



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Evaluación de la disfunción del esfínter esofágico inferior y de la respuesta inflamatoria local y sistémica en pacientes con diagnóstico de ERGE

T E S I S

QUE OPTAR POR EL GRADO DE :

Maestría en ciencias médicas

QUE PRESENTA:

Luis Raúl Valdovinos García

TUTOR:

Dr. Gonzalo Manuel Torres Villalobos

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

CIUDAD DE MÉXICO

DICIEMBRE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. CARLOS ALBERTO AGUILAR SALINAS
COORDINADOR DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”

DR. GONZALO MANUEL TORRES VILLALOBOS
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
“SALVADOR ZUBIRÁN”

DR. LUIS RAÚL VALDOVINOS GARCÍA
ALUMNO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
“SALVADOR ZUBIRÁN”

ABREVIATURAS

ERGE: Enfermedad por reflujo gastroesofágico
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana
VHC: Virus de hepatitis C
VIP: Péptido intestinal vaso activo
GABA: Ácido gama-amino-butírico
IBP: Inhibidor de la bomba de protones
Imc: índice de masa corporal
mts: Metros
kg: Kilogramos
IL: Interleucina
MMP: Metalopeptidasa de matriz
INF: Interferón
TGF: Factor de crecimiento transformante
FAS: Antígeno de apoptosis
CD: Cumulo de diferenciación
Th: Células T ayudantes
ANAS: Anticuerpo antinucleares
PCR: Proteína C reactiva
VSG: Velocidad de sedimentación globular
Cr: Creatinina
PLQ: Plaquetas
BT: Bilis Total
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
TIMP: Inhibidor tisular de metalopeptidasa
kg/m²: Peso sobre talla al cuadrado
IC-C: Índice cintura cadera
p: Probabilidad
mm: Milímetros
m: Metros
pH: Potencial hidrogeno
EEI: Esfínter esofágico inferior
EES: Esofágico superior
IRP: Integral de la presión de relajación

LD: Latencia distal

DCI: Integral de la contracción distal

CFV: Velocidad del frente contráctil

EUG: Unión esófago gástrica

IS: Índice de síntomas

PAS: Probabilidad de asociación a síntoma

PSPW: post- reflux swallow-induced peristaltic wave (onda peristáltica postreflujo inducida por trago)

P 25-75: percentil 25 y 75

OMG: Organización mundial de la salud

FDA: Food and drug administration

DS: Desviación estándar

ES: Error estándar

ANOVA: Análisis de varianza

Min: Mínima

Max: Máxima

IC: Intervalo de confianza

GERD-HRDQR: Cuestionario sobre calidad de vida relacionada a salud en enfermedad por reflujo gastroesofágico

GERD-Q: Cuestionario sobre enfermedad por reflujo gastroesofágico

EAT-10: Herramienta de evaluación del comer

ÍNDICE

PORTADA

ABREVIATURAS

ANTECEDENTES

MARCO TEÓRICO

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

Objetivo General

Objetivo Especifico

PACIENTES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Población del estudio

Grupos de estudio

Lugar del estudio

Periodo de tiempo

Tamaño de la Muestra

Criterios de inclusión

Criterios de exclusión

Variables

Procedimientos

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

APÉNDICES

ANTECEDENTES.

I. MARCO TEÓRICO.

La enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) es una de las principales patologías del aparato digestivo a la cual se enfrenta el gastroenterólogo en la práctica clínica diaria 1. ERGE se define por el consenso de Montreal como aquella condición que se desarrolla cuando el reflujo del contenido gástrico ocasiona síntomas o complicaciones problemáticas 2. La prevalencia de esta patología en Estados Unidos de Norteamérica (según la definición del consenso Montreal) es del 10 – 20% 3.

La ERGE tiene diferentes fenotipos clínicos definidos; 1) enfermedad erosiva su diagnóstico se basa en la observación directa de daño de la mucosa esofágica vía endoscópica (rupturas de la mucosa o erosiones), 2) enfermedad no erosiva es aquella en el que no se produce daño de la mucosa sin embargo encontramos reflujo ácido patológico en monitoreo de pH (exposición anormal al ácido), 3) esófago de Barrett una condición

premaligna relacionada a adenocarcinoma de esófago. El esófago de Barrett se diagnostica por sospecha endoscópica más confirmación histopatológica, en el estudio endoscópico se observa un cambio a una mucosa color asalmonada y en la histología se observa metaplasia intestinal de la mucosa esofágica

2.

Respecto a la fisiopatología de la enfermedad es bien conocido que existe un mecanismo de barrera el cual impide el retorno del contenido gástrico hacia el esófago. Este mecanismo de barrera está conformado por el esfínter esofágico inferior y la crura del diafragma. Este esfínter se encuentra ubicado entre la unión del esófago y cámara gástrica, puede ser reconocido mediante estudios morfológicos (histopatología) y funcionales (manometría esofágica de alta resolución). Morfológicamente se ha descrito como un engrosamiento de la capa muscular circular externa del esófago, este engrosamiento se puede observar fácilmente in vivo debido al tono muscular, esto quiere decir que

este aumento en el grosor es debido a la contracción muscular. Este fenómeno nos indica el carácter dinámico de esta región anatómica 4 y es el motivo por la cual anatómicamente es difícil de identificar como describir en estudios post mortem. En estudios funcionales se facilita la identificación de esta región con la manometría esofágica de alta resolución, se reconoce como una zona de aumento de la presión basal de esófago que puede medir entre 2 y 4 cm de longitud y esta ubicada en el tercio distal del esófago 5.

Pero no solo el musculo circular esofágico funciona como esfínter, el diafragma que es el principal musculo de la respiración en los mamíferos funciona como mecanismo coadyuvante al musculo circular del esófago y el diafragma influye en la presión en reposo de esfínter esofágico inferior, y esto es más visible en pacientes que tienen hernia hiatal (en esta enfermedad existe una separación entre la crura del diafragma y el esfínter esofágico inferior) presentan una presión basal del esfínter esofágico inferior

menor comparado con aquellos pacientes que no tienen hernia hiatal.

El diafragma se divide en dos: crural y costal, el primero coadyuvante del mecanismo de barrera del esfínter esofágico inferior y el segundo en función de la respiración 6. El diafragma crural presenta un orificio el cual funciona como canal vertical para el paso del esófago, este canal puede ser dividido en dos, uno superior y otro inferior. La parte superior es muscular y mide alrededor de 2.5 cm de longitud, la parte inferior forma un canal rodeado por el músculo crural derecho en la parte posterior y lateral y por las fibras centrales las cuales tienen un aspecto circular rodean al esófago esto de forma cráneo caudal 7.

