

DILATACIONES DE LOS ESPACIOS INTERCELULARES COMO MARCADOR HISTOLÓGICO EN LA ENFERMEDAD POR REFLUJO GASTRO-ESOFÁGICO: PUESTA AL DÍA.

Intercellular space dilatations as histological markers in gastroesophageal reflux disease: a review.

Caballero Mateos AM¹, Bailón Gaona MC², Cañadas de la Fuente GA³, López Hidalgo J², Caballero Plasencia AM⁴

¹HOSPITAL SANTA ANA. MOTRIL. GRANADA.

²HOSPITAL CLÍNICO SAN CECILIO. GRANADA.

³FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE GRANADA. GRANADA.

⁴FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD DE GRANADA. GRANADA.

Resumen

A pesar de su elevada prevalencia en la población general, el diagnóstico de la Enfermedad por Reflujo Gastro-Esofágico (ERGE) sigue siendo actualmente un reto. Los consensos de Montreal y Lyon son de gran ayuda en la esquematización de este problema; sin embargo, sus consejos y diseño no pueden aplicarse en centros en donde la sofisticada metodología propuesta no existe, como son nuestros hospitales comarcales. Desde hace casi seis décadas se viene utilizando, con diversas aproximaciones y acierto, el método histológico como un procedimiento útil en el diagnóstico de la ERGE. Sin embargo, aunque su descripción y método también tienen esa antigüedad, se ha considerado muy escasamente el análisis y evaluación de las dilataciones de los espacios intercelulares (DEI) como un marcador histológico de esofagitis microscópica. Las DEI aparecen allí en donde hay un daño de la mucosa esofágica, generalmente por ácido y/o álcali refluído, con independencia de que existan o no lesiones endoscópicas. En este sentido, se han encontrado en muy elevado porcentaje en la ERGE erosiva pero también, con menor frecuencia, en la

ERGE no erosiva; refractaria o no a los IBP. Es muy sorprendente el hallazgo de DEI en el Esófago Hipersensible (pH-metría fisiológica) y, con mucha menor frecuencia y similar a la de los controles, en la Pirosis Funcional. Ello podría explicarse por la elevada sensibilidad de las DEI, que aparecen incluso en condiciones de escaso o fisiológico reflujo. En esta revisión se propone la determinación de las DEI para el diagnóstico de la esofagitis microscópica.

Palabras clave: enfermedad por reflujo gastro-esofágico, dilataciones de los espacios intercelulares, esofagitis microscópica.

Abstract

Despite its high prevalence in the general population, the diagnosis of Gastroesophageal Reflux Disease (GERD) remains a current challenge. The Montreal and Lyon consensus guidelines provide significant assistance in schematizing this

Antonio Caballero Mateos
Hospital Santa Ana. Motril. Granada.
ogy1492@hotmail.com

Caballero Mateos AM, Bailón Gaona MC, Cañadas de la Fuente GA, López Hidalgo J, Caballero Plasencia AM. Dilataciones de los Espacios Intercelulares como Marcador Histológico en la Enfermedad por Reflujo Gastro-Esofágico: Puesta al Día. RAPD 2025;48(5):177-195. DOI: 10.37352/2025485.1

problem; however, their recommendations and protocols cannot be applied in centers where the sophisticated methodology proposed does not exist, such as in Community Hospitals. For nearly six decades, the histological method has been used, with various approaches and success, as a useful procedure in the diagnosis of GERD. Nevertheless, although its description and methodology also date back to that time, the analysis and evaluation of Dilated Intercellular Spaces (DIS) as a histological marker of microscopic esophagitis has been scarcely considered. DIS appear wherever there is damage to the esophageal mucosa, generally caused by refluxed acid and/or alkali, regardless of whether endoscopic lesions are present or not. In this regard, they have been found in very high percentages in erosive GERD but also, with lower frequency, in non-erosive GERD, whether refractory to PPIs or not. The finding of DIS in Hypersensitive Esophagus (physiological pH-metry) is very surprising, and with much lower frequency, similar to that of controls, in Functional Heartburn. This could be explained by the high sensitivity of DIS, which appear even under conditions of minimal or physiological reflux. This review proposes the determination of DIS for the diagnosis of microscopic esophagitis.

Keywords: Gastroesophageal reflux disease, dilated intercellular spaces, microscopic esophagitis..

1. Definición y procedimientos diagnósticos de la Enfermedad por Reflujo Gastro-Esofágico.

La Enfermedad por Reflujo Gastro-Esofágico (ERGE) es una enfermedad muy frecuente con prevalencias que varían según la latitud considerada. En la población general de los países occidentales la prevalencia es 10-20% y, en menor cuantía, aunque creciendo, en Asia¹. La ERGE se produce cuando el contenido del estómago (ácido, alcalino o gaseoso) refluye hacia el esófago produciendo síntomas (pirosis y/o regurgitación) y/o complicaciones (esofagitis, estenosis, esófago de Barrett y adenocarcinoma). Los síntomas solo se consideran cuando afectan al bienestar del sujeto; los síntomas leves, infrecuentes y poco relevantes pueden presentarse hasta en el 40% de la población general y no deben considerarse ERGE. Por ello, suelen utilizarse cuestionarios que solo consideran ERGE si la presencia de síntomas es de suficiente intensidad/frecuencia^{2,3}.

Definición clínica. Consensos de Montreal, Lyon y Los Ángeles.

El Consenso de Montreal³ propone que la ERGE consta de unos síndromes esofágicos (síndrome sintomático y síndrome

con lesiones endoscópicas) y unos síndromes extra-esofágicos, con asociación establecida o propuesta (Figura 1).

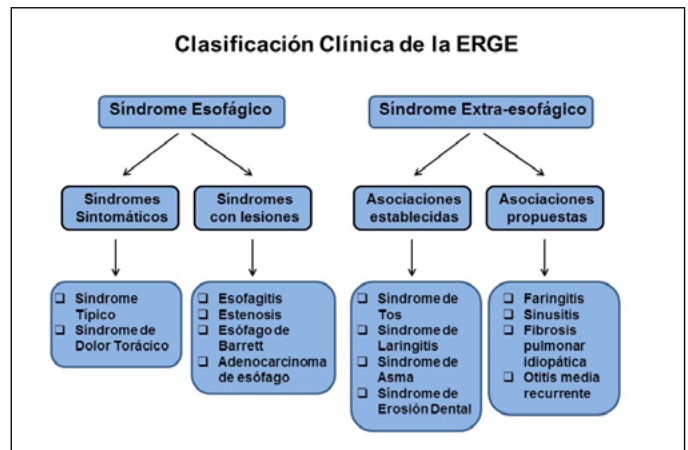


Figura 1. Clasificación y Síndromes de la ERGE según el Consenso de Montreal³.

Gracias a los Consensos de Montreal y Lyon I y II³⁻⁵, ha quedado establecida, de una forma lo más precisa posible, la definición de ERGE. Este hecho, aparentemente banal, es de gran importancia al acotar lo máximo posible el espectro clínico de la ERGE que, hasta el momento, había mostrado una variabilidad que impedía el correcto diseño y comparación de las investigaciones. En lo referente a la endoscopia digestiva alta (EDA), este trabajo de consenso ya se había logrado tras la aceptación de los criterios de Los Ángeles para las lesiones esofágicas inducidas por el reflujo gastro-esofágico (RGE)⁶. La EDA tiene una elevada especificidad (≈100%) para el diagnóstico de ERGE, pero baja sensibilidad pues, aproximadamente 2/3 de los pacientes con síntomas de ERGE, no tienen lesiones endoscópicas⁷⁻⁹. Hasta este punto, se ha conseguido con suficiente fiabilidad el diagnóstico clínico y endoscópico de ERGE, ya que nos permite dividir a estos pacientes en: 1) portadores de una ERGE con lesiones endoscópicas (grados A-D de los Ángeles) o ERGE Erosiva (EE), y 2) los que no presentan lesiones endoscópicas o son mínimas (grado N y M de los Ángeles) o ERGE no erosiva (ENE).

Estudio de la calidad y cantidad del material refluido

Tras la práctica de una EDA, empiezan los problemas metodológicos para el estudio de los diferentes fenotipos de las ENE. Siguiendo el protocolo, la prueba diagnóstica a efectuar en este momento sería, siempre que se pueda, una prueba combinada, la pHmetría ± Impedanciometría intraluminal multicanal de 24 h (pH-MII), que permite analizar tanto el RGE ácido como alcalino. Esta prueba subdivide la ENE en: ENE “verdadera” (ENEv), si la pH-MII es patológica y ENE “funcional” (ENEf), si la pH-MII es normal. Se ha comunicado

que entre el 37-60% de la ENE totales tienen pHmetría normal, lo que debería corresponder al porcentaje de pacientes con ENEf⁷. Hoy en día, tras los criterios de Roma IV⁷, la ENEf no forma parte de la ERGE, al considerarse un proceso funcional del esófago y, por ello, parte del espectro de los Trastornos de las Interacciones Cerebro-Intestino (TICI). Las ENEf están constituidas por dos entidades: el Esófago Hipersensible (EH) cuando la SAP/SI (Symptom Association Probability y Symptom Index, pruebas que relacionan los episodios de RGE con la aparición de síntomas de ERGE) son positivas, y la Pirosis Funcional (PF), cuando SAP/SI son negativas (Figura 2). La pH-MII consigue diferenciar ENEv de ENEf y, por ello, a falta de mejores procedimientos (sobre todo más sensibles), se la considera el “patrón oro” o de referencia (gold standard) entre las pruebas diagnósticas de la ERGE. No obstante, la pHmetría sin impedanciometría asociada, tiene algunos problemas:

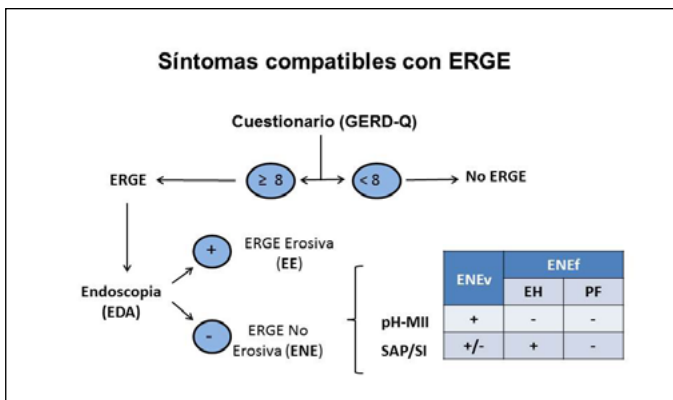


Figura 2. Diagnóstico actual de la ERGE (ENEv = ENE “verdadera”; ENEf = ENE “funcional”; EH = Esófago hipersensible; PF = Pirosis funcional; pHMII = pHmetría ± Impedanciometría de 24 h; SAP/SI = Probabilidad de asociación síntomas-reflujo/Índice sintomático).

- Déficit de sensibilidad, al haberse comprobado en la EE hasta un 23-34% de falsos negativos^{8,10,11}, aunque con una buena especificidad (85-100%)^{7,12}. Recientemente, se ha demostrado que determinadas formas de pepsina pueden ser activas a pH más elevados justificando algunas pHmetría normales en pacientes con EE. Este hallazgo podría tener importancia en la ENE con RGE levemente ácido o en pacientes estudiados bajo tratamiento con IBP^{13,14}.

- Variabilidad intra-individual, lo que explica que un día un paciente o control tenga una pHmetría patológica y, en otro día cercano, tenga pHmetría normal, o viceversa. Este hecho entra dentro de lo lógico, al ser el RGE un proceso dinámico, impredecible e intermitente, dependiente de múltiples factores (dieta, postura, relajaciones transitorias del EEI, estrés, ejercicio, motilidad, aclaramiento esofágico, etc.)¹⁵.

- El Consenso de Lyon II⁵ establece como valores patológicos de RGE cuando el pH es < 4, durante > 6% del

tiempo de registro (24h). Hasta entonces se habían considerado valores patológicos porcentajes del > 4%, > 5.5% (con un borderline entre 3.5-5.5%)^{10,16} o puntuación de DeMeester ≤ 14,72¹⁷. Por lo tanto, los estudios han considerado de forma muy variable lo que es un RGE patológico o normal. Así, las frecuencias de ENEv y ENEf han variado ampliamente según el método, momento, referencia e investigador considerados.

- Es una prueba invasiva, incómoda para el paciente, consume mucho tiempo, tiene un elevado coste y, lo más importante, no está disponible en muchos centros hospitalarios, como los hospitales comarcales.

Un último paso, la evaluación del estado de la mucosa esofágica.

