

Isabel Fiteni Mera

Papel del Oxido Nítrico y Anión
Superóxido en la esofagitis crónica
experimental en conejos producida
por ácido y pepsina

Departamento
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

Director/es
Lanas Arbeloa, Ángel
Soteras Abril, Fernando

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

1542

Tesis Doctoral

**PAPEL DEL OXIDO NÍTRICO Y ANIÓN
SUPERÓXIDO EN LA ESOFAGITIS
CRÓNICA EXPERIMENTAL EN
CONEJOS PRODUCIDA POR ÁCIDO Y
PEPSINA**

Autor

Isabel Fiteni Mera

Director/es

Lanas Arbeloa, Ángel
Soteras Abril, Fernando

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

1999



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Papel del Oxido Nítrico y Anión Superóxido en la
esofagitis crónica experimental en conejos
producida por ácido y pepsina

Autor

Isabel Fiteni Mera

Director/es

Dr. Angel Lanas Arbeloa

Dr. Fernando Soteras

Facultad de Medicina de Zaragoza

1999

I. INTRODUCCION

1. ESOFAGITIS POR REFLUJO

1.1. CONCEPTO Y DELIMITACION

El reflujo gastro-esofágico (R.G.E.) se define como el paso espontáneo del contenido gástrico y/o duodenal al esófago. Este paso existe en condiciones normales, sin consecuencias clínicas generalmente y es denominado fisiológico. Se ha delimitado gracias a los estudios por pHmetría de 24 horas; suele aparecer después de la ingesta y es más raro durante el reposo nocturno. Estos episodios de reflujo fisiológico no suelen durar más de 5 minutos y el tiempo total en que el pH esofágico permanece por debajo de 4 es inferior al 3,4%. Este reflujo puede tornarse patológico cuando la duración de los episodios se prolonga, el tiempo total de exposición del esófago al contenido refluído se hace muy largo o aparece por la noche. En esta situación puede ocasionar signos y síntomas con o sin lesiones anatomopatológicas evidentes en la mucosa esofágica, definiendo la enfermedad por reflujo gastro-esofágico (E.R.G.E.)⁽¹⁾.

La primera descripción del R.G.E. fue realizada en 1935 por Winkelstein quien sugirió que el reflujo de ácido gástrico producía lesiones esofágicas; hasta entonces éstas eran atribuidas a otras causas como infección, irritantes, divertículos o neoplasias ⁽²⁾. Pero es a partir de las descripciones de Allison en 1946 cuando se empieza a reconocer y utilizar el término de esofagitis por reflujo⁽³⁾. En las décadas siguientes se profundiza en el conocimiento de la fisiopatología esofagogástrica y de la enfermedad por reflujo, gracias a las nuevas técnicas como la manometría esofágica y la pHmetría esofágica de 24 horas.

La E.R.G.E. engloba manifestaciones que van desde síntomas leves a graves lesiones esofágicas; la forma más frecuente es la esofagitis por reflujo que puede incluso cursar con sintomatología recurrente y alteraciones anatomopatológicas con lesiones objetivables radiológica, endoscópica e histológicamente. Sin embargo no existe acuerdo en la definición exacta de la esofagitis por reflujo y para algunos autores hace referencia a la presencia de clínica compatible, independientemente

de la existencia de lesión histológica, mientras que para la mayoría debe haber afectación objetiva anatomopatológica^(1,4). Hay pacientes con lesiones esofágicas graves asintomáticos y otros muy sintomáticos pero sin lesiones .

1.2. EPIDEMIOLOGIA

La E.R.G.E. es una entidad extraordinariamente frecuente en la población general. Sin embargo es difícil conocer la prevalencia real de R.G.E. y de su síntoma más característico, la pirosis, ya que la mayoría de individuos consideran esta sensación de quemazón o ardor retroesternal ascendente, como normal y se automedican en lugar de acudir al médico. Se estima que afecta a más del 5% de la población con más de 50 años y aumenta con la edad pudiendo llegar a afectar al 20% por encima de los 70 años⁽⁵⁾. En estudios realizados en Estados Unidos se ha comprobado que el 36% de las personas presentan pirosis al menos una vez al mes y un 7% lo presentan diariamente⁽⁶⁾, con resultados similares en publicaciones europeas⁽⁵⁾. Se constató que aumenta considerablemente su incidencia durante el embarazo y que hasta un 25% de

embarazadas presentaban clínica de reflujo diariamente⁽⁵⁾.

Además de su alta prevalencia, otro aspecto importante de la E.R.G.E. es que puede conllevar una serie de complicaciones graves como la ulceración, la hemorragia digestiva, la perforación, la estenosis o el esófago de Barrett (lesión premaligna). Así un 10% de pacientes con E.R.G.E. desarrollan un esófago de Barrett, de los cuales un 10% desarrollan a su vez un adenocarcinoma de esófago con una supervivencia del 7% a los 5 años⁽⁷⁾. Hay que añadir a los problemas digestivos las manifestaciones clínicas extraesofágicas producidas por la E.R.G.E. como la tos crónica, el asma nocturno de difícil diagnóstico o los cuadros de dolor torácico atípico que se confunden con la angina de pecho.

Un último aspecto que refleja la magnitud del problema es el coste económico; esta patología es responsable de 300 a 450 millones de pesetas que se gastan anualmente en todo el mundo por la enfermedad relacionada con el ácido.

1.3. ETIOPATOGENIA DE LA ESOFAGITIS POR REFLUJO

La esofagitis por reflujo es un proceso multifactorial en el que pueden coexistir distintos factores patogénicos pero cuyo primer evento es la presencia del contenido gastroduodenal en la luz del esófago. La presencia de este material refluído y subsiguiente lesión de la mucosa esofágica es el resultado del equilibrio entre dos grupos de factores: los factores agresivos que favorecen el reflujo y los defensivos que impiden o contrarrestan este fenómeno. La esofagitis dependerá del desequilibrio entre estos.

1.3.1. AGENTES AGRESIVOS

Los factores agresivos son bien conocidos y dependen del material refluído; ácido clorhídrico, pepsina y contenido duodenal con sales biliares y jugo pancreático. La aparición de las lesiones esofágicas dependerá en parte de la capacidad lesiva del reflujo.

1.3.1.A. CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL REFLUIDO

La mayoría de pacientes con esofagitis por reflujo tienen lesiones

esofágicas relacionadas con un pH ácido, debido a los hidrogeniones. La lesión es máxima cuando el pH desciende por debajo de 2, provocando una desnaturalización proteica de la mucosa⁽⁸⁾. La pepsina, enzima del jugo gástrico, se activa a pH ácido siendo ésta máxima a pH 2⁽⁹⁾. Esta enzima es proteolítica; daña las uniones intercelulares y además interfiere con los mecanismos de reparación de la mucosa. La pepsina empeora la lesión producida por el ácido en el esófago y la gravedad de ésta se correlaciona con su concentración⁽¹⁰⁾.

Es igualmente importante el tiempo de exposición de la mucosa al material refluído; aunque la cantidad que refluye sea escasa si permanece largo tiempo en el esófago el daño será considerable, del mismo modo que si son períodos cortos de exposición pero muy frecuentes⁽¹¹⁾. Aunque existe controversia, se considera que a mayor volumen de ácido secretado por el estómago, mayor posibilidad de que ocurra el reflujo y la lesión. Existen estudios de pacientes con hipersecreción gástrica y úlcera duodenal que presentan una alta prevalencia de esofagitis por reflujo⁽¹²⁾ o como en el síndrome de Zollinger-Ellison en el que se han

descrito casos con esofagitis severa complicada con estenosis o hemorragia y cuya patogenia se ha relacionado con la importante secreción de ácido⁽¹³⁾.

Sin embargo la secreción ácida de la mayoría de los pacientes con E.R.G.E. no es mayor que en la población normal. Tanto es así que también se produce esofagitis por reflujo en pacientes con hiposecreción gástrica e incluso aclorhidria⁽¹⁴⁾. Ocurre del mismo modo en pacientes gastrectomizados, especialmente con reconstrucciones tipo Billroth II, en los que el pH puede ser muy alcalino >7 ⁽¹⁵⁾. Todos estos datos indican que el material refluido con pH neutro o alcalino también lesiona la mucosa esofágica; en estas circunstancias sería el contenido duodenal que pasaría al estómago y de ahí al esófago⁽¹⁶⁾. Este contenido está formado por la secreción biliar y la pancreática. Las sales biliares atacan la barrera formada por la mucosa, favorece la difusión de los hidrogeniones y facilita la acción de las enzimas pancreáticas, como la tripsina, que son proteolíticas. La tripsina se activa a pH neutro como las sales biliares no conjugadas que se inactivan a pH ácido⁽¹⁷⁾. Sin embargo las sales biliares conjugadas, como es el

taurodesoxicolato, tienen una acción corrosiva que lesiona directamente el esófago en presencia de ácido⁽¹⁸⁾. La lipasa pancreática es activa con pH óptimo entre 7 y 8 e inactiva en medio ácido; pero a concentraciones elevadas en medio alcalino es también capaz de dañar la mucosa esofágica⁽¹⁹⁾. El reflujo alcalino se produce con más frecuencia durante la noche o tras la ingesta cuando los alimentos aumentan el pH del contenido gástrico. No existe consenso en cuanto a qué tipo de reflujo es más lesivo para la mucosa esofágica. Unos estudios apoyan que el reflujo mixto con ácido y sales biliares es el responsable de los casos de esofagitis más graves⁽¹⁵⁾ y además es el más frecuente en pacientes sintomáticos⁽²⁰⁾. Para Lillemoe las sales biliares junto a tripsina en medio alcalino producen más lesión que estas sales con pepsina en medio ácido⁽²¹⁾. Estudios más recientes indican que el ácido solo no produce daño y requiere la presencia de pepsina cuya concentración no influye en el resultado.

1.3.1.B. FACTORES GASTRICOS

La diferencia de presión entre el estómago y el esófago favorece la

aparición de reflujo. Esta presión intragástrica depende fundamentalmente del volumen gástrico que está condicionado por el volumen de las ingestas y el grado de secreción gástrica. También influyen en la presión intragástrica las alteraciones de la motilidad gástrica.

Las ingestas abundantes, especialmente grasas y bebidas gasificadas aumentan la distensión gástrica y favorecen el descenso de presión del esfínter esofágico inferior y su relajación facilitando el reflujo^(22,23). Se ha comprobado en casos de secreción gástrica patológica, como en el síndrome de Zollinger-Ellison o en la úlcera duodenal, que existe mayor incidencia de reflujo por el mayor volumen^(12,13, 24).

Por otro lado se piensa que las alteraciones de la motilidad gástrica pueden contribuir al reflujo; la permanencia prolongada del contenido gástrico en el estómago por retraso del vaciamiento sería un factor, sin embargo en estudios experimentales no se ha comprobado esta hipótesis⁽²⁴⁾. El retraso del vaciamiento gástrico sólo está implicado en la producción del reflujo si además existe una incompetencia en el esfínter esofágico inferior⁽²⁵⁾. En

pacientes con insuficiencia pilórica puede existir fácilmente reflujo duodeno-gástrico con aumento del volumen contenido en el estómago y en ellos se produciría un reflujo a esófago alcalino⁽²⁶⁾.

Para impedir el reflujo de material potencialmente dañino existen varios mecanismos “anti-reflujo” que analizaremos.

1.3.2. FACTORES DEFENSIVOS

1.3.2.A. BARRERA ANTI-REFLUJO

Clásicamente se consideraban mecanismos antirreflujo ciertas características anatómicas como el ángulo gastroesofágico de Hiss, los pilares diafragmáticos, el ligamento frenoesofágico y la roseta mucosa^(24,27). Se pensaba que con la alteración de estos factores, como ocurre en la hernia de hiato, se producía el reflujo⁽²⁴⁾. La introducción de la manometría esofágica permitió comprobar que existía una zona de alta presión intraluminal entre el esófago y el estómago que parecía depender del músculo intrínseco esofágico. En 1958, Boyle prueba que el músculo esquelético de las cruras diafragmáticas participan en este

mecanismo de barrera esofagogástrica⁽²⁸⁾. Ambos componentes anatómicamente superpuestos participan en formar esa zona de alta presión en la unión esofago-gástrica para evitar el reflujo; por un lado un componente interno que es el músculo liso del esófago distal o “esfínter esofágico inferior” (EEI) y un componente externo constituido por el músculo estriado de las cruras diafragmáticas⁽²⁹⁾.

Las contracciones de las cruras diafragmáticas que intervienen en la presión de la unión esofago-gástrica están normalmente relacionadas con la respiración; aumenta con la inspiración entre 10 y 20 mmHg llegando a 150 mmHg cuando ésta es profunda, para contrarrestar la presión negativa torácica que se crea y que favorecería el reflujo. Otras actividades que inducen la contracción refleja del diafragma son todas las que aumentan la presión abdominal como la tos o cualquier maniobra de Valsalva por contracción de los músculos de la pared abdominal⁽³⁰⁾. Se ha demostrado la importancia de este mecanismo al probar que puede mantener por sí solo una zona de presión en pacientes con resección del esófago distal y el EEI⁽³¹⁾.

El esfínter esofágico inferior no es un esfínter propiamente dicho desde el punto de vista anatómico. Está compuesto por un engrosamiento del músculo liso del esófago distal de unos 3-5 cm de longitud. Las fibras musculares del estómago situadas inmediatamente por debajo también contribuyen a la barrera antireflujo⁽³²⁾. En condiciones basales se encuentra en contracción creando una presión de 15-25 mmHg en la unión esofago-gástrica⁽³³⁾. Esta presión basal de la unión esófago-gástrica varía, con pequeñas fluctuaciones de 5 a 10 mmHg y son atribuidas a la contracción del esfínter. Se producen fluctuaciones de mayor intensidad simultáneamente con las contracciones gástricas llegando a superar los 80 mmHg, que se producen cada tres minutos aproximadamente⁽²⁹⁾. Todos los aumentos de presión intraabdominal están acoplados a un aumento del tono del esfínter esofágico inferior constituyendo una efectiva barrera antireflujo^(34,35). Entre estos dos mecanismos musculares se consigue una adaptación de la respuesta contráctil acoplada a los cambios de presión continuos tanto torácicos como abdominales e impedir el reflujo de material gástrico.

El control de la actividad de ambos sistemas, EEI y cruras diafragmáticas es de diferente origen. El diafragma está inervado por los nervios frénicos, cuyos cuerpos neuronales se encuentran en el núcleo del mismo nombre en la médula espinal cervical, conectados con las neuronas del centro de la inspiración del troncoencéfalo. Las cruras diafragmáticas se contraen segundos antes que el resto del diafragma para mayor efectividad antirreflujo⁽³⁶⁾.

El EEI tiene una regulación compleja, resultado de mecanismos miogénicos, neurogénicos y hormonales; todos ellos concurren en cambios intracelulares de la concentración de calcio que provocan la despolarización del miocito y su contracción⁽³⁷⁾. Este esfínter tiene una rica inervación donde las neuronas que forman el plexo mientérico se sitúan en diferentes planos musculares a diferencia del resto del esófago donde se localizan entre las capas musculares longitudinal y circular⁽³⁸⁾. El nervio vago del sistema nervioso autónomo es el principal control neurogénico. Llega desde los centros del sistema nervioso central hasta el plexo mientérico; modula el tono del EEI en respuesta a

las contracciones gástricas y la relajación con la deglución. Se ha comprobado que el neurotransmisor presináptico es la acetilcolina y el postsináptico es el NO, aunque pueden intervenir otras sustancias a este nivel como es el péptido intestinal vasoactivo^(39,40) que detallaremos en otra sección (cf. 3.4.1). Existen además gran cantidad de hormonas y sustancias endógenas que modulan y afectan el control del tono basal del EEI (tabla I).

Cuando la barrera antirreflujo descrita se hace incompetente se produce el reflujo hacia el esófago. Se han identificado tres mecanismos por los que el EEI se vuelve incompetente;

- a. por hipotonía permanente del EEI,
- b. presión parcialmente baja que permite el reflujo cuando aumenta la presión intraabdominal y
- c. relajaciones transitorias inadecuadas no relacionadas con la deglución y que es el principal mecanismo en los pacientes con E.R.G.E.

En algunos pacientes con E.R.G.E. se detecta un tono basal del EEI disminuído. Presiones por debajo de 10 mmHg indican una mayor posibilidad de reflujo, ya que cualquier aumento de presión intraabdominal lo provocaría. En estos pacientes los

episodios de reflujo son más frecuentes que en personas con presiones normales. De todas formas existen personas sanas con presiones por debajo de 10 y al mismo tiempo pacientes con reflujo y presiones basales normales. Estos datos explican que sólo un 20% de los pacientes con reflujo se debe a una hipotonía del EEI permanente⁽¹¹⁾. Probablemente esta baja incidencia de E.R.G.E: por hipotonía de EEI se deba a que se previene el reflujo por la contracción del diafragma, y se ha demostrado en trabajos con pacientes sanos que al suprimir el tono del EEI con atropina sólo aparece reflujo durante los períodos de relajación transitoria de las cruras diafragmáticas⁽⁴¹⁾. En la hipotonía mantenida pueden intervenir hormonas gastrointestinales que disminuyen el tono basal como la colecistoquinina, la progesterona que explicaría la alta frecuencia de reflujo en el embarazo, pueden influir alimentos o también medicamentos como las aminofilinas, los nitritos o los anticolinérgicos (tabla I). En general se ha observado que una hipotonía mantenida se asocia con una mayor prevalencia y gravedad de síntomas y de esofagitis péptica.

Las relajaciones transitorias del esfínter son episodios de 10 a 60 segundos en los que simultáneamente se relajan el EEI y las cruras diafragmáticas, sin relación con la deglución⁽⁴²⁾. Aproximadamente el 50% de los episodios de reflujo se deben a este mecanismo. Se producen alrededor de 20 al día, sobre todo después de las comidas y raramente por la noche. Estas relajaciones están mediadas por el nervio vago y aunque no se conocen los estímulos desencadenantes parece que la distensión gástrica, el decúbito lateral derecho y la estimulación faríngea aumentan la frecuencia de estas relajaciones⁽⁴²⁾. Esto explica el aumento de episodios de reflujo después de las comidas, o con el eructo y los vómitos, considerados fisiológicos.

En un estudio para determinar los factores que provocan el reflujo, se observó que en personas sanas coincide en su mayoría con episodios de relajación esfinteriana de tipo fisiológico, principalmente desencadenado por el eructo. Sin embargo, según aumentaba el grado de lesión esofágica en los pacientes se detectaban mayor número de reflujos espontáneos, probablemente

relacionados con el stress o con alteraciones motoras del esófago⁽⁴³⁾.

<u>HORMONAS</u>	<u>FARMACOS</u>
Secretina	Nitratos y nitritos (nitroprusiato)
Colecistoquinina	Calcio-antagonistas
Péptido Inhibidor Vasoactivo (VIP)	Benzodiazepinas
Péptido Inhibidor Gástrico (GIP)	Barbitúricos y Opiáceos
Glucagón	Antidepresivos tricíclicos
Progesterona	Anticolinérgicos
Neurotensina	Prostaglandinas
Somatostatina	Dopamina
Encefalinas	Beta-adrenérgicos
	Alfa-bloqueantes
<u>DIETA</u>	<u>TOXICOS</u>
Grasas y chocolate	Cafeína
Tomate	Alcohol
Zumos concentrados de frutas	Tabaco

Tabla I.- Agentes que disminuyen el tono basal del EEI

Como veremos también más adelante la propia agresión ácida al esófago provoca una alteración de la motilidad esofágica afectando el aclaramiento, con una disminución del tono del EEI, empeorando el reflujo y la lesión. Se cierra un círculo vicioso iniciado por la incompetencia de la barrera anti-reflujo y perpetuado por la E.R.G.E.⁽⁴⁴⁾. En estudios experimentales la perfusión ácida además de producir lesión de la mucosa

esofágica provoca una caída del tono del EEI que se recupera al resolverse la esofagitis⁽⁴⁵⁾. Este fenómeno puede estar relacionado con la prostaglandina E2 que aumenta con la inflamación tisular, ya que la indometacina que inhibe su síntesis también evita al mismo tiempo la caída del tono del EEI⁽⁴⁶⁾. Sin embargo en humanos no se ha demostrado la recuperación del tono esfinteriano al curar la lesión esofágica⁽⁴⁷⁾.

Cuando esta barrera gastroesofágica falla, intervienen otros factores defensivos contra el reflujo.

1.3.2.B. ACLARAMIENTO ESOFAGICO

El aclaramiento esofágico es la capacidad que tiene el esófago para eliminar el material refluído. Este determina la duración del contacto de la mucosa esofágica con el material refluído; su objetivo es limitarlo al máximo. Se ha visto en estudios experimentales que la gravedad de la esofagitis viene determinada por la agresividad del material refluído y el tiempo de contacto con la mucosa esofágica^(48,49).

Los factores que intervienen en un aclaramiento eficaz son: la gravedad, el peristaltismo esofágico y la neutralización del material refluído.

La fuerza de la gravedad es relativamente poco importante en el vaciamiento esofágico de personas sanas, sin embargo en pacientes con trastornos de la motilidad esofágica la bipedestación contribuye a acelerar este vaciamiento⁽⁵⁰⁾. Por esta razón se aconseja a pacientes con E.R.G.E. la

elevación de la cabecera de la cama y retrasar el decúbito tras las ingestas.

La motilidad esofágica es el factor más importante para el aclaramiento. El peristaltismo primario se inicia con la deglución y el peristaltismo secundario se desencadena por la distensión esofágica producida por la presencia del material refluído. Esta actividad motora es muy importante durante el sueño, cuando disminuye el peristaltismo primario de la deglución de la saliva. De esta forma el 50% de los pacientes con esofagitis moderada o grave presentan una disfunción peristáltica, con contracciones de amplitud disminuída respecto a controles sanos⁽¹¹⁾. Parece que el trastorno motor puede preceder o también suceder como consecuencia a la E.R.G.E. ya que la esofagitis experimental producida por instilación de ácido en animales se acompaña de disfunción peristáltica⁽⁵¹⁾. Como ya veíamos la lesión producida en el esófago puede a su vez alterar la contractilidad del esófago y disminuír la presión del EEI; sin embargo pacientes con contracciones de baja amplitud y esofagitis erosiva no restablecen su motilidad esofágica con la curación de las lesiones⁽⁵²⁾.

Después de la contracción que vacía el esófago del material refluido puede persistir un residuo que será eliminado por la neutralización del bicarbonato de la saliva (alrededor del 30%) y el producido por las glándulas esofágicas (en torno al 70%). El contacto del ácido con la mucosa esofágica es un importante estímulo para la secreción de saliva⁽⁵³⁾. Se ha comprobado que si se suprime la saliva con anticolinérgicos, el aclaramiento esofágico se enlentece⁽⁵⁴⁾.

Es la duración y no la frecuencia del reflujo el parámetro que mejor se relaciona con la gravedad de la esofagitis. Por ello, cualquier fallo en los sistemas de aclaramiento descritos serán de gran trascendencia en la patogenia de las lesiones. Estos sistemas son menos eficaces durante el sueño, por disminuir la secreción salivar y estar en decúbito, lo cual explica que el reflujo nocturno sea más lesivo⁽²⁴⁾.

1.3.2.C. RESISTENCIA TISULAR

La tercera línea defensiva interviene cuando el contacto de la mucosa con el material refluido ocurre, y se denomina resistencia tisular. Esta resistencia tisular se pone en evidencia

al perfundir con ácido (CIH a pH 2) el esófago de conejos durante horas sin que aparezcan lesiones tisulares⁽⁵⁵⁾. La misma realidad se pone de manifiesto en el trabajo de Berstein cuando perfunde ácido durante más de 30 minutos sin producir sintomatología en individuos sanos⁽⁵⁶⁾. Con ambas maniobras se obvian los mecanismos defensivos de la barrera anti-reflujo y el aclaramiento luminal esofágico, por lo que la resistencia a la agresión ácido-péptica debe producirse a nivel del epitelio mismo de la mucosa esofágica⁽⁵⁷⁾.

Constituída por varios factores se divide en defensa preepitelial, defensa epitelial y postepitelial según su localización anatómica respecto a la luz y el epitelio esofágicos (tabla II).

1. Defensa preepitelial

Los factores preepiteliales tienen como objetivo evitar que los hidrogeniones de la secreción ácido-péptica entren en contacto con la superficie epitelial de la mucosa. Esto lo realizan una capa de moco-capla fija de agua y los iones bicarbonato de superficie. La capa de moco está formada por una estructura polimérica de proteoglicanos adherente que recubre

la superficie y evita la difusión del agente lesivo. Además en esta capa se neutralizan los hidrogeniones gracias a los iones de bicarbonato secretados por el epitelio, con un retraso producido por la capa de moco-agua creando un gradiente de pH entre la luz esofágica y la superficie del epitelio. Este gradiente de pH parece depender de los iones bicarbonato ya que las prostaglandinas E lo aumentan y los inhibidores de la ciclooxigenasa (AINES) lo reducen, con los mismos efectos en la secreción de bicarbonato⁽⁵⁸⁾.

Este sistema evita la retrodifusión de los hidrogeniones, pero como demuestran Quigley y Turnberg en un estudio en humanos, estos factores no son tan eficaces en el esófago como en el estómago y duodeno⁽⁵⁹⁾. El gradiente de pH existente entre la luz y la superficie epitelial en el estómago varía entre 5 y 7 con un pH endoluminal de 2, mientras que este gradiente en el esófago es de 2-3. No se conocen las causas de esta diferencia pero parece que se deba a una capa de moco menos definida, la capacidad de la pepsina del reflujo de destruir esta capa y una limitada capacidad de difusión del bicarbonato intersticial por la vía paracelular⁽⁶⁰⁾.

La secreción de moco podría estar regulada por una vía colinérgica pues aumenta el grosor de la capa con la administración de agentes colinérgicos⁽⁵⁸⁾. También parece que está regulada por una vía no adrenérgica- no colinérgica mediada por el óxido nítrico como demuestran Sarosiek et al en humanos⁽⁶¹⁾. Al perfundir el esófago con suero salino más pepsina observaron un aumento de la mucina en el contenido luminal como producto de la digestión de la capa de moco. Cuando inhiben la síntesis del óxido nítrico pretratando con L-NNA no se produce el incremento de mucina endoluminal en los mismos experimentos por lo que estos autores concluyen que el óxido nítrico interviene en su síntesis⁽⁶¹⁾. Se tiene constancia que los liberadores de NO estimulan la secreción de moco en experimentos in-vitro e in-vivo a nivel del estómago, efecto que desaparece in-vivo al añadir inhibidores del NO⁽⁶²⁾.

En cuanto a los iones bicarbonato son secretados por las glándulas submucosas, y aumentan con la perfusión de ácido como demostró Orlando et al⁽⁶³⁾. Esta secreción se mantiene aumentada durante los 90 minutos siguientes a la perfusión ácida y

no se inhibe con anestésico ni con fármacos anticolinérgicos, por lo que parece mediada también por una vía no-adrenérgica-no colinérgica como el moco.

2. Defensa epitelial

El epitelio del esófago tanto estructural como funcionalmente supone en sí una barrera frente a la agresión ácido-péptica. El principal factor de esta barrera es su estructura estratificada y en especial su estrato córneo, el más apical. Las células del estrato córneo gracias a la bicapa lipídica de las membranas celulares apicales y las uniones intercelulares constituyen una barrera muy eficaz a la libre penetración de iones y moléculas dentro de la mucosa, lo cual se manifiesta por una considerable resistencia eléctrica (entre 1000 y 2500 ohm.cm²)⁽⁶³⁾. Se ha demostrado esta baja permeabilidad de las membranas celulares apicales a los hidrogeniones por medio de microelectrodos colocados en estas células; hasta un pH endoluminal de 2 no existen cambios significativos en el pH intracelular, y sólo por debajo de 2 empieza a descender, resistencia que depende de las membranas celulares apicales⁽⁶⁵⁾. Sin

embargo la porción basolateral de la membrana celular sí es muy permeable a los hidrogeniones⁽⁶⁶⁾. El otro componente de la impermeabilidad que son las estructuras de unión intercelular han sido analizados por el grupo de Orlando por medio de estudios morfológicos (microscopía electrónica y criofractura) y fisiológicos⁽⁶⁷⁾. Comprobaron que las barreras intercelulares frente a la difusión de iones y moléculas están formadas por uniones estrechas (“tight junctions”) situadas fundamentalmente en el estrato córneo y en las 2-3 capas superiores del estrato espinoso y material intercelular de composición variable entre especies (lípidos en el ratón y glucolípidos en el conejo). Ambas estructuras ofrecen importante resistencia a la difusión de iones desde la luz pero no desde la serosa. Demuestran este hecho administrando lantano, un trazador electrónico denso, que desde la superficie endoluminal no atraviesa la porción más superficial del epitelio y sin embargo desde la vertiente adventicial alcanza las capas más superficiales, hasta 8-10 capas celulares de la luz esofágica. Cuando se abrieron estas uniones estrechas, las resistencias eléctricas (consideradas un marcador de

permeabilidad tisular) no disminuían de forma importante, lo cual demuestra que las uniones estrechas no representan la única barrera paracelular de impermeabilidad y el material intercelular tiene un papel preponderante en esta función⁽⁶⁷⁾.

A pesar de todas estas líneas defensivas, la difusión de hidrogeniones depende finalmente de su concentración, ya que cuando alcanza unos niveles determinados consiguen difundir al espacio intra y extracelular de la mucosa. Esto indica también que existen otros elementos defensivos que intervienen a este nivel. Uno de estos elementos es la capacidad tampón en el espacio intra y en el extracelular. A nivel extracelular son los iones bicarbonato los encargados de neutralizar los hidrogeniones como demuestran Tobey y cols⁽⁶⁸⁾. Estos proceden principalmente del aporte sanguíneo desde la adventicia y su concentración parece estar en equilibrio con la concentración sanguínea en torno a 25 mM de HCO_3^- . Observaron perfundiendo esófagos con bicarbonato por su capa adventicial, una protección frente al daño producido simultáneamente por el ácido en la luz, gracias al efecto tampón a nivel del

espacio intercelular por la difusión del bicarbonato vía paracelular. Cuando los hidrogeniones difunden al interior celular son tamponados por proteínas y fosfatos y en menor medida por bicarbonato.

Si la capacidad tampón es superada y se acidifica el medio intracelular como ocurre en exposiciones largas a altas concentraciones de ácido, las células epiteliales aún tienen dos mecanismos de membrana capaces de extruir hidrogeniones hasta restablecer el pH intracelular normal (7,3). Ambos mecanismos se han estudiado en células de conejo; dependen de un gradiente transmembrana de Na^+ mantenido por una bomba Na^+/K^+ -ATPasa. Un primer mecanismo intercambia H^+ por Na^+ extracelular y es sensible a la amilorida, análogo al identificado en el humano⁽⁶⁹⁾. El otro sistema intercambia iones Cl^- por HCO_3^- extracelular. También se ha detectado un transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ independiente del Na^+ que responde a la alcalinización de la célula acidificando el citoplasma⁽⁷⁰⁾.

Cuando la exposición al ácido es prolongada o intensa y sobrepasa todos los mecanismos descritos hasta ahora, se produce finalmente la muerte celular y

entran en acción fenómenos reparativos celulares encargados de cubrir el defecto. En estudios de DeBacker con perros, se comprobó que la perfusión de ácido a concentraciones inferiores a las que producen esofagitis provocaba un aumento de la proliferación celular en la capa basal objetivada por la captación de timidina tritiada⁽⁷¹⁾, que refleja síntesis de ADN. El aumento de síntesis de ADN se produjo a las 16 horas de la perfusión ácida con un pico a las 20 horas. Cuando al líquido de perfusión se añadió pepsina no se detectó cambio en la replicación celular respecto a la perfusión con ácido solamente, lo que indica que el estímulo depende del ácido y es independiente de la pepsina. Se ha comprobado que antes de 12 horas después de una agresión ácido-péptica en esófagos de conejo no hay cambios replicativos⁽⁷²⁾. A las 24 horas se observó una reparación parcial con disminución de la retrodifusión de hidrogeniones que fué completa a las 48. Por lo tanto la hiperplasia basal, considerada desde hace tiempo como fenómeno patognomónico de esofagitis, es la traducción morfológica de esta replicación celular⁽⁷³⁾. La pérdida de epitelio esofágico es reparada por replicación celular, pero antes de este

fenómeno se pone en marcha la restitución celular tras una agresión que consiste en la migración de células desde capas adyacentes hacia la zona de lesión, como ocurre en otros tramos del tubo digestivo. Nuestro grupo ha demostrado en experimentos in-vitro cómo estos dos fenómenos de reparación son claramente afectados por el pH extracelular. Con ligeras disminuciones del pH (a 7-6,5) durante períodos cortos (30 minutos) se estimulaba e incrementaba la proliferación celular, sin embargo si se alargaba este discreto descenso de pH a 24 horas o con descenso algo mayor del pH (a 5) disminuía drásticamente la proliferación hasta inhibirse. La restitución celular igualmente es afectada por variaciones del pH extracelular y con discretas variaciones de pH se inhibe a partir de las 24 horas, así como en dos horas si el pH baja a 5. La reparación de las lesiones epiteliales en el esófago depende por lo tanto de las variaciones del pH existente en la luz esofágica, tanto en intensidad como en tiempo⁽⁷⁴⁾.