Ya que se habló de la anatomía del esfínter esofágico inferior es importante hablar de la fisiología en especial de el tono, que es mantenido por factores miogénicos, neurales y humorales 8. El factor miogénico es responsabilidad del músculo circular que

se encuentra en la parte distal del esófago, estudios post mortem se ha demostrado la presencia de mayor cantidad de alfa actina y cadenas ligeras 9. Desde un punto de vista electrofisiológico el musculo del esfínter esofágico inferior tiene un umbral de despolarización menor que el resto del esófago, esto se debe a la presencia de canales de cloro ausentes en el resto del musculo esofágico, estos canales son inactivados por el óxido nítrico y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) estos transmisores relajan el musculo del esfínter esofágico inferior al impedir el flujo de cloro¹⁰
¹¹ ¹².

Algunos neurotransmisores del sistema nervioso autónomo también mantienen acción en esta compleja región del organismo, la acetilcolina produce despolarización del músculo liso produciendo un mayor tono del esfínter esofágico inferior, esto se ha demostrado al aplicar atropina y bloquear los receptores colinérgicos una produciendo disminución del 50% al 70% del tono basal del EEI ¹³. Por otro lado la estimulación adrenérgica beta 1

y 2 disminuye el tono basal del esfínter esofágico inferior 14. Estos transmisores son liberados por medio del nervio vago el cual además libera, óxido nítrico, dopamina y epinefrina, este nervio esta en íntima relación con el núcleo del nervio vago y núcleo del tracto solitario. En estos núcleos se encuentran receptores para GABA (ácido gamaaminobutírico) que disminuyen la frecuencia de las degluciones, esta es la razón por la cual los agonistas de GABA disminuyen las relajaciones transitorias del EEI 15.

La fitopatología de la perdida de la función de este mecanismo de barrera es desconocido actualmente se ha descrito como multifactorial. De los múltiples factores descritos el más importante y estudiado es la disfunción del esfínter esofágico inferior 16 17. Esta disfunción se ha atribuido a relajaciones transitorias del esfínter esofágico inferior. Actualmente las relajaciones transitorias son uno de los mecanismos que mayor peso tiene en la fisiopatología de la enfermedad por reflujo gastroesofágico. Entre otros mecanismos descritos encontramos

hernia del hiato (disrupción entre el esfínter esofágico inferior y la crura diafragmática), retardo en el aclaramiento del ácido en el esófago (por alteraciones en la perístasis esofágica) este correlaciona con mayor daño en la mucosa esofágica, hipersensibilidad visceral (toma importancia presencia de pirosis funcional).

Estudios recientes apuestan a la inflamación de la mucosa como la responsable de la disminución del tono del EEI, se ha observado un aumento en la IL-1B la cual aumenta la cantidad de prostaglandina E2, esta última produce una relajación del EEI y bloquea la producción de prostaglandina F2a la cual contrae el EEI 18. Otro mecanismo encontrado es la disminución de la liberación de acetil colina esto secundario a la producción de IL-6 la cual incrementa la cantidad de H2O2 en el músculo este último produce liberación de factor activador de plaquetas y prostaglandina E2 19 20. También se han observado aumento de los niveles de IL-8 en pacientes con esofagitis y esto se presume es por aumento de la

cantidad de neutrófilos 21. La inflamación y la producción de prostaglandinas produce un aumento de óxido nítrico en el tejido esofágico así como aumento de la cantidad de inervaciones nitrgicas 22. El problema que todos los estudios sobre inflamación se han realizado en la mucosa actualmente no existe ningún estudio realizado en musculo del esfínter esofágico inferior.

La piedra angular del tratamiento para el enfermedad por reflujo gastroesofágico son los inhibidores de la bomba de protones (IBP) 1 23, estos ayudan a la cicatrización de la mucosa en pacientes con erosiones y alivio de síntomas, además estos parecen tener un efecto antiinflamatorio disminuyendo la producción de interleucinas en la mucosa 24. Con esto logramos reducir la sintomatología. Al no estar dirigidos estos medicamentos a contrarrestar el principal mecanismo fisiopatológico de la ERGE que es la disrupción del mecanismo de barrera nos encontramos con una cantidad considerable de pacientes requiere tratamiento de mantenimiento con inhibidores de bomba de protones y lo más

importante una buena proporción de pacientes que presentan falla sintomática al manejo sobre todo a la regurgitación. Es bien conocido que la ERGE no es producida por sobreproducción acida, además esta es una de la razones por la cual un porcentaje importante de los pacientes (10 a 40%) presentan una falla a la respuesta sintomática con IBP y este es el tipo de paciente que se presenta con mayor frecuencia en la práctica del gastroenterólogo

25.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Existe relación entre la disfunción del mecanismo de barrera de la unión gastroesofágica con una respuesta inflamatoria local (esfínter esofágico inferior) o sistémica en pacientes con diagnóstico de enfermedad por reflujo gastroesofágico?

III. JUSTIFICACIÓN.

Hasta la fecha se desconoce la causa de la disfunción del esfínter esofágico inferior en pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico, por estudios funcionales se ha descrito hipotensión muscular y relajaciones transitorias del músculo del esfínter esofágico inferior. No se han realizado estudios histológicos en el esfínter esofágico inferior en pacientes con esta patología con la intención de indagar la razón por la cual existe disfunción de este mecanismo de barrera anti-reflujo. Actualmente la piedra angular para el manejo de esta patología son los inhibidores de la bomba de protones gástrica con el fin de disminuir la secreción ácida, sin embargo el mecanismo por el cual se producen síntomas no es la hipersecreción ácida es la disfunción del esfínter. Por esta razón no todos los pacientes tiene una buena respuesta a esta terapéutica antisecretora. Son necesarias nuevas intervenciones capaces de modificar esta disfunción, esto se podría traducir en la capacidad para disminuir las complicaciones y sintomatología ocasionada por esta patología. Hasta el momento

no hay estudios a nivel mundial que evalúen la respuesta inflamatoria en el músculo del esfínter esofágico inferior en pacientes con ERGE.

IV. HIPÓTESIS.

Nula: No existe relación entre la respuesta inflamatoria local o sistémica en pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico.

Alternativa: Si existe relación entre la respuesta inflamatoria local o sistémica en pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico.

V. OBJETIVOS.

V 1. General.

Evaluar la respuesta inflamatoria muscular local en pequeñas biopsias de músculo liso del esfínter esofágico inferior en pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico, estas biopsias serán sometidas a análisis histológico e inmunohistoquímica en búsqueda de datos de respuesta inflamatoria local se buscaran, proteínas de recambio de la matriz extracelular: MMP9 y TIMP-1, citoquinas proinflamatorias: IL22, IL17 y interferón gama, citoquinas profibrogénicas: TGF-b1, IL4 e IL3, proteína relacionada con apoptosis: FAS, linfocitos T reguladores: CD25/Foxp3, linfocitos B reguladores: CD20/IL10.

Para valorar la respuesta inflamatoria sistémica se realizara velocidad de sedimentación globular y cartometría de flujo para Th22:CD3+/CD4+/CD161-/IL-22+; Th17: CD3+/CD4+/CD161+/IL-17A+; Th2: CD3+/CD4+/CD14-/IL-4+; Th1:CD3+/CD4+/CD14-/IFN-g+ y células T reguladoras CD3+/CD4+/CD25hi/Foxp3+. Se

realizará medición de anticuerpos anti-plexo mientérico. Esto será comparado con pacientes a los cuales se les realiza cirugías de esófago por otra patología y niegan sintomatología de reflujo gastroesofágico.

