



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Expresión de genes asociados a la inflamación (IL1B, IL6, CXCL8, IL10, TNF, IFNG, MMP3, MMP9) en biopsias de mucosa de esófago de diferentes fenotipos de enfermedad por reflujo gastroesofágico.

Tesis

PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

MÓNICA ROCÍO ZAVALA SOLARES

TUTOR PRINCIPAL: DR. JESÚS KAZÚO YAMAMOTO FURUSHO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN, INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA DE LEÓN MÉNDEZ, UNAM/INMEGEN

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ASESORES:

DRA. GABRIELA FONSECA CAMARILLO.
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen | 4 |
| Abreviaturas | 5 |
| Antecedentes | 7 |
| a) Fenotipos de ERGE | 7 |
| b) Fisiopatología de ERGE | 8 |
| c) Asociación de ERGE y factores genéticos | 9 |
| Justificación | 15 |
| Pregunta de investigación | 15 |
| Hipótesis | 16 |
| Pacientes y métodos | 18 |
| Definiciones operacionales | 24 |
| Análisis estadístico | 25 |
| Resultados | 27 |
| Discusión | 33 |
| Conclusiones | 38 |
| Referencias | 39 |
| Anexos | |

RESUMEN

Antecedentes: Los fenotipos clínicos endoscópicos de la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) se clasifican en esofagitis erosiva (EE), esófago de Barrett (EB) y enfermedad por reflujo gastroesofágico no erosiva (ERNE). ERNE que significa? se subclasifica como exposición ácida anormal (EAA) y exposición ácida normal (EAN) según los resultados del estudio de monitoreo de pH. El objetivo de este estudio fue describir los genes implicados en la fisiopatología y la respuesta inmune de la ERGE de acuerdo a cada fenotipo.

Metodología: Se trata de un estudio observacional y transversal. Todos los pacientes con, EE, EB, EAA y ENA y un grupo control fueron sometidos a endoscopia superior (con biopsias de mucosa esofágica). La cuantificación relativa del ARNm de citocinas y genes diana se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR). Se evaluaron los cambios en la expresión de genes asociados con la inflamación para cada fenotipo de enfermedad. El análisis estadístico de la expresión génica diferencial se realizó utilizando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados: Se incluyeron 82 pacientes y se dividieron en los siguientes grupos: Grupo EE, 23 (28.04%); grupo EB, 16 (19.51%); Grupo EAA, 13 (15.86%); ENA 13 (15.86%); y Grupo de Control, 17 (20.73%). Los pacientes con EE comparados con el grupo control mostraron niveles aumentados de IL-1B, IL-6 e IL-10 ($P < 0.05$). En comparación con el grupo de control, los pacientes con EB mostraron un aumento de la expresión de IL-8 ($P < 0.05$) y niveles aumentados de IL10, MMP3 y MMP9 y los pacientes con EAA mostraron una mayor expresión de IL1B, IL6, IFNG y TNF en la comparación con el grupo control ($P < 0.05$). EAA mostró un aumento de la expresión de IL1B y TNF en comparación con ENA ($P < 0.05$).

Conclusiones: Este estudio demuestra la expresión génica diferencial de mediadores de la inflamación en la mucosa esofágica de pacientes con diferentes fenotipos endoscópicos de ERGE. IL-1B y TNF podrían ser útiles para diagnosticar diferencialmente EAA y ENA en el fenotipo no erosivo usando biopsias endoscópicas.

Número de palabras: 326

Palabras clave: esofagitis, enfermedad por reflujo no erosivo (ERNE), citocina, gen.

ABREVIATURAS:

EB, esófago de Barrett

ADN, ácido desoxirribonucleico

ADNc, ADN complementario

CXC, dominios CXC (cisteína-cualquier aminoácido-cisteína)

EAA, exposición anormal al ácido

ENA, exposición normal al ácido

MEC, matriz extracelular, las siglas están en inglés, si es en español debería ser MEC

EE, esofagitis erosiva

ERGE, Enfermedad por reflujo gastroesofágico

GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GWAS, estudio de asociación de genoma completo

IFNG interferón γ

IL10 interleucina 10

IL1B, interleucina 1 beta

IL6 interleucina 6

IL8, interleucina 8 el nombre actual es CXCL8

MMP3, metaloproteinasa de matriz 3

MMP9, metaloproteinasa de matriz 9

ERNE, enfermedad por reflujo gastroesofágico no erosiva

NF- κ B, factor nuclear kappa B

ARN, ácido ribonucleico

RT-qPCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SEM, error estándar de la media

TNF, factor de necrosis tumoral

ANTECEDENTES

La enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) es un padecimiento crónico, causado por la exposición prolongada al contenido gástrico. Aproximadamente el 10-20% de la población en los países occidentales tienen ERGE, con síntomas como pirosis y regurgitación al menos una vez por semana.(1) Otros estudios reportan una frecuencia hasta del 40%.(2-5)

El paso de contenido gástrico al esófago es referido como reflujo gastroesofágico y es considerado normal cuando ocurre en individuos sanos sin síntomas o signos de enfermedad. Sin embargo, cuando el reflujo gastroesofágico es excesivo causa inflamación ó síntomas y es cuando recibe el nombre de ERGE.(4) Se ha atribuido al hecho de que su fisiopatología es compleja e involucra factores mecánicos como la presencia de hernia hiatal hasta relajaciones transitorias del esfínter esofágico inferior.(6)

Fenotipos de ERGE

Recientemente, se ha propuesto que los pacientes con ERGE se categorizan en 3 grupos: esofagitis erosiva (EE), esófago de Barrett (EB) y enfermedad por reflujo gastroesofágico no erosiva (ERNE).(7, 8)

La gravedad de las lesiones y síntomas de ERGE no se puede predecir únicamente en función de la exposición esofágica.(9) Los pacientes muestran cuadros clínicos similares, algunos pueden tener erosiones, mientras que otros muestran una enfermedad no erosiva que sugiere que otros factores pueden estar involucrados, por lo tanto, es fundamental comprender los mecanismos moleculares por los cuales el contacto con un reflujo deteriora la función de la barrera esofágica.(1)

Los pacientes con EE son pacientes con síntomas de ERGE con erosiones esofágicas de distintos grados.

El EB es considerado una complicación de la ERGE, conocido también como metaplasia columnar esofágica. Se gradúa con la Clasificación de Praga. Las áreas sugestivas de cambio de epitelio escamoso a columnar son biopsiadas para

la confirmación histológica. El EB continúa siendo un padecimiento de interés, ya que es una lesión precursora del adenocarcinoma esofágico.(2)

Los pacientes con ERNE son clasificados al presentar síntomas de ERGE, pero sin lesiones en la endoscopia, aproximadamente corresponde al 70% de los pacientes con ERGE.(2, 8) A su vez, estos pacientes con ERNE se subclasifican en pacientes con exposición esofágica (reflujo) al ácido normal (ENA) (no relacionada con reflujo ácido o pirosis funcional) y anormal (EAA) (presencia de reflujo ácido anormal ó asociación sintomática).

Cada una de estas variantes debe ser considerada como un estadio diferente de la enfermedad, ya que las opciones terapéuticas y el seguimiento es diferente en cada una. Existen datos del curso natural de la enfermedad de cada uno de estos fenotipos o estadios y no hay información convincente de que exista progresión entre los mismos.(8)

Aunque existen factores de riesgo y mayor frecuencia en algunos de los grupos de acuerdo con el género, el por qué un paciente con los mismos síntomas evoluciona a uno u otro fenotipo continúa siendo desconocido.(9) Los diferentes fenotipos reflejan diferentes formas clínicas ERGE, por lo tanto, se puede predecir que después de exposiciones similares a estímulos nocivos (ácido, pepsina, bilis), un antecedente genético específico predispone a los pacientes a desarrollar cada uno de los fenotipos.

Fisiopatología de la ERGE

Esta enfermedad es considerada como una falla en los mecanismos de barrera anti-reflujo.(5) Múltiples factores se encuentran involucrados, como factores fisiológicos del huésped, ambientales y genéticos.(10)

Para muchos de los pacientes, los mecanismos principales son las relajaciones transitorias del esfínter esofágico inferior y la inhibición de la crura diafragmática es el mecanismo dominante que origina que el contenido gástrico pase al esófago.(2, 4) No todas las relajaciones transitorias del esfínter están

acompañadas de reflujo, sin embargo sí se encuentra incrementada la frecuencia de reflujo ácido durante estas relajaciones.(4) La exposición incrementada de la mucosa escamosa normal del esófago a los jugos gástricos resulta en daño a la mucosa e inflamación en algunos pacientes. Estas alteraciones son reconocidas a nivel macroscópico como esofagitis, por disrupciones de la mucosa esofágica o como un epitelio de tipo columnar.(5, 11)

Tanto los factores mecánicos como funcionales alteraran la barrera del esfínter en la unión esófago-gástrica. Esta exposición del esófago al contenido gástrico origina daño a la mucosa escamosa del esófago, dilatación de los espacios intercelulares, extensión papilar, erosión de la mucosa. La Clasificación de los Ángeles es la más utilizada recientemente para definir estas erosiones.(2)

Se ha descrito la presencia de aumento de los espacios intercelulares en la mucosa esofágica expuesta al reflujo gastroesofágico (RGE). Cuando el ácido penetra la membrana celular y llega al citoplasma se cree que inicia una cascada de eventos inflamatorios que resultan en necrosis, inflamación y erosión.(1)

