La función pancreática exocrina de los pacientes con PC se evaluó de acuerdo con los niveles de elastasa fecal-1 (EF-1) medidos con el kit ELISA de elastasa pancreática de BioServ Diagnostics, siguiendo las instrucciones del fabricante (BioServ Analytics and Medical Devices Ltd., Rostock, Alemania). Se consideró  $EF-1 \geq 200 \mu\text{g/g}$  como función pancreática normal,  $EF-1 = 100-200 \mu\text{g/g}$  como insuficiencia pancreática exocrina (IPE) leve-moderada y  $EF-1 < 100 \mu\text{g/g}$  como IPE grave.

### **Extracción de metabolitos**

Se añadió acetronilo (AcN) (muestra 1:8/AcN) a las muestras de suero y se agitaron durante 2 min para eliminar las proteínas. Se centrifugaron a 15200 rpm durante 10 min a 4° C, después se recogieron los sobrenadantes y se transfirieron a viales y, por último, se evaporaron usando el evaporador GeneVac HT-8 (Savant, Holbrook, NY). Se utilizó AcN/agua (50:50) con ácido fórmico al 0,1% para reconstituir los residuos secos obtenidos, agitando durante 1 min. Todas las muestras se mantuvieron a 4° C durante los procedimientos analíticos.

### **Análisis por RPLC-HRMS e HILIC-HRMS**

La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna Waters Atlantis T3 (C18: 2,1 mm × 150 mm, 3 µm) (Waters Corporation, Milford, MA), manteniendo la temperatura de la columna a 25° C en el sistema de cromatografía líquida Agilent Serie 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El volumen de inyección fue de 5 µl. La fase móvil consistió en el disolvente A (agua/AcN 90/10 con ácido fórmico al 0,1%) y el disolvente B (AcN/agua 90/10 con ácido fórmico al 0,1%). El gradiente fue: 0-0,5 min 99% de disolvente B; 0,5-10 min 99% de disolvente B; 10-12 min 1% de disolvente B; 12-12,10 min 99% de disolvente B; 12,10-15 min 99% de disolvente B. El caudal fue de 300 µl/min.

Para el método HILIC, la separación cromatográfica se realizó de la siguiente manera: 0,00-0,10 min 99% de eluyente B; 0,10-7,00 min 30% de eluyente B; 7,00-7,10 min 99% de eluyente B; 7,10-10,00 min 99% de eluyente B, utilizando una columna de amida Waters Xbridge BEH (2,1 x 150 mm, 2,5 µm). La temperatura de la columna se mantuvo a 45° C. El caudal de elución fue de 400 µl/min. Se utilizó Agilent Serie 1290 como instrumento de cromatografía.

La detección de masas se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo AB SCIEX Triple TOF 5600 (AB SCIEX, Concord, ON) en modo de ionización por electrospray (ESI) positivo y negativo para los análisis RPLC e HILIC, respectivamente. Para obtener la fragmentación y los espectros de masas, el TripleTOF 5600 se operó utilizando un método de tiempo de vuelo (TOF) y una técnica de adquisición dependiente de la información (IDA) fragmentando los ocho iones más intensos, para recopilar simultáneamente información de HRMS y MS/MS. La calibración de la masa exacta se realizó

automáticamente cada 8 y 10 inyecciones en los análisis HILIC y RPLC, respectivamente.

La muestra de fase móvil se analizó cada 50 muestras para identificar las impurezas de los solventes o del procedimiento de extracción y para probar la contaminación por arrastre de picos intensos. Se inyectaron muestras de control de calidad cada 10 ciclos cromatográficos para comprobar la variabilidad en el análisis.

### **Creación del conjunto de datos**

El tiempo de retención (TR) y la masa/carga (m/z) se evaluaron para estudiar la reproducibilidad analítica utilizando el software PeakView (versión 1.0 con el complemento Formula Finder versión 1.0, AB SCIEX, Concord, ON). Los datos brutos se procesaron con el software MarkerView (versión 1.2.1, AB SCIEX, Concord, ON), que realiza detección de picos, alineación y filtrado de datos.

Para RPLC, la detección de picos se llevó a cabo usando un algoritmo automatizado en el rango de TR de 1-18 min, eliminando los picos más estrechos de 0.02 Da y 4 escaneos de TR y eliminando el ruido de fondo (100 cps) usando como herramienta el software MarkerView. La alineación de los picos se logró aplicando una tolerancia de TR de 0,10 min y una tolerancia m/z de 10 partes por millón (ppm).

Para HILIC, la detección de picos se llevó a cabo utilizando un algoritmo en el rango de TR de 1-8 min y eliminando el ruido de fondo (50 cps). La alineación de los picos se logró utilizando TR y tolerancias m/z de 0,15 min y 15 ppm, respectivamente. A continuación, se aplicó un filtro por “presencia” para retener las masas que aparecen en al menos 5 muestras en los grupos de casos de estudio, considerando únicamente los picos monoisotópicos. Finalmente, se empleó un procedimiento de filtrado con prueba t ( $p < 0,05$ ) y cambio de veces ( $< 0,6 - > 1,2$ ) para identificar señales de masa expresadas diferencialmente entre muestras de la fase móvil y muestras a estudiar.

### **Validación analítica**

Se utilizó el servidor web Metaboanalyst 3.0 para transformar la matriz de datos en una distribución de tipo gaussiana por sumas de área total, escalado automático y transformación al cubo. El estudio fue evaluado por el método de análisis de componentes principales (ACP) no supervisado. Se excluyeron las variables con reproducibilidad inaceptable (desviación estándar relativa [RSD] >30%). En la validación estadística,  $R^2$  y  $Q^2$  explicaron la bondad del ajuste y la predicción, respectivamente. El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) permitió la identificación de valores atípicos.

### **Análisis estadístico**

El análisis univariante se realizó con la prueba t de Student ( $p < 0.05$ ), determinando la significancia estadística de las diferencias entre grupos. También se realizó análisis multivariante, realizando ACP y PLS-DA para identificar los valores m/z responsables de la separación entre grupos. Los metabolitos con valores de importancia de la variable para la proyección (VIP) >1 se aceptaron como estadísticamente relevantes. Finalmente, el cambio de veces (<0,6 - >1,2) entre grupos se consideró como criterio de elección.

### **Identificación de los biomarcadores**

Los componentes moleculares seleccionados se identificaron mediante la búsqueda en las bases de datos Metlin, Human Metabolome Database, KEGG y Lipid Maps, utilizando una tolerancia de masa de <5 ppm. A continuación, se utilizó el software PeakView (versión 1.0 con el complemento Formula Finder versión 1.0, AB SCIEX, Concord, ON) para determinar las fórmulas moleculares. Los valores de m/z con la misma fórmula molecular en estimaciones experimentales y de bases de datos se analizaron más a fondo mediante el estudio de sus espectros MS/MS experimentales con información proporcionada por las bases de datos MassBank, NIST 2014 MS / MS, Human Metabolome Database y Metlin.

### **Evaluación de los biomarcadores**

La sensibilidad y especificidad de los biomarcadores propuestos se probaron utilizando la curva de característica operativa del receptor (COR), una medida no paramétrica de la utilidad de los biomarcadores. Realizamos análisis COR

univariantes y multivariantes para evaluar el valor clínico de los candidatos como biomarcadores individuales y en combinación con otros.

## **ESTUDIO 2: Papel de la insuficiencia exocrina y endocrina en el manejo de pacientes con pancreatitis crónica.**

### **Diseño del estudio y selección de la muestra**

Presentamos un estudio transversal de 50 pacientes con pancreatitis crónica (PC) en seguimiento en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada entre febrero de 2015 y junio de 2016. Los criterios de inclusión fueron: edad >18 años, cumplimiento de los criterios de diagnóstico de Rosemont para PC en pacientes diagnosticados por ecografía endoscópica, presencia de calcificaciones pancreáticas o dilatación del conducto pancreático principal con alteraciones parenquimatosas en los diagnosticados por ecografía abdominal o tomografía computarizada y resultado histológico positivo en los diagnosticados por biopsia pancreática. Los criterios de exclusión fueron la presencia de adenocarcinoma ductal pancreático, negativa a participar en el estudio y la falta de asistencia a las sesiones de seguimiento. El adenocarcinoma de páncreas se descartó mediante tomografía computarizada, resonancia magnética o ecografía reciente (<6 meses).

Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado por escrito para participar en el estudio, el cual fue realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y la legislación española vigente, preservando la confidencialidad de los participantes y anonimizando los datos personales. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario San Cecilio de Granada (número de aprobación 1269-M1-19).

Todos los pacientes del grupo de terapia de sustitutiva con enzimas pancreáticas (TSEP) estaban recibiendo dicho tratamiento en el momento de las pruebas de laboratorio y consumieron la misma cantidad de reemplazo de enzimas (2 cápsulas de 25,000 unidades de lipasa en el desayuno, el almuerzo y la cena). Además, todos los pacientes con déficit de vitamina D estaban recibiendo tratamiento para esta afección en el momento de la prueba. En cuanto a los oligoelementos, a todos los pacientes se les realizó una entrevista



nutricional sobre hábitos de vida saludables, incluyendo recomendaciones dietéticas para mejorar el consumo y suministro de nutrientes.

### **Evaluación de la insuficiencia pancreática, el estado nutricional y las complicaciones pancreáticas**

Las pruebas se realizaron en el momento de la adhesión al estudio, cuando se realizó una entrevista y se estableció un perfil nutricional. La función pancreática exocrina de los pacientes se evaluó utilizando el kit ELISA de elastasa pancreática de BioServ Diagnostics (BioServ Analytics Ltd., Rostock, Alemania) para determinar los niveles de EF-1, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se consideró que EF-1  $\geq 200$   $\mu\text{g/g}$  indica función pancreática normal, EF-1 = 100-200  $\mu\text{g/g}$  IPE leve-moderada y EF-1  $< 100$   $\mu\text{g/g}$  IPE grave. Todas las heces analizadas tenían una consistencia de 1 a 4 en la escala de Bristol. El estado nutricional de los pacientes con PC con y sin IPE se evaluó determinando su índice de masa corporal (IMC), sus concentraciones sanguíneas de glucosa, hemoglobina glicosilada (HbA1c), proteínas totales, albúmina, prealbúmina, somatomedina C, ferritina, transferrina, triglicéridos, colesterol, vitamina D, magnesio (Mg) y hemoglobina, y su recuento de linfocitos.

Se estudió la presencia de complicaciones pancreáticas secundarias a la PC, incluyendo complicaciones compresivas (pseudoquiste y absceso), estenóticas (bilíares y duodenales) y vasculares (trombosis del eje esplenoportal y pseudoaneurisma), el desarrollo de diabetes mellitus (DM) tipo 3c (siendo el criterio del diagnóstico de diabetes la glucosa plasmática  $\geq 126$  mg/dl o HbA1c  $\geq 6,5\%$ ) y la aparición de eventos cardiovasculares, definidos como graves (síndrome coronario agudo o accidente cerebrovascular) o leves (enfermedad arterial periférica o trombosis venosa profunda). Los datos sobre eventos cardiovasculares se recopilaron mediante la revisión de las historias clínicas del Servicio de Urgencias y los Servicios correspondientes de Cardiología, Neurología y/o Cirugía Vascul. La evaluación del dolor abdominal crónico se basó en la necesidad de analgésicos y en la escala analgésica de la Organización Mundial de la Salud (WHO), remitiendo a los pacientes a la Unidad de Dolor del Departamento de Anestesiología cuando el dolor era de difícil control. La información sobre abscesos pancreáticos, colangitis aguda y exacerbación de la

pancreatitis se recopiló mediante la revisión de los ingresos hospitalarios de los pacientes. El diagnóstico de estenosis duodenal se basó en la presencia de vómitos recurrentes y en los hallazgos radiológicos y endoscópicos, y se confirmó mediante biopsia. Se identificaron pseudoquistes y trombosis del eje esplenoportal en estudios de imagen realizados cada 6-12 meses. Finalmente, el diagnóstico de estenosis biliar se basó en las alteraciones del perfil hepático y los hallazgos por resonancia magnética o ecografía endoscópica.

### **Análisis estadístico**

Para los análisis estadísticos se utilizó SPSS v.21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.). Después del análisis descriptivo, se compararon las proporciones entre los grupos mediante la prueba de chi-cuadrado o, cuando no se cumplieron las condiciones, la prueba exacta de Fisher. Se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para comparar los valores medios de las variables cuantitativas entre dos grupos y la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los valores medios entre más de dos grupos.  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## **ESTUDIO 3: Nuevos biomarcadores para diferenciar entre diabetes mellitus tipo 3c y tipo 2 mediante metabólica no dirigida.**

### **Selección de la muestra**

Para evitar cualquier variación relacionada con el sexo, estudiamos muestras de sangre de 21 varones con diabetes mellitus tipo 3c (grupo T3cDM) y 19 varones con diabetes mellitus tipo (grupo T2DM). Se extrajeron muestras de sangre en el hospital entre las 8 a.m. y las 9 a.m. de pacientes en ayunas con T3cDM. Todos los pacientes firmaron su consentimiento informado de participación después de recibir información escrita sobre el estudio, que fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario San Cecilio de Granada (número de aprobación ética: 1269-M1-19) y se siguió los principios de la Declaración de Helsinki. Las muestras se recogieron en tubos BD Vacutainer SSTII Advance (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) que contenían sílice para activar la coagulación de la muestra. Después de una centrifugación

durante 10 min a 2450 rpm, el sobrenadante se aspiró y se almacenó a -80° C hasta el análisis. Las muestras de suero de pacientes del grupo T2DM fueron suministradas por el Biobanco del Sistema Público de Salud de Andalucía y se obtuvieron y trataron de la misma forma que las muestras del grupo T3cDM. Las características basales de ambos grupos están resumidas en la tabla 8.

	<b>T3cDM</b>	<b>T2DM</b>
<b>N</b>	21	19
<b>Edad, media años (±DS)</b>	58.42 (±9.57)	55.96 (±6.16)
<b>Sexo</b>		
Hombres	21	19
Mujeres	0	0
<b>Raza caucásica</b>	21	19
<b>Estadío</b>		
A	0	-
B	0	-
C	21	-
<b>Duración enfermedad, años</b>	5.36	7.14
<b>HbA1c, %</b>	7.82	7.69
<b>IMC, media (±DS)</b>	21.4 (±6.61)	24.3 (±3.54)
<b>Glucosa, mg/dL</b>	144.36	138.42
<b>Tratamiento con insulina</b>	21	19

**Tabla 8.** Características basales de pacientes en grupo T3cDM y T2DM.

### **Extracción de metabolitos**

Todas las muestras del estudio se mantuvieron a 4° C durante su manipulación. La precipitación de proteínas se logró utilizando acetonitrilo (AcN) (muestra 1:8/AcN) y agitando durante 2 min, seguido de centrifugación a 15200

rpm durante 10 min a 4° C. A continuación, los sobrenadantes se trasladaron a viales de HPLC y se secaron en un evaporador GeneVac HT-8 (Savant, Holbrook, NY, EE.UU.). El material restante se disolvió en una solución de AcN/agua [50:50] con ácido fórmico al 0,1% y luego se agitó durante 1 min.

### **Análisis por LC-HRMS**

Las muestras se analizaron mediante LC-HRMS integrada por el sistema de cromatografía líquida Agilent 1290 acoplado a un espectrómetro de masas Q-TOF 5600 (Triple Quadrupole Time-of-Flight) (AB SCIEX, Concord, ON, Canadá) utilizando el modo ESI positivo. La etapa cromatográfica se logró con una columna de HPLC Atlantis T3 (C18: 2.1 mm × 150 mm, 3 µm) (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.) mantenida a 25° C y con un volumen de inyección de 5 µL de muestra. La composición de la fase móvil fue la siguiente: 0,1% de ácido fórmico - 90:10 de agua/AcN (eluyente A) y 0,1% de ácido fórmico - 90:10 de AcN/agua (eluyente B). La elución de los analitos se logró aplicando el siguiente gradiente de elución: 0,00-0,50 min 1% de eluyente B; 0,50-11,00 min 99% de eluyente B; 11,00-15,50 min 99% de eluyente B; 15,50-15,60 min 1% de eluyente B; 15,60 –20,00 min 1% de eluyente B. El flujo se fijó en 300 µL/min. El Q-TOF 5600 se configuró en un modo de IDA que permitió la adquisición simultánea de datos de HRMS y MS/MS de escaneo completo. Los parámetros de la fuente de iones y las condiciones de IDA fueron: fuente de gas 1:50,00; fuente de gas 2: 50,00; gas de cortina: 45,00; temperatura: 500,00° C; voltaje de pulverización de iones flotante: 4500,00; masas TOF: min = 80.0000 Da max = 1600.0000 Da; tiempo de acumulación: 0,2500 s, tiempo de acumulación IDA: 0,1000 s.

Para asegurar la determinación precisa de la masa exacta, se llevó a cabo una calibración de masa periódica cada 10 inyecciones con una solución estándar. La secuencia de inyección de muestras incluyó muestras de solvente orgánico (SO) y muestras de control de calidad (QC) cada 10 inyecciones. Las muestras de control de calidad se extrajeron de un conjunto de alícuotas iguales de todas las muestras de suero recogidas en este estudio y se utilizaron para evaluar la deriva analítica del sistema. Se utilizaron muestras de SO para filtrar

cualquier contaminante de los disolventes orgánicos o del procedimiento de extracción y para comprobar el efecto de la contaminación remanente.

### **Creación del conjunto de datos**

Se aplicó el software PeakView (versión 1.0 con el complemento Formula Finder versión 1.0, AB SCIEX, Concord, ON, Canadá) para verificar el TR y la deriva de m/z del experimento. Se seleccionó el software MarkerView (versión 1.2.1, AB SCIEX, Concord, ON, Canadá) para el procesamiento de datos obtenidos por LC-HRMS sin procesar. Este software permitió la detección de picos, alineación, filtrado de datos, determinación de m/z y RT e integración de picos de iones para cada muestra. Los cálculos se realizaron en el rango de RT de 1 a 17,2 min y el umbral de intensidad máxima se estableció en 60 cps. Las tolerancias de los valores de alineación m/z y RT se establecieron en 0,10 min y 10 ppm, respectivamente. Solo los valores m/z que aparecieron en, al menos, 10 muestras del grupo de estudio se incluyeron en la matriz de datos, produciendo una matriz de 3998 características definidas por RT y valores m/z. A continuación, se consideró que los picos monoisotópicos (886 características) solos reducían la redundancia de masa y mejoraban la selección de características moleculares verdaderas. Las variables se eliminaron de la matriz de datos si su reproducibilidad era inadecuada (desviación estándar relativa [RSD]> 30% en muestras de control de calidad [QC]) o si se observaron en <50% de las muestras de QC. Como resultado, se eliminaron 350 funciones. Luego, se identificaron las señales de masa expresadas diferencialmente por el SO y las muestras del estudio de caso (T3cDM y T2DM) aplicando un procedimiento de filtrado adicional, calculando el valor medio de cada característica en las muestras en blanco y QC (conjunto de todos los extractos) y aplicando una t - prueba. Todas las características con un valor de p <0,05 y una relación de control de calidad medio en blanco/media >1,5 se eliminaron de la matriz de datos (257 características). Finalmente, se consideró una matriz de datos filtrados que comprende 278 características para un análisis adicional.

### **Tratamiento previo de los datos**

La normalización se realizó utilizando una muestra de control de calidad y normalización de cociente probabilístico, escala de centrado medio y

transformación logarítmica para transformar la matriz de datos en una distribución de tipo más gaussiano.

### **Validación analítica y detección de valores atípicos**

Para identificar la deriva del sistema analítico se utilizó el ACP. En total se reconoció un valor atípico en el grupo T3CDM y dos en el T2DM en el análisis PLS-DA. La eliminación de valores atípicos no produjo un aumento en las cifras  $R^2$  ó  $Q^2$ .

Se empleó el antibiótico roxitromicina como patrón analítico. Todas las muestras estudiadas se enriquecieron después de la reconstitución de los residuos secos con 5 uL de una solución madre de roxitromicina para producir una concentración final de 150 ng/ml.

### **Análisis estadístico**

La distribución normal de la matriz de datos se verificó con la prueba de Shapiro. La prueba t de Student y las pruebas de Wilcox se utilizaron para explorar diferencias significativas en las características entre los grupos T3cDM y T2DM. El umbral de significación se fijó en un valor de  $p < 0,05$ , incluida la corrección de la tasa de descubrimientos falsos (FDR) de Benjamini-Hochberg. Luego, se aplicó un análisis multivariado (ACP y PLS-DA) para identificar las variables más discriminantes entre los grupos. Los criterios de selección de características se establecieron finalmente en un valor de  $p$  corregido por FDR  $< 0,05$  y un cambio de veces (DM2/T3cDM) que oscilaba entre  $< 0,6$  y  $> 1,5$ .

### **Identificación de biomarcadores**

La estimación de la fórmula molecular a partir de datos experimentales (masa precisa, perfil isotópico y patrones de fragmentación) se realizó con el software PeakView (versión 1.0 con el complemento Formula Finder versión 1.0, AB SCIEX, Concord, ON, Canadá). A continuación, se buscó en bases de datos compuestas (Metlin, Human Metabolome Database, Lipid Maps, PubChem, ChemSpider) y bases de datos espectrales (MassBank, NIST2014) con los datos experimentales de cada candidato para la anotación estructural. En base a estos criterios, todas las anotaciones encontradas en nuestro estudio deben tomarse

como provisionales. Cuando fue posible, las anotaciones provisionales se confirmaron utilizando estándares auténticos.

### **Evaluación de metabolitos**

El área bajo la curva COR (AUC) se utilizó para evaluar el potencial predictivo de los biomarcadores candidatos seleccionados, ya sea individualmente o en combinación.

## **ESTUDIO 4: Análisis de los factores implicados en la progresión de la pancreatitis crónica**

### **Diseño del estudio y selección de la muestra**

Se presenta un estudio ambispectivo en pacientes con diagnóstico de PC, para evaluar el papel de la TSEP y los principales agentes etiológicos, consumo de tabaco y alcohol, en la progresión de la enfermedad.

El período de reclutamiento quedó comprendido entre febrero de 2015 y junio de 2016. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para formar parte del estudio. Los diferentes ensayos se realizaron de acuerdo con los requisitos establecidos en la Declaración de Helsinki y la legislación española actual. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

Se obtuvo de la base de datos del programa Archinet un listado de todos los pacientes con PC que habían sido valorados en la Unidad de Gestión Clínica de Aparato Digestivo del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Posteriormente, se comprobó que los seleccionados cumplían los criterios diagnósticos de PC y que habían sido valorados en consulta en los 2 últimos años para proceder a su reclutamiento. El diagnóstico de PC se definió por alteraciones morfológicas tanto ductales como parenquimatosas, evidenciadas mediante pruebas de imagen o hallazgos histopatológicos, obtenidos a través de biopsia o pieza quirúrgica. Se excluyeron aquellos pacientes que rechazaron participar en el estudio, se perdieron en el seguimiento o desarrollaron adenocarcinoma de páncreas.

### **Procedimientos del estudio**

Se concertó una entrevista para recoger las variables retrospectivas. También se realizó una extracción de sangre periférica (20 ml) para el estudio prospectivo de las variables analíticas. El período de seguimiento fue de 18 meses para las complicaciones, estudio de ingresos hospitalarios y eventos cardiovasculares.

### **Análisis estadístico**

En el análisis descriptivo se calculó la media junto con la desviación estándar y la mediana para las variables cuantitativas, y las frecuencias absolutas y porcentajes para las variables cualitativas.

Se realizó un análisis bivalente para estudiar la relación de las variables en estudio con las variables principales. Se utilizó Chi-cuadrado para comparar proporciones entre grupos y, cuando éste no cumplía las condiciones de validez, se aplicó el test exacto de Fisher. Como métodos no paramétrico, la U de Mann-Whitney fue aplicada para comparar dos muestras independientes, comparando los rangos promedios y/o medianas. Se utilizó el test de Kruskal-Wallis para comparar diferencias entre medianas en más de dos grupos. EL software IBM SPSS V.21 se usó para el análisis estadístico.  $p < 0.05$  se consideró significativo en todos los test.



# Resultados

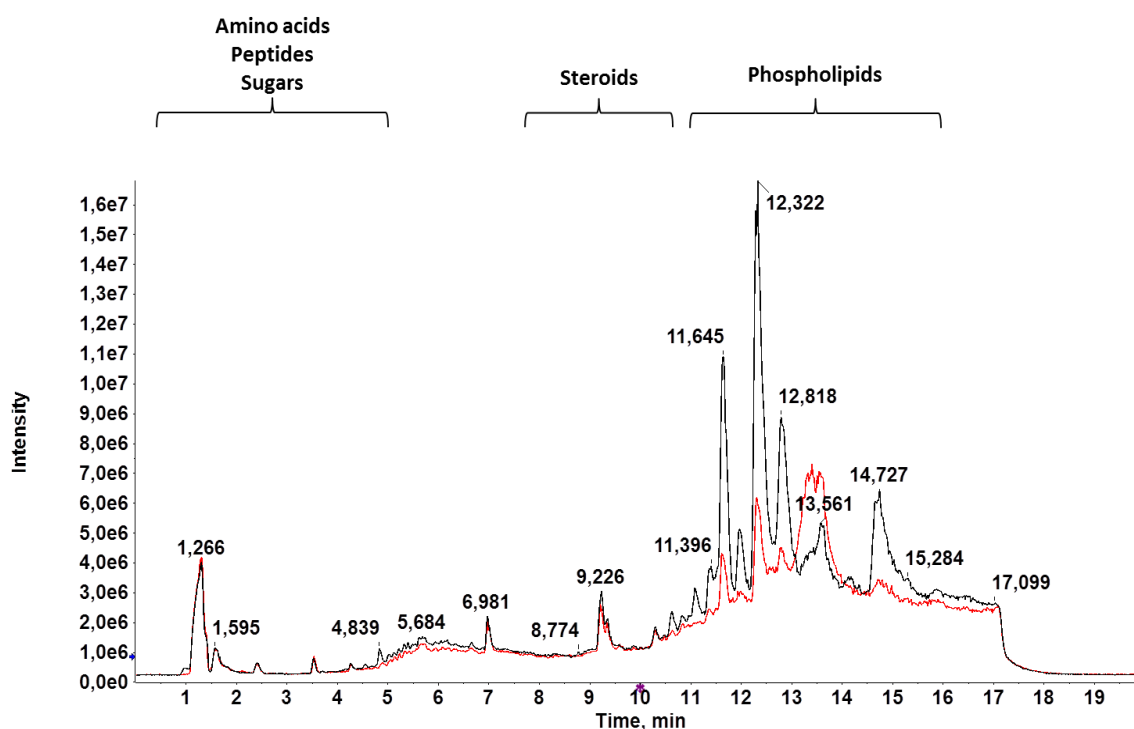


## VII. RESULTADOS

### 1. Nuevos biomarcadores para el diagnóstico y evaluación de la pancreatitis crónica mediante metabolómica no dirigida.

#### 1.1. Nuevos metabolitos para el diagnóstico de pancreatitis crónica.

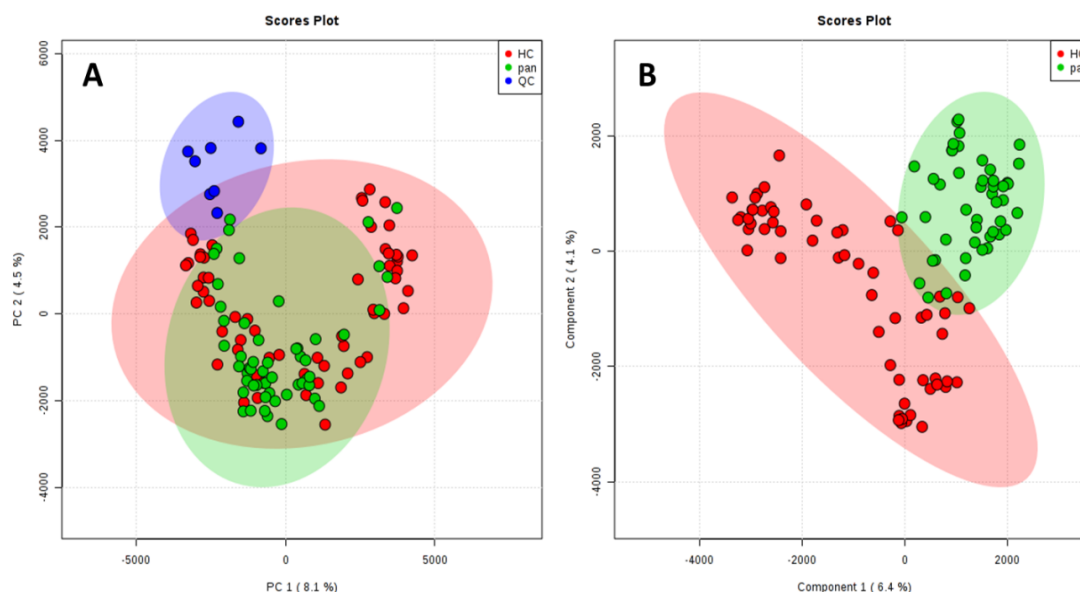
Utilizamos una aproximación metabolómica no dirigida mediante RPLC asociada a HRMS, que permitió detectar diferencias entre los patrones de metabolitos en pacientes con PC y controles sanos. Según los cromatogramas obtenidos la mayores diferencias entre controles sanos y pacientes con PC se observaron en el tiempo medio y final del mismo, donde se encuentran la mayoría de los lípidos (Figura 6).



**Figura 6.** Imagen representativa de un cromatograma de un control sano (rojo) y un paciente con pancreatitis crónica (negro).

Se obtuvo una matriz de datos de 4456 metabolitos característicos, de los cuales 1242 fueron monoisotópicos; 603 de los distintivos se expresaron diferencialmente en muestras de sujetos sanos y PC y muestras de fase móvil (FM). Después de normalización, 220 variables fueron descartadas debido a variabilidad inaceptable (FDR >30%), y los 383 restantes se evaluaron mediante ACP. LA gráfica de ACP (Figura 7A) reveló una agrupación cercana de muestras

QC, lo que indica que la separación entre las muestras de controles sanos y PC se atribuyó principalmente a factores biológicos. El estudio mediante PLS-DA (Figura 7B) indicó la viabilidad para diferenciar entre muestras de controles sanos y PC.



**Figura 7.** (A) Representación gráfica del análisis de componentes principales; (B) Representación gráfica del análisis mediante PLS-DA. Los puntos verdes corresponden a los pacientes con pancreatitis crónica, los puntos rojos corresponden a los controles rojos y los puntos azules indican las muestras de control de calidad.

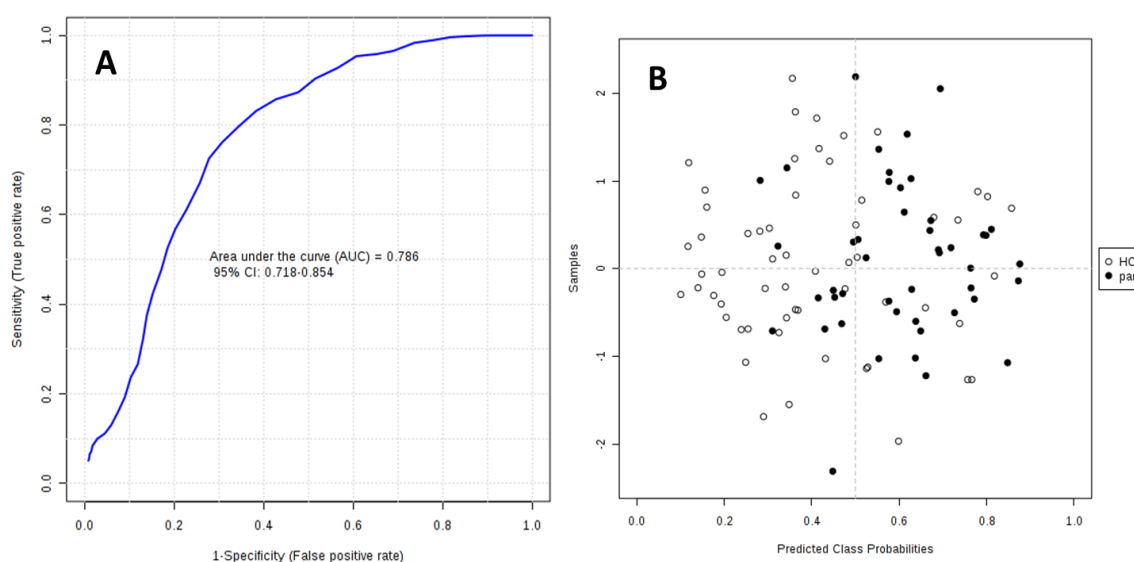
Dado que los datos metabolómicos para la capacidad predictiva del modelo de PLS-DA debe obtener un valor  $R^2 \geq 0,7$  y un valor  $Q^2 \geq 0,4$  con una variabilidad de  $\leq 0,2-0,34$ , se obtuvo un valor  $Q^2$  de 0,76 y un valor  $R^2$  de 0,99 para discriminar entre controles sanos y PC. Entre las 383 variables restantes, 135 tenían un valor de  $p < 0,05$ . El cálculo del cambio de veces ( $< 0,6 - > 1,5$ ) mostraron 47 metabolitos que estaban regulados en direcciones opuestas en las muestras de PC frente a las de controles sanos. De éstos 3 metabolitos fueron finalmente seleccionados como potenciales biomarcadores de PC de acuerdo con su VIP en el estudio de PLS-DA (Tabla 9).

m/z	TR	VIP	p	CV	Fórmula	Identificación	AUC
321,1304	5,94	2,10	4,43E-8	1,91	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> N <sub>8</sub> O <sub>12</sub>	5-methyltetrahydropteroyltri-L-glutamate	0,715
428,3735	10,32	1,46	2,66E-5	0,50	C <sub>25</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>4</sub>	Acylcarnitine C18:0	0,72
610,3716	12,63	2,56	1,97E-5	1,74	C <sub>29</sub> H <sub>56</sub> NO <sub>10</sub> P	PGPC	0,699

CV: Cambio de veces expresado como la ratio entre HC/CP; PGPC: 1-palmitoyl-2-glytaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine.

**Tabla 9.** Información detallada de los potenciales biomarcadores de pancreatitis crónica.

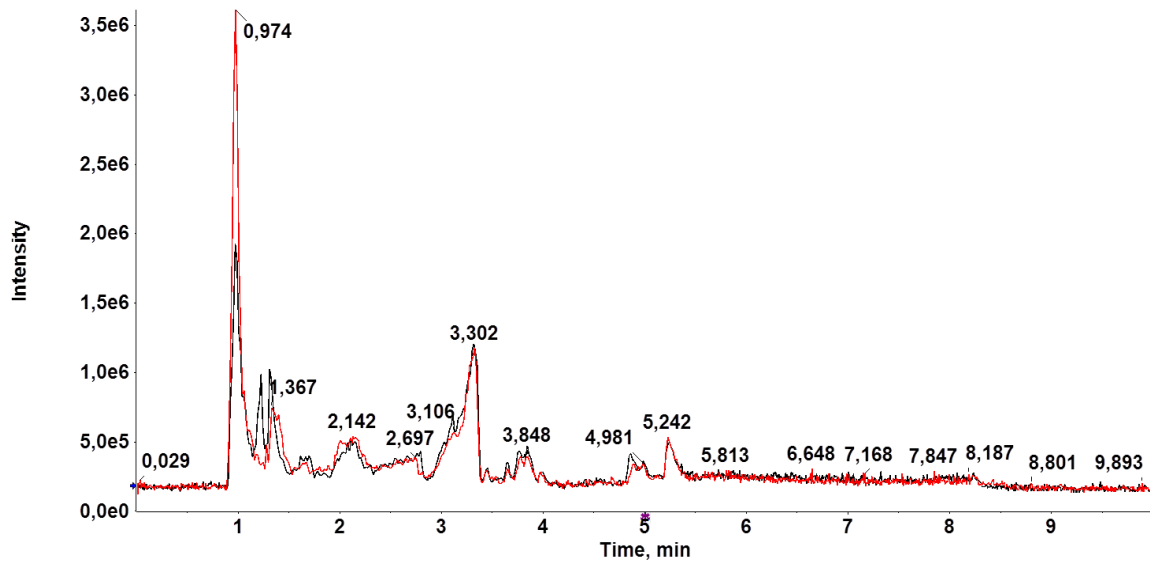
El potencial de los biomarcadores candidatos se evaluó más a fondo mediante la construcción de las curvas COR, obteniéndose los valores de AUROC que se muestran en la Tabla 9. El AUROC de la combinación de estos tres biomarcadores fue de 0,786 (IC al 95%: 0,718-0,854) (Figura 8A), mayor que el valor de AUROC de cada biomarcador de manera individual. La correspondiente matriz de confusión (Figura 8B) muestra que las muestras de 40 controles sanos fueron correctamente y 18 incorrectamente clasificadas, mientras que 32 muestras de PC fueron correctamente y 15 incorrectamente clasificadas.



**Figura 8.** (A) Representación gráfica de la curva COR de la combinación de los biomarcadores obtenidos. (B) Matriz de confusión correspondiente.

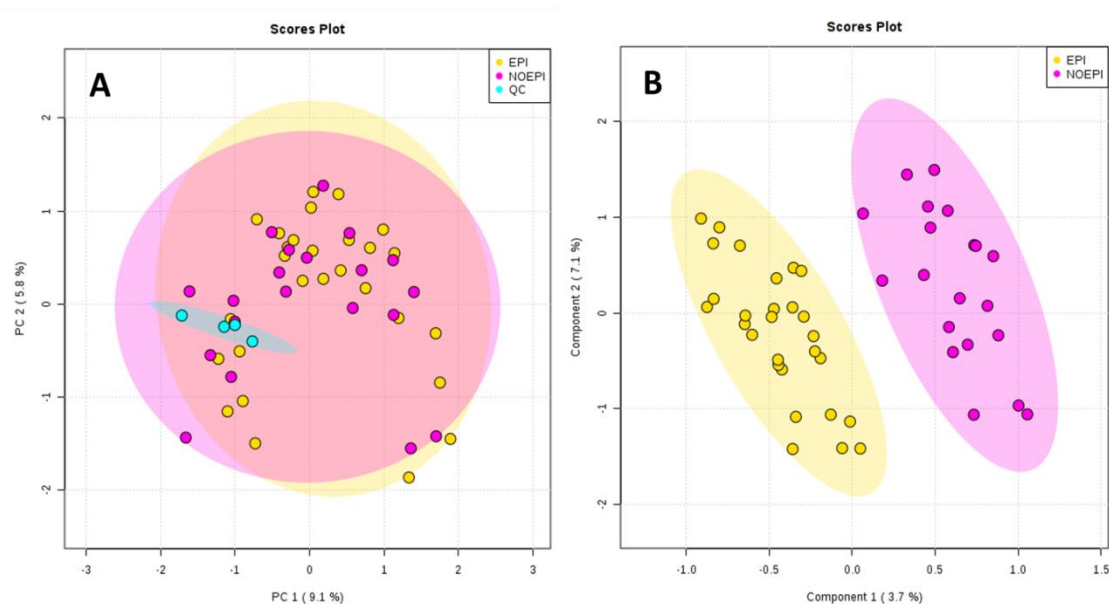
## 1.2. Nuevos metabolitos para el diagnóstico de la insuficiencia pancreática exocrina.

La IPE fue diagnosticada o descartada en pacientes con PC usando el test de la EF-1, siendo 60,4% de los pacientes con PC diagnosticados de IPE. Entre los diagnosticados con IPE, el 87,5% tenían IPE severa (EF-1 <100  $\mu\text{g/g}$ ). Con estas muestras realizamos RPLC en modo ESI(+), pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos IPE y NO-IPE (Figura 9). Sin embargo, utilizando el mismo método de extracción pero con HILIC como técnica de separación y en modo ESI(-), se obtuvo un número significativamente mayor de metabolitos.



**Figura 9.** Imagen representativa de un cromatograma de un paciente con IPE (negro) y un paciente NO-IPE (rojo).

Después de los procesos de alineación y filtrado, se obtuvo una matriz de datos de 302 metabolitos característicos, de los cuales 262 fueron monoisotópicos. Entre estos, 254 se expresaron diferencialmente en muestras de casos (EPI y NO-EPI) y muestras de FM. Después de la normalización, 6 de estas variables fueron descartadas debido a la inaceptable variabilidad (RSD >30%). La representación gráfica del análisis de componentes principales para las 248 variables restantes reveló una agrupación cercana de las muestras QC (Figura 10A), indicando que la separación observada entre los pacientes IPE y NO-IPE fue principalmente debida a factores biológicos. Por su parte el análisis mediante PLS-DA sugirió que era factible para discriminar entre estos pacientes (Figura 10B). El valor de  $Q^2$  para la capacidad predictiva del modelo de PLS-DA para discriminar entre IPE y NO-IPE fue 0.44 and el valor  $R^2$  fue 0.74, lo que indica que podría discriminar con éxito entre pacientes con y sin EPI.



**Figura 10.** (A) Representación gráfica del análisis de componentes principales; (B) Representación gráfica del análisis mediante PLS-DA. Los puntos amarillos corresponden a pacientes con IPE, los puntos rosas a pacientes sin IPE, y los puntos azules a las muestras de controles de calidad.

De estas 248 variables, 13 tenían un valor de  $p < 0,05$ . El cálculo del cambio de veces de veces ( $<0.6 - >1.2$ ) mostró que 12 metabolitos presentaron una regulación opuesta dependiendo de si se trataba de pacientes con y sin IPE. Cuatro de ellos fueron seleccionados como potenciales biomarcadores de acuerdo a su valor VIP en el modelo PLS-DA. El potencial de los cuatro candidatos como biomarcadores clínicos se evaluó adicionalmente mediante análisis COR univariante, obteniendo los valores de AUROC exhibidos en la tabla 10.

m/z	TR	VIP	p	CV	Fórmula	Identificación	AUC
303.9/3.9	3.87	2.33	0.02	1.30	C3H7N3O6P4	-	0.75
634.3/2.1	2.07	1.92	0.03	1.30	C30H49N6O10	Pentastine	0.73
828.6/1.3	1.26	1.06	0.004	1.20	C45H84NO10P	PS(19:1(9Z)/20:1(11Z))	0.75
841.9/3.1	3.13	2.31	0.03	1.45	C50H73N15O11	Bradykinin	0.70

CV: Cambio de veces expresado como la ratio entre EPI/NO-EPI; PS(19:1(9Z)/20:1(11Z)): Glycerophosphoserine (19:1(9Z)/20:1(11Z)).

**Tabla 10.** Información detallada de los potenciales biomarcadores de insuficiencia pancreática exocrina.

## 2. Papel de la insuficiencia exocrina y endocrina en el manejo de pacientes con pancreatitis crónica.

## 2.1. Características de los pacientes con y sin insuficiencia pancreática exocrina

La tabla 11 exhibe las características de los 50 pacientes con PC incluidos en este estudio, dividido entre aquellos con IPE y aquellos sin esta complicación.

	Total	Pacientes con IPE	Pacientes sin IPE	Valor de p
<i>N</i>	50	30 (60%)	20 (40%)	
Edad media	54.82	55.77	53.4	0.751
Género				0.021 <sup>a</sup>
Varón	41 (82%)	28 (93.3%)	13 (65%)	
Mujer	9 (18%)	2 (6.7%)	7 (35%)	
Caucásica	50 (100%)	30 (100%)	20 (100%)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )				0.062 <sup>a</sup>
Sobrepeso (>25)	21 (42%)	9 (30%)	12 (60%)	
Normopeso	28 (56%)	20 (66.7%)	8 (40%)	
Infrapeso (<18)	1 (2%)	1 (3.3%)	0 (0%)	
Diabetes mellitus	25 (50%)	18 (60%)	7 (35%)	0.083
Tipo 1–2	12 (48%)	10 (55.6%)	2 (28.6%)	
Tipo 3c	13 (52%)	8 (44.4%)	5 (71.4%)	
>12 a. desde el diagnóstico	8 (16%)	7 (23.3%)	1 (5%)	0.123
Test diagnósticos				0.233
USE	36 (72%)	19 (63.3%)	17 (85%)	
TC	14 (28%)	11 (36.7%)	3 (15%)	
Ecografía	3 (6%)	3 (10%)	0 (0%)	
Informe anatomopatológico	2 (4%)	2 (6.7%)	0 (0%)	
Etiología PC				0.608
Tóxica	33 (66%)	22 (73.3%)	11 (55%)	
Idiopática	11 (22%)	5 (16.7%)	6 (30%)	
Autoimmune	4 (8%)	2 (6.7%)	2 (10%)	
Pancreas divisum	2 (4%)	1 (3.3%)	1 (5%)	
Hábito alcohólico				0.051
Bebedor (UBE)	33 (66%) (7.1)	23 (76.7%) (6.6)	10 (50%) (7.9)	
Hábito tabáquico				0.311
Fumador (cigarros/día)	39 (78%) (20.5)	19 (63.3%) (20.1)	14 (70%) (22.1)	
TSEP	28 (56%)	21 (70%)	7 (35%)	0.015 <sup>a</sup>
Tratamiento quirúrgico	12 (24%)	10 (20%)	2 (4%)	0.163



IPE: insuficiencia pancreática exocrina; IMC: índice masa corporal; USE: ultrasonografía endoscópica; TC: tomografía computarizada; PC: pancreatitis crónica; UBE: unidad de bebida estándar; TSEP: terapia sustitutiva con enzimas pancreáticas.  
<sup>a</sup>  $p < 0.05$ .

**Tabla 11.** Características de los pacientes incluidos en el estudio, dividido entre aquellos con IPE y aquellos sin esta complicación ( $n = 50$ ).

La PC se definió por hallazgos morfológicos característicos, identificados con pruebas de imagen en pacientes con perfiles clínicos compatibles. La mayoría de los pacientes (72%) fueron diagnosticados usando USE, según los criterios de Rosemont, mientras que el 28% fue diagnosticado por TC, el 6% por ecografía abdominal y el 4% por informe anatomopatológico.

Considerando los 50 pacientes con PC, 30 (60%) tenían EF-1  $< 200 \mu\text{g/g}$  y fueron, por tanto, diagnosticado de IPE; en el 83,3% de estos casos, la IPE fue severa (elastasa fecal  $< 100 \mu\text{g/g}$ ).

Nosotros analizamos la posible asociación entre la presencia de IPE y el interval de tiempo desde el diagnóstico de PC, seleccionado 12 años como el punto de corte. El tiempo desde el diagnóstico fue  $> 12$  años en el 35% de los paciente con IPE y en un 5% de los que no presentaban esta complicación, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0,123$ ). No se encontró asociación significativa entre una historia de PC  $> 12$  años y ser fumador o bebedor ( $p = 0.174$  y  $p = 0.237$ , respectivamente).

Los valores IMC mostraron que la mayoría (66,7%) de los pacientes con IPE tenían un peso normal, mientras que la mayoría (60%) de los que no tenían IPE tenían sobrepeso, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística ( $p = 0,062$ ). El estado nutricional no fue comparado entre pacientes con IPE leve-moderada y grave debido a la gran disparidad en el tamaño de la muestra (25 frente a 5).