VI. PACIENTES Y MÉTODOS.

VI 1. Diseño del estudio.

Estudio prolectivo no aleatorio transversal.

VI 2. Población en estudio.

Para el estudio de la respuesta inflamatoria local y sistémica en enfermedad por reflujo gastroesofágico se estudiarán pacientes que tengan diagnóstico objetivo de reflujo (endoscopia positiva más pHmetría positiva o endoscopia negativa más pHmetría positiva) y cumplan los criterios de selección. Deberán estar programados para tratamiento quirúrgico de la ERGE (funduplicatura) además aceptar y firmar consentimiento informado para la toma de una biopsia de musculo del esófago al momento de procedimiento quirúrgico, además el día del procedimiento quirúrgico se tomara muestra de sangre periférica.

Como controles de la respuesta inflamatoria sistémica se estudiarán donadores de sangre con cuestionarios validados para

sintomatología esofágica GERD-Q, EAT score negativos y pacientes con acalasia.

Como controles de la respuesta inflamatoria local se estudiara a pacientes donadores de órganos a los cuales se les realizara sección en bloque del tercio distal del esófago y tercio proximal del estomago, en estos especímenes se buscara en la mucosa los datos histológicos por microscopia electrónica de enfermedad por reflujo gastroesofágico (dilatación de espacios intercelulares) ya que este dato histológico tiene una sensibilidad y especificidad similar a la pHmetría 26. Estos controles se separan en dos grupos a aquellos que presenten datos histológicos de reflujo por microscopia electrónica y aquellos que no presenten datos histológicos de reflujo por microscopia electrónica.

VI 3. Grupos de estudios.

1. Casos: Pacientes con diagnóstico objetivo de enfermedad por reflujo gastroesofágico, con indicación para realizar cirugía antirreflujo.
2. Control de respuesta inflamatoria local: Pacientes donadores multiorgánicos, sin datos de reflujo en la mucosa esofágica por microscopía electrónica.
3. Control de respuesta inflamatoria sistémica: Hombres y mujeres sanos sin síntomas típicos de reflujo que acepten donar una muestra sanguínea y pacientes con diagnóstico de acalasia por MAR.

VI 4. Lugar de realización.

Laboratorio de motilidad gastrointestinal, laboratorios de reumatología, departamento cirugía experimental, departamento de endoscopia del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ)

VI 5. Periodo de Tiempo.

Marzo del 2016 a marzo del 2017.

VI 6. Tamaño de la muestra

Debido a que se trata de un estudio experimental y no tenemos datos para realizar un cálculo de tamaño de la muestra se realizara por conveniencia con 30 pacientes por grupo. Esto basado en experiencia previa en el laboratorio con otras enfermedades esofágicas.

VI 7. Criterios de Inclusión.

- Pacientes con síntomas típicos de ERGE y diagnóstico objetivo (por endoscopia y confirmada por pHmetría)

- Pacientes candidatos a tratamiento con funduplicatura sin alteraciones en manometría esofágica de alta resolución.
- Pacientes sin enfermedad autoinmune concomitante.
- Firma de consentimiento informado para toma de biopsia.

VI 8. Criterios de exclusión.

- Pacientes con comorbilidades autoinmunes.
- Pacientes con diagnóstico de cardiopatía isquémica.
- Pacientes con funduplicatura previa.
- Pacientes con enfermedad de Chagas
- Pacientes con alteraciones de la motilidad esofágica
- Pacientes con cáncer de esófago
- Pacientes con escleroderma
- Pacientes con esófago de Barrett

- Pacientes con esofagitis eosinofílica
- Pacientes con infección por VIH o VHC
- Pacientes con contraindicación para cirugía antirreflujo (coagulopatía o riesgo cardiovascular elevado)
- Diagnósticos por manometría de alta resolución de acalasia con una IRP mayor de 15 y cualquiera de los patrones de los tres subtipos manométricos.

VI 9. Criterios de eliminación

- Falta de viabilidad de la biopsia

VI 10. Variables.

- Edad
- Género
- Peso
- Talla

- Índice de masa corporal
- Tiempo de evolución de los síntomas
- Puntos en cuestionario EAT-10
- Puntos en cuestionario GERD-Q
- Puntos en el cuestionario GERD -HRDQR
- Presión de esfínter esofágico superior (pEES)
- Presión del EEI (pEEI).
- Presión de relajación integrada (IRP)
- Hallazgos endoscópicos

VI 11. Procedimientos.

Los pacientes fueron captados a su envío al departamento de motilidad de gastroenterología del instituto nacional de ciencias médicas y nutrición Salvador Zubirán con sospecha de enfermedad por reflujo gastroesofágico. A todos los pacientes se les realizó endoscopia con biopsias esofágicas previo a estudios de fisiología gastrointestinal, las biopsias fueron tomadas en la

unión esófago gástrica o línea z (4 biopsias) y a 5 cm de la unión esófago gástrica (4 biopsias).

Los estudios fisiológicos (manometría y pHmetría) fueron realizados en el laboratorio de motilidad gastrointestinal con previo ayuno de 8hrs. Se realizó manometría esofágica de alta resolución de estado solido de 36 sensores con equipo (Manoscan 360, Medtronic) el catéter fue colocado por intubación naso-faríngeo-esofágico se inicio protocolo de manometría con medición basal en reposo del esófago en todos los pacientes, con posterior medición de 10 degluciones húmedas con 5ml de agua potabilizada para consumo humano en posición sentado. El dispositivo fue calibrado previo a su colocación y/o uso. Una vez realizada la manometría esofágica se coloco catéter para pHmetría con impedancia (Digitrapper pHz, Medtronic) el catéter fue colocado por intubación naso-faríngeo-esofágico a 5cm del esfínter esofágico inferior según la medición realizada por manometría, se realizó medición 24 hrs del pH esofágico. Los pacientes que cumplieron criterios de inclusión fueron operados en

el quirófano central, previo a procedimiento quirúrgico se tomaron muestra de sangre periférica para la medición de la respuesta inflamatoria sistémica (citometría de flujo. Para la evaluación de la respuesta inflamatoria local (inmuno histoquímica) se realizo la biopsia del musculo liso del esfínter esofágico inferior durante el procedimiento quirúrgico.

Los controles de respuesta inflamatoria sistémica (donadores de sangre) se les aplicó los cuestionarios de síntomas esofágicos, los pacientes que tuvieron 0 de puntuación en los cuestionarios se les solicitó la donación de 20 ml de sangre venosa periférica para citometría de flujo.