La última prueba diagnóstica a considerar en la ERGE es el estudio histológico de las biopsias esofágicas, procedimiento minimizado en las últimas décadas y cuya utilidad se ha reactivado en los últimos años. La mucosa esofágica, compuesta por un epitelio escamoso estratificado parcialmente queratinizado (parecido al de la piel), tiene tres capas: 1) La más superficial, luminal o funcional, es el estrato córneo. 2) La capa media o estrato espinoso (prickle) contiene las células que, unidas por desmosomas, van diferenciándose y migrando hacia el lecho funcional¹⁸. 3) La capa más profunda, basal o germinativa, es donde se encuentran las células en división que, posteriormente, renovarán el epitelio. Aunque el estudio al microscopio óptico (MO) de la mucosa esofágica es antiguo, no fue hasta principios de los años 70 cuando se comunican varias alteraciones elementales relacionadas con el daño inducido por el RGE¹⁹. Tras un amplio y prolongado debate, los últimos estudios han concluido que no existen lesiones o conjunto de lesiones exclusivamente inducidas por el RGE, ya que carecían de la especificidad (la hiperplasia de la capa basal, elongación de papilas e infiltrado inflamatorio intraepitelial linfocitario) y/o sensibilidad (erosiones/necrosis, infiltrados intraepiteliales de neutrófilos y eosinófilos) necesarias para un correcto diagnóstico de ERGE microscópica o Esofagitis Microscópica (Em)^{12,16,20-23}. No obstante, se debe considerar que gran parte de las diferencias entre los diversos estudios son de tipo metodológico²⁴: Escaso número de pacientes, diferentes criterios para definir la ERGE, esporádica realización de EDA y/o pH-MII, deficitaria selección del grupo control (incluirla una correcta definición de ERGE, práctica de EDA, pH-MII e, incluso, una manometría), distribución “en parches” de las lesiones (obliga a tomar varias biopsias), reproductibilidad de la observación (variaciones inter-observador), ausencia de período de “lavado” de IBP (≈ 4 semanas), definición del número y lugar en donde tomar las biopsias (recomendable tomarlas en la unión

escamo-columnar o línea "Z" o, mejor aún, en los 2 cm más proximales a ella, a las 3 horarias y preferentemente en zonas enrojecidas)²⁵⁻²⁹, correcta orientación de las biopsias (esencial para evaluar la hiperplasia de la capa basal y elongación de las papilas). Algunos parámetros aceptados como expresión del daño por RGE no están suficientemente consensuados (se han considerado excesivos los límites patológicos de $\geq 15\%$ de la hiperplasia de la capa basal y $\geq 2/3$ del grosor total en la elongación de papilas^{19,20,30-35}) y, finalmente, el importante consumo de tiempo cuando se utilizan métodos cuantitativos, como los propuestos por Zentilin *et al.*¹⁶ y el EsoHisto Project^{20,22}.

Todas estas son las razones por las que, aunque se siguen utilizando en la práctica diaria, los parámetros sobre los que se basa el diagnóstico histológico de la ERGE estén en entredicho.

El hallazgo de las Dilataciones de los Espacios Intercelulares (DEI)

A finales de los años 70 del siglo pasado, habiéndose apreciado previamente en estudios experimentales³⁶, Poppe en 1978³⁷ y Hopwood en 1979³⁸ describieron, por primera vez en humanos, unas alteraciones al microscopio electrónico (ME) que consideraron como consecuencia del efecto lesivo del RGE sobre la mucosa esofágica. Se trataba de unas Dilataciones de los Espacios Intercelulares (DEI), más aparentes en el lecho más basal y, en menor grado, en el escamoso y espinoso. Posteriormente, estos hallazgos fueron confirmados en 1996 por Tobey *et al.*³⁹, mediante ME de transmisión y un laborioso método de medida (Figura 3). Apreciaron que las DEI tenían un diámetro máximo medio $\geq 2.4 \mu\text{m}$ en el 73% de los 11 pacientes con pirosis (vs. 0% en 13 controles, $0.46 \mu\text{m}$), sin apreciar diferencias significativas entre aquellos con EE (55% de los pacientes, $0.80 \mu\text{m}$) o ENE (45% de los pacientes, $1.0 \mu\text{m}$); quizás debido al escaso número de casos evaluados y que en aquellos con EE la biopsia se tomó de zonas no lesionadas (siempre en los 5 cm más distales). La sensibilidad del procedimiento para diferenciar ERGE vs. controles, basada en el valor de $\geq 2.4 \mu\text{m}$, fue del 73% y la especificidad del 100%. Posteriormente, se confirmó que, en el hombre sano asintomático, el espacio intercelular analizado en la capa superficial o estrato córneo es más estrecho y variable, entre $0.45\text{-}0.56 \mu\text{m}$, que en las otras dos capas más profundas^{40,41} (Tabla1). El grupo de Tobey *et al.*³⁹ postuló que estas DEI serían consecuencia de una mayor permeabilidad paracelular al ácido, consecuencia del daño inducido por éste en las membranas de las células epiteliales, empeorando el transporte del sodio y acumulándose el agua en el espacio intercelular³⁶ (Figura 4). Si los mecanismos que provocan la lesión están equilibrados con los de reparación no existirá lesión (ENE); por el contrario, si aquéllos superan

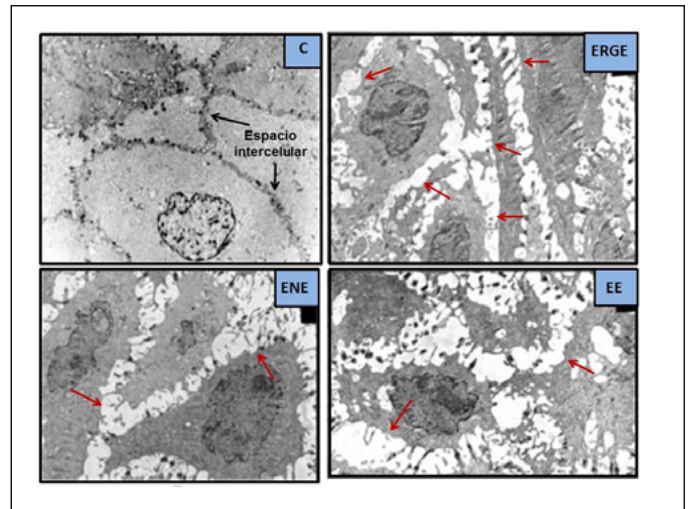


Figura 3. Dilataciones de los Espacios Intercelulares al ME (modificado de Calabrese *et al.*⁷⁶, 2003. DEI = formaciones arrosariadas, de color blanco al ME, señaladas con flechas rojas. Están ausentes en el sujeto control asintomático [C] y presentes en pacientes con pirosis intensa [ERGE], ERGE No Erosiva [ENE] o ERGE Erosiva [EE]).

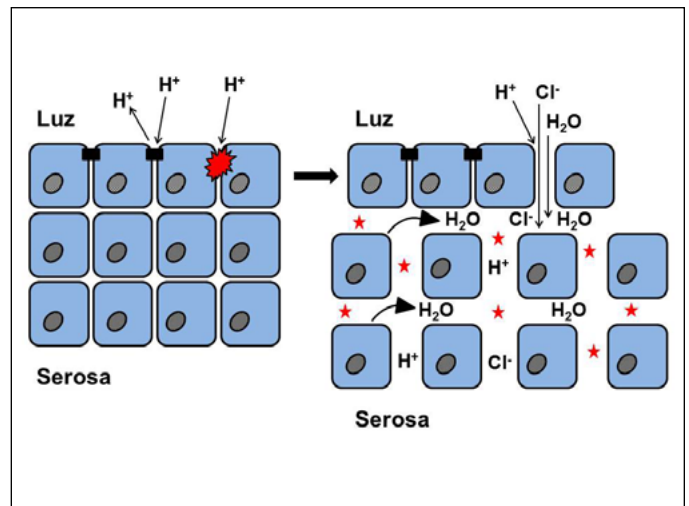


Figura 4. Ruptura de las uniones intercelulares proteicas (tight junctions, uniones adherentes y desmosomas) por el ácido intraluminal concentrado (H^+), disminución de la resistencia mucosa (impedancia) y aumento de la permeabilidad paracelular. La entrada paralela de altas concentraciones de Cl^- hacia los espacios intercelulares induce un gradiente osmótico, lo que arrastra el agua hacia ellos produciendo su dilatación; son las DEI (asteriscos). Figura de elaboración propia.

a estos últimos, aparecería la EE⁴¹. Se ha comprobado que las DEI son más frecuentes en el esófago de Barrett vs. EE⁴² y en la EE vs. ENE, por lo que podrían considerarse como unos signos precoces de esofagitis o de la intensidad del daño mucoso. En este sentido, la medida de las DEI podría ser útil para reconocer qué ENE podrían evolucionar a EE, pues se conoce que, aproximadamente, un 15-89% de los pacientes con ENE puede evolucionar en 4-10 años a EE; aunque también se han detectado regresiones en el tiempo⁴³⁻⁴⁷.

Estudio	Tipo de observación	Dilataciones de los Espacios Intercelulares (DEI)					
		Ø medio o máximo de los DEI (µm)			% pacientes con DEI		
		ENE	EE	Control	ENE	EE	Control
Tobey'96 ³⁹	ME (Bx ≤ 5 cm). Cut-off Ø máximo 2.4 µm (SS-ESP: 73-100%) (13C,6EE,5ENE)	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1*	80	67	0
Calabrese'03 ⁷⁶	ME (Bx 5 cm; PL 2 sem) Cut-off Ø medio 0.74 µm (12C,11EE,17ENE)	2.2 ± 0.5	2.4 ± 0.4	0.6 ± 0.1*	100	100	0
Caviglia'05 ⁷⁸	ME (Bx 5 cm; PL 3 sem) Cut-off Ø medio 0.47 µm (7C,9ENEpH+,11PF)	pH+: 1.49 pH-: 1.45	-	0.45*	pH (±) 100	-	14
Vela'11 ⁸⁵	ME-morfometría (Bx 5 cm. Refractarios IBP) Cut-off Ø medio 0.68 µm (11C,15EE+ENE+EH, 11PF)	0.87		0.32* (PF: 0.42)	Cut-off > 0.68 µm: 60% ERGE vs. 9% PF		
Solcia'00 ⁵²	ME+MO (Bx 2-3 cm) Cambios cualitativos (12C,22EE,44ENEpH+)		DEI: SS: 72%: ESP: 92%		68	90	8
Villanacci'01 ⁸⁴	MO-semicuantitativo (0-3) y morfológico (área DEI). (Bx 3 cm) (14EE,7ENE)	272 µm ²	278 µm ²	-	71	100	-
Armstrong'03 ⁹³	MO (Bx UGE y 2 cm) Cut-off Ø máximo 2.4 µm	-	-	-	UGE 77 2cm 41	UGE 96 2cm 66	-
Vieth'04 ²⁸	MO 44-Pirosis + manchas rojas en endoscopia	-	-	-	Manchas rojas: 91	56	
Bove'05 ⁷¹	MO (10C,7EE,10ENE): antes vs después de 30' de perfusión ácida	-	-	-	80 vs 70	86 vs 86	22 vs 44*
Zentilin'05 ¹⁶	MO (Bx 2-4 cm. PL 2-4 sem). Semicuantitativo (20C,48EE,59ENEpH+, 12PF)		DEI: SS: 86%: ESP: 70%		83 (pH+) 67 (pH-) 80 (pH ±)	94	30
Takubo'05 ³⁵	MO (38C,69EE,49CaE, 16Autopsias)	-	-	-	CaE 33 Autopsia 0	48	21
Cui'11 ⁷⁹	MO-morfometría + ME (Bx 2-3 cm) Correlación MO y ME (r=0.60) Cut-off Ø medio 0.85 µm (SS-ESP: 93-100%) (42C,61ENE,58EE)	1.07 ± 0.3	1.29 ± 0.2	0.58 ± 0.16*	-	-	-
Savarino'13 ⁸³	MO (Bx 2 cm. PL 2-4 sem) (20C,22ENEv,20EH, 20EE,15PF)	-	-	-	ENEv 95 EH 70 PF 33	95	25

Tabla 1. Principales estudios que han evaluado las Dilataciones de los Espacios Intercelulares (DEI) (* significativo vs. control; Ø = diámetro medio o máximo, en µm; ME = microscopio electrónico; MO = microscopio óptico; ENE = ERGE no erosiva; ENEv = ERGE no erosiva "verdadera" o pHmetría positiva; EE = ERGE erosiva; C = control; EH = esófago hipersensible; PF = pirosis funcional; Bx = biopsia; PL = período de lavado de IBP; SS-ESP = sensibilidad-especificidad; UGE = unión gastro-esofágica; CaE = carcinoma de esófago).