Los mecanismos que regulan estos procesos de replicación y reparación celular, más conocidos y mejor descritos en el estómago, están en

estudio a nivel del esófago. Especialmente los factores de crecimiento como el factor de crecimiento epitelial (EGF) y el de crecimiento transformante alfa (TGF- α), secretados por las glándulas submucosas del esófago y las glándulas salivales^(58,75). Según diferentes autores estos factores producen un aumento de la síntesis de ADN en la mucosa y un aumento de la replicación celular asociado a todo lo largo del tracto gastrointestinal. Todos los agentes que promuevan la replicación celular favorecen la resistencia de la mucosa, y en algunos trabajos se ha asociado la esofagitis por reflujo a deficiencias de la síntesis de EGF a nivel del esófago⁽⁷⁶⁾. Además se ha comprobado que durante las fases de cicatrización de las lesiones de la mucosa aumenta el número de receptores para estos factores de crecimiento⁽⁷⁷⁾. Este factor también está relacionado con los fenómenos de metaplasia de Barrett y de degeneración neoplásica⁽⁷⁸⁾, y se ha detectado en estos casos una expresión de receptores para EGF mucho más intensa en estas patologías que en esófagos normales.

Nuestro grupo⁽⁷⁹⁾ ha estudiado los efectos de todos estos factores que pueden influir en los mecanismos de

reparación celular en experimentos in-vitro con cultivos celulares de epitelio esofágico de conejo. Los resultados difieren de los hallados a otros niveles del tubo digestivo. Sólo los factores de crecimiento HGF (del hepatocito), IGF (insulin-like growth factor) y el EGF (epitelial growth factor) estimulan la proliferación celular epitelial esofágica. No se ha detectado ningún efecto de los factores TGF-alfa ni el PDGF (derivado de las plaquetas) ni la prostaglandina E2 sobre la proliferación a este nivel. Ninguno de todos estos factores influye sobre la restitución celular. El factor transformante beta (TGF- β) inhibe ambos mecanismos de reparación celular, al contrario de lo que ocurre a otros niveles intestinales donde estimula la restitución.

Si estos datos se confirman podrían arrojar luz sobre fenómenos como la carcinogénesis esofágica pues se ha observado que una disminución de receptores para este factor se asocia a resistencia frente a la inhibición del crecimiento celular⁽⁸⁰⁾.

3. Defensa postepitelial

Los mecanismos que desempeña la defensa post-epitelial dependen

esencialmente del flujo sanguíneo. La circulación sanguínea aporta nutrientes, oxígeno para el metabolismo celular incluida la replicación, y retira productos de desecho, algunos potencialmente tóxicos como el CO₂ y ácidos o radicales libres⁽⁶³⁾. Un mecanismo crucial en la defensa es la regulación del equilibrio ácido-base tisular con el aporte de iones bicarbonato al espacio intercelular como ya hemos visto⁽⁶⁸⁾. Este aporte sanguíneo no es fijo; la mucosa de todo el tracto digestivo tiene capacidad para regularlo y modularlo localmente en respuesta a diferentes agresiones lumenales; al ácido entre otras. Hollwarth⁽⁸¹⁾ demostró que el flujo sanguíneo aumentaba de forma considerable en el esfínter inferior y tercio inferior del cuerpo esofágico tras perfundir con una preparación ácida. Esta hiperemia se detectó principalmente en las capas musculares y en la mucosa del tercio distal y la submucosa exclusivamente a nivel del EEI.

En conejos, Bass et al⁽⁸²⁾ observaron que al romper la barrera mucosa con sales biliares o tripsina a pH 7 el flujo mucoso aumentaba y no se producía retrodifusión de hidrogeniones.

Sin embargo cuando se exponía a pepsina o ácido a pH 2 no se producía este aumento del flujo vascular y sí acontecía la retrodifusión de H⁺⁽⁸²⁾.

Aunque se conocen bien el papel y la regulación de los cambios de flujo sanguíneo en la defensa mucosa a otros niveles del tracto digestivo⁽⁵⁸⁾ principalmente gástrico, a nivel esofágico están todavía en discusión. Se ha evidenciado que ocurre una hiperemia en la mucosa esofágica durante la exposición a ácido y que es precedida de una liberación de histamina por desgranulación de los mastocitos⁽⁸³⁾. Este fenómeno desaparece al añadir estabilizadores de los mastocitos o anti-histamínicos. En última instancia los inhibidores de la NOS (L-NAME) bloquean esta hiperemia inducida tras perfusión de ácido por la liberación de histamina y también tras administración directa de histamina, por lo que el aumento de flujo mucoso ante la agresión ácida dependería del NO como último mediador de la histamina de los mastocitos. Aquí no intervienen mecanismos neurógenos como han defendido otros investigadores, pues al bloquearlos con diferentes sustancias no se afecta la respuesta hiperémica al ácido. Resultados éstos corroborados

por Sandler et al⁽⁸⁴⁾, ya que midiendo el flujo sanguíneo antes y después de la perfusión con ácido comprobaron que el aumento de flujo que se producía en respuesta a la agresión por ácido se anulaba al utilizar un inhibidor del NO y no se modificaba tras denervación.

En el hombre los mastocitos presentes en el esófago como en ciertos animales de experimentación utilizados (como la zarigüeya), aumentan en la esofagitis sugiriendo un posible papel patogénico de los mastocitos y la histamina⁽⁸³⁾, aunque no se han detectado mastocitos en el conejo^(79,83). Podrían participar también en esta hiperemia otras sustancias vasoactivas liberadas por aferentes nerviosas quimiosensibles a la agresión ácida como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) o la sustancia

P al aplicar capsaicina⁽⁸⁴⁾. Como respuesta a la aplicación de ácido estos aferentes nerviosos adyacentes al epitelio gástrico liberan el péptido CGRP en la proximidad a las arteriolas submucosas que responderían liberando NO⁽⁶²⁾. Si se altera este mecanismo neurógeno de la hiperemia con disrupción de los aferentes quimiosensibles, con antagonistas del CGRP o inhibidores del NO, aumenta considerablemente la vulnerabilidad de la mucosa ante el ácido. El óxido nítrico se ha implicado contundentemente como una molécula crucial en la regulación del flujo sanguíneo mucoso que puede responder a múltiples estímulos o sustancias vasoactivas, entre ellas la histamina^(83,84).

PRE-EPITELIAL

1. Capa de moco-agua fija
2. Iones bicarbonato de superficie

EPITELIAL

1. Barrera estructural

- Estratificación del epitelio
- Membranas celulares apicales: bicapa lipídica
- Complejos de unión intercelular: uniones estrechas y material

intercelular

2. Barrera funcional

- Bomba Na^+ / H^+ del epitelio
- Bomba $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ del epitelio, Na^+ -dependiente
- Tampones intracelular y extracelular
- Replicación celular

POSTEPITELIAL

1. Flujo sanguíneo mucoso

- Aporte de O_2 y nutrientes
- Aclaramiento de agentes nocivos
- Efecto del óxido nítrico

Tabla II. Factores de la resistencia tisular esofágica en sus tres niveles

1.3.2.D. LA ADAPTACION MUCOSA
COMO MECANISMO DE DEFENSA

Además de todos los factores descritos, la mucosa posee potencialmente otro recurso para defenderse contra las diferentes agresiones: la adaptación. En un

principio fue descrita en la mucosa gástrica en los años 30⁽⁸⁵⁾ y posteriormente ha sido estudiada a nivel del esófago. Este fenómeno consiste en la protección que desarrolla la mucosa cuando se le somete a irritantes “leves” como el ácido clorhídrico, el etanol o el ácido taurocólico a bajas

concentraciones y de forma repetida, por lo que se denomina “adaptación citoprotectora”⁽⁵⁸⁾. Se observa una reducción o ausencia de lesiones producidas con irritantes a dosis superiores aplicadas posteriormente en relación a las que aparecerían con esta misma agresión, pero sin las dosis previas a concentraciones bajas^(86,87). Estos “irritantes leves” producen una exfoliación del epitelio superficial, sin llegar a la necrosis.

La adaptación de la mucosa consta de dos fases; una primera en la que se produce una lesión leve estable que no aumenta a pesar de continuar con la agresión y una segunda en la que las lesiones van curando progresivamente aún continuando en contacto con el agente irritante. El resultado es una mucosa más resistente y aunque no se conocen exactamente los mecanismos intrínsecos, parece que depende de un aumento de la proliferación celular. Estos fenómenos han levantado especial interés por estar involucrados en la patogenia de la gastropatía por AINES. Graham et al⁽⁸⁸⁾ lo demuestran al administrar ácido acetil-salicílico a voluntarios; observan la producción de unas lesiones mucosas que se resuelven progresivamente a pesar de continuar

con la administración de aspirina. Justo antes de iniciarse esta resolución de las lesiones aumenta la concentración de ADN que refleja exfoliación y replicación delular⁽⁸⁸⁾. Konturek obtiene los mismos resultados en ratas⁽⁸⁹⁾ y humanos⁽⁹⁰⁾ administrando aspirina; produce lesiones que se reducen y resuelven con la repetición de la exposición, asociado a un importante aumento de la síntesis de ADN en la mucosa tras un descenso leve inicial. Un factor conocido estimulador de la proliferación celular epitelial es el EGF. Al eliminar la fuente endógena de EGF en ratas realizándoles una salivectomía, se produce igualmente la adaptación mucosa⁽⁸⁹⁾. Sin embargo objetivan un incremento en la inmunorreactividad al EGF en la mucosa, simultáneamente a un aumento de receptores para éste en la mucosa dañada. Estos datos sugieren que la mucosa gástrica responde a la agresión produciendo EGF localmente en exceso para favorecer su reparación estimulando la mitogénesis y la proliferación celular⁽⁸⁹⁾.

Otro fenómeno observado en estos experimentos junto con el aumento de proliferación celular es el incremento del flujo sanguíneo mucoso, que se ha relacionado con la producción de óxido

nítrico ya que al bloquearlo con L-NNA no se produce esta hiperemia^(83,89,90,91). Sin embargo esta inhibición con L-NNA influye muy ligeramente en el proceso de adaptación mucosa, por lo que parece que la adaptación citoprotectora se asocia a una hiperemia pero no depende de ésta. Konturek en todos estos trabajos sobre la adaptación citoprotectora observa durante las primeras agresiones con el irritante (aspirina acidificada) una infiltración de la mucosa por neutrófilos^(89,90,91) y producción de leucotrienos⁽⁹⁰⁾ que posteriormente se van reduciendo según se produce la adaptación y el incremento del flujo mucoso. Proponen una explicación de la patogenia del daño por aspirina y AINES en general en la que éstos activarían los leucocitos especialmente neutrófilos, favoreciendo su adhesión al endotelio vascular y su migración para liberar sustancias como leucotrienos y radicales libres mediadores de lesión^(90,91). En el proceso de adaptación se observa de forma concomitante una reducción de la activación de los neutrófilos y descenso de la liberación de leucotrienos.

Se han descrito estos mismos fenómenos de adaptación utilizando otros irritantes diferentes del AAS como

otros AINES⁽⁹²⁾, el stress en ratas⁽⁹³⁾, el etanol⁽⁹⁴⁾, las sales biliares⁽⁹⁵⁾ y el ácido⁽⁹⁶⁾, incluso se ha demostrado que existe una adaptación cruzada para alcohol, stress y taurocolato administrando previamente aspirina⁽⁹⁷⁾. En todos ellos se observa el aumento de la proliferación celular junto con los factores de crecimiento y asociado al incremento del flujo mucoso. Sin embargo los resultados en cuanto al papel de las prostaglandinas en esta adaptación son más dispares. En los trabajos con aspirina⁽⁸⁷⁻⁹¹⁾ la adaptación citoprotectora tiene lugar a pesar de una baja concentración de prostaglandinas ya que el AAS, como otros AINES, inhibe la ciclooxigenasa y por lo tanto la síntesis de prostaglandinas (hasta en un 90%). La adaptación a nivel gástrico parece ser por lo tanto independiente del sistema de prostaglandinas. Tampoco se anula con indometacina la adaptación ante agresiones repetidas con etanol⁽⁹⁸⁾. Sin embargo, en trabajos con otros agentes agresivos como el ácido se objetiva un aumento de síntesis de prostaglandinas en la mucosa durante la adaptación que desaparece al administrar conjuntamente la indometacina, efecto éste reversible al añadir prostaglandinas exógenas^(93,95,96).

Igualmente con la indometacina observan una reducción del aumento del flujo mucoso que normalmente se asocia a la adaptación. En el duodeno ocurre este mismo mecanismo de adaptación protectora como demuestra el grupo de Malagelada en ratas⁽⁹⁹⁾. Estudian la respuesta al ácido que en condiciones fisiológicas recibe el duodeno del vaciamiento gástrico. Se produce siempre asociada a una hiperemia. Esta hiperemia desaparece al bloquear la síntesis del NO con L-NNA, pero no consigue anular sin embargo la adaptación de la mucosa al ácido. Al administrar NO en forma de nitroprusiato se incrementa el flujo mucoso duodenal pero no la adaptación citoprotectora, por lo que la adaptación parece independiente de la vía del NO. Por el contrario al administrar un análogo de la prostaglandina E₂ se obtiene una hiperemia y una potenciación de la adaptación mucosa al ácido. Las prostaglandinas intervendrían en la adaptación de la mucosa duodenal al ácido y contribuirían, al menos en parte, en el control de la microcirculación mucosa. Probablemente el NO endógeno interactúa con las prostaglandinas en

esta regulación vascular para mantener la mucosa íntegra.

A nivel del esófago estos fenómenos son menos conocidos. Principalmente se ha podido comprobar que el esófago presenta también un mecanismo de defensa frente a la agresión crónica por ácido y pepsina. Hemos visto que intervienen los factores de crecimiento y sus receptores como reguladores de los mecanismos de reparación y proliferación celular^(80,100). Nuestro grupo ha demostrado que se produce la adaptación mucosa a nivel esofágico como a otros niveles, pues tras una primera exposición a irritante leve, una siguiente exposición a irritante más potente produce menor lesión que si directamente se expone sólo al irritante más fuerte. Dentro de los mecanismos reguladores de esta adaptación hemos estudiado el papel del óxido nítrico en la exposición aguda al ácido con pepsina⁽¹⁰¹⁾. Se puso en evidencia experimentalmente que el mecanismo de adaptación desaparece al bloquear la síntesis del óxido nítrico con L-NNA, así como al anular el efecto del factor de crecimiento EGF con anticuerpos inmunoespecíficos. Sin embargo esta adaptación no depende de la proliferación celular pues aparece en 3

horas y la proliferación tarda al menos 16 h en estimularse⁽⁷¹⁾, hecho corroborado por la negatividad de las tinciones inmunohistoquímicas para el antígeno mib 1 utilizado para detectar el aumento de replicación celular. Por lo tanto el papel del factor EGF en la adaptación es desconocido e independiente de la proliferación celular al menos en las primeras horas. El NO, implicado también en la adaptación tras la primera exposición, produce un aumento en el flujo mucoso local⁽¹⁰¹⁾ que si se anula se potencia la lesión.

En resumen la adaptación citoprotectora es un proceso complejo del que participan varios mecanismos mal identificados, con relevancia variable según el agente lesivo que actúe. Existe evidencia en cuanto a los factores de crecimiento que aumentan cuando se produce la lesión y que potencian la replicación y reparación celulares. Las prostaglandinas parecen intervenir en la agresión por ácido y en algunos trabajos, en la lesión por etanol. Finalmente interviene el flujo mucoso, cuya variación y regulación depende del óxido nítrico y probablemente también de las prostaglandinas, aunque no es imprescindible para que la adaptación se desarrolle. El aumento de la

microcirculación local podría ser el mecanismo de adaptación que más rápidamente se pone en marcha ante las agresiones, aunque no es imprescindible en el resultado final⁽¹⁰¹⁾.

1.3.3. MECANISMOS DE LESION CELULAR POR EL ACIDO

1.3.3.A. ACCION DEL ACIDO

Cuando todos estos factores defensivos de la mucosa son superados se produce la lesión celular. Aunque se han realizado numerosos trabajos para describir los fenómenos íntimos que la producen, todavía no se conoce completamente la secuencia de eventos que tienen lugar. Sin embargo se han definido muchas características del daño celular. Nuestro grupo⁽⁷³⁾ ha comprobado que las células esofágicas aisladas son resistentes a exposiciones de soluciones ácidas de pH>2. Sólo con exposiciones largas (por encima de 15 minutos) a pH inferiores a 2 aumentaba la mortalidad celular tanto en células aisladas como en cultivos celulares. Ramos et al⁽¹⁰²⁾ también estudiaron el comportamiento de las células expuestas al ácido. Vieron que las células en cultivo resistían durante largos períodos

a diferentes pH ácidos, excepto si era muy bajo (inferior a 1), y el daño era mayor si se asociaba pepsina al ácido. Como esto ocurría en cultivos celulares pero no en células aisladas; dedujeron que la pepsina actuaba a nivel de las uniones intercelulares⁽¹⁰²⁾.

Igualmente en cultivos celulares se ha visto que las células esofágicas de conejo se adaptan a importantes gradientes de pH; cuando el pH extracelular descendía también lo hacía el pH intracelular y éste volvía a ascender cuando se normalizaba el pH extracelular. Este fenómeno se anulaba al añadir pepsina al cultivo⁽¹⁰³⁾.

Otro factor importante en la producción de lesión por ácido es la permeabilidad celular de la mucosa. La permeabilidad de la mucosa aumenta con la perfusión ácida intraluminal de los esófagos. Orlando et al⁽¹⁰⁴⁾ demuestran que con la perfusión de ácido en esófagos de conejo se produce una dilatación de las uniones intercelulares con caída de la resistencia eléctrica y un aumento del transporte pasivo de sodio. Al intensificar la agresión ácida se produce edema celular, formación de vesículas en el estrato espinoso y necrosis celular con una inhibición completa del transporte de

sodio. En trabajos posteriores de este mismo grupo, se confirma que la lesión producida por el ácido es originada por la pérdida de la regulación del volumen celular y depende del tiempo de exposición y de la presencia de sodio extracelular⁽¹⁰⁵⁾. Otros autores concurren con estos resultados y parece que el daño mucoso se produciría por la inhibición del transporte del Na⁺ con el consiguiente acúmulo de sodio, agua y otros aniones dentro de la célula⁽¹⁰⁶⁾. Este acúmulo origina el edema celular con alteraciones de la permeabilidad y del metabolismo y viabilidad de la célula.

1.3.3.B. MEDIADORES DE LA LESION POR ACIDO

1.3.3.B.1. LA HISTAMINA

Dentro del mecanismo lesivo por el ácido se han involucrado numerosas y diferentes sustancias como intermediarios o efectores de este daño. Entre otros a la histamina; su liberación aumenta precozmente con la perfusión intraesofágica de ácido⁽¹⁰⁷⁾. Esta liberación de histamina se produce al mismo tiempo que un aumento de la permeabilidad vascular local y ambos

fenómenos forman parte del componente inflamatorio⁽¹⁰⁷⁾. Por otra parte, se ha demostrado que los mastocitos de la mucosa esofágica sufren una desgranulación en capas subepiteliales y profundas con la exposición intraluminal al ácido; estas células constituirían la fuente de la histamina liberada^(83,108) en la lesión esofágica por ácido.

Existen mastocitos en la mucosa esofágica (y todo el tubo digestivo) del hombre y de la zarigüeya, pero no se han detectado en el esófago del conejo como describen otros grupos^(83,108) y hemos analizado nosotros mismos⁽¹⁰¹⁾.

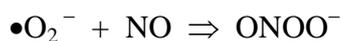
1.3.3.B.2. LOS RADICALES LIBRES

Otros agentes lesivos considerados son los radicales libres, involucrados en muchas patologías humanas incluyendo las digestivas como las enfermedades inflamatorias, neoplasias y en concreto en la enfermedad por ácido⁽¹⁰⁹⁾. Son sustancias químicas que se caracterizan por tener uno o más electrones no apareados en su orbital externo. Por este hecho son inestables y por lo tanto, muy reactivos. Los radicales se forman en muchos procesos como en la respiración

mitocondrial, en la fagocitosis celular desarrollada por neutrófilos principalmente, pero también por monocitos y macrófagos, o por el sistema xantina deshidrogenasa-xantina-oxidasa en la isquemia tisular⁽¹¹⁰⁾ y en la inflamación por las células inflamatorias activadas o también en el metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la lipooxigenasa.

El radical libre más abundante en los sistemas biológicos es el oxígeno; reacciona con el agua produciendo intermediarios llamados “radicales libres derivados del oxígeno” que son más reactivos, como el anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El radical hidroxilo es el más reactivo de los conocidos. Los radicales libres atacan cualquier estructura que encuentran; las proteínas, los ácidos nucleicos y más fácilmente los fosfolípidos de las membranas celulares desencadenando una cadena autolítica denominada la peroxidación lipídica, pues origina hidroperóxidos de lípidos, que dañan la integridad y estructura de las membranas. El óxido nítrico puede comportarse como un radical libre, pues tiene un electrón no apareado, y aunque relativamente estable puede ser tóxico

cuando se encuentra en exceso en un tejido, sobre todo si coexiste el anión superóxido con el que reacciona para originar peroxinitritos, potentes oxidantes con larga vida media⁽¹¹¹⁾. La tasa de producción de peroxinitritos depende de las concentraciones de NO y de superóxido que aunque en condiciones normales son bajas, pueden aumentar considerablemente ambos en situaciones patológicas:



Los radicales libres intervienen por su toxicidad en la defensa contra los gérmenes invasores pero también son lesivos para las propias células. Los organismos han desarrollado mecanismos de defensa para protegerse y limitar el daño producido por estos radicales, llamados antioxidantes que existen dentro de la célula y en el medio extracelular. Pueden ser enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y el glutatión (GSH) o no enzimáticos como las vitaminas A, E y C, el alopurinol o el zinc. La SOD elimina selectivamente el anión superóxido producido, la catalasa “limpia” el peróxido de hidrógeno y el alopurinol barre los radicales hidroxilo.

El GSH sin embargo es inespecífico y existe en altas concentraciones en las células endoteliales y hepatocitos⁽¹¹¹⁾. En la mucosa digestiva también están presentes estos anti-oxidantes; alfa-tocoferol, ácido ascórbico, SOD, catalasa y GSH que la protegen del daño oxidativo y su disminución potencia las lesiones^(110,111).

Se ha demostrado el papel patogénico de los radicales en las lesiones de la mucosa del tracto digestivo. En concreto la producción de superóxido aumenta cuando se inducen lesiones por stress de la mucosa gástrica de ratones⁽¹¹²⁾, y previamente a la aparición de las lesiones se objetiva un descenso de la actividad de SOD endógena, presumiblemente por consumo. La administración de otros antioxidantes como el dimetilsulfóxido y el alopurinol previene la producción de úlcera gástrica crónica por isquemia en ratas⁽¹¹³⁾ de forma claramente dosis-dependiente o por ácido⁽¹¹⁴⁾, evidenciando la citotoxicidad de estos radicales. En un modelo experimental de esofagitis por reflujo en ratas de Wetscher et al⁽¹¹⁵⁾ el bloqueo de la producción de superóxido y de peróxido de hidrógeno mediante utilización de los antioxidantes SOD y catalasa

respectivamente disminuyen significativamente la lesión macroscópica esofágica y la peroxidación lipídica. Con la SOD desaparece la lesión macroscópica y disminuye en un 69% la peroxidación, mientras que con la catalasa disminuye en un 50%. Al administrar conjuntamente varios antioxidantes (SOD y además alopurinol y dimetiltiourea) consiguen anular totalmente el daño oxidativo. Por lo tanto aunque parecen estar implicados diferentes metabolitos oxidativos, el superóxido sería el principal radical en la esofagitis aguda por reflujo⁽¹¹⁵⁾. Observan que el reflujo origina un aumento de GSH, antioxidante natural, cuantitativamente paralelo a la peroxidación lipídica medida objetivamente, por lo que es considerado un marcador del stress oxidativo. Nuestro grupo ha demostrado la importancia del superóxido en el daño agudo esofágico con ácido y pepsina respecto a otros radicales libres en un modelo de esofagitis aguda en conejos⁽¹¹⁶⁾. El daño producido por el ácido con pepsina disminuye drásticamente cuando se tratan los animales con SOD eliminando el anión superóxido, pero sólo se atenúa

débilmente si se trata con la catalasa que elimina el peróxido de hidrógeno o con DMSO eliminador de radicales hidroxilo. Se objetiva directamente un aumento de la producción intracelular del anión superóxido⁽¹¹⁶⁾. Además hemos podido determinar por citometría de flujo que la fuente del anión superóxido en la mucosa era principalmente células inflamatorias, monocitos, macrófagos y neutrófilos que son células positivas para el marcador CD_{11b}. Realmente las células inflamatorias activadas parecen la fuente principal del anión superóxido, pues cuando se añade ketotifeno, un anti-inflamatorio que disminuye significativamente la infiltración de la mucosa por estas células, el daño de la mucosa se reduce a grados similares a cuando se trata con SOD. Aunque los neutrófilos son los principales productores de radicales libres, Olayee⁽¹¹⁷⁾ et al demuestran que no son los únicos añadiendo inhibidores de los enzimas fagocíticos de los neutrófilos como la azida (inhibe la mieloperoxidasa de los granulocitos) y la catalasa a las muestras biópsicas y observan que sólo se inhibe la quimioluminiscencia de los radicales libres parcialmente. Existen pues otras

fuentes de radicales derivados del oxígeno en la mucosa del esófago además de los neutrófilos, que podrían ser los macrófagos, las células endoteliales o las epiteliales. Estos trabajos de Olayee fueron realizados en humanos con patología esofágica como esofagitis por reflujo y enfermedad de Barrett, cuantificando los radicales libres reactivos por quimioluminiscencia en muestras de biopsia tomadas por endoscopia⁽¹¹⁷⁾. Se ha demostrado que existe una correlación significativa entre el grado de severidad de la esofagitis y el grado de quimioluminiscencia que refleja la concentración de radicales libres^(117,118). Wetscher et al⁽¹¹⁸⁾ en trabajos posteriores con este mismo tipo de muestras y pacientes, miden los niveles de SOD endógena en la mucosa y demuestran que ésta disminuye cuando el grado de lesión aumenta. Los menores niveles de SOD se detectan en los casos de Barrett con esofagitis grave y los mayores niveles en esófagos con lesión leve. La SOD es consumida con el daño oxidativo y vice-versa; altos niveles pueden prevenir una esofagitis grave en el esófago de Barrett. Además demuestran que los pacientes con funduplicatura de Nissen tienen resultados similares en todos los

aspectos a los controles sanos, por lo que esta técnica protege la mucosa del daño oxidativo del reflujo. Parece evidente por lo tanto que la esofagitis por reflujo se asocia a la producción de radicales libres, principalmente el anión superóxido que desencadena o mantiene la lesión celular por stress oxidativo.

1.3.3.B.3. LAS PROSTAGLANDINAS

Así como se conoce la capacidad protectora de las prostaglandinas a nivel de la lesión gástrica y de hecho se definió la propiedad de citoprotección en un origen como la capacidad de las prostaglandinas para prevenir las úlceras producidas por agentes lesivos con independencia de la secreción de ácido⁽¹¹⁹⁾, su acción a nivel esofágico está menos clara. Los estudios arrojan resultados controvertidos y varios grupos observan que la administración de un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas como es la indometacina reduce la esofagitis producida experimentalmente con ácido^(120,121). Sin embargo, en nuestro laboratorio al administrar aspirina hemos aumentado la lesión producida en conejos perfundidos

intraesofágicamente con ácido más pepsina⁽¹²²⁾.

En trabajos recientes de nuestro grupo⁽¹²³⁾ hemos visto que la mucosa esofágica del conejo produce prostaglandinas en condiciones basales, principalmente PGE2, y cuya secreción aumenta con la agresión ácido-péptica. Aunque su papel no está todavía tan definido como en el estómago, estas prostaglandinas no producen daño en la mucosa sino que parecen tener un papel protector pues cuando se administran de forma exógena se consigue prevenir la aparición de lesiones graves inducidas por ácido y pepsina en un modelo similar al utilizado aquí⁽¹²³⁾. Inhibiendo la síntesis de prostaglandinas con indometacina no se ejercía ningún efecto beneficioso como defienden otros autores^(120,121) aunque tampoco aumentaba la lesión⁽¹²³⁾.

1.4. HISTOPATOLOGIA

Como hemos descrito, cuando el agente agresor supera los mecanismos defensivos de la mucosa se produce la lesión esofágica. Esta lesión se pone de manifiesto mediante alteraciones macroscópicas y microscópicas, si bien

muchas veces no existe una buena correlación entre la sintomatología del paciente y los hallazgos anatomopatológicos^(124,125). En general se distinguen dos formas de esofagitis; una grave, con evidentes alteraciones endoscópicas y que se caracteriza por un patrón secuencial de ulceración y curación y una forma leve caracterizada por un epitelio más o menos intacto en el que con frecuencia existe una escasa respuesta inflamatoria o incluso no existe⁽¹²⁶⁾. No es fácil en estas formas leves establecer unos criterios claros de esofagitis. Muchos autores han realizado estudios al respecto, con conclusiones a veces contradictorias.

La ausencia de signos inflamatorios claros en numerosas biopsias esofágicas realizadas a pacientes con sintomatología de esofagitis por reflujo impulsaron a Ismael-Beigi et al a realizar estudios anatomopatológicos meticulosos que permitieran definir las características del esófago normal y establecer unos criterios fiables de E.R.G.E^(73,127). Las biopsias obtenidas en individuos sanos presentaban unas papilas coriónicas que se extendían menos de la mitad de la totalidad de la altura de la mucosa, y la capa basal no llegaba a representar el

15% del total del espesor del epitelio. No se visualizaban polimorfonucleares en la lámina propia y los eosinófilos aparecían con escasa frecuencia. Por otra parte las biopsias de los individuos con reflujo sintomático y pHmetría positiva presentaban una papilas coriónicas elongadas con una altura superior al 66% de la totalidad y la capa basal superaba el 15% de la totalidad. Basándose en estos datos el estudio de las biopsias presentaba una sensibilidad del 85% y una especificidad del 90%. La presencia de polimorfonucleares y de eosinófilos se observó únicamente en el 18% del total, que coincidía con los casos más graves. Estos cambios descritos en las biopsias no eran constantes de forma que recomendaban realizar biopsias múltiples en los últimos 10 cm del esófago. La elongación papilar se explicaría, al menos en parte, por una pérdida de la capa epitelial superficial, lo cual disminuye el grosor total epitelial y alarga de forma relativa las papilas vásculonerviosas⁽¹²⁴⁾.

El engrosamiento de la capa basal observado parece corresponder a un estímulo de la proliferación celular secundario a la acción del material refluído. Livstone et al⁽¹²⁸⁾ demuestran

esta hipótesis con el estudio de biopsias esofágicas de enfermos marcadas con timidina tritiada. Ponen en evidencia un notable aumento de la proliferación celular en comparación con enfermos sanos sin reflujo⁽¹²⁸⁾. El grupo de Johnson⁽¹²⁹⁾ corroboró estos hallazgos al encontrar una correlación directa entre la proporción de tiempo con exposición a pH inferior a 4 en pHmetrías de 24 horas y la longitud de las papilas y la hiperplasia de la capa basal. En los pacientes con mayor frecuencia de episodios de reflujo nocturno y en los que presentaban hernia de hiato la longitud de las papilas era mayor. Además los pacientes intervenidos quirúrgicamente con técnicas antirreflujo presentaban una longitud menor en sus papilas coriónicas. Igualmente Behar y su grupo⁽¹²⁶⁾ encontraron una longitud papilar superior al 50% y un grosor de la capa basal superior al 15% del grosor total del epitelio en el 95% de sus pacientes con esofagitis por reflujo y en ninguno de los controles. Es destacable el hecho de que el 95% de los casos de esofagitis leve, sin alteraciones endoscópicas, presentaban mucosas alteradas así como el 100% de los casos de esofagitis grave. Existiría por tanto

una llamativa falta de correlación entre los hallazgos endoscópicos y los histológicos, por lo que una endoscopia normal no excluiría el diagnóstico de esofagitis. Al mismo tiempo no encontraron relación entre la presencia de infiltrado inflamatorio y la esofagitis. Los agregados linfocitarios aparecían en proporción similar en enfermos y sanos, y los infiltrados de neutrófilos se observaron en el 22,5% de los pacientes con esofagitis y en ningún caso de los sanos. En un estudio realizado a voluntarios sanos por el grupo de Weinstein⁽¹³⁰⁾ se describieron hallazgos histológicos similares a los descritos por Ismail-Beigi en los últimos 2,5 cm de esófago en un 57% de los casos, mientras que si la biopsia se tomaba por encima sólo se detectaban alteraciones en el 19% de los casos. Es posible que estos cambios fueran debidos al reflujo fisiológico habitual tras la relajación del E.E.I. con la deglución, lo cual indicaría que las biopsias deberían ser tomadas por encima de este margen para evitar conclusiones erróneas.

Algunos autores critican los criterios de Ismael-Beigi y de Behar ya que para su estudio se requiere que las secciones tisulares estén bien orientadas, perpendiculares a la superficie epitelial.

Las biopsias convencionales tomadas con endoscopio no suelen ser útiles, pues a menudo las muestras son demasiado pequeñas o están mal orientadas, y se precisan instrumentos específicos como es el tubo de succión Quinton para realizar biopsias correctas⁽¹³¹⁾. Para valorar las biopsias convencionales se han descrito técnicas morfométricas basadas en la medición del área nuclear, concentración nuclear y dimensiones nucleolares en la capa basal, como criterio de hiperplasia⁽¹³²⁾. Sin embargo, Collins en un estudio diseñado para valorar esta técnica no encontró la sensibilidad necesaria para que tuviera valor diagnóstico en la práctica de rutina⁽¹³³⁾.