Los controles de respuesta inflamatoria local se obtuvieron de los pacientes donadores de órganos. Se obtuvo el esófago distal y cámara gástrica proximal durante la procuración de órganos. Esta muestra fue obtenida de aquellos pacientes en los cuales sus familiares firmaron consentimiento informado, fue

traslada a laboratorio por el equipo de trasplante, para minimizar el daño por isquemia se transporta en conjunto con hígado y riñones en frío con Custodiol solución HTK (Bretschneider) utilizada para la preservación de corazón y órganos abdominales. Una vez la pieza en el laboratorio se conserva la mitad en formaldehído al 1% y otra fue congelada con nitrógeno líquido y guardada bajo refrigeración en el laboratorio de reumatología a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las citometrías de flujo, para realizar la inmunofenotipificación de las células circulantes, se obtuvo de las muestras de sangre venosa periférica (20 ml) para cada paciente y de ésta se aislaron las células mononucleares (CMNs) a través de un gradiente de densidad [Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway)].

El paquete celular se resuspendió en 1 ml de RPMI a $1-2 \times 10^6$ células/ml, y la suspensión celular se trató con 2 μL de un cóctel de activación celular de forbol-12 miristato 13-acetato (40.5 μM) y ionomicina (669.3 μM) en DMSO (500X) y brefeldina A

(BioLegend Inc., San Diego, CA, EE. UU.) durante 6 horas a 37°C en una incubadora de CO₂.

Las PBMC se incubaron con 5 µL de Human TruStain FcXTM (BioLegend Inc.) por millón de células en 100 µl de PBS durante 10 minutos.

Para determinar el porcentaje de células Th22 (CD3+/CD4+/CD161-/IL-22+), Th17 (CD3+/CD4+/CD161+/IL-17A+), Th2 (CD3+/CD4+/CD25+/IL-4+), Th1 (CD3+/CD4+/CD25+/IFN-γ+), células Treg (CD3+/CD4+/CD25hi/Foxp3+), células Breg (CD19+/CD24hi/CD38hi/IL-10+) y pDCs (CD123hi/CD196+/IDO+); las CMNs fueron incubadas con 5 µl de anticuerpo monoclonal anti-CD3-FITC, anti-CD4-PeCy5 y anti-CD161-APC (BD Biosciences, San Jose, CA); anti-CD3-FITC, anti-CD4-PeCy5 y anti-CD25-APC (BD Biosciences, San Jose, CA); anti-CD19-APC, anti-CD38-PeCy5, anti CD24- FITC o anti-CD123-FITC, anti-CCR6-PeCy5 en tubos separados durante 20 min a 37°C en oscuridad. Las células fueron permeabilizadas con 200

μl de solución cytofix/cytoperm (BD Biosciences) a 4°C por 30 min. La tinción intracelular se llevó a cabo mediante la incubación con 5 μl de un anticuerpo anti-IL-22-PE, anti-IL-17A-PE, anti-IL-4-PE, anti-IFN-γ-PE, anti-Foxp3-PE anti-IL-10-PE o anti-IDO-PE (BD Biosciences) durante 30 min a 4°C y en oscuridad. Finalmente, un total de 500,000–1,000,000 de eventos fueron adquiridos de cada muestra en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences) y se analizaron con el programa FlowJo X software (Tree Star, Inc.). Para el análisis de las muestras adquiridas se trazó una ventana electrónica para las células CD3+/CD4+/CD161-, CD3+/CD4+/CD161+, CD3+/CD4+/CD25+, CD3+/CD4+/CD25hi, CD19+/CD38hi/CD24hi o CD123hi/CCR6+. Los resultados se expresaron como el porcentaje relativo de las células IL-22+, IL-17A+, IL-4+, IFN-γ+, Foxp3+, IL-10+ o IDO+ en cada ventana electrónica.

Como control de isotipo se empleó una mezcla de anticuerpos monoclonales de ratón de tipo IgG1,k-FITC/IgG1-PE/CD45-PeCy5 (BD Tritest™, BD Biosciences). Además, se

realizó un control de autofluorescencia y los respectivos controles FMO (fluorescence minus one).

La inmunohistoquímica se realizó con el fin de identificar las células que expresaban IL-22, se realizaron cortes de tejido embebido en parafina de 4- μ m de espesor, los cuales se colocaron en un portaobjetos electrocargado. Las laminillas se desparafinaron durante 45 min a 54°C. El tejido se hidrató con xileno, alcoholes al 100%, 96% y 50%) y agua destilada. Las laminillas se incuban con una solución de H₂O₂ al 3 % en metanol absoluto (1:9 vol/vol) durante 30 min, para eliminar la actividad de peroxidasa endógena. Los tejidos se incubaron durante 18 horas a 4°C con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-22 humana (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) a una concentración de 10 μ g/ml. La unión del anticuerpo al antígeno se identificó con un anticuerpo biotinado de burro anti-IgG de cabra (ABC Staining System; Santa Cruz Biotechnology). Las laminillas se incubaron con peroxidasa de rábano (HRP)–estreptavidina por

45 min, posteriormente se revelaron con 3,3'-diaminobencidina (DAB) (SIGMA-Aldrich) durante 10 min. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron con alcohol y xileno y se montaron en resina. El control negativo se realizó empleando suero humano diluido 1:100, en lugar del anticuerpo primario. El control de reactivos se llevó a cabo sustituyendo el anticuerpo primario con amortiguador fosfato y albúmina de huevo (Sigma-Aldrich). Estos controles excluyen la tinción inespecífica y la actividad de peroxidasa endógena.

Procedimiento de Doble-Tinción para determinar las subpoblaciones celulares. Para determinar la subpoblaciones de células T-CD4+/IL-17A+, CD4+/IL-4+, CD4+/IFN- γ +, células T reguladoras CD25+/Foxp3+, células B productoras CD20+/IL-10+ y subpoblación de células CD123+/IDO+, se realizó detección simultánea. Se utilizó sistema de doble-tinción de segunda generación de EnVision™ G|2 Doublestain System (Dako, Glostrup, Denmark) para la detección simultanea de dos antígenos presentes a bajas concentraciones en la misma biopsia. El

procedimiento es una doble tinción secuencial, donde el primer antígeno es visualizado utilizando peroxidasa de rábano (HRP)/3,3'-diaminobenzidine (DAB) y el segundo antígeno es visualizado utilizando fosfatasa alcalina (AP)/Permanent Red. Brevemente, se realiza una incubación de las muestras con 200 μ l de bloqueadores endógenos de enzimas por 5 min. Este procedimiento inhibe la AP endógena, peroxidasa, y la actividad de la pseudoperoxidasa presente en los tejidos. Posteriormente los tejidos son incubados con 200 μ l de suero normal como control negativo o con los anticuerpos policlonales primarios de conejo anti-IL-17A, anti-IL-4, anti-IFN- γ , anti-IDO IgG o anticuerpos monoclonales de ratón anti-IL-10 o anti-Foxp3 IgG1 (Santa Cruz Biotechnology) a 10 μ g/ml por 15 min, a temperatura ambiente. Las muestras fueron incubadas con 200 μ l de polímero/HRP por 10 min. La reacción se visualizó con 200 μ l de DAB durante 5-15 min. Posteriormente los tejidos fueron incubados con 200 μ l inhibidor de AP por 3 min y luego se incubaron con un suero normal como control negativo o con el segundo anticuerpo policlonal de

conejo anti-CD20, anti-CD25 o un anticuerpo monoclonal anti-CD4 (Santa Cruz Biotecnología) o anti-CD123 (Abcam plc, CA, Reino Unido) a una concentración de 10 µg/ml, durante 15 min a temperatura ambiente. Después los tejidos se incubaron con 200 µl del LINK durante 10 min. Finalmente, los tejidos se incubaron con 200 µl de polímero AP durante 10 min. La reacción se visualizó con 200 µl de cromógeno Permanent Red durante 5-20 min. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina y montados en resina acuosa.