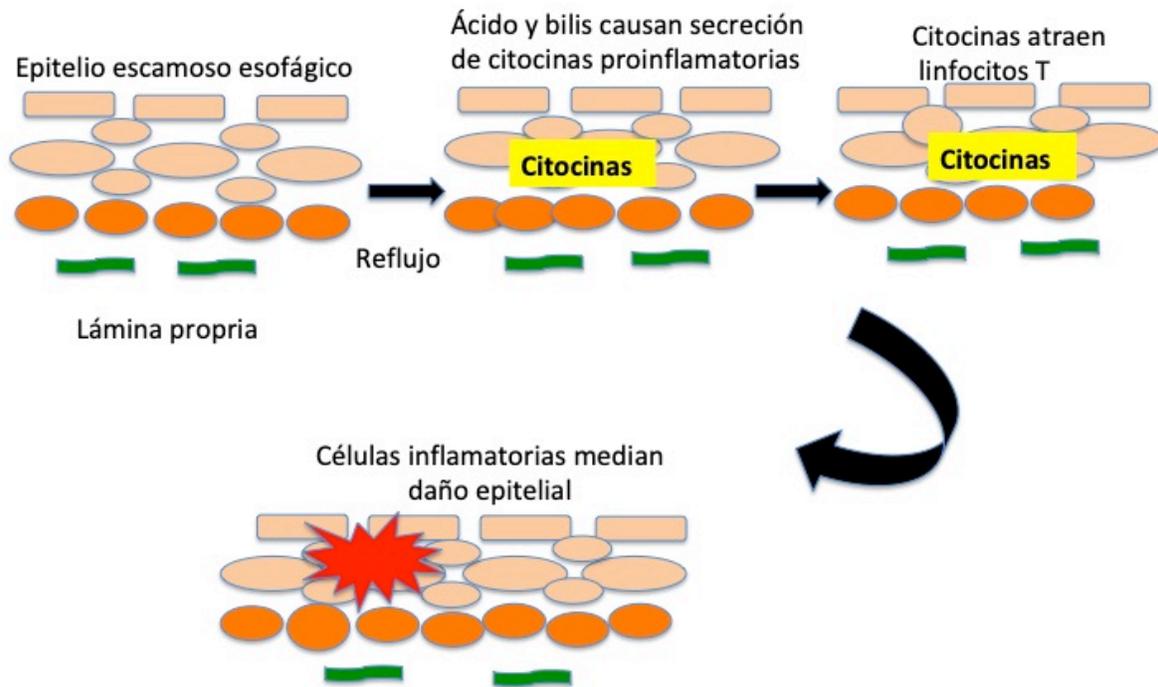
La hipótesis más reciente para la formación del esófago de Barrett señala que este tejido es formado cuando el RGE daña el epitelio esofágico escamoso, dañando a las células madre multipotenciales en las capas basales por el jugo gástrico refluído que estimula una diferenciación anormal. El progenitor del esófago de Barrett continúa desconocido, sin embargo se ha relacionado a la metaplasia con cambios en la expresión génica y estos cambios parecen ser inducidos por ERGE.(12)

Asociación de ERGE y factores genéticos

Estudiar las bases moleculares y genéticas de una enfermedad es de importancia fundamental ya que ofrece profundidad en su patogénesis y abre nuevas rutas de tratamiento específico.

En un modelo experimental proponen que el ácido y la bilis refluídos estimulan la liberación de citocinas inflamatorias de las células escamosas del esófago, reclutando linfocitos primero en la submucosa y luego en la superficie luminal. Los

estudios emergentes sobre la esofagitis aguda por reflujo en humanos respaldan este nuevo concepto, lo que sugiere que la liberación de citocinas inducida por el reflujo puede ser el mecanismo fisiopatológico más importante.(13) Figura 1



Modificado de Souza RF. From Reflux Esophagitis to Esophageal Adenocarcinoma. Dig Dis. 2016;34(5):483-90

Figura 1. Modelo que propone que la esofagitis por reflujo se desarrolla como una lesión mediada por citocinas inflamatorias

Recientemente, se han reportado estudios que sugieren una asociación entre la genética del huésped, ERGE y su complicación, el EB.(3, 4) Estos factores genéticos incluyen polimorfismos de diversos genes que codifican para citocinas pro y anti-inflamatorias, de proteínas de mecanismos de reparación del DNA, de enzimas implicadas en el metabolismo xenobiótico, de proteínas reguladoras del

ciclo celular, y genes silenciadores por hipermetilación del DNA en la progresión de la enfermedad.(3) Estos estudios deben de ser aún reproducidos en diferentes poblaciones para interpretar los mecanismos de la patogénesis de la enfermedad.

Existen estudios recientes que muestran una concordancia incrementada en gemelos monocigóticos comparados con los gemelos dicigóticos, indicando efectos genéticos en ERGE más que ambientales. Variaciones étnicas e interindividuales pueden determinar el estadio o fenotipo de la enfermedad.(10)

De acuerdo a estos antecedentes, los siguientes genes fueron considerados en este estudio. De acuerdo a la fuente aprobada para la nomenclatura genética humana HGNC (de sus siglas en inglés HUGO Gene Nomenclature Comitte), se redacta el nombre y abreviatura oficial de cada uno.

Interleucina 1 (IL1) es una citocina proinflamatoria que juega un papel crucial en el sistema inmune. Tiene dos isoformas funcionales IL1 α e IL1 β . Los genes que la codifican son IL1A e IL1B, respectivamente.(10) El nombre oficial es intereucina 1 beta y la abreviatura IL1B; es un gen localizado en el cromosoma 2q14. Existen estudios contradictorios sobre la asociación de esta citocina y sus polimorfismos con daño a la mucosa esofágica.(3, 10, 14)

La interleucina 6 (IL6) es una citocina pro-inflamatoria que regula la respuesta innata y la respuesta de fase aguda. El gen IL6 se encuentra en el cromosoma 7p21.(15) Esta familia de citocinas comparte el receptor de membrana glucoproteína 130 (gp130), capaz de transmitir señales intracelulares a través de un proceso de fosforilación de proteínas llevado a cabo en su dominio intracelular.(16) La IL6 es una citocina multifuncional producida por diferentes tipo celulares incluyendo células del sistema inmune, células endoteliales, fibroblastos, miocitos y tejido adiposo, intermediando en la respuesta inflamatoria y el estrés.(17) Se genera una expresión inmediata y transitoria de IL6 en respuesta a factores de estrés ambiental como infecciones y lesiones tisulares. Esta expresión activa una señal de alarma y activa los mecanismos de defensa del huésped contra el estrés.(15, 17)

La interleucina 10 (IL10) es una citocina anti-inflamatoria, codificada por el gen *IL10*, localizado en el cromosoma 1q31-q32. Se han reportado diversos polimorfismos en EB y adenocarcinoma esofágico.(18) La gran mayoría de los leucocitos, incluyendo células B y T, células dendríticas, células asesinas naturales, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y queratinocitos producen IL10.(19)

El factor de necrosis tumoral (TNF) (previamente conocido como TNF- α o TNF alpha), se encuentra involucrado en una gran variedad de estímulos, sobretodo de tipo inflamatorio. El locus del factor de necrosis tumoral humano (TNF) se encuentra en el cromosoma 6p213.(20, 21) Es producido por macrófagos, pero también por monocitos, linfocitos, tejido adiposo y músculo. Se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 6p21 formando parte del complejo mayor de histocompatibilidad. Estimula la producción de IL6. Se ha estudiado ampliamente su expresión en tejido adiposo, así como IL6 y MMP. Su expresión en mucosa esofágica, a pesar de ser crucial su rol en la inflamación, no se ha determinado por completo. (15) El TNF puede ser producido por una variedad de células que incluyen macrófagos, monocitos, leucocitos polimorfonucleares, células del músculo liso y mastocitos.(20)

El Interferon-gamma (IFNG, símbolo oficial de acuerdo a Gene Nomenclature Committe) Este gen localizado en 12q15, codifica una citocina soluble que es miembro de la clase de interferón tipo II. La proteína codificada es secretada por células del sistema inmunológico tanto innato como adaptativo. La proteína activa es un homodímero que se une al receptor de interferón gamma que desencadena una respuesta celular a infecciones virales y microbianas.(22)

Las mutaciones en este gen están asociadas con una mayor susceptibilidad a infecciones virales, bacterianas y parasitarias y a varias enfermedades autoinmunes.(23) El IFNG es producido predominantemente por las células asesinas naturales (NK) y las células T asesinas naturales durante la respuesta inmune innata y por las células T auxiliares CD4 + (Th1) y las células T citotóxicas CD8 + en la respuesta inmune humoral.(24)

Se ha encontrado incrementada la expresión de esta citocina en pacientes con EE y EB (fue comparada con controles sanos, no comparadas en ERNE).(25)

El ligando 8 de quimiocina con motivo C-X-C (CXCL8) conocida como interleucina 8 (IL8) es un quimiocina, miembro de las familias CXC, es una proteína con un papel dual (inflamación y carcinogénesis). Se encuentra en el cromosoma 4q13.3.(26)

Es tanto un quimioatrayente de neutrófilos como un estimulante de la proliferación celular y angiogénesis. En modelos animales, se ha demostrado que el reflujo induce un incremento en la CXCL8 en el epitelio esofágico.(1) En un estudio se reportó que la expresión de CXCL8 se encontraba elevada durante la progresión de mucosa de esófago normal a adenocarcinoma esofágico en humanos.(11) Otros estudios han asociado la expresión de IL1B y CXCL8 en pacientes con ERNE y EE a comparación de controles sanos. Sin embargo, no realizaron análisis adicionales entre los diferentes tipo de ERNE.(27)

Otro estudio en modelo animal, determinó la expresión de TNF e IL1B y se encontraban incrementadas en ratas con reflujo gástrico agudo en mucosa esofágica por PCR-RT.(5) Los modelos en animales tienen limitaciones, especialmente en ratones, ya que no producen una fuerte inflamación a comparación de lo que ocurre en humanos.

La familia de metalopeptidasas de matriz (MMP), son enzimas que contribuyen a la remodelación de tejido normal y patológico. La degradación de la matriz extracelular ocurre procesos fisiológicos normales, como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación tisular. Se cree que la enzima participa en la reparación de heridas, la progresión de la aterosclerosis y la iniciación del tumor. La mayoría de las MMP se secretan como proteínas inactivas que se activan cuando se escinden mediante proteinasas extracelulares. El gen es parte de un grupo de genes MMP que se localizan en el cromosoma 11q22.3.

Las MMP se clasifican en subgrupos principales que incluyen colagenasas (MMP-1, -8, -13, -18), gelatinasas (MMP -2, -9), estromelinas (MMP -3, -7, -10, -11, -19), elastasa (MMP -12) y tipo de membrana (MMP -1, -5) .