Seefeld y su grupo realizando biopsias por succión 5 cm por encima del E.E.I. en pacientes afectados de esofagitis por reflujo, no pudieron confirmar la presencia de estos cambios reparativos descritos⁽¹³⁴⁾. Para ellos la existencia de leucocitos polimorfonucleares y de eosinófilos representaban los mejores marcadores histológicos de esofagitis, con una sensibilidad del 62% y una especificidad del 90%. Winters también valoró el infiltrado de eosinófilos como criterio específico de esofagitis, hallando una

correlación directa entre la presencia de eosinófilos intraepiteliales y un aclaramiento de ácido alterado, medido por pHmetría nocturna⁽¹³⁵⁾. Sin embargo otros autores encuentran una baja especificidad y sensibilidad para este hallazgo anatomopatológico⁽¹³¹⁾.

Muchos estudios experimentales en animales intentan aportar luz al controvertido tema de los criterios histológicos de esofagitis. Ingram et al⁽¹³⁶⁾ controlaron durante un período de tiempo entre una semana y 20 meses a 20 perros a los que habían intervenido quirúrgicamente para provocarles una esofagitis crónica. Realizaron un estudio histológico exhaustivo dividiendo la evolución de la esofagitis por reflujo en 4 fases:

1ª) lesión epitelial con pérdida de las capas superficiales.

2ª) mantenimiento de la pérdida epitelial con infiltrado inflamatorio en la lámina propia.

3ª) aparición de úlceras con destrucción de la arquitectura normal de la mucosa y en ocasiones de la submucosa, y

4ª) ulceración que puede cronificarse o bien evolucionar hacia la curación.

Schulze-Delrieu Et al. produjeron una esofagitis crónica por R.G.E. en cobayas mediante la resección

del cardias, controlando la evolución de las lesiones mediante esofagoscopia, biopsias por succión y por último necropsia, durante un período de tiempo entre 6 y 72 semanas⁽¹³⁷⁾. Propusieron un patrón secuencial de la esofagitis en el que a diferencia del estudio de Ingram en perros, no hallaron la presencia de ulceraciones crónicas. Basándose en el aspecto histopatológico de las lesiones dividieron la esofagitis en 3 fases; 1ª) Aguda: importante congestión vascular, hemorragia tisular e infiltrado granulocítico agudo. Frecuente descamación y erosión epitelial que adelgazaba su grosor total. 2ª) Subaguda: la descamación, el edema, el infiltrado celular y la congestión eran menos intensas que en el período previo. Llamaba la atención la hiperplasia de la capa basal y la elongación papilar, que eran observadas a partir de las 3 semanas de evolución y 3ª) Crónica: la hiperplasia basal y la elongación papilar eran más marcadas y persistían durante todo el experimento. Existía un aumento del grosor epitelial total debido a la acantosis. Eran frecuentes así mismo la presencia de mitosis y de fibrosis en la lámina propia y muscularis mucosae.

Desde un punto de vista morfológico, algunos autores han estudiado los diferentes mecanismos de lesión provocada por los componentes del material refluido. Así, Salo et al⁽¹³⁸⁾ observaron que la perfusión esofágica con CIH durante varias horas provocaba muy ligeros cambios microscópicos, consistentes en un discreto infiltrado de leucocitos polimorfonucleares. Si el CIH se combinaba con pepsina o taurocolato se producían importantes lesiones ulcerativas en una hora de perfusión. El deoxicolato en medio no ácido también provocaba lesiones macroscópicas graves. Sin embargo, al microscopio electrónico, las lesiones provocadas eran muy diferentes; las sales biliares afectaban primariamente la membrana celular y las organelas intracelulares, mientras que la pepsina afectaba la sustancia intercelular, provocando la descamación celular⁽¹³⁸⁾. El aumento de la replicación celular como consecuencia de la acción lesiva del material refluido fue puesto de manifiesto por De Backer et al⁽⁷¹⁾ en un estudio experimental realizado en perros, en el que se observó una actividad mitógena significativamente aumentada a las 16 horas tras la perfusión de ácido. Al añadir pepsina a

la perfusión de los mismos animales la actividad mitógena era similar, por lo que se sugirió que la concentración de pepsina no potenciaba el estímulo de la proliferación celular provocado por el ácido.

Otros estudios experimentales han sido diseñados para valorar la curación esofágica al cesar la agresión. El grupo de Geisinger⁽¹³⁹⁾ observó que las lesiones provocadas en el esófago del gato tras una perfusión ácida durante 30 minutos presentaban diferencias estadísticamente significativas al ser valoradas en el 1^{er}, 2^o, 3^o o 4^o día tras la perfusión. La mayoría de las úlceras curaban al 2^o día con una importante disminución de la capa basal y al 4^o día del infiltrado leucocitario subepitelial. Mud et al⁽¹⁴⁰⁾ en un estudio de esofagitis crónica en ratas por reflujo pancreatobiliar, observaron que al eliminar el reflujo se producía una curación completa de la pared esofágica en 15 días. Aunque en ningún caso se encontró estenosis esofágica, la presencia de colágeno intramural detectada con la esofagitis no disminuyó sino que sufrió un incremento tras la curación. Este incremento del colágeno intramural podría explicar las frecuentes alteraciones motoras esofágicas que se

encuentran tras la curación de la esofagitis⁽¹⁴⁰⁾.

La esofagitis crónica por R.G.E. se ha asociado a un aumento de la replicación celular que explicaría la asociación de esta patología con el esófago de Barrett^(141,142) y con una prevalencia aumentada de desarrollar un adenocarcinoma⁽¹⁴³⁾. Barrett⁽¹⁴⁴⁾ en su trabajo original describió esta lesión como la presencia de epitelio columnar de tipo gástrico en el esófago. Con posterioridad en estudios realizados por diversos autores se ha puesto de manifiesto que el denominado epitelio de Barrett responde en realidad a un complejo mosaico de células, glándulas y tipos estructurales que muestran diversos grados de atrofia y maduración hacia epitelio intestinal y gástrico. Aunque en un principio se pensó en un origen congénito para esta lesión, desde hace algunos años numerosas evidencias clínicas han relacionado el esófago de Barrett con el reflujo ácido^(145,146,147) y con el alcalino^(148,149).

A pesar de los esfuerzos realizados por numerosos autores para dilucidar las características histopatológicas de la esofagitis, no existen unos criterios uniformemente aceptados. En la actualidad la mayoría

de los clínicos desechan la biopsia de mucosa esofágica de rutina en el diagnóstico cuando existen lesiones objetivadas macroscópicamente, limitando su uso a los casos en los que el aspecto endoscópico es normal o hay cambios mínimos, donde las posibilidades de error de la endoscopia son elevadas. Aquí los cortes histológicos pueden detectar signos inflamatorios como infiltración celular, edema o fibrosis y cambios morfométricos como hiperplasia basal o elongación papilar⁽¹⁵⁰⁾. De la misma forma la biopsia es obligada en casos graves de ulceraciones, estenosis o para despistar el esófago de Barrett y el cáncer de esófago.

2. OXIDO NITRICO

2.1. IMPORTANCIA DEL OXIDO NITRICO

Desde que en 1987 se identificara al óxido nítrico (NO) como el factor dilatador derivado del endotelio por diferentes grupos de investigadores (EDRF; endothelial-derived relaxing factor)^(151,152), éste se ha convertido en una de las moléculas más estudiadas los últimos años. El EDRF fue aislado por

Furchgott y Zawadzki⁽¹⁵³⁾ en 1980 como mediador de la relajación de algunas venas, arterias y vasos de la microcirculación en respuesta a diversos estímulos como son la acetilcolina, nucleótidos de adenina, trombina, bradikina o al ionóforo del calcio A 23187. El interés por esta sustancia fue en aumento al ser reconocida como segundo mensajero, el estimulador endógeno de la guanilato-ciclasa, en muchos procesos fisiológicos.

El NO ha sido implicado en la modulación del flujo vascular, en la motilidad intestinal, en el transporte de agua y electrolitos, en la función de las plaquetas (adhesión y agregación), en la de los mastocitos (desgranulación) y es liberado por células inflamatorias tras activación inmunológica interviniendo en la defensa del huésped en los procesos inflamatorios⁽¹⁵⁴⁾.

Esta variedad de acciones del NO en el organismo, sin relación entre ellas, sugiere que la síntesis de NO es un mecanismo regulador muy importante y que su alteración por defecto o por exceso puede contribuir en la fisiopatología de muchas enfermedades, y por ende su manipulación puede constituir una aproximación terapéutica interesante⁽¹⁵⁵⁾.

2.2 METABOLISMO DEL NO

El óxido nítrico es un gas originado a partir de una reacción entre L-Arginina y oxígeno que produce NO y citrulina de forma equimolar⁽¹⁵⁶⁾.

En el agua y en el plasma o en cualquier solución oxigenada, el óxido nítrico es inestable con una vida media inferior a 5 segundos y se oxida a nitrito (NO_2^-), forma estable durante varias horas. En sangre completa sin embargo, la forma nitrito se convierte rápidamente a nitrato (NO_3^-) por la presencia de hemoglobina. Esto explica que la concentración de nitrito en sangre sea baja y la de nitrato 100 veces mayor. El óxido nítrico también utiliza otras vías de metabolización y se oxida rápidamente produciendo otros compuestos nitrosados al unirse con la albúmina o con moléculas que contienen grupos sulfhidrilo, como el glutatión o la cisteína.

Otra molécula que interacciona con este gas es el ion ferroso del grupo prostético HEME de muchas proteínas como la mioglobina o la hemoglobina, al que se une con una avidez 10 veces mayor que al oxígeno. Al unirse produce

metahemoglobina o hemoglobina nitrosilada, según el estado de oxigenación de la hemoglobina, y el NO pierde su actividad. De forma similar, la guanilato ciclasa contiene un grupo prostético heme capaz de unirse al NO, como otras enzimas con grupos hierro-sulfuro⁽¹⁵⁵⁾.

Por otro mecanismo completamente diferente, se une al anión superóxido $\bullet\text{O}_2^-$ para generar peroxinitritos (ONOO^-), tras lo cual el NO pierde su actividad biológica. La SOD (superóxido dismutasa) impide esta inactivación del NO por el superóxido, pues se une a éste último y lo convierte a H_2O_2 , preservando y potenciando la acción del NO⁽¹⁵⁴⁾.

2.3 SINTESIS DEL OXIDO NITRICO

2.3.1. LA OXIDO NITRICO SINTASA: NOS

Los microorganismos pueden generar NO por una vía de reducción de NO_2^- u oxidación de amoníaco. Sin embargo los mamíferos lo producen en la oxidación de L-Arginina a L-citrulina, en cantidades equimolares⁽¹⁵⁶⁾. Esta reacción es

catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Esta enzima se localizó por primera vez en el endotelio de los vasos por Moncada⁽¹⁵⁷⁾ y desde entonces se han detectado varias formas parecidas pero no idénticas de NOS en células de diferentes tejidos del organismo⁽¹⁵⁸⁾. Estas “isoformas”, todas ellas productoras de NO se distinguen por su ubicación y mecanismos de regulación diferentes. Principalmente existen dos isoenzimas de NOS; la forma constitutiva (cNOS) y la forma inducible (iNOS). Ambas requieren la presencia de NADPH y cuatro cofactores: protoporfirina IX, Flavin adenin dinucleótido, Flavin mononucleótido y tetrahidrobiopterina (BH4) para la transferencia de electrones⁽¹⁵⁷⁾.

2.3.2. INHIBIDORES DE LA NOS

El estudio del NO, su metabolismo y fisiología, ha sido en gran medida desarrollado con la utilización de los inhibidores de la NOS, como los análogos de L-Arginina. El más importante y usado es el L-N-Monometil -Arginina (LNMMMA), competidor de L-Arginina e inhibiendo su conversión a NO a nivel de todos las isoformas del enzima. En condiciones normales su concentración sérica es muy

baja, pero puede aumentar en condiciones como la insuficiencia renal aguda por acumularse y llega a inhibir la síntesis de NO^(155,158).

Existen otros inhibidores con diferentes propiedades; el L-NNA (L-N^o-nitro-arginina) y su éster metilado L-NAME (L-nitro-arginina-metil ester) que producen una inhibición irreversible y progresiva después de la unión inicial. Se distinguen principalmente en la carga y el pKa. Otros inhibidores conocidos como la L-Canavanina y el L-NIO inhiben con mayor potencia la NOS inducible que las constitutivas⁽¹⁵⁸⁾.

Los corticoides inhiben la expresión de la iNOS, al bloquear la síntesis proteica necesaria para su activación, y sin embargo no afectan el funcionamiento de la cNOS. La cicloheximida tiene un mecanismo similar e inhibe selectivamente la enzima inducible.

Otra forma de inhibir la síntesis de NO es limitando los cofactores como el di-amino 6-hidroxipirimidina (DAHP) que bloquea la síntesis de BH4. Del mismo modo los antagonistas de la calmodulina como la trifluoperazina y la clorpromazina que inhiben la cNOS calcio dependiente y la inducible calcio independiente⁽¹⁵⁸⁾. La

aminoguanidina inhibe selectivamente la isoforma inducible.

2.3.3. ISOFORMAS DE LA NOS

En un principio se distinguieron dos isoformas de la NOS; la constitutiva y la inducible. La forma constitutiva (cNOS) es citosólica, calcio-dependiente y requiere también la presencia de calmodulina. Se activa cuando aumenta la concentración citosólica de calcio y se inactiva al retornar el calcio a su concentración basal. Estas variaciones del calcio intracelular responden a estímulos fisiológicos como hormonales, neurotransmisores e incluso a estímulos mecánicos. Esta isoforma enzimática produce pequeñas cantidades (concentraciones nanomolares) de NO durante cortos períodos. El NO así liberado actúa como mecanismo transductor en diferentes procesos fisiológicos, activando la guanilato ciclasa enzima que aumenta los niveles de GMPc⁽¹⁵⁴⁾. Así el NO produce una relajación del miocito liso y vasodilatación entre otras acciones.

La forma inducible del enzima (iNOS) no se expresa hasta que se activan las células como el macrófago o el hepatocito que la contienen, tras exposición a una endotoxina o a

citokinas (interleukina 1β , factor de necrosis tumoral o $TNF\alpha$ e interferón γ). Por lo tanto está regulada a nivel de la transcripción genética y necesita unas horas para activarse. Una vez transcrita esta iNOS es poco regulable y sintetiza grandes cantidades (concentraciones micromolares) de NO durante períodos prolongados, a diferencia de la constitutiva. También se diferencia por no requerir la presencia de calcio. El NO liberado por esta enzima en estas condiciones (endotoxinas o citokinas) en altas concentraciones tiene actividad proinflamatoria, es citotóxico para microorganismos invasores o células tumorales y puede generar radicales libres^(62,158).

Tras múltiples estudios para determinar propiedades y especificidades de esta enzima se perfilaron más de dos isoformas y se confirmaron al clonar las enzimas para caracterizar el DNA. Se clasificaron en tres tipos; la neuronal (nNOS) o tipo I, desde un inicio identificada como constitutiva en el tejido neuronal, la endotelial (eNOS) o tipo III identificada como constitutiva en las células endoteliales de los vasos y la inducible o tipo II identificada en los macrófagos y

hepatocitos tras activación con citokinas⁽¹⁵⁸⁾.

La primera enzima que se clonó y purificó fue la isoforma constitutiva de la neurona de la rata; se denominó tipo 1 o nNOS (constitutiva neuronal) por presentar una actividad en el cerebro al menos 20 veces superior que en otros tejidos. Su actividad no cambia con la exposición a endotoxinas. Los cambios de calcio en la neurona que activan la nNOS responden a estímulos del glutamato en el cerebelo⁽¹⁵⁹⁾. La eNOS o tipo III es una enzima similar a la neuronal. Se ha clonado en el endotelio vascular, es también calcio y calmodulín-dependiente como la neuronal. Su código genético tiene sólo un 57% de identidad con el de la neuronal. Es la responsable de la producción de NO vascular en situación fisiológica. Esta eNOS produce NO ante estímulos de la acetilcolina que provoca variaciones en la concentración de calcio.

La otra NOS cuyo DNA es conocido hoy en día es la inducible o tipo II (iNOS). Es diferente a las anteriores y se expresa en células como los macrófagos, músculo liso vascular y también célula endotelial, neutrófilos y hepatocitos tras exposición a endotoxina

o citokinas, independientemente de la concentración de calcio intracelular. También se ha clonado el mismo DNA de iNOS en condrocitos humanos tras exposición a interleukina-1⁽¹⁵⁸⁾.

Como en las dos constitutivas descritas, su DNA contiene secuencias para su unión a NADPH, FMN y FAD. La constitutiva depende de la calmodulina^(158,160), a diferencia de la inducible que es independiente.

Se han localizado los genes que codifican estos tres tipos de enzima en el mapa genético humano; el gen de la eNOS está localizado en el cromosoma 7, el de la nNOS en el 12 y el de la iNOS en el cromosoma 17⁽¹⁵⁸⁾.

Actualmente nuevas isoformas inducibles, con características diferentes a las conocidas están en estudio: en el condrocito del conejo al exponerlo a endotoxina se induce una NOS que no se inhibe con corticoides como otras inducibles y es calcio-dependiente en contraposición a la iNOS conocida. Sin embargo es inducible pues se inhibe con la aminoguanidina⁽¹⁵⁸⁾. Existen otras isoformas de NOS inducibles, como en el hígado, que se expresan tras incubación con endotoxina. En el hígado se ha detectado una segunda iNOS, diferente a la conocida de los

hepatocitos, pues es calmodulín-dependiente. Nuevos estudios están en marcha para describir esta otra vía de producción de NO en el hígado^(158,161).

2.4. UBICACION DE LAS DISTINTAS NOS

2.4.1 DISTRIBUCION EN DIFERENTES ORGANOS

Aunque la distribución de la Oxido Nítrico Sintasa (NOS) es universal⁽¹⁶¹⁾, varía según la isoforma de la enzima; en unos órganos existe la isoforma constitutiva exclusivamente, mientras que en otros se expresa la inducible tras exposición a endotoxina.

En el cerebro y la piel sólo hay actividad de la NOS constitutiva, según se comprueba en varias especies (ratas, cerdos y conejos)⁽¹⁶¹⁾. Los mismos investigadores encuentran diversidad a nivel del pulmón según el animal; en la rata sólo inducible, en el cerdo constitutiva y en el conejo niveles muy bajos de ambas^(161,162). Bredt et al⁽¹⁶²⁾ estudian la localización de la cNOS en todo el organismo de la rata por medios inmunohistoquímicos con antisuero específico y purificado. Detectan una distribución especial y observan a

nivel del SNC mayor densidad en las capas granulosas del cerebelo, en el bulbo olfatorio, el hipocampo, colículos inferiores y superiores y banda diagonal del área de Broca. Hay también una alta densidad en el lóbulo posterior de la hipófisis y en los núcleos supraóptico y paraventricular hipotalámicos; éstos podrían ser el origen de las fibras proyectadas a la hipófisis posterior. Hay menor densidad en las capas superficiales del córtex. También se tiñe el sistema nervioso periférico; en la retina existe NOS cerca del epitelio pigmentoso. En la médula de la glándula adrenal se localiza en situación sináptica con las células cromafines. Esta distribución en las suprarrenales y como veíamos en el lóbulo posterior hipofisario pueden indicar un papel del NO en la regulación y liberación de hormonas. Experimentos de otros autores ratifican esta hipótesis cuando demuestran que el NO estimula la liberación de catecolaminas en preparaciones de médula adrenal.

También a nivel del sistema nervioso periférico Bredt et al describieron actividad en los ganglios neuronales posteriores⁽¹⁵⁹⁾ y en el plexo mientérico del tracto digestivo⁽¹⁶²⁾ hay neuronas y fibras con intensa tinción

paralelas a la capa muscular circular interna. Estos resultados ponen en evidencia una asociación entre la síntesis de NO y ciertas neuronas y fibras del organismo; neuronas en contacto con otras neuronas que muestran actividad guanilato-ciclase y modulación del GMPc como en el cerebelo, neuronas y nervios autónomos en contacto con músculo liso que puede reflejar un papel del NO en la regulación de la contracción-relajación, como veremos más adelante. Para estos autores la presencia de NOS en tan numerosos sistemas neuronales implica que el NO podría ser un mensajero neuronal o neurotransmisor⁽¹⁶³⁾.

Por último también se tiñe el endotelio de los grandes vasos; aorta, coronarias y arterias cerebrales⁽¹⁶¹⁾. Tan sólo en las cerebrales se detecta inmunoreactividad también rodeando la adventicia. Se ha demostrado que las plaquetas también contienen esta isoforma cNOS.

La iNOS se expresa tras estimulación en macrófagos, neutrófilos, hepatocitos y endotelio vascular y miocito liso de los vasos⁽¹⁶¹⁾.

2.4.2 UBICACION DE LA NOS EN EL TRACTO DIGESTIVO

En el tracto digestivo Salter, Moncada et al^(161,161) demuestran la existencia de ambas isoformas de la NOS. Se detecta la isoforma neuronal de expresión constitutiva que se encuentra en las neuronas del sistema entérico. La otra isoforma de expresión constitutiva eNOS, se localiza en el endotelio de los vasos y en las células epiteliales de la mucosa intestinal. La isoforma inducible iNOS se expresa bajo estímulo en muchos tipos celulares como las células endoteliales, macrófagos, neutrófilos y el epitelio.

En primer lugar se estudió la localización de la NOS en el cerebro y en el sistema nervioso periférico sensitivo; posteriormente se estudió exhaustivamente en el tracto digestivo sospechando la existencia de neuronas productoras de NO en éste. Utilizando métodos inmunohistoquímicos con anticuerpos anti nNOS se ha conseguido marcar neuronas que producen NO y se ha visto que característicamente tienen actividad NADPH-diaforasa⁽¹⁶⁴⁾. Por histoquímica se pueden teñir las células

con esta actividad enzimática y constituye un marcador selectivo de la expresión de NOS en general. Aunque es altamente fiable este método no discrimina entre iNOS y cNOS; para este fin se utilizan medios inmunohistoquímicos con anticuerpos policlonales específicos de isoforma. También se dispone de técnicas para detectar la expresión genética de la NOS por PCR-RT (polymerase chain reaction reverse transcription) que mide el mRNA que codifica este enzima. Empleando estas técnicas se ha descrito el mapa de las neuronas productoras de NO en el aparato digestivo en ratas, cerdos, primates y humanos^(164,165).

Se encuentran neuronas teñidas por estos métodos desde el esófago hasta el recto. Existen variaciones de densidad de tinción según el nivel del tracto digestivo y a un mismo nivel según las diferentes capas de la pared intestinal. Sin embargo esta distribución por capas se mantiene idéntica a lo largo de todo el tubo^(164,165,166).

En general se detecta mayor densidad de fibras y células en los plexos nerviosos mientéricos y en la capa muscular del tracto humano y del primate según estudios publicados de di Giorgio et al⁽¹⁶⁴⁾. Son más abundantes

en el plexo mientérico que en el plexo submucoso. Dentro de la capa muscular hay mayor densidad en la capa circular interna que en la longitudinal. En la submucosa hay escasas fibras teñidas, y siempre asociadas a los vasos. En la mucosa están confinadas a la muscularis mucosae donde son abundantes sobre todo en intestino delgado y grueso; a este último nivel se disponen en la base de las criptas. Considerando el tracto digestivo humano en su totalidad se ha detectado mayor actividad NADPH-diaforasa (NOS total) a nivel del colon que en el intestino delgado. También se ha detectado mayor actividad en estómago que en intestino delgado y esófago. Igualmente se detecta el marcador en la vesícula biliar, en las células ganglionares de los plexos interno y externo y en las capas musculares, pero más abundantes son en el esfínter de Oddi. En el páncreas se ve actividad en las células ganglionares y fibras intrapancreáticas, alrededor de los acini, de los ductos y en el estroma⁽¹⁶⁴⁾.

Se ha estudiado por el mismo método inmunohistoquímico el desarrollo embriológico humano del tracto digestivo por medio de fetos y recién nacidos muertos⁽¹⁶⁶⁾. Se observa el mismo patrón de mayor densidad en

el plexo mientérico y capa muscular, escasas células en el plexo submucoso y en la muscularis mucosae. En el intestino delgado entre las semanas 21 y 26 existen neuronas debajo y encima de los haces nerviosos primarios del plexo mientérico. Posteriormente se hacen más numerosas y extensas respetando esa topografía y formando una red entre los ganglios y fibras primarias y secundarias. Al final de la gestación se detectan fibras a lo largo de las musculares de la capa circular y muchas menos en la longitudinal. En la submucosa existen algunas células positivas limitadas a la capa más externa del plexo. Desde ahí fibras de esas células se dirigen a la capa muscular circular. A nivel del colon la distribución es similar con un patrón denso de fibras en la muscular circular y dos entramados ganglionares separados por vasos. Estas redes ganglionares y aganglionares sugieren y apoyan la hipótesis de una población de neuronas productoras de NO que actuarían como interneuronas o motoneuronas⁽¹⁶⁶⁾.

Aimi et al⁽¹⁶⁵⁾ han realizado las mismas descripciones en la rata donde se detecta mayor actividad en íleon, yeyuno y colon, algo menor en duodeno y mucho menor en estómago y esófago.

En estos dos últimos segmentos del tracto, las células y fibras positivas son escasísimas a nivel del plexo submucoso.

En un trabajo centrado en el esófago Murray et al⁽¹⁶⁷⁾ se proponen caracterizar el isoenzima en preparaciones homogenizadas de la capa muscular con muscularis propia y observan que es NADPH y calcio dependiente como la cNOS neuronal caracterizada con anterioridad. Miden la actividad a diferentes niveles del esófago y determinan que no hay diferencias significativas a lo largo del músculo liso ni incluso en el esfínter esofágico inferior donde es ligeramente superior; descartan así un gradiente de actividad enzimática. Sorprendentemente también detectan actividad NOS aunque mucho menor, a nivel del músculo estriado de la porción superior del esófago⁽¹⁶⁷⁾. Tanoué et al⁽¹⁶⁸⁾ han estudiado más recientemente el papel del NO en la formación de las varices esofágicas en la rata con hipertensión portal y al mismo tiempo han contribuido a describir la distribución de las diferentes NOS. Determinan la actividad NOS a nivel del esófago por diversos métodos complementarios como la

inmunofluorescencia con anticuerpos anti-iNOS y anti-cNOS, histoquímica para NADPH-diaforasa y detección del RNAm de ambas enzimas por PCR. Con estas técnicas determinan la presencia y localización de ambas isoformas inequívocamente en las ratas-control o sanas a nivel del epitelio, la muscularis mucosae, el endotelio de los vasos de la submucosa, la muscularis propia y los plexos mientéricos, principalmente cNOS y mucho más débilmente iNOS. Al producir hipertensión portal experimentalmente observan un aumento importante de la actividad de la cNOS a nivel del endotelio de los vasos de la submucosa, en muscularis mucosae y en el epitelio. El aumento de la iNOS es menos cuantioso que el de cNOS y ocurre en el endotelio de los vasos submucosos y en la muscularis mucosae. Por lo tanto además de la cNOS existe iNOS en condiciones patológicas a diferentes niveles del esófago. Nunca antes se había detectado actividad NOS a nivel del epitelio estratificado de la mucosa del esófago.

2.5. MECANISMO DE ACCION A NIVEL CELULAR DEL OXIDO NITRICO

El óxido nítrico es una molécula lipofílica que difunde a través de las membranas al citosol celular. Uno de los receptores del NO mejor conocido es el ión ferroso, que forma parte de muchos complejos, como es el grupo prostético heme u otros grupos no heme que contienen hierro unido a átomos de azufre⁽¹⁵⁴⁾. Al entrar en el citosol celular se une a dicho ion hierro de la guanilato ciclasa activándola y generando GMP cíclico, por lo que es considerado el 2º mensajero de muchas acciones como es la relajación del miocito, la vasodilatación o de la agregación plaquetar. El incremento de GMPc aumenta la conductancia al potasio por medio de los canales del calcio, inhibe el voltaje de éstos y se produce una hiperpolarización de la membrana del miocito con inhibición de contracción resultando en relajación⁽¹⁶⁹⁾. Por esta acción se le considera el neurotransmisor no adrenérgico-no colinérgico de la relajación de la musculatura lisa que describiremos más adelante. Esta acción es inhibida por la oxihemoglobina al unirse con gran avidéz con el óxido nítrico⁽¹⁷⁰⁾.

También en el cerebelo se ha demostrado que el NO media acciones como es la estimulación del GMPc por

el glutamato. El glutamato es uno de los más importantes neurotransmisores del SNC y actúa a través de varios subtipos de receptores; unos abren los canales iónicos, otros estimulan el ciclo del fosfolípico inositol y otros participan en la formación de GMPc. Mediante diversos experimentos se ha comprobado que el L-NAME bloquea el aumento de GMPc que depende del glutamato, efecto revertido al añadir L-Arginina (L-Arg). Estos resultados demuestran el papel intermediario del NO⁽¹⁵⁶⁾ en la neurotransmisión del glutamato.

Otra papel fisiológico conocido es la facilitación de un grupo ADP-ribosa a una molécula receptora estimulando la ADP-ribosiltransferasa, como en la generación de ATP por la vía de la glucólisis por medio de inactivación de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasas.

A pesar de todos los conocimientos actuales, los diferentes papeles del NO a nivel celular que permiten mediar en tan variados fenómenos fisiológicos permanecen hoy en día poco comprendidos

3. PAPEL DEL NO EN LOS DIFERENTES SISTEMAS DEL ORGANISMO

3.1 ACCION DEL NO EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

El primer papel conocido del NO fue como vasodilatador al identificarlo como el EDRF^(151,152). Se sintetiza en las células endoteliales de los vasos por la eNOS constitutiva, de forma continua y en pequeñas cantidades contribuyendo al control local del flujo sanguíneo; se ha comprobado que mantiene un tono basal de relajación primordialmente arterial y en menor medida venoso^(155,169). El NO producido por las células endoteliales difunde al citosol de las células musculares lisas adyacentes donde se une a la guanilato-ciclasa y aumenta el GMPc con la consiguiente relajación y dilatación⁽¹⁷⁰⁾. El L-NAME (inhibidor de la NOS) es un potente vasoconstrictor cuando se infunde a animales, efecto que se anula si se añaden liberadores de NO como el nitroprusiato. El NO es considerado el nitrovasodilatador endógeno^(154,155). Se ha demostrado que el NO interviene en

ciertas patologías vasculares como la HTA. Las concentraciones de NO en la HTA tanto en modelos experimentales animales como en humanos enfermos están disminuídos. En modelos animales hipertensos se ha constatado una respuesta disminuída al NO asociado a niveles bajos de cGMP urinario⁽¹⁷¹⁾. Esta relajación dependiente del endotelio por medio de NO está atenuada en los diabéticos y en el paciente insuficiente renal^(155,172) por acúmulo de inhibidores endógenos de la NOS en sangre, que se produce al fallar su depuración.

En la aterosclerosis la liberación de NO por el endotelio está disminuída o la respuesta a éste, sin que se conozcan las razones. En esos vasos la respuesta a cualquier vasoconstrictor está aumentada⁽¹⁵⁵⁾. No se conoce bien el mecanismo; podría explicarse por los radicales libres liberados por los monocitos acumulados en el proceso aterosclerótico, como el $\bullet\text{O}_2^-$ que se une al NO disminuyendo su actividad. Otra posibilidad sugerida es la intervención de las LDL oxidadas que inhiben la relajación dependiente del NO. De cualquier forma la síntesis disminuída de NO favorece esta patología por diferentes mecanismos; el NO endógeno inhibe la liberación de renina

y la proliferación de los miocitos vasculares por mediación del GMPc⁽¹⁷²⁾.

Sin embargo el NO sintetizado en los vasos puede también provenir de la iNOS que se activa con citokinas como hemos visto en las células endoteliales y en las musculares lisas de los vasos^(154,155,158,170). De este modo, por la iNOS se genera una excesiva cantidad del vasodilatador NO que puede llevar a situaciones patológicas como ocurre en el shock séptico por estímulo de las endotoxinas bacterianas o en la hipotensión de pacientes cancerosos tratados con citokinas. El grado de hipotensión se ha visto directamente relacionado con la cantidad de NO producido. Esta vasodilatación es además resistente a vasoconstrictores y sin embargo se puede revertir y prevenir experimentalmente con los análogos inhibidores de la NOS⁽¹⁷³⁾.

También se ha estudiado la activación de esta iNOS vascular con producción de NO en la circulación hiperdinámica de la hipertensión portal⁽¹⁵⁴⁾. Un aumento en la producción de NO explicaría la vasodilatación esplácnica con bajas resistencias sistémicas y la falta de respuesta a vasoconstrictores existentes en esta

patología. Varios trabajos han confirmado que estas alteraciones hemodinámicas se atenúan al administrar inhibidores del NO en modelos animales^(174,175). Incluso estimulando con eritropoyetina la síntesis de hemoglobina, potente inactivador del NO, en ratas con hipertensión portal se consigue disminuir los cambios hiperdinámicos establecidos o prevenir completamente si se administra antes de provocar la hipertensión portal⁽¹⁷⁶⁾. El origen del exceso de NO es desconocido, pero una vía plausible sería el estímulo de la endotoxemia existente en el shunt portosistémico para la iNOS vascular. El grupo de Rodés⁽¹⁷⁷⁾ inhibiendo la iNOS con corticoides demuestra que se desarrolla igualmente la circulación hiperdinámica aunque se anule su actividad, pero se atenúa con L-NAME que inhibe ambas NOS. Proponen que la actividad aumentada de NO puede depender de la cNOS, a través de un mecanismo que potencie su receptor quizás por sustancias como VIP, CGRP o adenosina, que están aumentadas en la hipertensión portal. Sin embargo Tanoué et al⁽¹⁶⁸⁾ obtienen resultados diferentes: además de medir actividad enzimática miden la expresión de iNOS y cNOS por

medio del DNA y RNAm en el mismo modelo experimental que Rodés, a nivel concreto del esófago, donde se producen alteraciones vasculares en la hipertensión portal como las varices y circulación hiperdinámica. Constatan un aumento de ambas enzimas a nivel de los vasos submucosos principalmente⁽¹⁶⁸⁾. El RNAm de la cNOS se multiplica por 10 y el de la iNOS por 20 sobre los valores basales.