En la tabla 12 se muestran los pacientes con y sin IPE que difirieron significativamente en los niveles sanguíneos de HbA1c (7,16 *versus* 5,9%,  $p = 0,007$ ), prealbumina (23,64 *versus* 27,94 mg/dL,  $p = 0.005$ ), y magnesio (1,87 *versus* 1,98 mg/dL  $p = 0.03$ ); estando los valores medios de estos parámetros dentro del rango normal en ambos grupos, excepto los niveles de HbA1c, que estuvieron por encima del límite superior de la normalidad en los pacientes con

IPE. El 34,4% de los pacientes con hipomagnesemia recibió tratamiento con inhibidores de la bomba de protones. Los niveles de glucosa fueron mayores y los niveles de colesterol fueron menores en los pacientes con IPE *versus* sin IPE, aunque no se alcanzó la significación estadística ( $p = 0,06$  para ambas variables). Solo 12 pacientes requirieron cirugía (resección de páncreas o cirugía del tracto digestivo), y no mostraron diferencias estadísticamente significativas con el grupo de IPE. Ningún paciente del estudio fue diagnosticado de hemocromatosis o enfermedad celíaca.

	Normal	Total	Pacientes con IPE	Pacientes sin IPE	Valor de $p$
N		50	30	20	
Glucosa (mg/dL)	75–115	116.98 ( $\pm 51.6$ )	127.23	104.65	0.06
HbA1C (%)	3–6	6.59 ( $\pm 1.6$ )	7.16	5.9	0.007 <sup>a</sup>
Proteínas totales (mg/dL)	6.6–8.3	7.19 ( $\pm 0.5$ )	7.16	5.9	0.471
Albumina (g/dL)	3.5–5.2	4.19 ( $\pm 0.4$ )	4.21	4.28	0.568
Prealbumina (mg/dL)	20–40	25.29 ( $\pm 6.4$ )	23.64	27.94	0.005 <sup>a</sup>
Somatomedina C ( $\mu\text{g/L}$ )	81–225	161.08 ( $\pm 77.2$ )	143.12	177.37	0.113
Colesterol (mg/dL)	140–200	191.57 ( $\pm 47.5$ )	181.41	199.45	0.06
Triglicéridos (mg/dL)	89–150	138.69 ( $\pm 73.8$ )	134.8	162.06	0.846
Vitamin D (ng/dL)	20–100	16.49 ( $\pm 8.9$ )	14.41	19.53	0.097
Magnesio (mg/dL)	1.8–2.6	1.93 ( $\pm 0.21$ )	1.87	1.98	0.03 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dL)	12–17.2	14.57 ( $\pm 1.85$ )	14.56	14.96	0.649
Ferritina (ng/mL)	20–250	142 ( $\pm 48.12$ )	136.14	171.68	0.915
Transferrina (mg/dL)	10–360	284.28 ( $\pm 63.6$ )	284.86	290.84	0.562
Linfocitos absolutos	1100–4500	2170.8 ( $\pm 720$ )	2340	2375	0.762
Elastasa fecal ( $\mu\text{g/g}$ )	>200	180 ( $\pm 185.5$ )	42.9	386	0.000 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ . Los datos se informan como media (desviación estandar) con la excepción de los datos de elastasa fecal, para los cuales se dan solo los valores medios.

**Tabla 12.** Parámetros analíticos en la población de estudio, grupo con IPE y grupo sin IPE.

La tabla 13 exhibe otras complicaciones de PC observadas en el estudio de la población. La más frecuente fue la presencia de pseudoquistes (50%), seguido de dolor abdominal crónico (46%), estenosis biliar (26%) y exacerbación de pancreatitis (20%).

	Total	Pacientes con IPE	Pacientes sin IPE	Valor de p
N	50	30 (60%)	20 (40%)	
Complicaciones de PC				0.137
Pacientes sin complicaciones	10 (20%)	6 (20%)	4 (20%)	
Pacientes con complicaciones	40 (80%)	24 (80%)	16 (80%)	
Tipo de complicación				
Eventos cardiovasculares	4 (8%)	2 (6.7%)	2 (10%)	0.528
Dolor abdominal crónico	23 (46%)	15 (50%)	8 (40%)	0.487
Pseudoquiste	25 (50%)	15 (50%)	10 (50%)	0.507
Absceso	2 (4%)	1 (3.3%)	1 (5%)	0.623
Estenosis biliar	13 (26%)	10 (33%)	3 (15%)	0.249
Estenosis duodenal	1 (2%)	0 (0%)	1 (5%)	0.379
Trombosis del eje esplenoportal	3 (6%)	3 (10%)	0 (0%)	0.268
Colangitis aguda	1 (1%)	1 (3.3%)	0 (0%)	0.619
Exacerbación pancreatitis	10 (20%)	4 (13.3%)	6 (30%)	0.163

**Tabla 13.** Complicaciones de pancreatitis crónica.

## 2.2 Comparación de pacientes con insuficiencia pancreática exocrina con y sin terapia sustitutiva con enzimas pancreáticas.

Los resultados fueron comparados entre los pacientes con IPE que estaban con TSEP y aquellos que no lo estaban. Lo único que mostró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos fue la mayor frecuencia de DM en aquellos con TSEP (Tabla 14).

	Total de pacientes con IPE	Pacientes con IPE en TSEP	Pacientes con IPE sin TSEP	Valor de p
N	30 (60%)	21 (70%)	9 (30%)	
Edad media	55.77	54.81	58	0.428
Género				1.000
Varón	28 (93.3%)	19 (90.5%)	9 (100%)	
Mujer	2 (6.7%)	2 (9.5%)	0 (0%)	
Caucásico	30 (100%)	21 (100%)	9 (100%)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )				0.124

Sobrepeso (>25)	9 (30%)	4 (19%)	5 (55.6%)	
Normopeso	20 (66.7%)	16 (76.2%)	4 (44.4%)	
Infrapeso (<18)	1 (3.3%)	1 (4.8%)	0 (0%)	
Diabetes mellitus	18 (60%)	15 (71.4%)	3 (33.3%)	0.050 <sup>a</sup>
Tipo 1-2	10 (55.6%)	7 (46.7%)	3 (100%)	
Tipo 3c	8 (44.4%)	8 (53.3%)	0 (0%)	
>12 a. desde el diagnóstico	7 (23.3%)	7 (100%)	0 (0%)	0.071
Test diagnósticos				0.458
USE	19 (63.3%)	12 (57.1)	7 (77.8%)	
TC	6 (20%)	4 (19%)	2 (22.2%)	
Ecografía	3 (10%)	3 (14.3%)	0 (0%)	
Informe anatomopatológico	2 (6.7%)	2 (9.5%)	0 (0%)	
Etiología de PC				0.583
Toxica	22 (73.3%)	14 (66.7%)	8 (88.9%)	
Idiopática	5 (16.7%)	4 (19%)	1 (11.1%)	
Autoimmune	2 (6.7%)	2 (9.5%)	0 (0%)	
Pancreas divisum	1 (3.3%)	1 (4.8%)	0 (0%)	
Hábito alcohólico				0.918
Bebedor (UBE)	23 (77%) (6.6)	15 (71.4%) (6.7)	8 (88.9%) (6.6)	
Hábito tabáquico				0.716
Fumador (cigarette/day)	19 (63%) (20.1)	13 (61.9%) (20.6)	6 (66.7%) (20.0)	
Tratamiento quirúrgico	10 (20%)	9 (42.9%)	1 (11.1%)	0.204

USE: ultrasonografía endoscópica; TC: tomografía computarizada; PC: pancreatitis crónica; UBE: unidad de bebida estándar; <sup>a</sup>  $p < 0.05$ .

**Tabla 14.** Características de pacientes con IPE en TSEP y aquellos sin TSEP.

Se comparó el estado nutricional entre los pacientes con IPE en TSEP y aquellos sin TSEP, observándose que los valores de glucosa y HbA1C fueron significativamente mayores y los de prealbúmina y vitamina D significativamente menores en el grupo en TSEP (Tabla 15).

Normal	Total de pacientes con IPE	Pacientes con IPE en TSEP	Pacientes con IPE sin TSEP	Valor de $p$
--------	----------------------------	---------------------------	----------------------------	--------------

N		30	21	9	
Glucosa (mg/dL)	75–115	127.23 (±58.3)	138.57	100.78	0.037 <sup>a</sup>
HbA1C (%)	3–6	7.16 (±1.8)	7.61	6.01	0.027 <sup>a</sup>
Proteínas totales (mg/dL)	6.6–8.3	7.16 (±0.5)	7.15	7.17	0.928
Albumina (g/dL)	3.5–5.2	4.21 (±0.4)	4.19	4.27	0.776
Prealbumina (mg/dL)	20–40	23.64 (±6.8)	21.15	28.18	0.010 <sup>a</sup>
Somatomedin C (µg/L)	81–225	143.12 (±65.6)	141.17	147.5	0.802
Colesterol (mg/dL)	140–200	181.41 (±50.8)	178.5	187.22	0.758
Triglicéridos (mg/dL)	89–150	134.8 (±66.7)	129.28	149	0.628
Vitamin D (ng/dL)	20–100	14.41 (±6.1)	12.78	17.83	0.019 <sup>a</sup>
Magnesio (mg/dL)	1.8–2.6	1.87 (±0.2)	1.86	1.91	0.556
Hemoglobina (g/dL)	12–17.2	14.56 (±2.1)	14.21	15.38	0.213
Ferritina (ng/mL)	20–250	136.14 (±301)	166.61	303.23	0.483
Transferrina (mg/dL)	10–360	284.86 (±57.9)	281.7	291.89	0.555
Linfocitos absolutos	1100–4500	2340 (±711)	2308.1	2413.33	0.700
Elastasa fecal (µg/g)	>200	42.9 (±12.5)	32.38	74.11	0.132

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ . Los datos se informan como media (desviación estandar) con la excepción de los datos de elastasa fecal, para los cuales se dan solo los valores medios.

**Tabla 15.** Parámetros analíticos en pacientes con IPE en TSEP y aquellos sin TSEP.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en complicaciones de PC entre los pacientes con IPE con TSEP y aquellos sin él, cómo se muestra en la tabla 16.

	Total de pacientes con IPE	Pacientes con IPE en TSEP	Pacientes con IPE sin TSEP	Valor de <i>p</i>
N	30 (60%)	21 (70%)	9 (30%)	
Complicaciones de PC				
Pacientes sin complicaciones	6 (20%)	4 (19%)	2 (22.2%)	0.509
Pacientes con complicaciones	24 (80%)	17 (81%)	7 (77.8%)	
Tipo de complicación				
Eventos cardiovasculares	2 (6.7%)	2 (9.5%)	0 (0%)	0.506
Dolor abdominal crónico	15 (50%)	13 (61.9%)	2 (22.2%)	0.109

Pseudoquistes	15 (50%)	12 (57.1%)	3 (33.3%)	0.405
Absceso	1 (3.3%)	1 (4.8%)	0 (0%)	1.000
Estenosis biliar	10 (33%)	8 (38.1%)	2 (22.2%)	1.000
Estenosis duodenal	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Trombosis del eje esplenoportal	3 (10%)	2 (9.5%)	1 (11.1%)	1.000
Colangitis aguda	1 (3.3%)	0 (0%)	1 (11.1%)	1.000
Exacerbación pancreatitis	4 (13.3%)	3 (14.3%)	1 (11.1%)	1.000

**Tabla 16.** Complicaciones de pancreatitis crónica en pacientes con IPE en TSEP y sin TSEP.

### 2.3 Comparación de pacientes con insuficiencia pancreática exocrina leve y moderada versus severa.

Los pacientes fueron divididos entre aquellos con IPE leve/moderada y aquellos con IPE severa. La frecuencia de diabetes fue significativa mayor en el grupo de IPE severa, el cual también tenía significativamente una mayor proporción de pacientes en TSEP. No fueron observadas diferencias estadísticamente significativas en las otras variables analizadas (Tabla 17).

	Total de pacientes con IPE	Pacientes con IPE leve/moderada	Pacientes con IPE severa	Valor de p
N	30 (60%)	5 (16.7%)	25 (83.3%)	
Edad media	55.77	60.8	54.76	0.373
Género				1.000
Varón	28 (93.3%)	5 (100%)	23 (92%)	
Mujer	2 (6.7%)	0 (0%)	2 (8%)	
Caucásica	30 (100%)	5 (100%)	25 (100%)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )				0.803
Sobrepeso (>25)	9 (30%)	2 (40%)	7 (28%)	
Normopeso	20 (66.7%)	3 (60%)	17 (68%)	
Infrapeso (<18)	1 (3.3%)	0 (0%)	1 (4%)	
Diabetes mellitus	18 (60%)	0 (0%)	18 (72%)	0.006 <sup>a</sup>
Tipo 1-2	10 (55.6%)		10 (55.6%)	
Tipo 3c	8 (44.4%)		8 (44.4%)	
>12 años desde el diagnóstico	7 (23.3%)	0 (0%)	7 (28%)	0.304

Test diagnósticos				0.324
USE	19 (63.3%)	5 (100%)	14 (73.7%)	
TC	6 (20%)	0 (0%)	6 (24%)	
Ecografía	3 (10%)	0 (0%)	3 (12%)	
Informe anatomopatológico	2 (6.7%)	0 (0%)	2 (8%)	
Etiología pancreatitis				0.879
Tóxica	22 (73.3%)	4 (80%)	18 (72%)	
Idiopática	5 (16.7%)	1 (20%)	4 (16%)	
Autoimmune	2 (6.7%)	0 (0%)	2 (8%)	
Pancreas divisum	1 (3.3%)	0 (0%)	1 (4%)	
Hábito alcohólico				0.347
Bebedor (UBE)	23 (76%) (6.6)	4 (80%) (8.8)	19 (76%) (6.2)	
Hábito tabáquico				0.372
Fumador (cigarrillos/día)	19 (63%) (20.1)	3 (60%) (15.0)	16 (64%) (21.0)	
TSEP	21 (70%)	2 (40%)	19 (76%)	0.143
Tratamiento quirúrgico	10 (20%)	3 (60%)	7 (28%)	0.300

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ .

**Tabla 17.** Características de pacientes con IPE leve/moderada *versus* IPE severa ( $n = 30$ ).

A nivel de parámetros analíticos, los valores de glucosa y HbA1C fueron significativamente superiores y los valores de EF-1 significativamente menores en aquellos con enfermedad severa. No fueron observadas otras diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Tabla 18).

	Normal	Total de pacientes con IPE	Pacientes con IPE leve/Moderada	Pacientes con IPE severa	Valor de $p$
$N$		30	5	25	
Glucosa (mg/dL)	75–115	127.23 ( $\pm$ 58.3)	89.6	134.76	0.018 <sup>a</sup>
HbA1C (%)	3–6	7.16 ( $\pm$ 1.8)	5.5	7.58	0.009 <sup>a</sup>
Proteínas totales (mg/dL)	6.6–8.3	7.16 ( $\pm$ 0.5)	7.48	7.09	0.264
Albumina (g/dL)	3.5–5.2	4.21 ( $\pm$ 0.4)	4.26	4.2	0.907
Prealbumina (mg/dL)	20–40	23.64 ( $\pm$ 6.8)	26.03	22.98	0.325
Somatomedina C ( $\mu$ g/L)	81–225	143.12 ( $\pm$ 65.6)	150.6	141.33	0.845
Colesterol (mg/dL)	140–200	181.41 ( $\pm$ 50.8)	172	183.55	0.827

Triglicéridos (mg/dL)	89–150	134.8 (±66.7)	111.2	140.7	0.684
Vitamin D (ng/dL)	20–100	14.41 (±6.1)	17.56	13.72	0.126
Magnesio (mg/dL)	1.8–2.6	1.87 (±0.2)	1.94	1.86	0.388
Hemoglobina (g/dL)	12–17.2	14.56 (±2.1)	14.64	14.54	0.956
Ferritina (ng/mL)	20–250	136.14 (±301)	440.46	161.02	0.487
Transferrina (mg/dL)	10–360	284.86 (±57.9)	270.4	287.88	0.751
Linfocitos absolutos	1100–4500	2340 (±711)	2024	2402.76	0.420
Elastasa fecal (µg/g)	>200	42.9 (±12.5)	157.4	20	0.001 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ . Los datos se informan como media (desviación estandar) con la excepción de los datos de EF-1, para los cuales se dan solo los valores medios.

**Tabla 18.** Parámetros analíticos en pacientes con IPE leve/moderada *versus* severa ( $n = 30$ ).

Como se muestra en la tabla 19, a nivel de complicaciones de PC no fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con IPE leve/moderada e IPE severa, excepto por una frecuencia significativamente mayor de pseudoquistes en aquellos con IPE severa.

	Total de pacientes con IPE	Pacientes con IPE leve/moderada	Pacientes con IPE severa	Valor de $p$
$N$	30 (60%)	5 (16.7%)	25 (83.3%)	
Complicaciones de PC				0.583
Pacientes sin complicaciones	6 (20%)	1 (20%)	5 (20%)	
Pacientes con complicaciones	24 (80%)	4 (80%)	20 (80%)	
Tipo de complicación				
Eventos cardiovasculares	2 (6.7%)	0 (0%)	2 (8%)	0.138
Dolor abdominal crónico	15 (50%)	3 (60%)	12 (48%)	1.000
Pseudoquiste	15 (50%)	2 (40%)	13 (52%)	0.039 <sup>a</sup>
Absceso	1 (3.3%)	0 (0%)	1 (4%)	1.000
Estenosis biliar	10 (33%)	2 (40%)	8 (32%)	1.000
Estenosis duodenal	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Trombosis del eje esplenoportal	3 (10%)	2 (40%)	1 (4%)	0.108
Colangitis aguda	1 (3.3%)	1 (20%)	0 (0%)	1.000
Exacerbación pancreatitis	4 (13.3%)	2 (40%)	2 (8%)	1.000

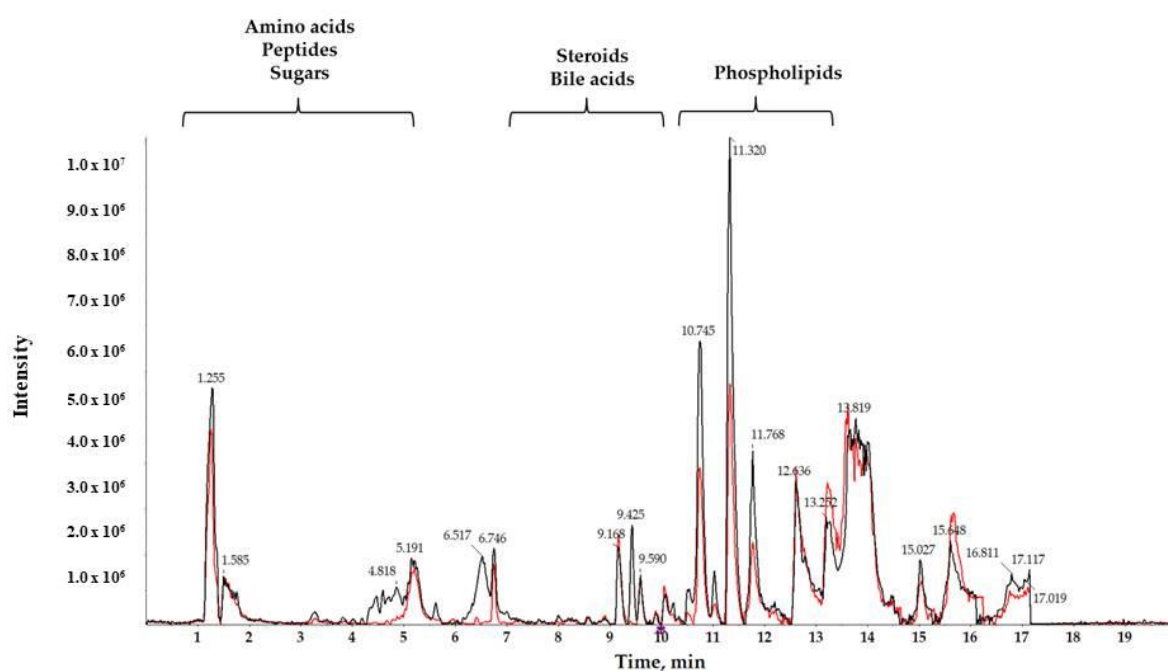
<sup>a</sup>  $p < 0.05$ .



**Tabla 19.** Complicaciones de pancreatitis crónica en pacientes con IPE leve/moderada *versus* severa ( $n = 30$ ).

### 3. Nuevos biomarcadores para diferenciar entre diabetes mellitus tipo 3c y tipo 2 mediante metabolómica no dirigida.

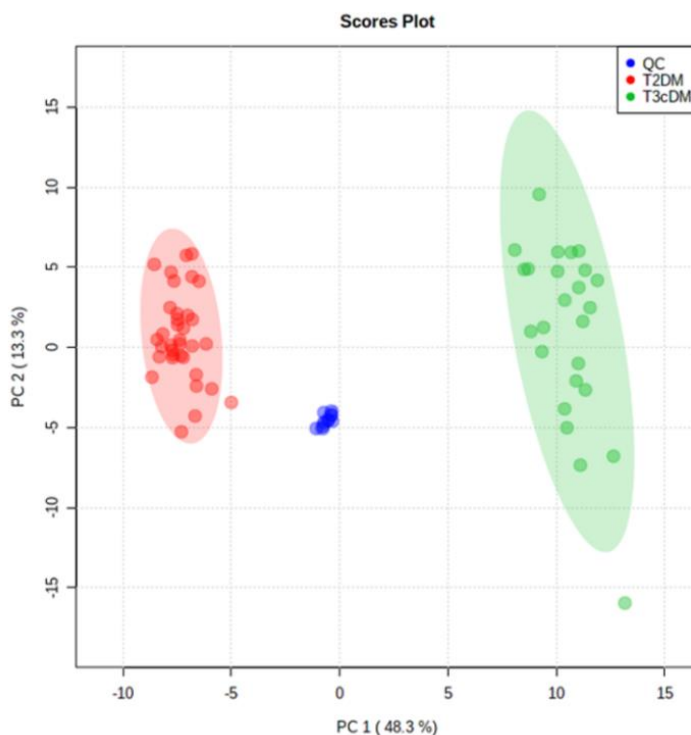
Se utilizó una columna de fase inversa para separar compuestos de polaridad media y baja. Los cromatogramas de iones totales (TIC) representativos de las muestras de diabetes tipo 2 y tipo 3c mostraron diferentes TR para metabolitos de polaridad media (eluyendo en el rango de 7 a 15 min), para metabolitos de alta polaridad (mostrando TR en los primeros 5 min) y metabolitos no polares (observados en el TR final). Los TR obtenidos mostraron que la separación cromatográfica fue satisfactoria, y se observó un cambio notable entre los grupos de los minutos 10.5 al 12, correspondiente al TR de la mayoría de los lípidos.



**Figura 11.** Imagen representativa de un cromatograma de suero de paciente con DM2 (negro) y DM3c (rojo).

Después de las etapas de alineación y filtrado, se recuperaron 3998 metabolitos, que comprenden 866 picos monoisotópicos. De las señales monoisotópicas, se excluyeron 350 por variabilidad inaceptable ( $RSD > 30\%$ ); a continuación, 279 se expresaron diferencialmente entre las muestras de estudio (DM3c y DM2) y las muestras de SO y se rechazaron como contaminantes. Por

lo tanto, se consideraron 259 variables en el ACP. Este análisis multivariante (Figura 12) mostró una agrupación ajustada de muestras de QC, lo que indica que la diferenciación entre DM3c y DM2 fue principalmente atribuible a factores biológicos. Dentro de este conjunto de 259 variables, 26 cumplieron los criterios para la selección como biomarcadores candidatos.



**Figura 12.** Representación gráfica del análisis de componentes principales de las muestras de TD2DM (rojo), T3cDM (verde), y control de calidad (azul).

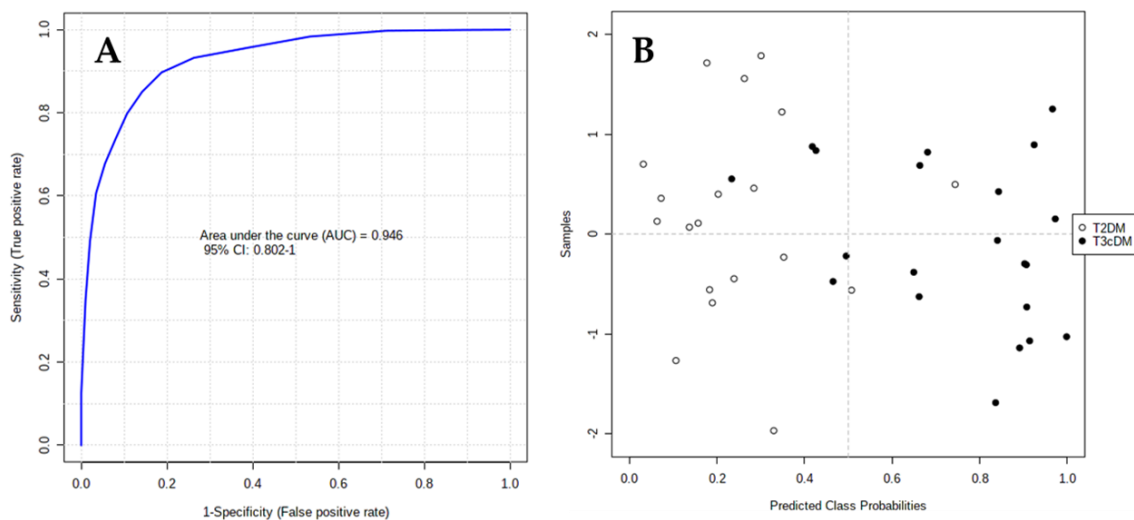
El valor de  $m/z$  de cada metabolito seleccionado se comparó con diferentes bases de datos (Metlin, NIST, LipidMaps and Human Metabolome Database). Como resultado, se obtuvieron varias fórmulas moleculares con un error de masa por debajo de 10 ppm. Cada fórmula molecular se clasificó de acuerdo con la  $m/z$  experimental y el perfil isotópico, con el fin de asignar una identificación para cada biomarcador potencial (Tabla 20).

$m/z$	TR	Aducto	Fórmula	ppm	FDR	CV	AUC	Identificación
188.0716	3.3	[M+H-NH3] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	-2	$7.86 \times 10^{-3}$	2.9319	0.93	L-Tryptophan
400.3408	9.9	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>4</sub>	3	$2.75 \times 10^{-2}$	2.62	0.81	Palmitoylecarnitine
431.3140	11.85	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	4	$1.39 \times 10^{-2}$	3.5449	0.80	7-HOCA
526.2931	10.6	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P	1	$7.86 \times 10^{-3}$	2.3703	0.71	LysoPE(22:6)

7-HOCA: 7 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid; LysoPE: lysophosphatidylethanolamine.

**Tabla 20.** Información detallada de los potenciales biomarcadores para distinguir entre Dm3c y DM2.

El AUROC calculado para cada marcador candidato varió de 0,71 a 0,93, lo que indica la utilidad clínica moderada de cada biomarcador individual. Sin embargo, en enfermedades complejas como el cáncer o la diabetes, la combinación de diferentes marcadores individuales en un modelo multivariante proporciona con frecuencia el poder discriminativo necesario, como en el presente caso. El AUC para el modelo final fue 0,946 (IC al 95%: 0,802–1), lo que indica su sólida capacidad discriminativa y respalda el potencial de estos metabolitos como biomarcadores (Figura 13A). Según este modelo, solo 2 de las 19 muestras etiquetadas como DM2 se clasificaron incorrectamente como DM3c, mientras que 5 de las 21 muestras etiquetadas se clasificaron incorrectamente como DM2 (Figure 13B).



**Figura 13.** (A) Representación gráfica de la curva COR de la combinación de los biomarcadores obtenidos. (B) Matriz de confusión correspondiente.

## 4. Análisis de los factores implicados en la progresión de la pancreatitis crónica

### 4.1 Grupo con pancreatitis crónica.

Nuestro estudio incluyó un total de 50 pacientes diagnosticados de PC con una edad media de  $54,82 \pm 12,30$ , teniendo el más joven 19 y el mayor 79 años. En cuanto a la distribución por sexo, 41 pacientes eran varones y 9 mujeres. El total de la muestra fue de raza caucásica (Tabla 21).

<b>Característica</b>	
<i>N</i>	50
Edad media	54.82
<i>Sexo</i>	
Hombre	41 (82%)
Mujer	9 (18%)
Caucásico	50 (100%)
<i>Estadio</i>	
A	6 (12%)
B	9 (18%)
C	35 (70%)
<i>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</i>	
Sobrepeso (> 25)	16 (32%)
Normopeso	28 (56%)
Bajopeso (< 18)	6 (12%)
<i>Diabetes mellitus</i>	
Tipo 1-2	12 (48%)
Tipo 3c	13 (52%)
<i>Tiempo desde el diagnóstico</i>	
< 12 años	42 (84%)
> 12 años	8 (16%)
<i>Test diagnóstico</i>	
Ultrasonografía endoscópica	36 (72%)

Tomografía computarizada	9 (18%)
Ultrasonografía abdominal	3 (6%)
Informe patológico	2 (4%)
<i>Etiología</i>	
Tóxica	33 (66%)
Idiopática	11 (22%)
Autoinmune	4 (8%)
Pancreas divisum	2 (4%)
<i>Hábito alcohólico</i>	
No bebedor	17 (34%)
Bebedor	33 (66%)
<i>Hábito tabáquico</i>	
No fumador	11 (22%)
Fumador	39 (78%)
<i>Insuficiencia pancreática exocrina</i>	
Sí	30 (60%)
No	20 (40%)
<i>Tratamiento</i>	
Tratamiento enzimático sustitutivo	28 (56%)
Endoscópico	7 (14%)
Quirúrgico	11 (22%)
Analgésico	29 (58%)
Antidiabéticos orales / insulina	24 (48%)
Estatinas / fibratos	16 (32%)
<i>Eventos cardiovasculares</i>	
	4 (8%)
<i>Dolor abdominal</i>	
	23 (46%)
<i>Diarrea</i>	
	11 (22%)

**Tabla 21.** Características de los pacientes con pancreatitis crónica.

En nuestra población, la causa de PC más frecuente fue la tóxica (66%), entendiéndose como aquella debida al consumo de alcohol y/o tabaco. De tal modo, 33 sujetos habían sido bebedores o seguían bebiendo activamente y 39 eran exfumadores o fumadores activos. La segunda causa más frecuente fue la idiopática (22%), dentro de la cual se incluyeron 3 casos con alta sospecha de causa genética: en un caso por la edad precoz de debut de la enfermedad y en los otros dos casos por la agregación familiar (padre e hija).

Las medidas terapéuticas más extendidas en nuestra población de estudio fueron el tratamiento analgésico (58%), seguida de la TSEP (56%) y de la administración de antidiabéticos orales/insulina (48%).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las variables de estudio (TSEP, hábito tabáquico y alcohólico) y el desarrollo de complicaciones, eventos cardiovasculares y la necesidad de ingreso hospitalario (Tabla 22).

<b>Complicaciones</b>	
<i>Número de complicaciones</i>	
0	21 (42%)
1	17 (34%)
>1	12 (24%)
<i>Tipo de complicación</i>	
Pseudoquiste	25 (86.2%)
Absceso	2 (6.9%)
Estenosis biliar	13 (44.8%)
Estenosis duodenal	1 (3.4%)
Trombosis esplenoportal	13 (10.3%)

*\*El porcentaje de los distintos tipos de complicación se ha calculado en base al total de individuos que presentan complicaciones (n=29).*

**Tabla 22.** Complicaciones de pacientes con pancreatitis crónica.

#### 4.2 Grupo con terapia sustitutiva con enzimas pancreáticas.

Dentro de este grupo de pacientes encontramos un 64,3% que eran diabéticos frente a un 35,7% que no lo eran ( $p = 0,023$ ). La gran mayoría (95,2%) tenía un IMC considerado normal, frente al restante 4,8% que presentaron todos bajo peso. Observamos que el 75% de los pacientes de este grupo no necesitó tratamiento endoscópico ( $p = 0,014$ ). Además, un amplio porcentaje de ellos (64,3%) también estaba en tratamiento con antidiabéticos orales o insulina ( $p = 0,013$ ).

A nivel de parámetros sanguíneos, existían diferencias significativas entre los rangos promedios de los niveles de glucosa, siendo mayor el valor en los pacientes de este grupo (29,43) frente a los que no tomaban TSEP (20,75) ( $p = 0,041$ ). También se observaron diferencias significativas en la variable HbA1c, apareciendo un rango promedio más elevado (25,56) en estos pacientes, frente al promedio del resto de pacientes (17,06) ( $p = 0,028$ ).

Además, en la prealbúmina también se evidenciaron diferencias entre los valores de los rangos promedios, siendo significativamente menor dicho valor en los pacientes con TSEP *versus* grupo sin esta terapia (19,62 *versus* 29,43;  $p = 0,015$ ). Por último, el magnesio también mostró diferencias estadísticamente significativas, siendo menor este valor (21,39) en los pacientes con TSEP, frente al de los que no la tomaban (30,73).

#### 4.3 Grupo con hábito tabáquico.

Dentro del grupo de pacientes con hábito tabáquico, la mayoría presentaba PC con estadio C (70,7%). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los rangos promedios en la variable glucosa, siendo mayor dicho rango (27,78) en estos pacientes, frente al rango promedio de los que no presentan hábito tabáquico (17,41). También en los valores de vitamina D, siendo menor dicho rango en los pacientes con hábito tabáquico (21,75 *versus* 31,36). Por último, también se observaron diferencias en la

variable calcio, siendo menor dicho rango dentro de este grupo (25,35 *versus* 26,05).

Por otro lado, también existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los rangos promedios de linfocitos, siendo mayor dicho rango en los pacientes con hábito tabáquico (27,42 *versus* 14,68), y en los rangos promedios de leucocitos, siendo mucho mayor frente a los que no presentan hábito tabáquico (28,76 *versus* 13,95).

#### **4.4 Grupo con hábito alcohólico.**

Dentro del grupo de pacientes con hábito alcohólico, también observamos como la gran mayoría de los mismos (96,3%) presentaban PC en un estadio C ( $p = 0,0013$ ). Además, era mayoritarios los varones y también los que presentaban hábito tabáquico (93,9%, en ambos casos).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,043$ ) entre los valores de los rangos promedios en la variable edad, de manera que en el grupo con hábito alcohólico este valor era de 28,48 y en el grupo sin hábito alcohólico 19,71. A nivel de parámetros en sangre, tan sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la variable glucosa, siendo mayor dicho dato en los pacientes con hábito alcohólico frente a los que no lo tenían (28,56 *versus* 19,56).



# Discusión



## VIII. DISCUSIÓN

Son muchas las incógnitas sin resolver entorno a la PC, una patología que posee, entre otras características, una fisiopatología no completamente aclarada lo que nos priva de la oportunidad identificar nuevas dianas terapéuticas sobre las que poder intervenir. Este hecho está íntimamente relacionado con uno de los mayores retos que plantea la pancreatitis crónica como es la dificultad para alcanzar un diagnóstico precoz [55]. Esta enfermedad se considera en la actualidad infradiagnosticada, estando basada su detección en cambios morfológicos, objetivables mediante pruebas de imagen, en estadios más avanzados de la enfermedad. Un diagnóstico más precoz nos permitiría prevenir complicaciones irreversibles derivadas de dicha patología [56] entre las que se encuentra un riesgo elevado de desarrollar cáncer de páncreas [55, 57, 58].

El campo de la metabolómica ofrece una oportunidad excepcional para identificar nuevos biomarcadores con tan solo una muestra de sangre periférica. La mayoría de la investigación en metabolómica ha ido enfocada, en el campo de la oncología, hacia la identificación de nuevos biomarcadores de cáncer, incluyendo el páncreas, para conseguir un diagnóstico en estadios más precoces que permita actuar antes de que la enfermedad sea irresecable y, por tanto, el tratamiento no sea curativo [59]. No obstante, resultaría más rentable identificar grupos de riesgo de desarrollo de cáncer de páncreas para establecer una intervención y seguimiento precoz y anticiparte a la aparición de esta complicación. Conseguir identificar nuevos biomarcadores para el diagnóstico de PC nos permitiría acotar la vigilancia e intervención sobre una población diana menor. Una vez identificada dicha población podremos actuar sobre aquellos factores modificables conocidos que favorecen la progresión de la enfermedad dando lugar a pérdida funcional y aparición de complicaciones.

Dado que no hay síntomas patognomónicos, el diagnóstico de PC continúa basándose en criterios morfológicos y funcionales que habitualmente son de aparición tardía en la evolución de la enfermedad. En los últimos años se ha incorporado como herramienta adicional la elastografía que determina la rigidez de la glándula pancreática, basándose en el hecho de que la sustitución de tejido funcional por cicatricial aumenta dicha rigidez [60].

La fibrosis pancreática conlleva la pérdida de la doble función endocrina y exocrina del páncreas. En el caso de la IPE es provocada fundamentalmente por patología pancreática, siendo la PC la primera causa en adultos. Otras causas son la fibrosis quística, la cirugía pancreática y los tumores que producen la destrucción del parénquima pancreático. Existen otras menos prevalentes y algunas emergentes que todavía se encuentran en discusión sobre su implicación en el origen de IPE [61]. El diagnóstico de la IPE también presenta sus limitaciones dado que los métodos directos son complejos y no disponibles fácilmente y los métodos indirectos carecen de alta sensibilidad [18]. Esto conlleva que también sea una entidad infradiagnosticada [62]. Igualmente, identificar nuevos biomarcadores nos puede poner en el camino para identificar individuos con PC. En el caso de aquellos pacientes con pancreatitis crónica ya conocida, permitiría iniciar tratamiento de forma precoz para evitar complicaciones derivadas de la misma como desnutrición y eventos cardiovasculares.

En el caso de la diabetes pancreatogénica (tipo 3c), su diagnóstico en pacientes con pancreatitis crónica conocida resulta fácil ya que se basa en los niveles de glucemia que se determina en un análisis de rutina [55]. No obstante, en los casos de diagnóstico de diabetes de nueva aparición que se cataloga erróneamente como diabetes de tipo 2, se puede producir un grave problema, especialmente si no se realizan pruebas para descartar una patología pancreática subyacente como puede ser una PC o incluso ser la primera manifestación de cáncer de páncreas [63]. En este contexto, la metabolómica es una herramienta que puede permitir la identificación de paneles de metabolitos para identificar la presencia de una PC en los estadios iniciales de la enfermedad antes de que aparezcan complicaciones y una pérdida funcional. Nuestro trabajo propone paneles de metabolitos que permitan la identificación precoz de IPE y la diferenciación de diabetes pancreatogénica que nos obligue a descartar patología pancreática no conocida ya que, IPE y diabetes pancreatogénica pueden ser consecuencia de la progresión de PC y/o la primera manifestación de cáncer de páncreas.

## 1. Factores de progresión e insuficiencia pancreática en pancreatitis crónica

La pérdida de la función pancreática, concretamente exocrina, a pesar de considerarse una entidad infradiagnósticada, se sitúa en algunos estudios entorno al 64-66% [64, 65]. En nuestra muestra, la IPE alcanzó el 60% y la diabetes el 50% habiéndose catalogado como pancreatogénica en el 52% de los diabéticos, lo que pone de manifiesto la alta prevalencia.

Todos los pacientes con IPE severa, definida por elastasa fecal  $< 100 \mu\text{g/g}$ , presentaron diabetes ( $p = 0.006$ ). Además, dentro del grupo con tratamiento sustitutivo con enzimas pancreáticas (PERT de las siglas en inglés - pancreatic enzyme replacement therapy) la proporción de diabéticos fue mayor ( $p = 0.023$ ) con niveles promedios de hemoglobina glicosilada (HbA1c) mayores ( $p = 0.028$ ) y mayor necesidad de tratamiento con antidiabéticos orales o insulina ( $p = 0.013$ ). Esto pone de manifiesto que la pérdida funcional pancreática tanto exocrina como endocrina tiene un curso paralelo a la evolución de la enfermedad [66].

La aparición de insuficiencia pancreática constituye un punto de inflexión en la progresión de la enfermedad predisponiendo a una peor evolución con mayor riesgo de complicaciones, como demostró de la Iglesia-García [67] en un estudio donde se observó un incremento de la mortalidad asociada a IPE en pacientes con PC. Las causas de muerte se relacionan con problemas derivados del abuso de alcohol y el consumo de tabaco más que con la propia enfermedad [68]. Por ello, su detección precoz es fundamental para una intervención temprana sobre aquellos factores modificables.

Dentro de las causas modificables de pancreatitis, el tabaco y sobre todo el alcohol, aparecen como factores etiológicos en las historias clínicas del 60 - 70% de los pacientes [55, 68]; estando presentes en el 66% en nuestra muestra de estudio en donde pudimos comprobar una asociación positiva en el consumo de ambos hábitos tóxicos. Tanto el grupo de fumadores como bebedores mostraron un mayor desarrollo de insuficiencia pancreática (exocrina y endocrina) siendo las diferencias estadísticas significativas ( $p = 0.024$  y  $p = 0.013$  respectivamente), y presentan un peor control glucémico ( $p = 0.037$  para fumadores y  $p = 0.039$  para bebedores).

Respecto al alcohol, no se ha podido demostrar la influencia ni del tipo de bebida ni del consumo acumulado necesario, proponiéndose por algunos autores una media de 80 g/día durante al menos 6 años [55]. Aunque se le atribuye un efecto dosis-dependiente, debe haber otros factores ambientales y de predisposición genética implicados que aumentan la susceptibilidad del páncreas a la toxicidad del alcohol. Esto se basa en estudios donde no se ha podido demostrar pancreatitis crónica en bebedores severos [69]. No obstante, si se ha podido relacionar un consumo abusivo de alcohol con un riesgo aumentado de desnutrición [55].

El desarrollo de insuficiencia pancreática exocrina y endocrina tiene lugar en menor tiempo en presencia de alcohol respecto a otras causas (incluso hereditarias), estimándose que la aparición de IPE sucede a los 10-15 años del diagnóstico de PC [55]. De hecho, la supervivencia de los pacientes con pancreatitis crónica es del 70% a los 10 años y se reduce a menos del 50% a los 20 años de evolución [66]. En nuestra población de estudio el porcentaje de bebedores es mayor en el grupo con IPE con tendencia a la significación estadística ( $p = 0.051$ ). La ingesta de alcohol no solo acelera la aparición de diabetes, sino que también favorece la necesidad de administrar insulina precozmente [68]. En el caso de PC con pancreatectomía total, los eventos de hipoglucemia son más frecuentes y severos si existe un abuso persistente de alcohol [55]. Además de ser causa de PC y favorecer el desarrollo de insuficiencia pancreática, el consumo mantenido de alcohol incrementa la mortalidad hasta un 60 % y el riesgo de padecer cáncer de páncreas [67].

El tabaco se ha propuesto como el principal factor que favorece la progresión de la enfermedad [55, 68]. Hay estudios que ponen evidencia su implicación directa en el desarrollo de IPE [70, 71], sugiriendo un mayor efecto sobre la función pancreática que el alcohol [71]. Actúa como factor proinflamatorio que se manifiesta en nuestra muestra con la elevación de reactantes de fase aguda como los leucocitos ( $p = 0.003$ ) y linfocitos ( $p = 0.003$ ), siendo el porcentaje de fumadores activos muy alto (78%). El consumo activo de tabaco implica también un mayor riesgo de la aparición de un dolor se haga constante respecto a paciente exfumadores [55]. También aumenta el riesgo de osteoporosis [72],

siendo significativo que en nuestra población de estudio, los pacientes fumadores presentaran niveles más bajos de calcio y vitamina D con diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.017$  y  $p = 0.042$ , respectivamente) en relación a los controles. Este hecho también se ha relacionado con una peor calidad de vida y mayor porcentaje de depresión y ansiedad [73]. Además de ser causa de PC [74], incrementa la mortalidad y el riesgo de cáncer de páncreas [75].

La implicación de los hábitos de vida en la historia natural de la PC hace que cualquier medida terapéutica a menudo resulte ineficaz si no se consigue el cese del consumo de tabaco y alcohol. Por ello, el eje fundamental del tratamiento se basa en la modificación del estilo de vida con abandono de los hábitos tóxicos y el tratamiento sustitutivo de la insuficiencia pancreática exocrina y endocrina [68]. Los beneficios globales de su abandono son incuestionables [55]. Puede ralentizar la progresión de PC con una recuperación parcial de la IPE y mejora algunos síntomas como el dolor pancreático [55].

La abstinencia alcohólica parece retrasar la progresión con un efecto más significativo sobre la función pancreática endocrina que la exocrina. También favorece que el dolor sea menos severo y menos complicaciones. La reducción del consumo ( $< 50\text{g/d}$ ) aumenta la esperanza de vida [55, 68]. En aquellos pacientes que refieran abstinencia o disminución significativa del consumo de alcohol debemos pensar en otras causas pancreáticas y extrapancreáticas de la sintomatología. El cese precoz del consumo de tabaco disminuye el riesgo de cáncer de páncreas, reduciéndose a niveles de no fumadores con el paso del tiempo (20 años sin fumar) hasta igualarse al de no fumadores, dado que el riesgo se incrementa con el número de cigarrillos y los años acumulados [68]. El cese precoz del tabaco disminuye el riesgo de desarrollar calcificaciones cuya presencia se ha relacionado con el dolor, aunque no se ha conseguido establecer claramente la relación entre tabaco y dolor en PC [55].

El abandono de ambos hábitos tóxicos favorece la eficacia de otros tratamientos como es el caso de tratamiento endoscópico por dolor, manteniéndose los pacientes libres de dolor por más tiempo [55]. También evita el desarrollo de osteopenia/osteoporosis en PC que supone un mayor riesgo de

fracturas, teniendo el tabaco un papel más relevante en la disminución de densidad mineral ósea [55]. Por lo tanto, se debe recomendar el abandono del tabaco y la reducción o eliminación completa del consumo de alcohol [55].

Actuar sobre los factores modificables es un reto difícil de abordar al ponerse en juego el problema de la adicción a los hábitos tóxicos, siendo el hábito tabáquico el más difícil de abandonar. El alcohol habitualmente lo abandona o reducen su consumo un porcentaje importante de pacientes, lo cual disminuye la progresión de la enfermedad y la sintomatología. Esto no ocurre con el tabaco [76], siendo necesarias nuevas estrategias que incluyen el asesoramiento y farmacoterapia, y dentro del asesoramiento terapias cognitivo conductuales, apoyo telefónico, terapia grupal y materiales educativos. La terapia de reemplazo con nicotina, bupropión y vareniclina están eficientemente probados como primera línea farmacológico, reservando clonidina y nortriptilina como medicamentos de segunda línea [55].

El otro pilar fundamental del tratamiento de la insuficiencia pancreática es el tratamiento sustitutivo, siendo de especial relevancia el PERT dado que la IPE constituye la principal causa de desnutrición en pacientes con PC [77]. Otras causas que contribuyen al desarrollo de este estado son el consumo de alcohol y la disminución de la ingesta por la sintomatología y complicaciones como la estenosis duodenal [77]. Un estudio reciente asocia la sarcopenia con un aumento de las hospitalizaciones y disminución de la supervivencia en pacientes con PC [78].