La MMP3 es una endopeptidasa dependiente de zinc que puede degradar varios componentes y moléculas extracelulares, como transferrina, laminina, colágeno y condroitina. Se localiza en el cromosoma 11q22.2. La matriz extracelular está compuesta principalmente por colágeno, elastina, proteoglicanos y aminoglicanos. MMP3 expresa una MMP capaz de degradar el colágeno, que es la estructura principal de la matriz extracelular. Esta degradación podría destruir la estructura y función de la matriz extracelular.(28)

MMP9 (gelatinasa B), una proteinasa de 92 kDa, degrada específicamente el colágeno tipo IV de la membrana basal (BM), así como gelatina, colágeno tipo I, V, VII, X, elastina, laminina y fibronectina. Se encuentra localizado en el cromosoma 20q13.12. MMP9, pertenece a la subfamilia de gelatinasa, ha jugado un papel importante en los estudios de angiogénesis, aterosclerosis y tejido adiposo. La familia de proteínas MMP participa en la descomposición de la matriz extracelular durante los procesos patológicos. La MMP9 es sintetizada principalmente por células inflamatorias, particularmente leucocitos polimorfonucleares. Se cree que la MMP9 se almacena en los gránulos secundarios y terciarios de los neutrófilos para una rápida liberación en los sitios inflamatorios . Encontramos que la cantidad de proteína MMP9 aumenta en relación con la inflamación en el tejido mucoso de la EII de espesor total, tanto en la enfermedad de Crohn como en colitis ulcerosa.

MMP3 y MMP9 se han encontrado sobre expresadas en células epiteliales e inflamatorias en modelos *in vivo* e *in vitro* en tejido mamario, ambos involucrados en la pérdida de la integridad de la función de la barrera epitelial por alteración de las proteínas de unión.(1) Por el momento solo se han asociado en un estudio de modelo experimental con ERGE; el primer estudio que asocia que estas proteínas de integridad de la barrera epitelial podrían estar alteradas en esta enfermedad en humanos.

Recientemente Bonfiglio et al proporcionaron evidencia de 30 loci independientes que están involucrados en vías moleculares con relevancia biológica para la fisiopatología de la ERGE. Este estudio propuso ideas iniciales sobre el fondo genético de la ERGE, que fue respaldado por análisis de GWAS que mostraron que la ERGE y el esófago de Barrett y el adenocarcinoma de esófago muestran una superposición sustancial en términos de su etiología genética.

Los avances en el descubrimiento de nuevas vías involucradas en la etiopatogenia de la ERGE destacan el papel crucial de la regulación de las respuestas inflamatorias locales.

JUSTIFICACION

La enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) es la enfermedad más prevalente dentro de los padecimientos gastroenterológicos. Los pacientes con ERGE pueden presentar diferentes fenotipos y, aunque existen factores de riesgo asociados como en el esófago de Barrett, aún se desconoce por qué un paciente presenta un fenotipo específico, aún teniendo los mismos síntomas que otros. La importancia radica en que no todos los fenotipos reciben el mismo tratamiento, principalmente en ERNE en particular los pacientes con pirosis funcional, es decir, pacientes que tienen síntomas típicos de reflujo pero sin lesiones en la mucosa esofágica y una exposición al reflujo ácido normal.

Estudiar las bases moleculares y genéticas de una enfermedad es de importancia fundamental ya que ofrece profundidad en su patogénesis y abre nuevas rutas de opciones de un tratamiento específico.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen diferencias en la expresión génica de los mediadores de inflamación en los diferentes fenotipos de enfermedad por reflujo gastroesofágico?

HIPOTESIS:

Existen diferencias en la expresión génica de citocinas inflamatorias en mucosa esofágica en esofagitis erosiva y esófago de Barrett al comparar con la variedad no erosiva de la enfermedad por reflujo gastroesofágico y controles.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de genes asociados a la inflamación (IL1B, IL6, CXCL8, IL10, TNF, MMP3, MMP9, IFNG) en mucosa de esófago de los diferentes fenotipos de la enfermedad por reflujo gastroesofágico.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.-Analizar los cambios de expresión génica asociados a los diferentes fenotipos de la enfermedad por reflujo gastroesofágico: esofagitis erosiva, esófago de Barrett, enfermedad por reflujo no erosiva; de los genes asociados a la inflamación (IL1B, IL6, CXCL8, IL10, TNF, MMP3, MMP9, IFNG)

2.-Estratificar el grupo de enfermedad por reflujo no erosiva en pirosis funcional y exposición anormal al reflujo ácido, analizando los cambios de expresión génica; de los genes asociados a la inflamación (IL1B, IL6, CXCL8, IL10, TNF, MMP3, MMP9, IFNG)

METODOLOGÍA

PACIENTES

Se realizó un estudio transversal, que incluyó pacientes con síntomas típicos de enfermedad por reflujo gastroesofágico (pirosis, regurgitación). El presente estudio se llevó a cabo en el Departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Todos los pacientes que aceptaron participar fueron sometidos a una endoscopia superior (ya referidos por su médico tratante para este estudio) y de acuerdo con sus resultados fueron clasificados en 3 grupos: esofagitis erosiva (Clasificación de los Ángeles), esófago de Barrett (clasificación de Praga), y enfermedad por reflujo gastroesofágico no-erosiva. Este último grupo se subclasificó en exposición anormal al ácido o pirosis funcional de acuerdo a un estudio de pHmetría de 24 h. A todos los grupos se les tomaron biopsias de mucosa esofágica durante el procedimiento endoscópico. Se determinó la expresión de los genes asociados a la inflamación (IL1B, IL6, CXCL8, IL10, TNF, MMP3, MMP9, IFNG) en cada fenotipo de la enfermedad.

El grupo control incluyó pacientes que acudieron con dispepsia en estudio, quienes al momento de su endoscopia presenten una mucosa gástrica macroscópicamente sin lesiones.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Criterios de selección pacientes con ERGE:

- Síntomas típicos de ERGE al menos una vez por semana por al menos 1 año (pirosis y/o regurgitación) de primera vez
- Sujetos mayores de 18 años, ambos géneros, que acepten participar en el protocolo.

Criterios de selección de controles:

- Endoscopia realizada por dispepsia en estudio.
- Sujetos mayores de 18 años.
- Ambos géneros

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Antecedente de endoscopia previa.
- Consumo de Inhibidor de bomba de protones los 7 días previos a la toma de muestra de biopsia de mucosa esofágica
- Embarazo
- Presencia de úlcera esofágica
- Antecedente de cirugía de esófago o gástrica previa (excepto apendicectomía)

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

- Desear salirse del estudio
- No contar con los datos clínicos completos para el análisis
- Muestras con problemas técnicos para su procesamiento

MÉTODOLOGIA.

Se realizó una endoscopia de tubo digestivo superior (panendoscopia), y en este momento se clasificó, de acuerdo con los hallazgos, en esofagitis erosiva (Clasificación de los Ángeles, Anexo) , Esófago de Barrett (Clasificación de Praga, Anexo) y enfermedad por reflujo no erosiva (mucosa de unión esófago-gástrica normal). Se tomaron biopsias de las lesiones encontradas en esófago o biopsia a 4-5 cm de la línea Z (en caso de mucosa normal). A los pacientes del grupo de

enfermedad por reflujo no erosiva y a los controles se les realizó una pHmetría de 24 horas.

EVALUACIÓN ENDOSCÓPICA

Se realizó una panendoscopia posterior a una sedación con midazolam (2.5 mg) para valorar la presencia/ ausencia de daño a la mucosa esofágica. En caso de encontrar lesiones, se tomaron dos biopsias de la región lesionada en los grupos EE, EB o en caso de no encontrar lesiones a 5 cm arriba de la unión escamocolumnar de la mucosa esofágica (dos biopsias)

PHMETRÍA esofágica de 24 h:

Se realizó medición de pH esofágico de 24 h con catéter de 1 sensor (GeroFlex, Alpine bioMed, Fountain Valley CA, Estados Unidos) colocado a 5 cm por arriba del EEI, localizado por manometría esofágica. Aparato de registro portátil (Digitrapper, Medtronic, Parkway, Minneapolis MN, Estados Unidos). De acuerdo con el resultado del porcentaje de tiempo de exposición al pH <4, fueron clasificados en Exposición anormal al ácido (EAA) (porcentaje de tiempo de exposición > 4.2%) o exposición ácida normal (EAN) (porcentaje de tiempo de exposición < 4.2%).

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA(29-32)

Equipos

1. Refrigerador 4°C /Congelador -20°C (Congelador THERMO FISHER, No. B-B-02661, Estados Unidos)
2. Ultracongelador de -70°C (THERMO FISHER, No. B3-0318, Estados Unidos)
3. Homogenizador (Kinematica AG, PT 1300D, Estados Unidos)
4. Cámaras de electroforesis (Gibco BRL Horizon 58, Estados Unidos)

5. Fotodocumentador UVP (TM – 15 de 115V, 50 Hz y 1.20 Amps BIORAD, Estados Unidos)
6. Software y cámara fotográfica para geles de agarosa (Kodak DC290, Estados Unidos)
7. Espectrofotómetro NANODROP (Perkin Elmer Lambda E2201, Estados Unidos)
8. Termociclador (THERMO FISHER ND-2000, Estados Unidos).
9. Termociclador en tiempo real (Light Cycler 480 Roche, Alemania)
10. Multiplacas blancas de 96 pozos de Roche[®]. Alemania
11. Centrifugas: MiniSpin y 5415 C de Eppendorf[®]. Alemania
12. Termoblock 1909312 para 32 capilares de Roche[®]. Alemania

Reactivos

1. Kit de Extracción de RNA de tejido (High Pure RNA Tissue Kit de Roche[®] Alemania)
2. Reactivos para síntesis de ADN complementario (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit de Roche[®], Alemania)
3. Mezcla de reacción compatible con sondas TaqMan de Roche[®] Alemania
4. Sondas TaqMan (Universal Probe Library Set, Human de Roche[®]) Alemania
5. Iniciadores (Invitrogen Custom Primers, Estados Unidos)

La síntesis de ADN complementario se realizó por RT-PCR de acuerdo con la siguiente mezcla de reacción:

- 2 µl de hexámeros random (50 µM).
- 4 µl de Buffer (5x).
- 0.5 µl de inhibidor de RNAsas (40 U/µl).
- 2 µl de mezcla de dNTPS (10 mM).
- 0.5 µl de transcriptasa reversa.
- 1 µl de Agua grado PCR.
- 10 µl de muestra de ARN aislado.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó empleando como sustrato el ADN complementario que resultó de la retrotranscripción. Para la amplificación de las regiones de interés, la reacción fue llevada a cabo en 10 μ l, y contenía:

- 5.5 μ l de Agua grado PCR.
- 2.0 μ l de Taqman Master MIX
- 0.2 μ l de iniciadores sentido y 0.2 antisentido de Invitrogen, Estados Unidos
- 0.1 μ l de sonda p (Universal Probe Library Set, Human de Roche, Alemania)
- 2 μ l de ADN complementario

TEJIDO

Para la cuantificación de la expresión génica de IL1B, IL6, CXCL8, IL10, TNF, MMP3, MMP9 e IFNG, se obtuvieron biopsias de mucosa de esófago. Las biopsias se colocaron en tubos crioviales con 1 mL de preservador de ácidos nucleicos (RNA later), se mantuvieron a temperatura ambiente por un período de 6 a 8 horas, posteriormente fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de la extracción del ARN.