2. Estudios experimentales de las DEI: hallazgos fisopatológicos del daño mucoso inducido por el reflujo.

Estudios experimentales han demostrado que la exposición al ácido de la mucosa esofágica produce una elevación en la diferencia de potencial de la mucosa para, después, ir descendiendo paulatinamente hasta ser nula. Al inicio de la agresión inducida por el RGE, y mientras ésta no sea

muy intensa y repetitiva, aparecerían las DEI y, posteriormente, si persiste la agresión, aparecerán las lesiones endoscópicas^{36,38}. En este sentido, las DEI serían una manifestación histológica muy inicial de la esofagitis microscópica (Em). Las células de la mucosa esofágica están unidas por un triple complejo proteico: 1) claudinas y ocludinas en las tight junctions, 2) e-cadherina en las uniones adherentes (JAM), y 3) desmogleína y desmocolina en los desmosomas^{18,48,49}. Cuando por efecto del ácido estas uniones fallan, aparecen

las DEI al separarse las membranas intercelulares. En este momento, la resistencia de la mucosa baja y aumenta la permeabilidad a los contenidos lumbinales por vía paracelular, más que transcelular. Para que aparezcan las DEI son precisas dos condiciones: 1) altas concentraciones de H⁺ que rompan la barrera epitelial y aumenten la permeabilidad paracelular, y 2) altas concentraciones de Cl⁻ que difundan a través de esas roturas hacia los espacios intercelulares y den lugar a un gradiente osmótico que arrastre el agua hacia ellos, dilatándolos⁵⁰ (Figura 4). Las DEI no aparecen con el ácido sulfúrico, pues los iones SO₄⁻ son demasiado grandes como para penetrar en los espacios intercelulares y crear un gradiente osmótico. Un estudio⁴¹ mostró que las DEI no están uniformemente distribuidas localizándose, preferentemente, en la parte alta del epitelio escamoso. Además, las alteraciones en los desmosomas se relacionaban con la intensidad del daño inducido por el RGE, aunque la expresión de claudinas 1 y 2 fue similar en pacientes con EE, ENE y controles. Sugieren que el daño de los desmosomas está en relación con la aparición y tamaño de las DEI. Por el contrario, en otro estudio, también investigando la distribución de varias proteínas de unión intercelular como ocludina, claudina-1, claudina-2, zonula ocludens-1 y zonula ocludens-2 en pacientes con EE y ENE, observaron solo la sobreexpresión de las dos claudinas en la EE, aunque sin correlación con la presencia y tamaño de las DEI⁵¹.

Las DEI, sobre todo las apreciadas en la mitad inferior de la mucosa, también se han relacionado con la infiltración de eosinófilos y/o neutrófilos, así como con la pérdida/alteración de los glicoconjugados que sellan los espacios intercelulares. Tras el análisis inmunohistoquímico, utilizando anticuerpos monoclonales CD-15 contra esos glicoconjugados, se pudo apreciar una alteración en estas glicoproteínas con pérdida de su patrón normal laminar y compacto. Estos cambios son más evidentes en la mitad superior de la mucosa y posiblemente representan una alteración precoz de la función de la barrera mucosa, previa a la lesión mucosa, ante una agresión externa. Pueden ser focales o sutiles, por lo que pueden ser indetectables en un estudio histológico rutinario⁵². En los casos más graves, junto a la lesión mucosa, estos hallazgos se aprecian también en la capa espinosa más profunda e, incluso, en la basal. Solcia *et al.*⁵² aseguran que la irregular y peculiar forma de los DEI hace que sean fácilmente identificables al MO, por lo que una sencilla evaluación cualitativa sería una buena alternativa a los más complejos estudios morfométricos al ME/MO³⁹ (Figura 5). El ácido que es inicialmente neutralizado por el bicarbonato presente en el medio, pero llega un momento en que éste es insuficiente para neutralizar la agresión,

aconteciendo dos hechos: 1) Los receptores de las neuronas nociceptivas quimiosensitivas (sensibles al ácido y/o álcali) se activarían, enviando señales vía médula-cerebro, lo que se percibe centralmente como síntomas (pirosis)⁵³. Los receptores de las neuronas nociceptivas, como el receptor vaniloide de potencial transitorio-subtipo 1 (TRPV-1) y canales iónicos sensibles al ácido (ASIC), están localizados en las terminaciones nerviosas sensitivas de la mucosa esofágica y responden a cambios en el pH, aunque no haya lesión^{39,54-58}; es decir, como es característico en la ERGE, puede haber síntomas sin lesión. 2) La acidificación del espacio intercelular expone a la membrana basolateral al ácido, dando lugar a una acidificación del citosol, cambios en la osmorregulación celular, edema y muerte celular^{59,60}. En otro estudio experimental, Tobey *et al.*⁶¹ encontraron que las DEI permitían el paso de moléculas del tamaño del dextrano de 20 kD, favoreciendo la entrada del EGF salivar (6 kD) hacia la capa basal, promocionando su regeneración y reparación. Consecuencia de todo este proceso sería la aparición de un marcador microscópico de daño/reparación, como la hiperplasia de la capa basal. También se ha comprobado la presencia de DEI en pacientes adultos con esofagitis microscópica linfocítica o eosinofílica^{63,64}, en niños con esofagitis eosinofílica⁶⁴, alergia alimentaria e, incluso, con el estrés; así como en estudios experimentales con exposición de la mucosa esofágica al ácido, bilis, alcohol, AAS o infección por *C. albicans*⁶⁵⁻⁶⁷. En el caso del estrés, por mecanismos similares a los comprobados en la piel o en el tubo digestivo bajo, con incremento de mastocitos en la submucosa⁶⁷⁻⁷⁰.

También se ha comprobado la aparición de DEI en humanos sanos tras la infusión lesiva de una solución ácida pH 1⁷¹ y se ha demostrado el papel lesivo de la bilis en el desarrollo de la EE y esófago de Barrett⁷². El clásico estudio experimental en conejos de Farré *et al.*⁶⁶ demostró el daño tisular precoz de la bilis, al comprobar la aparición de diversas alteraciones funcionales de la mucosa: descenso en la resistencia eléctrica transepitelial (TER), aumento de la permeabilidad y, por último, aparición de DEI, tras el contacto de la mucosa esofágica con la bilis junto a un ácido débil (pH = 4-7, similar al que presentan pacientes en tratamiento con IBP) y, en mayor cuantía, que cuando se utilizó solamente el ácido. Además, en voluntarios humanos, la aparición de las DEI tras la infusión de soluciones de diferente acidez/alcalinidad en el esófago fue muy rápida, a los 50 min (30 min de perfusión + 20 min de espera, antes de tomar las biopsias), afectando tanto a la zona infundida como a las proximales. Sin embargo, esta infusión nociva no se acompañó de síntomas por lo que, en "algunas ENE", éstos podrían originarse por causas diferentes a las DEI (¿serían

las ENEf?), quizás a través de sustancias como TRPV-1, ASIC y receptores purinérgicos P2X^{56,57,73}.

3. Investigación clínica de las DEI en humanos (Tabla 1).

Primeros estudios de las DEI al Microscopio Electrónico (ME)

Unos años después del estudio de Tobey *et al.*³⁹, en el año 2000, el grupo de Enrico Solcia⁵² comunicó la existencia de las DEI al ME en el 90 % de pacientes con EE, 68% de pacientes con ENE y 8% de controles asintomáticos. Aunque las DEI son más frecuentes en el esófago distal y capas más profundas, también se pueden apreciar en el proximal, siendo alteraciones estables en el tiempo^{74,75}. Las DEI tienen la gran ventaja de no precisar una correcta orientación de la muestra, presentando una mayor sensibilidad que los infiltrados inflamatorios. En 2003, Calabrese *et al.*⁷⁶, en un estudio al ME, confirmaron los hallazgos de Tobey *et al.*³⁹ sin encontrar diferencias entre pacientes con un RGE ácido vs. biliar (medido por Bilitec[®]), o aquellos con ENE vs. EE. A los pacientes se les evaluó sintomáticamente y mediante realización de EDA, pHmetría (en el clásico estudio de Tobey *et al.*³⁹ no se hizo pHmetría) e histología. La importancia de realizar una pHmetría al grupo control, se justificó por la exclusión de 2 sujetos asintomáticos, inicialmente parte del grupo control, que mostraron una pHmetría patológica y DEI. Afirman que el mejor parámetro para la evaluación de las DEI era el valor de su diámetro medio (\emptyset), mejor que el diámetro máximo, siendo el cut-off de \emptyset entre controles vs. pacientes de 0.74 μm (vs. 2.4 μm de diámetro máximo, según Tobey *et al.*³⁹).

Todos los controles tenían un \emptyset significativamente menor que los pacientes con ERGE (< 1.69 μm vs. 9.36 μm). En ese mismo año, Vieth *et al.*⁷⁷ mostraron la importancia de tomar las biopsias en el lugar adecuado. Así, apreciaron DEI al MO en ENE y EE, en el 77% y 96% en muestras tomadas en la unión gastroesofágica y 41% y 66% en muestras tomadas a 2 cm de ésta, respectivamente. Recomiendan que, si en la mucosa esofágica se encuentran manchas rojas, precursoras de las erosiones, las biopsias se deben de tomar en ellas, pues las DEI se detectaron allí en el 90.5% vs. 56.1% en las áreas macroscópicamente normales. Concluyen que la evaluación de las DEI sea incorporada a la rutina del estudio histológico de la mucosa esofágica en relación a los daños inducidos por el RGE. Posteriormente, en 2005, Caviglia *et al.*⁷⁸ observaron al ME que el \emptyset de las DEI en ENE, tanto con pHmetría patológica como normal, era 3 veces mayor que en los controles: 1.49 μm , si la pHmetría era patológica y 1.45 μm , si la pHmetría era normal vs. 0.45 μm en los controles ($p < 0.001$), de forma similar a lo apreciado con la media de los diámetros máximos (3.78 μm

vs. 1.6 μm ; $p < 0.001$), y sin diferencias entre ENE con pHmetría patológica y normal. Consideran las DEI como una alteración característica de la ENE, un marcador de los síntomas de la ERGE y expresión de un descenso en la resistencia de la mucosa, con independencia del resultado de la pHmetría.

Estudio de las DEI al Microscopio Óptico (MO). Diagnóstico de Esofagitis microscópica (Em)

Tras el primero comunicado de Solcia⁵² en el año 2000, el grupo de Zentilin *et al.*¹⁶ volvió a dar protagonismo a la MO, realzando el valor diagnóstico de las clásicas lesiones elementales inducidas por el RGE, a las que añadieron la evaluación de las DEI. Desarrollaron un sistema de puntuación global sobre biopsias tomadas, en la línea en "Z", 2 y 4 cm. más proximales, en 135 pacientes con síntomas atípicos y atípicos de ERGE. Las 6 lesiones elementales analizadas fueron: hiperplasia de la capa basal, elongación de las papilas, DEI, infiltrado intraepitelial de eosinófilos y neutrófilos y presencia de necrosis/erosión; que evaluaron en 20 controles, 48 EE, 59 ENEv y 12 ENEf (EH+PF). Concluyen que los estudios histológicos al MO son un buen procedimiento para detectar la existencia de ERGE, ya que se apreció una esofagitis microscópica (Em) en el 84% de ERGE vs. 15% de controles ($p < 0.00001$), con una significativa correlación entre la puntuación global histológica y el porcentaje de tiempo con $\text{pH} < 4$ ($r = 0.43$, $p < 0.001$); indicando que la Em era principalmente debida al RGE. La sensibilidad para el diagnóstico de ERGE fue 84%, comparable a los estudios clásicos de Ismail-Beigi *et al.*¹⁹ y Behar *et al.*³⁰, con una especificidad del 85% (en otros estudios, la especificidad del diagnóstico de ERGE con datos obtenidos al MO osciló entre 27-78%)^{31,32}.