El PERT junto con una dieta equilibrada consigue un manejo adecuado de más del 80%, precisando suplementos orales nutricionales solo un 10-15% [55, 79]. Dentro de una dieta equilibrada no se recomienda la restricción de grasas siendo necesario evitar dietas muy ricas en fibras por disminución de la eficacia del PERT. Se recomienda la fortificación con alimentos ricos en proteínas [77]. Esto debe complementarse con la realización de ejercicio físico dado su efecto beneficioso en la recuperación de masa muscular [80].

Con el PERT se consigue el control sintomático y nutricional que se traduce en una mejora de la calidad de vida [80]. Aunque no se ha demostrado su beneficio en el control del dolor abdominal si puede aliviar síntomas de



malabsorción como el meteorismo que repercute en la sensación de bienestar del paciente [68]. En nuestra población se observó una menor necesidad de tratamiento endoscópico en los sujetos con PERT ( $p = 0.014$ ). Pero ante todo el PERT ha demostrado ser un factor independiente que mejora la supervivencia en patologías pancreáticas con IPE asociada como cáncer de páncreas [81].

Los estudios ponen de manifiesto que, a pesar de la alta prevalencia de IPE tanto en PC como en cirugía pancreática y cáncer de páncreas, las pruebas diagnósticas se realizan en un porcentaje pequeño, pocos pacientes reciben tratamiento y si lo reciben suele ser a dosis insuficientes [82, 83, 84, 85]. No obstante, en nuestra población de estudio se evidencia una asociación positiva del PERT con la necesidad de tratamiento quirúrgico ( $p = 0.014$ ). La eficacia del PERT viene medida por la normalización de los síntomas de malabsorción y de los parámetros antropométricos y bioquímicos de malnutrición. El objetivo, por tanto, no es solo el control sintomático, sino también alcanzar la normalización del estado nutricional [55].

En la muestra estudiada, el grupo con PERT mostró tendencia a un índice de masa corporal (IMC) normal ( $p 0.009$ ) lo que hace pensar que el PERT ayuda a mantener un peso normal o que dicha pérdida sea menos acusada como se ha visto en estudios previos [86, 87, 88, 89]. No obstante, el IMC puede llevar a malinterpretaciones, ya que no permite valorar el global de la composición corporal, pudiendo darse valores normales del mismo aunque el paciente presente sarcopenia o alteración de fluidos [90]. Muestra de ello es que en nuestra población no hubo una normalización de los parámetros analíticos nutricionales a pesar del PERT, mostrando el grupo con tratamiento unos niveles más bajos de prealbúmina ( $p 0.015$ ) y magnesio ( $p 0.025$ ), lo que pone de manifiesto que en ciertos casos las dosis fueron insuficientes. Con la finalidad de optimizar el PERT, se recomienda aumentar la dosis, tomarlo durante las comidas, que las cápsulas tengan recubrimiento entérico y asociar la supresión del ácido gástrico con inhibidores de la bomba de protones [62, 91].

## **2. Diagnóstico mediante metabolómica de pancreatitis crónica**

Las tecnologías “ómicas”, definidas por la detección de diferentes moléculas producidas por células, tejido u organismo, han mostrado una gran utilidad para

el diagnóstico, manejo y pronóstico de diversas enfermedades. Esto ha favorecido su integración y aplicabilidad en la práctica clínica siendo más accesibles a pesar de la limitación de requerir una infraestructura y equipamiento de alto nivel [92, 93]. Aunque la genómica es la tecnología que ha presentado mayor desarrollo, la metabolómica se plantea como una “ómica” emergente siendo de especial utilidad en la identificación de biomarcadores para el diagnóstico y monitorización de respuesta al tratamiento en cáncer [92, 93], especialmente cuando se usa la técnica de espectometría de masas [94, 95, 96].

Por ello, en el campo de las enfermedades pancreáticas se ha aplicado la metabolómica en el campo del diagnóstico oncológico [50,51, 52, 53, 54, 97, 98, 99, 100]. También se han realizado estudios mediante transcriptómica [101], proteómica [48, 49] y microbiómica [102, 103] en la búsqueda de nuevos biomarcadores de cáncer de páncreas.

En los últimos años en el entorno de la investigación respecto al cáncer, se viene hablando mucho de biopsia líquida como potencial herramienta revolucionaria en el futuro en su diagnóstico. Conceptualmente se basa en la detección de células tumorales circulantes (CTC) en sangre junto ácidos nucleicos libres (cfDNA), exosomas y tumor-educated platelets (TEPs), mediante técnicas de genómica-transcriptómica-proteómica [104]. Sin embargo, no está exenta de limitaciones como son la presencia de niveles bajos de CTC en determinadas neoplasias, pequeño porcentaje de cfDNA derivado de células tumorales o la fragilidad del RNA de las TEPs. Más recientemente se ha valorado la posibilidad de aplicar la metabolómica en la detección de los diferentes componentes de los exosomas implementando o mejorando la detección de biomarcadores [105]. Por ello, la biopsia líquida se plantea más en la valoración de la respuesta al tratamiento oncológico y la detección precoz de recaídas, siendo su papel más limitado en el diagnóstico de cáncer [104].

En relación a nuestro proyecto de investigación, el grupo está trabajando en una línea paralela basada en la transcriptómica, definida por la detección de ARN que refleja la expresión de determinados genes. El objetivo es identificar dentro de los pacientes con PC aquellos que presenten susceptibilidad genética a los

tóxicos causantes de la enfermedad (tabaco y alcohol), lo cual ayude a una mejor comprensión de su etiopatogenia.

Las limitaciones en el diagnóstico de PC que se exponen a continuación sacan a relucir la necesidad de nuevas herramientas diagnósticas que permitan la identificación de esta patología en estadios precoces. Y es aquí donde entra en juego la metabolómica en nuestro estudio. Tiene la ventaja de ser un método diagnóstico no invasivo que precisa de una muestra de sangre periférica. La facilidad y asequibilidad económica de dicha tecnología dependerá de que los hallazgos sean lo suficientemente relevantes para generalizar su uso en la práctica clínica. Y esto favorezca a su vez la disponibilidad de forma universal.

### **Limitaciones del diagnóstico de pancreatitis crónica**

La falta de un gold estándar para identificar la PC en estadios iniciales dificulta enormemente su diagnóstico [106]. Normalmente, dicho diagnóstico se basa en el conjunto de datos clínicos, pruebas de imagen y de función pancreática [55, 70, 106, 107]. Sin embargo, habitualmente suele existir un decalaje en el tiempo (de incluso años) entre la aparición de dichos criterios clínicos, morfológicos y funcionales. Los cambios morfológicos y funcionales suelen cursar en paralelo, pero hasta en un 25% hay discordancia [55]. Esto dificulta aún más un diagnóstico de certeza [70]. En la práctica clínica es frecuente alcanzar el diagnóstico mediante pruebas de imagen en fases avanzadas, quedando las pruebas funcionales para una valoración posterior de la función exocrina [108].

La presentación de los síntomas es muy variable, extendiéndose desde un simple dolor abdominal agudo a caquexia progresiva, no siendo, en cualquier caso, patognomónicos [109]. Muestra de ello son estudios donde se ha visto una alta prevalencia de pancreatitis crónica mediante ecoendoscopia en pacientes previamente catalogados de dispepsia funcional [110, 111, 112]. Como consecuencia, el intervalo entre la aparición de los síntomas y el diagnóstico de PC es de 33-55 meses si son bebedores, pudiendo prolongarse aún más si no hay un antecedente de consumo de alcohol (81 meses) [109].

Los cambios morfológicos en estadios iniciales son difícilmente reconocibles mediante pruebas radiológicas como TC o cRMN [70]. La USE constituye la prueba de imagen con más capacidad para el diagnóstico precoz [108, 113], pero se trata de una prueba invasiva. Por ello, siguiendo una estrategia de realizar pruebas de menor a mayor agresividad el TC suele ser de primera elección [114, 115] y es en aquellos casos en los que se mantiene una alta sospecha a pesar de la normalidad de las pruebas radiológicas, cuando entra en juego [70, 116]. Las pruebas de función pancreática también presentan limitaciones en la detección temprana de pancreatitis crónica. Los test indirectos son más accesibles y fácil de realizar, pero muestran una baja sensibilidad en estadios precoces. Por el contrario, los métodos directos son procedimiento invasivos y de menor disponibilidad [55]. No obstante, los test indirectos por su carácter no invasivo pueden plantearse en la valoración inicial si la probabilidad diagnóstico pretest es alta en base a criterios clínicos [116].

El desarrollo de la elastografía guiada por ecografía endoscópica ha supuesto un apoyo en el diagnóstico al permitir cuantificar el grado de fibrosis pancreática en PC [117, 118]. La evaluación multimodal dinámica del páncreas guiada por ecografía endoscópica asociada a secretina intravenosa aporta de forma simultánea información sobre criterios radiológicos (ecoendoscopia), funcionales (cuantificación de bicarbonato) y grado de fibrosis (elastografía) para el diagnóstico de la enfermedad en estadios iniciales [119].

En definitiva, el diagnóstico en estadios iniciales de esta enfermedad constituye un desafío surgiendo la necesidad de nuevos métodos diagnósticos.

### **Identificación de nuevos biomarcadores de PC mediante metabolómica**

En el presente estudio se han conseguido identificar un nuevo panel de metabolitos, no descritos hasta ahora, que apoya un diagnóstico de pancreatitis crónica respecto a controles sanos. El 5-methyltetrahydropteroyl-L-glutamate es un metabolito producido por bacterias de la flora intestinal. Estudios previos han hipotetizado sobre la implicación de la disbiosis intestinal como mediador proinflamatorio en PC [120, 121]. En base a esta hipótesis se han realizado estudios en animales de experimentación mostrando su potencial como diana terapéutica [122, 123]. Sin embargo son necesarios más estudios para

establecer la relación de la microbiota con las enfermedades pancreáticas [124]. Por otra parte, las acilcarnitinas, como la identificada en nuestro panel de metabolitos (Acylcarnitine C18:0), se han relacionado en estudios previos con el riesgo de desarrollar diabetes pudiendo funcionar como marcadores predictores [125, 126, 127]. De hecho en nuestra cohorte de estudio la mitad de los sujetos eran diabéticos. Por último, el metabolito 1-palmitoyl-2-glytaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PGPC) parece estar implicado en procesos de estrés oxidativo actuando a nivel del endotelio vascular favoreciendo la aterosclerosis [128, 129, 130]. Esto justificaría el riesgo incrementado de eventos cardiovasculares asociado a IPE [131, 132]; presentando el 60% de los pacientes con PC de nuestra muestra IPE. Debido a la implicación como inductores pro/antiinflamatorios de los fosfolípidos oxidados como PGCG, también se han realizado estudios buscando su utilidad como dianas terapéuticas [133, 134].

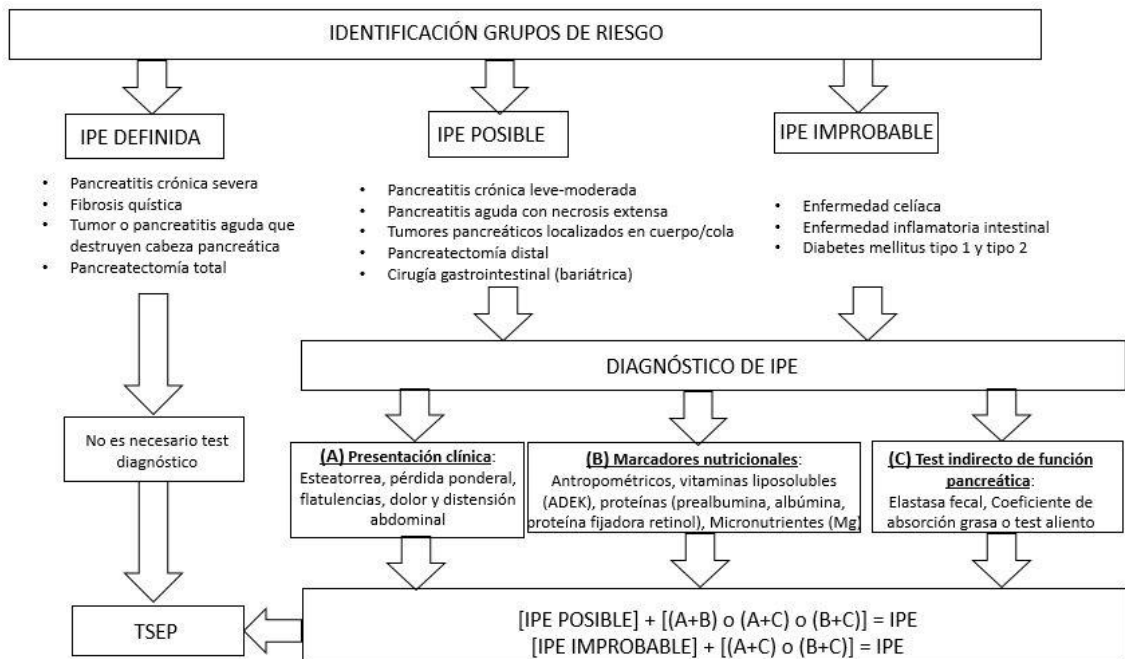
### **3. Diagnóstico mediante metabolómica de insuficiencia pancreática exocrina (IPE)**

La falta de conocimiento y el hecho de infravalorar la importancia de esta entidad dentro de la propia gastroenterología puede influir en que considere infradiagnosticada e infratratada. Así lo ponen de manifiesto algunos estudios donde se muestra un bajo porcentaje de pacientes diagnosticados y dentro de los mismos son pocos los tratados, presentando muchos de ellos dosis insuficientes [82, 84, 135].

Por ello, nos planteamos realizar una revisión en la que se estableciera un abordaje integral de los distintos aspectos de la patología y su orientación hacia la aplicabilidad de forma sencilla en la práctica de los gastroenterólogos. Concretamente, se presenta un algoritmo de actuación destacando la relevancia de los grupos de riesgo para la sospecha de IPE [136] y la necesidad de combinar criterios clínicos, analíticos y test de función pancreática de fácil aplicación [62] para establecer el diagnóstico e iniciar tratamiento precozmente [137].

#### **Limitaciones en el diagnóstico de IPE**

El diagnóstico de IPE va a requerir de la combinación de síntomas de maldigestión/malabsorción, marcadores analíticos de desnutrición y/o un test de función pancreática no invasivo, en el contexto clínico adecuado definido por los grupos de riesgo a los que atribuye su implicación en la etiología de IPE [62] como se expone en la figura 14. La necesidad de combinar varios criterios para establecer el diagnóstico ya supone un inconveniente a lo que se añaden las limitaciones propias de cada uno de ellos.



**Figure 14.** Resumen de algoritmo diagnóstico (adaptado de Dominguez-Muñoz y Club Australiano de Páncreas). IPE: insuficiencia pancreática exocrina. TSEP: tratamiento sustitutivo con enzimas pancreáticas. [137]

Dentro de las causas definidas de IPE, la pancreatitis crónica es la más frecuente en adultos y la fibrosis quística en edad pediátrica [138]. En el caso de la pancreatitis crónica, el desarrollo de IPE se asocia tradicionalmente con el tiempo de evolución de la enfermedad [62], ocurriendo comúnmente después de 5-10 años de evolución [139] cuando se produce una pérdida del 90% de la función. No obstante, otros autores ponen en duda que realmente sea necesaria dicha pérdida para desarrollar IPE [140, 141].

El riesgo y tiempo de evolución necesario para la aparición de IPE varía según la etiología. La causa alcohólica es el mayor factor de riesgo. En un

estudio la mediana de aparición de IPE fue 13 años en los bebedores crónicas frente a 26 años en PC idiopática [142]. Dicho riesgo se incrementa en combinación con el tabaco, aunque en algún estudio se ha considerado como una causa independiente de IPE en pacientes sin patología pancreática [71]. También se asocia a pancreatitis hereditaria (Mutación PRRS1), autoinmune tipo I y causas obstructivas [62, 136]. La presencia extensa de calcificaciones también se relaciona con una mayor presencia de IPE [62].

La probabilidad diagnóstica de IPE también es muy alta en PA con necrosis pancreática extensa, cáncer de páncreas localizado en cabeza y tras cirugía del tracto digestivo superior [62]. Sin embargo, hay otras causas que todavía se encuentran en discusión como pueden ser la celiaquía y enfermedad inflamatoria intestinal [141]. Dentro de los criterios clínicos, la presencia de esteatorrea unido a la pérdida de peso parece lo más predictivo de IPE [143, 144]. Sin embargo, es frecuente la desaparición de la esteatorrea por la disminución de la ingesta de grasas involuntaria y la pérdida de peso suele aparecer de forma más tardía. Esto hace que la sintomatología sea muy variable o incluso paucisintomática [62].

En cuanto a la valoración del estado nutricional, los parámetros antropométricos utilizados habitualmente en la práctica clínica como el IMC no suelen ser de utilidad en este tipo de pacientes dado que un alto porcentaje presenta sobrepeso [25] como se observó en nuestra muestra de estudio (42%). Sin embargo, la sarcopenia también es frecuente en estos pacientes [145] poniendo en evidencia la limitación del IMC que no tiene en cuenta la composición corporal. Esto hace la implementación de métodos de cribado de sarcopenia fiables en la práctica clínica. La malnutrición asociada suele ponerse de manifiesto con la alteración de diversos parámetros bioquímicos nutricionales incluyendo proteínas, vitaminas liposolubles y oligoelementos, como ponen de manifiesto estudios previos [16].

En nuestro estudio se objetivó que la fosfatasa alcalina (FA) puede ser un buen marcador predictor de IPE, no descrito en estudios previos como ocurre con la hemoglobina glicosilada (HbA1c). Para ello se aplicó el modelo de regresión logística incluyendo aquellas variables que en el análisis bivariente

junto a IPE habían alcanzado mayor significación estadística: prealbumina ( $p = 0.005$ ), magnesio ( $p = 0,030$ ), fosfatasa alcalina ( $p = 0,001$ ) y hemoglobina glicosilada ( $p = 0,007$ ) (tabla 7). Después de aplicar el modelo de regresión logística, las variables prealbúmina y magnesio perdieron la significación estadística. En el modelo final, las variables FA ( $p = 0,049$ ) y HbA1c glicosilada ( $p = 0,017$ ) mantuvieron la significación estadística como buenos predictores del riesgo de desarrollar IPE. Por cada unidad que se eleva la FA y la HbA1c, el riesgo de IPE se incrementa 0,025 y 0,876 respectivamente.

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
<b>Paso 1<sup>a</sup></b>	<b>HbA1c36</b>	,744	,395	3,541	1	,060	2,103
	<b>PreAlb2040</b>	-,043	,079	,305	1	,581	,958
	<b>Mg1.82.6</b>	-1,017	2,218	,211	1	,646	,362
	<b>FA30120</b>	,025	,013	3,890	1	,049	1,026
	<b>Constante</b>	-4,057	6,021	,454	1	,500	,017
<b>Paso 2<sup>a</sup></b>	<b>HbA1c36</b>	,811	,381	4,535	1	,033	2,249
	<b>PreAlb2040</b>	-,050	,077	,426	1	,514	,951
	<b>FA30120</b>	,025	,013	3,754	1	,053	1,025
	<b>Constante</b>	-6,215	3,889	2,553	1	,110	,002
	<b>HbA1c36</b>	,876	,366	5,725	1	,017	2,400
<b>Paso 3<sup>a</sup></b>	<b>FA30120</b>	,025	,013	3,881	1	,049	1,026
	<b>Constante</b>	-8,030	2,818	8,122	1	,004	,000

**Tabla 7.** Regresión logística: variables en la ecuación.

Así pues, una probabilidad pre-test alta, definida por la presencia de criterios clínicos y analíticos sobre una patología de base avanzada definida como causa de IPE, ayudará a la mejor interpretación y fiabilidad de los resultados del test de función pancreática a pesar de las limitaciones inherentes al mismo. Dentro de los test de función pancreática, el coeficiente absorción de



grasa (CFA) se considera el patrón oro, pero tiene muchas limitaciones destacando la falta de adherencia por precisar la recogida de heces durante 3 días. Dentro de los test directos, su limitación viene definida por ser invasivos, costoso y solo estar disponibles en centros especializados. El test de aliento con triglicéridos mixtos marcados con  $^{13}\text{C}$  es fácil y no invasivo [146], pero requiere 6 horas para su realización y sobre todo está muy limitado su uso por la falta de disponibilidad. Así pues, la elastasa fecal se muestra como el test más aventajado por su amplia disponibilidad siendo accesible a todos los niveles asistenciales, sencillez y bajo coste [8, 18, 55].

Por el contrario, como principal limitación de EF destaca la alta tasas de falsos positivos que depende de los niveles de corte (indeterminado entre 100-200  $\mu\text{g/g}$ ), consistencia de las heces, edad avanzada y otras patologías como enfermedad renal crónica y sobrecrecimiento bacteriano [55, 70, 141]. No obstante algunas de estas variables son fácilmente controlables para limitar los falsos positivos. En el caso de la consistencia de las heces (diarrea), despreciando la muestra si la consistencia no es adecuada (escala Bristol 5-7). La edad avanzada se ha descrito como posible causa de IPE [141] y además en nuestra población solo un 10% supera los 70 años. Respecto a la insuficiencia renal crónica, un 10% presentaban cifras alteradas de creatinina de los cuales el 40% presentaba IPE severa ( $< 100 \mu\text{g/g}$ ) incrementándose la sensibilidad y especificidad [147].

Aunque no se ha llegado a un acuerdo respecto a un punto de corte para definir IPE (arbitrariamente  $< 200 \mu\text{g/g}$ ), a menor concentración mayor probabilidad y valores muy altos lo excluyen [55]. En consecuencia, a la hora de interpretar valores limítrofes o indeterminados de EF (100-200) es cuando más debemos tener en cuenta si la probabilidad pretest es elevada considerando la presencia de síntomas de maldigestión y datos analíticos de desnutrición en el contexto clínico adecuado. En nuestra muestra con PC, un 10% de los casos presentaban valores limítrofes, de los cuales un paciente continuaba fumando (60% exfumadores) y ninguno consumía alcohol (80% exbebedores). Es por ello en estos casos donde deberíamos recomendar una monitorización más estrecha para valorar evolución a forma severas (EF  $< 100 \mu\text{g/g}$ ), especialmente si persisten los factores etiológicos más frecuentes asociados al daño pancreático (tabaco y alcohol).

El mayor conocimiento de esta patología en la identificación de nuevos grupos de riesgo, así como la búsqueda de nuevos biomarcadores serán de ayuda para un diagnóstico más precoz.

### **Identificación de nuevos biomarcadores de IPE mediante metabolómica**

Tras comparar el perfil de metabolitos en sangre dentro de la cohorte de pancreatitis crónica en función de la presencia o ausencia de IPE, se han identificado cuatro metabolitos que discriminan ambos grupos siendo potenciales biomarcadores de IPE. Esto daría solución al problema del diagnóstico en estadios precoces expuesto anteriormente. Estudios previos han descrito el potencial de determinados metabolitos en el diagnóstico de IPE tanto en animales de experimentación como en humanos en edad pediátrica [148, 149].

Uno de los metabolitos identificados como potencial biomarcador de IPE, la bradicinina; ha sido implicada en patología pancreática en publicaciones previas teniendo un papel proinflamatorio en la pancreatitis [150, 151] mediando la activación de las células pancreáticas estelares [152, 153] y poniendo en marcha procesos de reparación y fibrosis [154]. Es lógico pensar que la presencia de fibrosis pancreática conllevará una sustitución del tejido pancreático funcional con la consiguiente pérdida de capacidad funcional de la glándula pancreática favoreciendo el desarrollo de IPE.

## **4. Diagnóstico diferencial mediante metabolómica de diabetes pancreatogénica (tipo 3c) y diabetes tipo 2**

El diagnóstico de diabetes, independientemente del tipo, se establece fácilmente basándose en los mismos parámetros analíticos: glucemia en ayunas (> 126 mg/dL) o hemoglobina glicosilada (HbA1c > 6.5%) [55].

La dificultad radica en diferenciar el tipo de diabetes sobre todo cuando no existe un diagnóstico previo de patología pancreática. Muestra de ello son los estudios que ponen de manifiesto el diagnóstico erróneo de diabetes pancreatogénica como diabetes tipo 2 [155, 156].

La importancia de diferenciar el tipo de diabetes radica por una parte en que puede ser la primera manifestación de una enfermedad pancreática subyacente

desconocida hasta el momento; siendo la pancreatitis crónica la principal causa [157]. Otras causas frecuentes de diabetes pancreatogénica son la hemocromatosis, la fibrosis quística, el cáncer de páncreas y la pancreatectomía [157, 158, 159, 160].

En el caso de la pancreatitis crónica hasta en un 20% de los casos la diabetes puede ser la primera manifestación indolora [68]. Favorecen su desarrollo la edad, una etiología alcohólica y el tiempo de evolución de la enfermedad [55]. El 50% de los pacientes tiene diabetes a los 10 años y hasta un 83% a los 25 años de evolución de la enfermedad [55].

La diabetes de reciente diagnóstico (menos de 24-36 meses) se ha descrito como grupo de alto riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma de páncreas, ya que puede ser la primera manifestación de cáncer de páncreas [63, 156, 158]. Se han sugerido como factores que no hagan sospechar el cáncer como causa de la diabetes de nueva aparición, la ausencia de antecedentes familiares de diabetes, una edad superior a 65 años, una pérdida de peso reciente y un IMC < 25 [157].

Una revisión sistemática reciente establece como principales factores de riesgo para diabetes pancreatogénica en el caso de pacientes sometidos a pancreatectomía, el tipo de resección, un volumen bajo del remanente pancreática y una HbA1c preoperatoria elevada [161].

Por otra parte la diabetes tipo 3c tiene una historia natural diferente de otros tipos que hace que su manejo sea más complejo. Los niveles tanto de insulina como glucagón y polipéptido pancreática favorecen las fluctuaciones rápidas de las glucemias dificultando su control [158]. Habitualmente va a necesitar antes tratamiento sustitutivo con insulina por la destrucción de los islotes beta y requiere tratar la IPE para evitar desnutrición y complicaciones metabólicas [158, 162, 163].

Dentro de las complicaciones agudas, presentan un mayor riesgo de hipoglucemias por la destrucción de las células alfas productoras de glucagón [55, 68]. En paciente con pancreatectomía total, la persistencia del alcohol

favorece los episodios de hipoglucemia. El riesgo de cetoacidosis es más bajo, aunque puede verse incrementado por el consumo de alcohol [158].

En cuanto a las complicaciones crónicas, la microangiopatía (retinopatía, nefropatía y neuropatía) es similar a la diabetes tipo I y existe la aceptación general de que no se asocia con complicaciones por macroangiopatía [55].

### Limitaciones en el diagnóstico diferencial de diabetes tipo 3C

Actualmente no existen unos criterios universalmente aceptados para su diagnóstico, aunque se han realizado diversas propuestas. Por un lado, varios autores hacen referencia a los criterios propuestos por Ewald y Bertzel en 2013 que exponen en la tabla 8 [157, 158, 159]. Por otra parte, en 2017 la Guía Europea de pancreatitis crónica establece otra serie de criterios diagnósticos [55] que también se exponen comparativamente en la tabla 8.

Criterios Ewald y Bertzel (2013)	Criterios Guía europea pc (2017)
<p><b>Criterios mayores</b> (deben cumplirse todos)</p> <p>Presencia de IPE (EF &lt; 200 o test directo anormal)</p> <p>Imágenes pancreáticas patológicas (USE, RM y TC)</p> <p>Ausencia marcadores autoinmunes asociados a DM-1 (anticuerpos contra glutamina ácido descarboxilasa, antígeno islotes o insulina)</p>	<p><b>Criterios mayores</b> (deben estar presentes)</p> <p>Diagnóstico establecido de pancreatitis crónica</p> <p>Ausencia de marcadores autoinmunes asociados a diabetes tipo 1</p>
<p><b>Criterios menores</b></p> <p>Ausencia de secreción de polipéptido pancreático</p> <p>Deterioro de la secreción de incretinas</p> <p>No excesiva resistencia a la insulina</p>	<p><b>Criterios menores</b> (dos de cuatro deben estar presentes)</p> <p>Deterioro de la secreción de incretinas (glucagon-like peptide-1 (glp-1) o polipéptido pancreático)</p> <p>No excesiva resistencia a la insulina</p>
<p>Deterioro de la función de células beta (radio péptido C / glucosa o homeostatic model assessment for beta-cell dysfunction (HOMA-B))</p>	<p>Deterioro de la función de células beta (radio péptido C / glucosa o homeostatic model assessment for beta-cell dysfunction (HOMA-B))</p>

Niveles bajos de vitamina liposolubles (A,D, E y K)

Deficiencia de vitaminas liposolubles y/o presencia de deficiencia/insuficiencia de micronutrientes (en ausencia de terapia enzimática o suplementación de nutrientes)

**Tabla 8.** Criterios diagnósticos propuestos para diabetes pancreatogénica (tipo 3C).

Sin embargo, estos criterios no están exentos de limitaciones debido al solapamiento de características de los distintos tipos de diabetes [159], la dificultad de aplicarlos en práctica clínica [158] y no tienen en cuenta las características clínicas de los pacientes. El conocimiento de las principales causas de este tipo de diabetes puede ser de gran utilidad para alcanzar el diagnóstico.

Ante la falta de criterios diagnósticos, no solo el campo de la metabólica como veremos a continuación se plantea como herramienta útil en la búsqueda de nuevos biomarcadores. También se ha estudiado el microbioma observando el incremento de determinadas cepas de bacterias intestinales en la diabetes tipo 2 [164].

### **Identificación de nuevos biomarcadores mediante metabólica para el diagnóstico diferencial del tipo de diabetes**

En el presente estudio se identificó un panel compuesto por 5 metabolitos con el que se consiguió diferenciar los grupos de diabetes tipo 3c y diabetes tipo 2. A continuación se exponen los metabolitos identificados y en su implicación potencial como biomarcadores de diabetes tipo 2. El primero de ellos, LysoPE, coincide con otros autores que lo han propuesto como potencial biomarcador en el diagnóstico de diabetes tipo 2 de reciente diagnóstico [165]. El aminoácido triptófano y sus metabolitos, al igual que en el presente estudio se han relacionado con el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en estudios previos [166, 167, 168]. La palmitoilcarnitina identificada ha sido propuesta como biomarcador en estadios iniciales de la enfermedad. Son varios los estudios a favor de dicha aseveración destacando un metanálisis reciente [169]. El mecanismo por el que produce resistencia a la insulina se basa en la oxidación de ácidos grasos con tendencia a la acumulación de lípidos [170]. La biliverdina ha mostrado en animales de experimentación favorecer la acumulación de lípidos que produce

esteatosis hepática, la cual está a su vez íntimamente relacionada con la resistencia a la insulina y diabetes [171]. Sin embargo, en la diabetes tipo 3c presenta unos niveles bajo donde parece presentar un efecto protector sobre la inflamación pancreática [172]. El último metabolito diferencial identificado, el ácido 7 $\alpha$ -hidroxi-3-oxo-4-colestenoico (7-HOCA), se absorbe en el hígado donde se oxida en ácidos biliares que estimulan una liberación aguda de insulina [173, 174].

Existen otros trabajos de metabolómica en búsqueda de perfiles diagnósticos de diabetes. Vangipurapu et cols. Identificaron cinco aminoácidos (tirosina, alanina, isoleucina, ácido aspártico y ácido glutámico) que fueron asociados significativamente con un riesgo incrementado de desarrollar diabetes tipo 2 [175]. También se ha realizado estudios metabolómicos para diferenciar diabetes tipo 2 de la diabetes pancreatogénica secundaria a cáncer de páncreas [176].

# **Conclusiones**





## IX. CONCLUSIONES

1. Hemos identificado un panel de tres metabolitos en suero con capacidad para discriminar entre pacientes con pancreatitis crónica y sujetos sanos. Estos metabolitos, un derivado del glutamato, una acilcarnitina y una fosfocolina, se relacionaron con el papel proinflamatorio de la microbiota, la disfunción de células  $\beta$  pancreáticas y mecanismos de inflamación, apoptosis y fibrogénicos.
2. Proponemos un panel de cuatro biomarcadores en suero de pacientes con pancreatitis crónica con capacidad para discriminar entre pacientes con y sin insuficiencia pancreática exocrina. Entre estos metabolitos, destacar la bradiquinina, descrita como mediador inflamatorio en otras patologías pancreáticas, contribuyendo al edema y daño tisular.
3. Hemos encontrado un panel de cinco metabolitos séricos que permite distinguir con precisión la diabetes pancreatogénica, o tipo 3c, de la diabetes tipo 2.
4. La prevalencia de insuficiencia pancreática, tanto exocrina como endocrina, en el curso de la pancreatitis crónica es elevada, siendo su repercusión clínica variable, en función de la severidad de esta pérdida funcional y de la instauración de un tratamiento adecuado.

5. La pérdida de la función pancreática exocrina y endocrina se produce de forma paralela a la evolución de la pancreatitis crónica, siendo favorecida su progresión por el consumo de tabaco y alcohol. El tabaco es un factor proinflamatorio crucial, evidenciado por la elevación de reactantes de fase aguda en pacientes fumadores de pancreatitis crónica.
  
6. El uso de enzimas pancreáticas, como tratamiento sustitutivo en la insuficiencia pancreática exocrina, es capaz de normalizar los parámetros antropométricos pero no los nutricionales de los pacientes, lo cual parece estar relacionado con la necesidad de optimizar este tipo de tratamiento.
  
7. La mejora en el diagnóstico de la insuficiencia pancreática exocrina requiere, además de conocer todas sus posibles etiologías, de la combinación de datos clínicos, analíticos y pruebas de función pancreática.

# **Bibliografía**



## X. BIBLIOGRAFÍA

1. EA P. Pró EA. Anatomía Clínica. 1ª edición. Argentina: Medica Panamericana. 2012 (formato digital).
2. Grapin-Botton A. Ductal cells of the pancreas. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(3):504-10. Epub 2004/12/25.
3. Sastre J, Sabater L, Aparisi L. [Physiology of pancreatic secretion]. *Gastroenterología y hepatología*. 2005;28 Suppl 2:3-9. Fisiología de la secreción pancreática.
4. Vinik A RL, Pittenger GL, Taylor-Fishwick D. Stimulation of pancreatic islet neogenesis: a possible treatment for type 1 and type 2 diabetes. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes*. 2004;11:125-40
5. American Cancer Society. Pancreatic cancer detailed guide. American Cancer Society Atlanta, GA. [Accesed on: 2019 April 02]. Available from: <http://www.cancer.org/cancer/pancreaticcancer/detailedguide/>
6. Prados JC, Archilla F, Melguizo C, Vélez MC, Rivera M. Principios básicos de Anatomía Humana para Nutrición y Dietética. 1ª edición. Avicam. 2015
7. Domínguez JE. Pancreatitis crónica y sus complicaciones. In: Montoro MA, García Pagán JC, editores. *Gastroenterología y Hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica*. 2 ed. Madrid: Jarpyo; 2012. p. 645-56.
8. Afghani E, Sinha A, K. Singh V. An Overview of the Diagnosis and Management of Nutrition in Chronic Pancreatitis. *Nutr Clin Pract* 2014; 29(3): 295-311.
9. Vaquero-Raya EC, Molero RX. Pancreatitis crónica. In: Ponce García J, editor. *Tratamiento de las enfermedades gastroenterológicas*. 3 ed. Madrid: Asociación Española de Gastroenterología; 2011. p 439-53.
10. Domínguez-Muñoz JE, Lucendo A, Carballo LF, Tenías JM, Iglesias-García J. Estudio español multicéntrico de estimación de la prevalencia e incidencia de la pancreatitis crónica y sus complicaciones. *Rev Esp Enferm Dig* 2014; 106(4): 239-45.
11. Freedman SD, Lewis MD. Etiology and pathogenesis of chronic pancreatitis in adults. *UptoDate [serial online]* 2014. Disponible en: URL: [http://ws003.juntadeandalucia.es:2092/contents/etiology-and-pathogenesis-of-chronic-pancreatitis-in-adults?source=search\\_result&search=2.%09Freedman+SD%2C+L](http://ws003.juntadeandalucia.es:2092/contents/etiology-and-pathogenesis-of-chronic-pancreatitis-in-adults?source=search_result&search=2.%09Freedman+SD%2C+L)

ewis+MD.+Etiology+and+pathogenesis+of+chronic+pancreatitis+in+adults&selectedTitle=1~150

12. Coté GA, Yadav D, Slivka A, Hawes RH, Anderson MA, Burton FR et al. Alcohol and smoking as risk factors in a epidemiology study of patients with chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9(3): 266-73.

13. Yadav D, Hawes RH, Brand RE, Anderson MA, Money ME, Banks PA et al. Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. *Arch Intern Med* 2009; 169(11):1035-45.

14. Imoto M, DiMagno EP. Cigarette smoking increases the risk of pancreatic calcification in late-onset but not early-onset idiopathic chronic pancreatitis. *Pancreas* 2000; 21(2):115-9.

15. Freedman SD. Clinical manifestations and diagnosis of chronic pancreatitis in adults. UptoDate [serial online] 2014. Disponible en: URL: [http://ws003.juntadeandalucia.es:2092/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-chronic-pancreatitis-in-adults?source=search\\_result&search=3.%09Freedman+SD.+Clinical+manifestations+and+diagnosis+of+chronic+pancreatitis+in+adults.&selectedTitle=1~150](http://ws003.juntadeandalucia.es:2092/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-chronic-pancreatitis-in-adults?source=search_result&search=3.%09Freedman+SD.+Clinical+manifestations+and+diagnosis+of+chronic+pancreatitis+in+adults.&selectedTitle=1~150)

16. Lindkvist B, Dominguez-Munoz JE, Luaces-Regueira M, Castineiras-Alvarino M, Nieto-Garcia L, Iglesias-Garcia J. Serum nutritional markers for prediction of pancreatic exocrine insufficiency in chronic pancreatitis. *Pancreatology* 2012; 12(4):305-10.

17. Hojgaard-Rasmussen H, Irtun O, Schou-Olesen S, Mohr-Drewes A, Holst M. Nutrition in chronic pancreatitis. *World J Gastroentero* 2013; 19(42): 7267-75.

18. Pezzilli R, Andriulli A, Bassi C, Balzano G, Cantore M, Delle-Fave G et al. Exocrine pancreatic insufficiency in adults: A shared position statement of the Italian association for the study of the pancreas. *World J Gastroentero* 2013; 19(44): 7930-46.

19. Sikkens EC, Cahen DL, Koch AD, Braat H, Pley JW, Kuipers EJ et al. The prevalence of fat-soluble vitamin deficiencies and a decreased bone mass in patients with chronic pancreatitis. *Pancreatology* 2013; 13(3): 238-42.

20. Dominguez-Muñoz JE, Iglesias García J, Lariño Noia J. Complicaciones potencialmente graves de la pancreatitis crónica. In: Montoro Huguet M, García Pagán JC. *Manual de emergencias en gastroenterología y hepatología*. 2 ed. Madrid: Jarpyo; 2013. p 57-64.

21. Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F et al. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* 2002; 51:849-52.
22. Duggan SN, O'Sullivan M, Feehan S, Ridgway P, Conlon K. Nutrition treatment of deficiency and malnutrition in chronic pancreatitis: a review. *Nutr Clin Pract* 2010; 25(4): 362-70.
23. Verhaegh BP, Reijven PL, Prins MH, Brouns JH, Masclee AA, Keulemans YC. Nutritional status in patients with chronic pancreatitis. *Eur J Clin Nutr* 2013; 67: 1271-6.
24. Test de elastasa fecal. [Internet] 2011 [cited 2015 Feb 1]: Disponible en: <http://www.gastrolabperu.com/web/content/examen.php?examen=CF011>
25. Duggan SN, Smyth ND, O'Sullivan M, Feehan S, Ridgway PF, Conlon KC. The prevalence of malnutrition and fat-soluble vitamin deficiencies in chronic pancreatitis. *Nutr Clin Pract* 2014; 29(3): 348-54.
26. Tinju J, Reshmi S, Rajesh G, Balakrishnan V. Anthropometric, biochemical, clinical and dietary assessment for malnutrition in South Indian patients with chronic pancreatitis. *Trop Gastroentero* 2010; 31(4): 285 – 90.
27. Hébuterne X, Hastier P, Péroux JL, Zeboudj N, Delmont JP, Rampal P. Resting energy expenditure in patients with alcoholic chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 533-9.
28. Gramlich L, Tandon P, Rahman A. Nutritional status in patients with sustained heavy alcohol use. *UptoDate* [serial online] 2014. Disponible en: URL: [http://ws003.juntadeandalucia.es:2092/contents/nutritional-status-in-patients-with-sustained-heavy-alcohol-use?source=search\\_result&search=6.%09Gramlich+L%2C+Tandon+P%2C+Rahman+A.+Nutritional+status+in+patients+with+sustained+heavy+alcohol+use.&selectedTitle=1~150](http://ws003.juntadeandalucia.es:2092/contents/nutritional-status-in-patients-with-sustained-heavy-alcohol-use?source=search_result&search=6.%09Gramlich+L%2C+Tandon+P%2C+Rahman+A.+Nutritional+status+in+patients+with+sustained+heavy+alcohol+use.&selectedTitle=1~150)
29. Freedman SD. Treatment of chronic pancreatitis. *UptoDate* [serial online] 2014. Disponible en: URL: [http://ws003.juntadeandalucia.es:2092/contents/treatment-of-chronic-pancreatitis?source=search\\_result&search=4.%09Freedman+SD.+Treatment+of+chronic+pancreatitis.&selectedTitle=2~150](http://ws003.juntadeandalucia.es:2092/contents/treatment-of-chronic-pancreatitis?source=search_result&search=4.%09Freedman+SD.+Treatment+of+chronic+pancreatitis.&selectedTitle=2~150)
30. Mukkai Krishnamurty D, Rabiee A, Jagannath SB, Andersen DK. Delayed release pancrelipase for treatment of pancreatic exocrine insufficiency associated with chronic pancreatitis. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2009; 5: 507-20.

31. Ficha técnica KREON (Pancreatina). [Internet] 2012 [cited 2015 Feb 1]: Disponible en: [http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/63832/FT\\_63832.pdf](http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/63832/FT_63832.pdf)
32. Wilder-Smith CH, Hill L, Osler W, O'Keefe S. Effect of tramadol and morphine on pain and gastrointestinal motor function in patients with chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 1999; 44(6):1107-16.
33. Olesen SS, Bouwense SA, Wilder-Smith OH, van Goor H, Drewes AM. Pregabalin reduces pain in patients with chronic pancreatitis in a randomized, controlled trial. *Gastroenterology.* 2011; 141(2): 536-43.
34. Slaff JI, Wolfe MM, Toskes PP. Elevated fasting cholecystokinin levels in pancreatic exocrine impairment: evidence to support feedback regulation. *J Lab Clin Med.* 1985; 105(3):282-5.
35. Taylor JR, Gardner TB, Waljee AK, Dimagno MJ, Schoenfeld PS. Systematic review: efficacy and safety of pancreatic enzyme supplements for exocrine pancreatic insufficiency. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010; 31(1):57-72.
36. Whitcomb DC, Lehman GA, Vasileva G, Malecka-Panas E, Gubergrits N, Shen Y et al. Pancrelipase delayed-release capsules (CREON) for exocrine pancreatic insufficiency due to chronic pancreatitis or pancreatic surgery: a double-blind randomized trial. *Am J Gastroenterol.* 2010; 105(10): 2276-86.
37. Siriwardena AK, Mason JM, Sheen AJ, Makin AJ, Shah NS. Antioxidant therapy does not reduce pain in patients with chronic pancreatitis: the ANTICIPATE study. *Gastroenterology.* 2012; 143(3): 655-63
38. Meier R, Ockenga J, Pertkiewicz M, Pap A, Milinic N, MacFie J. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Pancreas. *Clin Nutr* 2006; 25(2): 275-84.
39. Weimann A, Braga M, Harsanyi L, Laviano A, Ljungqvist O, Soeters P et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Surgery including organ transplantation. *Clin Nutr* 2006; 25: 224-44.
40. Marik PE, Zaloga GP. Immunonutrition in high-risk surgical patients: a systematic review and analysis of the literature. *J Parenter Enteral Nutr* 2010; 34: 378-86.
41. Marano L, Porfidia R, Pezzella M, Grassia M, Petrillo M, Esposito G et al. Clinical and immunological impact of early postoperative enteral immunonutrition after total gastrectomy in gastric cancer patients: a prospective randomized study. *Ann Surg Oncol* 2013; 20: 3912-8.



42. Wishart D, Tzur D, Knox C, Eisner R, ChiGuo A, Young N et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*, 2007; 35: D521–26.
43. Zyromski N, Mathur A, Nagana GA, Murphy C, Swartz-Basile DA, Wade TE et al. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy-Based metabolomics of the fatty pancreas: implicating fat in pancreatic pathology. *Pancreatology* 2009; 9: 410-19.
44. Bing T, Chao M, Jian W, Chun-Shu P, Gen-Jin Y, Jian-Ping L. Analysis of metabolic characteristics in a rat model of chronic pancreatitis using high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Molecular Medicine Reports* 2015; 11: 53-58.
45. Sun G, Wang J, Zhang J, Ma C, Shao C, Hao J et al. High-resolution magic angle spinning (1)H magnetic resonance spectroscopy detects choline as a biomarker in a swine obstructive chronic pancreatitis model at an early stage. *Mol Biosyst.* 2014; 10(3): 467-74.
46. Xiao H, Huang JH, Zhang XW, Ahmed R, Xie QL, Li B et al. Identification of potential diagnostic biomarkers of acute pancreatitis by serum metabolomic profiles. *Pancreatology* 2017; 17: 543 – 49.
47. Huang JH, He D, Chen L, Dong CY, Zhang SH, Qin YH et al. GC-MS based metabolomics strategy to distinguish three types of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2019; 19: 630-37.
48. Pan S, Chen R, Crispin DA, May D, Stevens T, McIntosh MW et al. Protein alterations associated with pancreatic cancer and chronic pancreatitis found in human plasma using global quantitative proteomics profiling. *J Proteome Res* 2011; 10: 2359-76.
49. Paulo JA, Kadiyala V, Brizard S, Banks PA, Steen H, Conwell DL. A proteomic comparison of formalin-fixed paraffinembedded pancreatic tissue from autoimmune pancreatitis, chronic pancreatitis, and pancreatic cancer. *JOP* 2013; 14: 405-14.
50. Benedikt A, Ceglarek U, Weinert P, Nakas CT, Nuoffer JM, Kase J et al. Pancreatic carcinoma, pancreatitis, and healthy controls: metabolite models in a three-class diagnostic dilemma. *Metabolomics* 2013; 9: 677-87.
51. Zhang L, Jin H, Guo X, Yang Z, Zhao L, Shanhong T et al. Distinguishing pancreatic cancer from chronic pancreatitis and healthy individuals by H nuclear magnetic resonance-based metabolomic profiles. *Clinic Biochem* 2012; 45: 1064 – 69.