Por lo tanto a nivel vascular el NO es vasodilatador y tiene un importante papel fisiológico homeostático local cuando es generado por la cNOS y que se torna patológico cuando se produce en exceso por activación de la iNOS.

3.2. NO Y FUNCION PLAQUETAR

Las plaquetas también producen NO que inhibe la agregación y promueve su disgregación de forma sinérgica con la prostaciclina^(155,178). El citosol de las plaquetas posee una NOS, calcio-dependiente similar a la endotelial vascular, capaz de producir NO cuando éstas se activan al entrar en contacto con colágeno. Cuando se induce la agregación plaquetar con colágeno se produce un aumento concomitante de GMPc intraplaquetar, que se anula al

añadir L-NMMA. Este L-NMMA potencia la agregación plaquetar y promueve además la adhesión de plaquetas y de leucocitos al endotelio vascular⁽¹⁷⁹⁾. La acción del L-NMMA se debe a la inhibición del NO. Por lo tanto esta vía del NO podría constituir un mecanismo de retroalimentación negativo de las plaquetas, regulador de la agregación⁽¹⁵⁵⁾. Otros agentes pro-agregantes como el ADP o el ácido araquidónico, estimulan también la síntesis de NO por las plaquetas, para poner en marcha este mecanismo de control. El NO derivado de las células endoteliales participa de igual manera en el control de la agregación ayudando a mantener una superficie anti-trombogénica en la microvasculatura. Además del NO intraplaquetario y el liberado por el endotelio vascular, los neutrófilos también lo generan. Mc Call et al⁽¹⁸⁰⁾ han puesto en evidencia que los neutrófilos o polimorfonucleares (PMN) producen una sustancia que inhibe la agregación plaquetaria idéntica al NO, con sus mismas características. La NOS de los neutrófilos tiene el mismo perfil que la iNOS de los macrófagos. Probablemente la síntesis del NO por los PMN tenga otros fines biológicos diferentes de la función plaquetar como

el bactericida o la extravasación en la inflamación, todavía en estudio⁽¹⁸⁰⁾.

3.3. SISTEMA NERVIOSO

El hallazgo de unas células en el cerebro de la rata que se estimulan con N-Metil-D-Aspartato y capaces de liberar una sustancia similar al NO junto con la detección de NOS constitutiva en el SNC demostró la existencia de una vía del óxido nítrico a nivel cerebral. En 1989 Bredt y Snyder⁽¹⁵⁸⁾ probaron el papel intermediario del NO entre el estímulo por parte del glutamato y el efecto de aumento de GMPc, como segundo mensajero. Este mediador parece tener un papel en la formación de la memoria y aprendizaje. Cuando se inhibe in-vitro dificulta el comportamiento de aprendizaje. Por otro lado su excesiva liberación se relaciona con convulsiones y neurotoxicidad^(154,155). Se ha sugerido además que esta vía del NO podría mediar los efectos biológicos de otros neurotransmisores cuyas acciones se asocian a un aumento del GMPc. También se ha identificado en el Sistema Nervioso Periférico, donde parece contribuir en la transmisión sensitiva.

Se ha propuesto el NO como neurotransmisor de las fibras nerviosas autónomas no adrenérgicas-no colinérgicas que inervan la musculatura lisa de las vísceras pélvicas, las vías aéreas y del tracto gastrointestinal. Es responsable de la relajación de los cuerpos cavernosos y por lo tanto de la erección peneana. También actúa a nivel vesical y se ha evidenciado en trabajos experimentales que su inhibición induce hiperactividad muscular con disminución de la capacidad vesical⁽¹⁵⁵⁾. Desde hace años se intenta identificar el sistema neurotransmisor inhibitor responsable de la regulación de la motilidad intestinal. Se han propuesto sustancias como el ATP o el VIP pero sin conseguir demostrar realmente tal papel. Sin embargo varios trabajos indican que el NO cumple los criterios necesarios que definen a un neurotransmisor. Estos criterios son; al estimular eléctricamente estos nervios se libera una sustancia con propiedades similares al NO, el otro criterio es que la aplicación exógena de NO en la musculatura intestinal tiene efectos superponibles a los de la sustancia liberada fisiológicamente por estos nervios del esfínter esofágico inferior, estómago, intestino delgado y del

esfínter anal interno de muchos animales, evocando una relajación. Esta relajación del músculo liso producida por el NO está mediada por GMPc como en la relajación de la musculatura lisa vascular. De hecho se ha demostrado que la relajación del esfínter esofágico inferior y de la taenia coli tras estímulo de los nervios no A- no C está asociada a un aumento del GMPc y descenso del calcio citosólico⁽¹⁷⁰⁾. Queda por aclarar todavía si el NO es el transmisor entre estos nervios y el músculo efector o un modulador del transmisor que realice esta acción⁽¹⁵⁴⁾.

3.4. EL NO EN LA INMUNIDAD: CITOTOXICIDAD

Se ha conseguido demostrar la producción de óxido nítrico a partir de L-Arg en cultivos celulares de macrófagos activados⁽¹⁸¹⁾. Cuando se añaden inhibidores de la NOS, los macrófagos citotóxicos activados (CAM) dejan de sintetizar NO y de ser citotóxicos para las células diana. En efecto, Hibbs et al⁽¹⁸¹⁾ demostraron que el NO exógeno aplicado a células de hepatoma desencadena los mismos efectos tóxicos que producen los macrófagos activados, con lo cual

deducen que el NO debe ser el efector molecular de la citotoxicidad de los macrófagos. El NO al igual que los CAM alteran ciertos mecanismos celulares como la respiración mitocondrial, inhiben la aconitasa del ciclo del ácido cítrico y la síntesis de ADN. Todos estos enzimas afectados tienen en común un grupo de hierro no heme unido a átomos de azufre, activos catalíticamente. Los macrófagos inhiben estos enzimas produciendo simultáneamente un descenso del hierro intracelular. La toxicidad del NO a este mismo nivel se explicaría por su unión a estos grupos Fe-S generando complejos Fe-nitrosilados, disminuyendo el hierro intracelular e inactivando las enzimas⁽¹⁸¹⁾. Se ha visto que el NO es citotóxico para ciertas células y citostático para otras; posiblemente esta variabilidad dependa de la importancia de estas enzimas-diana en el seno de cada célula. No se descarta que otras acciones del NO intervengan en la citotoxicidad de los macrófagos, estimulando la producción de GMPc que participa en la regulación de funciones como la fagocitosis, la motilidad o la respuesta a linfoquinas^(154,181).

Los macrófagos se activan principalmente por citokinas producidas por los linfocitos al reconocer antígenos específicos de bacterias u otros patógenos. Los lipopolisacáridos de las paredes bacterianas son también capaces de inducir la activación de la iNOS en los macrófagos con aumento del NO en pocas horas. Estos macrófagos desarrollan una citotoxicidad inespecífica frente a microorganismos invasores. In-vitro se ha demostrado que tienen efectos citostáticos contra *Cryptococcus neoformans* o *Toxoplasma gondii*, efecto que desaparece con inhibidores de la NOS. Igualmente se ha demostrado tóxico para la leishmania, el *Schistosoma* o la *Mycobacterium tuberculosis*. Parece pues un mecanismo primario inespecífico frente a diferentes microorganismos intracelulares y patógenos demasiado grandes para ser fagocitados⁽¹⁵⁴⁾. Se ha propuesto que el NO produce, al interferir con los sistemas respiratorios y la síntesis de DNA comentados, la muerte o la inhibición del crecimiento de muchos patógenos e incluso bloquea la replicación viral^(155,181).

Además de ser tóxico para microorganismos invasores, el NO inhibe la respuesta a mitógenos y

crecimiento tumoral de varias extirpes y especies⁽¹⁵⁴⁾. Esto supone que el NO también intervenga en la citotoxicidad de los macrófagos contra células cancerígenas y formaría parte del control de la proliferación celular.

Sin embargo la producción de NO ante una estimulación inmunológica no es exclusiva del sistema retículo-endotelial; se ha demostrado que los LPS, interleukinas e interferón γ son capaces de activar la iNOS en los neutrófilos, células de Kupffer y hepatocitos, endotelio vascular, incluso linfocitos T y otras líneas celulares como en el adenocarcinoma de mama de rata o los fibroblastos⁽¹⁵⁴⁾. En este sentido tanto las células endoteliales vasculares como los macrófagos participarían en la inmunidad inespecífica produciendo NO a nivel de órganos como los pulmones y el hígado, cruciales en la defensa contra patógenos invasores del organismo por contener una red vascular muy amplia que sirve de filtro del torrente circulatorio. El NO supondría un mecanismo de defensa general por la cantidad de células diferentes que lo producen, su ubicuidad y por las diferentes y múltiples células diana. Sin embargo no se conoce exactamente el mecanismo citotóxico

del NO en todas estas células y probablemente tenga también otras consecuencias biológicas. Así no se conoce muy bien el papel del NO sintetizado por los neutrófilos. Se ha visto que inhibe la agregación plaquetar⁽¹⁸⁰⁾ y la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular regulando su extravasación⁽¹⁷⁶⁾, inhibe la liberación de lisosomas enzimáticas que median el daño tisular pero por otro lado, si se inhibe la síntesis de NO se bloquea la quimotaxis de los neutrófilos⁽¹⁵⁴⁾.

Los macrófagos, neutrófilos y células endoteliales estimulados, además de liberar NO también producen especies reactivas como el H₂O₂ (peróxido de hidrógeno), •O₂⁻ (anión superóxido). Paceli et al⁽¹⁸²⁾ demostraron que estas sustancias son liberadas conjuntamente para potenciar su capacidad tóxica; de hecho se multiplica por 10000 respecto a la de cada sustancia por separado. Principalmente se potencian al unirse NO con H₂O₂ en el medio extracelular. Producen daño a nivel del DNA bicatenario del genoma. Para explicar el mecanismo de interacción ponen en evidencia que los quelantes del hierro (entre otros metales de transición)

anulan esta potenciación entre NO y H₂O₂. Sugieren que el Fe³⁺ interviene en la reacción por su capacidad redox: el NO liberaría el hierro de los grupos sulfurados enzimáticos gracias a su alta afinidad y éste reduciría el H₂O₂ generando el radical •OH que es mucho más tóxico que ambos precursores. Los quelantes del hierro, al unirse con el hierro que es el catalizador, evitarían esta reacción⁽¹⁸²⁾. El NO también reacciona con el •O₂⁻ generando peroxinitritos (ONOO⁻) que puede desdoblarse en •OH y •NO₂⁻. No se sabe si con estas reacciones se produce mayor toxicidad in-vivo y la citotoxicidad atribuida al NO podría depender sobre todo de estos peroxinitritos, muy reactivos, con alto poder oxidante y capacidad para desencadenar la peroxidación. Además de participar en la defensa contra los microorganismos invasores, pueden ser perjudiciales para las células del huésped cuando hay sobreproducción o producción descontrolada de peroxinitritos. De hecho el daño celular desencadenado en las situaciones patológicas como las reacciones inmunológicas inflamatorias crónicas podrían depender en parte de la

liberación desmedida de NO y otros radicales y sus interacciones.

3.5. ACCIONES EN EL TUBO DIGESTIVO

Numerosos grupos de investigadores estudian los diferentes papeles que desempeña el NO a lo largo del aparato digestivo como pueden ser el control en la regulación del flujo sanguíneo mucoso, aspectos de la citoprotección o su participación en la motilidad. En su vertiente citotóxica también interviene en lesiones inflamatorias del intestino. Las funciones del NO son diversas e incluso varían según el nivel del tubo digestivo.

3.5.1. OXIDO NITRICO Y MOTILIDAD INTESTINAL

3.5.1.A. ESOFAGO

En el funcionamiento de la motilidad esofágica existe un período de latencia entre el inicio de una deglución y la contracción del músculo liso

circular, con un aumento progresivo de la duración de esta latencia en dirección orocaudal. Este gradiente de latencias genera el peristaltismo y la progresión del alimento. Precocemente en este tiempo de latencia son liberados neurotransmisores por neuronas intramurales no adrenérgicos-no colinérgicos que producen la inhibición del músculo liso por medio de una hiperpolarización y consecuente relajación. De una forma global se ha constatado que el estímulo de los nervios no colinérgicos-no adrenérgicos en el esófago producen relajación del esfínter inferior y contracción del músculo circular liso; esta contracción se produce cuando el estímulo nervioso ha finalizado, por lo que se denomina “respuesta off”^(170,183). Se ha propuesto, entre otros, el NO como el agente de esta vía no adrenérgica-no colinérgica inhibidora.

Yamato Et al.⁽¹⁸⁴⁾ han estudiado el papel del NO en el peristaltismo esofágico del oposum o zarigüeya. Observan que bloqueando el NO con L-NAME se reducen estos períodos de latencia, las contracciones ocurren simultáneamente y se pierde la efectividad del peristaltismo primario. Este gradiente se restaura al añadir

L-arginina a los mismos conejos. Por otro lado, estimulando eléctricamente el nervio vago se desencadena la liberación de neurotransmisores en los plexos mientéricos y la producción de contracciones mecánicas; se provocan contracciones “A” precoces durante el estímulo y contracciones “B” que aparecen tras cesar el estímulo (equivalen a la respuesta “off” in-vitro). Eléctricamente a nivel del miocito se produce una hiperpolarización inicial con una despolarización intraestímulo (on) que corresponde a la onda A y otra despolarización tras finalizar el estímulo (off) que corresponde a la B.. Al añadir L-NAME desaparecen las ondas B post-estímulo y resulta en un aumento de las ondas A y una atenuación de las latencias; eléctricamente se atenúa la hiperpolarización inicial que llega a desaparecer junto con la despolarización “off” y se potencia o desenmascara la despolarización intraestímulo “on”. La atropina abole por completo esta despolarización “on”. Esta latencia en las ondas peristálticas parece ser una función de la neurotransmisión inhibitoria y L-NAME actúa precisamente eliminando esa acción neurotransmisora inhibitoria. Por lo tanto el NO endógeno o una sustancia

relacionada es la que media la latencia y el gradiente de latencias responsables del peristaltismo. Sería el efector de las contracciones “off” in-vitro / B in-vivo. Para estos autores los bloqueadores del NO, L-NAME y de la acetilcolina, la atropina, reducen la amplitud de las contracciones peristálticas pero no las abolen completamente. Ese componente resistente a la atropina sería otro neurotransmisor y se han propuesto el VIP y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) entre otros ⁽¹⁸¹⁾ ya que se han colocalizado juntos en las mismas neuronas de los plexos mientéricos. Sin embargo, Anand y Paterson⁽¹⁸⁵⁾ que con dosis bajas de inhibidores obtienen los mismos resultados que Yamato sobre el gradiente de latencias, al utilizar dosis suficientes de ambos inhibidores simultáneamente desaparecen por completo las contracciones del peristaltismo primario. Por lo tanto las contracciones de la deglución podrían estar mediadas por una vía colinérgica y otra nitrérgica y desaparece la necesidad de un tercer neurotransmisor para explicar el funcionamiento peristáltico primario. Se ponen en evidencia con estos resultados dos vías neurales; una vía dependiente del NO que produce una

hiperpolarización inicial y que traduce la inhibición del músculo en la latencia y una despolarización responsable de la onda de contracción tras finalizar el estímulo; y otra vía colinérgica responsable de la despolarización durante el estímulo⁽¹⁸⁵⁾.

Se ha demostrado también en el humano que la inhibición de la NOS bloquea la acción de los nervios noA-noC en el esófago como en las otras especies. Preiksaitis et al observan que muestras de esfínter esofágico inferior responden con una relajación al estímulo eléctrico y a la administración de NO con nitroprusiato⁽¹⁸⁶⁾. El L-NNA inhibe esta relajación y en su lugar aparece una pequeña contracción. En el cuerpo esofágico humano se produce la misma actividad mecánica con el estímulo eléctrico que hemos visto en la zarigüeya por Anand⁽¹⁸²⁵⁾ y Yamato⁽¹⁸⁴⁾. Este estudio corrobora que el NO es un mediador importante de los efectos neuronales noA-noC en el esófago humano aunque podrían existir otros mediadores como el VIP que contribuyan a la inhibición noA-noC. En el oposum el VIP es capaz de producir una relajación del esfínter esofágico inferior independientemente del NO⁽¹⁸⁴⁾. A pesar de estos estudios la relación

entre nervios excitadores e inhibidores para producir la actividad peristáltica es todavía controvertida y puede variar según especies.

Murray et al⁽¹⁸⁷⁾ demuestran hechos similares a nivel clínico. Administran a humanos hemoglobina recombinante, potente eliminador de NO, que difunde a todos los tejidos, y estudian por medio de manometría esofágica las consecuencias a nivel de la función neuromuscular. Al anular el NO se observa una disminución de la amplitud de la relajación del esfínter esofágico desencadenada con la deglución y produce además una disrupción en el peristaltismo con aumento de la duración y amplitud de las contracciones tras la deglución. Estos cambios se producen en todo el esófago tanto proximal (musculatura estriada) como distal (lisa)⁽¹⁸⁷⁾. Los resultados del trabajo de Murray sugieren una posible relación entre las alteraciones de la motilidad esofágica y defectos de la regulación del NO sobre el sistema neuromuscular como en los espasmos esofágicos dolorosos o en la acalasia. Así lo confirman Konturek et al⁽¹⁸⁸⁾ en pacientes con espasmo esofágico difuso doloroso diagnosticado por manometría. Les realizan

mediciones manométricas con degluciones basales y tras administración de gliceriltrinitrato (GTN) utilizado como liberador de NO. Comprueban que las contracciones simultáneas prolongadas que se observan en todo el cuerpo esofágico con los espasmos dejan de ser simultáneas tras la medicación con GTN para recuperar la progresión fisiológica y propagarse en dirección distal con restitución del tiempo de latencia. Con dosis altas disminuye la duración de las contracciones y aumenta el tiempo de latencia. Clínicamente tras el GTN se alivian los síntomas dolorosos. Este restablecimiento del peristaltismo hasta la casi normalidad con NO exógeno cuando está alterada la sincronización de la motilidad, sugiere que en estos pacientes con espasmos esofágicos pudiera existir un defecto de NO endógeno. También se ha sugerido un papel fisiopatogénico del NO en el reflujo gastroesofágico que explicaría la alteración en el funcionamiento y relajación del esfínter esofágico inferior por un aumento del NO o una sensibilidad aumentada a éste⁽¹⁸⁸⁾.

3.5.1.B. ESTOMAGO

A nivel del estómago el NO también tiene un papel regulador de la motilidad; al entrar comida en el estómago se produce una dilatación con aumento de su capacidad. Este reflejo de dilatación está mediado por neuronas noAñoC⁽¹⁸⁹⁾.

Plourde et al⁽¹⁹⁰⁾ estudiaron el papel del NO en el vaciamiento gástrico utilizando inhibidores de la NOS como el L-NNA y evidenciaron que bloqueando el NO se producía un retraso dosis dependiente en el vaciamiento. Este descenso de NO producía un aumento del tono basal y de las contracciones pilóricas lo que sugiere una intervención en la modulación fisiológica del tránsito gástrico⁽¹⁹⁰⁾.

3.5.1.C. INTESTINO

A lo largo de todo el intestino, los nervios inhibidores no adrenérgicos-no colinérgicos producen una respuesta de hiperpolarización en el músculo liso llamada IJP (inhibitory junction potential)⁽¹⁸³⁾. En muchos músculos tras la finalización del estímulo noAñoC se produce una respuesta excitadora post-estímulo. En las regiones no esfíntéricas las neuronas inhibitoras

noA-noC están activas continuamente manteniendo una inhibición persistente de la actividad contráctil. Sin embargo en los esfínteres estas neuronas están inactivas y se activan para permitir la relajación y la apertura del esfínter y el paso del contenido luminal durante un tiempo apropiado. Ward et al.⁽¹⁹¹⁾ estudian el posible papel del NO en la actividad inhibidora noA-noC en el colon proximal del perro. Limitan sus experimentos a nivel del comportamiento eléctrico. Para ello estimulan los nervios intramurales del borde submucoso de la capa muscular circular en presencia de diferentes sustancias para bloquear la actividad adrenérgica y colinérgica, con lo que se produce una reducción de la duración y amplitud de las ondas lentas del colon, una pequeña hiperpolarización y una excitación rebote. Con la aplicación de NO exógeno se consiguen efectos similares a la estimulación de nervios noA-noC descritos. Al añadir L-NAME se inhiben las IJP (o hiperpolarizaciones) inducidas por estímulos eléctricos y disminuyen las excitaciones rebote, efectos que se revierten con NO exógeno. La oxihemoglobina, potente eliminador irreversible del NO, consigue bloquear

completamente la fase de inhibición o hiperpolarización y la excitación rebote tanto a la estimulación nerviosa como al NO exógeno. Demuestran en el colon, como Mark y Szurzewski⁽¹⁹²⁾ un año antes en el intestino delgado del perro, el papel mediador del NO, o de una sustancia derivada, en la actividad inhibidora de los nervios entéricos noA-noC responsable de la relajación del músculo liso, evidenciando su traducción eléctrica. Como Anand et al.⁽⁸²⁾ en estudios a nivel del esófago estos investigadores se plantean la naturaleza del mediador de la fase excitadora rebote post-estímulo cuya liberación podría depender del NO.

Burleigh⁽¹⁹³⁾ ha realizado el mismo estudio con muestras de colon sigmoide y esfínter anal interno humanas, ambos tejidos responden con una relajación muscular seguida de una contracción a los estímulos eléctricos que se reducen al añadir L-NNA y se reproducen con nitroprusiato. Sin embargo existen otros trabajos que demuestran también que el VIP causa relajación del músculo liso y que está presente en los nervios noA-noC del tracto digestivo. Ambas sustancias podrían participar en la neurotransmisión inhibidora noA-

noC⁽¹⁹³⁾. Estos resultados conducen a su aplicación al campo de la patología humana, y al planteamiento de la posible intervención del NO en enfermedades relacionadas con disfunción de la motilidad intestinal como veíamos en el esófago. Se ha descrito un déficit de NOS en el músculo circular pilórico de niños con estenosis pilórica y en la unión gastroesofágica de pacientes con acalasia así como en la región agangliónica de los enfermos de Hirschprung que podría afectar a la modulación de la relajación de los diferentes esfínteres. La falta de relajación del segmento agangliónico en esta última enfermedad junto con la abolición del reflejo inhibitorio rectoanal ha sido relacionado también con una reducción local de la inervación VIPérgica⁽¹⁹⁴⁾. Cortesini⁽¹⁹⁵⁾ ha medido por métodos inmunohistoquímicos la densidad de neuronas entéricas con VIP y las de NO en los plexos mientérico y submucoso del colon de pacientes con estreñimiento crónico idiópico. Encuentran una menor cantidad de neuronas con la proteína VIP y un marcado aumento de neuronas positivas para NOS en ambos plexos respecto a los controles sanos. Las fibras y neuronas son de apariencia normal lo

que descarta una posible neuropatía degenerativa. Este exceso de NO podría llevar a una inhibición de las contracciones migratorias propagadoras que causan el estreñimiento⁽¹⁹⁵⁾.

3.5.1.D. TRACTO HEPATOBILIAR

La vía no adrenérgica-no colinérgica (noA-noC) moduladora de la motilidad en el tubo digestivo ha sido también analizada a nivel hepatobiliar. En la vesícula biliar el principal estímulo fisiológico de la contracción es la colecistokinina, antagonizada por el GMPc. En el mismo sentido los nervios noA-noC que la inervan al ser estimulados producen una relajación. Mourelle et al^(196,197) en varios trabajos diseñan experimentos para definir esta vía a nivel de vesícula biliar y esfínter de Oddi en cobayas y conejos. Estos investigadores miden la presión en el interior de la vesícula biliar de cerdos y la respuesta al estímulo constrictor con CKK modulando el NO⁽¹⁹⁶⁾. Al inhibir el NO (con L-NAME, L-NNA y L-NMMA) se produce un aumento de la presión basal y se potencia la intensidad y duración de la contracción en respuesta a la colecistokinina. Estos efectos se revierten con el sustrato

L-Arginina. Sin embargo al añadir nitroprusiato como liberador de NO se reduce marcadamente la respuesta de la vesícula a CCK⁽¹⁹⁶⁾. Con la misma secuencia de experimentos realizan las medidas manométricas en el colédoco de cerdos y conejos a nivel del esfínter de Oddi. El pretratamiento con inhibidores de NO produce un aumento de la presión del esfínter y de las contracciones, y potencia la respuesta a la CCK. El nitroprusiato por el contrario reduce la presión basal y antagoniza la respuesta a la CCK. Si se bloquea toda conducción nerviosa con tetrodotoxina aumentan las presiones. Existe pues una vía nerviosa inhibidora que modula la actividad del esfínter de Oddi y la motilidad vesicular. Demuestran en ambos trabajos la existencia de una vía enzimática local de NO evidenciando la actividad enzimática NOS constitutiva en homogeneizados de tejido normal de vesícula biliar y del esfínter de Oddi. Sin embargo no se detecta actividad de NOS inducible en condiciones normales y sí a altas concentraciones tras incubación con endotoxina. Todos estos resultados sugieren que el NO liberado por neuronas mientéricas es el mediador de la vía inhibidora noA-noC, y desempeña un papel en la regulación de

la contractilidad favoreciendo la relajación por medio de NOS constitutiva continuamente activa. La capacidad de activar una NOS inducible con endotoxinas explicaría la dilatación presente en procesos infecciosos. Este sistema presente en el tracto hepatobiliar podría formar parte de un mecanismo más generalizado del tracto digestivo con mismas características vistos a otros niveles mediador de la relajación muscular lisa. Otros autores como Thune et al⁽¹⁹⁸⁾ con un modelo experimental diferente en gatos no encuentran influencia del NO en la actividad tónica del músculo de la vesícula biliar ni de la secreción biliar. Para ellos parece pues no existir una inervación tónica nitrérgica, aunque demuestran por inmunohistoquímica actividad NADPH-diaforasa en las neuronas del plexo mientérico que inerva la vesícula y el esfínter de Oddi evidenciando síntesis neural del NO. El NO podría ser un neuromodulador de la transmisión colinérgica y/o peptidérgica⁽¹⁹⁸⁾.

3.5.2. OXIDO NITRICO Y MICROCIRCULACION

Uno de los primeros fenómenos que acontecen en la lesión mucosa son vasculares, como la congestión y el aumento de permeabilidad capilar. El aumento del flujo sanguíneo, como hemos visto se produce en la exposición de la mucosa al ácido⁽⁸⁴⁾ y está involucrado en la protección o resistencia de la mucosa frente a factores lesivos^(100,101). Es de extremo interés conocer los mecanismos o vías que regulan este flujo mucoso.

3.5.2.A. FLUJO VASCULAR MUCOSO GÁSTRICO Y NO

La integridad de la mucosa gástrica depende del estado de la microcirculación. Este flujo mucoso está modulado en respuesta a diferentes estímulos para asegurar las funciones fisiológicas de la mucosa frente a factores agresivos⁽⁶³⁾, como un mecanismo de defensa que ya hemos descrito (cf. pag. 16). Se ha comprobado que uno de los estímulos que regulan esta microcirculación es la secreción ácida del estómago; cuando se aumenta el ácido gástrico con infusión de pentagastrina se produce simultáneamente un incremento del flujo mucoso⁽¹⁹⁹⁾. Como mediadores de

esta hiperemia se han implicado sustancias vasoactivas como la adenosina, prostaglandinas e histamina. Sin embargo se demostró con ratas que bloqueando previamente las prostaglandinas con indometacina se producía el mismo aumento del flujo mucoso al estimular la secreción gástrica y similares resultados se obtuvieron bloqueando la acción de la adenosina con antagonistas sin efecto sobre la hiperemia⁽¹⁹⁹⁾. Piqué et al⁽²⁰⁰⁾ en experimentos con ratas estudiaron la hipótesis de que el NO fuera el mediador de este fenómeno. Al tratar las ratas con L-NMMA se anulaba el aumento del flujo mucoso asociado al estímulo de la secreción ácida. No detectan ningún cambio sobre la cantidad de ácido producida con y sin inhibidor del NO. Por lo tanto aunque el NO parece no influir en la regulación de la secreción ácida, podría ser el mediador de la respuesta vasodilatadora que acompaña a la secreción ácida. Sin embargo con altas dosis de L-NMMA se provocaba una disminución del flujo vascular basal por vasoconstricción y disminuía la secreción ácida inducida; esto puede responder a la necesidad de una perfusión sanguínea correcta para el buen funcionamiento de las células

parietales y su secreción de ácido⁽¹⁹⁹⁾. El NO actúa como vasodilatador en el lecho gástrico y una alteración de su metabolismo puede contribuir a la lesión y ulceración⁽²⁰⁰⁾.

Un grupo de investigadores en Japón probaron que un mecanismo lesivo de la agresión por alcohol, que origina en humanos una gastritis hemorrágica, es la vasoconstricción que éste produce localmente, probablemente a través de liberación de endotelinas vasoconstrictoras⁽²⁰¹⁾. Estos mismos investigadores estudiaron el papel vasodilatador del NO en estas lesiones como regulador del tono local vascular. Observan que la disminución del flujo vascular mucoso y de la saturación local de oxígeno y el desarrollo de lesión con el etanol empeora de forma drástica al añadir el inhibidor de NO (L-NNA)⁽²⁰¹⁾. Comprueban que el L-NNA administrado aisladamente sin etanol no produce lesión alguna. Por todo ello se deduce que al anular el NO endógeno la mucosa gástrica se hace más sensible a la agresión por etanol, a través de cambios producidos en la microcirculación, resultando en hipoxia tisular. El NO por su acción vasodilatadora podría contrarrestar los efectos constrictores de la endotelina-1,

modulando la lesión producida por el etanol y disminuyéndola⁽²⁰¹⁾.

Pero el NO no es la única sustancia reguladora del flujo vascular gástrico en las agresiones; actúa en conjunción con otras sustancias vasoactivas. Whittle y Moncada⁽²⁰²⁾ comprueban en ratas que el mayor daño a la mucosa con una sola dosis de ácido intragástrico se produce al bloquear previamente y de forma simultánea la síntesis de NO con L-NNA, la de prostaciclina con indometacina y depleccionando los nervios sensitivos de sus neuropéptidos (sustancia P y la proteína relacionada con el gen de la calcitonina o CGRP) con capsaicina. Sin embargo administradas cada sustancia inhibidora por separado junto con el ácido producen cambios mínimos. Sugieren que las tres sustancias están implicadas en la protección de la integridad de la mucosa frente a las agresiones, modulando la microcirculación, ya que cuando se anulan aumenta la vulnerabilidad ante el etanol y se producen lesiones necróticas y hemorrágicas⁽²⁰²⁾. En experimentos complementarios se ratifica que realmente las sustancias liberadas por las neuronas sensibles a la capsaicina (llamadas fibras C) disminuyen las

lesiones producidas por el alcohol puro, efecto protector que desaparece al añadir L-NNA y se restablece con L-Arginina de forma dosis-dependiente⁽²⁰³⁾.

Por lo tanto el NO está implicado en la gastroprotección desarrollada por los neuropéptidos vasoactivos que liberan los nervios aferentes sensitivos próximos a los capilares gástricos. Una hipótesis es que estos neuropéptidos actúen promoviendo la liberación del NO por las células endoteliales o por las terminaciones nerviosas no adrenérgicas-no colinérgicas^(203,204). O como concluye Konturek⁽²⁰⁵⁾ “el aumento del flujo que acompaña la acción gastroprotectora de la capsaicina ha sido atribuido a la actividad biológica del NO que parece interactuar con los prostanoïdes de la mucosa influyendo tanto en el flujo vascular mucoso como en la integridad tisular.”

El NO ha sido implicado en el mecanismo de “adaptación citoprotectora” de la mucosa a diversos irritantes, como mediador de la hiperemia que se produce. Sin embargo esta hiperemia asociada no parece imprescindible en el desarrollo de tal adaptación de la mucosa gástrica^(89,90) ni de la duodenal^(98,99).

Además de la resistencia a la agresión, un flujo vascular suficiente es necesario en la cicatrización de las úlceras para asegurar la proliferación de las células de la mucosa y de los vasos. Konturek⁽²⁰⁶⁾ estudió el papel del NO como regulador del flujo y demostró que si se bloquea la síntesis del NO con L-NNA o L-NMMA se produce una disminución del flujo vascular en torno a las úlceras crónicas que producía en ratas. El bloqueo del NO resultaba además en una disminución de los capilares en el tejido de granulación y en un retraso en la cicatrización. Parece estar involucrado, como parte de su papel vasodilatador en el proceso de cicatrización de las úlceras aumentando la perfusión y favoreciendo la neoangiogénesis. Esta propiedad de acelerar la cicatrización de las úlceras tiene su aplicación práctica como sugieren Elliott et al⁽²⁰⁷⁾ al demostrar que un AINE liberador de NO como es el nitrofenac, permite una cicatrización de la úlcera gástrica a pesar de inhibir la ciclooxigenasa como el diclofenac, incluso más rápidamente que con el análogo de la prostaglandina PGE2 misoprostol. Los liberadores de NO serían un adyuvante interesante en pacientes que requieren AINES y sin

embargo desarrollan úlceras o gastropatía por AINEs.