Comunicaron que, en las ENE totales, las DEI tenían un valor diagnóstico similar al de la hiperplasia de la capa basal (se encontraron en el 83% y 92%, respectivamente). La sensibilidad en el conjunto de las lesiones histológicas evaluadas fue del 96% en EE, 80% en ENEv, 58% en ENEf (76% en ENE total) vs. 30% en controles. Cabe suponer que, en los pocos casos de PF (EDA normal y pHmetría normal) con lesiones histológicas, los síntomas podrían provenir de un reflujo débilmente ácido, no ácido o alcalino. Este grupo también afirma que es más rentable el uso de la histología que la práctica de una pHmetría, lastrada con un número poco aceptable de falsos negativos en la EE^{8,10-12}. En 2009, el mismo grupo obtuvo similares resultados y conclusiones en otro estudio al MO²⁴, comprobando que la existencia de DEI presentaba una sensibilidad-especificidad del 80%-70%. La frecuencia de estas lesiones fue del 94% en EE, 83% en ENEv, 67% en ENEf y 30% en los controles¹⁶. Este grupo recomienda que la toma de las muestras de biopsia sea en la línea en "Z" o en los 2 cm. más proximales a ésta, ya que

la frecuencia de todas las lesiones elementales evaluadas disminuye proximalmente. Sin embargo, se debe de dar una explicación al elevado porcentaje (¡30%!) de DEI en controles. La selección de un grupo control obliga a que estrictamente sea un sujeto asintomático en el momento del estudio y en un tiempo previo, que no haya tomado IBP en las 4-6 semanas previas, la EDA sea normal (Los Ángeles: N ó A), pHmetría normal y Em (-). Estos criterios no se cumplen casi nunca y en casi ningún estudio, lo que hace difícilmente comparables sus resultados. ¿Qué significado tiene que el grupo control tenga DEI en un 30%?. Está comprobado que existe un RGE fisiológico, que podría producir alteraciones histológicas leves, sobre todo en la línea en "Z" o pocos cm. más proximalmente; es decir, se podría admitir que un control tuviera lesiones histológicas leves (¿Los Ángeles M ó A?) y solo en la parte más distal del esófago (≤ 2 cm.). Los criterios que debe de cumplir un sujeto control para los estudios relacionados con la ERGE pueden ser más o menos estrictos, pero, hoy en día, es un tema de debate aun no resuelto, aunque no exento de interés. En un reciente y excelente estudio, con MO-morfométrica y ME, del grupo chino de Cui *et al.*⁷⁹ comprobaron la validez diagnóstica de las DEI en la ERGE, con una buena consistencia Kappa ($k = 0.691$) y correlación ($r = 0.605$) entre las medidas obtenidas mediante MO y ME, con valores de \emptyset al MO significativamente mayores en 58 pacientes con EE y 61 con ENE vs. 42 controles. El cut-off para los valores de \emptyset de DEI, que diferenciaban ENE de controles, fue de $0.85 \mu\text{m}$ (sensibilidad del 93%, especificidad del 100%) (Tabla 1).

Frente a las evidentes ventajas de los estudios al MO vs. ME, los primeros tienen una limitación en la resolución, solo son visibles las DEI $\geq 0.2 \mu\text{m}$, por lo que éste sería el mínimo tamaño de DEI cuantificable con el MO⁷⁹. Son pocos los estudios que se han comunicado en relación a la presencia de DEI en niños con síntomas sugerentes de ERGE o esofagitis eosinofílica⁶⁴. El primer estudio fue el de Ravelli *et al.*⁸⁰ en el año 2006, realizado con MO en 48 niños con EE. Sus resultados fueron similares a los obtenidos posteriormente, en 2012, por el grupo de Mancini *et al.*⁸¹, quienes evaluaron la presencia de DEI mediante ME en 20 niños con EE y 24 con ENE vs. 10 controles asintomáticos. Comprobaron que el tamaño de las DEI era significativamente mayor en los casos de EE y ENE vs. controles (valores de $\emptyset \pm \text{DS}$: $1 \pm 0.2 \mu\text{m}$ y $0.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$ vs. $0.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$), aunque sin relación entre el diámetro de las DEI y los diversos parámetros evaluados en la pHmetría, ni con su consideración de patológica o normal. Concluyen que, en niños, las DEI son también un marcador precoz y sensible de daño mucoso inducido por el RGE, sin poder diferenciar los dos fenotipos de ERGE, ni relacionarse con los resultados de la pHmetría. En 2014, el mismo grupo dirigido por Borrelli *et al.*⁸² estudió niños con tos crónica (15 pacientes vs. 12 controles), sugerente de

ser causada por el RGE, mediante pHmetría y una evaluación de las DEI con ME. Señalan la importancia de la cuantificación de las DEI en estos casos, como expresión de la lesión mucosa inducida por el ácido, aunque su presencia y diámetro tampoco se relacionaron con ninguno de los parámetros de la pHmetría, ya fuera patológica o normal.

4. Metodología para cuantificar la presencia de las DEI.

De forma aproximada, $\geq 2/3$ de los pacientes con ENE tienen alteraciones histológicas compatibles con Em, una de las cuales son las DEI⁸³. Diversos estudios, ya sea al MO o ME, han evaluado la cuantificación de las DEI, con el fin de discriminar mejor los valores entre los diferentes fenotipos de ERGE y los controles asintomáticos. Así, Solcia *et al.*⁵² intentaron hacer una cuantificación (presencia/ausencia) de las DEI utilizando cortes ultrafinos ($0.5-1 \mu\text{m}$), pero sus resultados fueron poco concluyentes (DEI: 72% de los pacientes vs. 8% controles. Sensibilidad 72%, especificidad 92%), siéndoles imposible distinguir casos con esofagitis leve y controles. Otros estudios también han intentado cuantificar las DEI mediante procedimientos cuantitativos, semicuantitativos e, incluso, morfométricos y automatizados, tanto en biopsias proximales como distales (2, 5 y 10 cm. más proximales desde la línea en "Z"). En realidad, los estudios al ME se conforman con el ímprobo trabajo de realizar múltiples medidas (10 medidas x foto, en 10 fotos = 100 medidas por paciente) y utilizar el parámetro del diámetro medio (\emptyset) como valor de comparación. Lo engorroso de este procedimiento explica el escaso número de pacientes incluidos en los estudios de las DEI al ME. Sin embargo, son los estudios al MO los que han hecho una aproximación más práctica, aunque no exenta de complejidad, a la cuantificación de las DEI^{12,16,67,76,84}. Un ejemplo sería el sofisticado método desarrollado recientemente en el estudio EcoHisto Proyect^{20,22}, que propone un detallado proceso para cuantificar los DEI, a las que define como dilataciones redondeadas e irregulares, o ensanchamiento difuso del espacio intercelular (a $\times 40$ aumentos). Inicialmente las cuantificó como 0= ausentes, 1= pequeñas y 2= grandes o muy grandes para, posteriormente, redefinirlas de una forma más detallada, pero también más compleja (Tabla 2). La práctica clínica impone utilizar su primer intento. Casi todos los estudios concluyen en la superioridad de los estudios con ME en la valoración de las DEI, procedimiento que consideran es el "patrón oro", al no apreciarse solapamientos entre los datos de los pacientes y los del grupo control. En todo caso, son preferibles los resultados obtenidos con las pruebas cuantitativas (sensibilidad del 86%) vs. semicuantitativas (con una menor especificidad). Sin embargo, también reconocen que los estudios al ME son muy exclusivos,

Puntuación	Fórmula sencilla	Fórmula compleja
0	Ausentes	≤ 5 pequeñas*
1	Pequeñas	≥ 6 pequeñas + ≤ 5 grandes**
2	Grandes o muy grandes	≥ 6 grandes

Las DEI se pueden reconocer al MO (x40) como unas dilataciones redondeadas e irregulares, o como un ensanchamiento difuso del espacio intercelular

* DEI pequeña = $\varnothing <$ al de un linfocito
** DEI grande = $\varnothing \geq$ al de un linfocito

Tabla 2. Reconocimiento y evaluación de las Dilataciones de los Espacios Interelulares (DEI) mediante MO²⁰.

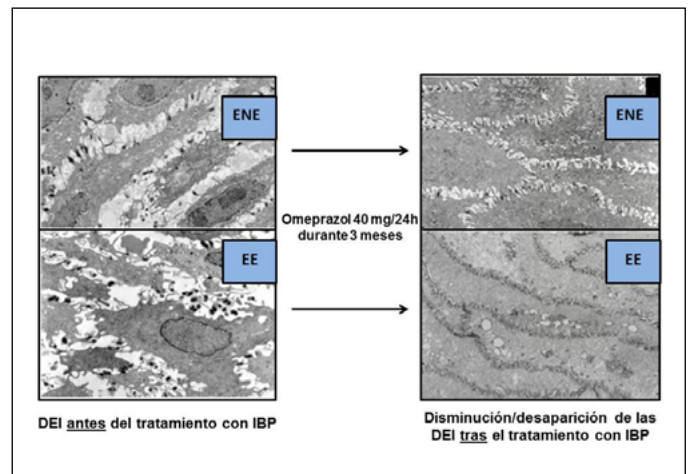


Figura 7. Mejoría/desaparición de las DEI al MO, en pacientes con ENE y EE, tras un tratamiento con omeprazol (40mg/24h/3meses) (modificado de Calabrese et al.⁸⁶, 2005).

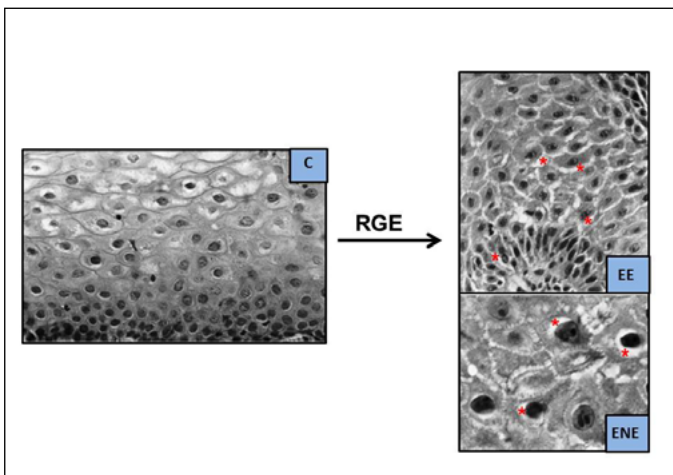


Figura 5. Dilataciones de los Espacios Interelulares al MO (modificado de Solcía et al.⁵², 2000. Tinción H&E, aumentos x350 [C y EE] y x900 [ENE]. DEI señaladas con asteriscos).

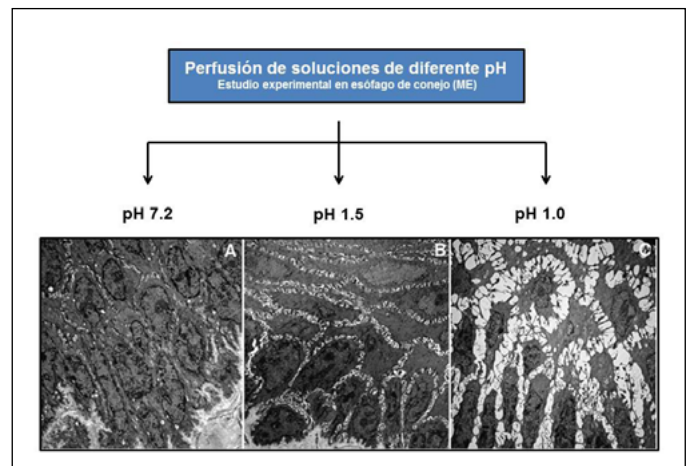


Figura 8. Aparición de las DEI tras el daño inducido en la mucosa esofágica por la perfusión de soluciones ácidas de diferente pH (modificado de Farré et al.⁹⁸, 2011. Estudio experimental en conejos).

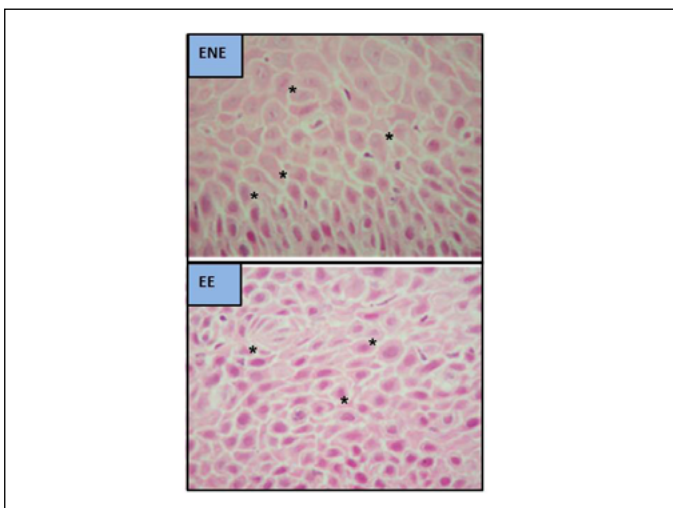


Figura 6. Dilataciones de los Espacios Interelulares al MO (modificado de Kandulski et al.²¹, 2013. Tinción H&E, aumentos x400. DEI señaladas con asteriscos).

caros y consumen mucho tiempo, lo que les hace poco o nada útiles para la práctica clínica.