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.

A partir de las biopsias de mucosa de esófago se obtuvo el ARN total empleando un kit de extracción de ARN (High Pure RNA Tissue Kit de Roche, Alemania), según la metodología sugerida por el fabricante. Las biopsias se mezclaron usando el homogenizador durante 1 minuto con amortiguador de lisis, se lavó con etanol al 100%, empleando las columnas de purificación, se centrifugó la mezcla a 13.000 xg durante 15 segundos, lavándose con amortiguador de lavado a 13.000

xg durante 15 segundos, finalmente se agregó 100 µl de buffer de elución al ARN total.

La cuantificación de la concentración de ARN se realizó con Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Estados Unidos) se leyó a una longitud de onda de 260 y 280 nanómetros.

Una alícuota de cada uno de los productos de ARN se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y fue visualizado por tinción con bromuro de etidio. Se documentó con un transiluminador con luz ultravioleta. ANEXO

SÍNTESIS DE ADN DE CADENA COMPLEMENTARIA POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA.

El ADN de cadena complementaria se obtuvo por Transcripción Reversa. La reacción se llevó a cabo con 10 µl de la siguiente forma: Preincubación: 25°C X 10 minutos, Incubación: 55°C x 30 minutos, seguida de la desnaturalización: 85°C x 5 minutos en un termociclador (Perkin-Elmer, Estados Unidos).

ANÁLISIS DE LA CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS POR PCR EN TIEMPO REAL.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó empleando como sustrato el ADN complementario que resultó de la retrotranscripción. Para la amplificación de las regiones de interés, la reacción fue llevada a cabo en 10 µl. Incluir los reactivos contienen los 10 µl La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: un programa de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, 45 ciclos de amplificación (95°C-10 segundos, alineación 60°C 10 segundos, extensión 40°C-30 segundos) y un ciclo de enfriamiento a 4°C, durante 30 segundos. Para determinar la expresión relativa de los genes blanco y GAPDH (Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa, como gen de referencia) se utilizó el Termociclador Light Cycler 2.0 (Roche, Alemania) empleando ensayos validados para la cuantificación (reproducibilidad y linealidad), con iniciadores sentido y antisentido de Invitrogen (Estados Unidos) y sondas TaqMan para cada gen (Universal Probe Library Set, Human de Roche, Alemania) como se ilustra en la Tabla 1 .

Tabla 1. Diseños de la Librería de Sondas Universales de Humano (Roche, Alemania).

| Gen | Banco de gen | Iniciadores Sentido Anti-sentido | Sonda UPL |
|----------------------|---------------------|---|----------------------|
| IL1B | NM_000576.2 | tacctgtcctgcgtgtgaa tctttgggtaattttgggatct | #78 |
| IL6 | NM_000600.3 | gccagctatgaactcctct cttctcctgggggtactgg | # 68 |
| IL8 CXCL8 | NM_000584.2 | agacagcagagcacacaagc atgggtcctccggtggt | #72 |
| IL10 | NM_000572.2 | cataaattagagggtcctcaaaatcg aaggggctgggtcagctat | #45 |
| IFNG | NM_000619.2 | ggcatttgaagaattggaaag tttggatgctctggtcatctt | #21 |
| TNF | NM_000594.2 | cgctccccaagaagacag agaggctgaggaacaagcac | #57 |
| MMP3 | NM_002422.3 | caaacatatttctttagaggacaa ttcagctatttgctgggaaa | #36 |
| MMP9 | NM_004994.2 | gaaccaatctcaccgacagg | #6 |

| | | | |
|--------------|--------------------|---|-----|
| | | gccacccgagtgtaaccata | |
| GAPDH | NM_002046.3 | agccacatcgctcagacac gcccaatacgaccaaattcc | #60 |

DEFINICIONES OPERACIONALES

EE: pacientes con síntomas de ERGE con erosiones o disrupciones de la mucosa esofágica de distintos grados. (Clasificación de los Ángeles)

ERNE: síntomas de ERGE, pero sin lesiones en la endoscopia. A su vez, estos pacientes con ERNE se subclasifican en pacientes con exposición al esófago con reflujo normal (no relacionada con reflujo ácido) y anormal (presencia de reflujo ácido anormal o asociación sintomática).

EB: pacientes con EB de segmento largo (> 3 cm) y corto (< 3 cm) del segmento de la columna de epitelio localizado entre el límite superior de los pliegues gástricos y la parte proximal de la línea Z e histopatológicamente confirmada la presencia de metaplasia intestinal en biopsias del segmento de epitelio de Barrett.

Grupo control: pacientes sin patología que involucre su inmunidad (neoplasias, enfermedad celiaca, enfermedades reumatológicas) que presente dispepsia en estudio, con una endoscopia normal (sin patología orgánica) y con pHmetria normal (que descarta reflujo gastroesfágico).

Tamaño de la muestra.

Los estudios previos en la literatura han incluido de 10 a 15 pacientes por grupo. Considerando las pérdidas, al menos se pretendió incluir a 20 pacientes por grupo.

Cálculo de tamaño de muestra para comparar promedios en dos poblaciones:

Nivel de confianza 95% ($Z_{1-\alpha}=1.96$)

Potencia de prueba 80% ($Z_{1-\beta}=0.84$)

De acuerdo al estudio previo de Gao et al (33) para MMP9 en enfermedad inflamatoria intestinal vs controles, se calculó la DE en 1.5 ($S^2=2.25$) y la diferencia propuesta para este estudio es de 1.5.

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 * S^2}{d^2}$$

Con esta información el tamaño de muestra fue de 15.7 pacientes por cada grupo

Esta estimación realizada con programa Stata versión 14

Se incluirán 20 pacientes por grupo, considerando pérdidas, en total 100 pacientes. (El subtipo de ERNE deberá tener 20 pacientes cada uno)

Análisis estadístico:

Los tiempos de exposición al ácido en cada subgrupo del fenotipo no erosivo y los controles se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

A los pacientes con lesiones (EE y EB) se les realizaron 2 biopsias: una biopsia de la lesión y otra biopsia de mucosa sana. La expresión de cada gen se analizó utilizando la prueba de Wilcoxon, y cada paciente sirvió como su propio control. Para fines de análisis, se utilizaron biopsias del tejido de la lesión (EE, BE) para realizar comparaciones con el grupo de control.

El análisis estadístico de la expresión génica diferencial se realizó utilizando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. El análisis se realizó utilizando (Paquete estadístico para ciencias sociales) SPSS versión 20 y Prism GraphPad versión 6.

Consideraciones éticas

Este trabajo se realizó de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki. El estudio fue aprobado por el comité de ética de nuestra institución y se obtuvo un consentimiento informado por escrito de todos los pacientes. La carta de aprobación del comité de ética e investigación institucional se encuentra en el Anexo 3.

RESULTADOS

Características demográficas y clínicas.

De los 82 pacientes incluidos, el 64,6% eran mujeres con una mediana de edad de 59 años. Los pacientes se dividieron en los siguientes grupos: Grupo EE, 23 (28,04%); grupo EB, 16 (19,51%); Grupo EAA, 13 (15,86%); Grupo ENA, 13 (15,86%); y Grupo de Control, 17 (20,73%). Las características demográficas basadas en el grupo, los hallazgos endoscópicos y el tiempo de exposición al ácido se detallan en la Tabla 2.

La mediana del tiempo de exposición al ácido se obtuvo durante el estudio de monitoreo de pH de cada subgrupo del fenotipo endoscópico no erosivo (Tabla 2). Comparando el porcentaje obtenido entre los grupos, se observaron diferencias significativas (0,001) con un porcentaje mayor en el subgrupo AAE como se esperaba. El grupo ENA y los controles se compararon específicamente. Aunque el porcentaje medio se incrementó en el subgrupo ENA, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos.

Tabla 2. Características demográficas de los pacientes con ERGE y controles, hallazgos endoscópicos y tiempo de exposición al ácido en 24 horas.

| | EE | EB | EAA | ENA | Control |
|--------------------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| n(%) | 23 (28.04%) | 16 (19.51%) | 13 (15.85) | 13 (15.85) | 17 (20.73) |
| Edad años mediana(IQ) | 50 (34-60) | 56 (42.64) | 49 (40-54) | 31 (25-43) | 45 (32-52) |
| Género | | | | | |
| Femenino | 12 | 9 | 9 | 10 | 13 |
| n(%) | (52.18) | (56.25) | (69.24) | (76.92) | (76.48) |
| Masculino | 11 | 7 | 4 | 3 | 4 |

| | | | | | |
|--|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------|------------------|----------------|
| N(%) | (47.82) | (43.75) | (30.76) | (23.07) | (23.52) |
| Hallazgos endoscópicos | Esofagitis A-B: 16 C-D: 7 | Segmento <3 cm: 10 >3 cm: 6 | No erosivo | No erosivo | Non Erosive¿? |
| Exposición esofágica anormal en 24 h median%(IQ) | NA | NA | 13.65 (8.55-20.1) | 1.0 (0.2-1.6) | 0.6 (0-1.1) |

EE Esofagitis esofágica, EB Esófago de Barrett, EAA Exposición ácida anormal, Exposición ácida normal ENA, F Mujer, NA no disponible

La expresión génica relativa de citocinas proinflamatorias fue detectable y cuantificable por RT-qPCR en biopsias de diferentes fenotipos de enfermedad por reflujo gastroesofágico y controles. La Figura 2 presenta la expresión génica relativa de citocinas proinflamatorias en todos los grupos de fenotipo y el grupo de control.