3.5.2.B. FLUJO SANGUINEO Y NO EN EL ESOFAGO

El mismo fenómeno descrito en la mucosa gástrica se observa en la esofágica. Sandler et al⁽⁸⁴⁾ demuestran en perros cómo el flujo de la microcirculación aumenta en la mucosa del esófago distal al aplicar ácido clorhídrico repetidamente o capsaicina, estimulador de nervios sensitivos que contienen neuropéptidos. Utilizando diferentes sustancias vasoactivas observan que el aumento del flujo tras el ácido se anula si se tratan previamente con inhibidores de la síntesis de NO (L-NAME), y el aumento del flujo producido por la capsaicina se bloquea con suero anti-sustancia P. La bradikinina, un mediador de la inflamación, también produce un aumento en el flujo de menor duración, efecto que se bloquea igualmente con L-NAME. Sugieren con estos resultados que existen al menos dos mecanismos diferentes responsables del aumento del flujo sanguíneo mucoso frente a las agresiones; uno neurógeno, mediado por la sustancia P independiente de la

inervación extrínseca vagal pues no desaparece al realizarles a los animales una vagotomía troncular y además es resistente a la atropina. Esto implicaría una vía neurógena intramural no colinérgica, y otro mecanismo en principio paracrino, sin relación tampoco con la innervación extrínseca, mediada por el NO. El NO tendría un papel protector para la mucosa esofágica frente a la agresión ácida incrementando el flujo sanguíneo⁽⁸³⁾ y potenciando la resistencia mucosa por la adaptación⁽¹⁰¹⁾, hecho no demostrado en el estómago.

3.5.3. NO E INFLAMACION EN EL APARATO DIGESTIVO

3.5.3.A. LESION Y TRACTO DIGESTIVO

Se ha constatado que tanto en modelos experimentales⁽²⁰⁸⁾ de enfermedad inflamatoria intestinal como en enfermos humanos⁽²⁰⁹⁾ existe un aumento de nitritos en la luz intestinal, metabolito que indica producción de NO⁽²¹⁰⁾. En la biopsia de pacientes con esta patología se ha objetivado un aumento de la actividad de la NOS⁽²¹¹⁾. En muchas condiciones patológicas que

conllevan inflamación aguda como en la sepsis o la isquemia con reperfusión se genera NO por las células proinflamatorias como macrófagos y neutrófilos. No se sabe con precisión si este aumento de NO en la inflamación tiene efectos beneficiosos o deletéreos, probablemente ambos.

Ratas transgénicas de laboratorio que expresan el alelo HLA B27 desarrollan espontáneamente una ileocolitis muy similar a la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) humana⁽²¹²⁾. En estos intestinos se objetiva un aumento del metabolismo de NO asociado a un aumento de permeabilidad de la mucosa. En macacos con colitis crónica espontánea con rasgos parecidos a la EII, Miller y Clark demuestran además de este aumento de NO, que la actividad de NOS se localiza en el plexo mientérico y en zonas que histológicamente en macacos normales no aparece; epitelio superficial, mucosa y criptas con formación de abscesos. Demuestran por primera vez midiendo el RNAm que la expresión de la iNOS en el colon enfermo está muy incrementada y llega a representar el 58% de la NOS total, mientras que no se detecta en el colon de los animales sanos⁽²¹³⁾.

Otros trabajos demuestran que realmente el exceso de NO está involucrado en la patogenia y que no es meramente un epifenómeno ya que al inhibir su síntesis constatan una mejoría⁽²¹⁴⁾. En la colitis ulcerosa experimental, producida eliminando el antioxidante GSH de la pared del colon con iodoacetamida, se confirma que el L-NAME y la aminoguanidina que inhibe selectivamente la iNOS, disminuyen el daño producido⁽²¹⁵⁾. Este efecto protector es mucho más marcado que el conseguido con inhibidores de la lipooxigenasa o con antagonistas de los PAF (factor activador de las plaquetas); posiblemente esto refleje un mayor protagonismo del NO en el proceso inflamatorio que los leucotrienos o el PAF. Miller et al⁽²¹⁶⁾ demuestran rotundamente por medios complementarios que este exceso de NO se corresponde con un aumento de expresión genética de iNOS que localizan por inmunohistoquímica principalmente en el epitelio, más intensamente cuanto más superficial. Sorprendentemente detectan aumento de iNOS en los plexos mientérico y submucoso, que no se detecta en los casos-control, hecho inesperado pues normalmente sólo contienen cNOS.

Además detectan con idéntica distribución la nitrotirosina que utilizan como metabolito marcador de los peroxinitritos, ya que éstos no se pueden medir por ser muy inestables con una vida media de 1 segundo a 37°C y pH 7,4. Esta nitrotirosina no se detecta en los cobaya-control ni cuando se bloquea la iNOS con aminoguanidina. La colocalización de iNOS y nitrotirosina en la lesión inflamatoria refleja que los peroxinitritos se forman en relación a la síntesis de NO y parecen implicados en el daño tisular de la ileítis experimental⁽²¹⁶⁾ y del mismo modo en el colon de pacientes con EII⁽²¹⁷⁾.

Por otro lado se ha demostrado que una administración única de peroxinitritos en el colon es capaz de inducir una inflamación aguda con cambios histopatológicos muy parecidos a los de la EII, pero sin granulomas⁽²¹⁸⁾. Los peroxinitritos derivados del NO y O₂⁻, que son producidos por las células inflamatorias (macrófagos y neutrófilos), tienen una mayor capacidad citotóxica que los precursores por sí solos^(182,218). Estos peroxinitritos inician la peroxidación lipídica y la oxidación de grupos sulfhidrilo. Así el NO en exceso producido por el aumento de iNOS favorece las reacciones oxidativas

frente a agentes agresores pero también en las células del huésped, potenciando el daño tisular.

Se ha implicado del mismo modo el NO en la patogénesis de la úlcera péptica asociado a la infección por *Helicobacter pylori*. En el antro de pacientes con úlcus duodenal se ha medido una mayor actividad de NOS, bioquímicamente iNOS, que en el de los sujetos sanos⁽²¹⁹⁾. Por otro lado se ha demostrado que el *H. pylori* es capaz de activar la expresión de iNOS en los macrófagos, tanto su RNAm como su actividad enzimática⁽²²⁰⁾. Aunque no se ha explicado el mecanismo intrínseco, es posible que los macrófagos y neutrófilos que componen el infiltrado inflamatorio de la mucosa duodenal dañada produzcan NO debido a la activación de su iNOS por parte del *H. pylori*. Este NO puede colaborar siguiendo su metabolismo oxidativo en el daño tisular al generar peroxinitritos, aunque por otro lado puede contribuir en el aumento del flujo local y cicatrización⁽²⁰⁶⁾ para paliar la lesión.

Sin embargo y a pesar de estar aparentemente involucrado en la patogenia de diferentes procesos lesivos, se ha estudiado el NO en otras patologías además de la EII, como la

colitis necrotizante, el shock séptico o la colitis isquémica entre otros, a través de modelos experimentales de lesión intestinal. Se ha puesto en evidencia que tanto en el daño por toxinas bacterianas (LPS o lipopolisacáridos del *E. coli*), por isquemia o por sustancias proinflamatorias, el NO endógeno en las fases precoces de la agresión ejerce un papel protector por varios mecanismos. La lesión en el intestino de ratas producida a los 15 minutos tras una dosis única de LPS empeoraba de forma llamativa con aparición de hemorragia y necrosis al inhibir previamente el NO con L-NMMA⁽²²¹⁾ y el grado de lesión en este mismo modelo disminuía con donantes de NO exógeno⁽²²²⁾. El NO parece prevenir las lesiones producidas por la isquemia durante 90 minutos en el intestino de la rata, ya que aparecen sólo si se inhibe con L-NMMA⁽²²³⁾, y se daña la función de barrera en la mucosa intestinal del gato por el mismo procedimiento mientras que los liberadores de NO atenúan este daño⁽²²⁴⁾.

En todos estos modelos el primer acontecimiento en el daño de la mucosa es el aumento de permeabilidad capilar con extravasación de plasma, indicador de lesión vascular. Además participan

en el daño una vasoconstricción de la microcirculación, adhesión de leucocitos al endotelio con su activación y liberación de mediadores proinflamatorios con formación de radicales libres. El NO sería capaz de mantener la integridad de la microcirculación y la permeabilidad al contrarrestar todos estos efectos ya que es vasodilatador y se opondría a los vasoconstrictores, inhibe la adhesión y activación de los leucocitos al endotelio^(179,180), previene la agregación plaquetar⁽¹⁷⁸⁾ evitando la formación de microtrombos y oclusión de la microcirculación asegurando su función y también eliminaría radicales libres formados en el lecho inflamatorio^(223,224). Entre otros mediadores, el PAF (platelet-activating factor, fosfolípido liberado por macrófagos y neutrófilos) experimentalmente remedia el daño del shock endotóxico en el intestino con congestión vascular, aumento de la permeabilidad y necrosis con hemorragia⁽²²¹⁾. Estos mismos cambios al producirlos con LPS son limitados y prevenidos completamente con diferentes antagonistas de los receptores del PAF⁽²²⁵⁾, por lo que éste es un mediador de la lesión por endotoxinas y

además parece estar en estrecha relación con el NO. De hecho, aumenta su concentración cuando en estos modelos se inhibe la síntesis de NO y se frena su síntesis cuando se administran donantes de NO⁽²²³⁾. El NO podría regular la síntesis o liberación del PAF y ejercer así otro mecanismo protector; la lesión intestinal dependería del equilibrio entre ambos factores.

Sin embargo Moncada et al, que demuestran el efecto protector del NO en la fase inmediata tras exposición al LPS^(221,222), constatan en este mismo modelo que a las 3 horas de la agresión aumenta la activación de la iNOS en la mucosa intestinal poco antes de que se desarrolle el deterioro de la permeabilidad vascular con extravasación de plasma⁽²²⁶⁾. Con L-NMMA consiguen disminuir las lesiones y la permeabilidad capilar, así como con dexametasona que inhibe la iNOS. Aunque la dexametasona puede prevenir las lesiones por otras vías diferentes a la inhibición de la síntesis de NO, los resultados con L-NMMA están en contradicción con los efectos protectores previamente expuestos. Sugieren que tal vez el exceso de NO generado por la iNOS, que tarda unas 3 horas en aumentar después del estímulo

agresor, favorezca la llegada de agentes pro-inflamatorios gracias a la vasodilatación que produce o represente un agente citotóxico por la vía de su metabolismo oxidativo.

En un intento de zanjar estas conclusiones equívocas, el grupo de Kubes⁽²²⁴⁾ estudian el papel de la producción de NO por la iNOS en un modelo de colitis experimental en ratones con déficit de iNOS por manipulación genética. Ponen en evidencia que los ratones sin iNOS sufren mayor daño mucoso por ácido acético que los que son capaces de incrementar su iNOS ante la agresión, tienen mayor infiltración mucosa de neutrófilos que persiste en el tiempo (7 días) mientras que la inflamación se resuelve mucho antes en los ratones con aumento de iNOS⁽²²⁷⁾. Por lo tanto, el aumento de iNOS puede ser un componente normal como respuesta protectora en la inflamación que ayuda a mantener la integridad vascular, amortigua el daño y favorece su resolución aunque en condiciones particulares y complejas podría contribuir a un daño inapropiado por exceso de producción y generación de radicales tóxicos.

3.5.3.B. NO Y LESION HEPATICA

El NO se forma en el hígado a varios niveles; las células endoteliales poseen cNOS que genera pequeñas cantidades de NO para regular el tono vasomotor y la perfusión local. Existe iNOS en las células endoteliales, células musculares lisas, hepatocitos y macrófagos que genera grandes cantidades de NO en respuesta a endotoxinas y citocinas inflamatorias. Todavía no se ha conseguido elucidar si el NO producido en este órgano tiene un papel protector frente a la lesión o es un tóxico hepatocelular. Esta controversia es debida a las diferentes funciones fisiológicas del NO como hemos visto a otros niveles. El NO es vasodilatador y puede prevenir la isquemia, inhibe la agregación plaquetar y la formación de trombos y la adhesión leucocitaria al endotelio vascular favoreciendo igualmente la perfusión^(178,180,223). Por otro lado el NO puede reaccionar con radicales como el peróxido de hidrógeno o el superóxido y formar metabolitos más tóxicos como los peroxinitritos^(181,217).

En diferentes modelos experimentales de lesión hepática se ha intentado aclarar o matizar los

mecanismos que regulan esta toxicidad. En ratas con alimentación rica en alcohol se vió que la lesión hepatocelular se produce en zonas concretas (perivenosas) y está asociada a un descenso de la producción de NO endógeno en esas zonas⁽²²⁸⁾. El daño celular aumenta aún más con la administración de un inhibidor de NO (L-NAME) y se previene dando suplementos de L-Arginina para favorecer la síntesis de NO. En otro modelo, también en ratas, al producir el daño hepatocelular por medio de isquemia seguida de reperfusión se observó todo lo contrario; existía mayor lesión cuando se inducía síntesis de NO con endotoxina y disminuía el daño al inhibir la NOS con L-NAME⁽²²⁹⁾. Evaluaron simultáneamente la producción de anión superóxido por un método de quimioluminiscencia y objetivaron que con la reperfusión tras isquemia se generan importantes cantidades de superóxido que se anulan cuando se induce NO; el superóxido desaparecería en presencia del NO al reaccionar con éste y formar metabolitos más tóxicos como los peroxinitritos que aumentan la lesión. Otro grupo de investigadores estudió concretamente el papel del NO en la lesión oxidativa de

los hepatocitos en cultivos celulares de ratas⁽²³⁰⁾. Producen este stress oxidativo añadiendo benzenetriol a los cultivos el cual genera aniones superóxido a pH fisiológico; evalúan posteriormente el daño hepatocelular midiendo el nivel de transaminasas y el malonilaldehído como producto de la hidroperoxidación de lípidos utilizado como índice de metabolismo oxidativo. Cuando se añade al cultivo celular L-NMMA para inhibir la síntesis de NO, se produce un incremento considerable de productos oxidativos y lesión celular. Con un donante de NO exógeno como S-nitroso-albúmina se consigue disminuir la lesión y la peroxidación lipídica de forma dependiente de dosis hasta niveles similares al control sin benzenetriol. Demuestran que el NO por sí no es hepatotóxico en estos cultivos sin benzenetriol. Un dato importante para explicar el papel del NO es que objetivan un descenso del antioxidante GSH en los cultivos con benzenetriol que se agrava al bloquear el NO, concomitante a la exacerbación de la lesión oxidativa. También se observa este descenso de GSH en la lesión por alcohol específicamente en las zonas más lesionadas⁽²²⁸⁾, lo que ha sugerido que la concentración de este

antioxidante podría determinar si el NO es tóxico o protector, permitiendo la formación de radicales tóxicos cuando disminuye. El estado redox del medio podría pues modular los efectos del NO, así como según otros autores lo regularía el estado hemodinámico y de oxigenación: cuando la oxigenación es baja el NO actuaría como vasodilatador y antiagregante para favorecer la perfusión y cuando el nivel de oxígeno es alto el NO reaccionaría con radicales como el superóxido incrementando el metabolismo oxidativo tóxico⁽²³⁰⁾.

3.6. NO COMO ANTIOXIDANTE

Como hemos visto en presencia del anión superóxido, el NO puede unirse a éste y generar peroxinitritos de alto poder tóxico. Sin embargo, estos peroxinitritos que pueden descomponerse en el potentísimo radical hidroxilo, cuando existe NO en exceso pueden descomponerse en nitrato y nitrito, mucho menos nocivos⁽⁶²⁾. Por otro lado, el NO tiene alta afinidad por el hierro tanto unido a proteínas (en el grupo heme de la hemoglobina o mioglobina) como a aniones del tipo sulfato ferroso⁽²³¹⁾. Por esta alta afinidad puede interceptar diversas reacciones de

estos complejos ferrosos con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que generan complejos oxirradicales (ion hidroxilo) y compuestos ferrilo muy reactivos que desencadenan la peroxidación lipídica. Estas reacciones con formación de radicales y de peroxidación están catalizadas por el hierro que se libera de complejos ferrosos tanto proteicos como aniónicos por acción del peróxido de hidrógeno. Estos fenómenos han sido claramente demostrados por Kanner et al⁽²³¹⁾ al medir los productos de peroxidación lipídica (los TBA-RS) en diferentes medios con H_2O_2 y oxihemoglobina o metmioglobina. La alta actividad oxidativa y sus productos (TBA-RS) disminuyen drásticamente al añadir NO al medio. Se confirman los mismos hechos anti-oxidantes al realizar los experimentos con H_2O_2 y complejos ferrosos aniónicos como el sulfato ferroso ($Fe\ SO_4$); los productos de la hidroxilación disminuyen de forma significativa al añadir NO. Demuestran concomitantemente una liberación al medio de Fe^{++} de las proteínas del grupo heme que no se produce cuando está presente el NO.

La acción anti-oxidante dependería de la capacidad del NO para unirse al hierro de los complejos

ferrosos (tanto proteicos como aniónicos) evitando reacciones de alto poder tóxico de estos complejos con el peróxido de hidrógeno. El NO actúa modulando las reacciones prooxidativas; modula la reactividad de los componentes ferrosos, es quelante del hierro libre lo que disminuye el potencial catalizador del hierro para generar productos oxigenados tóxicos y "barre" los radicales libres⁽²³¹⁾.

Otro mecanismo antioxidante comprobado es que el NO puede inhibir la producción del superóxido por parte de los neutrófilos al bloquear directamente la NADPH-oxidasa⁽⁶²⁾.

También se ha detectado que el NO inhibe la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa de la oxidación lipídica lo que demuestra una amplia actividad antioxidante.

Por lo tanto el NO puede actuar como prooxidante al unirse con otros radicales ($\bullet O_2^-$) para formar sustancias altamente tóxicas o por el contrario puede actuar como antioxidante. Esta dualidad puede depender de diferentes factores, como el lugar de su síntesis, su concentración y la presencia de metales de transición como el hierro.

3.7. DUALIDAD DEL NO

Como hemos visto, además de esta dualidad prooxidante-antioxidante el NO puede ser protector o deletéreo en diferentes procesos lesivos. En la lesión neuronal experimental en ratas por isquemia se ha conseguido distinguir entre la inhibición del NO al inicio del ictus, lo que aumentó la mortalidad, e inhibir su actividad en el momento de la reperfusión con lo que se disminuyó el tamaño del infarto⁽²³²⁾. Esto refleja la modulación de la lesión por el NO según las circunstancias; en un primer momento puede intervenir como vasodilatador y favorecer el flujo (pre-ictus) siendo protector por lo que su inhibición empeora la isquemia y sin embargo tras el establecimiento de la isquemia y en un medio ácido el NO es dañino por su potencial oxidante y su reactividad con otros radicales producidos por la hipoxia, ya que si se bloquea el superóxido con SOD se eliminaba el efecto dañino y se conseguía el mismo efecto protector. Esta variabilidad ha sido puesta de manifiesto por Rachmilewitz⁽²³³⁾ en dependencia del lugar de la síntesis del NO. Demostró que el papel del NO variaba entre el estómago y el colon en la lesión por iodoacetamida. La

iodoacetamida es un bloqueador de sulfhidrilos por lo que destruye el GSH, importante antioxidante que elimina superóxido, y reduce el peróxido de hidrógeno. En el estómago demuestra que la disminución del NO favorece la producción de lesión y sin embargo en el colon cuando se inhibe disminuye la lesión por iodoacetamida. Según los autores esta diferencia podría depender del tipo de NOS implicado, ya que en el estómago 50% de la actividad NOS es constitutiva y en el colon tan sólo el 17% lo es y el resto es NOS inducible⁽²¹⁵⁾. En la colitis experimental el NO producido deriva principalmente de la isoforma inducible, con un papel nocivo, mientras que en el estómago el NO deriva de la isoforma constitutiva e interviene en la integridad de la mucosa.

También en el miocardio ejerce el NO un papel protector; además de un efecto vasodilatador, inhibe la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular y la agregación plaquetar y la adherencia endotelial favoreciendo el flujo, lo cual se ha visto que es beneficioso en reducir la lesión coronaria isquémica⁽²³⁴⁾.

En el inicio de una agresión gastrointestinal como son los cáusticos, la isquemia, el ácido o el shock séptico el NO protege la integridad de la

mucosa asegurando su perfusión. Como hemos descrito produce vasodilatación además de inhibir la agregación plaquetar y la adherencia neutrofílica cuando estos fenómenos se ponen en marcha. Sin embargo, en fases más avanzadas de la inflamación el NO

puede aumentar la lesión por alcanzar concentraciones tóxicas producidas por la estimulación excesiva de la NOS inducible e interactuar con otros metabolitos generados también en el lecho inflamatorio.

II. OBJETIVOS

Así como en el estómago los mecanismos de defensa de la mucosa están mucho mejor definidos, a nivel esofágico permanecen en continuo estudio con resultados muchas veces contradictorios. Estos conocimientos se centran básicamente en la regulación del pH intracelular frente a las variaciones del pH extracelular y los mecanismos de proliferación celular y restitución tras la muerte celular. Aunque menos descrita conocemos la adaptación frente al ácido de la mucosa esofágica y la implicación del óxido nítrico y los factores de crecimiento epitelial como mediadores de este mecanismo defensivo. El óxido nítrico interviene en la regulación del flujo mucoso de la mucosa esofágica frente al ácido, lo cual podría estar en la base de esta adaptación mucosa. A pesar de este papel beneficioso a nivel esofágico, se ha visto a otros niveles del tracto digestivo que el óxido nítrico puede intervenir en el mecanismo de lesión inflamatoria. No se conoce sin embargo si esta sustancia puede también desempeñar un papel en la lesión del esófago y no se ha estudiado su posible participación en la génesis de la agresión por ácido y pepsina.

En modelos experimentales de esofagitis aguda en animales se ha demostrado que los radicales libres, mayoritariamente el anión superóxido, son mediadores de la lesión por ácido y pepsina. Sin embargo los modelos experimentales en los que se ha podido demostrar la causa-efecto de estos productos y la lesión mucosa esofágica son de tipo agudo, con exposiciones intensas, únicas y de corta duración lo cual se aleja de lo que ocurre en el ser humano donde la mucosa esofágica es expuesta al ácido de forma intermitente y repetida en el tiempo. A nivel humano se han detectado estos radicales libres en la mucosa lesionada pero no se ha podido describir los fenómenos causantes ni su posible modulación.

Se sabe por diferentes resultados experimentales que el óxido nítrico y el anión superóxido cuando se hallan en proximidad y a concentraciones suficientes interaccionan potenciando de forma cuantiosa la capacidad tóxica del anión superóxido al generar los llamados peroxinitritos. No conocemos si esta reacción ocurre a nivel esofágico donde se producen radicales libres frente

al ácido y donde también podría intervenir el óxido nítrico.

Por todo ello planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

“El anión superóxido es uno de los mediadores de la lesión crónica por ácido y pepsina de la mucosa esofágica. El óxido nítrico aumenta ante una agresión ácido-péptica como mecanismo defensivo”.

Para demostrar nuestra hipótesis hemos desarrollado un modelo original experimental con conejos, puesto a punto para remedar la producción de esofagitis por reflujo ácido en el humano, consiguiendo con diferentes pautas experimentales una lesión de alto y bajo grado de características macroscópicas e histológicas similares a la conocida en el hombre. Con esta hipótesis nos proponemos estudiar este

punto de la patogenia de la esofagitis crónica que se definen en los siguientes objetivos:

- 1.- Determinar si la mucosa esofágica genera óxido nítrico y el papel de éste en la lesión o defensa de la mucosa ante la agresión por ácido.
- 2.- Evaluar si la producción de anión superóxido en la mucosa esofágica interviene en la génesis de la lesión de alto y bajo grado por ácido y pepsina y el efecto de los barredores de este radical libre.
- 3.- Demostrar si existe interacción entre el óxido nítrico y el anión superóxido en la mucosa esofágica lesionada por ácido de forma crónica y su efecto en la producción del daño.

III. MATERIAL Y METODOS

1. MODELO EXPERIMENTAL

1.1 ANIMAL DE EXPERIMENTACION

Como animal para los experimentos se eligió el conejo blanco Nueva Zelanda, por sus características idóneas para este tipo de experimentación; el esófago del conejo posee una estructura histológica muy similar al de la especie humana. Se distinguen en que el esófago del conejo no posee glándulas submucosas. Pero las similitudes son mayores pues ambos esófagos tienen un epitelio escamoso estratificado, una capa muscular lisa y mecanismos de defensa epiteliales y postepiteliales contra la agresión del ácido que primero se describieron en el conejo y luego se ratificaron en el humano⁽⁶³⁾. Por esta razón el conejo blanco ha sido utilizado como modelo en muchos trabajos sobre esofagitis y nuestra elección permite una comparación homogénea y fiable de nuestros resultados obtenidos con los de otros grupos.

Los animales fueron suministrados por la Facultad de Veterinaria de la

Universidad de Zaragoza. Se utilizaron 180 conejos con un peso entre 2500 y 3500g. Fueron estabulados en jaulas individuales y vigilados por cuidadores de animales diplomados. Durante el período perioperatorio estuvieron en jaulas metabólicas con control de entrada de líquidos, diuresis y deposiciones. En ambos tipos de jaulas tenían acceso libre a alimento y agua. Cada animal posee una ficha de identificación con su número de serie, sexo, peso al inicio y al final del experimento, incidencias quirúrgicas, cantidad de anestesia administrada, la premedicación según el tipo de experimento, número y duración de las perfusiones, así como las extracciones de sangre realizadas.

1.2. NORMAS DE EXPERIMENTACION ANIMAL

Para la realización de nuestros experimentos nos hemos atendido a las normas del Consejo de Europa sobre experimentación animal aplicada, recogidas en la directiva 86/609/ CEE y reguladas en España por el Real Decreto 223/ 1988 del 14 de Marzo, sobre

protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Estudios con animales de la Universidad de Zaragoza.

1.3. CENTRO DE EXPERIMENTACION

La experimentación se llevó a cabo en la Unidad Mixta de Investigación, Servicio de Biomedicina y Biomateriales, inscrita oficialmente como “Establecimiento Usuario” por la subdirección General de Sanidad Animal con el nº 50297/18A para la estabulación y utilización adecuadas de todos los animales de experimentación contemplando la normativa anteriormente citada. Los conejos permanecieron en jaulas especialmente preparadas para estos animales (EU Dim; IFFA Credo) con condiciones de luz, temperatura y humedad controladas y reguladas por ordenador.

Personal experimentado y acreditado se ocupó del cuidado de los animales durante todo el período de experimentación desde la estabulación pre-experimento hasta la finalización de dicha experimentación.

Las intervenciones fueron rápidas y sencillas (en torno a 30 minutos), se realizaron en quirófano con medidas completamente estériles, material quirúrgico, sistemas de canulación venosa, equipos de gotero, sondas nasogástricas, y demás material necesario. Para anestesiarse a los animales se siguieron las recomendaciones del Departamento de Anestesia de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

1.4. DETERMINACIONES DE LABORATORIO

La preparación del líquido de perfusión con control de pH y del peso de pepsina, la medición de óxido nítrico-sintasa, nitritos en plasma y hematocrito se llevaron a cabo en los laboratorios de la Unidad Mixta de Investigación donde se dispone de pHmetro (Crison. MicropH 2001) y balanza de precisión (Sartorius Basic BA110S). Para medir la cantidad de ¹⁴C-citrulina como marcador de síntesis de NO se utilizó un escintilador líquido (Packard, Groningen, The Netherlands). Para las determinaciones de células productoras de anión superóxido por citometría de flujo se utilizó un EPICS

Elite (Coulter, Hialeah, FI) equipado con un láser de argón (ILT 550, Salt Lake City, Utah USA). En cuanto a la detección y medición de nitrotirosina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC o high performance liquid chromatography) se utilizó un Waters 600E Multisolvent Delivery System para realizar las eluciones y un equipo detector "Waters 486 Tunable Absorbance" a 227 nm. El análisis espectral y fluorescente de las muestras se llevó a cabo con un cromatograma (Shimadzu, Tokio, Japón) y se calculó la cantidad de la sustancia identificada (nitrotirosina) con el Waters Integrator 746 Data Module.

1.5. ESTUDIO ANATOMO-PATOLOGICO

Una vez finalizados los experimentos, los esófagos de los animales fueron fijados en formol, fotografiados, tallados, incluidos en parafina y posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina para su evaluación por microscopía óptica. La valoración de las lesiones se realizó de forma macroscópica en fresco con evaluación cualitativa y cuantitativa con asignación de puntuación consensuada por dos

observadores independientes. La valoración microscópica fue realizada de forma ciega por el Dr. Javier Ortego, profesor de la cátedra de Anatomía Patológica de la Universidad de Zaragoza.

2. PROCEDIMIENTO Y METODO

2.1 TECNICA QUIRURGICA

El modelo experimental de la producción de esofagitis se basó en la técnica descrita por Lillemoe⁽¹²¹⁾ para esofagitis aguda. Ha sido modificado por nuestro grupo de trabajo para la producción de esofagitis crónica⁽²³⁵⁾, más parecida a la producida en el humano. La descripción de este modelo experimental original ha sido publicado en extenso. En resumen:

La intervención se realizó en conejos blancos Nueva Zelanda después de 24 horas de ayuno. Para la anestesia se utilizó una combinación de Ketamina intramuscular y tiopental sódico intravenoso, manejados por personal experimentado. La ketamina ajustada a 75 mg/ kg produce relajación muscular, con descenso del nivel de conciencia en

pocos minutos pero con conservación del reflejo faringo-laríngeo. Su mecanismo de acción es interrumpir selectivamente las vías de asociación cerebral antes de provocar bloqueo sensorial, bloqueo del sistema reticular ascendente y del sistema límbico. Una vez sedado se procede a cateterizar la vena marginal de la oreja para mantener una vía con suero glucosalino durante toda la intervención. Por esa vía se administra el tiopental sódico, fármaco barbitúrico que a bajas dosis (bolos de 0,5cc) actúa como potente hipnótico de acción ultracorta produciendo la inconsciencia completa con analgesia eficaz. La ventaja del tiopental es la rápida recuperación del animal permitiendo en pocas horas la alimentación espontánea frente a otros anestésicos sedantes con los que se demora esta recuperación.

Con la anestesia completada y el conejo en decúbito lateral izquierdo, se realiza una cervicotomía lateral derecha longitudinal, paralela y a 1-1,5 cm por delante del relieve de la columna cervical. Tras la disección de los planos subcutáneo y muscular, con sección del músculo cutáneo del cuello y rechazo hacia delante del vientre del músculo esternocleidomastoideo, se accede al

esófago cervical, que se encuentra a ese nivel íntimamente adherido a la tráquea. Se practica un ojal lateral en la pared del esófago alrededor del cual se da un punto de sutura en bolsa de tabaco. En ese momento se tuneliza formando un trayecto subcutáneo hasta la región dorsal del cuello entre las dos orejas donde se abre un pequeño corte por el que se introduce la sonda naso-gástrica de polivinilo de calibre 6 Charrier (Pharma-plast, Denmark), se sigue el túnel preparado y se coloca dentro del esófago en dirección gástrica con una longitud intraesofágica adecuada de 2,5 cm para mantener por debajo de la sonda una porción de esófago hasta cardias de 8-10 cm. Una vez colocada se tira del punto en bolsa de tabaco para ajustar la sonda en el esófago para evitar fistulización con extravasación de alimento o del líquido de perfusión y se cierra dando puntos por planos musculares. Para finalizar se da 2-3 puntos de sutura del tapón de la sonda a la piel, para que la sonda no se mueva entre las orejas y no pueda arrancarla ni moleste al animal (figura 1).

Durante los 5 días siguientes a la intervención se realizó profilaxis antibiótica con tetraciclina intramuscular a dosis de 5 mg / kg/ día.

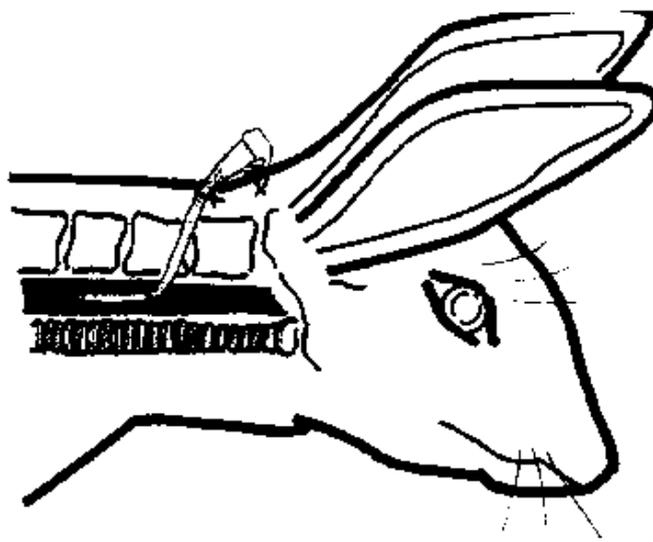


Fig. 1 Croquis del modelo quirúrgico de esofagitis crónica experimental en el conejo. Situación de la sonda en el esófago.

2.2 PRODUCCION DE ESOFAGITIS CRONICA

Tras 3 días completos de post-operatorio, cuando se ha recuperado el animal de la intervención se inicia la producción de la esofagitis crónica a través de la sonda colocada. Producimos la esofagitis perfundiendo suero salino acidificado más pepsina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) a una concentración de 400 mg / 100ml y pH final de 2. El líquido de perfusión se mantiene a una temperatura de 37° por

un termorregulador (P-selecta. Barcelona. España). Las perfusiones se realizan con un caudal de 1 ml/min cada 12 horas y tanto la duración como el número de perfusiones totales varía en relación al tipo de esofagitis que se desea producir, de forma controlada.

Las medicaciones en estudio se administraron previa a cada perfusión.