5. Utilidad de la DEI en en el diagnóstico de la Pirosis Funcional.

La distinción entre EE y ENE es sencilla tras la práctica de una EDA, pero no así entre una ENEv y una ENEf (EH y PF, trastornos funcionales del esófago, según criterios de Roma IV⁷), ya que para su diagnóstico se precisa de la práctica de una pHmetría y valoración síntomas/episodios de RGE mediante SAP/SI. Este es el punto en donde está "bloqueado" el procedimiento diagnóstico de la ERGE. ¿Qué hacer tras la realización de una EDA?: 1) una pHmetría con los inconvenientes ya referidos ó 2) un más accesible y menos costoso estudio histológicos, aún con la falta de especificidad de las lesiones

elementales comentadas o la dificultad en el estudio de algunas de ellas (correcta orientación). Es preciso separar la ENEv cuyo tratamiento es básicamente antsecretor, de las ENEf en donde podrían ser necesarios fármacos neuromoduladores o neurolépticos, asociados o no a IBP (sobre todo en EH). Vela *et al.*⁸⁵ estudiaron al ME, en pacientes refractarios a IBP, la diferencia en el tamaño de las DEI en EE + ENE (ENEv + EH, n=15), PF (n=11) y 11 controles, apreciándose diferencias significativas entre sus valores respectivos (0.87 μm vs. 0.42 μm vs. 0.32 μm); mostrando DEI el 60% de EE + ENE vs. 9% de los controles ($p < 0.01$). El límite superior del valor normal de DEI en controles (95% de percentil) fue 0.68 μm (cut-off); siendo los valores de los controles y PF similares ($p = ns$). En otros estudios el valor \emptyset medio de las DEI en controles osciló entre 0.47 μm y 0.85 μm ^{76,78,79} y el valor del diámetro medio máximo fue $\leq 2.4 \mu\text{m}$ ³⁹ (Tabla 1).

Por todo ello, afirman que estos valores de las DEI podrían servir para diferenciar los pacientes con ENE refractarios a los IBP de aquellos con PF (pacientes refractarios a los IBP son aquellos que obtienen un alivio sintomático parcial y $< 50\%$, tras 6 semanas de tratamiento con doble dosis de IBP)^{85,87}. Hasta un 40% de los pacientes con síntomas de ERGE tratados con IBP tiene una respuesta negativa, lo que puede ser debido a una insuficiente inhibición, a la presencia de un EH (síntomas, aún con pH altos tras inhibición con IBP) o de una PF. En este sentido, Kandulski *et al.*²¹ intentaron analizar al MO las diferencias histológicas entre pacientes con ENE (10 ENEv + 10 EH), EE (n=23) y PF (n=19), todos ellos refractarios a IBP, mediante una evaluación semicuantitativa de tres lesiones (DEI, elongación de papilas e hiperplasia de la capa basal) y comparación de sus datos vs. 25 controles (Figura 6). No se apreciaron diferencias entre grupos en lo referente a los síntomas evaluados según el cuestionario RDG, pero si existieron entre la puntuación histológica global y los valores de las DEI de pacientes con ENE (ya sea considerados globalmente ENEv + EH o de forma individual) vs. PF y controles ($p < 0.0001$). El valor de las DEI en la PF fue de 0.75 μm vs. 1.75 μm en las ENE (controles 0.72 μm). Los valores respectivos de la puntuación histológica global fueron 3.8, 6.3 y 3.3 ($p < 0.0001$). Además, encontraron una débil correlación entre la presencia de DEI y el tiempo de exposición ácida (% del tiempo con $\text{pH} < 4$) o número de episodios de reflujo ácido o gaseoso; concluyendo que el estudio histológico es capaz de diferenciar la ENE de la PF en pacientes refractarios a IBP.

El estudio de la curva ROC mostró un cut-off ≥ 5 para la puntuación histológica global que diferencia las ENE de la PF (sensibilidad-especificidad de 83%-64%). Un estudio

similar, también demostró la validez del estudio histológico en la diferenciación entre ENE y PF⁸³, tanto en la puntuación individualizada de cada una de las lesiones elementales evaluadas, como en la puntuación global. Consideraron que una puntuación histológica global ≥ 0.35 era diagnóstica de Em, apreciándola en el 95% de EE, 77% de ENE, 65% de EH vs. 13% de PF y 15% de controles ($p < 0.0001$). Dada la escasa frecuencia con que se presenta la Em en los pacientes con PF (similar a los controles) se podría afirmar, con una elevada probabilidad, que ese sería el diagnóstico de los pacientes con síntomas de ERGE, pHmetría normal y sin Em. La presencia de DEI en esos grupos fue 95%, 95%, 70%, 33%, 25%, respectivamente ($p < 0.0001$). Concluyen que la buena sensibilidad del estudio histológico en el diagnóstico de ERGE (81%) y ENE (74%), junto a su alta especificidad en la PF (87%) y controles (85%), demuestran su validez como método diagnóstico en la ERGE.

6. Relación entre los Síntomas de ERGE y las DEI.

Algunos estudios han encontrado una correlación entre la presencia de las DEI y los síntomas de ERGE como la pirosis^{74,78,88}, con independencia del resultado de la pHmetría⁷⁸; habiéndose comprobado la mejoría de las DEI y los síntomas tras un tratamiento con IBP^{76,88}. Sin embargo, algunos pacientes con DEI siguen presentando síntomas de ERGE tras inhibir el ácido con IBP, lo cual podría estar en relación con un RGE débilmente ácido o alcalino (¿EH?), más o menos persistente⁸⁹. El estudio de Tadiparthi *et al.*⁹⁰ mostró que la EE y la ENE no eran diferentes en cuanto a la evaluación de los síntomas (con cuestionarios GER-Q y RDQ) o la presencia de lesiones histológicas. Sin embargo, aunque existió una relación significativa entre las puntuaciones sintomáticas y la histológica (en concreto, presencia de DEI e infiltrado linfocitario), ello solo se apreció en el grupo de EE. Por todo ello, debemos admitir que los síntomas de algunas ENE pueden originarse por otras causas diferentes a las DEI quizás, como ya se comentó, por la acción de sustancias como TRPV-1, ASIC y receptores purinérgicos P2X^{56,57,67,73}.

7. Regresión de las DEI tras tratamiento antsecretor.

Hay estudios que han demostrado que el tratamiento con IBP puede restaurar los DEI a su valor normal en $> 70\%$ de los pacientes^{77,86,91,92}, de forma equivalente a la cirugía antirreflujo³³. Al MO, se ha comprobado que tres lesiones elementales evaluadas (hiperplasia de la capa basal, elongación de las papilas y DEI), mejoraron/normalizaron tras tratamiento antsecretor, en especial las DEI. Así, el estudio de Armstrong *et al.*⁹³, utilizandoesomeprazol (40mg/d/4sem) o

ranitidina (300mg/d/4sem), mostró una mejoría/normalización de las DEI, pasando desde el 76% al 53% y del 80% al 69% de los pacientes, respectivamente. El grupo de Calabrese et al.⁸⁶, en un estudio al ME, trató 22 ENE y 16 EE con omeprazol (40mg/d/3meses) apreciando una desaparición de las DIS y los síntomas en el 92% de los 38 casos. Tras otros 3 meses de tratamiento, en los 3 pacientes sin respuesta, consiguieron normalizar síntomas y DEI en 2 de ellos (97.4% de regresión a los 6 meses de tratamiento), comprobando el paralelismo entre síntomas y DEI (Figura 7). A los 3 meses de tratamiento, los Ø de las DEI pasaron de 2.04 µm a 0.54 µm en ENE y de 1.95 µm a 0.65 µm en EE, tanto en pacientes con RGE ácido como alcalino, todos ellos con pH-MII (+). El cut-off de DEI patológico fue ≥ 0.74 µm. Otros estudios no consiguieron esas elevadas frecuencias de reversibilidad de las lesiones/síntomas con IBP, llegando solo a $< 30\%$; lo cual podría ser debido al escaso tiempo de tratamiento (4 sem. vs. 3 meses)^{86,94-96}. Incluso, un reciente estudio confirma que los pacientes con ENE refractarios a IBP mantienen las DEI⁸⁹, lo que obligaría a suponer que el causante de las DEI y/o síntomas no fuera el ácido y si otras sustancias refluidas (bilis y componentes del jugo pancreático)^{66,67}. Lógicamente, en estos casos sería obligatoria la práctica de la doble exploración, pH-MII. Por otra parte, es necesario mencionar que en algunos estudios no fue posible la práctica de la MII al ser aprobada por la FDA en 2002 usándose, en su lugar, el detector alcalino llamado Bilitec®. En el estudio de Ravelli et al.⁶⁴, se evaluó la presencia de DEI al ME y MO en 22 niños con esofagitis eosinofílica refractaria a IBP (4-6 sem.) clínica e histológicamente vs. 30 controles, así como su mejoría tras un tratamiento con corticoides y/o dietas de exclusión. Los valores de Ø de DEI en los pacientes fueron 2.26 ± 0.21 mµ (MO y morfometría) y 2.24 ± 0.28 mµ (ME) vs. 0.62 ± 0.08 mµ y 0.33 ± 0.24 mµ, de los controles. Tras el tratamiento, los valores de DEI descendieron a 1.23 ± 0.20 mµ (MO y morfometría) y 0.98 ± 0.19 mµ (ME), lo que afirma que la eficacia del tratamiento está en relación con la disminución del daño mucoso y de las DEI.

En este punto, como complemento a la mejoría/resolución de las DEI tras tratamiento con IBP, es interesante señalar el resultado de un estudio experimental del grupo de Farré et al.⁹⁷ quienes comprobaron el papel "preventivo/protector", respecto a la aparición de las DEI, de sustancias antioxidantes (NAC y Vitamina C). Aunque, como se ha comentado, se ha sugerido una relación entre presencia de DEI y el síntoma pirosis, ello no está claramente demostrado, sugiriéndose posibles mecanismos fisiopatológicos que la explicarían^{12,74,78,88}. De demostrarse esta relación, se podría considerar a las DEI como un marcador de la ENE. Ello se basa en las siguientes razones: 1) se han encontrado en pacientes con ENE (EDA normal y pHmetría patológica), 2) se normalizan tras tratamiento con IBP, al tiempo que desaparecen los

síntomas como la pirosis, y 3) se pueden inducir en controles sanos asintomáticos tras la infusión esofágica de ácido.

8. La Impedanciometría, un método para evaluar la función de la mucosa esofágica. Protagonismo de las DEI.

La evaluación de la conductividad eléctrica de la mucosa esofágica es un parámetro íntimamente relacionado con su buena funcionalidad. El grupo de Farré et al.⁶⁶ demostró en estudios experimentales y en humanos que la caída de la impedancia basal de la mucosa esofágica está en relación con la de la TER y el daño de la mucosa esofágica inducido por el RGE ácido, débilmente ácido o alcalino, tanto en EE como en ENE^{98,99}. La infusión de soluciones pH 1.0 y 1.5 indujeron caídas de la impedancia mucosa basal paralelas a las de la TER y aparición de las DEI¹⁰⁰, concluyendo que, en pacientes con ERGE, la utilización de estos métodos pueden ser útiles en el estudio del daño de la mucosa inducida por el RGE (Figura 8). El grupo chino de Zhou et al.¹⁰¹ evaluó en 352 pacientes, la sensibilidad y especificidad de 5 pruebas habituales en el diagnóstico de ERGE: cuestionario GERD-Q (58% y 49%), impedanciometría (66% y 43%), pH-MII (94% y 43%), DEI > 0.9 mµ (61% y 56%) y prueba de respuesta a IBP (71% y 44%). Sin embargo, ninguna de ellas fue suficiente para un diagnóstico individualizado. En otro estudio sobre 20 pacientes con ENE y 30 con PF se comprobó que los pacientes con ENE tenían más baja impedancia basal vs. PF, una recuperación más lenta de la misma tras infusión de ácido (pH 1, durante 10 min.), posiblemente por los repetidos episodios de RGE en los ENE vs. PF, y una mayor sensibilidad al ácido (¿EH?), quizás por hacerse la mucosa más vulnerable a la percepción de los síntomas durante el prolongado período de recuperación de los valores basales¹⁰²⁻¹⁰⁴. La acidificación del esófago puede inducir a la degranulación de los mastocitos, activación de las neuronas aferentes sensibles a la capsaicina y liberación de neuroquinas. Se ha sugerido que estos mediadores podrían ser los responsables, tras episodios de acidificación, de la aparición de las DEI y de la hipersensibilidad demostrada en algunas ENE (¿EH?)¹⁰⁵.

Otro grupo chino, encabezado por Zhong¹⁰⁶ estudió la impedancia basal de la mucosa esofágica como medida del daño inducido tras la infusión de ácido en 229 pacientes con ERGE y 34 controles. Realizaron pH-MII, EDA, cuestionario GERD-Q, medida de las DEI (MO y ME) y expresión de proteínas de las tight junctions (claudina 1 y 3 y ocludina). Apreciaron que la impedancia basal en EE (1752 ± 1018 Ω) y ENE (2640 ± 1143 Ω) eran significativamente inferiores a la del grupo control (3360 ± 1258 Ω); siendo el cut-off que diferenciaba pacientes con ERGE y controles: 2167 Ω (sensibilidad 94%, especificidad 51%). También apreciaron una significativa mayor caída de

la impedancia mucosa en los ENE vs. controles ($3360 \pm 1258 \Omega$), tras ser infundidos con soluciones ácidas ($2510 \pm 1239 \Omega$), débilmente ácida ($2801 \pm 1156 \Omega$) y mezcla ácida/débilmente ácida ($2393 \pm 1009 \Omega$). Las soluciones débilmente básicas afectan poco la impedancia, como ya comprobó Farré et al.⁶⁶. También hubo diferencias significativas en la impedancia basal registrada entre los grados de EE (esofagitis C y D: $970 \pm 505 \Omega$ y esofagitis A y B: $1921 \pm 1024 \Omega$). La impedancia basal fue significativamente menor en los cuestionarios GERD-Q positivos (≥ 8 puntos) que en los negativos (< 8 puntos) ($2200 \pm 1153 \Omega$ vs. $2709 \pm 1244 \Omega$). En este sentido, también, se ha comunicado que la puntuación del cuestionario GERD-Q se relacionaba positivamente con los episodios ácidos medidos mediante pH-MII^{107,108}. Existió una correlación negativa entre la impedancia basal y el tiempo de exposición al ácido ($r = -0.41$, $p < 0.001$), niveles de claudina-1 ($r = -0.65$, $p < 0.001$), pero no con los de claudina-3 u ocludinas, y el tamaño de las DEI ($r = -0.64$, $p > 0.001$); encontrándose mayores DEI en EE vs. ENE y controles: $1.29 \mu\text{m}$ vs. $1.10 \mu\text{m}$ y $1.01 \mu\text{m}$, respectivamente.