Para determinar el porcentaje de células inmunorreactivas se cuantificaron las CD4+/IL-17A+, CD4+/IL-4+, CD4+/IFN- γ +, T reguladoras CD25+/Foxp3+, B productoras de IL-10+/CD20+ y las pDCs CD123+/IDO+ en al menos dos campos (X320) en dos diferentes secciones de cada biopsia. Los resultados se reportaron como el promedio \pm error estándar y la mediana del porcentaje de células inmunorreactivas empleando el programa Image Pro Plus versión 5 · 1 · 1.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva para variables demográficas, parámetros de manometría, parámetros de pHmetría y datos de citometrías. Las distribuciones de las variables se reportaron como medias aritméticas, percentil 25 y 75, desviación estándar, mínima y máxima o en porcentaje de acuerdo con el tipo de estas.

Análisis de varianza unidireccional en los rangos Kruskal-Wallis, si la prueba de Kruskal-Wallis fue significativa, se realizó un análisis post-hoc (prueba de Dunn o Holm-Sidak) para todos los procedimientos de comparación múltiple por pares.

VIII. RESULTADOS

A) Demográficos

Al momento se reclutaron un total de 28 pacientes con los diferentes fenotipos de enfermedad por reflujo gastroesofágico. Pacientes con enfermedad no erosiva 13, pacientes con enfermedad erosiva 11 (7 con enfermedad erosiva leve Los Ángeles A-B y 4 con enfermedad erosiva grave Los Ángeles C-D) y 4 pacientes con esófago de Barrett

En el grupo de controles 16 (59%) fueron mujeres, en el grupo de ERGE (35%) mujeres $p = 0.062$, para los datos demográficos ver la tabla 1

B) Estudios de fisiología digestiva.

Los estudios de fisiología digestiva de los pacientes con enfermedad por reflujo de describen en la siguiente Tabla 2.

C) Citometría de flujo

Los pacientes con ERGE presentan un número mayor de células Th1, Th2, Bregs y pDCregs en circulación en comparación con individuos sanos (n=33); sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre las células Th22, Th17 y Tregs (Ver imagen 1).

Los pacientes con ERGE presentan un número menor de células Th2, Th17, Th22, Tregs y pDCregs vs. los pacientes con acalasia (Ver Imagen2)

Queda por realizar las mediciones de citocinas proinflamatorias en los tejidos, específicamente a nivel de la mucosa de la unión esofagogástrica.

IX. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que valora la respuesta inflamatoria sistémica en pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico. Se ha descrito previamente en los pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico una respuesta inflamatoria local localizada en la mucosa. Esta respuesta inflamatoria es multifactorial, sin embargo los principales desencadenadores de esta respuesta en la mucosa son el ácido gástrico y la pepsina 27.

El contacto prolongado de este material refluido de la cámara gástrica provocado por un defecto de la barrera al reflujo y un aclaramiento esofágico inadecuado del material refluido son los responsables de este daño mucoso y respuesta inflamatoria local. Los tejidos lesionados o inflamados liberan mediadores inflamatorios que pueden ser detectados por el sistema inmune. La mucosa en respuesta a estos daños químicos y las células endoteliales producen moléculas de adhesión, que reclutan y

activan los leucocitos, por lo tanto, median condiciones inflamatorias 28.

En los diferentes fenotipos de enfermedad por reflujo (erosiva, no erosiva, Barrett) se han documentado diferentes tipos de respuesta inflamatoria local. Esta respuesta inflamatoria diferente en cada uno de los fenotipos de la enfermedad por reflujo puede explicar la razón por la cual el 70% de los pacientes con enfermedad por reflujo no presentan erosiones en la mucosa 27. A pesar de que un subgrupo de pacientes no presenta erosiones como cambio histológico de la enfermedad por reflujo cuando se realiza microscopia electrónica se ha demostrado una dilatación de los espacios intracelulares tanto en los pacientes con enfermedad erosiva y pacientes con enfermedad no erosiva 26, 29. Este incremento de los espacios intracelulares significa una rotura de la barrera epitelial que protege al esófago contra los daños del ácido y la pepsina, esta alteración permite el contacto

del ácido con las terminales nerviosas y causar síntomas además de la liberación de los mediadores de inflamación 30.

La inflamación microscópica en los pacientes con enfermedad erosiva y enfermedad no erosiva son similares. Ambos presentan infiltración por eosinófilos y neutrófilos siendo más frecuente esta infiltración en pacientes con enfermedad erosiva 30.

Se ha observado que las citosinas como la interleucina-8 (IL-8) el factor activador de las plaquetas (PAF) esta elevada de manera significativa en pacientes con enfermedad erosiva comparado con pacientes con enfermedad no erosiva 31. Estas interleucinas sobre todo la IL-8 promueven la migración y activación de los leucocitos periféricos 32.

Los pacientes con enfermedad no erosiva se caracterizan por una hipersensibilidad química y mecánica probablemente

asociada a un aumento de receptores de ácido. En particular se ha observado un aumento del receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1) en los pacientes con enfermedad erosiva y no erosiva comparado con controles sanos asintomáticos 33, 34.

En la mucosa de los pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico erosivo se ha encontrado IL-6, IL-8 e IL-1 β en los pacientes con reflujo erosivo IL-8 e IL-1 β y en los pacientes con esófago de Barrett IL-8, IL-4, TNF- α , IL-6 27.

La interleucina 8 (IL-8) es uno de los más poderosos quimiotrayentes para los neutrófilos y esta sobre expresada en la mucosa de los pacientes con enfermedad por reflujo independientemente del fenotipo 35-37. Además, el tratamiento con inhibidores de bomba de protones y cirugía anti reflujo disminuye la concentración de este mediador en la mucosa 38, 39.

En pacientes con enfermedad erosiva se ha documentado la activación de los receptores TRPV1 con subsecuente síntesis de factor activador de plaquetas (PAF) por las células epiteliales 40, este difunde hacia la capa muscular circular aumentando la producción de H_2O_2 e IL6, estos dos mediadores aumentan la formación de IL1 β produciendo inflamación a este nivel 41.