52. Kobayashi T, Nishiumi S, Ikeda A, Yoshie T, Sakai A, Matsubara A et al. A novel serum metabolomics-based diagnostic approach to pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; 22(4): 571 – 79.
53. Mayerle J, Kalthoff, Reszka R, Kamlage B, Peter E, Schniewind B et al. Metabolic biomarker signature to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *Gut* 2017; 0:1–10.
54. Lindahl A, Heuchel R, Forshed J, Lehtio J, Löhr M y Nordström. Discrimination of pancreatic cancer and pancreatitis by LC-MS metabolomics. *Metabolomics* 2017; 13: 61.
55. Löhr JM, Dominguez-Muñoz E, Rosendahl J, Besselink M, Mayerle J, Lerch MM et al. United European Gastroenterology evidence-based guidelines for the diagnosis and therapy of chronic pancreatitis (HaPanEU). *United European Gastroenterology Journal* 2017; 5(2): 153-99.
56. Whitcomb DC, Shimosegawa T, Chari ST, Forsmark CE, Frulloni L, Pramod G et al. International Consensus Statements on early chronic pancreatitis. *Pancreatol.* 2018; S1424-3903(18): 30113-3.
57. Ramsey ML, Conwell DL, Hart PA. Complications of chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci.* 2017; 62(7): 1745–50.
58. Kirkegard J, Mortensen FV, Cronin-Fenton D. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2017; 112(9): 1366-72.
59. Wang G, Zhong T. Clinical Application of metabolomics in pancreatic diseases: a mini-review. *Lab Med* 2020; 51(2):116-21.
60. Kuwahara T, Hirooka Y, Kawashima H, Ohno E, Ishikawa T, Yamamura T et al. Usefulness of shear wave elastography as a quantitative diagnosis of chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2018; 33(3): 756-61.
61. Capurso, G.; Traini, M.; Piciocchi, M.; Signoretti, M.; Arcidiacono, P.G. Exocrine pancreatic insufficiency: prevalence, diagnosis, and management. *Clin Exp Gastroenterol* 2019; 12: 129-39.
62. Dominguez-Muñoz, J.E. Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency. *Curr Opin Gastroenterol* 2018; 34: 349-54.

63. Pereira SP, Oldfield L, Ney A, Hart PA, Keane MG, Pandol SJ et al. Early detection of pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020; 5(7):698-710.
64. Marra-Lopez Valenciano C, Bolado-Concejo F, Marín- Serrano E, Millastre Bocos J, Martínez-Moneo E, Pérez Rodríguez E et al. Prevalence of exocrine pancreatic insufficiency in patients with chronic pancreatitis without follow-up. PANCR-EVOL Study. *Gastroenterol Hepatol* 2018; 41: 77–86.
65. Berger FZ, Mancilla AC. Chronic pancreatitis: Retrospective review of 121 cases. *Rev. Med. Chil.* 2016; 144: 1544–52.
66. Hardt PD, Hauenschild A, Nalop J, Marzeion AM, Jaeger C, Teichmann J et al. High prevalence of exocrine pancreatic insufficiency in diabetes mellitus. *Pancreatol* 2003; 3: 395–402.
67. de la Iglesia-Garcia D, Vallejo-Sendra N, Iglesias-Garcia J, López-López A, Nieto L, Domínguez-Muñoz JE. Increased risk of mortality associated with pancreatic exocrine insufficiency in patients with chronic pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2018; 52(8): e63-e72.
68. Rodrigues-Pinto E, Caldeira A, Soares JB, Antunes T, Carvalho JR, Costa-Maia J et al. Clube Portugues do Pancreas Recommendations for Chronic Pancreatitis: etiology, natural history and diagnosis. *GE Port J Gastroenterol* 2019; 26: 346-355.
69. Brock C, Nielsen LM, Lelic D, Drewes AM. Pathophysiology of chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2013; 19(42): 7231–40.
70. Luaces-Regueira M, Iglesias-García J, Lindkvist B, Castiñeira-Alvariño M, Nieto-García L, Lariño-Noia J et al. Smoking as a risk factor for complications in chronic pancreatitis. *Pancreas.* 2014; 43(2): 275–80.
71. Raphael KL, Chawla S, Kim S, Keith CG, Propp DR, Chen ZN et al. Pancreatic Insufficiency Secondary to Tobacco Exposure: A Controlled Cross-Sectional Evaluation. *Pancreas.* 2017; 46(2): 237–43.
72. Barkin JA, Barkin JS. Chronic pancreatitis and bone disease. *J Clin Densitom* 2020; 23(2): 237-243.
73. Han S, Patel B, Min M, Bocelli L, Kheder J, Wachholtz A et al. Quality of life comparison between smokers and non-smokers with chronic pancreatitis. *Pancreatol* 2018; 18(3): 269-274.

74. Ye X, Lu G, Huai J, Ding J. Impact of smoking on the risk of pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015; 10: e0124075.
75. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain R. Pancreatic cancer: a review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol* 2018; 24(43): 4846-61.
76. Singhvi A, Yadav MDD. Myths and realities about alcohol and smoking in chronic pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2018 September; 34(5): 355-61.
77. Dominguez-Muñoz JE, Phillips M. Nutritional therapy in chronic pancreatitis. *Gastroenterol Clin N Am* 2018 Mar; 47 (1): 95 -106.
78. Olesen SS, B̈uÿukuslu A, K̈ohler M, Rasmussen HH, Drewes AM. Sarcopenia associates with increased hospitalization rates and reduced survival in patients with chronic pancreatitis. *Pancreatol*. 2019; 19(2):245-251.
79. O'Brien SJ, Omer E. Chronic pancreatitis and nutrition therapy. *Nutr Clin Pract* 2019 Oct; 34 Suppl 1:S13-S26.
80. Layer P, Kashirskaya N, Gubergrits N. Contribution of pancreatic enzyme replacement therapy to survival and quality of life in patients with pancreatic exocrine insufficiency. *World J Gastroenterol* 2019 May 28; 25(20): 2430-41.
81. Roberts KJ, Bannister CA, Schrem H. Enzyme replacement improves survival among patients with pancreatic cancer: Results of a population based study. *Pancreatol* 2019; 19(1): 114–21.
82. Sikkens EC, Cahen DL, van Eijck C, Kuipers EJ, Bruno MJ. Patients with exocrine insufficiency due to chronic pancreatitis are undertreated: a Dutch national survey. *Pancreatol* 2012; 12(1): 71–3.
83. Forsmark CE, Tang G, Xu H, Tuft M, Hughes SJ, Yadav D. Oral Pancreatic Enzyme Replacement Therapy (PERT) in Chronic Pancreatitis (CP) is Infrequent and Often Suboptimal: A National Level Analysis. *Gastroenterology* 2017; 152(5 Supplement 1): S677.
84. Sikkens EC, Cahen DL, van Eijck C, Kuipers EJ, Bruno MJ. The daily practice of pancreatic enzyme replacement therapy after pancreatic surgery: a northern European survey: enzyme replacement after surgery. *J Gastrointest Surg* 2012; 16(8): 1487–92.

85. Forsmark CE, Tang G, Tuft M et al. Oral pancreatic enzyme replacement therapy (PERT) in patients with pancreatic cancer (PCa) is infrequent and suboptimal: a national level analysis. *Pancreas* 2017; 46: 1400.
86. Safdi M, Bekal PK, Martin S, Saeed ZA, Burton F et Toskes PP. The effects of oral pancreatic enzymes (creon 10 capsule) on steatorrhea. A multicenter, placebo-controlled, parallel group trial in subjects with chronic pancreatitis. *Pancreas* 2006; 33: 156-62.
87. Thorat V, Reddy N, Bhatia S, Bapaye A, Rajkumar JS, Kini DD et al. Randomised clinical trial: the efficacy and safety of pancreatin enteric-coated minimicrospheres (creon 40000 MMS) in patients with pancreatic exocrine insufficiency due to chronic pancreatitis – a double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 426-36.
88. Ramesh H, Reddy N, Bhatia S, Rajkumar, Bayape A, Kini D et al. A 51-week, open-label clinical trial in India to assesses the efficacy and safety of pancreatin 40000 enteric-coated minimicrospheres in patients with pancreatic exocrine insufficiency due to chronic pancreatitis. *Pancreatology* 2013; 13:133-39.
89. Kalh S, Schütte K, Glasbrenner B, Mayerle J, Simon P, Henniges et al. The effect of oral pancreatic enzyme supplementation on the course and outcome of acute pancreatitis: a randomized, double-blind parallel-group study. *J Pancreas* (online) 2014; 15(2): 165-74.
90. Hojgaard Rasmussen H, Irtun O, Schou Olesen S, Mohr Drewes A, Holst M. Nutrition in chronic pancreatitis. *World J Gastroentero* 2013; 19(42): 7267-75.
91. de la Iglesia-García D, Huang W, Szatmary P, Baston-Rey I, Gonzalez-Lopez J, Prada-Ramallal et al. Efficacy of pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis: systematic review and meta-analysis. *Gut*. 2017; 66(8):1354-5.
92. Hasin Y, Seldin M, Lusic A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology* 2017; 18: 83.
93. Farfán MJm, Torres JP. Diagnostics in medicine in the “omics” era. *Rev Chil Pediatr* 2018; 89(2): 163-65.
94. Zhang A, Sun H, Yan G, Wang P, Wang X. Mass spectrometry-based metabolomics: applications to biomarker and metabolic pathway research. *Biomed Chromatogr*. 2016; 30(1): 7-12.

95. Salvagno GL, Danese E, Lippi G. Preanalytical variables for liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of human blood specimens. *Clin Biochem* 2017; 50(10-11): 582-6.
96. Jacob M, Lopata AL, Dsaouki M, Rahman AMB. Metabolomics toward personalized medicine. *Mass Spectrom Rev* 2019; 38(3): 221-38.
97. Hocker JR, Postier RG, Li M, Lerner MR, Lightfoot SA, Peyton MD et al. Discriminating patients with early-stage pancreatic cancer or chronic pancreatitis using serum electrospray mass profiling. *Cancer Letters* 2015; 359: 314-24.
98. Costello E. A metabolomics-based biomarker signature discriminates pancreatic cancer from chronic pancreatitis. *Gut* 2018; 67(1): 2-3.
99. Hirata Y, Kobayashi T, Nishiumi S, Yamanaka K, Nakagawa T, Fujigaki S et al. Identification of highly sensitive biomarkers that can aid the early detection of pancreatic cancer using GC/MS/MS-based targeted metabolomics. *Clin Chim Acta* 2017; 468: 98-104.
100. Martín-Blánquez A, Jimenez-Luna C, Diaz C, Martinez-Galan J, Prados J, Vicente F et al. Discovery of pancreatic adenocarcinoma biomarkers by untargeted metabolomics. *Cancers (Basel)* 2020; 12(4): 1002.
101. Bauer AS, Keller A, Costello E, Greenhalf W, Bier M, Borries A et al. Diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis by measurement of microRNA abundance in blood and tissue. *PLoS One* 2012; 7: e34151.
102. McAllister F, Khan AW, Helminik B, Wargo JA. The tumor microbiome in pancreatic cancer: bacteria and beyond. *Cancer Cell* 2019; 36(6): 577-9.
103. Kiss B, Mikó E, Sebo E, Toth J, Ujlaki G, Szabo J et al. Oncobiosis and microbial metabolite signaling in pancreatic adenocarcinoma. *Cancers (Basel)* 2020; 12(5):1068.
104. Mader S, Pantel K. Liquid biopsy: current status and future perspectives. *Oncol Res Treat* 2017; 40(7-8): 404-8.
105. Zebrowska A, Skowronek A, Wojakowska A, Widlak P, Pietrowska M. Metabolome of exosomes: focus on vesicles released by cancer cells and present in human body fluids. *Int J Mol Sci* 2019; 20(14): 3461.
106. Martínez J, Abad-González A, Aparicio JR, Aparisi L, Boadas J, Boix E et al. Recomendaciones del Club Español Pancreático para el diagnóstico y tratamiento

de la pancreatitis crónica: parte 1 (diagnóstico). *Gastroenterol Hepatol* 2013; 36(5): 326-39.

107. Majumder S, Chari ST. Chronic pancreatitis. *Lancet* 2016; 387(10031):1957-66.

108. Lariño-Noia, Iglesias-García J. Pancreatitis crónica: como dejar que sea una enfermedad infradiagnosticada. *RAPD online* 2012; 35(4): 259-63.

109. Kleeff J, Whitcomb DC, Shimosegawa T, Esposito I, Lerch MM et al. Chronic pancreatitis. *Nat Rev Dis Primers* 2017; 3:17060.

110. Sahai AV, Mishra G, Penman ID, Williams D, Wallace MB, Hadziahic N et al. EUS to detect evidence of pancreatic disease in patients with persistent or nonspecific dyspepsia. *Gastrointest Endosc* 2000; 52(2):153-9.

111. Lariño-Noia J, de la Iglesia D, Iglesias-García J, Macías F, Nieto L, Bastón I et al. Morphological and functional changes of chronic pancreatitis in patients with dyspepsia: A prospective, observational, cross-sectional study. *Pancreatology* 2018; 18(3): 280-5.

112. Wakabayashi M, Futagami S, Yamawaki H, Tatsuguchi A, Kaneko K, Agawa S et al. Comparison of clinical symptoms, gastric motility and fat intake in the early chronic pancreatitis patients with anti-acid therapy-resistant functional dyspepsia patients. *PLoS One* 2018; 13(11): e0205165.

113. Rana SS, Vilman P. Endoscopic ultrasound features of chronic pancreatitis: A pictorial review. *Endosc Ultrasound* 2015; 4(1):10-4.

114. Salvador García J, Delgado Cordon F. Papel de la imagen en el diagnóstico de la pancreatitis crónica. *Radiología* 2019; 61(3): 247-58.

115. Anaizi A, Hart PA, Conwell DL. Diagnosing Chronic Pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2017; 62: 1713–20.

116. Singh VK, Yadav D, Garg PK. Diagnosis and management of chronic pancreatitis: A review. *JAMA* 2019; 322(24): 2422-34.

117. Domínguez-Muñoz JE. Últimos avances en pancreatitis crónica. *Gastroenterol Hepatol* 2015; 38(Supl 1): 86-90.

118. Huang CT, Lin CK, Lee TH, Liang YJ. Pancreatic fibrosis and chronic pancreatitis: mini-review of non-histologic diagnosis for clinical applications. *Diagnostics (Basel)* 2020; 10(2): 87.

119. Domínguez-Muñoz JE, Lariño-Noia J, Álvarez-Castro A, Nieto L, Lindkvist B, Iglesias-García J. Endoscopic ultrasound (EUS)-based multimodal evaluation of the pancreas for the diagnosis of early chronic pancreatitis (CP). *Gastroenterology* 2015; 148 (Suppl 1): S-906.
120. Akshintala VS, Talukdar R, Singh VK, Goggins. The Gut microbiome in pancreatic disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2018.
121. Hamada S, Masamune A, Nareshima T, Simosegawa T. Differences in Gut Microbiota profiles between autoimmune pancreatitis and chronic pancreatitis. *Tohoku J Exp Med* 2018; 244: 113-7.
122. Hu Y, Teng C, Yu S, Wang X, Liang J, Bai X et al. *Inonotus obliquus* polysaccharide regulates gut microbiota of chronic pancreatitis in mice. *AMB Expr* 2017; 7: 39.
123. Koukou L, Cheng Z, Chunying T, Sumei Y, Xin W, Yang H et al. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on chronic pancreatitis and intestinal microbiota in mice. *International Journal of Biological Macromolecules* 2016.
124. Memba R, Duggan SN, Ni Chonchubhair HM, Griffin OM, Bashir Y, O'Connor DB et al, The potential role of gut microbiota in pancreatic disease: A systematic review. *Pancreatology* 2017.
125. Guasch-Ferré M, Ruiz-Canela M, Li J, Zheng Y, Bulló M, Wang DD et al. Plasma acycarnitines and risk of type 2 diabetes in a Mediterranean population at high cardiovascular risk. *The J Cli End Met*.
126. Knebek B, Mack S, Lehr S, Barsch A, Schiller M, Haas J et al. Untargeted mass spectrometric approach in metabolic healthy offspring of patients with type 2 diabetes reveals médium-cahin acylcarnitine as potencial biomarker for lipid induced glucose intolerance (LGIT). *Archives of Physiology and Biochemistry*.
127. Libert DM, Nowacki AS, Natowicz MR. Metabolomic analysis of obesity, metabolic síndrome, and type 2 diabetes: amino acid and acycarnitine levels change along a spectrum of metabolic wellness. *PeerJ* 2018; 6: e5410.
128. Fruhwirth GO, Loidl A, Hermetter A. The oxidized phospholipids POVPC and PGPC inhibit growth and induce apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(7): 718-36.
129. Watson AD, Leitinge N, Navab M, Faull KF, Hörkkö S, Witztum JL et al. . Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally



oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem* 1997; 272(21): 13597-607.

130. Stemmer U, Dunai ZA, Koller D, Pürstinger G, Zenzmaier E, Deigner HP et al. Toxicity of oxidized phospholipids in cultured macrophages. *Lipids in Health and Disease* 2012, 11: 110.

131. Gullo L, Tassoni U, Mazzoni G, Stefanini F. Increased prevalence of aortic calcification in chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1996; 91(4): 759–61.

132. De La Iglesia-Garcia D, Vallejo-Sendra N, López-López A, Prada-Ramallal G, Iglesias-Garcia J, Larino-Noia J et al. Effect of pancreatic exocrine and endocrine insufficiency in cardiovascular events in patients with chronic pancreatitis (CP). A prospective cohort study. *Pancreatology* 2018; 18: S170–1.

133. Mateu A, De Dios I, Manso MA, Ramudo L. Oxidized phospholipids exert a dual effect on bile acid-induced CCL2 expression in pancreatic acini, *Pancreatology* 2017.

134. Li L, Wang XP, Wu K. The therapeutic effect of oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-Glycero-3-phosphorylcholine in rodents with acute necrotizing pancreatitis and its mechanism. *Pancreas* 2007; 35(3): e27-36.

135. Forsmark CE, Tang G, Tuft M, Xu H, Hughes SJ, Yadav D. Oral pancreatic enzyme replacement therapy (PERT) in patients with pancreatic cancer (PCa) is infrequent and suboptimal: A national level analysis. *Pancreas* 2017; 46: 1400.

136. Nikfarjam M, Wilson JS, Smith RS. Diagnosis and management of pancreatic exocrine insufficiency. *Med J Aust* 2017; 207: 161–5.

137. Diéguez-Castillo C, Jiménez-Luna C, Prados J, Martín-Ruiz JL, Caba O. State of the Art in Exocrine Pancreatic Insufficiency. *Medicina (Kaunas)* 2020; 56(10): 523

138. Ghodeif AO, Azer SA. Pancreatic insu\_cieny. In *StatPearls* [Internet]; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020.

139. Perbtani Y, Forsmark CE. Update on the diagnosis and management of exocrine pancreatic insu\_cieny. *F1000Research* 2019; 8: 1991.

140. Duggan SN. Negotiating the complexities of exocrine and endocrine dysfunction in chronic pancreatitis. *Proc Nutr Soc* 2017; 76: 484–94.

141. Forsmark C. Diagnosis and management of exocrine pancreatic insufficiency. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2018; 16: 306–15.
142. Layer P, Yamamoto H, Kalthoff L, Clain JE, Bakken LJ, DiMagno EP. The different courses of early- and late-onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1994; 107(5): 1481–7.
143. Pezzilli R. Applicability of a checklist for the diagnosis and treatment of severe exocrine pancreatic insufficiency: A survey on the management of pancreatic maldigestion in Italy. *Panminerva Med* 2016; 58: 245–52.
144. Pezzilli R, Capurso G, Falconi M, Frulloni L, Macarri G, Costamagna G et al., G. The applicability of a checklist for the diagnosis and treatment of exocrine pancreatic insufficiency: Results of the Italian exocrine pancreatic insufficiency registry. *Pancreas* 2020; 49: 793–8.
145. Shintakuya R, Uemura K, Murakami Y, Kondo N, Nakagawa N, Urabe K et al. Sarcopenia is closely associated with pancreatic exocrine insufficiency in patients with pancreatic disease. *Pancreatol* 2017; 17: 70–5.
146. Domínguez-Muñoz JE, Nieto L, Vilariño M, Lourido MV, Iglesias-García J. Development and diagnostic accuracy of a breath test for pancreatic exocrine insufficiency in chronic pancreatitis. *Pancreas* 2016; 45(2): 242–47.
147. Martínez J, Laveda R, Trigo C, Frasquet J, Palazón JM, Pérez-Mateo M. Determinación de la Elastasa-1 fecal en el diagnóstico de la pancreatitis crónica. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25(6):377-82.
148. Durie PR, Yung-Jato LY, Soldin SJ, Verjee Z, Ellis L. Bentiromide test using liquid-chromatographic measurement of p-aminobenzoic acid and its metabolites for diagnosing pancreatic insufficiency in childhood. *J Pediatr* 1992;121(3): 413-6.
149. Mary F, Moessler A, Khodorova N, Foucault-Simonin A, Benamouzig R, Tomé D et al. Metabolic markers of protein maldigestion after a 15N test meal in minipigs with pancreatic exocrine insufficiency. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2018; 314(2): G223-30.
150. Jönsson P, Ohlsson K. Intra-pancreatic release of bradykinin during the course experimental pancreatitis in rat. *Mediators Inflamm* 1996; 5(3): 202-5.
151. Camargo EA, Ferreira T, Ribela MT, de Nucci G, Landucci EC, Antunes E. Role of substance P and bradykinin in acute pancreatitis induced by secretory phospholipase A2. *Pancreas* 2008; 37(1): 50-5.

152. Gryshchenko O, Gerasimenko J, Gerasimenko OV, Petersen OH. Ca<sup>2+</sup> signals mediated by bradykinin type 2 receptors in normal pancreatic stellate cells can be inhibited by specific Ca<sup>2+</sup> channel blockade. *J Physiol* 2016; 594 (2): 281-93.
153. Gryshchenko O, Gerasimenko J, Peng S, Gerasimenko OV, Petersen OH. Calcium signalling in the acinar environment of the exocrine pancreas: physiology and pathophysiology. *J Physiol* 2018; 596 (14): 2663-78.
154. Robles-Díaz G, Santiago M. Células estelares pancreáticas y pancreatitis crónica. *Rev Gastroenterol Mex* 2005; 70(2): 232-34
155. Bhattamisra SK, Siang TC, Rong CY, Annan NC, Sean EH, Xi LW et al. Type-3c Diabetes Mellitus, Diabetes of Exocrine Pancreas—An Update. *Curr Diabetes Rev.* 2019; 15: 382–94.
156. Woodmansey C, McGovern AP, McCullough KA, Whyte MB, Munro NM, Correa AC et al. Incidence, Demographics, and Clinical Characteristics of Diabetes of the Exocrine Pancreas (Type 3c): A Retrospective Cohort Study. *Diabetes Care* 2017; 40: 1486–93.
157. Johnston PC, Thompson J, McKee A, Hamill C, Wallace I. Diabetes and chronic pancreatitis: considerations in the holistic management of an often neglected disease. *J Diabetes Res* 2019; 2019: 2487804.
158. Wynne K, Devereaux B, Dornhorst A. Diabetes of the exocrine páncreas. *J Gastroenterol Hepatol* 2019; 34(2):346-54.
159. Hart PA, Bellin MD, Andersen DK, Bradley D, Cruz-Monserrate Z, Forsmark CE et al. Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2016; 1(3): 226–37.
160. Barton JC, Acton RT. Diabetes in HFE hemochromatosis. *J Diabetes Res* 2017; 2017: 9826930.
160. Wu L, Nahm C, Samra J, Clifton-Bligh R, Mittal A, Tsang V. Risk factors for development of diabetes mellitus (type 3c) after partial pancreatectomy: a systematic review. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2020; 92(5): 396-406.
162. Duggan SN, Ewald N, Kelleher L, Griffin O, Gibney J, Conlon KC. The nutritional management of type 3c (pancreatogenic) diabetes in chronic pancreatitis. *Eur J Clin Nutr* 2017; 71: 3-8.

163. Makuc, J. Management of pancreatogenic diabetes: challenges and solutions. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2016; 9: 311–5.
164. Federici M. Gut microbiome and microbial metabolites: a new system affecting metabolic-disorders. *J Endocrinol Invest* 2019; 42(9):1011-8.
165. Ha CY, Kim JY, Paik JK, Kim OY, Paik YH, Lee EJ et al. The association of specific metabolites of lipid metabolism with markers of oxidative stress, inflammation and arterial stiffness in men with newly diagnosed type 2 diabetes. *Clin Endocrinol* 2012; 76: 674–82.
166. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E et al. Metabolite Profiles and the Risk of Developing Diabetes. *Nat Med* 2011; 17: 448–53.
167. Chen T, Zheng X, Ma X, Bao Y, Ni Y, Hu C et al. Tryptophan Predicts the Risk for Future Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* 2016; 11: e0162192.
168. Yu E, Papandreou C, Ruiz-Canela M, Guasch-Ferre M, Clish CB, Dennis C et al. Association of Tryptophan Metabolites With Incident Type 2 Diabetes in the PREDIMED Trial: A Case-Cohort Study. *Clin Chem* 2018; 64: 1211–20.
169. Sun Y, Gao HY, Fan ZY, He Y, Yan YX. Metabolomics Signatures in Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Integrative Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: dgz240.
170. Bouchouirab FZ, Fortin M, Noll C, Dubé J, Carpentier AC. Plasma Palmitoyl-Carnitine (AC16:0) Is a Marker of Increased Postprandial Nonesterified Incomplete Fatty Acid Oxidation Rate in Adults with Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes* 2018; 42: 382–8.
171. Gordon DM, Adeosun SO, Ngwudike SI, Anderson CD, Hall JE, Hinds TD et al. CRISPR Cas9-mediated Deletion of Biliverdin Reductase A (BVRA) in Mouse Liver Cells Induces Oxidative Stress and Lipid Accumulation. *Arch Biochem Biophys* 2019; 672: 108072.
172. Nuhn P, Mitkus T, Ceyhan GO, Künzli BM, Bergmann F, Fischer L et al. Heme Oxygenase 1-generated Carbon Monoxide and Biliverdin Attenuate the Course of Experimental Necrotizing Pancreatitis. *Pancreas* 2013; 42: 265–71.
173. Saeed A, Floris F, Andersson U, Pikuleva I, Lövgren-Sandblom A, Bjerke M et al. 7 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid in cerebrospinal fluid reflects the integrity of the blood-brain barrier. *J Lipid Res* 2014; 55: 313–8.

174. Hoffmeister T, Kaiser J, Lüdtkke S, Drews G, Düfer M. Interactions between Atorvastatin and the Farnesoid X Receptor Impair Insulinotropic Effects of Bile Acids and Modulate Diabetogenic Risk. *Mol Pharmacol* 2020; 97, 202–211.

175. Vangipurapu J, Stancáková A, Smith U, Kuusisto J, Laakso M. Nine Amino Acids are Associated with Decreased Insulin Secretion and Elevated Glucose Levels in a 4.6-Year Follow-Up Study of 5181 Finnish Men. *Diabetes* 2019; 68: 1353–8.

176. He X, Zhong J, Wang S, Zhou Y, Wang L, Zhang Y et al. Serum metabolomics differentiating pancreatic cancer from new-onset diabetes. *Oncotarget*, 2017; 8(17): 29116-24.



# **Publicación 1**





# Novel Biomarkers for the Diagnosis and Evaluation of Chronic Pancreatitis by Untargeted Metabolomics

**Carmelo Diéguez-Castillo<sup>1,+</sup>, Cristina Jiménez-Luna<sup>2,+</sup>, Ariadna Martín-Blázquez<sup>3</sup>, Caridad Díaz<sup>3</sup>, José Prados<sup>2,\*</sup>, José Luis Martín-Ruíz<sup>1</sup>, Olga Genilloud<sup>3</sup>, Consolación Melguizo<sup>2</sup>, Francisca Vicente-Pérez<sup>3</sup>, José Pérez del Palacio<sup>3</sup> and Octavio Caba<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Service of Digestive System, University Hospital San Cecilio, Granada, Spain; carmelo89dc@gmail.com (C.D-C.); jlmartin@ugr.es (J.L.M-R.)

<sup>2</sup> Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Center of Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada, Spain; crisjilu@ugr.es (C.J-L.); jcprados@ugr.es (J.P.); ocaba@ugr.es (O.C.)

<sup>3</sup> Fundación MEDINA, Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores, Granada, Spain; ariadna.martin@medinaandalucia.es (A.M-B.); caridad.diaz@medinaandalucia.es (C.D.); olga.genilloud@medinaandalucia.es (O.G.); francisca.vicente@medinaandalucia.es (F.V-P.); jose.perezdelpalacio@medinaandalucia.es (J.P.)

\* Correspondence: jcprados@ugr.es; Tel.: +34 958 248819

+ These authors contributed equally to this work

**Metabolites (in press).**

## **Abstract**

The clinical manifestations and course of chronic pancreatitis (CP) are often nonspecific and variable, hampering its diagnosis at an early stage and assessment of the risk of exocrine pancreatic insufficiency (EPI), among other complications of CP. Development of new, reproducible, and non-invasive methods to diagnose CP and its most frequent complication, EPI, is therefore a major priority. Hence, the objective of this study of metabolism was to identify novel biomarkers associated with CP and EPI. We analyzed 113 samples (32 from patients with CP and presence of EPI, 21 with CP and absence of EPI, and 60 healthy controls) using an untargeted metabolomics workflow based on high-resolution mass spectrometry. Principal component and partial least squares–discriminant analyses showed significant between-group differentiation, and univariate and multivariate analyses identified potential candidate metabolites that significantly differed between CP and healthy control samples and between samples from CP patients with EPI and those without EPI. Excellent results were obtained using a three-metabolic panel to differentiate CP patients from healthy controls and a four-metabolite panel to detect the presence of EPI in CP patients. Our results confirm the usefulness of the study of metabolism in this disease setting, allowing the identification of novel biomarkers to diagnose CP and to differentiate between the presence and absence of EPI.

## **Keywords**

Metabolomics; chronic pancreatitis; exocrine pancreatic insufficiency; biomarker; diagnosis; high-resolution mass spectrometry

## Introduction

Chronic pancreatitis (CP) is a progressive inflammatory disease characterized by irreversible morphological changes of the pancreatic gland, by fibrosis, and by impairment of exocrine and endocrine functions [1]. Worldwide, CP affects 0.4%-5% of the population, reducing the life quality and expectancy of affected patients [2]. The diagnosis of CP is largely based on the presence of morphological or functional changes, but no standard diagnostic criteria or techniques have been established [3,4]. It is crucial to detect CP before its last stages, when there is a high risk of serious complications (e.g., diabetes mellitus, stenosis, pancreatic cancer, etc.) and the substantial restoration of pancreatic function becomes highly challenging [5]. Therefore, early diagnosis is crucial to improve the clinical outcome of these patients.

Exocrine pancreatic insufficiency (EPI) consists in the destruction of the pancreatic parenchyma, with a loss of acinar cells and/or obstruction of pancreatic ducts, leading to an inadequate secretion of pancreatic enzymes and bicarbonate to maintain a normal digestion [6]. CP is the most frequent cause of EPI in adults [7]. The diagnosis of EPI is currently based on maldigestion-related symptoms, nutritional markers and noninvasive pancreatic function tests (e.g. fecal elastase-1 [FE-1]) [8]. Direct methods are more sensitive but are laborious, expensive, and invasive [9], whereas indirect methods are less costly, easier to perform, and non-invasive, but are only moderately sensitive for the early detection of EPI [10,11].

The study of metabolism is an emerging and powerful tool for identifying novel biomarkers to achieve early diagnosis and/or evaluation of the course of different diseases [12]. Metabolites represent the end products of gene transcription and protein expression, and therefore characterize the phenotype of an organism at a given time [13]. Hence, analysis of differences between normal and altered metabolic pathways may yield new biomarkers for disease diagnosis [14]. The aim of untargeted metabolomics is to analyze metabolites in an unbiased manner and has recently become widely applied to evaluate metabolic pathway changes associated with disease [15]. High-resolution mass spectrometry (HRMS) is highly useful in untargeted metabolomics by combining the ability to determine masses within 3 ppm with the technology to investigate unknown compounds by collision-induced dissociation (or MS/MS), allowing exploration of relationships between parent ions and their fragments [16].

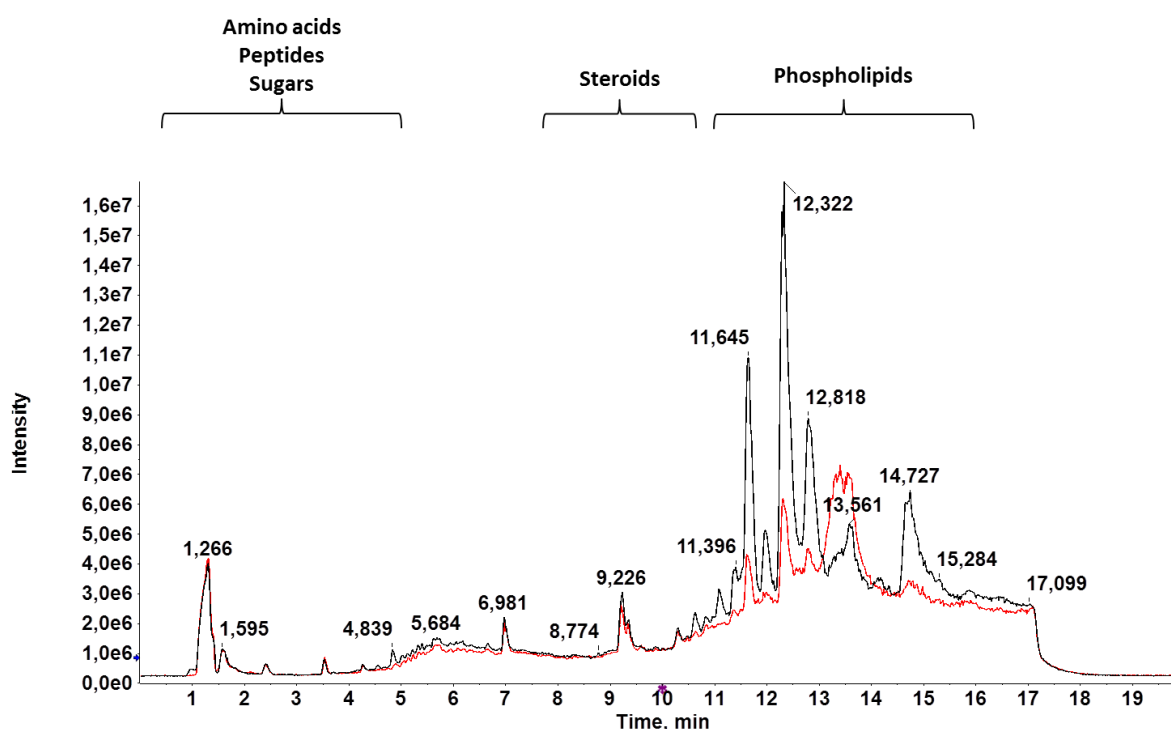
The objective of this study of metabolism was to use reverse-phase liquid chromatography (RPLC) coupled to HRMS (RPLC-HRMS) to identify potential biomarkers for the diagnosis of CP in serum samples from 113 individuals: 60 healthy controls (HC) and 53 CP patients. In addition, the presence of EPI in CP patients was

diagnosed with a FE-1 test and, by coupling hydrophilic interaction chromatography (HILIC) to HRMS, a metabolite-based predictive model was developed to discriminate between patients with and without EPI.

## Results

### Multivariate Analysis Identifies Three Metabolites Discriminating Healthy Controls and Chronic Pancreatitis Patients

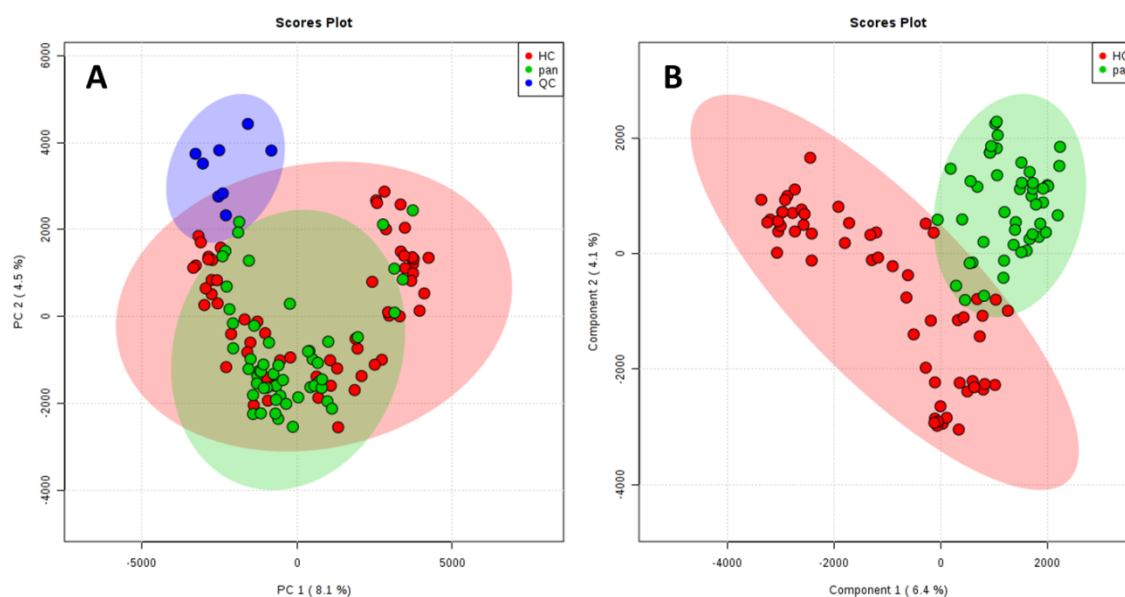
In an untargeted metabolomics approach, RPLC in positive electrospray ionization (ESI+) coupled to HRMS was used to detect candidate markers for discriminating CP patients from HC. According to the chromatograms obtained, a significant difference was observed between HC and CP total ion chromatograms (TICs) in the middle and end time, where most lipids are found (Figure 1).



**Figure 1.** Total ion chromatogram of a healthy control (red) and a chronic pancreatitis patient (black).

After alignment and filtering processes, a data matrix of 4456 metabolite features was obtained, of which 1242 were monoisotopic; 603 of the features were differentially expressed in HC and CP samples and mobile phase (MP) samples. After normalization, 220 variables were discarded due to unacceptable variability [relative standard deviation (RSD) >30%], and the remaining 383 were evaluated by principal component analysis (PCA). PCA score plot (Figure 2A) revealed a close clustering of quality control (QC) samples, indicating that the separation between HC and CP samples was mainly

attributable to biological factors. Partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) (Figure 2B) indicated the feasibility of differentiating between HC and CP samples.



**Figure 2.** (A) Principal component analysis score plot; (B) Partial least squares-discriminant analysis score plot. Green dots correspond to the chronic pancreatitis patients, red dots correspond to healthy controls and blue dots indicate the quality control samples.

Given that metabolomic data for the predictive ability of the PLS-DA model should obtain an  $R^2$  value  $\geq 0.7$  and  $Q^2$  value  $\geq 0.4$  with variability of  $\leq 0.2-0.34$ , a  $Q^2$  value of 0.76 and  $R^2$  value of 0.99 was established was determined to discriminate between HC and CP. Among the 383 remaining variables, 135 had a  $p$ -value  $< 0.05$ . Fold change calculations ( $<0.6 > 1.5$ ) showed that 47 metabolites were regulated in opposite directions in CP *versus* HC samples, and three of these were finally selected as potential biomarkers for CP in accordance with their variable importance in projection (VIP) values observed in the PLS-DA model (Table 1).

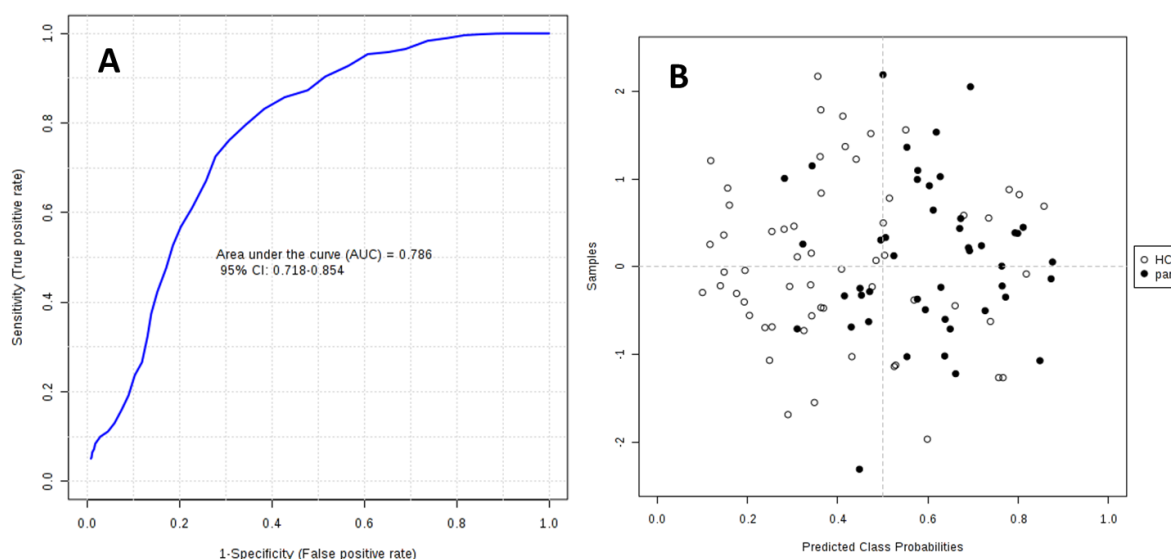
**Table 1.** Detailed information of the potential biomarkers of chronic pancreatitis.

m/z	RT	VIP	p value	FC	Molecular formula	Tentative Identification	AUC
321.1304	5.94	2.10	4.43E-8	1.91	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> N <sub>8</sub> O <sub>12</sub>	5-methyltetrahydropteroyltri-L-glutamate	0.715
428.3735	10.32	1.46	2.66E-5	0.50	C <sub>25</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>4</sub>	Acylcarnitine C18:0	0.720
610.3716	12.63	2.56	1.97E-5	1.74	C <sub>29</sub> H <sub>56</sub> NO <sub>10</sub> P	PGPC	0.699

Biomarkers were selected according to t test ( $p < 0.05$ ), fold change ( $<0.6 > 1.5$ ) and VIP ( $> 1$ ). RT: Retention time; VIP: variable importance in projection; FC: Fold change expressed as the ratio of the two means (HC/CP); AUC: Area under the receiver-operating characteristic (ROC) curve; PGPC: 1-palmitoyl-2-glytaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine.

The potential of the candidate biomarkers was further evaluated by constructing univariate receiver-operating characteristic (ROC) curves, obtaining the areas under the

ROC curve (AUCs) displayed in Table 1. The AUC for the combination of these three biomarkers was 0.786 (95% CI 0.718-0.854) (Figure 3A), higher than the AUC for each biomarker. The corresponding confusion matrix (Figure 3B) shows that 40 HC samples were correctly classified and 18 incorrectly classified, while 32 CP samples were correctly classified and 15 incorrectly classified.

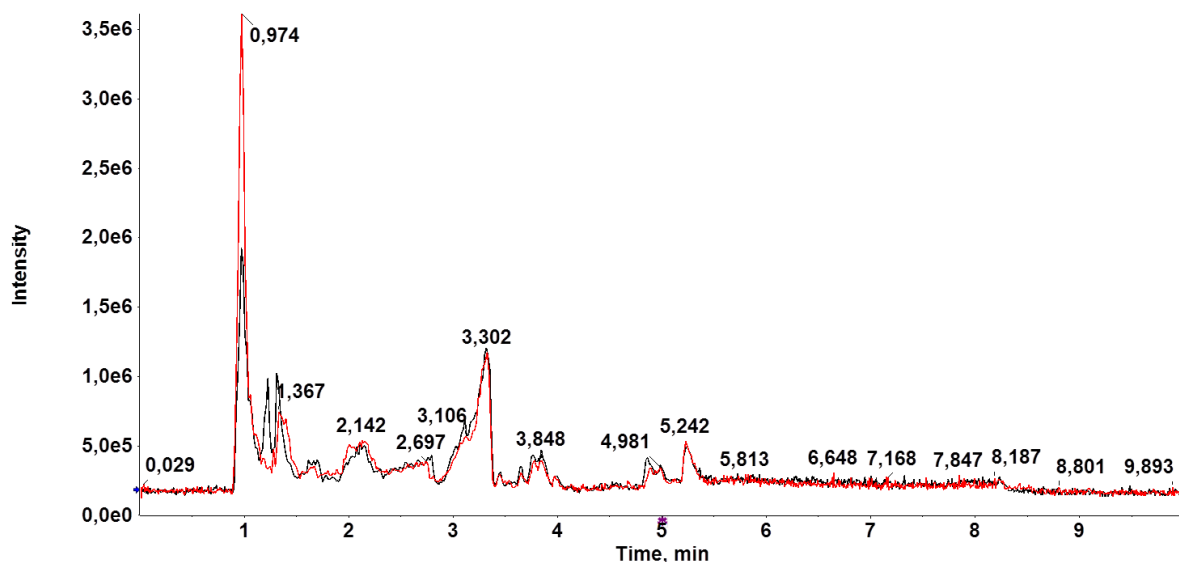


**Figure 3.** ROC curve plot for the final model obtained by multivariate combination of individual biomarkers: **(A)** ROC curve plot was created from the averaged results of 100 cross-validations. As an outcome from averaged cross-validations, it is possible to predict the classification of each patient sample; **(B)** as a consequence of the balanced subsampling approach incorporated in the algorithm, the classification limit is  $x = 0.5$  (dotted line).

Multivariate analysis identifies four metabolites that discriminate between the presence and absence of EPI

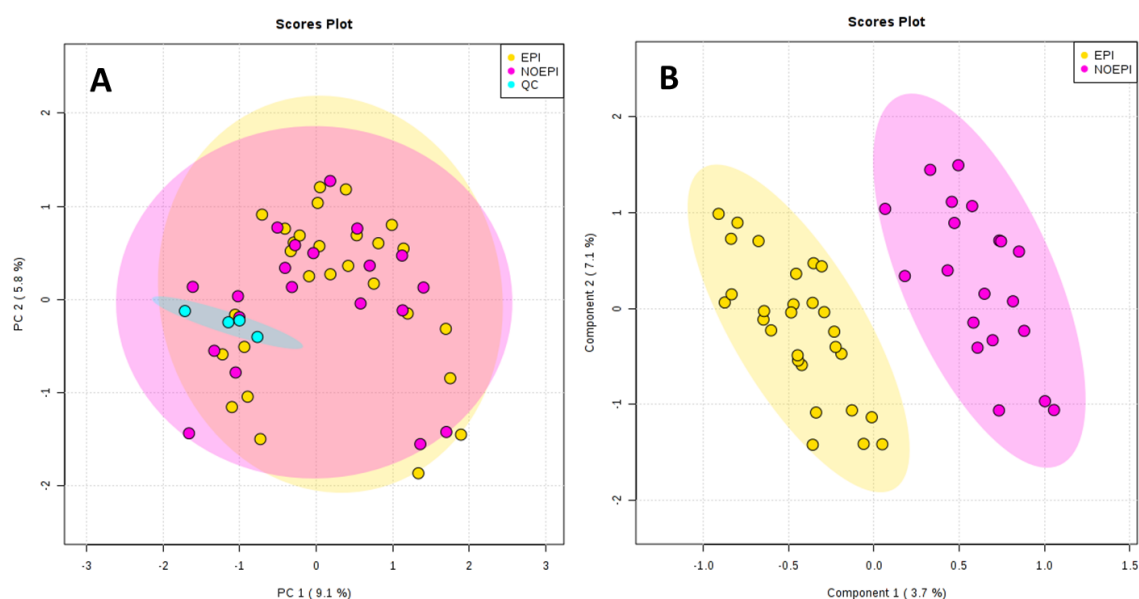
EPI was diagnosed or ruled out in CP patients using the FE-1 test: 60.4% of patients with CP patients were diagnosed with EPI ( $FE-1 < 200 \mu\text{g/g}$ ) and the remaining 39.6% were not (NO-EPI). Among those diagnosed with EPI, 87.5% had severe EPI ( $FE-1 < 100 \mu\text{g/g}$ ).