Las perfusiones se llevaron a cabo con el animal anestesiado con ketamina intramuscular con dosis de 75mg/kg. Se repitió la dosis según la

duración de la perfusión. La perfusión del líquido con ritmo se realizó y controló por medio de una bomba peristáltica (Microtube Pump MP-3. Eyela. Tokyo Rikakikai Co., Ltd Japan).

Al término del período perfusional el animal era sacrificado con tiopental intravenoso en bolo, seguido de la necropsia y extracción del esófago. Cada esófago fue abierto longitudinalmente, fotografiado y

extendido con agujas en una plancha de corcho. Inmediatamente se cuantificaron los cambios macroscópicos y se fijaron en formaldehído al 10% tras separar muestras de tejido para medir la actividad de la NOS, la nitrotirosina y el anión superóxido.

Posteriormente, en el laboratorio de Anatomía Patológica, se tomaron muestras de toda su superficie y se incluyeron en parafina.

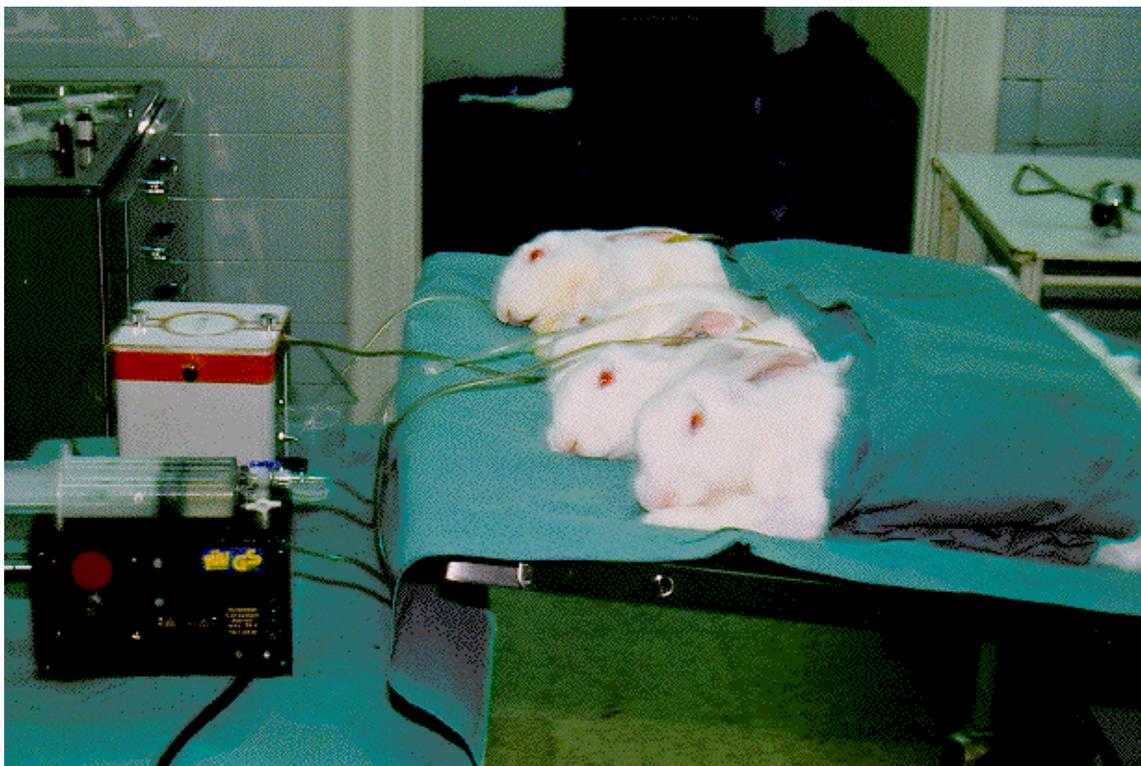


Fig. 2. Sistema para la perfusión con solución de pepsina acidificada

2.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se dividieron los experimentos en dos grandes grupos para la producción de esofagitis crónica de diferente gravedad descritos por nuestro grupo en otro trabajo⁽²³⁵⁾

- Esofagitis de alto grado con perfusiones de 45 min /12h durante 5 días
- Esofagitis de bajo grado con perfusiones de 30 min/12h durante 7 días.

La esofagitis de bajo grado: (30min/ 12h durante 7 días) se caracteriza por edema e hiperemia macroscópicamente y aunque la mucosa se halló con frecuencia preservada, puede presentar erosiones aisladas no confluyentes y hemorragias submucosas de tipo petequeal. Microscópicamente presenta cambios reactivos epiteliales, principalmente hiperplasia de la capa basal, mitosis, papilomatosis y paraqueratosis; edema y congestión son constantes y la mucosa presenta pérdida epitelial superficial en algunos casos y existe un infiltrado celular inflamatorio leve o moderado en la mitad de los casos de tipo agudo (PMN) o crónico.

Al prolongar el número de días más allá de 7, disminuían edema y congestión, y desaparecía por completo el infiltrado inflamatorio con 20 días; sólo aumentaban los cambios reactivos epiteliales. Visto este fenómeno de adaptación de la mucosa se eligió el modelo de 7 días con lesiones leves.

La esofagitis de alto grado: (45min/ 12h durante 5 días) con lesiones más importantes como erosiones y úlceras a menudo difusas y hemorragias submucosas lineales y confluyentes visibles. Microscópicamente existe un menor desarrollo de cambios reactivos epiteliales que en el modelo de bajo grado, condicionado por la ausencia de epitelio en muchas zonas. El edema, la congestión y la hemorragia intraparietal se apreciaban en la mayoría de los casos. El infiltrado celular inflamatorio polimorfonuclear fue difuso y constante y en algunas ocasiones de tipo mixto (PMN y plasmocelular). Cuando se alargó el experimento más de 5 días, aumentó considerablemente la mortalidad, por lo que se eligió como modelo con lesiones graves el de 5.

En ambos modelos se administraron varios tipos de

medicación con la intención de modular la síntesis y metabolismo del óxido nítrico y del anión superóxido, a diferentes dosis:

1) **N^o-nitro-L-Arginina (L-NNA)** (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO): se utilizó como inhibidor del enzima óxido nítrico sintasa para bloquear la síntesis del NO. Se usó vía oral (a través de la sonda esofágica colocada) 15 minutos antes de iniciar cada perfusión.

2) **Nitroprusiato sódico (NPS)** (Fides-Rottapharm, Valencia, España): un liberador de NO, se utilizó como fuente de NO exógeno. Se administró vía intraperitoneal inmediatamente antes de cada perfusión realizada.

3) **Superóxido dismutasa (SOD)** (Ontoseín[®], Tedec-Zambalatti; Madrid, España): se utilizó como antioxidante por eliminar el anión superóxido. Se administró vía subcutánea 20 minutos antes de cada perfusión.

4) **Dexametasona** (Decadrán[®], M.S.D., Madrid, España). Se utilizó por su papel inhibidor de la NOS inducible, común a

todos los corticoides. Se administró vía subcutánea.

3. PARAMETROS DE LESION

Para valorar las lesiones esofágica inducidas con este procedimiento usamos los siguientes parámetros de lesión:

3.1 Índice macroscópico de esofagitis al término del experimento

3.2 Índice microscópico de esofagitis tras fijación y tinción.

Estos índices de lesión que detallaremos, han sido diseñados por nuestro grupo para permitir una mayor definición de las lesiones que no se recogen en modelos anteriormente descritos^(236,237) y utilizados por nosotros en el modelo de esofagitis aguda^(101,116). Con esta nueva graduación se consigue discriminar mejor entre distintos grados de esofagitis y facilita su análisis estadístico⁽²³⁵⁾.

3.1. INDICE MACROSCOPICO DE ESOFAGITIS

La extensión de las lesiones fue evaluada por dos observadores independientes para asignar una puntuación de 1 a 100. Esta puntuación definida de forma arbitraria tiene en cuenta la importancia cualitativa y cuantitativa de cada uno de los hallazgos, puntuando especialmente la pérdida de la mucosa y la hemorragia ya que son las lesiones más aparentes y graves desde el punto de vista macroscópico. Se consideraron los siguientes parámetros:

1. Eritema: coloración rojiza de la mucosa esofágica producida por una hiperemia con vasodilatación que responde a un aumento del flujo sanguíneo submucoso.

Se puntúa de 0 a 5:

0 = ausencia;

2 = presente en < 50% de la superficie;

5 = presente en > 50%

-2. Edema: aumento del grosor de la pared del esófago por infiltración de los tejidos.

Se puntúa de 0 a 10:

0 = ausencia;

5 = presente en < 50% del esófago;

10 = presente en > 50%

-3. Hemorragia: (puntuación 0-35)

-Hemorragia submucosa: extravasación de hematíes de los vasos sanguíneos submucosos. Pueden aparecer como pequeñas lesiones redondeadas o petequias, que pueden aumentar en extensión con aspecto de hematoma y llegar a unirse haciéndose confluyentes. Se distinguen de la vasodilatación por no desaparecer a la vitropresión.

Se puntúa de 0 a 30:

0 = ausencia de hemorragia

5 = petequias (redondeadas)

10 = hemorragias lineales

15 = submucosas confluyentes.

Si la hemorragia es difusa la puntuación anterior se multiplica x 2.

-Hemorragia intraluminal: extravasación de sangre a la luz esofágica, normalmente a través de una lesión de la mucosa.

Se puntúa de 0 a 5:

0 = ausencia

5 = cualquier hemorragia intraluminal.

Esta puntuación se suma a la anterior de las hemorragias submucosas (máximo 35).

-4. Pérdida epitelial: se consideran la erosión y la úlcera

-Erosión: pérdida de las capas más superficiales del epitelio. Normalmente se manifiesta como decoloración y aspecto blanquecino sin brillo de la superficie.

-Ulceración: pérdida epitelial más profunda.

Se puntúa de 0 a 50:

10 = si hay erosión

25 = si existe úlcera

si la pérdida es difusa o múltiple se multiplica la puntuación obtenida x 2.

Una vez realizada la valoración, se fija en formol para realizar el estudio microscópico posteriormente.

3.2. INDICE MICROSCOPICO DE ESOFAGITIS

Los cortes histológicos obtenidos de las muestras tisulares en parafina se tiñeron con hematoxilina-eosina y se evaluaron por microscopía óptica. Aunque la histología del esófago del conejo es muy similar a la del hombre, debemos describir su estructura compuesta de cuatro capas, previamente al análisis de sus lesiones:

1^a- Mucosa: está compuesta de 3 capas. La primera está compuesta por un “epitelio plano estratificado”. Este, como su nombre indica consta de varios estratos; la capa basal, o estrato germinativo, donde se encuentran las células más indiferenciadas y de las que dependen los fenómenos de recambio y reparación celulares; el estrato espinoso, el granular y finalmente el más superficial o estrato córneo. Bajo la capa basal se encuentra la membrana basal que está formada por colágeno y glucoproteínas, y la separa de la segunda capa. Esta capa es la lámina propia o corion, formada por tejido conjuntivo laxo a base de fibras colágenas finas y redes de fibras elásticas distribuidas uniformemente. Más externamente se sitúa la muscularis mucosae, que contiene haces de fibras musculares lisas y una delgada red de fibras elásticas.

2^a-Submucosa: Formada por tejido conjuntivo laxo que contiene fibras de colágeno y de elastina con arterias, venas, vasos linfáticos y nervios. También se hallan presentes discretos infiltrados de linfocitos. La laxitud de esta capa confiere el aspecto en pliegues longitudinales de la mucosa del esófago en reposo.

3ª-Muscular: Constituida por dos capas de músculo; una interna circular y otra externa longitudinal. En el tercio proximal son fibras estriadas y en los dos distales son fibras lisas.

4ª-Adventicia: Formada por una capa de tejido conjuntivo muy laxo que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios.

La puntuación de las lesiones microscópicas se realizó incluyendo parámetros no considerados en experimentos previos^(119,232,233) por no existir en los modelos de esofagitis aguda, como son los cambios reactivos celulares del epitelio. Se realizó de la siguiente manera:

1. Cambios reactivos epiteliales:

(puntuación de 0 a 10)

- Hiperplasia de la capa basal: aumento del número de células que origina un incremento del grosor tanto relativo como absoluto de dicha capa con respecto a la totalidad del epitelio. Dicho incremento se considera hiperplásico cuando se ajusta al criterio de Ismail-Beigi^(73,125) o sea superior al 15% de la totalidad.

- Índice de actividad mitótica: determinación del número de células que se encuentran en proceso de división celular por unidad longitudinal lineal del epitelio a nivel de la capa basal.

- Papilomatosis: Elongación de las papilas coriónicas, que se aproximan a la superficie epitelial. Se considera que existe este fenómeno cuando sobrepasan las 2/3 partes del grosor total del epitelio^(73,122).

A cada uno de estos 3 fenómenos se le adjudica:

2 = presente

0 = ausente

Si aparecen los tres tipos de alteración conjuntamente su puntuará con 10, independientemente de los siguientes cambios menores. En caso de no llegar a este máximo se considera:

- Ortoqueratosis: queratinización en presencia de estrato granuloso

- Paraqueratosis: queratinización en ausencia de estrato granuloso

- Acantosis: Engrosamiento del estrato espinoso epitelial

- Células baloniformes: descritas por Jessurum et al⁽²³⁸⁾ en el esófago del conejo y posteriormente por Brewer et al⁽²³⁹⁾. Son células escamosas de los

estratos germinativo y espinoso de la capa basal epitelial, de forma globoide, cuyo citoplasma es pálido y vacuolado por edema. El núcleo es picnótico y está rechazado hacia la periferia.

A cada uno de estos cuatro fenómenos se le adjudicó (0-4):

1 = presente

0 = ausente

2. Pérdida epitelial:

(puntuación de 0 a 30)

Puede ser de diferente gravedad;

- Erosión: cuando la pérdida llega hasta la capa basal.

- Úlcera: cuando la pérdida alcanza más allá de la membrana basal.

Se puntúa:

0 = ausente

3 = leve o superficial

7 = moderada (erosión)

15 = grave (ulceración)

Sólo se tiene en cuenta la lesión más profunda. Si la pérdida epitelial presente es múltiple o difusa, la puntuación adjudicada se multiplica x2 (máximo será de 30).

3. Lesión vascular:

(Puntuación de 0 a 20)

- Edema subepitelial: para valorarlo nos basamos en el grado de separación entre el epitelio y la muscularis mucosae.

- Congestión: Dilatación de la luz de los vasos sanguíneos, localizada tanto en la lámina propia como en la submucosa.

- Hemorragia: Presencia de hematíes extravasados a cualquier nivel de la pared esofágica.

Se puntúa:

5 = edema y / o congestión;

7 = hemorragia focal,

15 = hemorragia difusa

4. Infiltrado inflamatorio:

(Puntuación de 0 a 40).

Puede incluir diferentes células y su localización puede ser intraepitelial, en la lámina propia, submucosa o muscular. Se consideró la intensidad del infiltrado celular y la extensión:

- Si es focal y de intensidad leve = 10

- Focal de intensidad moderada o de intensidad leve pero difuso = 20

- Difuso y de intensidad moderada = 30 o

- Difuso y de intensidad grave = 40

El índice de lesión microscópico alcanzará un máximo de 100 por este sistema.

4. IMPLICACION DEL NO Y DEL SUPEROXIDO EN LA ESOFAGITIS

Para estudiar el NO y su papel en la esofagitis se realizaron varias mediciones colaterales.

4.1. NIVELES DE NITRATO Y NITRITO EN SANGRE Y PRESION ARTERIAL

Utilizamos varios grupos de 5 conejos cada uno (n=5) para valorar los efectos de las diferentes drogas utilizadas en este estudio (L-NNA y NPS) sobre la presión arterial sistémica. Cada grupo de conejos recibió una de las medicaciones a una de las dosis utilizadas. Se procedió de la siguiente manera: tras la anestesia se colocó un catéter en la arteria central de la oreja del conejo y se acopló con un sistema de gotero comunicado a una columna de agua por una llave de tres pasos (en disposición de vasos comunicantes). La presión arterial se mide cuando se equilibra en la columna de agua acoplada a una regla en centímetros con el 0 a nivel del corazón. La tensión arterial se obtiene en cm de H₂O y se transforma en mmHg (1 cm H₂O = 1,36 mm Hg). Una vez estabilizada la presión arterial (durante 10 min) se administró la

medicación a la dosis asignada utilizando la vía habitual; intragástrica por la sonda para el L-NNA, intraperitoneal para el NPS. Se monitorizó la presión arterial durante 60 minutos.

En los grupos de experimentos con liberadores de NO (NPS) se realizaron extracciones de sangre en el minuto 0, minuto 15, 30 y 45 de las perfusiones para medir los niveles de nitrato/nitrito y comprobar que realmente esta medicación producía un aumento del NO y sus metabolitos. La sangre se centrifugó durante 3 minutos a 9000g y 4°C y congeló a -70°C para medición subsiguiente según la técnica descrita⁽²⁴⁰⁾. Estas mediciones se realizaron con posterioridad de forma ciega, con desconocimiento de la medicación recibida por cada grupo.

4.2. ACTIVIDAD DE LA NOS EN LA MUCOSA ESOFAGICA

Inmediatamente después de la extracción de cada esófago se tomó una pequeña muestra de la zona distal y se separó fácilmente la mucosa de la capa muscular subyacente. Se cortó la mucosa en pequeños trozos y suspendió en 2ml de solución tampón (pH 7,5)

compuesta por: 20 mM de Tris, 0,5 mM de ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), 0,5 mM ácido etilen diamino tetraacético (EDTA, 1 mM DL-ditiotreitol, 0,2 mM fenilmetilsulfonil-fluoride, 1 mM dihidrocloruro tetrahidro-L-biopterina (Schircks Lab. Switzerland), 1 μ M leupeptina. Se homogeneizaron los tejidos en hielo durante 60 segundos. Los homogeneizados se centrifugaron durante 15 minutos a 20000g a 4°C y se realizaron las pruebas en los supernadantes por duplicado. La síntesis del NO se midió por conversión de L- 14 C-arginina en 14 C-citrulina, coproducto de NO, según la técnica descrita⁽²⁴¹⁾ con anterioridad. En resumen se añade a 500 μ M del supernadante obtenido 200 μ M de una solución, compuesta por 20mM de HEPES(ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2-etansulfónico), 0,5 mM de NADPH (forma reducida de β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), 10 μ M de 14 C-arginina monohidrocloreto (actividad sp. 11,6 Bq/mmol. Amersham International; Buckinghamshire, England Tras 15 minutos de incubación a 37°C, se paró la reacción con 800 μ M de agua a 80°C. La muestra se colocó en

1 mL de una columna Dowex A 50WX8-400. La 14 C-citrulina se disolvió en 3 mL de agua. La radioactividad se midió por escintilación líquida. La actividad del enzima NOS de cada esófago fue medida en presencia de 100 μ M de Ca^{++} por un lado y de 1 mM de EGTA por otro. La producción de NO en presencia de Ca^{++} corresponde a la actividad de la NOS total, mientras que con EGTA (sin Ca^{++}) corresponde a la de iNOS (NOS inducible). Se sustrajo la actividad no específicamente inhibida por L-NAME (N^o-nitro-L-arginina metil ester) en ambas reacciones. La actividad de la forma constitutiva se calculó como la diferencia entre la total menos la inducible. La actividad del enzima se expresa en pmol/min/g de tejido. Salvo otra especificación los reactantes se adquirieron de Sigma, St. Louis, MO. Para demostrar histológicamente la presencia de la NOS algunas muestras de tejido esofágico se sometieron a la tinción para NADPH-diaforasa que detecta el enzima que nos interesa, siguiendo la técnica descrita en otro trabajo⁽²⁴¹⁾.

4.3. DETERMINACION DEL ANION SUPEROXIDO

La producción del anión superóxido se midió en células aisladas de los esófagos de conejo con y sin lesión por citometría de flujo equipado con un láser de argon siguiendo un procedimiento descrito previamente⁽¹¹⁶⁾. La producción intracelular de superóxido se midió indirectamente por la formación intracelular de bromuro de etidio, que se genera por oxidación de la hidroetidina en presencia del anión superóxido. La presencia de monocitos, macrófagos y neutrófilos en células aisladas de la mucosa esofágica se determinó por inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo CD11b de ratón (Labgen, Barcelona, España) y un anticuerpo Ig G1-FITC de cabra (Southern Biotechnologic Associates Inc. Birmingham AL, U.S.A.). Este tipo de células son denominadas células CD 11b (+). Se analizó la producción de superóxido en estas células CD11b+ respecto a las negativas para este anticuerpo o CD11b-. Se midió simultáneamente en células aisladas de la mucosa esofágica la producción de anión superóxido y las células CD11b+ en el modelo de esofagitis de grado leve,

en el modelo de esofagitis de grado grave y en esófagos sin perfundir o controles.

4.4. MEDICION DE PEROXINITRITOS EN LA MUCOSA ESOFAGICA

La formación de peroxinitritos en los tejidos esofágicos se determinó indirectamente a través de la formación de nitrotirosina. Los peroxinitritos modifican los residuos tirosina de las proteínas para formar nitrotirosina por lo que ésta se utiliza como marcador indirecto de la producción de estos peroxinitritos^(216,217). Se mide la nitrotirosina por cromatografía líquida o HPLC (high performance liquid chromatography), siguiendo la técnica previamente descrita^(242,243). En resumen los extractos de tejido se prepararon homogeneizando mucosa esofágica en una solución tampón de fosfato 1 mM con digitonina 0,1% (w/v) a pH 7,4. Para retirar los restos del tejido se centrifugaron los homogeneizados a 3000 g durante 10 minutos. Se hidrolizaron las proteínas del

homogeneizado al vacío en CIH 6M durante 24 horas a 120°C. Se purificaron y concentraron los aminoácidos por cromatografía de intercambio catiónico, utilizando una resina Dowex 50 WX8-400 (Sigma Chemical, St Louis, MO). La elución de los aminoácidos se realizó con amoníaco 4M y se liofilizó hasta analizarlos. Se analizó la nitrotirosina por HPLC utilizando una columna Novapack 4µm C18 (3,9 x 150 mm) montada con una pre-columna Novapack C18 HPLC (Waters Millipore Co. Milford, MA). Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en la fase móvil. Se inyectaron 20µL de muestras en esta columna y se realizaron eluciones isocráticas con una fase móvil compuesta de $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ (pH 1) con metanol al 1,25% (v/v) a un ritmo de 1 ml/min a 30°C en un Waters 600E Multisolvent Delivery System y un equipo detector “Waters 486 Tunable Absorbance” a 227 nm. Usando esta técnica el umbral de detección fue de 0,2 µM. Para identificar el pico-problema se realizó en base al tiempo de retención de la 3-L-nitrotirosina auténtica y experimentos previos así como análisis espectrales ultravioleta y fluorescente de los aminoácidos identificados en el

cromatograma. La cantidad de nitrotirosina presente en la muestra se calculó determinando el área de los picos identificados (Waters Integrator 746 Data Module) y expresados en nM/g de tejido.

5. PROTOCOLO DE EXPERIMENTOS

Este trabajo está compuesto por 12 grupos de experimentos de 6-8 conejos cada uno, definidos por la duración y la medicación utilizada. Siguiendo el modelo experimental

descrito y las graduaciones detalladas utilizamos los dos tipos de lesión esofágica dependiendo del tiempo y los días de perfusión, para demostrar los efectos de diferentes medicaciones moduladoras de NO y superóxido (cf. II. 2.3. en pag. 80)

GRUPO	FARMACO	DOSIS	PERFUSION	DIAS
ESOFAGITIS DE ALTO GRADO				
A1	CONTROL	-	45 min / 12 h	5
B1	SOD	1mg /kg/ día	45 min / 12 h	5
B2	SOD	2,5mg /kg/ día	45 min / 12 h	5
B3	SOD	5mg /kg/ día	45 min / 12 h	5
C1	L-NNA	10mg /kg/ día	45 min / 12 h	5
D1	NPS	0,4mg /kg/ día	45 min / 12 h	5
D2	NPS	1mg /kg/ día	45 min / 12 h	5
D3	NPS	4mg /kg/ día	45 min / 12 h	5
E1	DEXAMETASONA	2mg /kg/ día	45 min / 12 h	5
E2	DEXAMETASONA	0,5mg /kg/ día	45 min / 12 h	5
ESOFAGITIS DE BAJO GRADO				
A2	BAJO GRADO	CONTROL	30 min / 12 h	7
B4	SOD	20mg /kg/ día	30 min / 12 h	7
C2	L-NNA	4 mg/kg/día	30 min / 12 h	7
C3	L-NNA	10 mg/kg/día	30 min / 12 h	7
C4	L-NNA	20mg /kg/ día	30 min / 12 h	7
D4	NPS	4mg /kg/ día	30 min / 12 h	7

Tabla III. Grupos de experimentos realizados

6. ANALISIS ESTADISTICO

El tratamiento estadístico de los datos tanto cuantitativos como cualitativos se efectuó mediante los paquetes informáticos SPSS del Servicio de Epidemiología y Estadística de la Unidad Mixta de Investigación del Hospital Clínico Universitario y la Universidad de Zaragoza.

6.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

El estudio descriptivo se realizó expresando los resultados de las variables cuantitativas continuas con los estadísticos de tendencia central y de dispersión como son la media, la desviación estándar y el error estándar. Para las variables cualitativas se emplearon la tabla de frecuencias absolutas y de porcentajes.

6.2. ESTUDIO INFERENCIAL

Para demostrar diferencias entre grupos con variables de categoría se utilizó el test de Fisher. Para analizar el índice, las puntuaciones de la esofagitis, el grado de lesión y la actividad de la NOS se utilizaron los test de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney.

IV. RESULTADOS

1. EFECTOS DEL NO EN LA ESOFAGITIS EXPERIMENTAL

1.1. ESOFAGITIS DE BAJO GRADO

1.1.A. MODELO EXPERIMENTAL

En el grupo control de esofagitis de bajo grado (7 días) sin ninguna medicación o grupo A2, se demostraron lesiones poco importantes. Macroscópicamente se caracterizó por

edema, hiperemia y alguna erosión aislada no confluyente y sin sangrado (fig.3). Microscópicamente se observaron muy importantes cambios reactivos epiteliales, como hiperplasia basal, papilomatosis y ortoparaqueratosis (fig. 4). El infiltrado inflamatorio era poco importante y como se observaba también macroscópicamente la pérdida epitelial era superficial y escasa (fig. 5).



Fig. 3. Microscopía: Esofagitis de bajo grado con edema y alguna erosión aislada

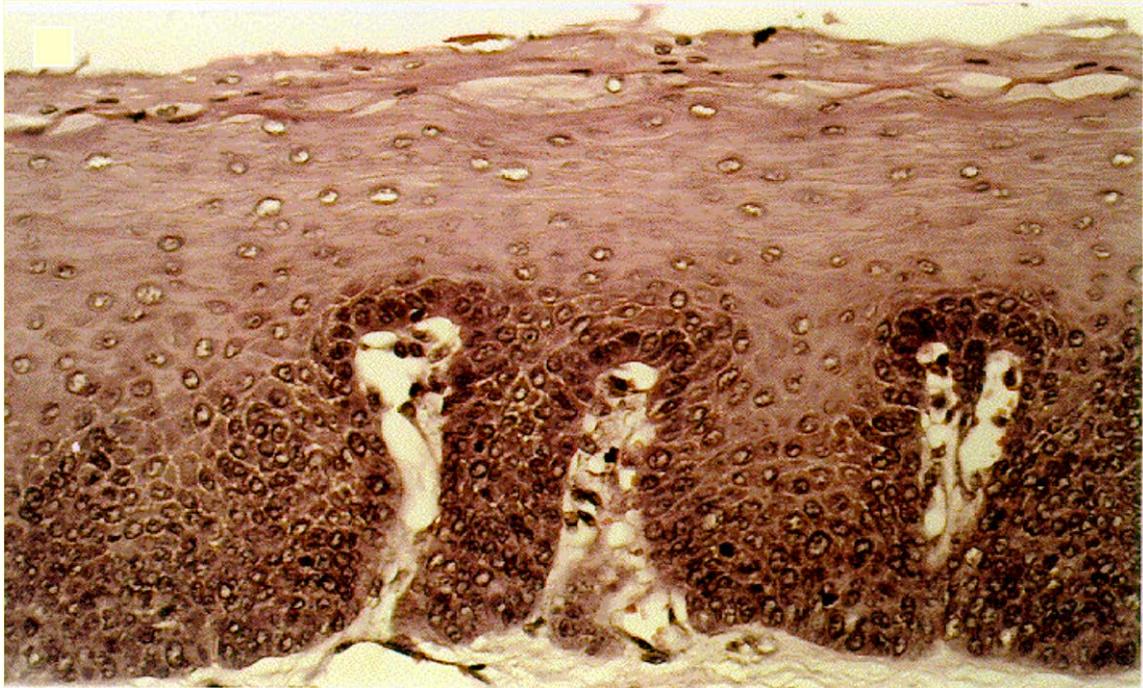


Fig. 4. Esofagitis leve con cambios reactivos de papilomatosis e hiperplasia basal

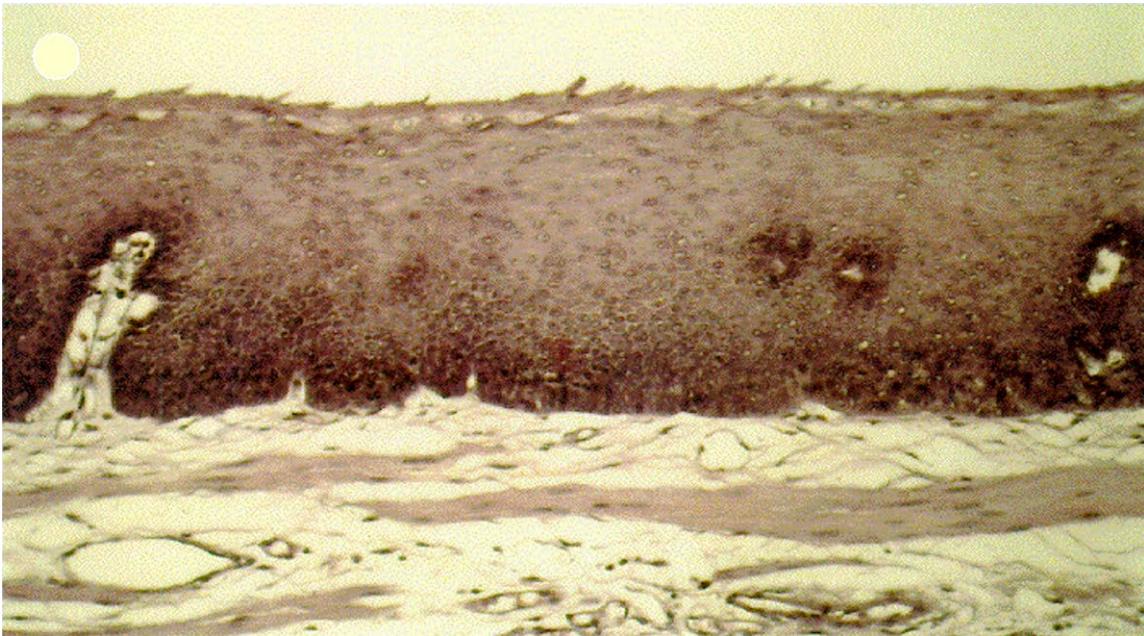


Fig. 5 Microscopía: Esofagitis leve con papilomatosis, hiperplasia basal, vasodilatación y edema de la submucosa.

1.1.B. EFECTO DE LOS LIBERADORES DE NO

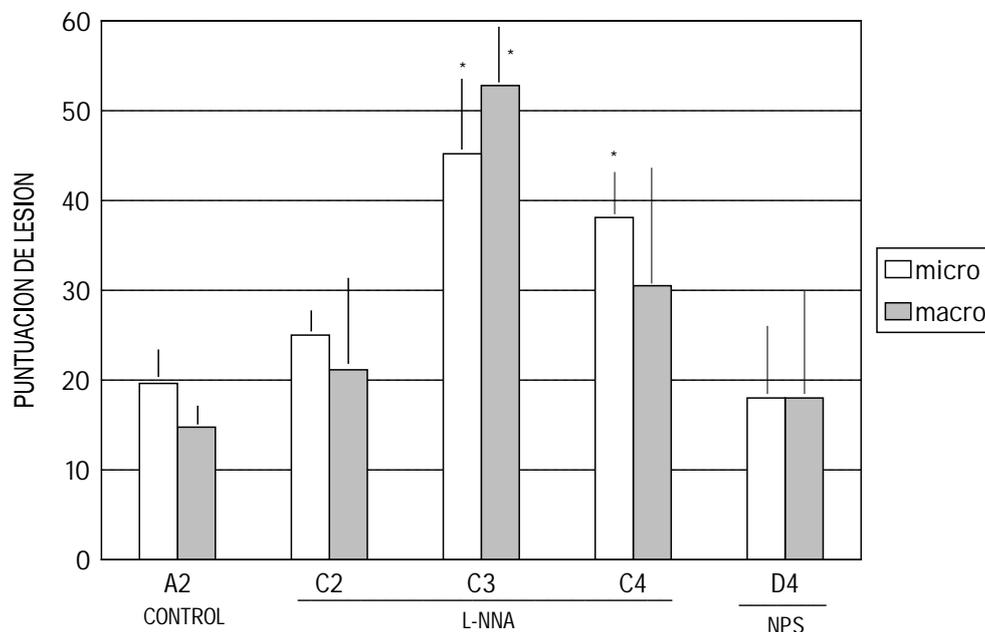
Tratando los conejos con el donante de NO nitroprusiato sódico (NPS) a dosis máxima (4mg/kg/día) no se disminuyó ni aumentó la lesión respecto al control, microscópica ni macroscópicamente en este modelo de bajo grado de esofagitis (tabla IV y fig.6). Constatamos en mediciones colaterales que estas dosis de NPS aumentan realmente los nitritos en sangre, metabolitos del NO (figura 8 en 1.3.).