Se ejemplifica curva representativa de cuantificación relativa de RT-qPCR (Anexo)

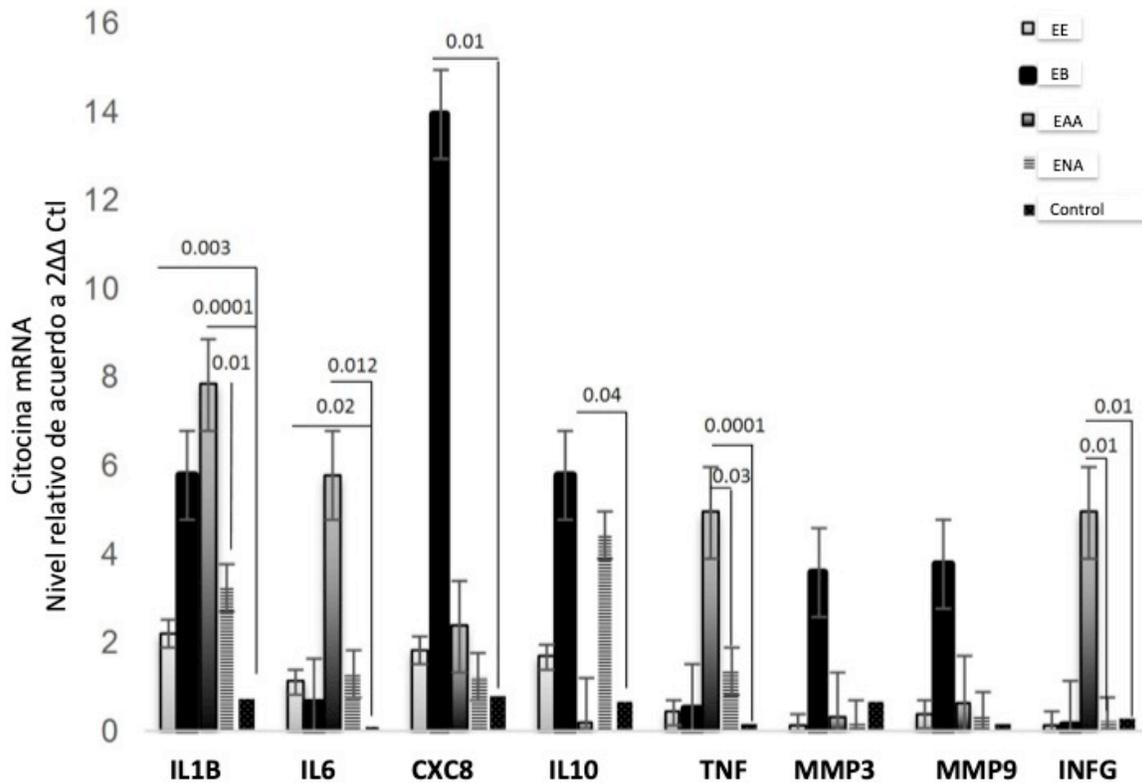


Figura 2 Perfil de expresión génica de todas las citocinas en la mucosa lesionada del esofagitis erosiva (EE), esófago de Barrett (EB), exposición anormal al ácido (EAA), exposición normal al ácido (ENA) y control(CONTROL) niveles de ARNm. Las barras muestran la media \pm SEM de la media de los niveles de transcripción de pacientes con GAPDH como gen Constitutivo

En nuestro grupo de investigación , previamente se han realizado pruebas de estandarización de genes constitutivos en diferentes tejidos. Algunos estudios previos han demostrado la calidad de GAPDH como un control apropiado para lo tejidos de las mucosas , incluyendo el esófago y no se ha mostrado evidencia del efecto de la edad, sexo del individuo en la expresión constitutiva de GAPDH en varios tipos de tejidos. (32)

Comparando la expresión de genes en todos los grupos, se destaca EB con predominio de expresión de IL8, IL10, MMP3 y MMP9, y expresión de IL1B, IFNG, IL6 y TNF es notable en el grupo EAA.

No se observaron diferencias al comparar las biopsias de lesión vs mucosa sana en el mismo paciente en los grupos EB y EE; por lo tanto, se decidió que todas las comparaciones de los grupos EE y EB se analizaron utilizando las muestras de tejido lesionado. No se encontraron diferencias al comparar pacientes con EB > 3 cm y <3 cm.

Perfil de expresión génica en pacientes con esofagitis erosiva y controles.

Los pacientes con EE exhibieron niveles significativamente más altos de expresión relativa de ARNm de IL1B, IL6 e IL10 en comparación con los controles ($P = 0.003$, $P = 0.02$ y $P = 0.04$, respectivamente) (Figura 3). Múltiples comparaciones corroboraron un predominio significativo de IL1B en comparación con las citocinas restantes.

Perfil de expresión génica en pacientes con esófago de Barrett y controles.

Los pacientes con EB mostraron un aumento de la expresión de CXCL8 en comparación con el grupo de control ($P = 0.010$) (Figura 4). Además, detectamos niveles más altos de mediadores inflamatorios, como IL1B, MMP3 y MMP9, en muestras de pacientes con EB en comparación con el grupo control.

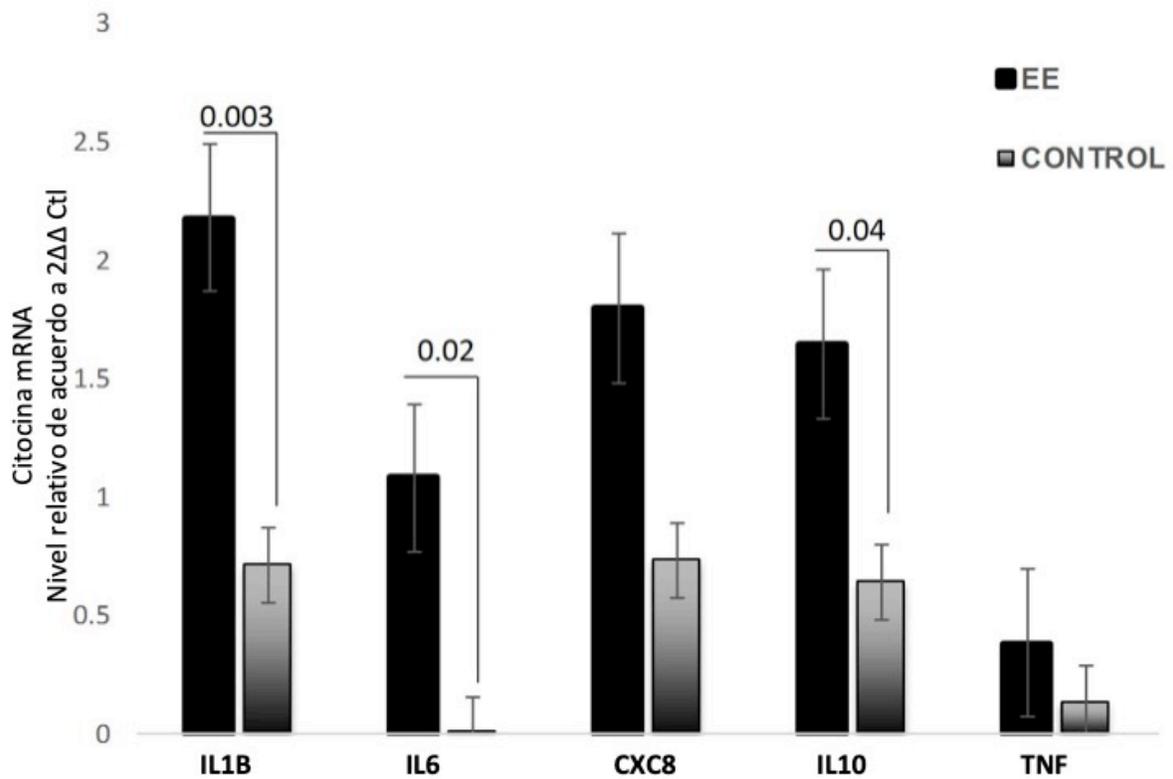


Figura 3.

Perfil de expresión génica en mucosa lesionada de niveles de ARNm de esofagitis erosiva (EE) y controles (C).

Las barras muestran la media \pm SEM de la media de la transcripción de pacientes con EE con GAPDH como gen constitutivo. * $p < 0.05$

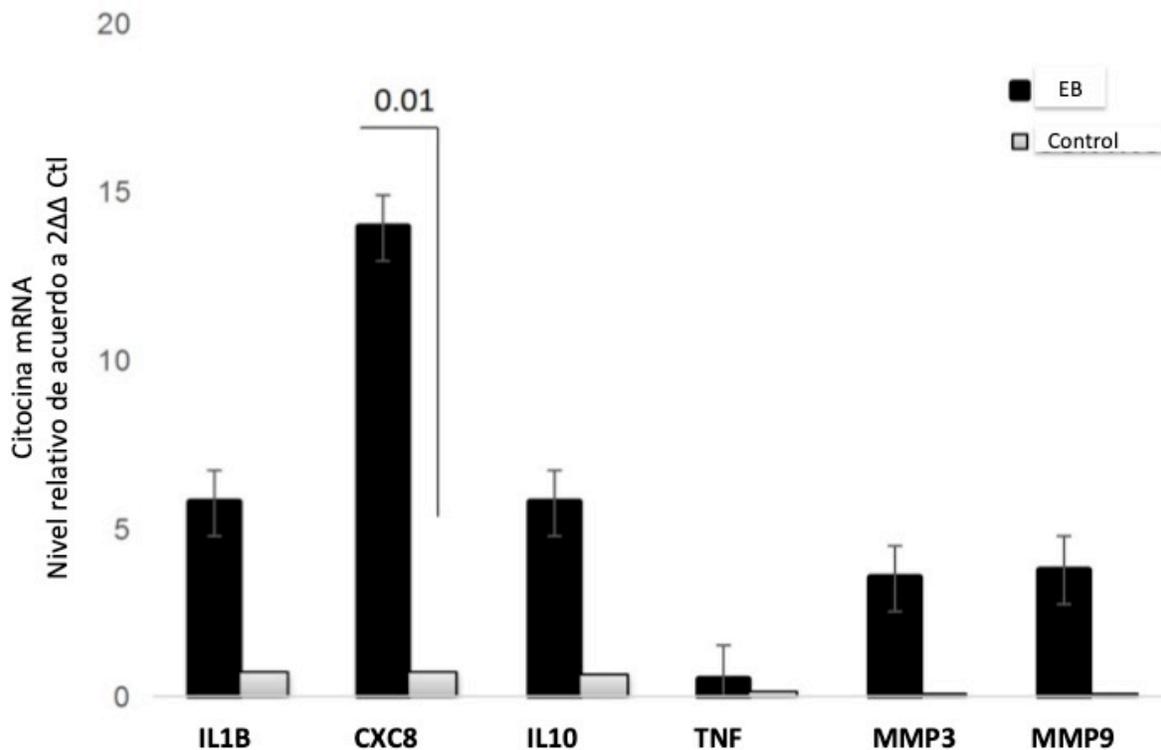


Figura 4.