Respecto a la celularidad se ha observado sobre todo en los pacientes con esófago de Barrett un aumento de las citosinas Th2 (IL-4 e IL10) comparado con los fenotipos erosivos donde predomina IL6 e IL8.

Las células Th1 se generan cuando los linfocitos CD4 se activan en presencia de interleucina 12 (IL-12), son importantes para la protección en contra de bacterias y virus y secretan interleucina 2 (IL-2) y interferón gamma (IFN γ) que tienen la función de activar a los macrófagos y aumentar su actividad fagocítica.

Las células Th2 se generan cuando los linfocitos CD4 se activan en presencia de interleucina 4 (IL-4), una vez activada la célula Th2 aumenta la producción interleucina 4, interleucina 5 e interleucina 13 (IL-4, IL-5 e IL-13). Estas células juegan un rol importante en la protección contra parásitos y en las reacciones alérgicas 42.

Las células Th17 se generan cuando los linfocitos CD4 se activan en presencia de factor de crecimiento transformante beta, interleucina 6, interleucina 1 beta, interleucina 21 e interleucina 23 (TGF β , IL-6, IL-1 β , IL-21 y IL-23) las células Th17 son de utilidad para el combate contra las bacterias extracelulares y también contra los hongos. Estas células se han asociado en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Las citosinas producidas por las células Th17 son la interleucina 17A e interleucina 17F (IL-17A e IL-17F) estas interleucinas promueven quimioatracción de neutrófilos y producción de beta defensinas (β defensinas) por las

células epiteliales. Además de la producción de citoquinas inflamatorias por los macrófagos y las células T 42.

Las células Th22 el desarrollo de estas células depende el desarrollo depende de la expresión del receptor maestro de hidrocarburo de arilo del factor de transcripción (AHR), por el momento se desconoce que citoquinas están encargadas de la activación de este receptor para la generación de estas células. Estas células tienen una alta producción de interleucina 22 (IL-22) estas células suelen encontrarse con mayor frecuencia en la piel inflamada 42.

Las células Treg son las células más importantes en la supresión de las células T autorreactivas. Estas células son activadas por la interleucina 2 (IL-2) y realizan su función reguladora mediante la producción de interleucina 10, interleucina 35 y factor de crecimiento transformante β (IL-10, IL-35, TGF β), las

Treg expresan FOXP3, estas células tienen un papel crítico en el desarrollo de la autoinmunidad 43.

Las células B regulatorias o Breg son células sorprendidas que apoyan la tolerancia inmunológica. Esta función de tolerancia inmunológica la realizan mediante la producción de interleucina 10, interleucina 35 y factor de crecimiento transformante β (IL-10, IL-35, TGF β), estas citosinas funcionan disminuyendo la expansión de las células T patogénicas y otras células inflamatorias 44.

Las células dendríticas plasmocitoides pDCreg estas células producen IFN- α que inducen la diferenciación in vitro de las células Breg, que a su vez regulan negativamente la actividad de pDC a través de IL-10 45.

Como ya se ha mencionado en los párrafos previos la mayoría de los estudios sobre mediadores y respuesta inflamatoria se han realizado en la mucosa esofágica de pacientes con reflujo.

En este estudio nuestra finalidad es estudiar la respuesta inflamatoria sistémica y muscular en pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico

A partir de estos resultados preliminares que presentamos sugerimos que los pacientes con ERGE tienen un patrón de inflamación sistémica primordialmente dirigido por células Th1, Th2, Bregs y pDCregs. Este patrón de respuesta inflamatoria nos sugiere que es una inflamación no autoinmune si se compara con pacientes con acalasia que tiene una respuesta predominante autoinmune por células Th17. En estudios previos ya se ha demostrado el patrón inflamatorio de autoinmunidad en pacientes con acalasia 46. En los pacientes con GERD observamos que hay un predominio de inflamación Th1 en comparación con los pacientes con acalasia que existe un predominio de respuesta inflamatoria Th17 .

Los pacientes que presentan mayor daño mucoso como los pacientes con Barrett, presentan una mayor respuesta inflamatoria sistémica. La mayor respuesta inflamatoria se presentó en los pacientes con Esófago de Barrett, esto es similar a lo ocurrido en la mucosa en los estudios mencionados previamente, donde los pacientes con Barrett presentan una inflamación con mayor intensidad 27. Basados en estos hallazgos creemos que esta respuesta inflamatoria sistémica puede estar asociada con la respuesta inflamatoria en la mucosa de los pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico.

Nuestra hipótesis es que esta respuesta inflamatoria estará además presente en el musculo del esófago en la inmunohistoquímica que aun queda pendiente y esta inflamación puede explicar la disfunción del esfínter esofágico inferior. Ya se ha demostrado que la respuesta inflamatoria local en la mucosa altera la motilidad del esófago. Las citocinas expresadas en la mucosa se asociaron con la función de motilidad esofágica en los

humanos, el TNF- α fue una citocina clave para caracterizar EGJOO, cuyo perfil de citocina es diferente del perfil de citocinas en el esófago normal y en la acalasia 47. Las IL-13 es un predictor positivo para la contractilidad del cuerpo del esófago mientras que la IL-23A fue predictor negativos para contractilidad del cuerpo esofágico 47. Para la contractilidad de la unión esófago gástrica el TNF- α es un predictor positivo lo cual quiere decir que aumenta la contractilidad de esta región y la IL-6 fue predictor y negativos de contractilidad de la unión esófago gástrica lo cual quiere decir que disminuye la presión de la unión esófago gástrica 47. Además, la producción excesiva de estas citocinas podría estar relacionada en el mecanismo de hipercontractilidad observado en la unión esófago gástrica en pacientes con onbstuccion del tracto de salida de la UEG ya que TNF- α media la regulación a la baja de la proteína inhibidora potenciada por PKC de 17 kDa 48 y el canal Ca²⁺ de tipo L 49, mientras que IL-1 β redujo la contractilidad del músculo liso del colon a través de la regulación positiva del regulador de la señalización de la proteína G 4 50. Por todos estos

antecedentes se puede intuir que las citosinas inflamatorias pueden tener un papel en la fisiopatología del reflujo al alterar la contracción del musculo liso.

Además, encontramos un aumento de células reguladoras en los pacientes con reflujo es una respuesta fisiológica para contrarrestar la respuesta inflamatoria sistémica.

Quedan pendientes los resultados de la inmunohistoquímica del musculo para poder tener una adecuada conclusión

X. CONCLUSIONES

Los pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico presentan mayor inflamación sistémica no autoinmune comparado con pacientes sanos asintomáticos.

Cuando un paciente presenta un daño mucoso mayor presenta una mayor inflamación sistémica no autoinmune.