RPLC in ESI+ mode was applied, but no significance difference was obtained between EPI and NO-EPI groups (Figure 4). However, using the same extraction method but with HILIC as separation technique and in ESI- ionization mode, a significantly larger number of metabolites was obtained.



**Figure 4.** Total ion chromatogram of an EPI patient (black) and a NO-EPI patient (red).

After alignment and filtering processes, a data matrix of 1262 metabolite features was obtained, 302 of which were monoisotopic. Among these, 254 features were differentially expressed in case samples (EPI and NO-EPI) and MP samples. After normalization, six of these variables were discarded due to unacceptable variability (RSD > 30%). The PCA score plot for the remaining 248 variables (Fig 5A) revealed a close clustering of the QC samples, indicating that the separation observed between EPI and NO-EPI was mainly due to biological factors, and the PLS-DA score plot (Fig 5B) suggested that it was feasible to discriminate between these patients. The  $Q^2$  value for the predictive ability of the PLS-DA model to discriminate between EPI and NO-EPI was 0.44 and the  $R^2$  value was 0.74, indicating that it could successfully discriminate between patients with and without EPI.



**Figure 5.** (A) Principal component analysis score plot; (B) Partial least squares-discriminant analysis score plot. Yellow dots correspond to EPI patients, pink dots to NO-EPI patients, and blue dots to quality control samples.

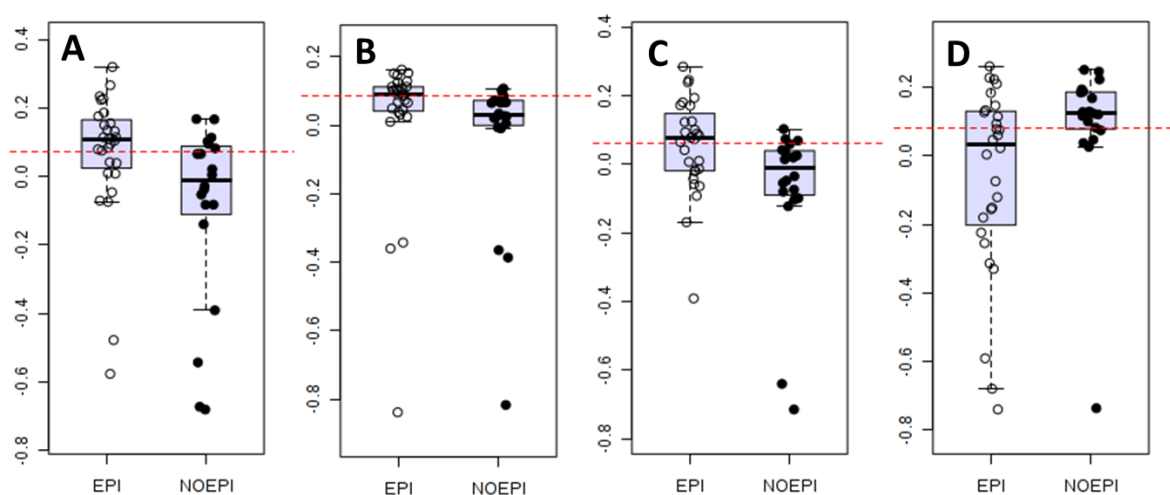
Out of these 248 variables, 13 had a  $p$ -value  $< 0.05$ . Fold-change calculations ( $<0.6$   $>1.2$ ) showed that 12 metabolites were regulated in opposite directions in patients with *versus* without EPI, and 4 of them were selected as potential EPI biomarkers according to their VIP value in the PLS-DA model. The potential of the four candidates as clinical biomarkers was further evaluated in univariate ROC analyses, obtaining the AUC values exhibited in Table 2.

**Table 2.** Detailed information of the potential biomarkers of exocrine pancreatic insufficiency.

m/z	RT	VIP	$p$ value	FC	Molecular formula	Tentative identification	AUC
303.9/3.9	3.87	2.33	0.02	1.30	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> P <sub>4</sub>	-	0.75
634.3/2.1	2.07	1.92	0.03	1.30	C <sub>30</sub> H <sub>49</sub> N <sub>6</sub> O <sub>10</sub>	Pentasin	0.73
828.6/1.3	1.26	1.06	0.004	1.20	C <sub>45</sub> H <sub>84</sub> N <sub>10</sub> O <sub>10</sub> P	PS(19:1(9Z)/20:1(11Z))	0.75
841.9/3.1	3.13	2.31	0.03	1.45	C <sub>50</sub> H <sub>73</sub> N <sub>15</sub> O <sub>11</sub>	Bradykinin	0.70

Biomarkers were selected according to  $t$ -test ( $p < 0.05$ ), fold change ( $<0.6$ - $>1.5$ ), and VIP ( $>1$ ). RT: Retention time; VIP: variable importance in projection; FC: Fold change expressed as the ratio of the two averages (EPI/NO-EPI); AUC: Area under the receiver-operating characteristic (ROC) curve; PS(19:1(9Z)/20:1(11Z)): Glycerophosphoserine (19:1(9Z)/20:1(11Z)).

Box plots of the potential biomarkers illustrate their alterations in EPI *versus* NO-EPI groups. The relative abundance of all selected biomarkers in serum of EPI patients was significantly higher than that of the NO-EPI group, using the Student's  $t$ -test ( $p$ -value  $< 0.05$ ) (Figure 6).



**Figure 6.** Box plots representing relative abundance of markers discriminating EPI and NO-EPI. All candidate markers in serum of EPI patients were upregulated using Student's  $t$ -test ( $p$ -value  $< 0.05$ ). (A) C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>P<sub>4</sub>; (B) Pentasin; (C) PS(19:1(9Z)/20:1(11Z)); (D) Bradykinin.



## Discussion

The prevalence of CP is currently underestimated due to its non-specific symptomology and the scant structural changes at early stages [17], when its diagnosis is vital to avoid serious complications such as pancreatic cancer [18]. The early detection of this cancer is hampered in these patients by the inflammation-induced destructuring of the pancreas, making it difficult to identify a well-defined lesion. Furthermore, there are many cases in which the pathological study of biopsy specimens was negative but adenocarcinoma foci were then detected in the surgical specimen [19]. Accordingly, most pancreas-related metabolomic studies have focused on the differential diagnosis between CP and pancreatic cancer, including the recent wide study by Mayerle et al of samples from 914 patients. They proposed a 9-metabolite panel that included the traditional biomarker CA19-9 alongside proline, sphingomyelin (d18:2,C17:0), phosphatidylcholine (C18:0,C22:6), isocitrate, sphinganine-1-phosphate (d18:0), histidine, pyruvate, ceramide (d18:1,C24:0), and sphingomyelin (d17:1,C18:0). This panel achieved an AUC of 0.94, sensitivity of 89.9%, and specificity of 91.3% to differentiate between pancreatic cancer and CP [20].

Given that metabolomic and pathological changes develop in a parallel manner with the progression of CP [21], researchers have searched for correlations between different metabolites and CP features to identify biomarkers that facilitate its early diagnosis. One study of Wistar rats reported that the concentration of betaine was positively correlated with fibrosis and inflammatory cell infiltration, while the concentration of aspartate was negatively correlated with fibrosis, and the presence of fatty acids was negatively correlated with fibrosis and inflammatory cell infiltration in a CP model [22]. A more recent study of a swine obstructive CP model (with partial ligation of the main pancreatic duct) used high-resolution magic angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy (HR MAS (1)H MRS) and proposed a panel including choline, glycerophosphocholine, phosphocholine, betaine and glycine to discriminate between a normal pancreas and different stages of CP [23]. Another metabolomic study in rats used HR MAS (1)H MRS to differentiate between acute necrotizing pancreatitis and CP, showing that pancreatic tissue concentrations of taurine were higher and those of leucine, isoleucine and valine were lower in the patients with CP, who also showed a higher lipid content [24].

In the present investigation, 5-methyltetrahydropteroyl-L-glutamate showed the greatest difference in expression between CP and HC samples. This molecule, which is produced by bacteria in the human gut and can also be found in feces and urine has not previously been identified as a biomarker; however, it is known to be involved in various biological pathways such as tetrahydrofolate and methionine biosynthesis, folate

polyglutamylation, and carbon tetrachloride degradation [25]. The fact that this molecule is produced by bacteria of the intestinal flora opens up the possibility of its utilization as a new diagnostic biomarker in this disease, because intestinal dysbiosis has been implicated as a mediator of chronic proinflammatory changes in the pancreas [26]. In this way, reduced levels of 5-methyltetrahydropteroyl-L-glutamate may indicate the presence of dysbiosis in these patients due to the loss of intestinal microorganisms. In this regard, a study by Han et al. on the composition of gut microbiota in mice observed a significant decrease in bacterial richness and diversity in those with CP *versus* healthy controls [27]. The differential expression of this metabolite in patients with CP has implications not only for the diagnosis of this disease but also for the development of new therapeutic targets. One study found that the administration of *Inonotus obliquus* polysaccharide mice with CP was able to regulate the composition and diversity of gut microbiota and achieve a healthy profile [28]. Another murine study found that supplementation with polysaccharides from *Ganoderma lucidum* strain S3 alleviated pancreatitis by reducing levels of lipase, AMS, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  [29]. Further research is warranted to elucidate the relationship of the microbiota with pancreatic diseases and the diagnostic and therapeutic usefulness of its manipulation [30,31].

Acylcarnitines are generated by mitochondrial and peroxisomal enzymes and comprise a fatty acid esterified to a carnitine molecule. It has been proposed that these intermediate oxidative metabolites are involved in the transport of fatty acids across the mitochondrial membrane for  $\beta$ -oxidation [32]. In addition, acylcarnitines have been strongly associated with  $\beta$ -cell dysfunction, resulting in early insulin resistance [33] that may lead to the development of gestational diabetes mellitus (DM) and progression to type 2 DM [34]. These observations have prompted proposals for the administration of different types of acylcarnitine, mainly those related to mitochondrial lipid dysregulation, as early biomarkers of type 2 DM, even before the development of insulin resistance [35-37]. Furthermore, it has been shown that the persistent inflammation in both exocrine and endocrine components of the pancreas during the course of CP may lead to DM [38]. Hence, our data support the proposition that CP is a potential risk factor for this pathology.

Fatty acid metabolism involves catabolic and anabolic processes that generate energy and biologically important molecules, and its dysregulation *via* epigenetic mechanisms has been related to several chronic diseases [39]. In the present study, the concentration of oxidized phospholipid 1-palmitoyl-2-glytaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PGPC) was lower in CP *versus* HC samples. Polyenoylphosphatidylcholines have been reported to possess anti-inflammatory, antiapoptotic, and antifibrogenic properties in rats and may exert effects on chronic

pancreatitis [40]. Examination of the composition of lipids in a rat model of acute pancreatitis also revealed a reduction in membrane levels of total phospholipids, choline, and ethanolamine glycerophospholipid and a greater susceptibility of the membranes to lipid peroxidation [41]. A more recent study of humans addressed the composition of phosphatidylcholines in relation to concomitant DM and malnutrition; the authors described intrinsic changes in fatty acid metabolism due to the alteration of delta desaturase activities in patients with CP, resulting in a decrease in polyunsaturated fatty acids and increase in monounsaturated fatty acids in the patients *versus* healthy controls [42].

In this way, a profile of patients with CP emerges from the metabolites associated with its presence: individuals with dysregulation of the intestinal microbiota and a reduction in molecules with bioprotective properties, with the consequent loss of pancreatic function and propensity to develop DM and EPI. Hence, this disease appears to be better defined using a panel of multiple metabolites.

Importantly, the early diagnosis of EPI in patients with CP is vital due to the increased risk of malnutrition and cardiovascular events [43,44]. Indirect methods are widely used but have a low sensitivity for early stages of EPI [45]. In the present study, a four-metabolite panel proved useful to discriminate between the presence and absence of EPI in patients with CP. One of the first metabolic studies for this purpose used high-pressure liquid-chromatography to assess the diagnostic capability of the bentiromide test to determine the concentration of *p*-amiobenzoic acid and its metabolites, and it detected a lower concentration of amines in patients with EPI *versus* control subjects. They concluded that this noninvasive method of evaluating pancreatic function could play an important role in the detection of EPI [46].

Among the four metabolites identified as EPI biomarkers in the present study, bradykinin showed the highest fold change. This molecule is an inflammatory mediator that has previously been implicated in pancreatic disease. Thus, a rat study reported an association between severe pancreatitis and the extensive release of bradykinin within the organ that likely contributes to the edema and tissue damage in this disease [47]. Another investigation in rats also showed that bradykinin-2 receptors regulate local and remote inflammation during pancreatitis and that pretreatment with the bradykinin-2 receptor antagonist icatibant considerably reduces the increase in pancreatic plasma extravasation and blood levels of inflammatory parameters [48]. Our panel also includes pentasine, a carboxylic acid with five carboxyl groups that belongs to the class of organic compounds known as pentacarboxylic acids and derivatives [49], as well as PS(19:1(9Z)/20:1(11Z)). This glycerophosphoserine was previously included in a panel of metabolites that showed significant differences in their concentration between tissue

samples from patients with endometrial carcinogenesis tissues *versus* controls [50]. More recently, PS(19:1(9Z)/20:1(11Z)) was identified among other significant predictive metabolites and lipids detected in sera from rats exposed to laser printer-emitted nanoparticle inhalation [51]. Further in-depth studies with wider samples are under way to establish the capacity of this four-metabolite panel to discriminate between CP patients with and without EPI.

## Materials and Methods

### Sample Collection

Our study included 113 samples: 53 from CP patients (CP) and 60 from healthy controls (HC). Baseline characteristics of patients with CP are detailed in Table 3.

**Table 3.** Baseline characteristics of all patients with chronic pancreatitis.

Characteristic	All Patients	EPI	No EPI
<b>Number</b>	53	32	21
<b>Age (years)</b>	55.7	56.7	54.3
<b>Sex</b>			
Male	44	30	14
Female	9	2	7
<b>Diagnostic test</b>			
Endoscopic ultrasonography	38	21	17
Computed Tomography	10	6	4
Abdominal ultrasound	3	3	0
Anatomopathological study	2	2	0
<b>Alcoholic habit</b>			
Yes	34	23	11
No	19	9	10
<b>Smoking habit</b>			
Yes	34	27	7
No	19	5	14
<b>Body Mass Index</b>			
Overweight/Obesity (>25)	24	10	14
Normal weight (18>BMI<25)	28	21	7
Underweight (<18)	1	1	0
<b>Cardiovascular events</b>			
Yes	4	2	2
No	49	30	19
<b>Abdominal pain</b>			
Yes	24	16	8
No	29	16	13
<b>Diarrhea</b>			
Yes	12	10	2
No	41	22	19
<b>Complications<sup>1</sup></b>			
Yes	31	19	12
No	22	13	9
<b>Hospital readmissions<sup>2</sup></b>			
Yes	21	13	8
No	32	19	13
<b>Treatment</b>			
Endoscopic	8	6	2

Surgical	13	10	3
Analgesic	30	21	9
Substitutive enzyme	29	22	7
Oral antidiabetics	26	20	6
Statins / Fibrates	16	11	5

<sup>1</sup> Compressive (Pseudocyst or abscess), stenotic (biliary or duodenal), or vascular (pseudoaneurysm or splenoportal thrombosis); <sup>2</sup> Hospital admissions in a follow-up period of 12 months.

In order to obtain the maximum reproducibility in our study, the variation in parameters related to patients and sampling (fasting state, time of day of sampling, etc.) was minimized. Thus, blood samples from patients were obtained at the Hospital Universitario San Cecilio in Granada between February and September 2017. The study was approved by the ethics committee of the hospital (approval code: 1269-M1-19), and all clinical investigations were conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. The Biobank of Andalusia Public Health System Serum transferred HC samples. Written informed consent was obtained from all patients before their enrolment in the study.

Clotting of samples was activated by collecting blood from selected patients in BC vacutainer SSTII Advance tubes with silica (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), centrifuging for 10 min at 2450 rpm, and then, aspirating the supernatant and storing it at -80°C.

#### Assessment of Exocrine Pancreatic Insufficiency

The exocrine pancreatic function of CP patients was tested by using the BioServ Diagnostics Pancreatic Elastase ELISA kit (BioServ Analytics and Medical Devices Ltd., Rostock, Germany) to determine FE-1 levels, following the manufacturer's instructions. FE-1  $\geq$  200  $\mu\text{g/g}$  was considered to indicate normal pancreatic function, FE-1 = 100-200  $\mu\text{g/g}$  mild-moderate EPI, and FE-1 < 100  $\mu\text{g/g}$  severe EPI.

#### Metabolite Extraction

AcN (1:8 sample/AcN) was added to serum samples and shaken for 2 min to remove proteins. After centrifugation at 15200 rpm for 10 min at 4 °C, supernatants were collected and transferred to vials and then evaporated using the GeneVac HT-8 evaporator (Savant, Holbrook, NY). AcN/water (50:50) with 0.1% formic acid was used to reconstitute obtained dry residues, shaking for 1 min. All samples were kept at 4 °C throughout analytical procedures.

#### RPLC-HRMS and HILIC-HRMS Analysis

Chromatographic separation was performed using a Waters Atlantis T3 column (C18: 2.1 mm × 150 mm, 3 μm) (Waters Corporation, Milford, MA), maintaining the column temperature at 25 °C in the Agilent Series 1290 LC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Injection volume was 5 μL. The mobile phase consisted in solvent A (water/AcN 90/10 with 0.1% formic acid) and solvent B (AcN/water 90/10 with 0.1% formic acid). The gradient was: 0–0.5 min 99% solvent B, 0.5–10 min 99% solvent B, 10–12 min 1% solvent B, 12–12.10 min 99% solvent B, and 12.10–15 min 99% solvent B. The flow rate was 300 μL/min.

For HILIC, chromatographic separation was performed as follow: 0.00-0.10 min 99% eluent B, 0.10-7.00 min 30% eluent B, 7.00-7.10 min 99% eluent B, and 7.10-10.00 min 99% eluent B, using a Waters Xbridge BEH amide column (2.1 x 150 mm, 2.5 μm) Column temperature was maintained at 45 °C. The elution flow rate was 400 μL/min. Agilent Series 1290 was used as LC instrument.

Mass detection was carried out using an AB SCIEX Triple TOF 5600 quadrupole-time-of-flight mass spectrometer in ESI (+) and ESI (-) modes (AB SCIEX, Concord, ON) for RPLC and HILIC analyses, respectively. To obtain fragmentation and mass spectra, the TripleTOF 5600 was operated using a TOF method and an information dependent acquisition (IDA) technique to simultaneously collect full-scan HRMS and MS/MS information.

Information-dependent acquisition method was used, fragmenting the eight most intense ions. Exact mass calibration was automatically performed every 8 and 10 injections in HILIC and RPLC analyses, respectively.

MP sample was run every 50 samples to identify impurities of either the solvents or extraction procedure and for testing carryover contamination from intense peaks. QC sample were injected every 10 chromatographic runs to check variability in the analysis.

#### Data Set Creation

The retention time (RT) and mass/charge (m/z) were evaluated to study the analytical reproducibility using PeakView software (version 1.0 with Formula Finder plug-in version 1.0, AB SCIEX, Concord, ON). Raw data was processed with MarkerView software (version 1.2.1, AB SCIEX, Concord, ON), which performs peak detection, alignment, and data filtering.

For RPLC, peak detection was carried out using an automated algorithm in the RT range of 1-18 min, removing the narrowest peaks of 0.02 Da and 4 scans of RT and eliminating background noise (100 cps) using a tool in the MarkerView software. Peak alignment was achieved applying RT tolerance of 0.10 min and m/z tolerance of 10 ppm.

For HILIC, peak detection was carried out using an algorithm in the RT range of 1-8 min and removing background noise (50 cps). Peak alignment was achieved using RT and m/z tolerances of 0.15 min and 15 ppm, respectively. Next, a filter was applied by “presence” to retain masses appearing in at least 5 samples in the study case groups, only considering monoisotopic peaks. Finally, a filtering procedure with t-test ( $p < 0.05$ ) and fold-change ( $<0.6->1.2$ ) was employed to identify differentially expressed mass signals between MP samples and case study samples. The following steps of the procedure were carried out using Metaboanalyst 3.0 Web Server.

#### Analytical Validation

Metaboanalyst 3.0 Web Server was used to transform the data matrix into a Gaussian-type distribution by total area sums, auto scaling, and cube transformation. The study was evaluated by the non-supervised PCA method. Variables with unacceptable reproducibility ( $RSD > 30\%$ ) were excluded. In the statistical validation,  $R^2$  and  $Q^2$  explained the goodness of fit and prediction, respectively. PLS-DA allowed the identification of outliers. No outliers were found in EPI assessment.

#### Statistical Analysis

Univariate analysis was performed with the Student's t-test ( $p < 0.05$ ), determining the statistical significance of between-group differences. Multivariate analysis was also conducted, carrying out PCA and a PLS-DA to identify m/z values responsible for the separation between groups. Metabolites with VIP values  $> 1$  were accepted as statistically relevant. Finally, the fold change ( $<0.6->1.2$ ) between groups was considered as election criterion for variability in the amounts of metabolites.

#### Biomarker Identification

Selected molecular components were identified by searching in Metlin, Human Metabolome Database, KEGG, and Lipid Maps databases, using a mass tolerance of  $< 5$  ppm. Next, PeakView software (version 1.0 with Formula Finder plug-in version 1.0, AB SCIEX, Concord, ON) was used to determine molecular formulas. M/z with the same molecular formula in experimental and database estimations were further analyzed by studying their experimental MS/MS spectra with information provided by the databases MassBank, NIST 2014 MS/MS, Human Metabolome Database and Metlin.

#### Biomarker Evaluation

The sensitivity and specificity of the proposed biomarkers was tested using the receiver operator characteristic (ROC) curve, a non-parametric measure of biomarker

utility. We performed univariate and multivariate ROC analyses to evaluate the clinical value of the candidates as individual biomarkers and in combination with others.

## Conclusions

Blood samples from patients with chronic pancreatitis and healthy controls were studied with liquid chromatography and mass spectrometry, identifying three metabolites with significantly lower concentrations in the patients. None of them have previously been proposed as biomarkers of chronic pancreatitis. In addition, the coupling of hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry yielded a panel of four metabolites that showed differential expression in patients with chronic pancreatitis according to the presence or absence of exocrine pancreatic insufficiency. These results confirm the potential of the study of metabolism to improve understanding of the pathogenesis of this disease and to identify new diagnostic and prognostic markers.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.P.P. and O.C.; methodology, A.M-V.; validation, C.J-L., C.D. and J.L.M-R.; formal analysis, A.M-V.; investigation, C.J-L.; resources, C.D-C.; data curation, C.D.; writing—original draft preparation, C.J-L. and C.D-C.; writing—review and editing, J.P. CM and J.P.P.; supervision, O.G. and J.P.; project administration, F.V-P.; funding acquisition, O.C.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

CP	Chronic pancreatitis
EPI	Exocrine pancreatic insufficiency
FE-1	Fecal elastase-1
HRMS	High-resolution mass spectrometry
RPLC	Reverse-phase liquid chromatography
HC	Healthy control
AcN	Acetonitrile
TIC	Total ion chromatograms
MP	Mobile phase
RSD	Relative standard deviation
PCA	Principal component analysis
QC	Quality control
PLSDA	Partial least square-discriminant analysis
ROC	Receiver-operating characteristic
AUC	Area under the curve



DM	Diabetes mellitus
PGPC	1-palmitoyl-2-glytaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine
ESI	Electrospray ionization
UVA	Univariate analysis
MVA	Multivariate analysis

## References

1. Kleeff, J.; Whitcomb, D.C. Chronic pancreatitis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17060.
2. Gupte, A.; Goede, D. Chronic pancreatitis. *BMJ* **2018**, *361*, k2126.
3. Dominguez-Munoz, J.E.; Drewes, A.M. Recommendations from the United European Gastroenterology evidence-based guidelines for the diagnosis and therapy of chronic pancreatitis. *Pancreatology* **2018**, *18*, 847-854.
4. Duggan, S.N.; Ní Chonchubhair, H.M. Chronic pancreatitis: A diagnostic dilemma. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 2304-2313.
5. Ramsey, M.L.; Conwell, D.L. Complications of Chronic Pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* **2017**, *62*, 1745-1750.
6. Hart, P.A.; Conwell, D.L. Challenges and Updates in the Management of Exocrine Pancreatic Insufficiency. *Pancreas* **2016**, *45*, 1-4.
7. de la Iglesia-Garcia, D.; Vallejo-Senra, N. Increased Risk of Mortality Associated With Pancreatic Exocrine Insufficiency in Patients With Chronic Pancreatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* **2018**, *52*, e63-e72.
8. Dominguez-Muñoz, J.E. Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2018**, *34*, 349-354.
9. Anaizi, A.; Hart, P.A. Diagnosing Chronic Pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* **2017**, *62*, 1713-1720.
10. González-Sánchez; V.; Amrani, R. Diagnosis of exocrine pancreatic insufficiency in chronic pancreatitis: <sup>13</sup>C-Mixed Triglyceride Breath Test versus Fecal Elastase. *Pancreatology* **2017**, *17*, 580-585.
11. Vanga, R.R.; Tansel, A. Diagnostic Performance of Measurement of Fecal Elastase-1 in Detection of Exocrine Pancreatic Insufficiency: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *16*, 1220-1228.
12. Madji Hounoum, B.; Blasco, H. Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry-Based Cell Metabolomics: Experimental Design, Recommendations, and Applications. *Trends Analyt. Chem.* **2016**, *75*, 118-128.
13. Guo, H.; Guo, H.; Zhang, L.; Tang, Z.; Yu, X.; Wu, J.; Zeng, F. Metabolome and Transcriptome Association Analysis Reveals Dynamic Regulation of Purine Metabolism and Flavonoid Synthesis in Transdifferentiation during Somatic Embryogenesis in Cotton. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, pii: E2070.
14. Zhang, A.; Sun, H. Metabolomics for Biomarker Discovery: Moving to the Clinic. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 354671.
15. Cajka, T.; Fiehn, O. Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 524-545.
16. Ríos Peces, S.; Díaz Navarro, C. Untargeted LC-HRMS-Based Metabolomics for Searching New Biomarkers of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Pilot Study. *SLAS Discov.* **2017**, *22*, 348-359.
17. Domínguez-Muñoz, J.E.; Lucendo, A. Estudio español multicéntrico de estimación de la prevalencia e incidencia de la pancreatitis crónica y sus complicaciones. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **2014**, *106*, 239-245.
18. Muñoz Martín, A.J.; Adeva, J. Pancreatic ductal adenocarcinoma: metastatic disease. *Clin. Transl. Oncol.* **2017**, *19*, 1423-1429.

19. Dutta, A.K.; Chacko, A. Head mass in chronic pancreatitis: inflammatory or malignant. *World. J. Gastrointest. Endosc.* **2015**, *7*, 258-264.
20. Mayerle, J.; Kalthoff, H. Metabolic biomarker signature to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *Gut* **2018**, *67*, 128-137.
21. Gu, W.; Tong, Z. Clinical Application of Metabolomics in Pancreatic Diseases: A Mini-Review. *Lab. Med.* **2019**, pii: Imz046.
22. Tian, B.; Ma, C. Analysis of metabolic characteristics in a rat model of chronic pancreatitis using high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *11*, 53-58.
23. Sun, G.; Wang, J. High-resolution magic angle spinning (1)H magnetic resonance spectroscopy detects choline as a biomarker in a swine obstructive chronic pancreatitis model at an early stage. *Mol. Biosyst.* **2014**, *10*, 467-474.
24. Ma, C.; Tian, B. Metabolic characteristics of acute necrotizing pancreatitis and chronic pancreatitis. *Mol. Med. Rep.* **2012**, *6*, 57-62.
25. Tapiero, H.; Mathé, G. Glutamine and glutamate. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56*, 446-457.
26. Adolph, T.E.; Mayr, L. Pancreas-Microbiota Cross Talk in Health and Disease. *Annu. Rev. Nutr.* **2019**, *39*, 249-266.
27. Han, M.M.; Zhu, X.Y. The alterations of gut microbiota in mice with chronic pancreatitis. *Ann. Transl. Med.* **2019**, *7*, 464.
28. Hu, Y.; Teng, C. *Inonotus obliquus* polysaccharide regulates gut microbiota of chronic pancreatitis in mice. *AMB Expr.* **2017**, *7*, 39.
29. Koukou, L.; Cheng, Z. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on chronic pancreatitis and intestinal microbiota in mice. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 904-912.
30. Akshintala, V.S.; Talukdar, R. The Gut microbiome in pancreatic disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *17*, 290-295.
31. Memba, R.; Duggan, S.N. The potential role of gut microbiota in pancreatic disease: A systematic review. *Pancreatology* **2017**, *17*, 867-874.
32. McCoin, C.S.; Knotts, T.A. Acylcarnitines-old actors auditioning for new roles in metabolic physiology. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 617-625.
33. Petersen, M.C.; Shulman, G.I. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 2133-2223.
34. Batchuluun, B.; Al Rijjal, D. Elevated Medium-Chain Acylcarnitines Are Associated With Gestational Diabetes Mellitus and Early Progression to Type 2 Diabetes and Induce Pancreatic  $\beta$ -Cell Dysfunction. *Diabetes* **2018**, *67*, 885-897.
35. Sun, L.; Liang, L. Early Prediction of Developing Type 2 Diabetes by Plasma Acylcarnitines: A Population-Based Study. *Diabetes Care* **2016**, *39*, 1563-1570.
36. Libert, D.M.; Nowacki, A.S. Metabolomic analysis of obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: amino acid and acycarnitine levels change along a spectrum of metabolic wellness. *PeerJ* **2018**, *6*, e5410.
37. Guasch-Ferré, M.; Ruiz-Canela, M. Plasma acycarnitines and risk of type 2 diabetes in a Mediterranean population at high cardiovascular risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, *104*, 1508-1519.
38. Zhu, X.; Liu, D. New-Onset Diabetes Mellitus After Chronic Pancreatitis Diagnosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pancreas* **2019**, *48*, 868-875.
39. González-Becerra, K.; Ramos-Lopez, O. Fatty acids, epigenetic mechanisms and chronic diseases: a systematic review. *Lipids Health Dis.* **2019**, *18*, 178.
40. Li, X.; Wu, Z. Protective effects of polyenoylphosphatidylcholine in rats with severe acute pancreatitis. *Pancreas* **2015**, *44*, 596-601.
41. Ferreira, L.; Pérez-González, N. Acute pancreatitis decreases pancreas phospholipid levels and increases susceptibility to lipid peroxidation in rat pancreas. *Lipids* **2002**, *37*, 167-171.

42. Zeman, M.; Macášek, J. Chronic pancreatitis and the composition of plasma phosphatidylcholine fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2016**, *108*, 38-44.
43. Min, M.; Patel, B. Exocrine Pancreatic Insufficiency and Malnutrition in Chronic Pancreatitis: Identification, Treatment, and Consequences. *Pancreas* **2018**, *47*, 1015-1018.
44. de la Iglesia, D.; Vallejo-Senra, N. Pancreatic exocrine insufficiency and cardiovascular risk in patients with chronic pancreatitis: A prospective, longitudinal cohort study. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *34*, 277-283.
45. Dominguez-Muñoz, J.E. Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2018**, *34*, 349-354.
46. Durie, P.R.; Yung-Jato, L.Y. Bentriomide test using liquid-chromatographic measurement of p-aminobenzoic acid and its metabolites for diagnosing pancreatic insufficiency in childhood. *J. Pediatr.* **1992**, *121*, 413-416.
47. Jönsson, P.; Ohlsson, K. Intra-pancreatic release of bradykinin during the course experimental pancreatitis in rat. *Mediators Inflamm.* **1996**, *5*, 202-205.
48. Camargo, E.A.; Ferreira, T. Role of substance P and bradykinin in acute pancreatitis induced by secretory phospholipase A2. *Pancreas* **2008**, *37*, 50-55.
49. Akagawa, M.; Suyama, K. Mechanism of formation of elastin crosslinks. *Connect. Tissue Res.* **2000**, *41*, 131-141.
50. Altadill, T.; Dowdy, T.M. Metabolomic and Lipidomic Profiling Identifies The Role of the RNA Editing Pathway in Endometrial Carcinogenesis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8803.
51. Guo, N.L.; Poh, T.Y. Integrated Transcriptomics, Metabolomics, and Lipidomics Profiling in Rat Lung, Blood, and Serum for Assessment of Laser Printer-Emitted Nanoparticle Inhalation Exposure-Induced Disease Risks. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, pii: E6348.



# **Publicación 2**



## **Role of Exocrine and Endocrine Insufficiency in the Management of Patients with Chronic Pancreatitis**

**Carmelo Diéguez-Castillo <sup>1</sup>, Cristina Jiménez-Luna <sup>2</sup>, Jose Luis Martín-Ruiz <sup>1</sup>, Joaquina Martínez-Galán <sup>3</sup>, José Prados <sup>2</sup>, Carolina Torres <sup>4</sup>, Amanda Rocío González-Ramírez <sup>5</sup> and Octavio Caba <sup>2,\*</sup>**

- 1 Department of Gastroenterology, San Cecilio University Hospital, 18012 Granada, Spain
- <sup>2</sup> Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), University of Granada, 18100 Granada, Spain
- <sup>3</sup> Department of Medical Oncology, Virgen de las Nieves University Hospital, 18014 Granada, Spain
- <sup>4</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology III and Immunology, University of Granada, 18071 Granada, Spain
- <sup>5</sup> Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.Granada), 18012 Granada, Spain

**J Clin Med 2020 Jun; 9 (6): 2014.**

## **Abstract**

*Background:* Exocrine pancreatic insufficiency results from the destruction of the pancreatic parenchyma and is diagnosed by using direct or indirect tests, both of which have shortcomings. Chronic pancreatitis is the most frequent cause of this pathology in adults.

*Methods:* Patients meeting radiological or histological diagnostic criteria of chronic pancreatitis are enrolled and the stool elastase test is conducted, considering fecal elastase levels  $>200$   $\mu\text{g/g}$  to represent normal pancreatic function, and levels  $<200$   $\mu\text{g/g}$  to indicate the presence of exocrine pancreatic insufficiency. Additionally, we determine the body mass index of the patients and study their nutritional status and main biochemical and hematological variables, including their glucose and hemoglobin A1c (HbA1c) levels.

*Results:* Exocrine pancreatic insufficiency is detected in 60% of the patients. Among these, 83.3% are severe cases, and 72% of the latter also are diagnosed with endocrine pancreatic insufficiency (diabetes mellitus). During the nutritional status study, HbA1c levels are significantly higher, and magnesium and prealbumin levels are significantly lower in patients with exocrine pancreatic insufficiency than in those without this disease.

*Conclusions:* Exocrine and endocrine pancreatic insufficiency are highly prevalent among patients with chronic pancreatitis and an early diagnosis of these diseases is vital to improve the clinical management of these patients and reduce their risk of mortality.

## **Keywords**

Chronic pancreatitis; exocrine pancreatic insufficiency; diabetes mellitus; nutritional status; pancreatic complications.

## **Introduction**



Exocrine pancreatic insufficiency (EPI) results from the destruction of the pancreatic parenchyma with a sufficiently large loss of acinar cells and/or obstruction of pancreatic ducts that it is not possible to maintain the minimum production levels of digestive enzymes and ductal bicarbonate secretion required to adequately digest food [1,2]. Chronic pancreatitis (CP) is the most frequent cause of EPI in adults [3].

EPI development compromises digestion and the absorption of macro- and micronutrients, and the resulting malnutrition increases the mortality risk [4,5]. Additionally, the presence of EPI significantly increases the risk of complications secondary to CP [6]. Exocrine pancreatic function is diagnosed by using direct or indirect tests, both of which have shortcomings. Direct methods are more sensitive but are only available in a few centers and are laborious, expensive and, being invasive, unpleasant for patients [7]. Indirect methods are less costly, easier to perform, and non-invasive, but their sensitivity for early detection is low [8,9].

The objectives of this study are to analyze the exocrine pancreatic function of patients with CP by using the fecal elastase-1 (FE-1) test during their follow-up and determining their nutritional status and main anthropometric and analytical characteristics.

## **Materials and Methods**

### **Study Design and Participants**

We present a cross-sectional study of 50 patients with chronic pancreatitis (CP) under follow-up at San Cecilio University Hospital between February 2015 and June 2016. Inclusion criteria were: age >18 years; fulfilment of Rosemont diagnostic criteria for CP in patients diagnosed by endoscopic ultrasonography (EUS) [10]; the presence of pancreatic calcifications or dilatation of the main pancreatic duct with parenchymal alterations in those diagnosed by abdominal ultrasound or computed tomography; and a positive histologic result in those diagnosed by pancreatic biopsy. Exclusion criteria were the presence of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), refusal to participate in the study, and failure to attend follow-up sessions. PDAC was ruled out by a recent (<6-month) computed tomography, magnetic resonance, or EUS scan.

All patients signed written informed consent to participate in the study, which was conducted in accordance with the Helsinki Declaration and current Spanish legislation, preserving the confidentiality of participants and anonymizing personal data. The protocol was approved by the Ethics Committee of our hospital (approval number 1269-M1-19).

All patients in the pancreatic enzyme replacement therapy (PERT) group were undergoing PERT at the time of laboratory testing and consumed the same amount of enzyme replacement (2 capsules of 25,000 lipase units at breakfast, lunch, and evening meal). Additionally, all patients with a vitamin D deficit were receiving treatment for this condition at the time of testing. Regarding trace elements, all patients underwent a nutritional intervention on healthy life habits, including dietary recommendations to improve the consumption and supply of nutrients.

#### Assessment of Pancreatic Insufficiency, Nutritional Status, and Pancreatic Complications

Testing was carried out at the time of study enrolment, when an interview was conducted, and a nutritional profile was established. The exocrine pancreatic function of patients was tested using the BioServ Diagnostics Pancreatic Elastase ELISA kit (BioServ Analytics Ltd., Rostock, Germany) to determine fecal elastase-1 (FE-1) levels, following the manufacturer's instructions. FE-1  $\geq 200$   $\mu\text{g/g}$  was considered to indicate normal pancreatic function, FE-1 = 100–200  $\mu\text{g/g}$  mild-moderate exocrine pancreatic insufficiency (EPI), and FE-1  $< 100$   $\mu\text{g/g}$  severe EPI. Found at the time of elastase testing, all stools analyzed had a consistency of 1–4 on the Bristol scale. The nutritional status of CP patients with and without EPI was evaluated by determining their body mass index (BMI), their blood concentrations of glucose, glycosylated hemoglobin, total proteins, albumin, prealbumin, somatomedin C, ferritin, transferrin, triglycerides, cholesterol, vitamin D, magnesium, and hemoglobin, and their lymphocyte count.

We studied the presence of pancreatic complications secondary to CP, including compressive (pseudocyst and abscess), stenotic (biliary and duodenal), and vascular (splenoportal axis thrombosis and pseudoaneurysm) complications, the development of type 3c diabetes mellitus (DM)—the diagnostic criterion for diabetes was plasma glucose  $\geq 126$  mg/dL (7.0 mmol/L) or hemoglobin A1c (HbA1c)  $\geq 6.5\%$  (48 mmol/mol)—and the onset of cardiovascular events, defined as major (acute coronary syndrome or stroke) or minor (peripheral arterial disease or deep vein thrombosis). Data on cardiovascular events were gathered by reviewing the clinical records of the Emergency Department and the corresponding Departments of Cardiology, Neurology, and/or Vascular Surgery. Evaluation of chronic abdominal pain was based on the need for analgesics and on the WHO analgesic ladder, referring patients to the Pain Unit of the Anesthesiology Department when the pain was difficult to control. Information on pancreatic abscesses, acute cholangitis, and exacerbation of pancreatitis was collected by reviewing the hospital admissions of patients. The diagnosis of duodenal stenosis was based on the presence of recurrent vomiting and on radiologic and endoscopic findings and was confirmed by

biopsy. Pseudocysts and splenoportal axis thrombosis were identified in imaging studies performed every 6–12 months. Finally, the diagnosis of biliary stenosis was based on hepatic profile alterations and cholangio-magnetic resonance imaging (MRI) or endoscopic ultrasonography (EUS) findings.

### Statistical Analysis

SPSS v.21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for the statistical analyses. After a descriptive analysis, proportions were compared between the groups using the chi-square test or, when conditions were not met, Fisher's exact test. We applied the non-parametric Mann–Whitney U test to compare mean values of quantitative variables between two groups, and the Kruskal–Wallis test to compare mean values among more than two groups.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

### Results

#### Comparison of Patients with versus without EPI

Table 1 exhibits the characteristics of the 50 patients with CP included in this study, divided between those with EPI and those without this complication.

**Table 1.** Patient characteristics ( $n = 50$ ).

	Total	Patients with EPI	Patients without EPI	<i>p</i> -Value
<i>N</i>	50	30 (60%)	20 (40%)	
Mean age	54.82	55.77	53.4	0.751
Gender				0.021 <sup>a</sup>
Male	41 (82%)	28 (93.3%)	13 (65%)	
Female	9 (18%)	2 (6.7%)	7 (35%)	
Caucasian	50 (100%)	30 (100%)	20 (100%)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )				0.062 <sup>a</sup>
Overweight (>25)	21 (42%)	9 (30%)	12 (60%)	
Normal weight	28 (56%)	20 (66.7%)	8 (40%)	
Underweight (<18)	1 (2%)	1 (3.3%)	0 (0%)	
Diabetes mellitus	25 (50%)	18 (60%)	7 (35%)	0.083
Type 1–2	12 (48%)	10 (55.6%)	2 (28.6%)	
Type 3c	13 (52%)	8 (44.4%)	5 (71.4%)	
>12 y. since diagnosis	8 (16%)	7 (23.3%)	1 (5%)	0.123
Diagnostic test				0.233
EUS	36 (72%)	19 (63.3%)	17 (85%)	

CT	14 (28%)	11 (36.7%)	3 (15%)	
Ultrasound	3 (6%)	3 (10%)	0 (0%)	
Pathology report	2 (4%)	2 (6.7%)	0 (0%)	
CP etiology				0.608
Toxic	33 (66%)	22 (73.3%)	11 (55%)	
Idiopathic	11 (22%)	5 (16.7%)	6 (30%)	
Autoimmune	4 (8%)	2 (6.7%)	2 (10%)	
Pancreas divisum	2 (4%)	1 (3.3%)	1 (5%)	
Alcohol habit				0.051
Drinker (SDU)	33 (66%) (7.1)	23 (76.7%) (6.6)	10 (50%) (7.9)	
Smoking habit				0.311
Smoker (cigarettes/day)	39 (78%) (20.5)	19 (63.3%) (20.1)	14 (70%) (22.1)	
PERT	28 (56%)	21 (70%)	7 (35%)	0.015 <sup>a</sup>
Surgical treatment	12 (24%)	10 (20%)	2 (4%)	0.163

EPI: exocrine pancreatic insufficiency; BMI: body mass index; EUS: endoscopic ultrasonography; CT: computed tomography; CP: chronic pancreatitis; SDU: standard drink unit; PERT: pancreatic enzyme replacement therapy. <sup>a</sup>  $p < 0.05$ .

CP was defined by characteristic morphological findings, identified with imaging tests in patients with compatible clinical profiles. Most patients (72%) were diagnosed using EUS, based on the Rosemont criteria, while 28% were diagnosed by computed tomography, 6% by abdominal ultrasound, and 4% by pathology report.

Considering the 50 patients with CP, 30 (60%) had FE-1  $< 200 \mu\text{g/g}$  and were, therefore, diagnosed with EPI; in 83.3% of these cases, the EPI was severe (FE-1  $< 100 \mu\text{g/g}$ ).

We analyzed the possible association between the presence of EPI and the time interval since CP diagnosis, selecting 12 years as the cutoff point. The time since diagnosis was  $> 12$  years in 35% of the patients with EPI and in 5% of those without this complication, although the difference was not statistically significant ( $p = 0.123$ ). No significant association was found between a history of CP for  $> 12$  years and being a smoker or alcohol drinker ( $p = 0.174$  and  $p = 0.237$ , respectively).

Body mass index (BMI) values showed that the majority (66.7%) of patients with EPI had normal weight, whereas the majority (60%) of those without EPI were overweight, although the difference did not reach statistical significance ( $p = 0.062$ ). Nutritional status was not compared between patients with mild–moderate and severe EPI due to the wide disparity in sample sizes (25 versus 5).

Shown in Table 2, the patients with and without EPI significantly differed in blood levels of glycosylated hemoglobin (7.16 versus 5.9%,  $p = 0.007$ ), prealbumin (23.64

versus 27.94 mg/dL,  $p = 0.005$ ), and magnesium (1.87 versus 1.98 mg/dL  $p = 0.03$ ); the mean values of these parameters were within the normal range in both groups, except for glycosylated hemoglobin levels, which were above the upper limit of normality in the patients with EPI. Treatment with a proton pump inhibitor was received by 34.4% of the patients with hypomagnesemia. Glucose levels were higher and cholesterol levels were lower in patients with versus without EPI, although statistical significance was not reached ( $p = 0.06$  for both variables). Only 12 patients required surgery (resection of pancreas or digestive tract surgery), and they showed no statistically significant difference with the EPI group. No patient in the study was diagnosed with hemochromatosis or celiac disease.