Perfil de expresión génica en la mucosa lesionada del esófago de Barrett (EB) y niveles de ARNm de controles (C).

Las barras muestran la media ± SEM de la media de los niveles de transcripción de pacientes EB con GAPDH como gen constitutivo * p <0.05.

Perfil de expresión génica en pacientes con fenotipo endoscópico no erosivo subclasificado como EAA/ENA y controles.

Los pacientes con fenotipo endoscópico no erosivo se subclasificaron como EAA/ENA Figura 5. Los pacientes con EAA mostraron una mayor expresión de IL1B, IL6 y TNF en comparación con el grupo de control (P <0.05). Los pacientes del grupo EAA mostraron un aumento de la expresión de IL1B y TNF en comparación con el grupo ENA (P <0.05).

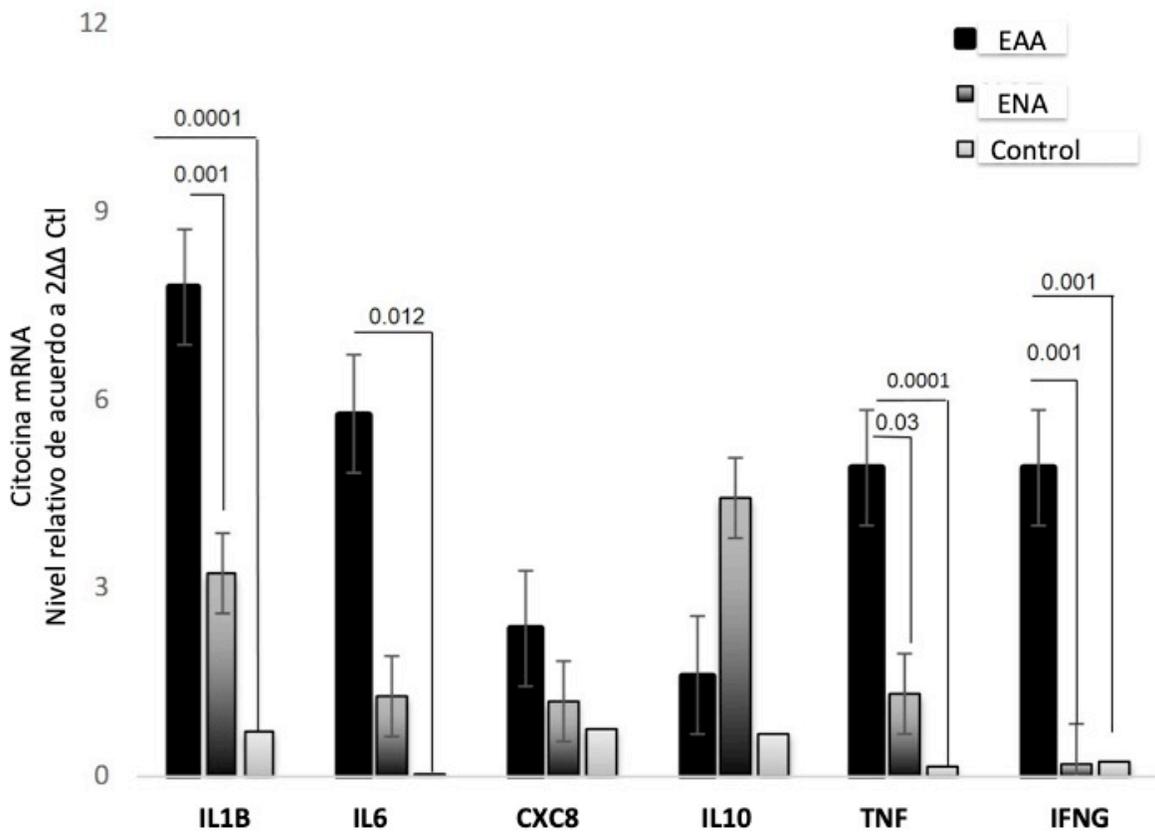


Figura 5. Perfil de expresión génica de citocinas inflamatorias con exposición anormal al ácido (EAA), exposición normal al ácido (ENA) y controles (C) niveles de ARNm. Las barras muestran la media \pm SEM de la media de los niveles de transcripción en la mucosa de pacientes con ERNE con GAPDH como gen constitutivo * $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, evaluamos la expresión génica de citocinas involucradas en la fisiopatología y la respuesta inmune de la ERGE. Este estudio analizó la expresión génica de mediadores inflamatorios (IL1B, IL6, CXCL8, IL10, TNF, IFNG) y dos metaloproteasas (MMP3, MMP9) asociadas con el daño de la mucosa esofágica como se informó en estudios previos en pacientes con 3 fenotipos endoscópicos diferentes de la enfermedad (EE, EB y ERNE). La expresión génica también se comparó en pacientes con la variedad no erosiva que se sometieron a

monitoreo de pH durante 24 horas para diferenciar los casos con exposición anormal al ácido esofágico de aquellos con exposición normal.

Los pacientes con EE demostraron niveles aumentados de IL1B, IL6 e IL10. Los pacientes con EB mostraron una mayor expresión de CXCL8, IL10, MMP9 y MMP3; los pacientes con EAA destacaron con niveles más incrementados de IL1B, INFG, IL6 y TNF. EAA, mostró una mayor expresión de IL1B y TNF en comparación con ENA. Una diferencia relevante en los grupos con verdadero reflujo patológico y aquellos sin metaplasia (EE y EAA) es una mayor expresión de IL10 en EE en comparación con EAA.

Aunque se trata de un estudio descriptivo, los hallazgos son de interés. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que analiza todos los fenotipos endoscópicos de pacientes con síntomas típicos de ERGE, evalúa el fenotipo endoscópico no erosivo mediante un estudio de monitorización del pH y caracteriza la expresión génica en estos pacientes de acuerdo con los resultados del estudio de monitoreo del pH. .

El perfil de mediadores en el fenotipo erosivo es un ejemplo clásico del equilibrio que existe entre la expresión de Th1 y Th2 en respuesta a la agresión presentada (reflujo). En este estudio, demostramos una mayor expresión de citocinas proinflamatorias, como IL1B e IL6, en biopsias de mucosas de pacientes con EE. Otros autores han presentado hallazgos similares en pacientes con la variedad erosiva.(6, 34-36)

Curiosamente, encontramos un aumento de la expresión del gen de IL10 en la mucosa de los pacientes con EE en comparación con los controles, y estos resultados sugieren el posible papel de la IL10 como una citocina crítica en el mecanismo inmunorregulador de la respuesta inflamatoria crónica en el esófago. La IL10 es una citocina con potentes propiedades antiinflamatorias que desempeña un papel central en la limitación de la respuesta inmune del huésped, previniendo así el daño al huésped y manteniendo la homeostasis normal del tejido.

Por otro lado, el perfil de mediadores en EB proporciona una mayor comprensión de la patogenia del esófago de Barrett y el posible papel inmunorregulador de IL10 asociado con el daño permanente de la mucosa que no puede contrarrestar la agresión de otros mediadores de inflamación. Este hallazgo está de acuerdo con un estudio anterior informado utilizando un modelo de ratón del esófago de Barrett que mostró una mayor expresión de IL10 en comparación con ratones con esófago no Barrett; sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de citocinas proinflamatorias, como TNF o INFG.(25) Por otro lado, la expresión de MMP3 y MMP9 se incrementó en EB en comparación con el grupo control, y la expresión de estos genes predomina en este fenotipo. Encontramos que la expresión de esta proteasa estaba incrementada, aunque nuestro grupo de pacientes con EB no presentaba displasia.(27) Se necesitan más estudios para determinar si las metaloproteínas desempeñan un papel en el daño de la mucosa en EB. Nuestro estudio destaca la participación de MMP9 y MMP3 en pacientes con EB, lo que posiblemente explique el mecanismo patológico de este cambio epitelial.

Con respecto a las mediciones de CXCL8, observamos una mayor expresión de esta citocina en pacientes con EB en comparación con los controles. La inflamación crónica en EB puede jugar un papel crítico en la progresión de enfermedad esofágica benigna a maligna.

En relación con nuestros resultados, Fitzgerald et al (37) realizaron un estudio en 26 pacientes con EE, 22 con EB y 18 con ERNE. La media de edad en cada grupo fue discretamente mayor que en nuestra muestra (53 a 61 años vs 31 a 56 años, respectivamente). IL1B, CXCL8 e IFNG predominaron significativamente en el fenotipo erosivo en comparación con los pacientes con EB. En nuestro estudio existe un predominio de IL1B y en EB de CXCL8.