Las tres proteínas analizadas participan en la formación de canales iónicos paracelulares y selección de iones, modulando así la conductancia paracelular y relacionándose con cambios en la TER y DEI¹⁰⁹. Tanto en humanos como en animales de experimentación, ya se había comprobado la relación entre DEI y TER (correlación negativa), impedancia y TER (correlación positiva)^{98,109}, e impedancia y tiempo de exposición ácida (correlación negativa)¹¹⁰ pero, en humanos, este estudio es el primero en demostrar la relación - inversa - entre las DEI e impedancia basal¹⁰⁶. Por todo ello, la impedanciometría y la medición de las DEI podrían ser muy útiles en el diagnóstico clínico de ERGE sin lesiones o poco sintomáticas, campo en donde son poco útiles la EDA y la pH-MII. En otro estudio sobre la impedancia de la mucosa esofágica, Kandulski et al.¹¹¹ evaluaron la impedancia y la presencia de DEI en 19 EE, 16 ENE y 17 PF. Concluyen que la medida de la impedancia es un marcador de disfunción mucosa y de su integridad, ya que diferencia a los pacientes con ERGE (EE y ENE), con una mayor caída de la impedancia, de aquellos con PF.

Además, los valores de impedancia estaban inversamente relacionados con tiempo de exposición ácida ($r = -0.45$, $p < 0.008$), siendo el cut-off de 2100Ω el que diferenciaba la ERGE de la PF (sensibilidad de 78%, especificidad de 71%), y con el tamaño de las DEI ($r = -0.28$, $p < 0.06$). La impedancia basal es un marcador de integridad mucosa y su determinación puede ser útil en la evaluación de los pacientes con ERGE, en especial los refractarios a IBP (la mayoría de PF con impedancia basal normal). Con los dispositivos actuales se puede medir la impedancia de la mucosa esofágica en el

mismo acto endoscópico¹¹². Si la medición se toma a 2 cm. de la línea en "Z", un valor de impedancia $> 2970 \Omega$ excluye la ERGE (sensibilidad 96%, especificidad 88%)¹¹². En un reciente intento para afinar aún más el diagnóstico histológico de Em, Kataria et al.¹¹³ realizaron una revisión y meta-análisis entre 2.871 estudios, de los cuales seleccionaron 10 (8 con grupo control) que cumplían sus criterios de inclusión, con el fin de determinar las lesiones elementales más sensibles para el diagnóstico de Em en pacientes con ENE (histología, EDA, pHmetría normal y sin consumo de IBP; por lo tanto, incluye pacientes con EH). Las lesiones evaluadas fueron hiperplasia de la capa basal, elongación de papilas, DEI y número de Eosinófilos (Eo), tomándose la muestra de biopsia a dos niveles: < 3 cm. y ≥ 3 cm. de la unión escamoso-columnar. En las muestras más distales (< 3 cm) las mejores sensibilidades fueron para los Eo (91%), DEI (88%) e hiperplasia de la capa basal (85%). En las biopsias tomadas a ≥ 3 cm. la mayor sensibilidad fue para la elongación de las papilas (84%) y Eo (77%). Este estudio demuestra que el análisis conjunto de DEI y Eo en las biopsias de esófago es muy sensible para el diagnóstico de Em.

9. Nuevos procedimientos para detectar las DEI

Las nuevas técnicas endoscópicas como la endoscopia de alta resolución^{96,114-116}, cromoendoscopia virtual \pm lugol (i-Scan y FICE, Fuji Intelligent Color Enhancement), endomicroscopía confocal con láser^{95,117-122} o imagen con banda estrecha (NBI, Narrow Band Imaging) con magnificación^{116,123} han logrado visualizar alteraciones en el tejido y vasos del mucosa del esófago de forma más precisa que la endoscopia convencional, ayudando a una mejor graduación de clasificación de Los Ángeles, distinguiendo mejor las EE de las ENE. Un estudio encontró útil el uso de i-Scan + cromoendoscopia con lugol en la detección de lesiones mínimas de la ERGE (microrroturas mucosas y manchas rojas)¹¹⁸⁻¹²¹, y en otro el FICE diferenció los grados N (normal) y M (lesiones mínimas: eritema sin demarcación nítida, turbidez blanquecina e invisibilidad secundaria de los vasos) en pacientes con ENE¹¹⁹⁻¹²². También ha sido útil el uso de la endomicroscopía confocal con láser^{120,121}, apreciándose en los pacientes con ENE vs. controles un mayor número de bucles capilares interpapilares (8.3 vs. 5.6 , $p < 0.01$). Cut-off > 6 por imagen, con sensibilidad-especificidad 68%-72%), de mayor diámetro (19.5 vs. $15.9 \mu\text{m}$, $p < 0.04$). Cut-off $> 17.2 \mu\text{m}$, con sensibilidad-especificidad 81%-76%) y mayor \emptyset en las DEI (3.4 vs. 1.9 , $p < 0.04$). Cut-off $> 2.4 \mu\text{m}$, con sensibilidad-especificidad 86%-91%), correlacionando con los valores de DEI encontrados al ME ($r = 0.75$, $p < 0.01$). Si se combinaban los hallazgos primero y tercero la especificidad fue del 100%¹²¹.

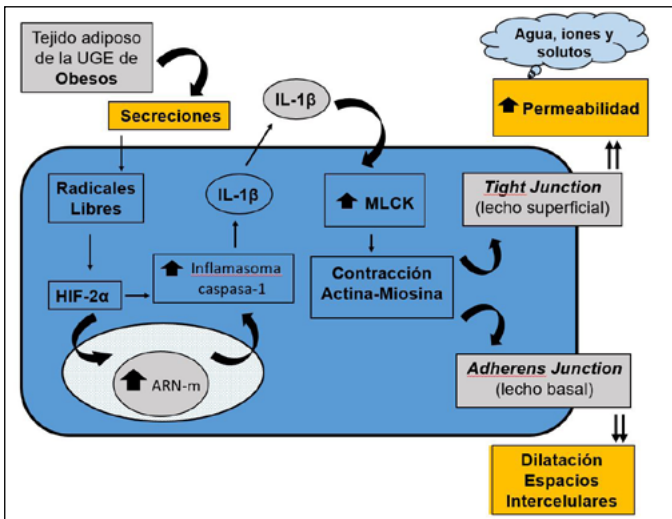


Figura 9. Nuevo mecanismo fisiopatológico propuesto para la formación de las Dilataciones de los Espacios Intercelulares. (UGE= unión gastro-ésfágica; HIF-2α = factor 2α inducible por hipoxia; MLCK = quinasa de la cadena ligera de la miosina; MLC = cadena ligera de la miosina; MLCp = cadena ligera de la miosina fosforilada). (modificado de: Paris S et al¹²⁶).

Recientemente se ha propuesto un nuevo mecanismo fisiopatológico en la formación de las Dilataciones de los Espacios Intercelulares¹²⁶. El tejido adiposo de la UGE de pacientes obesos, con o sin ERGE, segrega sustancias que inducen la producción de radicales libres, los cuales activan la HIF-2α que, de una forma directa o indirecta, tras entrar en el núcleo de las células de tejido escamoso esofágico y regular genes asociados a la respuesta inmune innata, aumenta el inflamasoma caspasa-1 y, consecuentemente, la producción de IL-1β. Esta interleukina pro-inflamatoria aumenta la actividad enzimática de la MLCK, transformando la MLC en MLCp. Esta MLCp produce la contracción del citoesqueleto a través de la actividad actina-miosina lo que, a nivel de las células superficiales del epitelio escamoso, disminuye la función de la barrera mucosa, con un aumento de la permeabilidad y entrada de solutos, iones y agua hacia el espacio intercelular. Por el contrario, la contracción del citoesqueleto a nivel de la capa basal del epitelio escamoso, en donde no hay tight junctions sino adherens junction, da lugar a las dilataciones de los espacios intercelulares (Figura 9).

Conclusiones

Las DEI son alteraciones reales y marcadores biológicos de ERGE: No proceden de manipulaciones de la biopsia y constituyen el marcador biológico más reciente de la enfermedad mientras otros marcadores se validan.

Relación con el daño mucoso: Las DEI están directamente relacionadas con el daño de la mucosa esofágica y aparecen junto con la caída de la impedancia, el descenso de la TER y la mayor permeabilidad mucosa. Se observan tanto con reflujo

ácido como con reflujo alcalino biliar o pancreático y no se correlacionan con el resultado de la pHmetría.

Frecuencia, distribución y aparición temprana: Las DEI son frecuentes e inespecíficas en la esofagitis no erosiva y se distribuyen preferentemente en los cinco centímetros distales del esófago. Aparecen muy pronto tras la agresión química, y su cuantificación más allá de presencia o ausencia resulta compleja y consume tiempo, sobre todo en microscopía electrónica. Su principal ventaja es que no requieren una orientación precisa de la biopsia.

Valor diagnóstico y comparación con otras pruebas: En humanos, la determinación de DEI muestra sensibilidad y especificidad comparables a la pH-MII y es técnicamente más sencilla. En revisiones estrictas, las DEI aparecen con mucha mayor frecuencia en pacientes con esofagitis no erosiva que en controles. Con frecuencia aparecen también en controles asintomáticos, lo que puede deberse a selección de controles no estricta.

Medidas y límites de observación: Los diámetros promedio de las DEI al microscopio electrónico y su prevalencia al microscopio óptico varían entre controles y fenotipos de enfermedad. El límite de observación al microscopio óptico se sitúa por debajo de 0.2 micras.

Utilidad clínica para el diagnóstico diferencial: La evaluación de las DEI ayuda a diferenciar EE, ENEv y EH de la PF (que se comporta como los controles), y permite distinguir la esofagitis no erosiva refractaria a IBP.

Relación con los síntomas y respuesta al tratamiento. La relación entre DEI y los síntomas de ERGE no está clara. Las DEI disminuyen o desaparecen tras tratamiento con IBP.

Bibliografía

1. Eusebi LH, Ratnakumaran R, Yuan Y, Solaymani-Dodaran M, Bazzoli F, Ford AC. Global prevalence of, and risk factors for, gastroesophageal reflux symptoms: a meta-analysis. *Gut* 2018;67:430-44.
2. Jones R, Junghard O, Dent J, Vakil N, Halling K, Wernersson B, et al. Development of GerdQ: a tool for the diagnosis and management of the gastroesophageal reflux disease in primary care. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;30:1030-8.
3. Vakil N, Van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R, Global Consensus Group. The Montreal definition and classification of

gastroesophageal reflux disease: A global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1900-20.

4. Gyawali CP, Kahrilas PJ, Savarino E, Zerbib F, Mion F, Smout AJPM, et al. Modern diagnosis of GERD: The Lyon Consensus. *Gut* 2018;67:1351-62.

5. Gyawali CP, Yadlapati R, Fass R, Katzka D, Pandolfino J, Savarino E, et al. Updates to the modern diagnosis of GERD: Lyon consensus 2.0. *Gut* 2024;73:361-71 .

6. Lundell LR, Dent J, Bennett JR, Blum AL, Armstrong D, Galmiche JP, et al. Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. *Gut* 1999; 45: 172-80.

7. Aziz Q, Fass R, Gyawali CP, Miwa H, Pandolfino JE, Zerbib F. Functional esophageal disorders. *Gastroenterology* 2016;150:1368-79.

8. Dent J, Vakil N, Jones R, Bytzer P, Schöning U, Halling K, et al. Accuracy of the diagnosis of GORD by questionnaire, physician and a trial of proton pump inhibitor treatment: The Diamond Study. *Gut* 2010;51:714-21.

9. Voutilainen M, Sipponen P, Maklin JP, Juhola M, Färkkilä M. Gastroesophageal reflux disease: prevalence, clinical, endoscopic and histopathological findings in 1.128 consecutive patients referred for endoscopy due to dyspeptic and reflux symptoms. *Digestion* 2000;61:6-13.