De demostrarse un patrón de inflamación tisular que refleje lo que se determinó a nivel sistémico el entendimiento de la fisiopatogenia de la ERGE cambiaría rotundamente y de la misma manera el tratamiento que reciben los pacientes con esta enfermedad.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Katz PO, Gerson LB, Vela MF. Guidelines for the Diagnosis and Management of Gastroesophageal Reflux Disease. The American journal of gastroenterology. 2013(Pactice Guidelines):1-21.
2. Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R, Global Consensus G. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. Am J Gastroenterol. 2006;101(8):1900-20; quiz 43.
3. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. Gut. 2005;54(5):710-7.
4. J L, VK P, RK M. Asymmetry of lower esophageal sphincter pressure is it related to the muscle thickness or its shape. Am J Physiol. 1997;272.
5. RK M, DH B. The Esophagogastric Junction. N Engl J Med. 1997;336(13).
6. Pickering M, Jones JFX. The diaphragm two physiological muscles in one. J Anat. 2002;201.
7. Delattre JF, Avisse C, Marcus C, Flament JB. Functional anatomy of the gastroesophageal junction. Surg Clin North Am. 2000;80(1):241-60.
8. Diamant NE. Esophageal Physiology and Testing. The Esophagus. 2012;Fifth Edition:31.
9. Szymanski PT, Szymanska G, Goyal RK. Differences in calmodulin and calmodulin binding proteins in phasic and tonic smooth muscles. Am J Physiol Cell Physiol 282: C94–C104, 2002. 2002;282: C94–C104.
10. Saha J, Sengupta J, Goyal R. Role of chloride ions in lower esophageal sphincter tone and relaxation. Am J Physiol. 1992 263.
11. Crist JR, He XD, Goyal RK. Chloride-mediate junction potentials in circular muscle of guinea pigs. American Physiological Society. 1991;261(5):G742-G51.
12. Zhang Y, Miller DV, Paterson WG. Opposing roles of K(+) and Cl(-) channels in maintenance of opossum lower esophageal

sphincter tone. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279(6):G1226-34.

13. Mittal R, Fisher M, Rochester D, Dent J, McCallum R, Sluss J. Human lower esophageal sphincter pressure response to increased intra-abdominal pressure. *Am J Physiol.* 1990;258:624–30.
14. DiMarino A, Cohen S. The adrenergic control of lower esophageal sphincter function. An experimental model of denervation supersensitivity. *J Clin Invest.* 1973;52:2264–71.
15. Lehmann A, Bremner-Danielsen M, Brändén L, Kärrberg L. Inhibitory effects of GABAB receptor agonists on swallowing in the dog. *European Journal of Pharmacology.* 2002;Volume 448(1):67-70.
16. Mittal RK, Holloway RH, Penagini R, Blackshaw LA, Dent J. Transient lower esophageal sphincter relaxation. *Gastroenterology.* 1995;109(2):601 - 10.
17. Castell DO, Murray JA, Tutuana R, Orlando RC, Arnold R. The pathophysiology of gastro oesophageal reflux disease - oesophageal manifestations. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20(9):14 - 5.
18. Cheng L, Cao W, Behar J, Biancani P, Harnett KM. Inflammation induced changes in arachidonic acid metabolism in cat LES circular muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(4):G787-97.
19. Cheng L, Cao W, Fiocchi C, Behar J, Biancani P, Harnett KM. In vitro model of acute esophagitis in the cat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289(5):G860-9.
20. Cheng L, Cao W, Fiocchi C, Behar J, Biancani P, Harnett KM. Platelet-activating factor and prostaglandin E2 impair esophageal ACh release in experimental esophagitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289(3):G418-28.
21. Isomoto H, Saenko VA, Kanazawa Y, Nishi Y, Ohtsuru A, Inoue K, et al. Enhanced expression of interleukin-8 and activation of nuclear factor kappa-B in endoscopy-negative gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(4):589-97.
22. Liu i, Liu X, Tang C, Liu J, Wang H, Xie P. Esophageal dysmotility and the change of synthesis of nitric oxide in a feline esophagitis model. *Diseases of the Esophagus.* 2002;15(3):193 - 1998.

23. Boeckxstaens G, El-Serag HB, Smout AJPM, Kahrilas PJ. Symptomatic reflux disease: the present, the past and the future. *Gut*. 2014;63(7):1185-93.
24. Huo X, Zhang X, Yu C, Zhang Q, Cheng E, Wang DH, et al. In oesophageal squamous cells exposed to acidic bile salt medium, omeprazole inhibits IL-8 expression through effects on nuclear factor-kappaB and activator protein-1. *Gut*. 2014;63(7):1042-52.
25. Sifrim D, Zerbib F. Diagnosis and management of patients with reflux symptoms refractory to proton pump inhibitors. *Gut*. 2012;61(9):1340-54.
26. Vela MF, Craft BM, Sharma N, Freeman J, Hazen-Martin D. Refractory heartburn: comparison of intercellular space diameter in documented GERD vs. functional heartburn. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(5):844-50.
27. Altomare A, Guarino MP, Cocca S, Emerenziani S, Cicala M. Gastroesophageal reflux disease: Update on inflammation and symptom perception. *World J Gastroenterol*. 2013;19(39):6523-8.
28. Kelly M, Hwang JM, Kubes P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(1):3-10.
29. Tobey NA, Carson J, Alkiek RA, Orlando RC. Dilated intercellular spaces: A morphological feature of acid reflux damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterology*. 1996;111(5).
30. Tutian R, Castell DO. Review article: complete gastro-oesophageal reflux monitoring combined pH and impedance. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24:27-37.
31. Altomare A, Ma J, Guarino MP, Cheng L, Rieder F, Ribolsi M, et al. Platelet-activating factor and distinct chemokines are elevated in mucosal biopsies of erosive compared with non-erosive reflux disease patients and controls. *Neurogastroenterol Motil*. 2012;24(10):943-e463.
32. Ma J, Altomare A, de la Monte S, Tong M, Rieder F, Fiocchi C, et al. HCl-induced inflammatory mediators in esophageal mucosa increase migration and production of H₂O₂ by peripheral blood leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(3):G791-8.