**Table 2.** Analytical parameters in the study population, group with EPI, and group without EPI.

	Normal	Total	Patients with EPI	Patients without EPI	<i>p</i> -Value
<i>N</i>		50	30	20	
Glucose (mg/dL)	75–115	116.98 ( $\pm$ 51.6)	127.23	104.65	0.06
HbA1C (%)	3–6	6.59 ( $\pm$ 1.6)	7.16	5.9	0.007 <sup>a</sup>
Total proteins (mg/dL)	6.6–8.3	7.19 ( $\pm$ 0.5)	7.16	5.9	0.471
Albumin (g/dL)	3.5–5.2	4.19 ( $\pm$ 0.4)	4.21	4.28	0.568
Prealbumin (mg/dL)	20–40	25.29 ( $\pm$ 6.4)	23.64	27.94	0.005 <sup>a</sup>
Somatomedin C ( $\mu$ g/L)	81–225	161.08 ( $\pm$ 77.2)	143.12	177.37	0.113
Cholesterol (mg/dL)	140–200	191.57 ( $\pm$ 47.5)	181.41	199.45	0.06
Triglycerides (mg/dL)	89–150	138.69 ( $\pm$ 73.8)	134.8	162.06	0.846
Vitamin D (ng/dL)	20–100	16.49 ( $\pm$ 8.9)	14.41	19.53	0.097
Magnesium (mg/dL)	1.8–2.6	1.93 ( $\pm$ 0.21)	1.87	1.98	0.03 <sup>a</sup>
Hemoglobin (g/dL)	12–17.2	14.57 ( $\pm$ 1.85)	14.56	14.96	0.649
Ferritin (ng/mL)	20–250	142 ( $\pm$ 48.12)	136.14	171.68	0.915
Transferrin (mg/dL)	10–360	284.28 ( $\pm$ 63.6)	284.86	290.84	0.562
Absolute lymphocytes	1100–4500	2170.8 ( $\pm$ 720)	2340	2375	0.762
Fecal elastase-1 ( $\mu$ g/g)	>200	180 ( $\pm$ 185.5)	42.9	386	0.000 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ . Data are reported as mean (standard deviation) with the exception of fecal elastase-1 data, for which mean values alone are given. EPI: exocrine pancreatic insufficiency; HbA1C: hemoglobin A1c.

Table 3 exhibits other complications of CP observed in the study population. The most frequent was the presence of pseudocysts (50%), followed by chronic abdominal pain (46%), biliary stenosis (26%), and pancreatitis exacerbation (20%).

**Table 3.** Complications of chronic pancreatitis.

	Total	Patients with EPI	Patients without EPI	<i>p</i> -Value
<i>N</i>	50	30 (60%)	20 (40%)	
CP complications				0.137
Patients without complications	10 (20%)	6 (20%)	4 (20%)	
Patients with complications	40 (80%)	24 (80%)	16 (80%)	
Type of complication				
Cardiovascular events	4 (8%)	2 (6.7%)	2 (10%)	0.528
Chronic abdominal pain	23 (46%)	15 (50%)	8 (40%)	0.487
Pseudocyst	25 (50%)	15 (50%)	10 (50%)	0.507
Abscess	2 (4%)	1 (3.3%)	1 (5%)	0.623
Biliary stenosis	13 (26%)	10 (33%)	3 (15%)	0.249
Duodenal stenosis	1 (2%)	0 (0%)	1 (5%)	0.379
Splenoportal axis thrombosis	3 (6%)	3 (10%)	0 (0%)	0.268
Acute cholangitis	1 (1%)	1 (3.3%)	0 (0%)	0.619
Pancreatitis exacerbation	10 (20%)	4 (13.3%)	6 (30%)	0.163

EPI: exocrine pancreatic insufficiency.

#### Comparison of Patients with EPI on PERT VS. not on PERT

Results were compared between the patients with EPI who were on pancreatic enzyme replacement therapy (PERT) and those who were not. The only statistically significant between-group difference was the higher frequency of diabetes mellitus (DM) in those on PERT (Table 4).

**Table 4.** Patient characteristics in patients with EPI on PERT and those not on PERT.

	Total patients with EPI	Patients with EPI on PERT	Patients with EPI not on PERT	<i>p</i> -Value
<i>N</i>	30 (60%)	21 (70%)	9 (30%)	
Mean age	55.77	54.81	58	0.428
Gender				1.000
Male	28 (93.3%)	19 (90.5%)	9 (100%)	
Female	2 (6.7%)	2 (9.5%)	0 (0%)	
Caucasian	30 (100%)	21 (100%)	9 (100%)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )				0.124
Overweight (>25)	9 (30%)	4 (19%)	5 (55.6%)	

Normal weight	20 (66.7%)	16 (76.2%)	4 (44.4%)	
Underweight (<18)	1 (3.3%)	1 (4.8%)	0 (0%)	
Diabetes mellitus	18 (60%)	15 (71.4%)	3 (33.3%)	0.050 <sup>a</sup>
Type 1-2	10 (55.6%)	7 (46.7%)	3 (100%)	
Type 3c	8 (44.4%)	8 (53.3%)	0 (0%)	
>12 y. since diagnosis	7 (23.3%)	7 (100%)	0 (0%)	0.071
Diagnostic test				0.458
EUS	19 (63.3%)	12 (57.1)	7 (77.8%)	
CT	6 (20%)	4 (19%)	2 (22.2%)	
Ultrasound	3 (10%)	3 (14.3%)	0 (0%)	
Pathology report	2 (6.7%)	2 (9.5%)	0 (0%)	
CP etiology				0.583
Toxic	22 (73.3%)	14 (66.7%)	8 (88.9%)	
Idiopathic	5 (16.7%)	4 (19%)	1 (11.1%)	
Autoimmune	2 (6.7%)	2 (9.5%)	0 (0%)	
Pancreas divisum	1 (3.3%)	1 (4.8%)	0 (0%)	
Alcohol habit				0.918
Drinker (SDU)	23 (77%) (6.6)	15 (71.4%) (6.7)	8 (88.9%) (6.6)	
Smoking habit				0.716
Smoker (cigarette/day)	19 (63%) (20.1)	13 (61.9%) (20.6)	6 (66.7%) (20.0)	
Surgical treatment	10 (20%)	9 (42.9%)	1 (11.1%)	0.204

EPI: exocrine pancreatic insufficiency; PERT: pancreatic enzyme replacement therapy; BMI: body mass index; EUS: endoscopic ultrasonography; CT: computed tomography; SDU: standard drink unit. <sup>a</sup>  $p < 0.05$ .

Comparisons of nutritional status between the patients with EPI on PERT and those not on PERT revealed that glucose and HbA1C values were significantly higher and prealbumin and vitamin D were significantly lower in the group on PERT (Table 5)

**Table 5.** Analytical parameters in patients with EPI on PERT and those not on PERT.

	Normal	Total Patients with EPI	Patients with EPI on PERT	Patients with EPI not on PERT	<i>p</i> -Value
N		30	21	9	
Glucose (mg/dL)	75-115	127.23 (±58.3)	138.57	100.78	0.037 <sup>a</sup>
HbA1C (%)	3-6	7.16 (±1.8)	7.61	6.01	0.027 <sup>a</sup>
Total proteins (mg/dL)	6.6-8.3	7.16 (±0.5)	7.15	7.17	0.928

Albumin (g/dL)	3.5–5.2	4.21 (±0.4)	4.19	4.27	0.776
Prealbumin (mg/dL)	20–40	23.64 (±6.8)	21.15	28.18	0.010 <sup>a</sup>
Somatomedin C (µg/L)	81–225	143.12 (±65.6)	141.17	147.5	0.802
Cholesterol (mg/dL)	140–200	181.41 (±50.8)	178.5	187.22	0.758
Triglycerides (mg/dL)	89–150	134.8 (±66.7)	129.28	149	0.628
Vitamin D (ng/dL)	20–100	14.41 (±6.1)	12.78	17.83	0.019 <sup>a</sup>
Magnesium (mg/dL)	1.8–2.6	1.87 (±0.2)	1.86	1.91	0.556
Hemoglobin (g/dL)	12–17.2	14.56 (±2.1)	14.21	15.38	0.213
Ferritin (ng/mL)	20–250	136.14 (±301)	166.61	303.23	0.483
Transferrin (mg/dL)	10–360	284.86 (±57.9)	281.7	291.89	0.555
Absolute lymphocytes	1100–4500	2340 (±711)	2308.1	2413.33	0.700
Fecal elastase-1 (µg/g)	>200	42.9 (±12.5)	32.38	74.11	0.132

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ . Data are reported as mean (standard deviation) with the exception of fecal elastase-1 data, for which mean values alone are given. EPI: exocrine pancreatic insufficiency; PERT: pancreatic enzyme replacement therapy.

No statistically significant differences in CP complications were found between the patients with EPI who were on PERT and those who were not, as shown in Table 6.

**Table 6.** Complications of chronic pancreatitis in patients with EPI on PERT and not on PERT.

	Total patients with EPI	Patients with EPI on PERT	Patients with EPI not on PERT	<i>p</i> -Value
<i>N</i>	30 (60%)	21 (70%)	9 (30%)	
CP complications				
Patients without complications	6 (20%)	4 (19%)	2 (22.2%)	0.509
Patients with complications	24 (80%)	17 (81%)	7 (77.8%)	
Type of complication				
Cardiovascular events	2 (6.7%)	2 (9.5%)	0 (0%)	0.506
Chronic abdominal pain	15 (50%)	13 (61.9%)	2 (22.2%)	0.109
Pseudocyst	15 (50%)	12 (57.1%)	3 (33.3%)	0.405
Abscess	1 (3.3%)	1 (4.8%)	0 (0%)	1.000
Biliary stenosis	10 (33%)	8 (38.1%)	2 (22.2%)	1.000
Duodenal stenosis	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Splenoportal axis thrombosis	3 (10%)	2 (9.5%)	1 (11.1%)	1.000
Acute cholangitis	1 (3.3%)	0 (0%)	1 (11.1%)	1.000



Pancreatitis exacerbation	4 (13.3%)	3 (14.3%)	1 (11.1%)	1.000
---------------------------	-----------	-----------	-----------	-------

EPI: exocrine pancreatic insufficiency; PERT: pancreatic enzyme replacement therapy.

### Comparison of Patients with Mild/Moderate vs. Severe EPI

Patients were divided between those with mild/moderate EPI and those with severe EPI. The frequency of DM was significantly higher in the severe group, which also had a significantly higher proportion of patients on PERT. No statistically significant differences were observed in the other variables analyzed (Table 7).

**Table 7.** Patient characteristics of patients with mild/moderate versus severe EPI. (*n* = 30).

	Total patients with EPI	Patients with mild/moderate EPI	Patients with severe EPI	<i>p</i> -Value
<i>N</i>	30 (60%)	5 (16.7%)	25 (83.3%)	
Mean age	55.77	60.8	54.76	0.373
Gender				1.000
Male	28 (93.3%)	5 (100%)	23 (92%)	
Female	2 (6.7%)	0 (0%)	2 (8%)	
Caucasian	30 (100%)	5 (100%)	25 (100%)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )				0.803
Overweight (>25)	9 (30%)	2 (40%)	7 (28%)	
Normal weight	20 (66.7%)	3 (60%)	17 (68%)	
Underweight (<18)	1 (3.3%)	0 (0%)	1 (4%)	
Diabetes mellitus	18 (60%)	0 (0%)	18 (72%)	0.006 <sup>a</sup>
Type 1–2	10 (55.6%)		10 (55.6%)	
Type 3c	8 (44.4%)		8 (44.4%)	
>12 years since diagnosis	7 (23.3%)	0 (0%)	7 (28%)	0.304
Diagnostic test				0.324
EUS	19 (63.3%)	5 (100%)	14 (73.7%)	
CT	6 (20%)	0 (0%)	6 (24%)	
Ultrasound	3 (10%)	0 (0%)	3 (12%)	
Pathology report	2 (6.7%)	0 (0%)	2 (8%)	
CP etiology				0.879
Toxic	22 (73.3%)	4 (80%)	18 (72%)	
Idiopathic	5 (16.7%)	1 (20%)	4 (16%)	

Autoimmune	2 (6.7%)	0 (0%)	2 (8%)	
Pancreas divisum	1 (3.3%)	0 (0%)	1 (4%)	
Alcohol habit				0.347
Drinker (SDU)	23 (76%) (6.6)	4 (80%) (8.8)	19 (76%) (6.2)	
Smoking habit				0.372
Smoker (cigarette/day)	19 (63%) (20.1)	3 (60%) (15.0)	16 (64%) (21.0)	
PERT	21 (70%)	2 (40%)	19 (76%)	0.143
Surgical treatment	10 (20%)	3 (60%)	7 (28%)	0.300

EPI: exocrine pancreatic insufficiency; BMI: body mass index; EUS: endoscopic ultrasonography; CT: computed tomography; SDU: standard drink unit; PERT: pancreatic enzyme replacement therapy. <sup>a</sup>  $p < 0.05$ .

Compared to the patients with mild/moderate EPI, glucose and HbA1C values were significantly higher and FE-1 values were significantly lower in those with severe disease. No other statistically significant between-group differences were observed (Table 8).

**Table 8.** Analytical parameters in patients with mild/moderate versus severe EPI. ( $n = 30$ ).

	Normal	Total Patients with EPI	Patients with Mild/Moderate EPI	Patients with Severe EPI	<i>p</i> value
<i>n</i>		30	5	25	
Glucose (mg/dL)	75–115	127.23 ( $\pm$ 58.3)	89.6	134.76	0.018 <sup>a</sup>
HbA1C (%)	3–6	7.16 ( $\pm$ 1.8)	5.5	7.58	0.009 <sup>a</sup>
Total proteins (mg/dL)	6.6–8.3	7.16 ( $\pm$ 0.5)	7.48	7.09	0.264
Albumin (g/dL)	3.5–5.2	4.21 ( $\pm$ 0.4)	4.26	4.2	0.907
Prealbumin (mg/dL)	20–40	23.64 ( $\pm$ 6.8)	26.03	22.98	0.325
Somatomedin C ( $\mu$ g/L)	81–225	143.12 ( $\pm$ 65.6)	150.6	141.33	0.845
Cholesterol (mg/dL)	140–200	181.41 ( $\pm$ 50.8)	172	183.55	0.827
Triglycerides (mg/dL)	89–150	134.8 ( $\pm$ 66.7)	111.2	140.7	0.684
Vitamin D (ng/dL)	20–100	14.41 ( $\pm$ 6.1)	17.56	13.72	0.126
Magnesium (mg/dL)	1.8–2.6	1.87 ( $\pm$ 0.2)	1.94	1.86	0.388
Hemoglobin (g/dL)	12–17.2	14.56 ( $\pm$ 2.1)	14.64	14.54	0.956
Ferritin (ng/mL)	20–250	136.14 ( $\pm$ 301)	440.46	161.02	0.487
Transferrin (mg/dL)	10–360	284.86 ( $\pm$ 57.9)	270.4	287.88	0.751
Absolute lymphocytes	1100–4500	2340 ( $\pm$ 711)	2024	2402.76	0.420
Fecal elastase-1 ( $\mu$ g/g)	>200	42.9 ( $\pm$ 12.5)	157.4	20	0.001 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ . Data are reported as mean (standard deviation) with the exception of fecal elastase-1 data, for which mean values alone are given. EPI: exocrine pancreatic insufficiency.

Shown in Table 9, no statistically significant difference was found between patients with mild/moderate and severe EPI, except for a significantly higher frequency of pseudocysts in those with severe EPI.

**Table 9.** Complications of chronic pancreatitis in patients with mild/moderate and severe EPI. ( $n = 30$ ).

	Total patients with EPI	Patients with Mild/Moderate EPI	Patients with Severe EPI	<i>p</i> -Value
<i>N</i>	30 (60%)	5 (16.7%)	25 (83.3%)	
CP complications				0.583
Patients without complications	6 (20%)	1 (20%)	5 (20%)	
Patients with complications	24 (80%)	4 (80%)	20 (80%)	
Type of complication				
Cardiovascular events	2 (6.7%)	0 (0%)	2 (8%)	0.138
Chronic abdominal pain	15 (50%)	3 (60%)	12 (48%)	1.000
Pseudocyst	15 (50%)	2 (40%)	13 (52%)	0.039 <sup>a</sup>
Abscess	1 (3.3%)	0 (0%)	1 (4%)	1.000
Biliary stenosis	10 (33%)	2 (40%)	8 (32%)	1.000
Duodenal stenosis	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Splenoportal axis thrombosis	3 (10%)	2 (40%)	1 (4%)	0.108
Acute cholangitis	1 (3.3%)	1 (20%)	0 (0%)	1.000
Pancreatitis exacerbation	4 (13.3%)	2 (40%)	2 (8%)	1.000

EPI: exocrine pancreatic insufficiency. <sup>a</sup>  $p < 0.05$ .

## Discussion

The first cause of EPI in adults is the presence of CP, followed by cystic fibrosis and pancreatic surgery [3]. During this study of patients with CP under follow-up at our hospital, we used FE-1 as diagnostic test for EPI because it is non-invasive, easily applied, economic, and offers a high positive predictive value in advanced stages. However, the main limitations of this test are its low sensitivity at earlier stages of EPI and its false positive rate, which may be influenced by the soft consistency of feces or the presence of small intestine disease. The likelihood of false positives was reduced in our study by excluding fecal samples that were not solid [1,5].

An EPI prevalence of 60% was found, similar to the prevalence of 64.1% reported in the “PANCR-EVOL” multi-center study of Spanish patients with CP [11]. During the

present investigation, 83.3% of the patients with EPI had FE-1 levels <100 µg/g, indicating an advanced stage of the disease. Similarly, a study of Chilean patients with CP found a comparable prevalence (66.9%) [12], whereas another study in Spain reported a lower prevalence of 38.8% [13].

During the present study, 18% of the patients diagnosed with EPI were not under treatment for this complication and were immediately started on treatment with PERT. Conversely, and similar to the findings of the PANCR-EVOL study [11], PERT was being received by 35% of the patients without EPI. These data underscore the need for an accurate diagnosis of EPI in patients with CP, given the increased morbidity and mortality risk if adequate treatment is not applied [14].

It has previously been reported that most patients with CP had EPI after a median of 12 years post-diagnosis [2]; hence, we set this value as the cutoff point to analyze the differences between groups with and without EPI after this time. Although there was a higher percentage of patients with a CP history of >12 years in the group with versus without EPI, the difference did not reach statistical significance. However, other studies report the development of EPI after a shorter history of CP [15].

During the present study, only 23.3% of the patients with EPI had never been drinkers and only 36.7% had never been smokers. The consumption of tobacco and alcohol is considered to be a prime cause of CP [16], and the synergetic effects of these substances have been found to produce major stress in the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells, inducing their death [17]. There was a trend in our sample toward a higher proportion of alcohol drinkers in the group with versus without EPI ( $p = 0.051$ ).

The presence of EPI is associated with a poor absorption of macronutrients and micronutrients, making these patients especially prone to malnutrition. Nutritional markers related to CP include fat-soluble vitamins, vitamin B12, zinc, magnesium, calcium, and folic acid [1], and it has been proposed that their combination may assist in the diagnosis of EPI [2]. We used the most frequent analytical and anthropometric parameters to assess the nutritional status of patients.

During our study, we observed no significant association between BMI and the presence of EPI, although the majority of the patients without EPI were overweight, while the majority of those with EPI were normal weight, and it was previously reported that patients with CP are more frequently normal or overweight than underweight [18]. However, it should be borne in mind that BMI provides a limited evaluation of body composition [19], and some of our patients with “normal” weight showed signs of protein malnutrition, with a major loss of muscle mass (sarcopenia) [20].

Compared to the patients without EPI, those with EPI evidenced significantly higher levels of glycosylated hemoglobin. Significantly lower levels of prealbumin and

magnesium were observed in those with EPI, indicating a possible malabsorption of macronutrients (proteins) and micronutrients (trace elements) in these patients. Mean magnesium levels in the group without EPI were 2.001 mg/dL, very similar to those obtained in the study by Lindkvist et al., (2.09 mg/dL) [2].

Vitamin D was selected from among the fat-soluble vitamins because it is routinely analyzed in primary care and hospital centers as a known marker of malnutrition. Additionally, coagulation levels serve as an indirect marker of vitamin K and were normal in all study participants. We found no statistically significant differences between the groups regarding vitamin D, or in albumin, somatomedin C, triglycerides, hemoglobin, ferritin, transferrin, or lymphocytes. However, there was a trend toward lower cholesterol levels and higher glucose levels in the patients with versus without EPI, suggesting that a significant difference might emerge with a larger sample size. Hirano et al., (2014) divided patients with CP between those with and without type 3c DM and observed significantly lower total cholesterol levels in the former group (164 mg/dL versus 183 mg/dL, respectively,  $p = 0.0028$ ) [21]. Seen in our sample, the frequency of DM was higher in the group with EPI, although statistical significance was not reached. As expected in patients with CP, which is associated with massive islet destruction, the most frequent type of DM was 3c [22]. Additionally, the presence of DM of any type in our study was higher in the group with EPI, although the difference was not statistically significant (60% in patients with EPI versus 35% in those without,  $p = 0.083$ ). However, as noted above, glycosylated hemoglobin levels were significantly higher in the group with EPI ( $p = 0.007$ ). These data indicate that exocrine and endocrine pancreatic insufficiency develops in parallel.

The prevalence of DM was higher in our study (50%) than in multi-center studies with a larger sample size, such as that by Schwarzenberg et al., (30%), which also found a significant difference in DM prevalence between children and adults, explained by the time taken for the disease to develop and the role of tobacco and alcohol in its etiology [23]. The higher prevalence in our investigation may be due in part to a greater motivation to participate in the study among patients with CP and functional loss (EPI or DM) than among patients with PC who are asymptomatic and have no signs of malnutrition or DM development, who would be less aware of their disease.

Seen in our study population, the most frequent complications of CP were the presence of pseudocysts (50%), chronic pain (46%), biliary stenosis (26%), and pancreatitis exacerbation (20%), as also observed in the PANCR-EVOL study [11], although the rate of these complications was higher in the present population.

Compared to the patients with EPI who were not on PERT, the frequency of DM was significantly higher in those undergoing this therapy, whose glycemic control was worse

(higher glycemia and HbA1C values), and their magnesium and prealbumin levels were significantly lower. These findings can be attributed to a positive association between the development of EPI and that of DM, which is corroborated by the higher frequency of DM in the group of patients with severe EPI. Concerning this, Hardt et al., proposed that DM is not a direct cause of EPI but rather a consequence of the CP that also produced EPI, through the destruction of both exocrine and endocrine pancreatic tissue [24]. These data support the idea that the pancreas functions as a whole, and that exocrine and endocrine disorders inevitably have repercussions on each other [25].

Finally, in comparison to patients with mild/moderate EPI, the frequencies of diabetes mellitus and pseudocyst-related complications were significantly higher in those with severe EPI, whose FE-1 levels were significantly lower, as expected. These findings suggest that the clinical management of this type of patient should include a close follow-up protocol to facilitate early diagnosis and treatment and to avoid the development of associated complications.

## **Conclusions**

This study contributes evidence on the prevalence of EPI and DM in patients with CP. Analysis of their nutritional status revealed altered nutritional variables in the patients, which may be useful information for their clinical management. We also report on differences between patients with EPI who were undergoing PERT and those who were not, and between patients with mild/moderate EPI and those with severe EPI. A finding of interest was the higher frequency of DM observed in the patients who were undergoing PERT. The main limitation was the relatively small sample size, as in many studies on this issue, although it was sufficient for statistically significant differences to be detected. Additionally, there were major disparities in sample size for the comparisons as a function of PERT and EPI severity. Further research in wider samples and external validation studies are needed to determine the clinical relevance of these results.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.L.M-R. and O.C.; methodology, J.M-G., C.T. and A.R.G-R.; formal analysis, C.D-C., C.J-L. and A.R.G-R.; investigation, C.J-L.; data curation, C.D-C. and J.L.M-R.; writing—original draft preparation, C.D-C. and C.J-L.; writing—review and editing, O.C.; supervision, J.M-G.; project administration, J.P.; funding acquisition, J.M-G. and O.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by JUNTA DE ANDALUCIA, grants number PC-0549-2017 and PC-0498-2017.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Afghani, E.; Sinha, A.; Singh, V.K. An Overview of the Diagnosis and Management of Nutrition in Chronic Pancreatitis. *Nutr. Clin. Pr.* **2014**, *29*, 295–311, doi:10.1177/0884533614529996.
2. Lindkvist, B.; Domínguez-Muñoz, J.; Luaces-Regueira, M.; Castiñeiras-Alvariño, M.; Nieto-García, L.; Garcia, D.D.L.I. Serum nutritional markers for prediction of pancreatic exocrine insufficiency in chronic pancreatitis. *Pancreatol.* **2012**, *12*, 305–310, doi:10.1016/j.pan.2012.04.006.
3. Martínez, J.; Abad-González, Á.; Aparicio, J.R.; Aparisi, L.; Boadas, J.; Boix, E.; de las Heras, G.; Domínguez-Muñoz, E.; Farré, A.; Fernández-Cruz, L.; et al. The Spanish Pancreatic Club Recommendations for the Diagnosis and Treatment of Chronic Pancreatitis: Part 1 (Diagnosis). *Pancreatol.* **2013**, *13*, 8–17. doi:10.1016/j.pan.2012.11.309.
4. Garcia, D.D.L.I.; Vallejo-Senra, N.; Garcia, D.D.L.I.; López-López, A.; Nieto, L.; Domínguez-Muñoz, J.E. Increased Risk of Mortality Associated With Pancreatic Exocrine Insufficiency in Patients With Chronic Pancreatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* **2018**, *52*, e63–e72, doi:10.1097/mcg.0000000000000917.
5. Nierop, J.E.W.-V.; Lochtenberg-Potjes, C.M.; Wierdsma, N.J.; Scheffer, H.J.; Kazemier, G.; Ottens-Oussoren, K.; Meijerink, M.R.; De Van Der Schueren, M.A.E. Assessment of Nutritional Status, Digestion and Absorption, and Quality of Life in Patients with Locally Advanced Pancreatic Cancer. *Gastroenterol. Res. Pr.* **2017**, *2017*, 1–7, doi:10.1155/2017/6193765.
6. Ramsey, M.L.; Conwell, D.L.; Hart, P.A. Complications of Chronic Pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* **2017**, *62*, 1745–1750, doi:10.1007/s10620-017-4518-x.
7. Pezzilli, R.; Andriulli, A.; Bassi, C.; Balzano, G.; Cantore, M.; Fave, G.D.; Falconi, M.; Frulloni, L. Exocrine pancreatic insufficiency in adults: A shared position statement of the Italian association for the study of the pancreas. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 7930–7946, doi:10.3748/wjg.v19.i44.7930.
8. Chowdhury, R.S.; E Forsmark, C. Review article: Pancreatic function testing. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2003**, *17*, 733–750.

9. Anaizi, A.; Hart, P.A.; Conwell, D.L. Diagnosing Chronic Pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* **2017**, *62*, 1713–1720, doi:10.1007/s10620-017-4493-2.
10. Catalano, M.F.; Sahai, A.; Levy, M.; Romagnuolo, J.; Wiersema, M.; Brugge, W.; Freeman, M.; Yamao, K.; Canto, M.; Hernandez, L.V. EUS-based criteria for the diagnosis of chronic pancreatitis: the Rosemont classification. *Gastrointest. Endosc.* **2009**, *69*, 1251–1261, doi:10.1016/j.gie.2008.07.043.
11. Marra-Lopez Valenciano, C.; Bolado Concejo, F.; Marín Serrano, E.; Millastre Bocos, J.; Martínez-Moneo, E.; Pérez Rodríguez, E.; Francisco González, M.; Del Pozo-García, A.; Hernández Martín, A.; Labrador Barba, E.; et al. Prevalence of exocrine pancreatic insufficiency in patients with chronic pancreatitis without follow-up. PANCR-EVOL Study. *Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *41*, 77–86. doi:10.1016/j.gastrohep.2017.08.002
12. Berger, F.Z.; Mancilla, A.C. Chronic pancreatitis: Retrospective review of 121 cases. *Rev. Med. Chil.* **2016**, *144*, 1544–1552. doi:10.4067/S0034-98872016001200005
13. Domínguez-Muñoz, J.; Villarín, A.J.L.; Álvarez, L.F.C.; Tenías, J.M.; García, J.I. Spanish multicenter study to estimate the incidence of chronic pancreatitis. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* **2016**, *108*, 411–416, doi:10.17235/reed.2016.4056/2015.
14. Löhr, J.-M.; Dominguez-Munoz, E.; Rosendahl, J.; Besselink, M.; Mayerle, J.; Lerch, M.M.; Haas, S.; Akisik, F.; Kartalis, N.; Iglesias-Garcia, J.; et al. United European Gastroenterology evidence-based guidelines for the diagnosis and therapy of chronic pancreatitis (HaPanEU). *United Eur. Gastroenterol. J.* **2017**, *5*, 153–199, doi:10.1177/2050640616684695.
15. Hammer, H.F. Pancreatic Exocrine Insufficiency: Diagnostic Evaluation and Replacement Therapy with Pancreatic Enzymes. *Dig. Dis.* **2010**, *28*, 339–343, doi:10.1159/000319411.
16. Madro, A.; Ciesielka, M.; Celiński, K.; Slomka, M.; Czechowska, G.; Kurzepa, J.; Kaszelan-Szczerbinska, B.; Buszewicz, G.; Madro, R. The Genetic Predisposition and Its Impact on the Diabetes Mellitus Development in Patients with Alcoholic Chronic Pancreatitis. *Gastroenterol. Res. Pr.* **2015**, *2015*, 309156–5, doi:10.1155/2015/309156.
17. Sahin-Tóth, M.; Németh, B.C. Smoking and Drinking Synergize in Pancreatitis: Multiple Hits on Multiple Targets. *Gastroenterol.* **2017**, *153*, 1479–1481, doi:10.1053/j.gastro.2017.10.031.
18. Duggan, S.N.; Smyth, N.D.; O’Sullivan, M.; Feehan, S.; Ridgway, P.F.; Conlon, K.C. The Prevalence of Malnutrition and Fat-Soluble Vitamin Deficiencies in Chronic Pancreatitis. *Nutr. Clin. Pr.* **2014**, *29*, 348–354, doi:10.1177/0884533614528361.



19. O'Brien, S.; Omer, E. Chronic Pancreatitis and Nutrition Therapy. *Nutr. Clin. Pr.* **2019**, *34*, S13–S26, doi:10.1002/ncp.10379.
20. Shintakuya, R.; Uemura, K.; Murakami, Y.; Kondo, N.; Nakagawa, N.; Urabe, K.; Okano, K.; Awai, K.; Higaki, T.; Sueda, T. Sarcopenia is closely associated with pancreatic exocrine insufficiency in patients with pancreatic disease. *Pancreatol.* **2017**, *17*, 70–75, doi:10.1016/j.pan.2016.10.005.
21. Hirano, K.; Saito, T.; Mizuno, S.; Tada, M.; Sasahira, N.; Isayama, H.; Matsukawa, M.; Umefune, G.; Akiyama, D.; Saito, K.; et al. Total Cholesterol Level for Assessing Pancreatic Insufficiency Due to Chronic Pancreatitis. *Gut Liver* **2014**, *8*, 563–568, doi:10.5009/gnl13366.
22. Afghani, E.; Sinha, A.; Singh, V.K. Diagnosis and treatment of diabetes mellitus in chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol* **2013**, *19*, 7276–7281. doi:10.3748/wjg.v19.i42.7276
23. Schwarzenberg, S.J.; Uc, A.; Zimmerman, B.; Wilschanski, M.; Wilcox, C.M.; Whitcomb, D.C.; Werlin, S.L.; Troendle, D.; Tang, G.; Slivka, A.; Singh, V.K.; et al. Chronic pancreatitis: Pediatric and Adult Cohorts Show Similarities in Disease Progress Despite Different Risk Factors. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2019**, *68*, 566–573. doi:10.1097/MPG.0000000000002279
24. Hardt, P.D.; Hauenschild, A.; Nalop, J.; Marzeion, A.M.; Jaeger, C.; Teichmann, J.; Bretzel, R.G.; Hollenhorst, M.; Kloer, H.U. High prevalence of exocrine pancreatic insufficiency in diabetes mellitus. *Pancreatol.* **2003**, *3*, 395–402, doi:10.1159/000073655.
25. Mayerle, J.; Kalthoff, H.; Reszka, R.; Kamlage, B.; Peter, E.; Schniewind, B.; Maldonado, S.G.; Pilarsky, C.; Heidecke, C.-D.; Schatz, P.; et al. Metabolic biomarker signature to differentiate pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *Gut* **2017**, *67*, 128–137, doi:10.1136/gutjnl-2016-312432.



# **Publicación 3**



## **Novel Biomarkers to Distinguish between Type 3c and Type 2 Diabetes Mellitus by Untargeted Metabolomics**

**Cristina Jimenez-Luna <sup>1</sup>, Ariadna Martin-Blazquez <sup>2</sup>, Carmelo Dieguez-Castillo <sup>3</sup>, Caridad Diaz <sup>2</sup>, Jose Luis Martin-Ruiz <sup>3</sup>, Olga Genilloud <sup>2</sup>, Francisca Vicente <sup>2</sup>, Jose Perez del Palacio <sup>2</sup>, Jose Prados <sup>1</sup> and Octavio Caba <sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), Center of Biomedical Research (CIBM), University of Granada, Granada 18012, Spain

<sup>2</sup> Fundación MEDINA, Centro de Excelencia para la Investigación en Medicamentos Innovadores en Andalucía, Granada 18012, Spain

<sup>3</sup> Department of Gastroenterology, San Cecilio University Hospital, Granada 18012, Spain

**Metabolites 2020 Oct 22; 10 (11): E423.**

## **Abstract**

Pancreatogenic diabetes mellitus (T3cDM) is a highly frequent complication of pancreatic disease, especially chronic pancreatitis, and it is often misdiagnosed as type 2 diabetes mellitus (T2DM). A correct diagnosis allows the appropriate treatment of these patients, improving their quality of life, and various technologies have been employed over recent years to search for specific biomarkers of each disease. The main aim of this metabolomic project was to find differential metabolites between T3cDM and T2DM. Reverse-phase liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry was performed in serum samples from patients with T3cDM and T2DM. Multivariate Principal Component and Partial Least Squares-Discriminant analyses were employed to evaluate between-group variations. Univariate and multivariate analyses were used to identify potential candidates and the area under the receiver-operating characteristic (ROC) curve was calculated to evaluate their diagnostic value. A panel of five differential metabolites obtained an area under the ROC curve of 0.946. In this study, we demonstrate the usefulness of untargeted metabolomics for the differential diagnosis between T3cDM and T2DM and propose a panel of five metabolites that appear altered in the comparison between patients with these diseases.

## **Keywords**

Metabolomics; untargeted LC-HRMS; diagnosis; pancreatogenic diabetes mellitus; type 2 diabetes mellitus; chronic pancreatitis; biomarker

## **Introduction**

Diabetes mellitus (DM) is characterized by the destruction or dysfunction of pancreatic  $\beta$ -cells, producing progressive hyperglycemia [1]. Because the mechanisms responsible for these changes likely differ between pancreatic disorders, it has been proposed that DM should be classified according to the underlying disorder [2]. Chronic pancreatitis (CP) is a pathological fibro-inflammatory syndrome accompanied by irreversible morphological changes, fibrosis, and impairment of both exocrine and endocrine functions of the pancreatic gland [3]. CP is frequently associated with pancreatogenic DM, recently designated as type 3c DM (T3cDM) [4].

It has been reported that around 30% of patients with CP develop T3cDM [5], which is often wrongly diagnosed as type 1 DM (T1DM) or especially type 2 DM (T2DM) [6]. In 2017, a study in the UK found that 559 of 31,789 adults newly diagnosed with DM had a history of pancreatic disease and that most of them (87.8%) were classified as T2DM [7]. The correct diagnosis of T3cDM and T2DM is important because they are both risk factors for pancreatic cancer (PC) [8,9] and because higher concentrations of hemoglobin A1c are observed in patients with T3cDM, who require insulin earlier in comparison to those with T2DM [10].

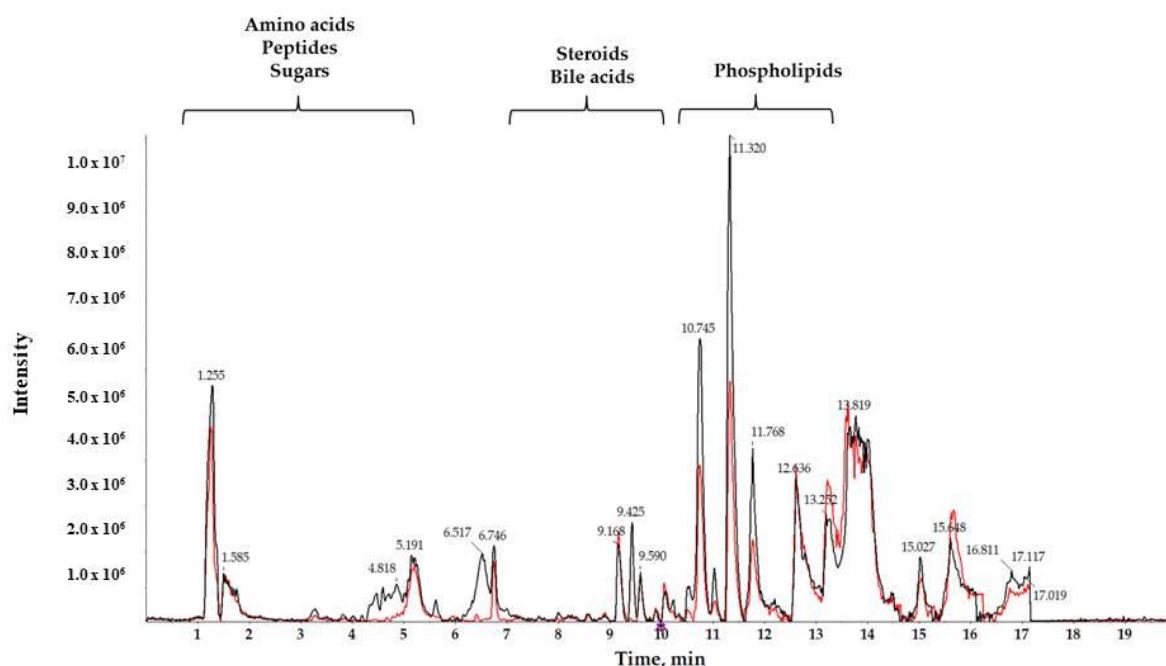
Metabolomics is an emerging and powerful discipline that provides an accurate and dynamic image of the phenotype of biological systems by studying endogenous and exogenous metabolites in cells, tissues, and biofluids. The aim of metabolic fingerprinting, through the non-targeted global analysis of tissues and biofluids, is to fingerprint and semiquantify metabolites and their changes, revealing information about the general metabolic state of the individual. Metabolomics analysis of human serum is highly useful, because serum is a rich source of potential biomarkers of the impairment of pathways in different disorders [11]. In this regard, liquid chromatography coupled to high resolution spectrometry (LC-HRMS) has become a reference analytical platform in the area of metabolomics due to its increased sensitivity and broad metabolic coverage [12,13]. This approach has been used to propose specific metabolite signatures for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and T2DM and even for the stratification of diabetic patients and complications [14–16].

The objective of this study was to use untargeted metabolomics to identify potential biomarkers of T3cDM and T2DM, performing reverse-phase liquid chromatography (RPLC) coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) in serum samples from patients.

## Results

## LC-HRMS Analysis

A reverse-phase column was used to separate compounds with medium and low polarity. Total ion chromatograms (TIC) of T3cDM and T2DM representative samples (Figure 1) showed different retention times (RTs) for medium-polar metabolites (eluting in the range from 7 to 15 min), for highly polar metabolites (showing RT in the first 5 min), and for non-polar metabolites (observed in the late RT). The RTs obtained show that the chromatographic separation was successful, and a noteworthy between-group change was observed from minutes 10.5 to 12, corresponding to the RT of the majority of lipids.

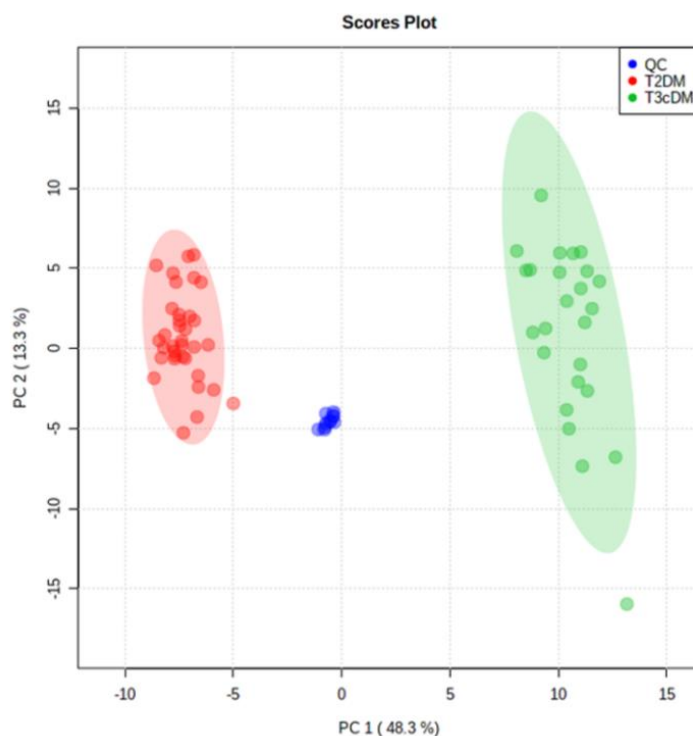


**Figure 1.** Characteristic liquid chromatography coupled to high resolution spectrometry (LC-HRMS) total ion chromatogram (TIC) of serum samples from T2DM (black) and T3cDM (red).

## Chemometric Analysis

Following alignment and filtering stages, 3998 metabolite features were retrieved from the raw data, comprising 866 monoisotopic peaks. From monoisotopic signals, 350 features were excluded for unacceptable variability ( $RSD > 30\%$ ); next, 279 features were differentially expressed between study samples (T3cDM and T2DM) and organic solvent (OS) samples and were rejected as contaminants. Therefore, 259 variables were considered in the principal component analysis (PCA). This multivariate analysis (Figure 2) displayed a tight grouping of QC samples, indicating that the differentiation between T3cDM and T2DM was mainly attributable to biological factors. Within this set of 259 variables, 26 met the criteria ( $p_v \leq 0.05$  and  $0.6 \leq FC \leq 1.5$ ) for selection as candidate biomarkers.





**Figure 2.** Principal component analysis score plot of TD2DM (red), T3cDM (green), and quality control (QC) samples (blue).

#### Identification of Potential Biomarkers

The accurate mass value of each selected feature was interrogated against compound databases (Metlin, NIST, LipidMaps and Human Metabolome Database). As a result, several molecular formulas were obtained with a mass error below 10 ppm. Each molecular formula was ranked according to experimental accurate mass and isotopic profile in order to assign a tentative identification for each potential biomarker (Table 1).

**Table 1.** Detailed information on the potential biomarkers to distinguish between T3cDM and T2DM.

<i>m/z</i>	RT	Adduct	MF	ppm	FDR	FC	AUC	Tentative Identification
188.0716	3.3	[M+H-NH3] <sup>+</sup>	C11H9NO2	-2	$7.86 \times 10^{-3}$	2.9319	0.93	L-Tryptophan
400.3408	9.9	[M+H] <sup>+</sup>	C23H45NO4	3	$2.75 \times 10^{-2}$	2.62	0.81	Palmitoylcarnitine
431.3140	11.85	[M+H] <sup>+</sup>	C27H42O4	4	$1.39 \times 10^{-2}$	3.5449	0.80	7-HOCA
526.2931	10.6	[M+H] <sup>+</sup>	C27H44NO7P	1	$7.86 \times 10^{-3}$	2.3703	0.71	LysoPE(22:6)
583.255	8.2	[M+H] <sup>+</sup>	C33H34N4O6	0	$2.75 \times 10^{-2}$	2.9319	0.82	Biliverdin

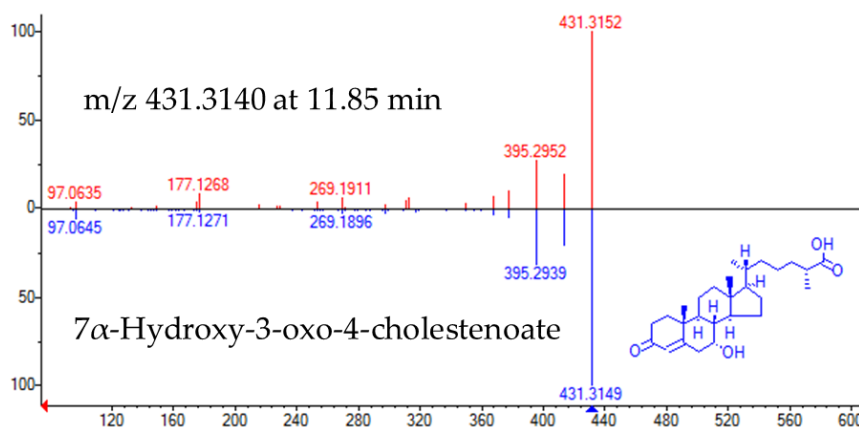
RT: Retention time in min; MF: Molecular formula; ppm: mass error in parts per million; FDR: false discovery rate; AUC: area under receiver-operating characteristic curves; FC: Fold (T2DM/T3cDM); 7-HOCA: 7 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid; LysoPE: lysophosphatidylethanolamine.

By this means, five compounds were identified in four classes of lipids (amino acids, carnitines, bile acids, lysophospholipids and bilirubins). Furthermore, interpretation of experimental fragmentation spectra and spectral database searches yielded the following structural identifications:

Identification of  $m/z$  188.0716 at 3.3 min was supported by a high matching rate between the experimental fragmentation spectrum and the spectrum stored in NIST14 DB corresponding to L-tryptophan (NIST#: 1075940 ID#: 146255).

For  $m/z$  400.3408 at 9.9 min, the experimental MS/MS spectrum was highly similar to that corresponding to palmitoylcarnitine in NIST14 DB (NIST#: 1152359 ID#: 30873).

The experimental fragmentation spectrum of feature  $m/z$  431.3140 at 11.85 min had a high matching rate with that corresponding to Cholest-4-en-26-oic acid, 7 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo (NIST#: 1,148,941 ID#: 27467) (Figure 3).



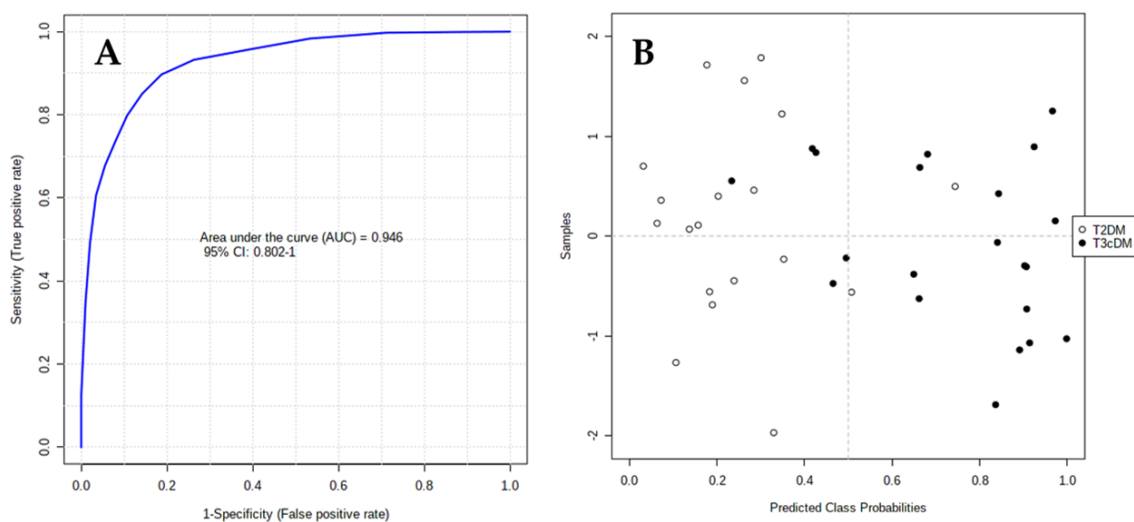
**Figure 3.** Head to tail representation of fragmentation spectra of  $m/z$  431.3140 in a biological sample (red trace) and NIST data base spectra for 7 $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-4-cholestenoate (pink trace).