Estudios recientes han proporcionado una mayor comprensión de la fisiopatología y la generación de síntomas en la ERNE.(27) En pacientes con fenotipo no erosivo, este estudio nos permitió caracterizar pacientes con EAA y ENA. El subgrupo EAA, que se confirmó que presentaba reflujo patológico como corrobora el estudio de monitoreo del pH, exhibió similitudes con el grupo EE, es decir,

mayor expresión de IL1B e IL6. Estos genes podrían ser dos marcadores en pacientes con ERGE real que no presentan metaplasia. AAE también presentó diferencias únicas en comparación con todos los grupos, como incrementos significativos en INFG y TNF en comparación con el grupo de control. La expresión de citocinas EAA y ENA fue muy similar a la observada en el grupo de control. Un hallazgo que destaca las diferencias entre EAA y ENA es el aumento de la expresión de IL1B y TNF en EAA. En un estudio posterior de precisión diagnóstica, valdría la pena determinar si IL1B / TNF representan biomarcadores útiles en biopsias en el momento de la endoscopia para definir EAA / ENA para fenotipos endoscópicos no erosivos. Curiosamente, encontramos una disminución de la expresión de IL-10 en pacientes con EAA y ENA en comparación con los controles.

En este estudio se describe un perfil de expresión similar entre EE y EAA con una mayor expresión de IL1B e IL6. Sin embargo, incluso estos hallazgos no explican por qué los pacientes con reflujo patológico pueden presentar erosiones y otros no (a pesar de que la mediana de pacientes con % de tiempo con pH <4 fue de 13,65%, 3 veces más que el punto de corte). Al comparar la expresión de citocinas en estos dos grupos, este hallazgo indica potencialmente que estas citocinas están involucradas en el mecanismo de reparación y daño de la mucosa. Se necesitan más investigaciones para corroborar estos hallazgos. En un estudio previo de Isomoto et al (9), los hallazgos son contradictorios a los de nuestro estudio ya que no encontraron diferencias significativas entre EE y controles

Como se señaló anteriormente, mostramos que la CXCL8 aumenta principalmente en EB.(38) La expresión de CXCL8 no es parte de los hallazgos significativos en EE o EAA. Al contrario de nuestros resultados, algunos autores han informado de un aumento de CXCL8 en pacientes con ERNE. Isomoto et al (39) en un estudio realizado con 31 pacientes con ERNE, 15 con EE y 15 controles, encontraron que CXCL8 era significativamente mayor la expresión de este mediador de la inflamación en el grupo de ERNE y EE al compararlo con los controles. El número de pacientes por grupo fue muy similar a nuestro estudio pero no realizaron

estudios de pHmetría para subclasificar a los pacientes de ERNE. Previamente, Kanazawa et al detectaron un aumento de la expresión de CXCL8 en ERNE en comparación con sujetos asintomáticos no sujetos a estudios de monitoreo de pH.(40)

Este estudio informa el perfil de expresión génica de mediadores inflamatorios en el tejido del esófago de pacientes con diferentes fenotipos de ERGE. El estudio de las bases moleculares y genéticas de una enfermedad es de fundamental importancia ya que esta información ofrece un conocimiento profundo de su patogénesis y abre nuevas vías de diagnóstico y tratamiento específico. Comprender esta vía podría llevarnos a la posibilidad de revertir la alteración de estos genes y distinguir estos genes de los que están implicados en erosiones o lesiones en pacientes con ERGE en comparación con el fenotipo ERNE.

LIMITACIONES

Una de las principales limitaciones del estudio es la n, sobre todo en el grupo de ERNE y aunque era la de mayor número de pacientes al dividirlo de acuerdo a los subtipos la muestra con fines de análisis fue insuficiente.

En el grupo de EE no se realizó un análisis para conocer si existen diferencias en la expresión de genes de los pacientes con erosiones severas (esofagitis C o D de la clasificación de Los Ángeles) al compararlo con los pacientes con erosiones de menor severidad y con otros fenotipos.

Una de las limitaciones es que el gen constitutivo GAPDH no se obtuvo para cada uno de los grupos. En nuestro grupo de investigación , previamente se han realizado pruebas de estandarización de genes constitutivos en diferentes tejidos. Algunos estudios previos han demostrado la calidad de GAPDH como un control apropiado para lo tejidos de las mucosas , incluyendo el esófago y no se ha mostrado evidencia del efecto de la edad, sexo del individuo en la expresión constitutiva de GAPDH en varios tipos de tejidos.(32)

CONCLUSIÓN Este estudio demostró la expresión diferencial de mediadores de la inflamación en la mucosa esofágica de pacientes con diferentes fenotipos endoscópicos. IL1B y TNF podrían ser útiles para diagnosticar diferencialmente EAA y ENA en el fenotipo no erosivo usando biopsias endoscópicas. Las vías de daño de la mucosa podrían estar mediadas por MMP3 dado que la ruptura de la mucosa es inducida por la familia de metaloproteínas en EB. Se necesitan más estudios para corroborar la remisión de estos hallazgos con tratamientos médicos o quirúrgicos para la ERGE.

Referencias

1. Fang Y, Chen H, Hu Y, Djukic Z, Tevebaugh W, Shaheen NJ, et al. Gastroesophageal reflux activates the NF-kappaB pathway and impairs esophageal barrier function in mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2013;305(1):G58-65.
2. Tytgat GN. Recent developments in gastroesophageal reflux disease and Barrett's esophagus. *J Dig Dis*. 2012;13:291-5.
3. Ghoshal UC CD. Genetic factors in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *Indian J Gastroenterol* 2011;30:55-62.
4. Vardouniotis AS KA, Tzortzaki E, Athanasakis E, Samara KD, Chalkiadakis G, et al. Molecular pathways and genetic factors in the pathogenesis of laryngopharyngeal reflux. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009;266:795-801.
5. Pawlik M PR, Kwiecien S, Ptak-Belowska A, Sliwowski Z, Mazurkiewicz-Janik M, et al. Nitric oxide (NO)-releasing aspirin exhibits a potent esophagoprotection in experimental model of acute reflux esophagitis. Role of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *J Physiol Pharmacol*. 2011;62:75-86.
6. Tack J, Pandolfino JE. Pathophysiology of Gastroesophageal Reflux Disease. *Gastroenterology*. 2018;154(2):277-88.
7. Ostrowski J RT, Wyrwicz LS, Mikula M, Bielasik A, Butruk E, et al. . Three clinical variants of gastroesophageal reflux disease form two distinct gene expression signatures. *J Mol Med*. 2006;84:872-82.
8. Calabrese C MV, Urbani A, Lazzarini G, Valerii MC, Liguori G, et al. Distinct proteomic profiles characterise non-erosive from erosive reflux disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2011;34:982-93.
9. Isomoto H, Nishi Y, Kanazawa Y, Shikuwa S, Mizuta Y, Inoue K, et al. Immune and Inflammatory Responses in GERD and Lansoprazole. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2007;41(2):84-91.
10. Chourasia D AB, Tripathi S, Mittal B, Mittal RD, Ghoshal UC. Genotypic and functional roles of IL-1B and IL-1RN on the risk of gastroesophageal reflux disease: the presence of IL-1B-511*T/IL-1RN*1 (T1) haplotype may protect against the disease. *The American journal of gastroenterology*. 2009;104:2704-13.
11. Oh DS DS, Vallbohmer D, Mori R, Kuramochi H, Hagen JA, et al. Reduction of interleukin 8 gene expression in reflux esophagitis of interleukin 8 gene expression in reflux esophagitis and Barrett's esophagus with antireflux surgery. *Archives of surgery*. 2007;142:554-9.
12. Spechler SJ FR, Prasad GA, Wang KK. History, molecular mechanisms, and endoscopic treatment of Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 2010;138:854-69.
13. RF S. From Reflux Esophagitis to Esophageal Adenocarcinoma. *Digestive diseases*. 2016;34(5):483-90.
14. <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=3553>.
15. Tanaka T NM, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10):a016295.

16. Contreras MG B-L, D, Pérez-Guerrero E, I Ruiz-Padilla, AJ, Saucedo-Ulloa M, Saldaña-Anguiano JM, Casillas-Iglesias F, González-López L. Niveles altos de IL-6 asociados a efectos sistémicos y locales en la artritis reumatoide. *El Residente*. 2015;10(1):38-42.
17. Scheller J CA, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro and anti inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(5):878-88.
18. Couper KN BD, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. 2008;180(9):5771-7.
19. Saxena A KS, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad AR. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*. 2015;74(1):27-34.
20. Driscoll KE CJ, Hassenbein DG, Howard B. Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environ Health Perspect*. 1997;105(5):1159-64.
21. Honchel R MS, Schaid DJ, Thibodeau SN. Tumor necrosis factor-alpha allelic frequency and chromosome 6 allelic imbalance in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*. 1996;56(1):145-9.
22. Schroder K HP, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163-89.
23. Rashidbaigi A LJ, Jung V, Jones C, Morse HG, Tischfield JA, Trill JJ, Kung HF, Pestka S. The gene for the human immune interferon receptor is located on chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(2):384-8.
24. Bae HR CM, Kim S, Young HA, Gershwin ME, Jeon SM, Kwon EY. IFN γ is a Key Link between Obesity and Th1-Mediated AutoImmune Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;28(22):208.
25. Zhong YQ LY, Xu Z. Expression of IFN-gamma and IL-4 in the esophageal mucosa of patients with reflux esophagitis and Barrett's esophagus and their relationship with endoscopic and histologic grading. *Digestive diseases and sciences*. 2011;56:2865-70.
26. <https://http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=3576>.
27. Monkemuller K WT, Kuester D, Fry LC, Peitz U, Beyer M, et al. . Interleukin-1beta and interleukin-8 expression correlate with the histomorphological changes in esophageal mucosa of patients with erosive and non-erosive reflux disease. *Digestion*. 2009;79:186-95.
28. Dai XY SA, Mu L, Wang LJ, Huang LQ. Potential Function of MMP3Gene in Degradation of Extracellular Matrix Complex in Colorectal Carcinoma. *Biomed Environ Sci*. 2021;34(1):66-70.
29. Fonseca-Camarillo G, Furuzawa-Carballeda J, Iturriaga-Goyon E, Yamamoto-Furusho JK. Differential Expression of IL-36 Family Members and IL-38 by Immune and Nonimmune Cells in Patients with Active Inflammatory Bowel Disease. *BioMed research international*. 2018;2018:5140691.
30. Fonseca-Camarillo G, Furuzawa-Carballeda J, Yamamoto-Furusho JK. Interleukin 35 (IL-35) and IL-37: Intestinal and peripheral expression by T and B regulatory cells in patients with Inflammatory Bowel Disease. *Cytokine*. 2015;75(2):389-402.
31. Yamamoto-Furusho JK, Fonseca-Camarillo G, Furuzawa-Carballeda J, Sarmiento-Aguilar A, Barreto-Zuniga R, Martinez-Benitez B, et al. Caspase

recruitment domain (CARD) family (CARD9, CARD10, CARD11, CARD14 and CARD15) are increased during active inflammation in patients with inflammatory bowel disease. *Journal of inflammation*. 2018;15:13.