1.1.C. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DEL NO

Al inhibir la síntesis de NO con L-NNA, aumentó el grado de lesión de forma dosis-dependiente. La puntuación o “score” macroscópico de lesión fue significativamente mayor en los grupos C3 (L-NNA a 10 mg/kg/día) y C4 (L-NNA a 20 mg/kg/día) que en el control A2 (con $\rho < 0,05$). La graduación microscópica también reflejaba una mayor lesión con el tratamiento de L-NNA y existía una diferencia entre el control y C2 (L-NNA a 4 mg/kg/día) y alcanzaba la significación estadística con C3 y C4 frente al control A2 (tabla IV y fig.6).

TABLA IV: “SCORE “o puntuación macroscópica y microscópica de la esofagitis de bajo grado con moduladores del NO.			
GRUPO	n	SCORE MACRO	SCORE MICRO
CONTROL (A2)	8	14,75 ± 3	19,62 ± 4,94
L-NNA 4mg (C2)	7	21,14 ± 13,92	25 ± 3,47
L-NNA 10mg (C3)	6	52,8 ± 22 *	45,2 ± 9,66 *
L-NNA 20mg (C4)	6	24,25 ± 19	38,1 ± 6,39 *
NPS 4mg (D4)	6	18 ± 13	18 ± 7,69

* $\rho < 0,05$ frente al control A2. n= número de conejos que constituye cada grupo de experimentos. “Score” es la puntuación de la lesión considerados todos los parámetros, de 0 a 100.



*Fig. 6. Puntuación de la lesión en la esofagitis leve con diferentes moduladores de NO
Las dosis de las medicaciones son las mismas que en la tabla IV*

* $p < 0,05$ frente al control A2

En el análisis detallado de las lesiones macroscópicas vimos que en los grupos tratados con L-NNA se produjo pérdida epitelial (erosión o úlcera) y hemorragia mucosa, que no ocurría en el grupo control o en el tratado con NPS (D4). La hemorragia fue más frecuente y grave en los grupos con altas dosis de L-NNA (C3 y C4).

Microscópicamente se observaron los mismos fenómenos, y el infiltrado inflamatorio era más importante en los grupos con inhibidor de NO que en el control o en el grupo tratado con NPS. En general el grado de inflamación fue paralelo al grado de lesión mucosa (tabla V).

TABLA V: Cambios microscópicos y macroscópicos en la esofagitis de bajo grado con diferentes tratamientos.

GRUPO	n	INFLAMACION (a)		HEMORRAGIA (b)		P. EPITELIAL n (%)
		n (%)	x ± ES	n (%)	x ± ES	
A2	8	1 (12,5)	0,7 ± 0,36	0 (0)	0,2 5± 0,16	1 (12,5)
C2	7	2 (28,5)	0,6 ± 0,4	1 (14,2)	0,5 ± 0,24	6 (85,7) *
C3	6	4 (66,6) *	1,4 ± 0,4 *	3 (50)*	1,5 ± 0,5*	5 (83) *
C4	6	3 (50) *	1,2 ± 0,5 *	3 (50)*	1,3 ± 0,75*	6 (100) *
D4	6	2 (33,3)	1 ± 0,47	1 (16,6)	0,5 ± 0,5	1 (16,6)

* con significación estadística $\rho < 0,05$ frente al control A2.

(a) : INFLAMACION; n = casos con inflamación de grado moderado o grave, se excluyen aquí los casos de inflamación leve focal. Puntuación x ± Error Standard; 0 = no inflamación; 1 = leve (leve intensidad y focal); 2 = leve intensidad con extensión difusa o moderado a grave en intensidad pero focal. 3 = grave (moderado a grave en intensidad y difuso).

(b) : HEMORRAGIA; n = sólo incluye los casos con hemorragia macroscópica moderada o grave, se excluye si leve. Puntuación: x ± Error Standard; 0 = no hemorragia; 1 = leve (petequias); 2 = moderada (lineal o confluyente focal o petequeial difusa); 3 = grave (lineal o confluyente difusa).

© : PERDIDA EPITELIAL; n = casos con erosión y/o úlcera tanto focal como difusa.

En los cambios reactivos epiteliales secundarios al daño producido, no había diferencias significativas entre los grupos tratados y el control, excepto que

se observó menos ortoparaqueratosis en los conejos tratados con L-NNA que sin éste (tabla VI).

TABLA VI: CAMBIOS EPITELIALES REACTIVOS EN LA ESOFAGITIS DE BAJO GRADO Y CON DIFERENTES TRATAMIENTOS MODULADORES del NO

GRUPO	n	HIPERPLASIA	PAPILOMATOSIS	ORTOPARA-	
		BASAL n (%)	n (%)	QUERATOSIS n (%)	
CONTROL	A2	8	7 (87,5)	5 (62,5)	8 (100)
L-NNA 4 mg	C2	7	7 (100)	5 (71,4)	3 (50) *
L-NNA 10 mg	C3	6	6 (100)	0 (0)*	2 (33,3) *
L-NNA 20 mg	C4	6	6 (100)	3 (50)	3 (50) *
NPS 4 mg	D4	6	3 (50)	3 (50)	4 (66,6)

* $\rho < 0,05$ frente al control A2. Las dosis de los fármacos son en mg / kg de peso / día, repartidas en dos dosis.

1.2. ESOFAGITIS DE ALTO GRADO

1.2.A. MODELO EXPERIMENTAL

La esofagitis de alto grado (5 días) se caracterizó por lesiones muy importantes, con erosiones y úlceras visibles macroscópicamente, a menudo difusas y con hemorragias submucosas lineales y confluyentes (fig. 7).

Microscópicamente destacaba además de la pérdida epitelial generalizada, un infiltrado celular inflamatorio polimorfonuclear difuso (fig. 8). Se observó una menor presencia de cambios reactivos epiteliales que en la esofagitis de bajo grado, condicionado por la ausencia de epitelio en muchas zonas ulceradas.



Fig. 7. Esofagitis de alto grado: aspecto macroscópico con erosiones y ulceraciones y sangrado del tercio distal del esófago.



Fig. 8. Microfotografía de la esofagitis de alto grado: pérdida epitelial con intenso edema e infiltración por células inflamatorias de la mucosa y submucosa.

1.2.B. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE NO

En este modelo de esofagitis de alto grado (grupo A1), el inhibidor de la NOS no aumentó significativamente el daño producido (grupo C1 a dosis de 10 mg/kg/día), a diferencia de lo que ocurría en el modelo de bajo grado cuando tratábamos con L-NNA. La dexametasona (grupos E1 y E2) mejoró de forma significativa la lesión siguiendo una curva dosis-dependiente (tabla VII y figura 9).

1.2.C. EFECTO DE LOS LIBERADORES DE NO

La administración de dosis bajas de NPS, liberador de NO, en los grupos D1 (0,4 mg/kg/día) y D2 (1 mg/kg/día), indujo una disminución del daño respecto al control.

Con dosis más altas de NPS (4 mg/kg/día en D3), que como veremos repercutía en la tensión arterial con un descenso mantenido y significativo (ver figura 11 en 1.4), no se atenúa la lesión respecto al control, sino que empeoraba ligeramente (resultados en tabla VII y fig. 9).

TABLA VII: “SCORE” O PUNTUACIONES MACRO Y MICROSCOPICA EN LA ESOFAGITIS DE ALTO GRADO CON DIFERENTES MODULADORES DEL NO

GRUPO	n	SCORE MACRO	SCORE MICRO	
CONTROL	A1	9	60,8 ± 22	57,66 ± 8,1
L-NNA 10mg	C1	6	52 ± 29,7	56,2 ± 10,51
NPS 0,4 mg	D1	6	45,5 ± 17,3	51,5 ± 8,04
NPS 1 mg	D2	10	21,7 ± 15 **	34,20 ± 5,33 *
NPS 4 mg	D3	6	58 ± 24,4	67,4 ± 6,4
Dexametasona 2mg	E1	6	30 ± 10 *	28 ± 6,81 *
Dexametasona 0,5	E2	6	12,8 ± 12,04 **	21.16 ± 4,78 **

* $\rho < 0,05$; ** $\rho < 0,005$ frente al control A1. n = tamaño de la muestra.

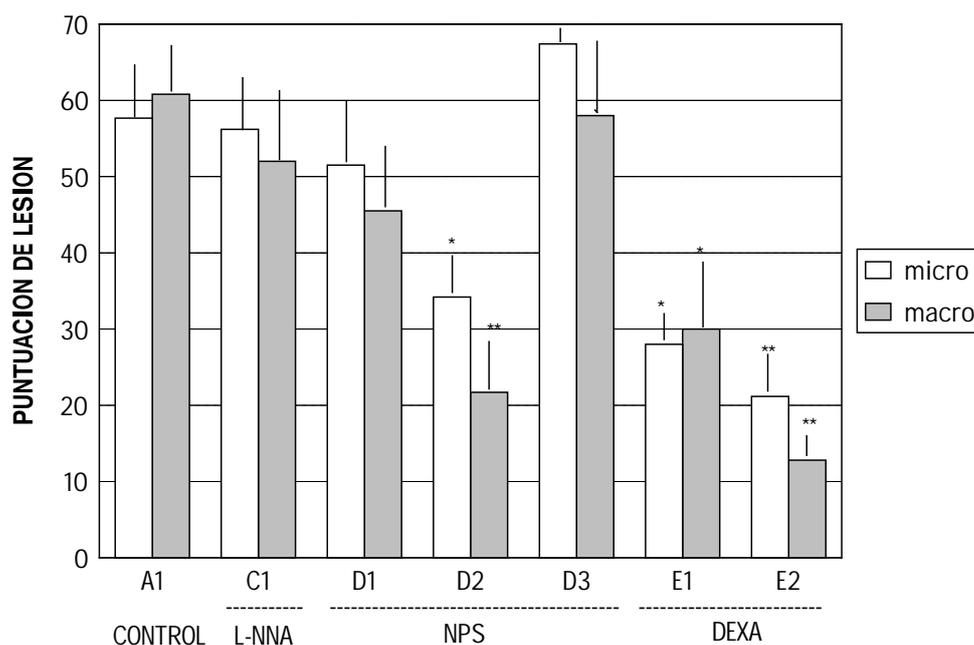


Fig. 9. Esofagitis de alto grado: puntuación de la lesión con los moduladores del NO.

Ver tabla VII para las dosis de las medicaciones. * $\rho < 0,05$; ** $\rho < 0,005$ frente al control A1.

n = tamaño de la muestra

Los parámetros de lesión como son la hemorragia macroscópica y la pérdida epitelial (erosión o úlcera; tabla VIII) sólo disminuyeron con la dosis más baja de NPS y con dexametasona; la mejoría

fue significativa con la dosis baja de corticoide de 0,5 mg/kg/día (E1) y muy significativa con la dosis más alta de 2 mg/kg/día (E2).

TABLA VIII: ALTERACIONES MACRO Y MICROSCOPICAS EN LA ESOFAGITIS DE ALTO GRADO					
GRUPO	INFLAMACION (a)		HEMORRAGIA MUCOSA (b)		P.EPITELIAL
	n(%)	puntos	n (%)	x ± ES	
A1	7 (77,7)	2,11± 0,42	7 (77,7)	2,22 ± 0,27	9 (100)
C1	6 (100)	2,40 ± 0,22	3 (50)	1,4 ± 0,50	5 (83,3)
D1	6 (100)	2,33 ± 0,21	2 (33,3)	0,83 ± 0,40 *	5 (83,3)
D2	4 (40)	1,5 ± 0,22	6 (60)	1,8 ± 0,24	8 (80)
D3	5 (83,3)	2,6 ± 0,4	6 (100)	3 ± 0	5 (83,3)
E1	3 (50)	1 ± 0,60	2 (33,3)	0,66 ± 0,31 *	3 (50)
E2	3 (50)	1 ± 0,44 *	0 (0) **	0,5 ± 0,22	3 (50)

* $\rho < 0,05$; ** $\rho < 0,005$ frente al control A1. Ver dosis y medicaciones por grupos en tabla VII.

(a): INFLAMACION; Microscópico. n = casos con inflamación de grado moderado o grave, se excluyen aquí los casos de inflamación leve focal. Puntuación $x \pm$ Error Standard; 0 = no inflamación; 1 = leve (leve intensidad y focal); 2 = leve intensidad con extensión difusa o moderado a grave en intensidad pero focal. 3 = grave (moderado a grave en intensidad y difuso).

(b): HEMORRAGIA MACROSCOPICA; n = conejos con hemorragia moderada o grave, se excluye si leve. Puntos: media $X \pm$ error standard ES con 0 = sin hemorragia; 1 = leve (petequias); 2 = moderada (lineal, confluyente o petequias difusas) y 3 = grave (lineal o confluyente difusas).

(c): PERDIDA EPITELIAL; n = casos con erosión y/o úlcera tanto focal como difusa.

No hubo diferencias entre los distintos grupos en cuanto a cambios reactivos epiteliales ante la agresión; tan sólo

destacaba una mayor papilomatosis en los conejos tratados con dexametasona (E1 y E2).

TABLA IX: CAMBIOS REACTIVOS EPITELIALES EN LA ESOFAGITIS DE ALTO GRADO CON DIFERENTES TRATAMIENTOS MODULADORES DEL NO

GRUPO		HIPERPLASIA	PAPILOMATOSIS	ORTOPARA-
		BASAL		QUERATOSIS
		n (%)	n (%)	n (%)
CONTROL	A1	6 (66,6)	0 (0)	3 (33,3)
L-NNA 10 mg	C1	5 (83,3)	2 (33,3)	2 (33,3)
NPS 0,4 mg	D1	4 (66,6)	2 (33,3)	3 (50)
NPS 1 mg	D2	10 (100)	4 (40)	5 (50)
NPS 4 mg	D3	4 (66,6)	3 (50)*	2 (33,3)
Dexametasona 2 mg	E1	4 (66,6)	4 (66,6)*	4 (66,6)
Dexametasona 0,5 mg	E2	6 (100)	5 (83,3)**	5 (83,3)

* $\rho < 0,05$ y ** $\rho < 0,005$ frente al control.

n = número de esófagos que presentan la alteración

**1.3. NITRITOS Y NITRATOS:
METABOLITOS DEL NO**

Se constató un aumento de los niveles de nitratos en sangre con todas las dosis de NPS; con la menor dosis utilizada en el protocolo (0,5 mg/ kg) el aumento fue significativo a los 45 min

de su administración y con la dosis mayor (2 mg/ kg) el aumento fue significativo desde los 15 minutos hasta la finalización de los 45 min (fig. 10). Estos metabolitos prueban que realmente se libera NO con la medicación utilizada.

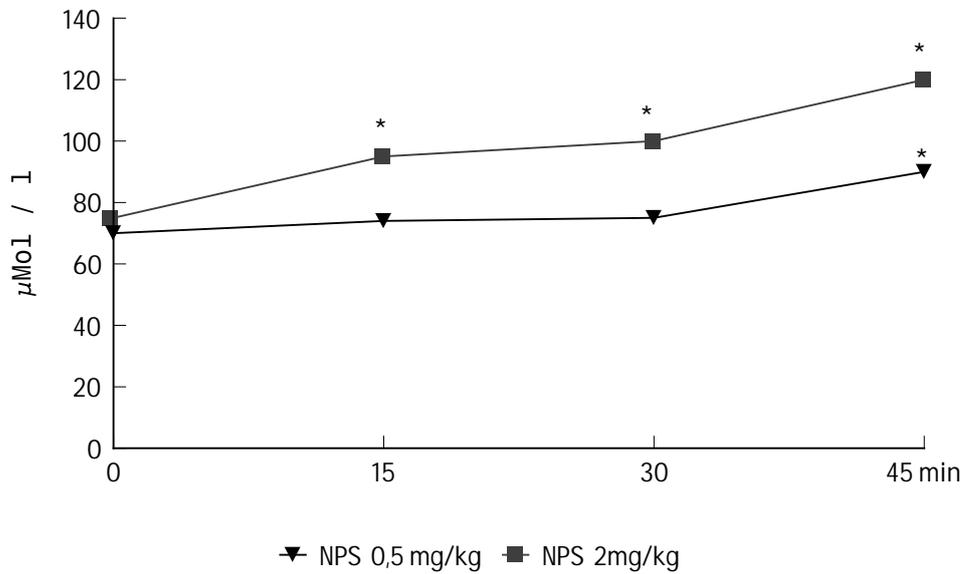


Figura 10: Efecto de dos dosis diferentes de NPS sobre el nivel de nitratos en sangre a lo largo de 45 minutos.

* $\rho < 0,05$ frente al nivel basal

1.4. EFECTO DE LOS MODULADORES DEL NO EN LA PRESION ARTERIAL

La tensión arterial no se vió afectada de forma importante con la mayoría de tratamientos moduladores de NO utilizados. En los grupos tratados con NPS se indujo una caída inicial de tensión, en general de corta duración; 5 minutos, seguida de recuperación de las cifras basales y que no bajó por debajo de los 80 mmHg en ningún caso. Sólo se mantuvo la bajada de tensión durante los 45 minutos en el grupo de mayor dosis

(20 mg/kg/día), pero nunca por debajo de los 80 mmHg (fig. 9).

Los grupos tratados con L-NNA a dosis más altas de 20 mg/kg/día, experimentaron una ligera subida de la tensión arterial, sin llegar a los 140 mmHg, que se mantuvo durante los 45 minutos (duración de la perfusión de suero acidificado con pepsina). En los grupos de menor dosis no se objetivaron cambios en la tensión arterial a lo largo de 45 minutos.

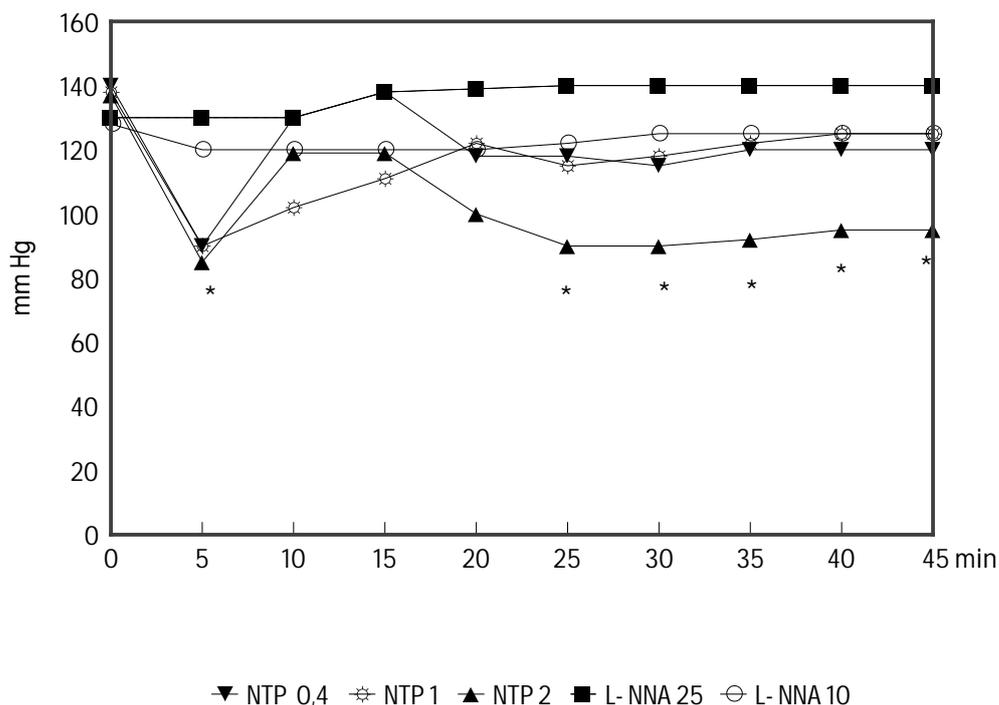


Figura 11: Efecto de las diferentes medicaciones moduladores del NO (NPS y L-NNA) sobre la presión arterial.

* $p < 0,05$ frente a la cifra basal de cada grupo. Los datos son las medias de 4 mediciones (n=4).

**2. EFECTOS DEL ANION
SUPEROXIDO EN LA ESOFAGITIS
EXPERIMENTAL**

2.1. LESION MUCOSA CON SOD

Los grupos tratados con el “barredor” de superóxido, la SOD o superóxido dismutasa, mostraron una drástica reducción de la lesión mucosa, de todos sus parámetros indicadores así como del infiltrado inflamatorio. Esta

mejoría se observó principalmente en el modelo de esofagitis de alto grado (5 días), ya que en el otro modelo de bajo grado (7 días) la mejoría fue leve y no significativa (tabla X).

Las lesiones hemorrágicas mucosas desaparecieron en todos los grupos tratados con SOD, así como tampoco se observó ninguna pérdida epitelial. Los cambios reactivos epiteliales estaban presentes sin diferencia respecto a los grupos control A1 y A2 (tabla XI).

TABLA X: PUNTUACIONES MACRO Y MICROSCOPICAS DE LA LESION EN LA ESOFAGITIS DE BAJO Y ALTO GRADO TRATADAS CON SOD

GRUPO	n	MACRO	MICRO	INFLAMACION (a)	
				n (%)	puntos
ALTO GRADO A1	9	60,8	57,66 ± 8,1	7 (77)	2,11 ± 0,42
SOD 1 mg/kg B1	6	4,8 ± 2	16 ± 1**	0 (0)**	0,2 ± 0,2**
SOD 2,5 B2	6	10,2 ± 6,4	14,2 ± 2,1**	0 (0)**	0,66 ± 0,33*
SOD 5 B3	6	4,5 ± 3,5	11,83 ± 2,6**	1 (16,6)*	0,75 ± 0,36*
BAJO GRADO A2	8	14,75 ±	19,6 ± 4,94	1 (12,5)	0,7 ± 0,36
SOD 2,5 B4	6	8 ± 2,1	17,1 ± 54	0 (0)	0,88 ± 0,2

(a): INFLAMACION; n = casos con inflamación de grado moderado o grave, se excluyen aquí los casos de inflamación leve focal. Puntuación $x \pm$ Error Standard; 0 = no inflamación; 1 = leve (leve intensidad y focal); 2 = leve intensidad con extensión difusa o moderado a grave en intensidad pero focal. 3 = grave (moderado a grave en intensidad y difuso).

* $\rho < 0,05$ y ** $\rho < 0,005$ frente al control respectivo; A1 para B1-B2 y B3. A2 para B4.

TABLA XI: CARACTERISTICAS MACROSCOPIAS Y MICROSCOPICAS Y CAMBIOS REACTIVOS EPITELIALES EN LA ESOFAGITIS TRATADA CON SOD

GRUPO	HEMORRAGIA ^a		P. EPITELIAL	HIPERPLASIA BASAL	PAPILOMATOSIS	ORTOPARA- QUERATOSIS
	n (%)	puntos				
A1	7 (77)	2,2 ± 0,27	9 (100)	6 (66)	0 (0)	3 (33,3)
B1	0 (0)**	0,6 ± 0,24**	0 (0)**	6 (100)	5 (83,3)**	4 (66,6)
B2	0 (0)**	0,6 ± 0,24**	0 (0)**	3 (50)	2 (33,3)	4 (66,6)
B3	0 (0)**	0,17 ± 0,16**	0 (0)**	6 (100)	2 (33,3)	4 (66,6)
A2	0 (0)	0,25 ± 0,16	1 (12,5)	7 (87,5)	7 (87,5)	8 (100)
B4	0 (0)	0,4 ± 0,24	0 (0)	3 (50)	6 (100)	6 (100)

* $\rho < 0,05$ ** $\rho < 0,005$ frente al control.

a: HEMORRAGIA; n = sólo incluye los casos con hemorragia macroscópica moderada o grave, se excluye si leve. Puntuación: $x \pm$ Error Standard; 0 = no hemorragia; 1 = leve (petequias); 2 = moderada (lineal o confluyente focal o petequial difusa); 3 = grave (lineal o confluyente difusa).

3. ACTIVIDAD DE LA NOS EN LA MUCOSA ESOFAGICA

Con la tinción histoquímica para la NADPH-diaforasa, que refleja la presencia de actividad NOS, se detectó intensa actividad de este enzima en el epitelio del esófago del conejo, el endotelio de los vasos y en las capas musculares (fig. 12.)

En condiciones basales se detecta actividad NOS en la mucosa del esófago del conejo que representa un 9,2 % de la actividad que existe en el hígado del mismo animal ($37,7 \pm 9,1$ vs. 401 ± 35). La NOS de la mucosa del esófago está compuesta en un 85% por cNOS y el 15% restante por iNOS.

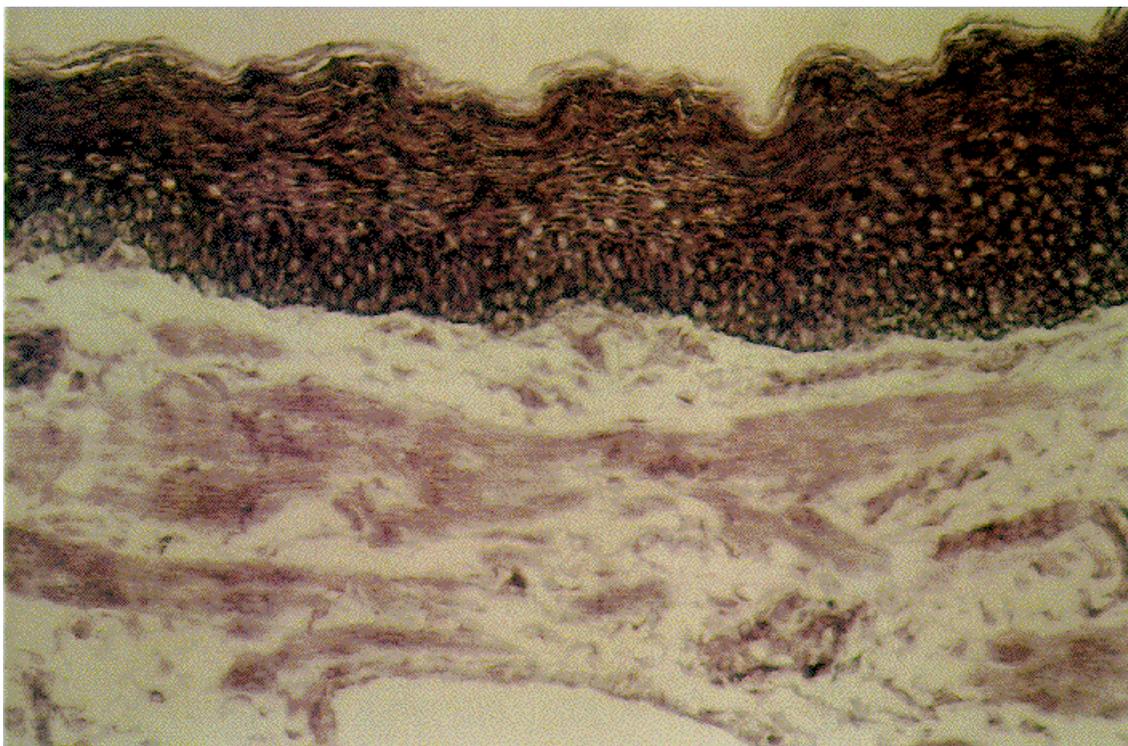


Fig. 12. Tinción histoquímica para la NADPH-diaforasa en el esófago. Muestra la presencia de actividad NOS en el epitelio de la mucosa, endotelio vascular y capas musculares.

3.1. ACTIVIDAD DE LA NOS EN LA ESOFAGITIS DE BAJO GRADO

3.1.A. VARIACION DE LA ACTIVIDAD NOS EN EL TIEMPO EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE BAJO GRADO

La actividad de la NOS aumentó en el modelo de esofagitis crónica de bajo grado (grupo A2) frente a esófagos control sanos sin perfusiones (grupo O).

Este aumento se debió principalmente a la NOS constitutiva, y la inducible aumentó en menor proporción. Vemos que este aumento de NOS es más importante los primeros días y paulatinamente disminuye al final del experimento aunque a niveles muy por encima del basal. Si se alarga el número de perfusiones hasta 20 días para estimar la actividad del enzima NOS, se observa que ésta vuelve a niveles basales (tabla XII).

TABLA XII: VARIACION DE LA NOS EN EL TIEMPO EN LA ESOFAGITIS DE BAJO GRADO				
	CONTROL	DIA 3	DIA 7	DIA 20
LESION (a)	0	23 ± 4,3	19,6 ± 5	9,5 ± 0,7
NOS total (b)	37,3 ± 9	111 ± 9*	85 ± 32*	27 ± 15,6
i NOS	5,4 ± 3	26 ± 3,6*	2,3 ± 2	2,2 ± 2,2

(a) Lesión de la mucosa siguiendo la puntuación establecida de 1 a 100. (b) Actividad NOS medida en pmol / min / g. de tejido.* $p < 0,05$ vs. control en la actividad enzimática.

3.1.B. ACTIVIDAD DE LA NOS EN EL MODELO DE BAJO GRADO CON DIFERENTES TRATAMIENTOS

El tratamiento con L-NNA a dosis de 10 mg/kg/día (grupo C3) inhibió este incremento de la NOS de forma significativa estadísticamente frente al grupo sin tratamiento (A2) y al

control (O), y que vimos cómo este tratamiento se asociaba a un aumento del daño producido (cf. 1.1.C). En el grupo tratado con SOD a 2,5 mg/kg/día se produjo un aumento de la NOS, y aunque menor que en el grupo control A2 sin SOD, no había diferencias significativas (fig. 13).

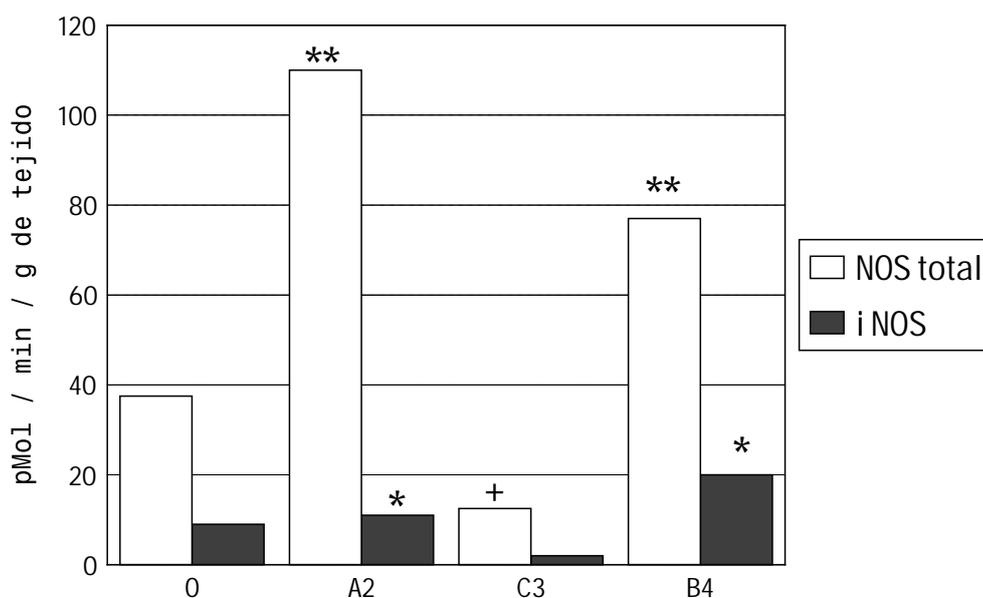


Figura 13: Actividad de la NOS total e iNOS en los grupos de esofagitis de bajo grado con diferentes tratamientos.

Grupo O; control sano sin perfundir. A2; esofagitis leve sin tratamiento, C3 con L-NNA y B4 con SOD. * $\rho < 0,05$ y ** $\rho < 0,005$ frente al control O. + $\rho < 0,05$ frente al grupo A2.

3.2. ACTIVIDAD DE LA NOS EN LA ESOFAGITIS DE ALTO GRADO

3.2.A. ACTIVIDAD DE LA NOS EN EL MODELO DE ALTO GRADO A LO LARGO DEL TIEMPO

En el modelo de esofagitis de alto grado (grupo A1 con 5 días) se detectó un aumento de la actividad de la NOS total principalmente a expensas

de la cNOS los primeros días de perfusiones, para progresivamente disminuir a niveles cercanos a los basales. Al final del experimento (día 5) no se detectaba aumento de actividad de la NOS en la mucosa respecto al inicio, y no hubo diferencia con el grupo control sin lesión (tabla XIII).

TABLA XIII: VARIACION DE LA NOS EN EL TIEMPO EN LA ESOFAGITIS DE ALTO GRADO

	CONTROL	DIA 1	DIA 3	DIA 5
LESION	0	15 ± 3,2	44 ± 7	57 ± 8*
NOS total	37,7 ± 9	94 ± 14,9*	70 ± 14	32,4 ± 20
i NOS	5,4 ± 3	20 ± 3,3*	22 ± 20	11,4 ± 6,6

La lesión se puntúa de 1 a 100 como se describe en el texto. La actividad NOS se mide en pmol / min /g de tejido.

* $\rho < 0,05$ vs. el control en la actividad enzimática y vs. día 1 en la lesión mucosa.

3.2.B. ACTIVIDAD NOS EN EL MODELO DE ALTO GRADO CON DIFERENTES TRATAMIENTOS

Sin embargo en el grupo con tratamiento concomitante con SOD a 2,5 mg/kg/día (grupo B2) se observó un aumento significativo de la NOS total y de la iNOS frente al grupo O de conejos

sin tratar ni perfundir, y también de forma paralela al grupo A1 (fig.14). Este grupo B2, como vimos en resultados previos, mostraba una disminución del daño mucoso (cf. 2.1.).