10. Kahrilas PJ, Quigley EMM. American Gastroenterological Association medical position statement: guide on the use of pH recording. *Gastroenterology* 1996;110:1981-96.

11. Quigley EM. 24-h pH monitoring for gastroesophageal reflux disease: Already standard but not yet gold? *Am J Gastroenterol* 1992;87:1071-5.

12. Dent J. Microscopic esophageal mucosa injury in nonerosive reflux disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:4-16.

13. Roberts NB. Review article: Human pepsins – their multiplicity, function and role in reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24 (Suppl. 2):2-9.

14. Martínez SD, Malagon IB, Garewal HS, Cui H, Fass R. Non-erosive reflux disease (NERD)-acid reflux and symptom patterns. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:537-45.

15. Locke R, Talley NJ. 24-hour monitoring for gastroesophageal reflux disease. *Lancet* 1993;342:1246.

16. Zentilin P, Savarino E, Mastracci L, Spaggiari P, Dulbecco P, Ceppa P, et al. Reassessment of the diagnosis value of histology in patients with GORD, using multiple biopsy sites and an appropriate control group. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2299-306.

17. Johnson LF, DeMeester TR. Twenty-four hour pH monitoring of the distal esophagus. A quantitative measure of gastroesophageal reflux. *Am J Gastroenterol* 1974;62:325-32.

18. Wex T, Monkemüller K, Stahr A, Kuester D, Fry LC, Völkel S, et al. Gastro-oesophageal reflux disease is associated with up-regulation of desmosomal components in esophageal mucosa. *Histopathology* 2012; 60: 405-15.

19. Ismail-Beigi F, Horton PF, Pope CE. Histological consequences of gastroesophageal reflux in man. *Gastroenterology* 1970;58:163-74.

20. Yerian L, Fiocca R, Mastracci L, Riddell R, Vieth M, Sharma P, et al. Refinement and reproducibility of histologic criteria for the assessment of microscopic lesions in patients with gastroesophageal reflux disease. *The Esohisto Project. Dig Dis Sci* 2011;56:2656-65 .

21. Kandulski A, Jechorek D, Caro C, Weigt J, Wex T, Mönkemüller K, et al. Histomorphological differentiation of non-erosive reflux disease and functional heartburn in patients with PPI—refractory heartburn. *Aliment Pharmacol Ther* 2013;38:643-51.

22. Schneider NI, Plieschnegger W, Geppert M, Wigglinghaus B, Hoess GM, Eherer A, et al. Validation study of the Esohisto consensus guidelines for the recognition of microscopic esophagitis (histoGERD Trial). *Hum Pathol* 2014;45:994-1002.

23. Kataria J, Rivera D, Grin A, Reed DE, Rodrigues DM. The role of histology in the diagnosis of non-erosive reflux disease: A symptomatic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol Motil* 2023;35:e14631.

24. Mastracci L, Spaggiari P, Grillo F, Zentilin P, Dulbecco P, Ceppa P, et al. Microscopic esophagitis in gastro-oesophageal reflux disease: individual lesions, biopsy sampling, and clinical correlation. *Virchows Arch* 2009;451:31-9.

25. Edebo A, Vieth M, Tam W, Bruno M, van Berkel AM, Stolte M, et al. Radial and axial distribution histological markers of epithelial damage in reflux disease. Is there an effect of therapy and correlation to the localization of mucosal breaks? *Gut* 2004;53:A117.

26. Edebo A, Vieth M, Tam W, Bruno M, van Berkel AM, Stolte M, et al. Circumferential and axial distribution of esophageal mucosal damage in reflux disease. *Dis Esophagus* 2007;20:232-8.
27. Fletcher J, Wirz A, Henry E, McColl KEL. Studies of acid exposure immediately above the gastro-oesophageal squamocolumnar junction: evidence of short segment reflux. *Gut* 2004;53(2):168-173.
28. Vieth M, Fiocca R, Haringsma J, Delarive J, Wiesel PH, Tam W, et al. Radial distribution of dilated intercellular spaces of the esophageal squamous epithelium in patients with reflux disease exhibiting discrete endoscopic lesions. *Dig Dis* 2004;22:208-12.
29. Krugmann J, Neumann H, Vieth M, Armstrong D. What is the role of endoscopy and esophageal biopsies in the management of GERD?. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2013;27:373-85.
30. Behar J, Sheahan DC. Histological abnormalities in reflux esophagitis. *Arch Pathol* 1975;99:387-91.
31. Jarvis LR, Dent J, Whitehead R. Morphometric assessment of reflux oesophagitis in fiberoptic biopsy specimens. *J Clin Pathol*. 1985;38(1):44-8.
32. Schindlbeck NE, Wiebecke B, Klauser AG, Voderholzer WA, Muller-Lissner SA. Diagnostic value of histology in non-erosive gastroesophageal reflux disease. *Gut* 1996;39(2):151-4.
33. Fiocca R, Mastracci L, Riddell R, Takubo K, Vieth M, Yerian L, et al. Development of consensus guidelines for the histologic recognition of microscopic esophagitis in patients with gastroesophageal reflux disease: the Eohisto Project. *Hum Pathol* 2010; 41:223-31.
34. Fiocca R, Mastracci L, Milione M, Parente P, Savarino V. Microscopic esophagitis and Barrett's esophagus: the histology report. *Dig Liver Dis* 2011; 43 (Suppl. 4): S319-30.
35. Takubo K, Honma N, Aryal G, Sawabe M, Arai T, Tanaka Y, et al. Is there a set of histologic changes that are invariably reflux associated?. *Arch Pathol Lab Med* 2005;129:159-63.
36. Carney CN, Orlando RC, Powell DW, Dotson MM. Morphologic alterations in early acid-induced epithelial injury of the rabbit esophagus. *Lab Invest* 1981;45:198-208.
37. Pope CI: Gastroesophageal reflux disease (reflux esophagitis). In *Gastrointestinal Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*, ed 2. Sleisenger M, Fordtran J, eds. Philadelphia: WB Saunders; 1978. p. 541-68.
38. Hopwood D, Milne G, Logan KR. Electron microscopic changes in human oesophageal epithelium in oesophagitis. *J Pathol* 1979;129:161-7.
39. Tobey NA, Carson JL, Alkiek RA, Orlando RC. Dilated intercellular spaces: a morphological feature of acid reflux damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterology* 1996;111:1200-5.
40. Park S, Chun HJ, Jang JS, Keum B, Seok Seo Y, Sik Kim Y, et al. Is intercellular space different among layers in normal esophageal mucosa? An electron microscopic study. *Dig Dis Sci*. 2011;56(11):3492-7.
41. Orlando LA, Orlando RC. Dilated intercellular spaces as a marker of GERD. *Curr Gastroenterol Rep* 2009;11:190-4.
42. Álvaro-Villegas JC, Sobrino Cossío S, Hernández-Guerrero A, Alonso-Lárraga JO, de la Mora-Levy JG, Molina-Cruz A, et al. Dilatación de los espacios intercelulares en los subtipos de la enfermedad por reflujo gastroesofágico. *Rev Esp Enferm Dig* 2010;102:302-7.
43. Pace F, Santalucia F, Bianchi Porro G. Natural history of gastroesophageal reflux disease without esophagitis. *Gut* 1991;32(8):845-8.
44. McDougall NI, Johnson BT, Collins JSA, McFarlan RJ, Love AH. Disease progression in gastro-esophageal reflux disease as determined by repeat oesophageal pH monitoring and endoscopy 3 to 4.5 years after diagnosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:1161-7.
45. Kawanishi M. Will symptomatic gastroesophageal reflux disease develop into reflux esophagitis? *J Gastroenterol* 2006;41:440-3.
46. Pace F, Bollani S, Molteni P, Bianchi Porro G. Natural history of gastroesophageal reflux disease without oesophagitis (NERD)-a reappraisal 10 years on. *Dig Liver Dis* 2004;36:111-5.
47. Labenz J, Nocon M, Lind T, Leodolter A, Jaspersen D, Meyer-Sabellek W, et al. Prospective follow-up data from the ProGERD study suggest that GERD is not a categorical disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2457-62.
48. Niessen CM: Tight junctions/adherents junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 2007;127:2525-2532.
49. Garrod D, Chidgey M: Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta*. 1991;32(8):845-8.
50. Tobey NA, Gambling TM, Vanegas XC, Carson JL, Orlando RC. Physicochemical basis for dilated intercellular spaces in non-erosive

acid-damaged rabbit esophageal epithelium. *Dis Esophagus*. 2008; 21:757-764. 2008;21(8):757-64.

51. Mönkemüller K, Wex T, Kuester D, Fry LC, Kandulski A, Kropf S, et al. Role of tight junctions protein in gastroesophageal reflux disease. *BMC Gastroenterol* 2012;12:128.

52. Solcia E, Villani L, Luinetti O, Trespi E, Strada E, Tinelli C, et al. Altered intercellular glycoconjugates and dilated intercellular spaces of esophageal epithelium in reflux disease. *Virchows Arch* 2000;436:207-16.

53. Barlow WJ, Orlando RC. The pathogenesis of heartburn in nonerosive reflux disease: A unifying hypothesis. *Gastroenterology* 2005;128:771-8.

54. Akiba Y, Mizumori M, Guth PH. Luminal CO₂ induces esophageal hyperemia via epithelial carbonic anhydrases and acid sensors in rats. *Gastroenterology* 2007;132:A410.

55. Guarino MP, Cheng L, Ma J, Harnett K, Biancani P, Altomare A, et al. Increased TRPV-1 gene expression in esophageal mucosa of patients with non-erosive and erosive reflux disease. *Neurogastroenterol Mot* 2010;22:746-51.

56. Bhat YM, Bielefeldt K. Capsaicin receptor (TRPV1) and non-erosive reflux disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006;18:263-70.

57. Suzuki T, Yoshida N, Kamada K. Nociceptors mediated neuropeptides release in the esophageal mucosa exposed to acid. *Gastroenterology* 2007;132:A277.

58. Rodrigo J, Hernández DJ, Vidal MA, Pedrosa JA. Vegetative innervation of the esophagus III. Intraepithelial endings. *Acta Anat* 1975; 92: 242-58.

59. Tobey NA, Orlando RC. Mechanisms of acid injury to rabbit esophageal epithelium. Role of basolateral cell membrane acidification. *Gastroenterology*. 1991;101(5):1220-8.

60. Tobey NA, Reddy SP, Keku TO, Cragoe EJ, Orlando RC. Mechanisms of HCl-induced lowering of intracellular pH in rabbit esophageal epithelial cells. *Gastroenterology*. 1993;105(4):1035-44.

61. Tobey NA, Hosseini SS, Argote CM, Dobrucali AM, Awayda MS, Orlando RC. Dilated intercellular spaces and shunt permeability in

nonerosive acid-damage esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol* 2004;99:13-22.

62. Peurdy JK, Appelman HD, Golebeski CP, McKenna B. Lymphocytic esophagitis-a chronic or recurring pattern of esophagitis resembling allergic contact dermatitis. *Am J Clin Pathol* 2008;130:508-13.

63. Genevay M, Rubbia Brandt L, Rougemont AL. Do eosinophilic numbers differentiate eosinophilic esophagitis from gastroesophageal reflux disease? *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:815-25.

64. Ravelli A, Villanacci V, Cadei M, Fuoti M, Gennati G, Salemme M. Dilated intercellular spaces in eosinophilic esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;59:589-93.

65. Farré R, De VR, Geboes K, Verbecke K, Vanden Berghe P, Depoortere I, et al. Critical role of stress in increased oesophageal mucosa permeability and dilated intercellular spaces. *Gut* 2007;56:1191-7.

66. Farré R, Van Malenstein H, De Vos R, Geboes K, Depoortere I, Vanden Berghe P, et al. Short exposure of oesophageal mucosa to bile acids, both in acidic and weakly acidic conditions, can impair mucosal integrity and provoke dilated intercellular spaces. *Gut* 2008;57:1366-74.

67. Van Malenstein H, Farré R, Safrim D. Esophageal dilated intercellular spaces and nonerosive reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1021-8.

68. Choi EH, Brown BE, Crumrine D, Chang S, Man MQ, Elias PM, et al. Mechanisms by which psychologic stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity. *J Invest Dermatol* 2005;124:587-95.

69. Mazzon E, Sturniolo GC, Puzzolo D, Frisina N, Fries W. Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum. *Gut* 2002;51:507-13.

70. Santos J, Benjamin M, Yang PC, Prior T, Perdue MH. Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: Role of mast cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G847-54.

71. Bove M, Vieth M, Dombrowski F, Ny L, Ruth M, Lundell L. Acid challenge to the human esophageal mucosa: effects on epithelial architecture in health and disease. *Dig Dis Sci* 2005;50:1488-96.