32. Barber RD HD, Coleman RA, Clark BJ. . GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005;21(3):389-95.

33. Gao Q MM, Kubben FJ, Sier CF, Kruidenier L, van Duijn W, van den Berg M, van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in intestinal tissue of patients with inflammatory bowel diseases. *Dig Liver Dis*. 2005;37(8):584-92.

34. Kohata Y, Fujiwara Y, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Tanigawa T, et al. Role of Th-2 cytokines in the development of Barrett's esophagus in rats. *Journal of gastroenterology*. 2011;46(7):883-93.

35. Davelaar AL, Straub D, Buttar NS, Fockens P, Krishnadath KK. Active matrix metalloproteases are expressed early on and are high during the Barrett's esophagus malignancy sequence. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2015;50(3):321-32.

36. Yang L, Francois F, Pei Z. Molecular pathways: pathogenesis and clinical implications of microbiome alteration in esophagitis and Barrett esophagus. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(8):2138-44.

37. Fitzgerald RC, Abdalla S, Onwuegbusi BA, Sirieix P, Saeed IT, Burnham WR, et al. Inflammatory gradient in Barrett's oesophagus: implications for disease complications. *Gut*. 2002;51(3):316-22.

38. Bohmer AC, Schumacher J. Insights into the genetics of gastroesophageal reflux disease (GERD) and GERD-related disorders. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2017;29(2).

39. 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. *The American journal of gastroenterology*. 2004;99(4):589-97.

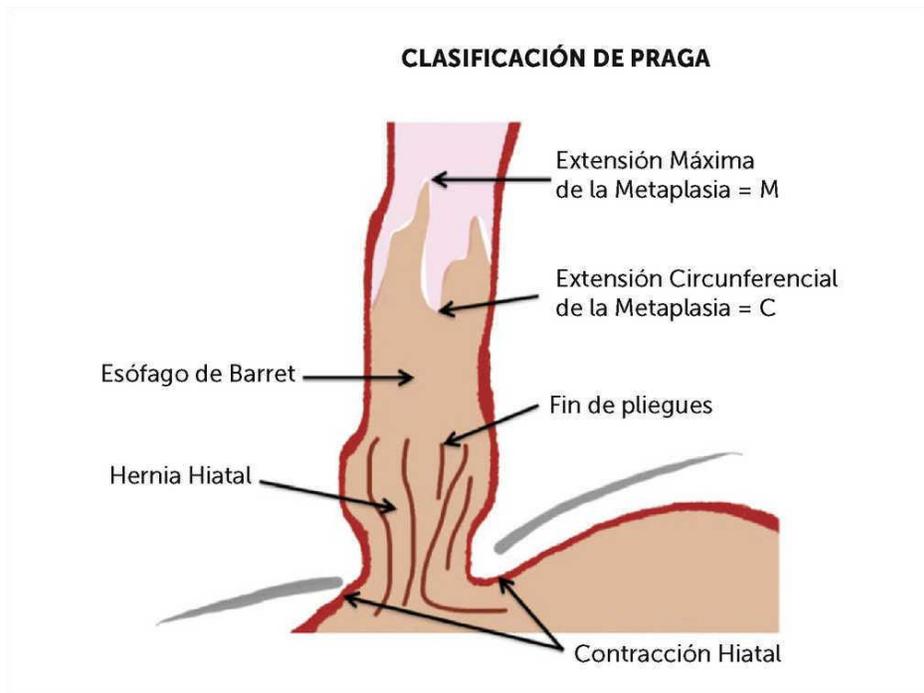
40. Kanazawa Y, Isomoto H, Wen CY, Wang AP, Saenko VA, Ohtsuru A, et al. Impact of endoscopically minimal involvement on IL-8 mRNA expression in esophageal mucosa of patients with non-erosive reflux disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2003;9(12):2801-4.

Anexo 1

| Clasificación de Los Ángeles | |
|------------------------------|---|
| Grado A | ≥ 1 ruptura mucosa ≤ 5 mm sin pasar pliegues |
| Grado B | ≥ 1 ruptura mucosa > 5 mm sin pasar pliegues |
| Grado C | Una o más rupturas mucosas que pasan pliegues e involucran $< 75\%$ de la circunferencia del esófago. |
| Grado D | Una o más rupturas mucosas que involucran al menos el 75% de la circunferencia del esófago. |

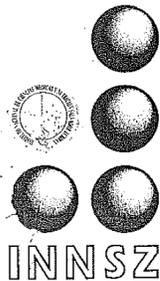
Rev Gastroenterol Mex. 2016;81:208-22

Anexo 2



Revista Médica Clínica Las Condes. 2015;26:557-64

Anexo 3



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

MÉXICO, D.F., A 29 DE JULIO DE 2013.

DR. JESÚS KAZUO YAMAMOTO FURUSHO
INVESTIGADOR PRINCIPAL
DEPTO. DE GASTROENTEROLOGÍA
P R E S E N T E

Por este medio, nos permitimos informarle que el *Comité de Investigación*, así como el *Comité de Ética en Investigación* del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, ha **revisado y aprobado** el Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

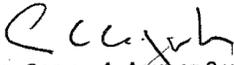
“Expresión de genes asociados a la inflamación en mucosa esofágica de pacientes con diferentes fenotipos de enfermedad por reflujo gastroesofágico”
Versión 15 de julio de 2013.
REF. 987

Así mismo se revisó y **aprobó** la siguiente documentación:

- Consentimiento Informado versión 15 de julio, 2013.

La vigencia de la aprobación termina el día 29 de julio de 2014. Si la duración del estudio es mayor tendrá que solicitar la re-aprobación anual del mismo, informando sobre los avances y resultados parciales de su investigación e incluyendo los datos sobresalientes y conclusiones.

Sin más por el momento quedamos de usted.


DR. CARLOS A. AGUILAR SALINAS
PRESIDENTE
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN




DR. ARTURO GALINDO FRAGA
PRESIDENTE
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

Investigación

Tradición

c.c.p. Dr. Rubén Lisker Y., Director de Investigación.
C.P. Martha Arredondo Urzúa, Jefe del Depto. C.F.E.I.

Asistencia

CAAS/AGF/MRG
Docencia

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00

Anexo 4

Una alícuota de cada uno de los productos de ARN se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y fue visualizado por tinción con bromuro de etidio. Se documentó con un transiluminador con luz ultravioleta como se observa en la siguiente imagen:

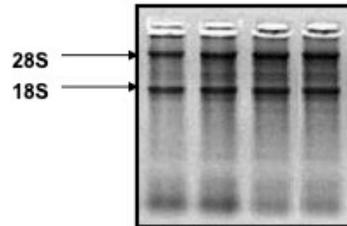
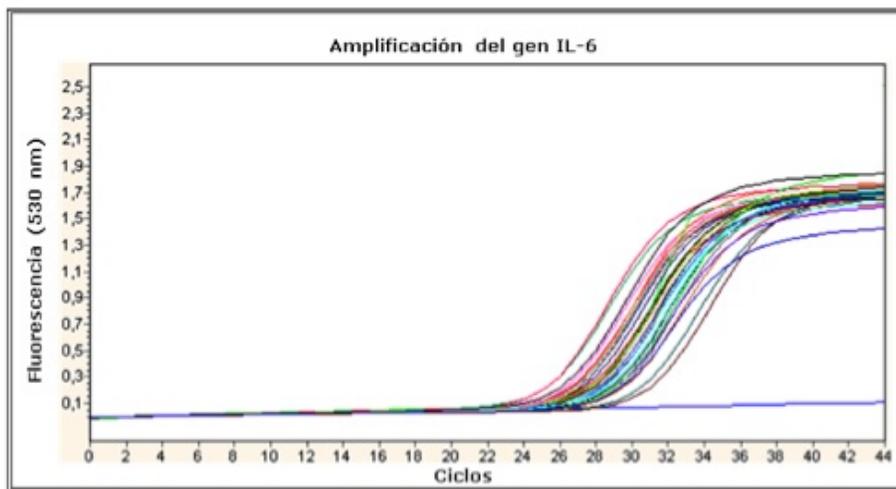


Figura 1 Bandas de ARN 28S y 18S de pacientes con ERNE en un gel de agarosa al 1 %.

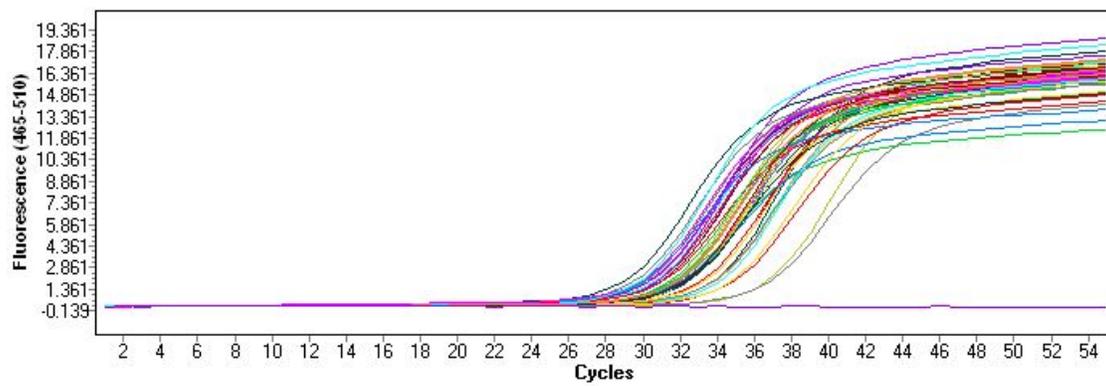
Anexo 5

Curvas representativas de RT-qPCR

Curva de cuantificación relativa de RT-qPCR de IL6



Curva de cuantificación relativa de RT-qPCR de TNF- α



Curva de cuantificación relativa de RT-qPCR de GAPDH