Characteristic fragment ions of lysophosphatidylethanolamine compound class, such as  $[M+H-141] = 385$ , corresponding to the neutral loss of the phosphoethanolamine group from the molecular ion, were observed for  $m/z$  526.2931 at 10.6 min. Additionally, MS/MS interpretation of its corresponding  $[M+Na]^+$  adduct at  $m/z$  548.2721 provided several fragment ions, including:  $[M+Na-43]^+ = 505$  (loss of aziridine),  $[M+Na-163] = 385$  (loss of  $[(OH)_2PO_2(CH_2)_2PONH_2Na]$ ),  $[M+Na-141]^+ = 407$  (loss of  $[(OH)_3PO(CH_2)_2PONH_2]$ ) and  $[M+Na-61]^+ = 487$  (loss of  $[OH(CH_2)_2NH_2]$ ).

Identification of  $m/z$  583.25 at 8.2 min was further supported by a high matching rate between the experimental fragmentation spectrum and the spectrum stored in NIST14 DB corresponding to biliverdin (NIST#: 1219743 ID#: 98197).

Biomarker Evaluation

The area under the receiver-operating characteristic (ROC) curve (AUC) calculated for each candidate marker ranged from 0.71 to 0.93, indicating the moderate clinical utility of each individual biomarker. However, in complex diseases such as cancer or diabetes, the combination of different individual markers in a multivariate model frequently delivers the necessary discriminative power, as in the present case. The AUC for the final model was 0.946 (95% CI 0.802–1), indicating its robust discriminative ability and supporting the potential of these metabolites as biomarkers (Figure 4A). Based on this model, only 2 out of 19 samples labeled as T2DM were wrongly classified as T3cDM, whereas 5 out of 21 samples labeled as T3cDM were misclassified as T2DM (Figure 4B).



**Figure 4.** ROC curve plot for the final model obtained by multivariate combination of individual biomarkers: (A) ROC curve plot was created from the averaged results of 100 cross-validations. As an outcome from averaged cross-validations, it possible to predict the classification of each patient sample; (B) as a consequence of the balanced subsampling approach incorporated in the algorithm, the classification limit is  $x = 0.5$  (dotted line).

## Discussion

No standardized diagnostic criteria are currently available for T3cDM secondary to CP, hampering the differential diagnosis with other types of diabetes and leading to its frequent misdiagnosis as T2DM and an underestimation of its incidence [17]. The diagnosis of T3cDM requires the presence of exocrine pancreatic insufficiency (EPI), the absence of T1DM autoantibodies, and confirmation by pancreatic imaging findings [18]. Its misdiagnosis means that patients do not receive the appropriate therapy, which involves the treatment of EPI, the maintenance of adequate levels of fat-soluble vitamins (especially vitamin D), and the restoration of impaired fat hydrolysis [19]. Patients with T3cDM should undergo regular follow-ups with dietary assessment to prevent

hypoglycemia, reduce hyperglycemia, avoid malnutrition, treat EPI, and reduce the risk of diabetes-related complications [20].

In the present study, we describe various metabolites that differed between T3cDM and T2DM groups. One of these, LysoPE, results from the partial hydrolysis of phosphatidylethanolamine, which removes one of the fatty acid groups, and it is a minor constituent of cell membranes. LysoPE(22:6) was previously found to be altered in the serum metabolome of patients with early-stage ovarian cancer versus healthy controls, and it was included in a 16-metabolite diagnostic model that identified early-stage ovarian cancer with 100% accuracy [21]. Concentrations of this metabolite were also reported to be significantly higher in patients with liver cirrhosis who developed hepatocellular carcinoma than in those who did not [22]. Ha et al. used LC-HRMS in their metabolic study of patients with newly diagnosed T2DM versus sex- and BMI-matched non-diabetic controls and reported fold-change values of 2.04 for lysoPE(22:6), which achieved an AUC of 0.746 to evaluate the risk of developing T2DM with a sensitivity of 0.808 and specificity of 0.667 [23].

As in the present study, the essential amino acid tryptophan and metabolites of its pathway have been widely associated with T2DM. In 2011, a prospective study of 2422 individuals with a 12-year follow-up reported a positive association between baseline tryptophan concentrations and subsequent incident T2DM [24]. In 2016, a prospective study of 213 participants with a 10-year follow-up found greater insulin resistance in patients with higher tryptophan concentrations, which were significantly increased in those who developed T2DM [25]. Finally, in 2018, the authors of a case-cohort study ( $n = 694$ ) with a median follow-up of 3.8 years proposed baseline tryptophan levels as a risk marker for incident T2DM, with a hazard ratio of 1.29 [26].

Higher concentrations of palmitoylcarnitine were also observed in the present patients with T2DM, and this carnitine has been widely proposed as an early biomarker for this disease, even before the onset of insulin resistance. Alterations in serum acylcarnitine profiles were initially associated with worse glucose tolerance, mediated by mitochondrial dysregulation and incomplete long-chain fatty acid oxidation [27]. In a later population-based prospective study of 2103 individuals, with a mean follow-up of six years, palmitoylcarnitine was included in a panel of acylcarnitines that demonstrated an AUC of 0.89 for the prediction of incident T2DM [28]. Palmitoylcarnitine was also associated with T2DM in a study of 2519 patients with coronary artery disease with a median follow-up of 7.7 years, and a three-metabolite panel that also contained trimethyllysine and  $\gamma$ -butyrobetaine was proposed for predicting the long-term risk of T2DM, based on the susceptibility to this disease of patients with dysfunctional fatty acid metabolism [29]. An in-depth study of the mechanism underlying this relationship

described palmitoylcarnitine as a useful biomarker of excessive fatty acid oxidation, which leads to tissue lipid accumulation and ultimately insulin resistance, finding elevated concentrations of this metabolite in patients with T2DM during the insulin clamp at fasting [30]. Finally, a recent meta-analysis of 46 prospective metabolomic studies on T2DM proposed a panel of 10 metabolites, including palmitoylcarnitine, for this disease [31].

Biliverdin is a dark green bile pigment product of heme catabolism, which can be converted to bilirubin by the catalytic reaction of biliverdin reductase. In mouse cells, deletion of this enzyme using CRISPR-Cas9 technology produced lipid accumulation and oxidative stress that led to non-alcoholic fatty liver disease, which is strongly associated with insulin resistance and diabetes [32]. Elevated concentrations of biliverdin may, therefore, reflect a reduction in bilirubin concentrations. Serum concentrations of bilirubin are inversely related to the development of T2DM, because it protects against insulin resistance by improving visceral obesity and adipose tissue inflammation [33]. Thus, the prevalence of T2DM is markedly lower among patients with Gilbert syndrome, characterized by congenital hyperbilirubinemia [34]. It has also been observed that the administration of biliverdin, which showed lower concentrations in the present patients with T3cDM, ameliorates pancreatic inflammation and has been proposed, alongside methylene chloride, as a possible therapeutic approach to pancreatitis [35]. Hence, the protective role attributed to hemeoxygenase-1 in gastrointestinal diseases may not be direct but rather the result of a cytoprotective and anti-inflammatory response against oxidative stress produced by its upregulation and the production of CO and biliverdin [36].

Finally, the last compound that appeared differentially expressed between the study groups was 7 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid (7-HOCA). This metabolite of cholesterol, which occurs naturally in human blood [37], is formed extrahepatically and has been observed to accumulate in human subdural hematomas in correlation with the time from bleeding to sample collection, and it has also been proposed as a diagnostic marker for dysfunctional blood–brain barrier [38]. This metabolite is taken up by the liver, where it is further oxidized into bile acids, mainly chenodeoxycholic acid [39], which have been shown to acutely enhance insulin secretion [40], explaining the accumulation of this precursor in our T2DM group.

## **Materials and Methods**

### **Sample Collection**

To avoid any sex-related separation of the groups, we studied blood samples from 21 males with T3cDM (T3cDM group) and 19 males with T2DM (T2DM group) (Table 2).

Blood samples were drawn in hospital between 8 a.m. and 9 a.m. from fasting patients with T3cDM. All patients signed their informed consent to participation after receiving written information about the study, which was approved by the ethics committee of the hospital (ethical approval number: 1269-M1-19) and followed the principles of the Helsinki Declaration. Samples were collected in BD Vacutainer SSTII Advance tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) containing silica to activate clotting of the specimen. After centrifugation for 10 min at 2450 rpm, the supernatant was aspirated and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. Serum samples from T2DM patients were supplied by the Biobank of the Andalusian Public Health System and were obtained and treated in the same manner as the samples from T3cDM.

**Table 2.** Patient characteristics.

	T3cDM	T2DM
n	21	19
Age, mean years ( $\pm$ SD)	58.42 ( $\pm$ 9.57)	55.96 ( $\pm$ 6.16)
Sex		
Male	21	19
Female	0	0
Caucasian	21	19
Stage		
A	0	-
B	0	-
C	21	-
Disease duration, years	5.36	7.14
HbA1c, %	7.82	7.69
BMI, mean ( $\pm$ SD)	21.4 ( $\pm$ 6.61)	24.3 ( $\pm$ 3.54)
Fasting glucose, mg/dL	144.36	138.42
Insulin treatment	21	19

T3cDM = patients with pancreatogenic diabetes mellitus; T2DM = patients with type 2 diabetes mellitus; HbA1c = Hemoglobin A1c; BMI = Body mass index.

## Metabolite Extraction

All samples in this study were maintained at 4 °C during their handling. Protein precipitation was achieved by using acetonitrile (AcN) (1:8 sample/AcN) and shaking for 2 min, followed by centrifugation at 15,200 rpm for 10 min at 4 °C. Next, the supernatants were moved to HPLC vials and dried out in a GeneVac HT-8 evaporator (Savant, Holbrook, NY, USA). The remaining material was dissolved in a solution of AcN/water [50:50] with 0.1% formic acid and then shaken for 1 min.

#### LC-HRMS Analysis

Samples were analyzed by means of an LC-HRMS platform integrated by an Agilent 1290 LC system coupled to a Q-TOF 5600 (Triple Quadrupole Time-of-Flight) mass spectrometer (AB SCIEX, Concord, ON, Canada) using electrospray ionization in positive mode. Chromatographic stage was achieved with an Atlantis T3 HPLC column (C18: 2.1 mm × 150 mm, 3 μm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) kept at 25 °C and considering an injection volume of 5 μL of sample. The composition of the mobile phase was as follows: 0.1% formic acid-90:10 water/AcN (eluent A) and 0.1% formic acid-90:10 AcN/water (eluent B). The elution of analytes was accomplished applying the following elution gradient: 0.00–0.50 min 1% eluent B, 0.50–11.00 min 99% eluent B, 11.00–15.50 min 99% eluent B, 15.50–15.60 min 1% eluent B, and 15.60–20.00 min 1% eluent B. The flow was set at 300 μL/min. The Q-TOF 5600 was configured in an information-dependent acquisition (IDA) mode that enabled the simultaneous acquisition of full-scan HRMS and MS/MS data. Ion source parameters and IDA conditions were: gas source 1:50.00; gas source 2:50.00; curtain gas: 45.00; temperature: 500.00 °C; ionspray voltage floating: 4500.00; TOF masses: Min = 80.0000 Da Max = 1600.0000 Da; accumulation time: 0.2500 s, IDA accumulation time: 0.1000 s.

In order to ensure the accurate determination of exact mass, a periodic mass calibration was carried out every 10 injections with a standard solution. The injection sequence of samples included OS samples and quality control (QC) samples every 10 injections. QC samples were drawn from a pool of equal aliquots of all serum samples collected in this study and used to assess the analytical drift of the system. OS samples were used to filter any contaminants from the organic solvents or extraction procedure and to check the effect of carryover contamination.

#### Data Set Creation

PeakView software (version 1.0 with Formula Finder plug-in version 1.0, AB SCIEX, Concord, ON, Canada) was applied to check the retention time (RT) and mass/charge ( $m/z$ ) drift of the experiment. MarkerView software (version 1.2.1, AB SCIEX, Concord, ON, Canada) was selected for raw LC-HRMS data processing. This software enabled

peak detection, alignment, data filtering,  $m/z$  and RT determination and ion peak integration for each sample. Calculations were performed in the RT range of 1–17.2 min, and the peak intensity threshold was set at 60 cps. The tolerances of  $m/z$  and RT alignment values were set at 0.10 min and 10 ppm, respectively. Only  $m/z$  values that appeared in at least 10 samples from the study group were included in the data matrix, producing a matrix of 3998 features defined by RT and  $m/z$  values. Next, monoisotopic peaks (886 features) alone were considered to reduce the mass redundancy and enhance the selection of true molecular features. Variables were removed from the data matrix if their reproducibility was inadequate (relative standard deviation [RSD] >30% in QC samples) or if they were observed in <50% of QC samples. As a result, 350 features were removed. Then, mass signals differentially expressed by the OS and case study samples (T3cDM and T2DM) were identified by applying an additional filtering procedure., calculating the mean value of each feature in blank and QC samples (pool of all extracts) and applying a  $t$ -test. All features with a  $p$ -value <0.05 and mean blank/mean QC ratio >1.5 were removed from the data matrix (257 features). Finally, a filtered data matrix comprising 278 features was considered for further analysis. The subsequent phases were performed using Metaboanalyst 3.0 Web Server.

#### Data Pre-Treatment

Normalization was performed using a QC sample and probabilistic quotient normalization, mean centering scaling, and log transformation to transform the data matrix into a more Gaussian-type distribution.

#### Analytical Validation and Outlier Detection

The relative distribution of QC samples and study samples on a PCA plot score was used to identify the drift of the analytical system. Separately, one outlier in T3CDM and two in T2DM were recognized from Hotelling T<sup>2</sup> ellipses in a partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), regardless of the approach used to adjust the standardization method. The removal of outliers did not produce a rise in R<sup>2</sup> or Q<sup>2</sup> figures (data not shown).

The antibiotic roxithromycin was employed as the analytical standard. All studied samples were spiked after reconstitution of dry residues with 5  $\mu$ L of a stock solution of roxithromycin to yield a final concentration of 150 ng/mL. This compound has multiple functional groups in its structure and provides a very specific fragmentation pattern, making it a good candidate to identify the stability of the analytical system. Furthermore, it is rarely used in clinical therapy, minimizing any potential inference with endogenous content. In terms of RT and accurate mass values, roxithromycin displayed an excellent



reproducibility across the whole set of samples. The RT was  $6.37 \pm 0.02$  min, and the accurate mass was  $837.5303$  Da  $\pm 2$ ppm. The mean roxithromycin peak area was  $1,733,454.78 \pm 398,032.56$  cps. The CV was 22.96%.

### Statistical Analysis

The normal distribution of the data matrix was checked with the Shapiro test. The Student's *t*-test and Wilcoxon tests were used to explore significant differences in features between T3cDM and T2DM groups. The significance threshold was set at a *p*-value  $< 0.05$ , including Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR) correction. Then, multivariate analysis (PCA&PLS-DA) was applied to identify the most discriminant variables between the groups. The feature selection criteria were finally set at an FDR-corrected *p*-value  $< 0.05$  and fold change (T2DM/T3cDM) ranging between  $< 0.6$  and  $> 1.5$ .

### Biomarker Identification

The estimation of molecular formula from experimental data (accurate mass, isotopic profile and fragmentation patterns) was done with PeakView software (version 1.0 with Formula Finder plug-in version 1.0, AB SCIEX, Concord, ON, Canada). Next, compound databases (Metlin, Human Metabolome Database, Lipid Maps, PubChem, ChemSpider) and spectral databases (MassBank, NIST2014) were interrogated with the experimental data of each candidate for structural annotation. Based on these criteria, all annotations reported in our study should be taken as tentative. When possible, tentative annotations were confirmed using authentic standards.

### Metabolite Evaluation

The AUC was used to assess the predictive potential of the selected candidate biomarkers, either individually or in combination.

## Conclusions

In this study, untargeted LC-HRMS metabolomics proved useful to discover novel biomarkers that differentiate between T3cDM and T2DM. We propose a 13-metabolite panel that classified each type of patient with high accuracy. Sampling procedures and conditions were designed to minimize possible biases and applied in the most homogeneous manner possible. Nevertheless, it can be highly challenging to detect and eliminate all sampling biases, and this represents a potential limitation. A further limitation of this type of study is the difficulty to find replication cohorts to serve as a separate validation set. For these reasons, additional investigation is required in larger

samples to identify the ability of these diagnostic markers for T3cDM and T2DM alongside new validation studies, in order to establish the potential clinical relevance of these metabolic biomarkers and deliver the most appropriate treatment to these patients.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.P.d.P. and O.C.; methodology, A.M.-B.; validation, C.J.-L., C.D. and J.L.M.-R.; formal analysis, A.M.-B.; investigation, C.J.-L.; resources, C.D.-C.; data curation, C.D.; writing—original draft preparation, C.J.-L. and C.D.-C.; writing—review and editing, J.P. and J.P.d.P.; supervision, O.G. and J.P.; project administration, F.V.; funding acquisition, O.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by JUNTA DE ANDALUCIA, grants number PIN-0474-2016, PC-0549-2017, and PC-0498-2017, and the INSTITUTO DE SALUD CARLOS III, grant number DTS17/00081. MEDINA authors disclosed the receipt of financial support from Fundación MEDINA, a public–private partnership of Merck Sharp and Dohme de España S.A./Universidad de Granada/Junta de Andalucía (PIN-0474-2016).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Skyler, J.S.; Bakris, G.L.; Bonifacio, E.; Darsow, T.; Eckel, R.H.; Groop, L.; Groop, P.H.; Handelsman, Y.; Insel, R.A.; Mathieu, C.; et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes* **2017**, *66*, 241–255.
2. Goodarzi, M.O.; Nagpal, T.; Greer, P.; Cui, J.; Chen, Y.I.; Guo, X.; Pankow, J.S.; Rotter, J.I.; Alkaade, S.; Amann, S.T.; et al. Genetic Risk Score in Diabetes Associated With Chronic Pancreatitis Versus Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2019**, *10*, e00057.
3. Kleeff, J.; Whitcomb, D.C.; Shimosegawa, T.; Esposito, I.; Lerch, M.M.; Gress, T.; Mayerle, J.; Drewes, A.M.; Rebours, V.; Akisik, F.; et al. Chronic pancreatitis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17060.
4. Petrov, M.S.; Yadav, D. Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 175–184.
5. Zhu, X.; Liu, D.; Wei, Q.; Lin, H.; Zhi, M.; Chen, Y.; Qi, L.; Waldron, R.T.; Lugea, A.; Pandol, S.J.; et al. New-Onset Diabetes Mellitus After Chronic Pancreatitis Diagnosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pancreas* **2019**, *48*, 868–875.
6. Bhattamisra, S.K.; Siang, T.C.; Rong, C.Y.; Annan, N.C.; Sean, E.H.Y.; Xi, L.W.; Lyn, O.S.; Shan, L.H.; Choudhury, H.; Pandey, M.; et al. Type-3c Diabetes Mellitus,

- Diabetes of Exocrine Pancreas—An Update. *Curr. Diabetes Rev.* **2019**, *15*, 382–394.
7. Woodmansey, C.; McGovern, A.P.; McCullough, K.A.; Whyte, M.B.; Munro, N.M.; Correa, A.C.; Gatenby, P.A.C.; Jones, S.A.; de Lusignan, S. Incidence, Demographics, and Clinical Characteristics of Diabetes of the Exocrine Pancreas (Type 3c): A Retrospective Cohort Study. *Diabetes Care* **2017**, *40*, 1486–1493.
  8. Rawla, P.; Sunkara, T.; Gaduputi, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J. Oncol.* **2019**, *10*, 10–27.
  9. Kirkegård, J.; Mortensen, F.V.; Cronin-Fenton, D. Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **2017**, *112*, 1366–1372.
  10. Hart, P.A.; Bellin, M.D.; Andersen, D.K.; Bradley, D.; Cruz-Monserrate, Z.; Forsmark, C.E.; Goodarzi, M.O.; Habtezion, A.; Korc, M.; Kudva, Y.C. Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *1*, 226–237.
  11. Zhang, A.; Sun, H.; Wang, P.; Han, Y.; Wang, X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst* **2012**, *137*, 293–300.
  12. Cajka, T.; Fiehn, O. Toward Merging Untargeted and Targeted Methods in Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Lipidomics. *Anal Chem.* **2016**, *88*, 524–545.
  13. González-Domínguez, R.; Sayago, A.; Fernández-Recamales, A. High-Throughput Direct Mass Spectrometry-Based Metabolomics to Characterize Metabolite Fingerprints Associated with Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Metabolites* **2018**, *8*, 52.
  14. Ríos Peces, S.; Díaz Navarro, C.; Márquez López, C.; Caba, O.; Jiménez-Luna, C.; Melguizo, C.; Prados, J.C.; Genilloud, O.; Vicente Pérez, F.; Pérez Del Palacio, J. Untargeted LC-HRMS-Based Metabolomics for Searching New Biomarkers of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Pilot Study. *SLAS Discov.* **2017**, *22*, 348–359.
  15. Xu, F.; Tavintharan, S.; Sum, C.F.; Woon, K.; Lim, S.C.; Ong, C.N. Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E1060–E1065.
  16. Ahonen, L.; Jäntti, S.; Suvitaival, T.; Theilade, S.; Risz, C.; Kostianen, R.; Rossing, P.; Orešič, M.; Hyötyläinen, T. Targeted Clinical Metabolite Profiling Platform for the Stratification of Diabetic Patients. *Metabolites* **2019**, *9*, 184.
  17. Johnston, P.C.; Thompson, J.; Mckee, A.; Hamill, C.; Wallace, I. Diabetes and Chronic Pancreatitis: Considerations in the Holistic Management of an Often Neglected Disease. *J. Diabetes Res.* **2019**, *2019*, 2487804.

18. Ewald, N.; Hardt, P.D. Diagnosis and treatment of diabetes mellitus in chronic pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 7276–7281.
19. Duggan, S.N.; Ewald, N.; Kelleher, L.; Griffin, O.; Gibney, J.; Conlon, K.C. The nutritional management of type 3c (pancreatogenic) diabetes in chronic pancreatitis. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2017**, *71*, 3–8.
20. Makuc, J. Management of pancreatogenic diabetes: Challenges and solutions. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* **2016**, *9*, 311–315.
21. Gaul, D.A.; Mezencev, R.; Long, T.Q.; Jones, C.M.; Benigno, B.B.; Gray, A.; Fernández, F.M.; McDonald, J.F. Highly-accurate metabolomic detection of early-stage ovarian cancer. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16351.
22. Resson, H.W.; Xiao, J.F.; Tuli, L.; Varghese, R.S.; Zhou, B.; Tsai, T.H.; Ranjbar, M.R.; Zhao, Y.; Wang, J.; Di Poto, C.; et al. Utilization of metabolomics to identify serum biomarkers for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *743*, 90–100.
23. Ha, C.Y.; Kim, J.Y.; Paik, J.K.; Kim, O.Y.; Paik, Y.H.; Lee, E.J.; Lee, J.H. The association of specific metabolites of lipid metabolism with markers of oxidative stress, inflammation and arterial stiffness in men with newly diagnosed type 2 diabetes. *Clin. Endocrinol.* **2012**, *76*, 674–682.
24. Wang, T.J.; Larson, M.G.; Vasan, R.S.; Cheng, S.; Rhee, E.P.; McCabe, E.; Lewis, G.D.; Fox, C.S.; Jacques, P.F.; Fernandez, C.; et al. Metabolite Profiles and the Risk of Developing Diabetes. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 448–453.
25. Chen, T.; Zheng, X.; Ma, X.; Bao, Y.; Ni, Y.; Hu, C.; Rajani, C.; Huang, F.; Zhao, A.; Jia, W.; et al. Tryptophan Predicts the Risk for Future Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162192.
26. Yu, E.; Papandreou, C.; Ruiz-Canela, M.; Guasch-Ferre, M.; Clish, C.B.; Dennis, C.; Liang, L.; Corella, D.; Fitó, M.; Razquin, C.; et al. Association of Tryptophan Metabolites With Incident Type 2 Diabetes in the PREDIMED Trial: A Case-Cohort Study. *Clin. Chem.* **2018**, *64*, 1211–1220.
27. Zhang, X.; Zhang, C.; Chen, L.; Han, X.; Ji, L. Human Serum Acylcarnitine Profiles in Different Glucose Tolerance States. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2014**, *104*, 376–382.
28. Sun, L.; Liang, L.; Gao, X.; Zhang, H.; Yao, P.; Hu, Y.; Ma, Y.; Wang, F.; Jin, Q.; Li, H.; et al. Early Prediction of Developing Type 2 Diabetes by Plasma Acylcarnitines: A Population-Based Study. *Diabetes Care* **2016**, *39*, 1563–1570.
29. Strand, E.; Rebnord, E.W.; Flygel, M.R.; Lysne, V.; Svingen, G.F.T.; Tell, G.S.; Løland, K.H.; Berge, R.K.; Svardal, A.; Nygård, O.; et al. Serum Carnitine

- Metabolites and Incident Type 2 Diabetes Mellitus in Patients With Suspected Stable Angina Pectoris. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2018**, *103*, 1033–1041.
30. Bouchouirab, F.Z.; Fortin, M.; Noll, C.; Dubé, J.; Carpentier, A.C. Plasma Palmitoyl-Carnitine (AC16:0) Is a Marker of Increased Postprandial Nonesterified Incomplete Fatty Acid Oxidation Rate in Adults with Type 2 Diabetes. *Can. J. Diabetes* **2018**, *42*, 382–388.
  31. Sun, Y.; Gao, H.Y.; Fan, Z.Y.; He, Y.; Yan, Y.X. Metabolomics Signatures in Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Integrative Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2020**, *105*, dgz240.
  32. Gordon, D.M.; Adeosun, S.O.; Ngwudike, S.I.; Anderson, C.D.; Hall, J.E.; Hinds, T.D. Jr.; Stec, D.E. CRISPR Cas9-mediated Deletion of Biliverdin Reductase A (BVRA) in Mouse Liver Cells Induces Oxidative Stress and Lipid Accumulation. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *672*, 108072.
  33. Takei, R.; Inoue, T.; Sonoda, N.; Kohjima, M.; Okamoto, M.; Sakamoto, R.; Inoguchi, T.; Ogawa, Y. Bilirubin Reduces Visceral Obesity and Insulin Resistance by Suppression of Inflammatory Cytokines. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0223302.
  34. Inoguchi, T.; Sasaki, S.; Kobayashi, K.; Takayanagi, R.; Yamada, T. Relationship between Gilbert Syndrome and Prevalence of Vascular Complications in Patients with Diabetes. *JAMA* **2007**, *298*, 1398–1400.
  35. Nuhn, P.; Mitkus, T.; Ceyhan, G.O.; Künzli, B.M.; Bergmann, F.; Fischer, L.; Giese, N.; Friess, H.; Berberat, P.O. Heme Oxygenase 1-generated Carbon Monoxide and Biliverdin Attenuate the Course of Experimental Necrotizing Pancreatitis. *Pancreas* **2013**, *42*, 265–271.
  36. Chang, M.; Xue, J.; Sharma, V.; Habtezion, A. Protective role of Hemoxygenase-1 in Gastrointestinal Diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 1161–1173.
  37. Meaney, S.; Babiker, A.; Lütjohann, D.; Diczfalusy, U.; Axelson, M.; Björkhem, I. On the origin of the cholestenic acids in human circulation. *Steroids* **2003**, *68*, 595–601.
  38. Saeed, A.A.; Edström, E.; Pikuleva, I.; Eggertsen, G.; Björkhem, I. On the importance of albumin binding for the flux of 7 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-4-cholestenic acid in the brain. *J. Lipid Res.* **2017**, *58*, 455–459.
  39. Saeed, A.; Floris, F.; Andersson, U.; Pikuleva, I.; Lövgren-Sandblom, A.; Bjerke, M.; Paucar, M.; Wallin, A.; Svenningsson, P.; Björkhem, I. 7 $\alpha$ -hydroxy-3-oxo-4-cholestenic acid in cerebrospinal fluid reflects the integrity of the blood-brain barrier. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 313–318.

40. Hoffmeister, T.; Kaiser, J.; Lüdtkke, S.; Drews, G.; Düfer, M. Interactions between Atorvastatin and the Farnesoid X Receptor Impair Insulinotropic Effects of Bile Acids and Modulate Diabetogenic Risk. *Mol. Pharmacol.* **2020**, *97*, 202–211.

# **Publicación 4**





## **State of the Art in Exocrine Pancreatic Insufficiency**

**Carmelo Diéguez-Castillo <sup>1</sup>, Cristina Jiménez-Luna <sup>2</sup>, Jose Prados <sup>2</sup>, José Luis Martín-Ruiz <sup>1</sup> and Octavio Caba <sup>2,\*</sup>**

<sup>1</sup> Department of Gastroenterology, San Cecilio University Hospital Granada  
18012, Spain

<sup>2</sup> Institute of Biopathology and Regenerative Medicine (IBIMER), University of  
Granada, Granada 18100, Spain

**Medicina 2020 Oct: 7;56 (10): 523.**

## **Abstract**

Exocrine pancreatic insufficiency (EPI) is defined as the maldigestion of foods due to inadequate pancreatic secretion, which can be caused by alterations in its stimulation, production, transport, or interaction with nutrients at duodenal level. The most frequent causes are chronic pancreatitis in adults and cystic fibrosis in children. The prevalence of EPI is high, varying according to its etiology, but it is considered to be underdiagnosed and undertreated. Its importance lies in the quality of life impairment that results from the malabsorption and malnutrition and in the increased morbidity and mortality, being associated with osteoporosis and cardiovascular events. The diagnosis is based on a set of symptoms, indicators of malnutrition, and an indirect non-invasive test in at-risk patients. The treatment of choice combines non-restrictive dietary measures with pancreatic enzyme replacement therapy to correct the associated symptoms and improve the nutritional status of patients. Non-responders require the adjustment of pancreatic enzyme therapy, the association of proton pump inhibitors, and/or the evaluation of alternative diagnoses such as bacterial overgrowth. This review offers an in-depth overview of EPI in order to support the proper management of this entity based on updated and integrated knowledge of its etiopathogenesis, prevalence, diagnosis, and treatment.

## **Keywords**

Exocrine pancreatic insufficiency; prevalence; clinic relevance; diagnosis; treatment; pancreatic enzyme replacement therapy

## Introduction

Exocrine pancreatic insufficiency (EPI) is defined in the most recent reviews as the inability of the pancreas to secrete enzymes and bicarbonate for action on the intestinal lumen to accomplish the normal digestion of food [1–8]. EPI can be caused by an alteration at any point in the digestive chain in which the exocrine pancreas is involved [1,4,6,7]. Alterations have been described in the following processes:

- (a) Pancreatic stimulation: Insufficient activation of pancreatic secretion can be caused by diseases (e.g., celiac disease) that reduce the release of cholecystokinin (CCK) from the duodenal mucosa or by pancreatic/gastrointestinal surgery. EPI can also result from the treatment of neuroendocrine tumors with somatostatin analogs, given that somatostatin is a physiological pancreatic secretion inhibitor [3,9].
- (b) Pancreatic juice synthesis: Damage to the pancreatic parenchyma reduces the production and secretion of pancreatic enzymes by acinar cells and of bicarbonate by pancreatic ducts. This functional loss can be caused by various diseases, including chronic pancreatitis, cystic fibrosis, pancreatic cancer, or acute necrotizing pancreatitis, or by pancreatic resection for the treatment of some of these.
- (c) Pancreatic juice transport: Obstruction of the passage of pancreatic juice through the pancreatic duct prevents its arrival into the intestinal lumen to carry out its digestive activity. This problem can be caused by disorders such as cystic fibrosis, with the production of a thicker secretion, or by various types of pancreatic tumor.
- (d) Synchronization of gastrointestinal secretions: Asynchrony in the interaction of nutrients with biliopancreatic secretions results in the incorrect digestion of foods. This problem is usually caused by anatomical changes produced by pancreatobiliary or gastrointestinal surgery. This phenomenon is also observed in patients with Crohn's disease or short bowel syndrome. Less frequently, there is no enzyme activation despite adequate secretion and the arrival of pancreatic juice to the duodenum, as in cases of hyperchlorhydria.

According to the above data, the terms exocrine pancreatic secretion and function should not be considered synonymous, given the possibility of EPI when the secretion is adequate, as in disorders that alter the interaction between secretion and food [1,3].

EPI is almost always produced by a pancreatic disease, with the most frequent cause being chronic pancreatitis in adults [10,11] and cystic fibrosis in children [4]. Other etiologies include acute pancreatitis [12,13], pancreatic tumors [14], diabetes mellitus

[15,16], celiac disease, inflammatory bowel disease [17,18], gastrointestinal and pancreatic surgery [19–21], HIV and genetic and congenital factors. Some of these causes have are less frequent, and there is even debate around their true role in the etiology of EPI.

Capurso et al. (2019) divided the causes of EPI between pancreatic and extra-pancreatic disorders (Table 1) [3], whereas other authors distinguished between those that had clearly demonstrated a connection with EPI and those that had not, assisting the establishment of a definitive diagnosis and the definition of risk groups (Table 2) [5]. In this way, the Australian Pancreas Group stratified the causes of EPI as definite, possible or unlikely, with the latter including type 2 diabetes, celiac disease, inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, advanced age with weight loss, and intestinal resection [6].

The aim of this review was to summarize and integrate recent knowledge on the etiopathogenesis, prevalence, treatment, and diagnosis of EPI and propose a novel algorithm for the clinical management of this entity, stratifying the risk of developing EPI according to the etiology and exploring the diagnostic usefulness of combinations of variables/symptoms.

Five electronic databases were searched: Ovid MEDLINE (1946 to present), Embase (1980 to present), Cochrane Library (1979 to present), AMED (1985 to present), and CINAHL (1981 to present). Two groups of search terms were combined, one related to EPI (“exocrine pancreatic insufficiency”, “pancreatic insufficiency”) and the other to the different issues under study (“concept”; “pathogeny”; “etiology”; “prevalence”; “clinical manifestations”; “diagnostic”; “treatment”). The search results were screened for eligibility in an independent and standardized manner by two investigators (C.D-C., and C.J-L.), resolving discrepancies by mutual consensus. Titles and abstracts of eligible studies were first screened, followed by the full article. No date, study design, or language limitations were applied in any search. The latest search was conducted on 1 August 2020. However, given that almost all selected studies focused on a specific aspect of EPI and showed a high variability, it was decided that the quantitative synthesis of data in a meta-analysis would not be appropriate.

**Table 1.** Pancreatic and extra-pancreatic causes of exocrine pancreatic insufficiency (EPI) (adapted from Capurso et al., 2019).

Pancreatic Disorders	Extra-Pancreatic Disorders
Chronic Pancreatitis	Types 1 and 2 diabetes
Cystic Fibrosis	Gastrointestinal Surgery
Pancreatic Tumors	Celiac Disease
Acute Pancreatitis	Inflammatory Bowel Disease
Pancreatic Surgery	HIV

Shwachman–Diamond Syndrome	Sjögren`s Syndrome
Johanson–Blizzard Syndrome	Intestinal Transplant at Pediatric Age
Pancreatic Hemochromatosis [22]	Treatment with Somatostatin Analog
Trypsinogen or Enteropeptidase Deficiency	Advanced Age
	Tobacco Habit [23]

**Table 2.** Defined and possible causes of EPI (adapted from Forsmark).

Defined causes	Likely causes
Chronic Pancreatitis	Gastrointestinal Surgery
Cystic Fibrosis	Tobacco Habit [23]
Pancreatic Surgery	Types 1 and 2 Siabetes
Pancreatic Tumor/Cancer	Celiac Disease
Benign Main Pancreatic Duct Obstruction	Zollinger-Ellison Syndrome (gastrinoma)
Shwachman-Diamond Syndrome	HIV
Johanson-Blizzard Syndrome	Advanced Age
Hemochromatosis [22]	Severe Malnutrition
	Acute Pancreatitis without Severe or Recurrent Necrosis

### Prevalence and Clinical Relevance

The current prevalence of EPI is unknown [3] and is highly variable, due to its multiple etiologies (Table 3) [4]. However, there is general consensus that it is a frequent disease that is underdiagnosed and undertreated [1].

**Table 3.** Prevalence of EPI according to its etiology.

Cause of EPI	Prevalence
Chronic Pancreatitis	At the Diagnosis: 10% [7] After 10–12 Years with the Disease: 60–90% [4]
Acute Pancreatitis [2]	Short-Term: 60% Long-Term: 33% Unresectable: 90%
Pancreatic Tumor [2]	Resectable: - Pre-Surgery: 20–44% - Post-Surgery: 60%
Pancreatic Surgery [3]	Whipple Procedure: 85–95% Distal Pancreatectomy: 20–50%
Cystic Fibrosis [2]	85% (the Majority at Birth)
Gastrointestinal Surgery [3]	Total/Subtotal Gastrectomy: 40–80% Esophagectomy: 16%
Type 1 Diabetes	Severe: 10–30%; Mild–Moderate: 22–56% [4] 40% [2]
Type 2 Diabetes	5–46 % [4] 27 % [2]
Celiac Disease	5–80% [3]
Inflammatory Bowel Disease	14–74 % [4]
HIV	26–45% [4]

The maldigestion produced by EPI can result in steatorrhea, abdominal distension, flatulence, and/or weight loss. These symptoms of malabsorption are non-specific, and there are even patients who reduce their intake of the foods they tolerate least well and

may be paucisymptomatic. The persistence of symptoms impairs the quality of life of patients [1,4,6].

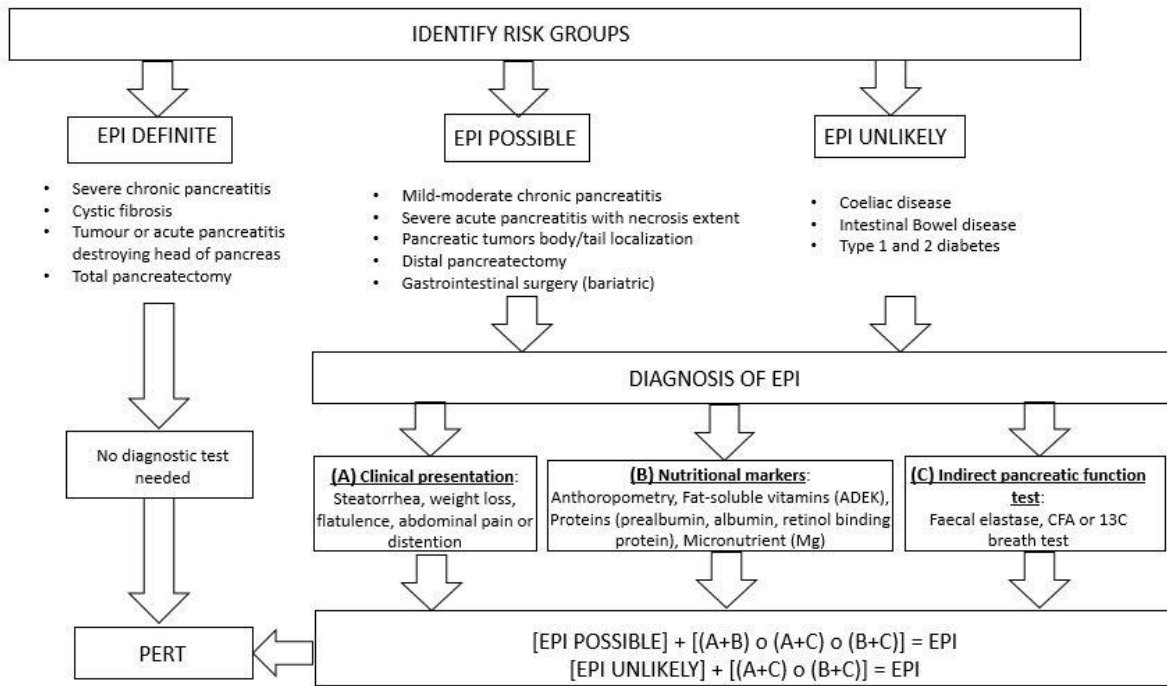
Alterations in intestinal ecology appear to be implicated in pancreatic maldigestion, according to observations of an increase in intestinal inflammation markers in patients with EPI, augmenting intestinal permeability and favoring bacterial overgrowth, thereby contributing to the persistence of symptoms [24].

The importance of EPI also lies in the resulting predisposition to develop malnutrition, which does not differ from that produced by other causes [7], being associated with deficiencies in proteins, oligoelements (Mg, Zn, etc.) and liposoluble vitamins (A, D, E, K) [1]. Malnutrition can lead to the onset of sarcopenia, which is not necessarily accompanied by weight loss. Indeed, Shintakuya et al. (2017) reported that the majority of EPI patients with sarcopenia in their study were overweight [25].

A frequent comorbidity in patients with EPI is osteopenia or osteoporosis, associated with non-traumatic fractures. For this reason, a bone mineral density test is recommended at the diagnosis and periodically thereafter [5]. Malnutrition also reduces the immunocompetence of patients and increases their risk of cardiovascular events. In patients with pancreatic cancer, the development of EPI is a factor for a poor prognosis, and its treatment independently improves survival outcomes [26,27]. In addition, EPI is a cardiovascular risk factor independent of other known factors (arterial hypertension, diabetes, tobacco, obesity), being influenced by the associated malnutrition [28]. The presence of these comorbidities increases the morbidity and mortality of patients with EPI [29].

## **Diagnosis**

The diagnosis of EPI is currently based on a set of symptoms of maldigestion/malabsorption, on indicators of malnutrition, and on the result of a non-invasive pancreatic test [1]. The combination of two of these criteria should be considered sufficient for the diagnosis and for initiating treatment of pancreatic maldigestion. Nevertheless, when a diagnosis of EPI appears unlikely, it is recommended that a positive indirect test of pancreatic function should be one of the diagnostic criteria applied (Figure 1).



**Figure 1.** Summary diagnostic algorithm (adapted from Dominguez-Muñoz and the Australian Pancreatic Club). EPI: exocrine pancreatic insufficiency CFA: coefficient of fat absorption 13C: 13C-mixed triglyceride PERT: pancreatic enzymatic replacement therapy.

It involves the identification of at-risk patients with pancreatic or extra-pancreatic disorders that are potentially responsible for EPI [5]. There is a high likelihood that a diagnosis of EPI can be established before a diagnostic test is performed in patients with defined causes of EPI, e.g., chronic pancreatitis, acute pancreatitis with extensive necrosis, cancer in the head of the pancreas, or gastrointestinal surgery [1].

It is important to take account of the demonstration over recent years that the presence of postprandial fatty stools is highly predictive of steatorrhea and that their presence combined with weight loss greater than 10% is strongly suggestive of EPI [30,31]. Although symptoms of maldigestion–malabsorption support the diagnosis of EPI, they may be absent or appear later [7].

Evaluation of the nutritional status of patients is based on anthropometric and analytical parameters, including biochemical results for oligoelements, liposoluble vitamins, and lipoproteins. Some authors have proposed a decrease in magnesium, albumin, prealbumin and retinol-binding protein levels as a predictive model for the diagnosis of EPI and for monitoring the response to treatment [32].

Various direct and indirect methods are available to quantify exocrine pancreatic secretions (Table 4). Direct techniques include the quantification of duodenal juice collected by probe or endoscopy after stimulation with secretagogues (secretin or CCK),

whereas one indirect approach is to measure the results of this stimulation by detecting metabolites derived from the action of pancreatic enzymes [3,7].

Direct methods offer high sensitivity and specificity but are invasive, expensive, and time-consuming. They are not readily available, and variability among centers has prevented their standardization. For these reasons, they are not useful for post-treatment follow-up. Conversely, indirect methods lack sensitivity in initial stages but are less costly and easier to apply [3,4]. The absence of a widely available, precise, and readily-reproducible diagnostic technique has contributed to the underdiagnosis of EPI [5].

**Table 4.** Diagnostic tests available to quantify exocrine pancreatic secretion (modified from Afghani et al., 2014; Pezzilli et al., 2013) [33,34]

Diagnostic test type	Advantages	Disadvantages
Direct		
Duodenal Intubation Test	High Sensitivity and Specificity	Invasive Laborious
Endoscopic Test	Preferably with Secretin Stimulation and Measurement of Bicarbonate	Expensive Only Available in Specialist Centers
Indirect		
13C-mixed triglyceride Breath Test	Simple Noninvasive Useful to Monitor the Response to PERT	Prolonged Time (6 hours) Not Widely Available False Positives (Malabsorption of Non-Pancreatic Fats and Liver or Lung Disease) Non-specific Low Sensitivity for Mild EPI
Stool Elastase	Very Simple Noninvasive Fast Widely Available	Not Useful for PERT Monitoring Low Sensitivity for Mild Cases False Positives (Liquid Stools, Intestinal Inflammation) Not Reliable After Pancreatic Resection
Fat absorption Coefficient	Gold Standard	Difficult Application/Adherence Only for Severe EPI Cases Diet of 100g Fats for 5 Days Gathering Stools for 3 Days False Positives (Malabsorption of Non-Pancreatic Fats)

The stool elastase test is the most widely applied non-invasive approach in routine clinical practice. Among multiple advantages, it does not need the collection of feces or a specific pre-test diet, it can be applied at all care levels, and it does not require the suspension of pancreatic enzyme replacement therapy (PERT) because it shows no cross-reaction with the porcine enzymes used in this treatment. Furthermore, it has demonstrated high sensitivity for advanced stages (elastase <100 µg/g feces = severe EPI). Nevertheless, this method is not without limitations, which must be understood to achieve an optimal result, because many can be easily corrected or modified to minimize false positives [35]. The following points should be taken into consideration:

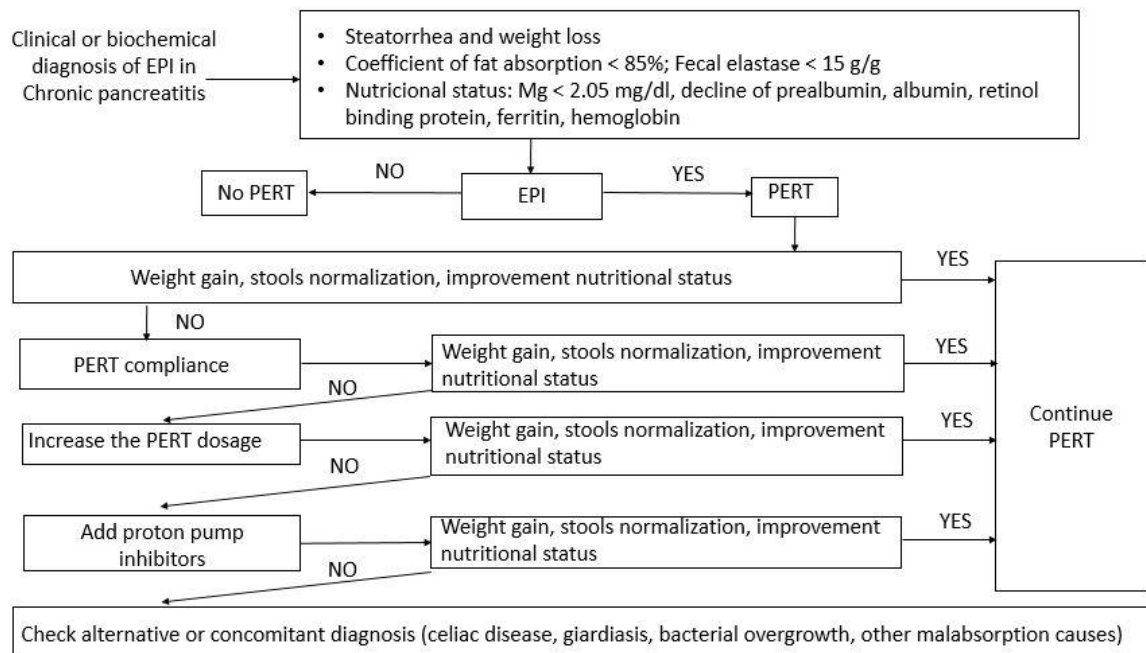


- (a) There is no consensus on the cutoff point for an EPI diagnosis, which has generally been arbitrarily considered as  $<200 \mu\text{g/g}$ . Nevertheless, the smaller the concentration, the greater the likelihood of EPI, and very high sensitivity and specificity values have been reported for concentrations  $<15 \mu\text{g/g}$ . Conversely, EPI is ruled out by very high elastase values ( $> 500 \mu\text{g/g}$ ) [7].
- (b) The interpretation of borderline elastase values (100–200) should be guided by the observation of symptoms and malnutrition indicators [1]. A closer follow up should be considered, especially if there is persistence of the etiological factors most frequently associated with pancreatic damage (tobacco and alcohol).
- (c) Samples with a liquid consistency (Bristol scale of 5–7) should be excluded.
- (d) Potential causes of false positives should be ruled out, including bacterial overgrowth [8]. They may also be attributable to advanced age or conditions such as chronic kidney disease, although these associations have not been fully elucidated.