72. Vaezi MF, Richter JE. Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 1996;111:1192-9.
73. Farré R, Fornari F, Blondeau K, Vieth M, De Vos R, Bisschops R, et al. Acid and weakly acidic solutions impair mucosal integrity of distal exposed and proximal non-exposed human esophagus. *Gut* 2010;59:164-9.
74. Caviglia R, Ribolsi M, Gentile M, Rabitti C, Emerenziani S, Guarino MPL, et al. Dilated intercellular spaces and acid reflux at the distal and proximal oesophagus in patients with non-erosive gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:629-36.
75. Ribolsi M, Perrone G, Caviglia R, Gentile M, Emerenziani S, Luca Guarino MP, et al. Intercellular space diameters of the oesophageal epithelium in NERD patients: head to head comparison between light and electron microscopy analysis. *Dig Liver Dis* 2009;41:9-14.
76. Calabrese C, Fabbri A, Bortolotti M, Cenacchi C, Areni A, Scialpi C, et al. Dilated intercellular spaces as a marker of oesophageal damage: comparative results in gastroesophageal reflux disease with and without bile reflux. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:525-32.
77. Vieth M, Deprez P. Esomeprazole therapy and esophageal histology in endoscopy-negative reflux disease (ENRD) – the CHEER study. *Gastroenterology* 2003;124:A416.
78. Caviglia R, Ribolsi M, Maggiano N, Gabriellini AM, Emerenziani S, Guarino MPL, et al. Dilated intercellular spaces of esophageal epithelium in nonerosive reflux disease patients with physiological esophageal acid exposure. *Am J Gastroenterol* 2005;100:543-8.
79. Cui R, Zhou L, Lin S, Xue Y, Duan L, Xia Z, et al. The feasibility of light microscopic measurements of intracellular spaces in squamous epithelium in the lower-oesophagus of GERD patients. *Dis Esophag* 2011;24:1-5.
80. Ravelli AM, Villanacci V, Ruzzenenti N, Grigolato P, Tobanelli P, Klersy C et al. Dilated intercellular spaces: a major morphological feature of esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:510-15.
81. Mancini V, Ribolsi M, Gentile M, de Angelis G, Bizarri B, Lindney KJ, et al. Oesophageal mucosal intercellular space diameter and reflux pattern in childhood erosive and non-erosive reflux disease. *Dig Liver Dis* 2012;44:981-7.
82. Borrelli O, Mancini V, Thapar N, Ribolsi M, Emerenziani S, de Angelis G, et al. Dilated intercellular space diameter as marker of reflux-related mucosal injury in children with chronic cough and gastroesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2014;39:733-42.
83. Savarino E, Zentilin P, Mastracci L, Dulbecco P, Marabotto E, Gemignani L, et al. Microscopic esophagitis distinguishes patients with non-erosive reflux disease from those with functional heartburn. *J Gastroenterol* 2013;48:473-82.
84. Villanacci V, Grigolato PG, Cestari R, Missale G, Cengia C, Klersy C, et al. Dilated intercellular spaces as markers of reflux disease: histology, semiquantitative score and morphometry upon light microscopy. *Digestion* 2001;64:1-8.
85. 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;106:844-50.
86. Calabrese C, Fabbri A, Bortolotti M, Cenacchi C, Carlo S, Zahlane D, et al. Effect of omeprazole on symptoms and ultrastructural esophageal damage in acid bile reflux. *World J Gastroenterol* 2005;11:1876-80.
87. Fass R, Sifrim D. Management of heartburn not responding to proton pump inhibitors. *Gut* 2009; 58: 295-309.
88. Kahrilas PJ: Dilated intercellular spaces: extending the reach of the endoscope. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(3):549-50.
89. Ribolsi M, Caviglia R, Gentile M. Dilated intercellular space diameters of esophageal epithelium in NERD patients with typical symptoms resistant to PPI therapy. *Gastroenterology* 2007;132:A139.
90. Tadiparthi RA, Bansal A, Wani S, Mathur S, Hall SB, Rastogi A, et al. Dilated intercellular spaces and lymphocytes on biopsy relate to symptoms of erosive GERD but not NERD. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:1202-8.
91. Vieth M, Kuling M, Leodolter A, Naucler E, Jaspersen D, Labenz J, et al. Histological effects of esomeprazole therapy on the squamous epithelium of the distal esophagus. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;15:313-9.
92. Fiocca R, Mastracci L, Engstrom C, Attwood S, Ell C, Galmiche JP, et al. Long-term outcome of microscopic esophagitis in chronic GERD patients treated with esomeprazole or laparoscopic antireflux surgery in the LOTUS trial. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 1015-23.

93. Armstrong D, Vieth M, Fiocca R. Are endoscopy negative GERD and reflux esophagitis different diseases? Baseline histology in GERD patients off-therapy—the CHEER Study. *Gastroenterology* 2003;124:A-416.
94. Edebo A, Tam W, Bruno M, Van Berkel AM, Jönson C, Schoeman M, et al. Magnification endoscopy for diagnosis of non-erosive reflux disease: a proposal of diagnostic criteria and critical analysis of observer variability. *Endoscopy* 2007;39:195-201.
95. Xue Y, Zhou LY, Lin SR. Dilated intercellular spaces in gastroesophageal reflux disease patients and the changes of intercellular spaces after omeprazole treatment. *Chin Med J (Engl)* 2008;121:1297-301.
96. Vaezi MF, Slaughter JC, Smith BS, Whashington MK, Jerome WG, Garrett GC, et al. Dilated intercellular space in chronic laryngitis and gastro-oesophageal reflux disease: at baseline and post-lansoprazole therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32:916-24.
97. Farré R, Cardozo L, Blondeau K. Esophageal mucosal damage induced by weakly acidic solutions containing unconjugated bile acids, similar to reflux in GERD patients “on” PPI, can be prevented with anti-oxidants. *Gastroenterology* 2009;136 (Suppl 1):A16.
98. Farré R, Blondeau K, Clement D, Vicario M, Cardozo L, Vieth M, et al. Evaluation of oesophageal mucosa integrity by the intraluminal impedance technique. *Gut* 2011;60:885-92.
99. Bredenoord AJ, Hemmink GJM, Smout AJPM. Relationship between gastro-oesophageal reflux pattern and severity of mucosal damage. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:807-12.
100. Farré R, Blondeau K, Clement D. Evaluation of esophageal mucosa integrity “in vivo”. Validation of basal intraluminal impedance measurements to assess non-erosive changes induced by esophageal acid exposure in rabbit and healthy human subjects. *Gastroenterology* 2010;138:S-555.
101. Zhou LI, Wang Y, Lu JJ, Lin R, Ciu RL, Zhang HJ, et al. Accuracy of diagnosing gastroesophageal reflux disease by Gerd-Q, esophageal impedance monitoring and histology. *J Dig Dis* 2004;15:230-8.
102. Bredenoord AJ, Weusten BL, Curvers WL, Timmer R, Smout AJPM. Determinants of perception of heartburn and regurgitation. *Gut* 2006;55:313-18.
103. Zerbib F, Duriez A, Roman S, Capdepon M, Mion F. Determinants of gastro-oesophageal reflux perception in patients with persistent symptoms despite proton pump inhibitors. *Gut* 2008;57:156-60.
104. Woodland P, Al-Zinaty M, Yazaki E, Sifrim D. In vivo evaluation of acid-induced changes in oesophageal mucosa integrity and sensitivity in non-erosive reflux disease. *Gut* 2013;62:1256-61.
105. Hobson AR, Furlong PL, Aziz Q. Oesophageal afferent pathway sensitivity in nonerosive reflux disease. *Neurogastroenterol Motil* 2008;20:877-83.
106. Zhong C, Duan L, Wang K, Xu Z, Ge Y, Yang C, Han Y. Esophageal intraluminal baseline impedance is associated with severity of acid reflux and epithelial structural abnormalities in patients with gastroesophageal reflux disease. *Clin Gastroenterol* 2013;48:601-10.
107. Wang K, Duan LP, Ge Y, Xu ZJ, Xia ZW. Diagnostic values of GerdQ, 24-h ambulatory oesophageal pH and impedance-pH monitoring in Barrett’s esophagus, reflux esophagitis and non-erosive reflux disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2011;91:1228-32.
108. Lacy BE, Chehade R, Crowell MD. A prospective study to compare a symptom-based reflux disease questionnaire to 48-h wireless pH monitoring for the identification of gastroesophageal reflux. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:1604-11.
109. Asaoka D, Miwa H, Hirai S, Ohkawa A, Kurosawa A, Kawabe M, et al. Altered localization and expression of tight junction proteins in a rat model with chronic acid reflux esophagitis. *J Gastroenterol*. 2005;40:781-90.
110. Kessing BF, Bredenoord AJ, Weijnenborg PW, Hemmink GJM, Loots CM, Smout AJPM. Esophageal acid exposure decreases intraluminal baseline impedance levels. *Am J Gastroenterol* 2011;106:2093-7.
111. Kandulski A, Weigt J, Caro C, Jechorek D, Wex T, Malfertainer P. Esophageal intraluminal baseline impedance differentiates gastroesophageal reflux disease from functional heartburn. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13:1075-81.
112. Lages RB, de Souza Fontes LH, Barbuti RC, Navarro-Rodríguez T. Esophageal mucosal impedance assessment for the diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *J Neurogastroenterol Motil* 2024;30:352-60.
113. Kataria J, Rivera D, Grin A, Reed DE, Rodrigues DM. The role of histology in the diagnosis of non-erosive reflux disease:

A symptomatic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol Motil* 2023;35:e14631.

114. Kiesslich R, Kanzler S, Vieth M, Moehler M, Neidig J, Nadar BJT, et al. Minimal change esophagitis: prospective comparison of endoscopic and histological markers between patients with non-erosive reflux disease and normal controls using magnifying endoscopy. *Dig Dis Sci* 2004;22:221-7.

115. Amano Y, Yamashita H, Koshino K, Oshima T, Miwa H, Iwakiri R, et al. Does magnifying endoscopy improve the diagnosis of erosive esophagitis?. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1063-8.

116. Sharma P, Wani S, Bansal A, Hall R, Puli S, Mathur S, et al. A feasibility trial of narrow band imaging endoscopy in patients with gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 2007;133:454-64.

117. Wang KK, Carr-Locke DL, Singh SK, Neumann H, Bertani H, Galmiche JP, et al. Use of probe-based confocal laser endomicroscopy (pCLE) in gastrointestinal applications. A consensus report based on clinical evidence. *United Eur Gastroenterol J* 2015;3:230-54.

118. Hoffman A, Basting N, Goetz M, Tresch A, Mudter J, Biestrerfeld S, et al. High-definition endoscopy with i-Scan and Lugol's solution for more precise detection of mucosal breaks of patients with reflux symptoms. *Endoscopy* 2009;41:107-12.

119. Miyasaka M, Hirakawa M, Nakamura K, Tanaka F, Mimori K, Mori M, et al. The endoscopic diagnosis of nonerosive reflux disease using flexible spectral imaging color enhancement image: a feasibility trial. *Dis Esoph* 2001;24:395-400.

120. Kiesslich R, Lammersdorf K, Goetz M. Microscopic changes in non erosive reflux disease (NERD) can be diagnosed during ongoing endoscopy by confocal laser endomicroscopy (CLE). *Gastrointest Endosc* 2006;63:AB243.

121. Chu CL, Zhen YB, Lv GP, Li CQ, Li Z, Qi QQ, et al. Microalterations of esophagus in patients with non-erosive reflux disease: in vivo diagnosis with confocal laser endomicroscopy and its relationship with gastroesophageal reflux. *Am J Gastroenterol* 2012;107:864-74.

122. Jeong E, Yoo IK, Yeniova AÖ, Yon DK, Cho JY. Confocal Laser Endomicroscopic findings of refractory erosive reflux disease versus non-erosive reflux disease with anti-reflux mucosectomy: An in vivo and ex vivo study. *Clin Endosc* 2021;54:55-63.

123. Desai M, Srinivasan S, Sundaram S, Dasari C, Andraws N, Mathur S, et al. Narrow-band imaging for the diagnosis of nonerosive reflux disease: an international, multicenter, randomized controlled trial. *Gastrointest Endosc* 2022;96:457-66.

124. Hayat JO, Gabieta-Somnez S, Yazaki E, Kang JY, Woodcock A, Dettmar P, et al. Pepsin in saliva for the diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *Gut* 2015;654:373-80.

125. Kia L, Pandolfino JE, Kahrilas PJ. Biomarkers of reflux disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;14:790-7.

126. Paris S, Zhang X, Davis D, Nguyen AD, Ustaoglu A, Genta RM, et al. In obesity, esophagogastric junction fat impairs esophageal barrier function and dilates intercellular spaces via hypoxia-inducible factor 2α. *Gastroenterology* 2025;168:914-30.