33. Bhat YM, Bielefeldt K. Capsaicin receptor (TRPV1) and non-erosive reflux disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006;18:263-70.
34. Guarino MP, Cheng L, Ma J, Harnett K, Biancani P, Altomare A, et al. Increased TRPV1 gene expression in esophageal mucosa of patients with non-erosive and erosive reflux disease. *Neurogastroenterol Motil.* 2010;22(7):746-51, e219.
35. Yoshida N, Uchiyama K, Kuroda M, Sakuma K, Kokura S, Ichikawa H, et al. Interleukin-8 expression in the esophageal mucosa of patients with gastroesophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol.* 2004;39(9):816-22.
36. Isomoto, H. Elevated levels of chemokines in esophageal mucosa of patients with reflux esophagitis. *The American Journal of Gastroenterology.* 2003;98(3):551-6.
37. Fitzgerald RC, Onwuegbusi BA, Bajaj-Elliott M, Saeed IT, Burnham WR, Farthing MJG. Diversity in the oesophageal phenotypic response to gastro-oesophageal reflux: immunological determinants. *Gut.* 2002;50(4):451-9.
38. Isomoto H, Nishi Y, Kanazawa Y, Shikuwa S, Mizuta Y, Inoue K, et al. Immune and Inflammatory Responses in GERD and Lansoprazole. *J Clin Biochem Nutr.* 2007;41(2):84-91.
39. Oh DS, DeMeester SR, Vallbohmer D, Mori R, Kuramochi H, Hagen JA, et al. Reduction of interleukin 8 gene expression in reflux esophagitis and Barrett's esophagus with antireflux surgery. *Arch Surg.* 2007;142:554-9.
40. Ma J, Altomare A, Guarino M, Cicala M, Rieder F, Fiocchi C, et al. HCl-induced and ATP-dependent upregulation of TRPV1 receptor expression and cytokine production by human esophageal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(5):G635-45.
41. Cheng L, de la Monte S, Ma J, Hong J, Tong M, Cao W, et al. HCl-activated neural and epithelial vanilloid receptors (TRPV1) in cat esophageal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;297(1):G135-43.
42. Brummelman J, Pilipow K, Lugli E. The Single-Cell Phenotypic Identity of Human CD8(+) and CD4(+) T Cells. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;341:63-124.

43. Sharabi A, Tsokos MG, Ding Y, Malek TR, Klatzmann D, Tsokos GC. Regulatory T cells in the treatment of disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(11):823-44.
44. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity.* 2015;42(4):607-12.
45. Shipman L. Systemic lupus erythematosus: Compromised pDC-BREG cell crosstalk. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(5):253.
46. Furuzawa-Carballeda J, Aguilar-Leon D, Gamboa-Dominguez A, Valdovinos MA, Nunez-Alvarez C, Martin-del-Campo LA, et al. Achalasia--An Autoimmune Inflammatory Disease: A Cross-Sectional Study. *J Immunol Res.* 2015;2015:729217.
47. Fukaura K, Ihara E, Ogino H, Iboshi Y, Muta K, Xiaopeng B, et al. Mucosally Expressed Cytokines are Associated with the Esophageal Motility Function. *Digestion.* 2018;98(2):95-103.
48. Ohama T, Hori M, Momotani E, Iwakura Y, Guo F, Kishi H, et al. Intestinal inflammation downregulates smooth muscle CPI-17 through induction of TNF-alpha and causes motility disorders. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(5):G1429-38.
49. Kinoshita K, Sato K, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Decrease in activity of smooth muscle L-type Ca²⁺ channels and its reversal by NF-κB inhibitors in Crohn's colitis model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285:G483-93.
50. Hu W, Li F, Mahavadi S, Murthy KS. Interleukin-1beta up-regulates RGS4 through the canonical IKK2/IkappaBalpha/NF-kappaB pathway in rabbit colonic smooth muscle. *Biochem J.* 2008;412(1):35-43.

XII. APÉNDICES

<i>Variable</i>	<i>Control</i>	<i>ERGE</i>	<i>p</i>
<i>Edad (años)</i>	45 (25 – 55)	50 (38 – 57)	0.177
<i>Peso (kilos)</i>	61 (61 – 75)	82 (69 – 87)	0.002
<i>Talla (mts)</i>	1.63 (1.55 -1.7)	1.67 (1.56 – 1.75)	0.576
<i>IMC (k/mts²)</i>	25.6 (23.3 – 26.2)	28.3 (25.7 – 30.4)	< 0.001
<i>GERD-Q</i>	0 (0 – 0)	11.5 (8 – 13)	< 0.001
<i>EAT score</i>	0 (0 – 0)	8 (3 – 20.5)	<0.001

Tabla 1 (Variables demográficas de pacientes con ERGE y donadores de sangre para respuesta inflamatoria sistémica.

Parámetro	Valor	Q2 – Q3
Tiempo de exposición al ácido (%)	11. 8	6.8 – 21.3
DeMeester (puntos)	50.2	34. 4 – 80.4
DCI (mmHg/s/cm ²)	712	409 - 1179
IRP (mmHg)	1.6	0.85 – 4.6

Tabla 2 Principales valores de estudios fisiológicos en pacientes con reflujo

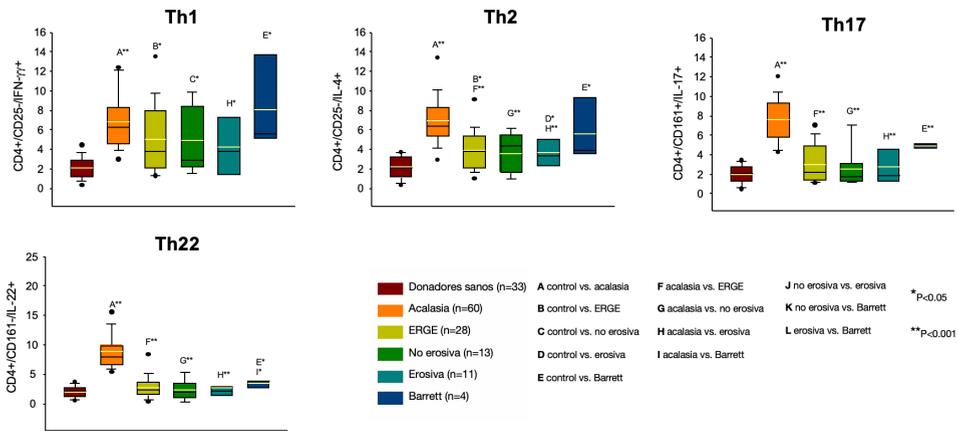


Imagen 1

Citometrías de flujo para Th1, Th2, Th17 y Th22 en pacientes con ERGE (erosiva, no erosiva y Barrett), acalasia y donadores sanos

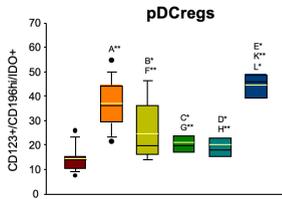
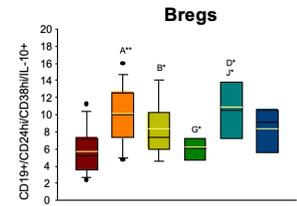
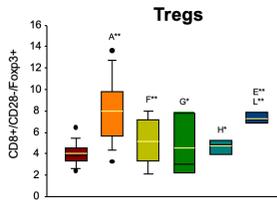
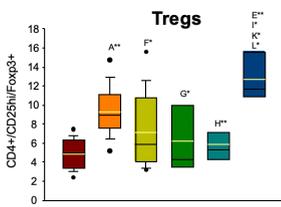


Imagen 2

Citometrías de flujo para Tregs, Bregs, y pDCregs en pacientes con ERGE (erosiva, no erosiva y Barrett), acalasia y donadores sanos



Esta tesina se imprimió en
PAPEL BOND TAMAÑO 41 x 51 P GRAMAJE 120 g/m²
TIRAJE DE 6 EJEMPLARES
Ciudad de México, México.
DICIEMBRE 2020