## **Treatment**

Despite the evident benefits of initiating treatment, diagnostic tests are carried out in a very small percentage of cases and few patients are treated, often with inadequate doses [36–39]. Patients with a diagnosis of EPI are given dietary recommendations and pancreatic enzyme replacement therapy (PERT). Their diet should be balanced, with no need to follow fat-restricted or fiber-rich diets. Patients are advised to consume a larger number of smaller-sized meals to facilitate digestion. Liposoluble vitamin supplements can be administered when considered necessary.

The dose of PERT should be individualized in accordance with the severity of patients and their needs [1]. The minimum dose recommended for PERT is 50000 Ph.Eur.U. for main meals and half of this dose for snacks, although higher doses should be prescribed in patients with pancreatic cancer or after pancreatic/gastrointestinal surgery. Half of the dose is taken at the beginning of each meal (after a few mouthfuls of food) and the rest at the end. Adjustment of the dose and regimen should take account of poor therapeutic adherence as well as inactivation by gastric acids, improving the response by associating proton-pump inhibitors. If no response is observed, other possible diagnoses should be considered, such as bacterial overgrowth, celiac disease, or a neoplasm (Figure 2) [2].



**Figure 2.** Algorithm for the follow-up of pancreatic enzymatic replacement therapy (PERT) in exocrine pancreatic insufficiency (EPI) (modified from Pezzilli et al., 2013) [34].

Bacterial overgrowth has frequently been observed in patients with chronic pancreatitis [40]. Its involvement in the persistence of steatorrhea in adequately supplemented patients is attributed to the malabsorption of bile acids and the alteration of intestinal permeability. However, PERT itself may influence the composition of intestinal flora, inducing the colonization of beneficial bacteria [41] and the association of proton pump inhibitors corrects the low pH, improving the absorption of bile acids.

Hence, the treatment of these patients is currently based on the correction of pancreatic insufficiency using pancreatic extracts and the improvement of duodenal pH to achieve their optimal effectiveness. However, other factors possibly implicated in maldigestion and malabsorption, such as changes in intestinal ecology, can predispose patients to intestinal inflammation and poor bile acid absorption. These should be considered as potential therapeutic targets, administering supplementation with bile acids, prebiotics, probiotics, or other drugs to protect and strengthen the intestinal barrier [24]. In this regard, Hamada et al. (2018) addressed the relationship of certain strains of intestinal microbiota with a worsening of malabsorption symptoms [42]. In addition, experimental rat studies have drawn attention to the intestinal microbiota as a possible therapeutic target [43,44].

In our view, the optimization of PERT, through an improvement in adherence, dose adjustments, and association with proton pump inhibitors, is the cornerstone of treatment, obviating the previously recommended need for dietary fat restrictions or for

vitamin or oligoelement supplementation, unless there is a severe deficit that generates symptoms.

Knowledge of new mechanisms underlying maldigestion/malabsorption, such as those that may involve the intestinal microbiota, can help to identify novel therapeutic targets and may represent a change in the approach to EPI [45,46]. Thus, these aspects could change from being the third step in monitoring the effectiveness of therapy in non-responders to being part of first-line treatment, so that the different factors implicated in EPI are treated in a combined manner from the outset.

The effectiveness of PET is indicated by the normalization of malabsorption symptoms and the recovery of nutritional status according to anthropometric and biochemical parameters [7,8], which should be followed up at least once a year [4]. Symptom control improves the quality of life of the patients and nutritional status recovery reduces their mortality risk. PET can ameliorate malabsorption symptoms such as meteorism but has not proved able to relieve abdominal pain.

In patients with pancreatic cancer, PERT has been found to independently improve their survival outcomes to a similar degree to that observed for surgery or chemotherapy [47]. PERT is a cornerstone of the treatment of patients with chronic pancreatitis, alongside a balanced diet, and achieves the correct management of >80 % of patients, with only 10-15 % needing oral nutritional supplements [7].

## 5. Conclusions

Exocrine pancreatic insufficiency is a highly prevalent entity that is underdiagnosed and undertreated. It is essential to achieve an early diagnosis and treatment, not only in patients with well-known causes of this condition (e.g., chronic pancreatitis, cystic fibrosis, pancreatic cancer, or acute pancreatitis with extensive necrosis) but also in those with emerging causes. Diagnosis is usually based on a set of symptoms, undernourishment data, and a noninvasive diagnostic test in at-risk groups. The appropriate implementation of PERT improves the quality of life of these patients by controlling their symptoms and reduces their morbidity and mortality risk by rectifying their nutritional status.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.D-C. and C.J-L.; writing—original draft preparation, C.D-C.; writing—review and editing, C.J-L.; supervision, J.P and J.L.M-R.; project administration, O.C.; funding acquisition, O.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by JUNTA DE ANDALUCIA, grants number PC-0498-2017 and PC-0549-2017.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Dominguez-Muñoz, J.E. Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2018**, *34*, 349–354.
2. Perbtani, Y.; Forsmark, C.E. Update on the diagnosis and management of exocrine pancreatic insufficiency. *F1000Research* **2019**, *8*, 1991.
3. Capurso, G.; Traini, M.; Piciocchi, M.; Signoretti, M.; Arcidiacono, P.G. Exocrine pancreatic insufficiency: Prevalence, diagnosis, and management. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **2019**, *12*, 129–139.
4. Ghodeif, A.O.; Azer, S.A. Pancreatic insufficiency. In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020.
5. Forsmark, C. Diagnosis and management of exocrine pancreatic insufficiency. *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* **2018**, *16*, 306–315.
6. Nikfarjam, M.; Wilson, J.S.; Smith, R.S. Diagnosis and management of pancreatic exocrine insufficiency. *Med. J. Aust.* **2017**, *207*, 161–165.
7. Löhr, J.M.; Dominguez-Munoz, E.; Rosendahl, J.; Besselink, M.; Mayerle, J.; Lerch, M.M.; Haas, S.; Akisik, F.; Kartalis, N.; Iglesias-Garcia, J.; et al. United European gastroenterology evidence-based guidelines for the diagnosis and therapy of chronic pancreatitis (HaPanEU). *United Eur. Gastroenterol. J.* **2017**, *5*, 153–199.
8. Rodrigues-Pinto, E.; Caldeira, A.; Soares, J.B.; Antunes, T.; Carvalho, J.R.; Costa-Maia, J.; Oliveira, P.; Azevedo, R.; Liberal, R.; Bouça Machado, T.; et al. Clube Portugues do pancreas recommendations for chronic pancreatitis: Etiology, natural history and diagnosis. *Ge Port. J. Gastroenterol.* **2019**, *26*, 346–355.
9. Levy, M.N.; Stanton, B.A.; Koeppen, B.M. Gastrointestinal secretions. In *Berne & Levy Principles of Physiology*, 4th ed.; Levy, M.N., Stanton, B.A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006; Volume 1, pp. 451–472.
10. Duggan, S.N. Negotiating the complexities of exocrine and endocrine dysfunction in chronic pancreatitis. *Proc. Nutr. Soc.* **2017**; *76*, 484–494.
11. Layer, P.; Yamamoto, H.; Kalthoff, L.; Clain, J.E.; Bakken, L.J.; DiMagno, E.P. The different courses of early- and late onset idiopathic and alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* **1994**, *107*, 1481–1487.
12. Huang, W.; de la Iglesia-García, D.; Baston-Rey, I.; Calviño-Suarez, C.; Lariño-Noia, J.; Iglesias-Garcia, J.; Shi, N.; Zhang, X.; Cai, W.; Deng, L.; et al. Exocrine pancreatic insufficiency following acute pancreatitis: Systematic review and meta-analysis. *Dig. Dis. Sci.* **2019**, *64*, 1985–2005.

13. Hollemans, R.A.; Hallensleben, N.D.L.; Mager, D.J.; Kelder, J.C.; Besselink, M.G.; Bruno, M.J.; Verdonk, R.C.; van Santvoort, H.C. Pancreatic exocrine insufficiency following acute pancreatitis: Systematic review and study level meta-analysis. *Pancreatology* **2018**, *18*, 253–262.
14. Pezzilli, R.; Caccialanza, R.; Capurso, G.; Brunetti, O.; Milella, M.; Falconi, M. Pancreatic enzyme replacement therapy in pancreatic cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 275.
15. Altay, M. Which factors determine exocrine pancreatic dysfunction in diabetes mellitus? *World J. Gastroenterol.* **2019**, *25*, 2699–2705.
16. Radlinger, B.; Ramoser, G.; Kaser, S. Exocrine Pancreatic Insufficiency in type 1 and type 2 diabetes. *Curr. Diabetes Rep.* **2020**, *20*, 18.
17. Fousekis, F.S.; Theopistos, V.I.; Katsanos, K.H.; Christodoulou, D.K. Pancreatic involvement inflammatory bowel disease: A review. *J. Clin. Med. Res.* **2018**, *10*, 743–751.
18. Iida, T.; Wagatsuma, K.; Hirayama, D.; Yokoyama, Y.; Nakase, H. The etiology of pancreatic manifestations in patients with inflammatory Bowel disease. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 916.
19. Chaudhary, A.; Dominguez-Muñoz, J.E.; Layer, P.; Lerch, M.M. Pancreatic exocrine insufficiency as a complication of gastrointestinal surgery and the impact of pancreatic enzyme replacement therapy. *Dig. Dis.* **2020**, *38*, 53–68.
20. Pathanki, A.M.; Attard, J.A.; Bradley, E.; Powell-Brett, S.; Dasari, B.V.M.; Isaac, J.R.; Roberts, K.J.; Chatzizacharias, N.A. Pancreatic exocrine insufficiency after pancreaticoduodenectomy: Current evidence and management. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **2020**, *11*, 20–31.
21. Vujasinovic, M.; Valente, R.; Thorell, A.; Rutkowski, W.; Haas, S.L.; Arnelo, U.; Martin, L.; Löhr, J.M. Pancreatic exocrine insufficiency after bariatric surgery. *Nutrients* **2017**, *9*, 1241.
22. Singh, V.K.; Haupt, M.E.; Geller, D.E.; Hall, J.A.; Quintana Diez, P.M. Less common etiologies of exocrine pancreatic insufficiency. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 7059–7076.
23. Raphael, K.L.; Chawla, S.; Kim, S.; Keith, C.G.; Propp, D.R.; Chen, Z.N.; Woods, K.E.; Keilin, S.A.; Cai, Q.; Willingham, F.F. Pancreatic insufficiency secondary to tobacco exposure: A controlled cross-sectional evaluation. *Pancreas* **2017**, *46*, 237–243.
24. Pezzilli, R. Chronic pancreatitis: Maldigestion, intestinal ecology and intestinal inflammation. *World J. Gastroenterol.* **2009**, *15*, 1673–1676.

25. Shintakuya, R.; Uemura, K.; Murakami, Y.; Kondo, N.; Nakagawa, N.; Urabe, K.; Okano, K.; Awai, K.; Higaki, T.; Sueda, T. Sarcopenia is closely associated with pancreatic exocrine insufficiency in patients with pancreatic disease. *Pancreatology* **2017**, *17*, 70–75.
26. Bachmann, J.; Ketterer, K.; Marsch, C.; Fechtner, K.; Krakowski-Roosen, H.; Büchler, M.W.; Friess, H.; Martignoni, M.E. Pancreatic cancer related cachexia: Influence on metabolism and correlation to weight loss and pulmonary function. *BMC Cancer* **2009**, *9*, 255.
27. Partelli, S.; Frulloni, L.; Minniti, C.; Bassi, C.; Barugola, G.; D'Onofrio, M.; Crippa, S.; Falconi, M. Faecal elastase-1 is an independent predictor of survival in advanced pancreatic cancer. *Dig. Liver Dis.* **2012**, *44*, 945–951.
28. De La Iglesia-Garcia, D.; Vallejo-Senra, N.; Lopez-Lopez, A.; Prada-Ramallal, G.; Iglesias-Garcia, J.; Larino-Noia, J.; Nieto-Garcia, L.; Dominguez-Munoz, J.E. Effect of pancreatic exocrine and endocrine insufficiency in cardiovascular events in patients with chronic pancreatitis (CP). A prospective cohort study. *Pancreatology* **2018**, *18*, S170–S171.
29. Dominguez-Munoz, J.E.; Phillips, M. Nutritional therapy in chronic pancreatitis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **2018**, *47*, 95–106.
30. Pezzilli, R. Applicability of a checklist for the diagnosis and treatment of severe exocrine pancreatic insufficiency: A survey on the management of pancreatic maldigestion in Italy. *Panminerva Med.* **2016**, *58*, 245–252.
31. Pezzilli, R.; Capurso, G.; Falconi, M.; Frulloni, L.; Macarri, G.; Costamagna, G.; Di Leo, A.; Salacone, P.; Carroccio, A.; Zerbi, A. The applicability of a checklist for the diagnosis and treatment of exocrine pancreatic insufficiency: Results of the Italian exocrine pancreatic insufficiency registry. *Pancreas* **2020**, *49*, 793–798.
32. Lindkvist, B.; Dominguez-Munoz, J.E.; Luaces-Regueira, M.; Castineiras-Alvarino, M.; Nieto-Garcia, L.; Iglesias-Garcia, J. Serum nutritional markers for prediction of pancreatic exocrine insufficiency in chronic pancreatitis. *Pancreatology* **2012**, *12*, 305–310.
33. Afghani, E.; Sinha, A.K.; Singh, V. An overview of the diagnosis and management of nutrition in chronic pancreatitis. *Nutr. Clin. Pract.* **2014**, *29*, 295–311.
34. Pezzilli, R.; Andriulli, A.; Bassi, C.; Balzano, G.; Cantore, M.; Delle Fave, G.; Falconi, M. Exocrine pancreatic insufficiency in adults: A shared position statement of the Italian association for the study of the pancreas. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 7930–7946.
35. Vanga, R.R.; Tansel, A.; Sidiq, S.; El-Serag, H.B.; Othman, M.O. Diagnostic performance of measurement of fecal elastase-1 in detection of exocrine pancreatic

- insufficiency: Systematic review and meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *16*, 1220–1228.
36. Sikkens, E.C.; Cahen, D.L.; van Eijck, C.; Kuipers, E.J.; Bruno, M.J. The daily practice of pancreatic enzyme replacement therapy after pancreatic surgery: A northern European survey: Enzyme replacement after surgery. *J. Gastrointest. Surg.* **2012**, *16*, 1487–1492.
  37. Sikkens, E.C.; Cahen, D.L.; van Eijck, C.; Kuipers, E.J.; Bruno, M.J. Patients with exocrine insufficiency due to chronic pancreatitis are undertreated: A Dutch national survey. *Pancreatology* **2012**, *12*, 71–73.
  38. Forsmark, C.E.; Tang, G.; Tuft, M.; Xu, H.; Hughes, S.J.; Yadav, D. Oral pancreatic enzyme replacement therapy (PERT) in patients with pancreatic cancer (PCa) is infrequent and suboptimal: A national level analysis. *Pancreas* **2017**, *46*, 1400.
  39. Forsmark, C.; Tang, G.; Xu, H.; Yadav, D. Oral pancreatic enzyme replacement therapy (PERT) in chronic pancreatitis (CP) is infrequent and often suboptimal: A national level analysis. *Gastroenterology* **2017**, *152*, S677.
  40. Akshintala, V.S.; Talukdar, R.; Singh, V.K.; Goggins, M. The Gut microbiome in pancreatic disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *17*, 290–295.
  41. Nishiyama, H.; Nagai, T.; Kudo, M.; Okazaki, Y.; Azuma, Y.; Watanabe, T.; Goto, S.; Ogata, H.; Sakurai, T. Supplementation of pancreatic digestive enzymes alters the composition of intestinal microbiota in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *495*, 273–279.
  42. Hamada, S.; Masamune, A.; Nareshima, T.; Simosegawa, T. Differences in gut microbiota profiles between autoimmune pancreatitis and chronic pancreatitis. *Tohoku J. Exp. Med.* **2018**, *244*, 113–117.
  43. Hu, Y.; Teng, C.; Yu, S.; Wang, X.; Liang, J.; Bai, X.; Dong, L.; Song, T.; Yu, M.; Qu, J. *Inonotus obliquus* polysaccharide regulates gut microbiota of chronic pancreatitis in mice. *Amb Expr.* **2017**, *7*, 39.
  44. Li, K.; Zhuo, C.; Teng, C.; Yu, S.; Wang, X.; Hu, Y.; Ren, G.; Yu, M.; Qu, J. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on chronic pancreatitis and intestinal microbiota in mice. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 904–912.
  45. Leal-Lopes, C.; Velloso, F.J.; Campopiano, J.C.; Sogayar, M.C.; Correa, R.G. Roles of comensal microbiota in pancreas homeostasis and pancreatic pathologies. *J. Diabetes Res.* **2015**, *2015*, 284680.
  46. Memba, R.; Duggan, S.N.; Ni Chonchubhair, H.M.; Griffin, O.M.; Bashir, Y.; O'Connor, D.B.; Murphy, A.; McMahon, J.; Volcov, Y.; Ryan, B.M.; et al. The potential role of gut microbiota in pancreatic disease: A systematic review. *Pancreatology* **2017**, *17*, 867–874.

47. Roberts, K.J.; Bannister, C.A.; Schrem, H. Enzyme replacement improves survival among patients with pancreatic cancer: Results of a population based study. *Pancreatology* **2019**, *19*, 114–121.



# **Publicación 5**



## **Pancreatitis crónica: Análisis de los factores implicados en la progresión de la enfermedad**

Carmelo Diéguez Castillo<sup>1</sup>, Cristina Jiménez Luna<sup>2</sup>, José Luis Martín Ruíz<sup>1</sup>, José Carlos Prados Salazar<sup>2</sup>, Joaquina Martínez Galán<sup>3</sup>, Amanda Rocío González-Ramírez<sup>4</sup> y Octavio Caba Pérez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Aparato Digestivo. Hospital Universitario San Cecilio. Granada.  
Email: jlmartin@ugr.es

<sup>2</sup>Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER). Centro de Investigación Biomédica (CIBM). Universidad de Granada. Granada. Email: crisjilu@ugr.es; jcprados@ugr.es; ocaba@ugr.es

<sup>3</sup>Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitatio Virgen de las Nieves. Granada.  
Email: jmgalan22@hotmail.com

<sup>4</sup>Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.Granada). Granada. Email: agonzalez@fibao.es

## Resumen

**Antecedentes y propósito del estudio:** Existe un amplio espectro de factores de riesgo asociados a la pancreatitis crónica (PC), aunque el consumo de alcohol y tabaco están considerados los más importantes. El objetivo que nos planteamos fue analizar la implicación de los factores etiológicos tabaco y alcohol y de la terapia sustitutiva con enzimas pancreáticas (TESP) en la progresión de la PC.

**Métodos:** En el presente estudio prospectivo y longitudinal se reclutó un total de 50 pacientes con diagnóstico de PC que fueron agrupados en función de las variables tabaco, alcohol y TSEP. Posteriormente, se analizaron diferentes variables y analíticas implicadas en la progresión de la enfermedad.

**Resultados:** El grupo de pacientes con TSEP mostró un mayor porcentaje de diabéticos, menor necesidad de tratamiento endoscópico y normalización del índice de masa corporal, aunque con algunos parámetros nutricionales alterados. El grupo con consumo de tabaco y alcohol tuvo un peor control glucémico. El grupo de tabaco mostró niveles bajos de calcio y vitamina D y aumento de reactantes de fase aguda. Por último, el grupo de alcohol, que presentó un rango de edad medio mayor, no presentó una asociación con la dosis.

**Conclusiones:** Conseguimos demostrar una asociación positiva en el desarrollo de la insuficiencia pancreática tanto exocrina como endocrina. También observamos como la TSEP disminuye la necesidad de tratamiento al mejorar el perfil nutricional. Por último, los factores tabaco y alcohol claramente favorecen la progresión de la PC, induciendo el tabaco un estado proinflamatorio.

## Palabras clave

Pancreatitis crónica. Progresión. Terapia sustitutiva con enzimas pancreáticas. Hábito tabáquico. Hábito alcohólico.

## Introducción

La pancreatitis crónica (PC) es una patología que se caracteriza por la inflamación y la cicatrización progresiva y crónica del páncreas, que le ocasiona un daño irreversible y la consiguiente pérdida de su función exocrina y endocrina (1). La progresión de la PC hacia insuficiencia pancreática se ha utilizado para clasificar su evolución en 3 estadios: El A se define por la ausencia de insuficiencia pancreática así como de complicaciones asociadas; dentro del estadio B se presentan complicaciones, como la trombosis de la vena esplénica, la estenosis biliar o duodenal o la presencia de pseudoquistes; por último, en el estadio C se desarrolla insuficiencia pancreática exocrina (IPE), endocrina (*diabetes mellitus*) o ambas (2).

El tratamiento de la PC va dirigido a eliminar aquellos factores etiológicos que favorecen la progresión de la enfermedad, controlar los síntomas (dolor abdominal crónico, IPE) y resolver las complicaciones derivadas de la misma (1). La piedra angular en el tratamiento de la IPE es la terapia sustitutiva con enzimas pancreáticas (TSEP) para normalizar la digestión, aliviar los síntomas asociados y lograr un estado nutricional normal. La finalidad última es prevenir la morbilidad asociada a la malnutrición y evitar la progresión de la enfermedad (3,4).

La PC puede estar producida por múltiples factores, entre los que se encuentran factores tóxicos (consumo de alcohol y tabaco), metabólicos (hipercalcemia), genéticos (mutaciones en genes *PRSS1*, *SPINK1*, *CFTR* y *CTCR*), inmunológicos (pancreatitis autoinmune), inflamatorios (pancreatitis aguda) y obstructivos (obstrucción del conducto pancreático) (5). A pesar de este amplio espectro de factores de riesgo, el consumo de alcohol y tabaco están considerados los más relevantes, de forma individual incrementando el riesgo de progresión de la patología, y multiplicándose cuando se asocian ambos (6).

El consumo de alcohol es el factor de riesgo más común en PC, considerándose dosis dependiente. Sin embargo, la incidencia de esta patología en individuos con un consumo excesivo de alcohol es relativamente baja, poniendo de manifiesto el desconocimiento de la patogénesis de este mecanismo (7). Por su parte, el hábito tabáquico constituye un factor de riesgo independiente y dosis dependiente para la PC, contribuyendo, claramente, en la progresión de la pancreatitis aguda a crónica (8). El objetivo del presente estudio fue analizar la implicación de los factores etiológicos tabaco y alcohol y de la TESP, como medida terapéutica, en la progresión de la PC.

## **Material y métodos**

### Diseño del estudio y selección de la muestra

Presentamos un estudio prospectivo y longitudinal en pacientes con diagnóstico de PC, para evaluar el papel de la TSEP y los principales agentes etiológicos (consumo de tabaco y alcohol) en la progresión de la enfermedad.

El período de reclutamiento quedó comprendido entre febrero de 2015 y junio de 2016. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito para formar parte del estudio. Los diferentes ensayos se realizaron de acuerdo con los requisitos establecidos en la Declaración de Helsinki y la legislación española actual. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario San Cecilio de Granada.

Se obtuvo de la base de datos del programa Archinet un listado de todos los pacientes con PC que habían sido valorados en la Unidad de Gestión Clínica de Aparato Digestivo del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Posteriormente, se comprobó que los seleccionados cumplían los criterios diagnósticos de PC y que habían sido valorados en consulta en los 2 últimos años para proceder a su reclutamiento. El diagnóstico de PC se definió por alteraciones morfológicas tanto ductales como parenquimatosas, evidenciadas mediante pruebas de imagen o hallazgos histopatológicos obtenidos a través de biopsia o pieza quirúrgica. Se incluyeron aquellos pacientes que, cumpliendo las premisas anteriores y siendo mayores de edad, dieron su consentimiento al estudio. Se excluyeron aquellos pacientes que rechazaron participar en el estudio, se perdieron en el seguimiento o desarrollaron adenocarcinoma de páncreas.

### Procedimientos del estudio

Los sujetos incluidos en el estudio se sometieron a la extracción de una muestra de sangre periférica (20 c.c.) para realización de una analítica de parámetros nutricionales. Además, se concertó una entrevista médica para la recogida de otras variables recogidas en la base de datos. Se estableció un período de seguimiento de 18 meses, y durante dicho período se analizó el desarrollo de complicaciones, eventos cardiovasculares y la necesidad de ingreso hospitalario.

### Análisis estadístico

Se describió el perfil de la población de estudio. Se emplearon medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas y de distribución de frecuencias absolutas y relativas para variables categóricas. Los resultados de las variables categóricas se han expresado en porcentajes.

Se utilizó el test de Chi-cuadrado para comparar proporciones entre grupos y cuando, éste no cumplía las condiciones de validez, se aplicó el test exacto de Fisher. Obedeciendo al tamaño de la muestra se utilizaron métodos no paramétricos en el análisis de los datos.

Para analizar las diferencias entre los valores medios de las variables cuantitativas de grupos independientes se utilizó la prueba no paramétrica “U Mann-Whitney”, siendo los valores a comparar los rangos promedios. Se utilizó el test de Kruskal-Wallis para comparar diferencias medias en más de dos grupos.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa IBM-SPSS (Versión 21.0). El nivel de significación para este estudio fue considerado para  $p < 0,05$ .

## Resultados

Nuestro estudio incluyó un total de 50 pacientes diagnosticados de PC con una edad media de  $54,82 \pm 12,30$ , teniendo el más joven 19 y el mayor 79 años. En cuanto a la distribución por sexo, 41 pacientes eran varones y 9 mujeres. El total de la muestra fue de raza caucásica (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características de los pacientes con pancreatitis crónica.

<b>Característica</b>	
<i>N</i>	50
Edad media	54.82
<i>Sexo</i>	
Hombre	41 (82%)
Mujer	9 (18%)
Caucásico	50 (100%)
<i>Estadio</i>	
A	6 (12%)
B	9 (18%)
C	35 (70%)
<i>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</i>	
Sobrepeso (> 25)	16 (32%)

Normopeso	28 (56%)
Bajopeso (< 18)	6 (12%)
<i>Diabetes mellitus</i>	25 (50%)
Tipo 1-2	12 (48%)
Tipo 3c	13 (52%)
<i>Tiempo desde el diagnóstico</i>	
< 12 años	42 (84%)
> 12 años	8 (16%)
<i>Test diagnóstico</i>	
Ultrasonografía endoscópica	36 (72%)
Tomografía computarizada	9 (18%)
Ultrasonografía abdominal	3 (6%)
Informe patológico	2 (4%)
<i>Etiología</i>	
Tóxica	33 (66%)
Idiopática	11 (22%)
Autoinmune	4 (8%)
Pancreas divisum	2 (4%)
<i>Hábito alcohólico</i>	
No bebedor	17 (34%)
Bebedor	33 (66%)
<i>Hábito tabáquico</i>	
No fumador	11 (22%)
Fumador	39 (78%)
<i>Insuficiencia pancreática exocrina</i>	
Sí	30 (60%)
No	20 (40%)



<i>Tratamiento</i>	
Tratamiento enzimático sustitutivo	28 (56%)
Endoscópico	7 (14%)
Quirúrgico	11 (22%)
Analgésico	29 (58%)
Antidiabéticos orales / insulina	24 (48%)
Estatinas / fibratos	16 (32%)
<i>Eventos cardiovasculares</i>	
	4 (8%)
<i>Dolor abdominal</i>	
	23 (46%)
<i>Diarrea</i>	
	11 (22%)

En nuestra población, la causa de PC más frecuente fue la tóxica (66 %), entendiéndose como aquella debida al consumo de alcohol y/o tabaco. De tal modo, 33 sujetos habían sido bebedores o seguían bebiendo activamente y 39 eran exfumadores o fumadores activos. La segunda causa más frecuente fue la idiopática (22 %), dentro de la cual se incluyeron 3 casos con alta sospecha de causa genética: en un caso por la edad precoz de debut de la enfermedad y en los otros dos casos por la agregación familiar (padre e hija).

Las medidas terapéuticas más extendidas en nuestra población de estudio fueron el tratamiento analgésico (58 %), seguida de la TSEP (56 %) y de la administración de antidiabéticos orales/insulina (48 %).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las variables de estudio (TSEP, hábito tabáquico y alcohólico) y el desarrollo de complicaciones, eventos cardiovasculares y la necesidad de ingreso hospitalario (Tabla 2).

**Tabla 2.** Complicaciones en pacientes con pancreatitis crónica.

<b>Complicaciones</b>	
<i>Número de complicaciones</i>	
0	21 (42%)
1	17 (34%)

>1	12 (24%)
<i>Tipo de complicación</i>	
Pseudoquiste	25 (86.2%)
Absceso	2 (6.9%)
Estenosis biliar	13 (44.8%)
Estenosis duodenal	1 (3.4%)
Trombosis esplenoportal	13 (10.3%)

*\*El porcentaje de los distintos tipos de complicación se ha calculado en base al total de individuos que presentan complicaciones (n=29).*

#### Grupo con terapia sustitutiva con enzimas pancreáticas

Dentro de este grupo de pacientes encontramos un 64,3 % que eran diabéticos frente a un 35,7 % que no lo eran ( $p = 0,023$ ). La gran mayoría (95,2 %) tenía un IMC considerado normal, frente al restante 4,8% que presentaron todos bajo peso. Observamos que el 75 % de los pacientes de este grupo no necesitó tratamiento endoscópico ( $p = 0,014$ ). Además, un amplio porcentaje de ellos (64,3 %) también estaba en tratamiento con antidiabéticos orales o insulina ( $p = 0,013$ ).

A nivel de parámetros sanguíneos, existían diferencias significativas entre los rangos promedios de los niveles de glucosa, siendo mayor el valor en los pacientes de este grupo (29,43) frente a los que no tomaban TSEP (20,75) ( $p = 0,041$ ). También se observaron diferencias significativas en la variable HbA1c, apareciendo un rango promedio más elevado (25,56) en estos pacientes, frente al promedio del resto de pacientes (17,06) ( $p = 0,028$ ).

Además, en la prealbúmina también se evidenciaron diferencias entre los valores de los rangos promedios, siendo significativamente menor dicho valor en los pacientes con TSEP vs. grupo sin esta terapia (19,62 vs. 29,43;  $p = 0,015$ ). Por último, el magnesio también mostró diferencias estadísticamente significativas, siendo menor este valor (21,39) en los pacientes con TSEP, frente al de los que no la tomaban (30,73).

### Grupo con hábito tabáquico

Dentro del grupo de pacientes con hábito tabáquico, la mayoría presentaba PC con estadio C (70,7 %). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los rangos promedios en la variable glucosa, siendo mayor dicho rango (27,78) en estos pacientes, frente al rango promedio de los que no presentan hábito tabáquico (17,41). También en los valores de vitamina D, siendo menor dicho rango en los pacientes con hábito tabáquico (21,75 vs. 31,36). Por último, también se observaron diferencias en la variable calcio, siendo menor dicho rango dentro de este grupo (25,35 vs. 26,05).

Por otro lado, también existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los rangos promedios de linfocitos, siendo mayor dicho rango en los pacientes con hábito tabáquico (27,42 vs. 14,68), y en los rangos promedios de leucocitos, siendo mucho mayor frente a los que no presentan hábito tabáquico (28,76 vs. 13,95).

### Grupo con hábito alcohólico

Dentro del grupo de pacientes con hábito alcohólico, también observamos como la gran mayoría de los mismos (96,3 %) presentaban PC en un estadio C ( $p = 0,0013$ ). Además, era mayoritarios los varones y también los que presentaban hábito tabáquico (93,9 %, en ambos casos).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,043$ ) entre los valores de los rangos promedios en la variable edad, de manera que en el grupo con hábito alcohólico este valor era de 28,48 y en el grupo sin hábito alcohólico 19,71. A nivel de parámetros en sangre, tan sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la variable glucosa, siendo mayor dicho dato en los pacientes con hábito alcohólico frente a los que no lo tenían (28,56 vs. 19,56).

## **Discusión**

La TSEP en la PC está indicada en caso de test de función pancreática alterado junto con signos antropométricos y/o analíticos de malnutrición (9). En nuestra población de estudio, se mostró que los pacientes con TSEP tienden a presentar un índice de masa corporal (IMC) normal, entendiéndose por ello los valores comprendidos entre 18 y 25. Del total de pacientes que tomaban TSEP, la mayoría presentaba elastasa fecal alterada, siendo esto considerado como marcador de la presencia de IPE. Es por ello que nuestros resultados muestran que la TSEP ayuda a mantener un peso normal en

estos pacientes, dato que ya ha sido demostrado en otros estudios (10,11). La pérdida de peso menos acusada fue uno de los efectos ya observados en un trabajo previo de Kalh et al. (2014), en el que se administraba TSEP a pacientes con pancreatitis aguda severa (12). No obstante, el IMC puede llevar a malinterpretaciones, ya que no permite valorar el global de la composición corporal, pudiendo darse valores normales del mismo aunque el paciente presente sarcopenia o alteración de los fluidos (13).

Los niveles de prealbúmina y magnesio son dos parámetros empleados para la valoración nutricional en diferentes tipos de pacientes, de manera que, valores alterados de los mismos, son indicativos de malabsorción de macro y micronutrientes, respectivamente. De este modo, en nuestro estudio observamos como los niveles alterados de ambos parámetros se dan en un número mayor de pacientes dentro del grupo con TSEP. Estos resultados pueden explicarse por la presencia de un tratamiento subóptimo, bien por la administración de una dosis insuficiente, una posología inadecuada, la ausencia de coadyuvancia con un inhibidor de la bomba de protones o un sobrecrecimiento bacteriano (4).

Según las últimas guías de diagnóstico y tratamiento de la PC, el tratamiento endoscópico está indicado en pacientes con patología dolorosa, sin complicaciones y con dilatación del conducto pancreático principal, tras fracaso del tratamiento médico (9). Si bien no está claro el papel de la TSEP en el manejo del dolor en la PC (3), en nuestro estudio se ve, claramente, una disminución de la necesidad de tratamiento endoscópico en los pacientes con este tipo de tratamiento. Otros estudios ya han descrito una mejoría del dolor abdominal atribuido a la maldigestión por la IPE, en pacientes de PC sometidos a tratamiento con TSEP (11).

La cirugía pancreática es otra de las indicaciones para la TSEP (14,15). Este dato se corrobora en nuestro estudio, evidenciándose una asociación positiva entre el tratamiento quirúrgico de la PC y la administración de TSEP. Además, la destrucción del parénquima pancreático en la PC produce una pérdida funcional, tanto exocrina como endocrina (5,16), de ahí que exista una asociación positiva entre el tratamiento con TSEP de la IPE y la *diabetes mellitus*, como hemos podido observar en nuestro estudio.

Por otro lado, está demostrado que el tabaco favorece el desarrollo de insuficiencia pancreática, tanto exocrina como endocrina (17), lo cual define el estadio C de la PC. Efectivamente, dentro de los resultados que hemos obtenidos, observamos como existe un mayor número de pacientes con PC estadio C dentro del grupo de fumadores. Este hábito, al favorecer el desarrollo de la IPE y, por tanto, de la diabetes pancreatogénica,

hace que el grupo de fumadores muestre niveles de glucosa elevados respecto a los otros pacientes.

Además, aunque el mecanismo que subyace no está del todo claro, el hábito tabáquico también se ha relacionado con el fenómeno de osteoporosis. Algunos autores defienden que el consumo de tabaco tiene una correlación negativa con la ingesta de calcio, haciendo referencia directamente al estilo de vida de los individuos (18). En nuestro estudio observamos como los fumadores muestran niveles de calcio en sangre más bajos. Sin embargo, según otros autores, el tabaco produce un aumento de la reabsorción ósea, lo cual justificaría niveles más elevados de calcio (19).

También dentro del grupo de fumadores, nuestros resultados muestran niveles de vitamina D en sangre más bajos en este tipo de pacientes. Son numerosos los estudios que ya han mostrado que el hábito tabáquico aumenta el riesgo de hipovitaminosis D (20,21). Por ejemplo, en un estudio de 2015 Lee et al. demostraron una mayor asociación entre el déficit de vitamina D y reactantes de fase aguda (proteína C reactiva) en fumadores (22).

Está bien documentado como el tabaco tiene un acusado efecto proinflamatorio (17), lo cual explicaría que en nuestra población de estudio el grupo con este hábito muestre niveles de leucocitos más elevados, coincidiendo con resultados de otros estudios previos (23,24). Además, el tabaquismo es una conocida causa de linfocitosis subaguda/crónica (25,26). En nuestra población de estudio, dentro del grupo de PC con hábito tabáquico existían niveles de linfocitos más elevados, en coincidencia con los estudios anteriores.

El perfil de los sujetos con hábito alcohólico en nuestra población fue de varones con una edad media mayor, respecto al grupo sin dicho hábito. Este dato concuerda con las características demográficas del grupo de alto riesgo descrito dentro del estudio de patrones de consumo de alcohol en España (27). En nuestro estudio no diferenciamos el consumo de alcohol por la cantidad, ya que no existe una clara relación dosis dependiente en su implicación en el desarrollo de PC, aunque sí se ha evidenciado una fuerte asociación entre el consumo de alcohol y el de tabaco.

Al igual que ocurre con el hábito tabáquico, los individuos con hábito alcohólico progresaban en mayor número a estadio C. La pérdida de la función exocrina se explica ya que el alcohol constituye el principal factor de riesgo para el desarrollo de PC, que a su vez es la primera causa de IPE. Al igual que en nuestra muestra, se ha demostrado en otras poblaciones una fuerte asociación entre el consumo de alcohol y el desarrollo

de diabetes (28). En concordancia con esto, en nuestro estudio el grupo de pacientes con hábito alcohólico presentó niveles de glucemia en sangre más elevados que en el resto de pacientes.

En conclusión, en nuestro estudio hemos demostrado como la pérdida funcional que se da en la pancreatitis crónica se produce, de forma concomitante, tanto a nivel exocrino (IPE) como endocrino (*diabetes mellitus*). La TSEP ha demostrado capacidad para normalizar los parámetros de IMC en estos pacientes, aunque otros parámetros analíticos muestran niveles alterados, por lo que parece necesario personalizar su tratamiento. Por otro lado, hemos visto como este tipo terapia disminuye la necesidad de tratamiento endoscópico y es indispensable en aquellos sujetos que reciben tratamiento quirúrgico con resección pancreática. Tanto el consumo de tabaco como de alcohol han demostrado favorecer la progresión de la pancreatitis crónica, con pérdida funcional exocrina y endocrina. El hábito tabáquico altera el metabolismo óseo en pacientes con esta patología, que muestran niveles más bajos de calcio y de vitamina D, además de relacionarse con un estado proinflamatorio, que hace que aparezcan niveles más elevados de leucocitos y linfocitos.

### **Agradecimientos**

El presente trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía, código PC-0549-2017.

### **Bibliografía**

1. Singh VK, Yadav D, Garg PK. Diagnosis and Management of Chronic Pancreatitis: A Review. JAMA 2019;322: 2422-34. DOI: 10.1001/jama.2019.19411
2. Kleeff J, Whitcomb DC, Shimosegawa T, et al. Chronic Pancreatitis. Nat Rev Dis Primers 2017;3: 17060. DOI: 10.1038/nrdp.2017.60
3. Capurso G, Traini M, Piciocchi M, et al. Exocrine Pancreatic Insufficiency: Prevalence, Diagnosis, and Management. Clin Exp Gas troenterol 2019;12: 129-39. DOI: 10.2147/CEG.S168266
4. Domínguez-Muñoz JE. Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency. Curr Opin Gastroenterol 2018;34: 349-54. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000459
5. Stram M, Liu S, Singhi AD. Chronic Pancreatitis. Surg Pathol Clin 2016; 9:643-59. DOI: 10.1016/j.path.2016.05.008
6. Singhvi A, Yadav D. Myths and realities about alcohol and smoking in chronic pancreatitis. Curr Opin Gastroenterol 2018;34: 355-61. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000466

7. Barry K. Chronic Pancreatitis: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician* 2017;97: 385-93.
8. Majumder S, Chari ST. Chronic pancreatitis. *Lancet* 2016;387: 1957-66. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00097-0
9. Lörh JM, Dominguez-Muñoz E, Rosendahl J, et al. United European Gastroenterology evidence-based guidelines for the diagnosis and therapy of chronic pancreatitis (HaPanEU). *United European Gastroenterol J* 2017;5: 153-99. DOI: 10.1177/2050640616684695
10. Thorat V, Reddy N, Bhatia S, et al. Randomised clinical trial: the efficacy and safety of pancreatin enteric-coated minimicrospheres (Creon 40000 MMS) in patients with pancreatic exocrine insufficiency due to chronic pancreatitis – a double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;36: 426-36. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2012.05202.x
11. Ramesh H, Reddy N, Bhatia S, et al. A 51-week, open-label clinical trial in India to assess the efficacy and safety of pancreatin 40000 enteric-coated minimicrospheres in patients with pancreatic exocrine insufficiency due to chronic pancreatitis. *Pancreatol* 2013;13: 133-9. DOI: 10.1016/j.pan.2013.01.009
12. Kalh S, Schütte K, Glasbrenner B, et al. The effect of oral pancreatic enzyme supplementation on the course and outcome of acute pancreatitis: a randomized, double-blind parallel-group study. *JOP* 2014;15: 165-74. DOI: 10.6092/1590-8577/797
13. Rasmussen HH, Irtun O, Olesen SS, et al. Nutrition in chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2013;19: 7267-75. DOI: 10.3748/wjg.v19.i42.7267
14. Whitcomb DC, Lehman GA, Vasileva G, et al. Pancrelipase delayed-release capsules (CREON) for exocrine pancreatic insufficiency due to chronic pancreatitis or pancreatic surgery: a double-blind randomized trial. *Am J Gastroenterol* 2011;106: 1177-8. DOI: 10.1038/ajg.2010.201
15. Gubergrits N, Malecka-Panas E, Lehman GA, et al. A 6-month, open-label clinical trial of pancrelipase delayed-release capsules (Creon) in patients with exocrine pancreatic insufficiency due to chronic pancreatitis or pancreatic surgery. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33: 1152-61. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04631.x
16. Duggan SN. Negotiating the complexities of exocrine and endocrine dysfunction in chronic pancreatitis. *Proc Nutr Soc* 2017;76: 484-94. DOI: 10.1017/S0029665117001045
17. Sliwiska-Mosson M, Milnerowicz S, Milnerowicz H. Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c): the effect of smoking on the exocrine-endocrine

- interactions of the pancreas. *Diab Vasc Dis Res* 2018;15: 243-59. DOI: 10.1177/147964118764062
18. Breitling LP. Smoking as an effect modifier of the association of calcium intake with bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100: 626-35. DOI: 10.1210/jc.2014-2190
  19. Szulc P, Garnero P, Claustrat B, et al. Increased bone resorption in moderate smokers with low body weight: the Minos study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87: 666-74. DOI: 10.1210/jcem.87.2.8232
  20. Wyskida M, Wieczorowska-Tobis K, Chudek J. Prevalence and factors promoting the occurrence of vitamin D deficiency in the elderly. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2017;71: 198-204. DOI: 10.5604/01.3001.0010.3804
  21. Merlijn T, Swart KMA, Lips P, et al. Prediction of insufficient serum vitamin D status in older women: a validated model. *Osteoporos Int* 2018;29: 1539-47. DOI: 10.1007/s00198-018-4410-3
  22. Lee H, Kim KN, Lim YH, et al. Interaction of vitamin D and smoking on inflammatory markers in the urban elderly. *J Prev Med Public Health* 2015;48: 249-56. DOI: 10.3961/jpmph.15.042
  23. Freedman DS, Flanders WD, Barboriak JJ, et al. Cigarette smoking and leukocyte subpopulations in men. *Ann Epidemiol* 1996;6: 299-306. DOI: 10.1016/s1047-2797(96)00024-5
  24. Terashima T, Wiggs B, English D, et al. The effect of cigarette smoking on the bone marrow. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155: 1021-6. DOI: 10.1164/ajrccm.155.3.9116981
  25. García-Candel A, Melero Amor A, Gómez-Espuch J, et al. Protocolo diagnóstico de las linfocitosis agudas y crónicas. *Medicine* 2012;11: 1317-20. DOI: 10.1016/S0304-5412(12)70456-0
  26. Gumus F, Solak I, Eryilmaz MA. The effects of smoking on neutrophil/lymphocyte, platelet/lymphocyte ratios. *Bratisl Lek Listy* 2018;119: 116-9. DOI: 10.4149/BLL\_2018\_023
  27. Galán I, González MJ, Valencia-Martín JL. Patrones de consumo de alcohol en España: un país de transición. *Rev Esp Salud Pública* 2014;88: 529-40. DOI: 10.4321/S1135-57272014000400007
  28. Lim J, Lee JA, Cho HJ. Association of Alcohol Drinking Patterns With Presence of Impaired Fasting Glucose and Diabetes Mellitus Among South Korean Adults. *J Epidemiol* 2018;28: 117-24. DOI: 10.2188/jea.JE20170021