En el grupo tratado con dexametasona a dosis de 0,5 mg/kg/día, que mostró también franca mejoría con disminución de las lesiones (cf. 1.2.C.),

no se detectó un aumento asociado de actividad de la NOS. Se comprobó una diferencia significativa en este punto frente al grupo tratado con SOD (B2).

El tratamiento con NPS a dosis de 1 mg/kg/día, que como demostramos producía disminución muy significativa

del daño mucoso, sí que ofreció un aumento de la NOS a cargo principalmente de la iNOS. Este aumento fue estadísticamente significativo frente al grupo de esofagitis sin tratamiento (grupo A1) y al grupo control sin perfundir (grupo O).

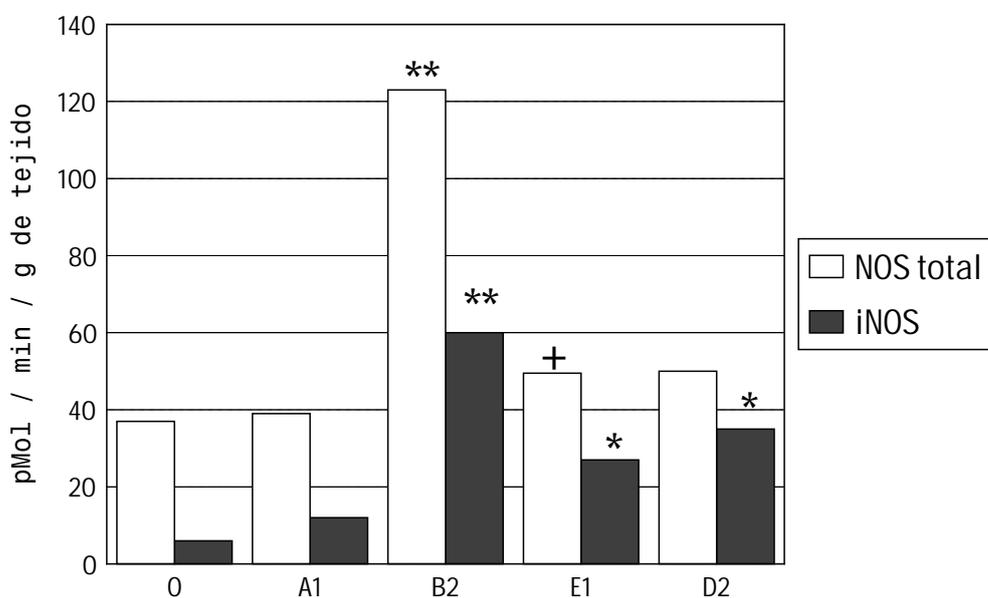


Figura 14: Actividad de NOS total e iNOS en los grupos de lesión de alto grado con diferentes tratamientos.

Grupo O; conejos sanos sin perfundir. A1; esofagitis de 5 días sin tratamiento, B2; tratados con SOD. E1; tratados con dexametasona y D2 con dosis intermedia de NPS.

4. PRODUCCION DE RADICALES LIBRES EN LA ESOFAGITIS

4.1. PRODUCCION DE ANIONES SUPEROXIDO

Hemos determinado la producción del anión superóxido en células aisladas de la mucosa esofágica en los dos diferentes modelos de esofagitis y en el esófago sin perfundir como control. Se comprobó por este método que realmente había un aumento en la generación de este anión en la esofagitis crónica experimental respecto a células mucosas esofágicas sin lesión ácido-péptica. Además se puso en evidencia que existía mayor producción de superóxido en las células del modelo

de esofagitis de alto grado que en el de bajo grado (tabla XIV).

Al analizar el infiltrado celular en la mucosa de ambos modelos, se comprobó que existe mayor proporción de células CD 11b (+) en el de alto grado que en el de bajo grado de lesión (tabla XIV). La producción del anión superóxido se localizó especialmente en estas células CD11b (+) con $151,25 \pm 18$ unidades de fluorescencia de media y en proporción muchísimo menor en las CD 11b (-) con $11,42 \pm 1$ unidades. Estas células con marcador CD 11b corresponden a neutrófilos, monocitos y macrófagos.

TABLA XIV: Producción de anión superóxido y células CD 11b+ en los dos modelos de esofagitis y en el esófago sin lesión .

GRUPO		n	FLUORESCENCIA (a)	CELULAS CD 11b + (b) %
O	SIN LESION	6	$7 \pm 1,42$	$1,46 \pm 0,42$
A2	BAJO GRADO	6	$18,5 \pm 1,5$ **	$3,29 \pm 0,44$ *
A1	ALTO GRADO	6	$45,2 \pm 0,69$ **	$16,12 \pm 0,26$ **

a: Bromuro de etidio; medido en unidades arbitrarias de fluorescencia

b: células CD 11b; refleja la proporción en % de estas células respecto a la totalidad de células.

* $\rho < 0,05$; ** $\rho < 0,01$ frente al grupo O sano sin perfundir.

4.2. FORMACION DE PEROXINITRITOS EN LA ESOFAGITIS EXPERIMENTAL

Demostramos la producción de peroxinitritos en la mucosa esofágica midiendo la formación de nitrotirosina por HPLC, como hemos descrito, en extractos hidrolizados de esófagos con esofagitis de bajo y alto grado. No se

pudo detectar la presencia de nitrotirosina en la mucosa normal sin lesión (n = 4) y en la esofagitis de bajo grado (n = 4). Sin embargo se detectaron cantidades considerables de ésta en la mucosa esofágica de conejos con esofagitis de alto grado de lesión, con una media de $9,83 \pm 4,96$ nM/ g de tejido con n = 6.

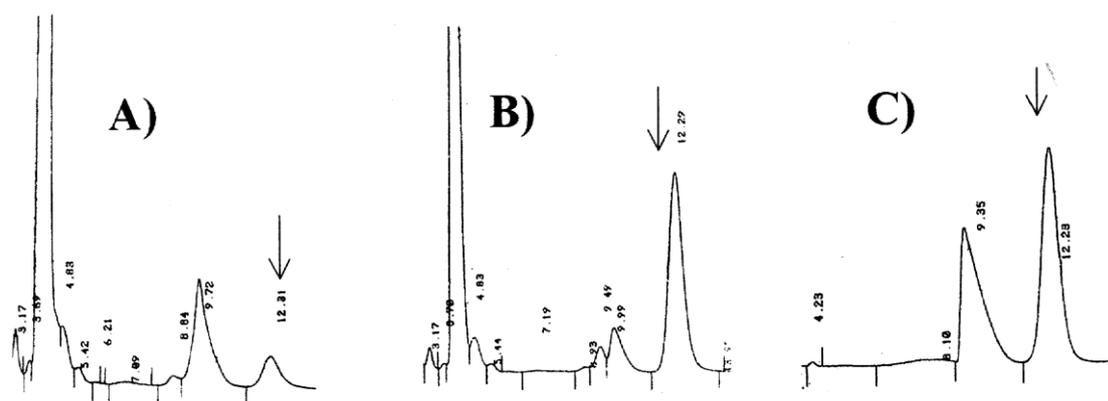


Fig. 15. Cromatograma de la nitrotirosina. A: muestra el perfil de los picos de fenilalanina y nitrotirosina por HPLC en una muestra de esofagitis de alto grado. B: muestra el perfil de la misma muestra de esófago a la que se añade nitrotirosina exógena y se suman ambos picos de nitrotirosina. C: cromatograma de ambos aminoácidos fenilalanina y nitrotirosina estándar de referencia.

V. DISCUSION

1. MODELO EXPERIMENTAL DE ESOFAGITIS

Para responder a los objetivos planteados en nuestro estudio, hemos producido dos modelos de esofagitis crónica en conejos, fácilmente reproducibles y con rasgos similares a la lesión desarrollada en el hombre. Así en la esofagitis grave por reflujo gastroesofágico en el ser humano las características microscópicas son la erosión y ulceración de la mucosa junto con una infiltración constante de la mucosa, de la lámina propia y de la muscularis mucosae con neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, en general importante. Por otra parte la esofagitis leve se caracteriza principalmente por edema, hiperemia, cambios reactivos epiteliales y un infiltrado inflamatorio mínimo. Estos cambios llamados reactivos epiteliales son la hiperplasia de células basales, la papilomatosis o elongación de papilas, la balonización celular y el aumento de mitosis celulares. Todos estos rasgos se han descrito en nuestros modelos experimentales con conejos, pasando de

un grado leve de lesión a uno grave variando el tiempo de perfusión con el agente lesivo. Esto es; se consigue una esofagitis de bajo grado con perfusiones de 30 minutos cada 12 horas durante 7 días, muy similar a la esofagitis leve humana con los cambios reactivos epiteliales descritos, un mínimo infiltrado inflamatorio y un grado de lesión epitelial leve. Sin embargo en los modelos experimentales producidos de manera aguda^(99,119) no aparecen estos cambios reactivos o son discretísimos, existe una pérdida epitelial superficial generalizada y la presencia de infiltrado inflamatorio es limitada, lo cual se aleja de la lesión vista en el hombre. De igual modo en nuestro modelo de esofagitis de alto grado destaca una extensa lesión epitelial e infiltrado inflamatorio con perfusiones más largas de 45 minutos durante 5 días que se asemeja a su vez a la esofagitis grave humana. La diferencia entre la producción de una esofagitis leve a una grave es de tan sólo 15 minutos más de perfusión. Parece que el tiempo crítico en la agresión es de 30 minutos, más allá de los cuales se produce una lesión grave. Este efecto

puede estar en relación con la capacidad de la mucosa para asegurar la homeostasis celular y evitar la necrosis durante un cierto intervalo de tiempo⁽⁶³⁾. El mecanismo de producción en nuestro modelo es también más similar al que ocurre en el ser humano con reflujo gastro-esofágico. En la enfermedad por reflujo se producen exposiciones de la mucosa esofágica al ácido de forma intermitente y repetida y no una exposición única como en los modelos habituales agudos conocidos hasta ahora^(101,121,236).

Como hemos comunicado en otro trabajo sobre nuestro modelo de esofagitis crónica, la correlación entre lesión microscópica y lesión macroscópica es muy superior a la de otros modelos experimentales previos^(236,237). Además pensamos que la utilización de este modelo para estudiar el mecanismo de lesión de la mucosa esofágica es más idóneo que los modelos agudos pues la prolongación en el tiempo de las exposiciones repetidas a lo largo de hasta una semana permiten a la mucosa adaptarse y desarrollar mecanismos de defensa que tienen lugar en el ser humano y que no se producen en los modelos de exposición única al ácido durante unas horas.

Aunque existen diferencias entre el esófago del conejo y el humano que habrá que tener en cuenta, como la ausencia de mastocitos en la mucosa del conejo contrariamente a la del hombre^(108,116), las interesantes similitudes tanto de producción de la lesión como de hallazgos histopatológicos, pueden ayudarnos a estudiar y entender los mecanismos de lesión por ácido en el hombre a través de este modelo animal fácilmente reproducible por la comunidad científica.

2. EFECTOS DEL NO Y DEL SUPEROXIDO EN LA ESOFAGITIS

Con estos dos modelos de alto y bajo grado de lesión esofágica hemos podido estudiar los efectos del NO y del anión superóxido en diferentes estados y grados de lesión mucosa. La primera conclusión que se puede deducir de los resultados expuestos es que ambas sustancias, NO y superóxido intervienen en los complejos mecanismos de lesión y defensa inducidos por la presencia de ácido y pepsina en la luz esofágica. Observamos que el grado de influencia de estos radicales en los fenómenos de lesión y defensa varía en dependencia

del tiempo de exposición al ácido y el consiguiente daño producido.

2.1. EFECTO DEL OXIDO NITRICO EN LA ESOFAGITIS EXPERIMENTAL

Hemos visto que en el estómago donde se han estudiado y se conocen mejor los mecanismos de defensa de la mucosa frente a la secreción ácida, la vasodilatación capilar es uno de los más importantes y está mediado por el NO^(199,200). Este mismo aumento de flujo vascular mediado por el NO se produce en el esófago cuando se expone a ácido intraluminal de forma experimental⁽⁸⁴⁾. También está comprobado en seres humanos que el NO está aumentado en la mucosa esofágica que sufre una esofagitis por reflujo respecto a la mucosa sana sin esofagitis⁽²⁴⁴⁾. Nuestro grupo ha demostrado que además de la vasodilatación se pone en marcha otro mecanismo defensivo más sutil que es la adaptación mucosa cuando se repiten las exposiciones al ácido, también mediado en parte por el NO⁽¹⁰¹⁾. Al bloquear el NO se anulaban estos mecanismos protectores frente a la agresión. En nuestros resultados actuales presentados, cuando conseguimos anular la síntesis

de NO con L-NNA, bloqueando la NOS total, potenciamos llamativamente la lesión de la mucosa alcanzando incluso características de alto grado con agresiones de baja intensidad. Este efecto protector del NO frente al ácido, podría estar en relación con el flujo mucoso. Aunque en nuestro trabajo no medimos flujos mucosos y sus variaciones, observamos una hiperemia en el tercio distal de la mucosa en todos los experimentos tras las perfusiones con ácido. Se ha demostrado ampliamente que el NO favorece el aumento de la perfusión sanguínea por medio de la vasodilatación capilar frente a la agresión ácido-péptica en el esófago y en el estómago^(84,200). Este fenómeno vascular participa en la resistencia mucosa o citoprotección como demostró nuestro grupo en la inducción de lesiones agudas en la mucosa de esófagos de conejo⁽¹⁰¹⁾. En este trabajo citado demostramos con un modelo de esofagitis aguda que bloqueando la NOS desaparece el fenómeno de adaptación⁽¹⁰¹⁾; este aspecto podría tener mayor importancia en nuestro modelo crónico con agresiones repetidas durante varios días. Al utilizar L-NNA eliminamos también este mecanismo de defensa. Además de favorecer el flujo

mucoso con la vasodilatación y la resistencia tisular, el NO impide la oclusión de la microcirculación por microtrombos inhibiendo la agregación y adhesión plaquetarias^(177,223,225) que acontece en la inflamación y frena este proceso inflamatorio inhibiendo la adhesión y activación de los leucocitos^(179,221,226). Otros autores han demostrado el efecto protector que el NO desempeña en las fases precoces del daño tisular por diferentes agresiones^(221,222), manteniendo la integridad de la permeabilidad vascular en la mucosa. En la agresión de baja intensidad de nuestro modelo de bajo grado, el NO aumenta ejerciendo efectos protectores; no se produce disrupción de la mucosa y al inhibirlo aumenta la vulnerabilidad de la mucosa frente a esta misma agresión con aumento significativo de la lesión.

Sin embargo en la esofagitis de alto grado cuando añadimos L-NNA no hay cambios en la gravedad de las lesiones. En este tipo de lesión producida por una exposición más larga a los mismos agentes dañinos, se observa una importante pérdida epitelial que es en parte donde se localiza la NOS productora del NO. La NOS en el esófago se ha detectado principalmente

en el epitelio, endotelio de los vasos de la submucosa y en los plexos mientéricos, y en menor grado en la muscularis mucosae y la muscularis propria^(167,168). Hemos demostrado que en esta esofagitis de alto grado no se produce un aumento de la actividad de la NOS que hemos relacionado con la pérdida epitelial extensa de la mucosa. Por lo tanto aunque se añada L-NNA no se puede modular la lesión puesto que no hay variaciones en la expresión del enzima y la lesión es ya considerable.

Cuando se aumenta de forma exógena el NO añadiendo NPS como generador de éste, no se ven cambios significativos en la lesión de bajo grado; ni mejoría ni empeoramiento. Sin embargo sí que produce cambios en la esofagitis de alto grado, en la que no se detectaba aumento de NOS. Al añadirlo exógenamente se observa una disminución de la lesión mucosa con dosis bajas, que todavía disminuye más con la dosis intermedia. Cuando se administra el NPS a dosis intermedia en la agresión intensa, disminuye la lesión epitelial a rangos de bajo grado con escasa erosión y ulceración y por lo tanto mucosa mantenida (puntuaciones de 20 / 30) y vemos paralelamente un aumento significativo de la NOS

(principalmente iNOS). Esto apoyaría nuestra hipótesis de que la NOS no aumenta en la lesión de alto grado porque ha desaparecido el epitelio donde se ubica y que cuando éste está sí se detecta un incremento de la actividad enzimática en cuestión. Sorprendentemente con la dosis más alta de NPS se produce un aumento de la lesión cercana a la del control de alto grado. Por lo tanto niveles bajos de NO parecen ser beneficiosos en la defensa ante la agresión intensa, como suplemento que favorece el mantenimiento de la integridad vascular^(221,222).

Un factor que debemos analizar en este punto es la tensión arterial; aunque no varía de forma importante con ninguno de los tratamientos administrados, el NPS produce una caída corta y no profunda de la tensión arterial (5 minutos y nunca por debajo de 80 mmHg) excepto para la dosis alta que produce una caída mantenida durante todo el experimento. Por lo tanto hay que tener en cuenta que el daño producido con esta dosis alta de NPS, además de generar altas dosis de NO también estamos provocando una hipotensión y la lesión podría depender en parte de la isquemia consiguiente.

2.2. IMPLICACION DEL ANION SUPEROXIDO EN LA ESOFAGITIS

La SOD que elimina el anión superóxido, produce una drástica disminución de la lesión esofágica manteniendo el epitelio totalmente preservado; no se observa pérdida epitelial alguna ni hemorragia. Paralelamente se observa un incremento de la NOS tanto iNOS como cNOS con la administración de SOD. Este incremento no es efecto directo de la SOD ya que en el modelo de bajo grado cuando tratamos con SOD no se produce ningún aumento de la actividad NOS. Esto implica que cuando la exposición del esófago al ácido se prolonga (de 30 a 45 min) el anión superóxido interviene en el daño tisular.

Con la dexametasona también hay una mejoría de la lesión y disminución del infiltrado inflamatorio, aunque no tan drástica como con la SOD, y no se asocia con incremento de la NOS. Esto es debido a que la dexametasona inactiva selectivamente la iNOS. Sin embargo esta mejoría puede ser atribuida a la acción antiinflamatoria

del corticoide por otros mecanismos distintos al NO.

3. PRODUCCION DE NO: LA NOS.

En nuestro grupo control de conejos sanos sin perfundir la mucosa muestra actividad NOS como se demuestra por tinción de la NADPH-diaforasa en el epitelio de la mucosa, el endotelio vascular y en las capas musculares como está descrito por otros autores⁽¹⁶⁸⁾. En condiciones basales la mucosa esofágica del conejo tiene actividad NOS, compuesta un 85% por cNOS y el otro 15% por iNOS⁽¹⁶⁸⁾. Al producir la esofagitis de bajo grado observamos un importante aumento de la actividad NOS total, principalmente a expensas de la cNOS (o calcio-dependiente) y mucho menor aumento de actividad iNOS. En la mayoría de trabajos experimentales con diferentes tipos de agresiones el aumento de actividad NOS es a expensas de la iNOS, demostrado por medio de mediciones de actividad NOS dependiente o independiente del calcio^(215,226) o por el RNAm⁽²¹⁶⁾ o por ambos⁽²¹³⁾. Este aumento de iNOS se ha visto asociado en algunos trabajos a un descenso de la cNOS, alteración que se

ha relacionado con el desarrollo de lesiones en la mucosa gástrica^(245, 246). Incluso se ha detectado un aumento de iNOS asociado a un descenso de cNOS tras agresión por peroxinitritos⁽²¹⁶⁾. Sin embargo, este incremento inesperado de la cNOS mayor que el de la iNOS de nuestros resultados ya ha sido descrito en patologías extradigestivas⁽²⁴⁷⁾ y también digestivas, concretamente en esófagos⁽¹⁶⁸⁾ y estómagos⁽²⁴⁸⁾ de animales con hipertensión portal experimental; la cNOS se incrementaba en un 470% y la iNOS en un 307%. Aunque nosotros distinguimos ambas isoformas por la calcio-dependencia o independencia de la actividad NOS, estos autores lo comprobaron por inmunohistoquímica (anticuerpos específicos para cNOS o iNOS) y midiendo el RNA mensajero que codifica cada una de las dos enzimas en la rata vieron que aumentaba la expresión de genes de ambas isoformas^(168,248). En población pediátrica se ha demostrado en biopsias esofágicas que aumenta el NO y sus metabolitos en pacientes con reflujo y esofagitis⁽²⁴⁴⁾. Sin embargo otros autores no han detectado aumento de los genes (mRNA) por PCR de la iNOS en la mucosa esofágica también en población

pediátrica con esofagitis⁽²⁴⁹⁾. No hemos podido realizar las mismas determinaciones en el conejo ya que todavía no disponemos de sondas genéticas para estas enzimas y poder realizar amplificaciones con PCR en este animal. Realmente existe un incremento considerable de la cNOS mayor que el de la inducible iNOS en diversos procesos patológicos^(168,247,248), que también objetivamos en nuestros experimentos de esofagitis por ácido. Este hecho es quizás sorprendente ya que por definición sería la iNOS quien aumentaría ante un estímulo. Sin embargo hay que considerar que el aumento de la actividad de esta enzima (cNOS) puede depender de la hiperplasia de células en la capa basal como vemos que se produce ante la agresión de baja intensidad con ácido, entre otros cambios reactivos epiteliales descritos. Tanoué et al⁽¹⁶⁸⁾ también demuestran esta actividad cNOS aumentada en el epitelio estratificado del conejo después de un estímulo diferente al nuestro. Para nuestro modelo pensamos que puede ser expresión del aumento de células con esta actividad biológica la que explicase el aumento de actividad enzimática cNOS.

Por el contrario al producir una esofagitis de alto grado por agresión del ácido más prolongada vemos que el aumento de la NOS es mucho menor y que el incremento de cNOS respecto a los casos control sin perfusiones es insignificante. Sin embargo, al inicio de estos experimentos tras las primeras perfusiones, se observa también un incremento de esta cNOS que progresivamente disminuye con la progresión de la agresión y de la lesión. Por un lado en este modelo de alto grado veíamos menor grado de hiperplasia basal que en el de bajo grado, que podría conllevar y explicar el aumento de actividad cNOS como hemos sugerido. Por otro lado esta ausencia de incremento de NOS puede estar en relación con la pérdida epitelial extensa observada en la esofagitis grave en forma de ulceraciones y erosiones. Esta pérdida epitelial con muerte celular acarrea una pérdida de actividad enzimática. De hecho cuando en el modelo de alto grado se administra SOD y se consigue conservar el epitelio sin apenas pérdida celular, se constata un incremento de actividad NOS de misma manera que en el modelo de bajo grado. No conocemos el origen de la iNOS, ya que aumenta cuando se administra SOD,

se consigue disminuir la lesión y se conserva el epitelio. La iNOS se localiza habitualmente en macrófagos y neutrófilos, endotelio vascular y miocitos lisos de los vasos. Sin embargo en las esofagitis de alto grado tratadas con SOD el infiltrado inflamatorio de estas mucosas es escaso. Por lo tanto el aumento de iNOS detectado en estos esófagos no puede depender de las células como neutrófilos, macrófagos con actividad inflamatoria. Es más probable que dependa de los macrófagos habituales, de las células endoteliales de los vasos submucosos⁽¹⁶⁸⁾ o de las células epiteliales⁽²¹⁶⁾ como en otros experimentos. La iNOS aquí no está específicamente asociada a mayor lesión, como han relacionado muchos autores en modelos de inflamación intestinal^(215,216,217,226), si no que se detecta menor infiltrado inflamatorio. Esto apoyaría la idea de McCafferty⁽²²⁷⁾ quien encuentra resultados concluyentes de que la iNOS puede ayudar a la resolución del infiltrado leucocitario y del proceso inflamatorio. También el grupo de Akiba⁽²⁵⁰⁾ demuestra en la úlcera gástrica experimental que inhibiendo selectivamente la iNOS se retrasa la cicatrización y la resolución

del infiltrado inflamatorio del lecho y márgenes ulcerosos. Comprueban que el aumento de iNOS produce una disminución de las células inflamatorias con actividad peroxidasa. Por nuestra parte, al inhibir la iNOS con dexametasona, conseguimos disminuir la lesión de forma significativa. Sin embargo esto puede deberse a otras cualidades antiinflamatorias de los corticoides, sin relación con la iNOS. La iNOS es posiblemente una parte fisiológica de la respuesta a la agresión que por sí sola no empeora la lesión.

5. INTERACCION DE OXIDO NITRICO Y ANION SUPEROXIDO: GENERACION DE PEROXINITRITOS

Cuando la perfusión se alarga de 30 minutos en el modelo de lesión leve a 45 minutos en el modelo de lesión grave, se detecta la presencia de peroxinitritos en la mucosa y submucosa midiendo la nitrotirosina por HPLC. La nitrotirosina es producto del peroxinitrito y se utiliza como marcador de éste ya que es muy inestable y no se puede medir directamente^(242,243). También se produce nitrotirosina por

reacción del nitrito con ácido hipoclorhídrico⁽²⁵¹⁾ y éste puede provenir de la reacción de peróxido de hidrógeno con un protón. Los peroxinitritos se forman rápidamente a partir de NO y superóxido y son altamente reactivos iniciando la oxidación a muchos niveles^(118,234). En el modelo de bajo grado no se detectan peroxinitritos y junto con la observación de que la SOD no modula significativamente la lesión, se puede deducir que no hay producción de anión superóxido en exposiciones de 30 minutos, o si la hay es a nivel tan bajo que no lo detectamos por nuestro método empleado. Cuando la exposición es más prolongada (45 min) se producen aniones superóxido que interactúan con el NO para generar peroxinitritos con un grado de lesión mucho mayor. Si en este tipo de perfusiones se elimina el superóxido con SOD, casi no hay lesión y sin embargo se detecta importante actividad del enzima NOS y producción de NO, con lo cual parece que el NO por sí solo no es tóxico. Sin embargo conlleva un potencial tóxico cuando se encuentra el anión superóxido en la proximidad para interactuar y producir los peroxinitritos como ponemos en evidencia midiendo la nitrotirosina. Al mismo tiempo que se

producen los peroxinitritos desaparece el NO y su actividad biológica protectora. El anión superóxido, como otros autores ya han demostrado^(115,116,117) es el principal radical libre implicado en las esofagitis. En este modelo de lesión crónica que se asemeja a la esofagitis humana por reflujo queda demostrado el papel patológico del superóxido, pero concretamente esto es así en los casos graves y no aparece involucrado en los procesos de esofagitis leves. No hemos estudiado la producción de otros radicales libres como el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo puesto que en trabajos previos sobre la esofagitis no se consiguió demostrar su presencia^(115,116). De cualquier manera la producción de estos radicales en la esofagitis crónica no se puede descartar completamente y merecen estudios definitivos.

De forma paralela comprobamos que el superóxido es producido por las células del infiltrado inflamatorio (CD11b+) y que tiene una relación cuantitativa; existe mayor producción de anión superóxido cuando existe mayor proporción de células inflamatorias. Como ya demostraba Wetscher⁽¹¹⁵⁾ y su

grupo en las esofagitis graves la presencia de radicales libres era mayor que en las leves, nosotros observamos que ocurre lo mismo con los peroxinitritos derivados de la interacción de superóxido y NO. Los peroxinitritos se forman en el lecho inflamatorio donde se liberan NO y anión superóxido como mecanismo de defensa, pero en exceso también desembocan en autolesión. La iNOS que aumenta como respuesta a una agresión con producción de NO para ejercer sus efectos beneficiosos tiene el efecto contrario cuando se genera aniones superóxido que interaccionan con este NO para ser mucho más tóxico.

La perfusión ácida con pepsina similar al reflujo gástrico, produce un incremento de la actividad de la NOS con generación de NO. Cuando la agresión es leve esta generación de NO conlleva efectos protectores sobre la mucosa modulando la lesión con

resultados beneficiosos. Cuando esta misma agresión se vuelve más intensa, se produce mayor infiltrado inflamatorio con células como macrófagos y neutrófilos que producen suficiente cantidad de radicales libres, principalmente superóxido. Esta producción de anión superóxido junto con el aumento de NO frente al ácido desemboca en una reacción con generación de peroxinitritos que potenciarán la lesión de forma drástica. El NO pasa de ejercer un papel beneficioso en la defensa a actuar como agente lesivo por mediación del radical superóxido. Vemos en la esofagitis las dos caras de la producción de NO. Sin embargo esta explicación levanta nuevas implicaciones terapéuticas desde este enfoque patogénico; disminuir las lesiones por reflujo gastro-esofágico eliminando la producción de radicales involucrados en las formas graves con SOD .

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. En respuesta al primer objetivo,

1.1. La mucosa del esófago, incluido el epitelio, presenta actividad del enzima NOS. La agresión con ácido y pepsina produce un aumento de esta actividad NOS a expensas de ambas isoformas, inducible y constitutiva, pero mayoritariamente de cNOS. Por lo que se puede deducir que la mucosa esofágica genera actividad y síntesis de óxido nítrico (NO) cuando se expone al ácido y pepsina.

1.2. El óxido nítrico generado en una agresión ácido-péptica leve ejerce un papel beneficioso. Esta capacidad protectora se ve superada ante una agresión de alta intensidad por ácido y pepsina.

2. En respuesta al segundo objetivo,

2.1. El anión superóxido es un factor clave en la génesis de la esofagitis de alto grado. Su papel en la esofagitis leve parece menos determinante.

2.2. La producción de anión superóxido presenta un paralelismo con la presencia de células inflamatorias, lo cual sugiere que estas células podrían ser la principal fuente de esta producción.

3. En respuesta al tercer objetivo,

En situación de agresión intensa por ácido y pepsina el óxido nítrico y el anión superóxido interaccionan generando radicales más agresivos para el daño celular como los peroxinitritos.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Orlando RC. Reflux esophagitis. En: Yamada T, Alpers DH, Owyang C y Col., eds. Textbook of gastroenterology. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1991: 1123-47.
- 2.- Winkelstein A. Peptic esophagitis: a new clinical entity. JAMA 1935; 104: 906-909.
- 3.- Allison PR. Peptic ulcer of the esophagus. J Thoraci Surg 1946; 15: 308-315.
- 4.- Skinner DB, Roth JLA, Sullea BH, Stein GN, Levin N. Esofagitis por reflujo. En: Berk JE, Haubrich WS y cols, eds. Gastroenterología. Bockus. Barcelona: Salvat, 1987: 815-865.
- 5.- Heading RC. Epidemiology of oesophageal reflux disease. Scand J Gastroenterology 1989; 24 (suppl. 156): 33-37.
- 6.- A Gallup Survey on Heartburn Across America. Princeton, Gallup Organization, 1988.
- 7.- Monnier P, Fontollet C, Savary M, Ollyo JB. Barrett's oesophagus or columnar epithelium of the lower oesophagus. En: Tytgat GN, de. Oesophageal Disorders. Baillière's Clinical Gastroenterology 1987; 1: 769-789.
- 8.- Goldberg HI, Dodds WJ, Gee S. Role of acid and pepsin in acute experimental esophagitis. Gastroenterology 1969; 56: 223-230.
9. Lillemoe KD, Johnson LF, Harmon JW. Role of the components of the gastroduodenal contents in experimental acid esophagitis. Surgery 1982; 87: 276-284.
- 10.- Sekera E, Cadiot G, Poitevin CH, Vallot T, Vatie J, Mignon M. Sécrétion gastrique de pepsine dans le reflux gastro-oesophagien compliqué ou non d'oesophagite peptique.

Gastroenterology Clin Biol 1992; 16: 141-147.

11.- Arenas JJ. Fisiopatología. En: Coll S, Ros Rahola E. eds. Enfermedad por reflujo gastroesofágico. Barcelona: Club español de Holter digestivo 1996; 11-24.

12.- Golman MS, Rasch JR, Wiltsie DS, Finkel M. Incidence of esophagitis in peptic ulcer disease. Am J Dig Dis 1967; 12: 994-998.

13.- Dodds WJ, Dent J, Hogan W. Severe peptic esophagitis in a patient with Zollinger-Ellison syndrome. Am J Roentgenol 1971; 113: 237-240.

14.- Orlando RC, Bozyski EM. Heartburn in pernicious anemia: a consequence of bile reflux. N Engl J Med 1973; 29: 522-523.

15.- Gillison EW, de Castro VAM, Nyhus L. The significance of bile in reflux esophagitis. Surg Gynecol Obstet 1972; 134: 419-424.

16.- Stoker DL, Williams JG. Alkaline reflux esophagitis. Gut 1991; 32: 1090-1092.

17.- Lillemoe KD, Johnson LF, Harmon JW. Alkaline esophagitis: A comparison of the ability of components of gastroduodenal contents to injure the rabbit esophagus. Gastroenterology 1983; 85: 621-628.

18.- Harmon JW, Johnson LF, Maydonovitch CL. Effects of acid and bile salts on the rabbit esophageal mucosa. Dig Dis Sci 1981; 26: 65-72.

19.- Salo JA, Lehto VP, Karonen SL, Kivilaakso E. Role of lipase in the pathogenesis of experimental esophagitis in the rabbit. Arch Surg 1987; 122: 1160-1164.

20.- Vaezi MF, Richter JE. Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. Gastroenterology 1996; 11: 1192-1199.

21.- Lillemoe KD, Johnson LF, Harmon JW. Taurodeoxycholate modulates the effects of pepsin and trypsin in experimental esophagitis. Surgery 1985; 97: 662-667

- 22.- Nebel OT, Castell DO. Inhibition of the lower esophageal sphincter by fat: A mechanism for fatty food intolerance. *Gut* 1973; 14: 270-274.
- 23.- Keshavarzian A, Bushnell DL, Sontag S et al. Gastric emptying in patients with severe reflux esophagitis. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 738-742.
- 24.- Dodds WJ, Hogan W, Hellm JF, Dent J. Pathogenesis of reflux esophagitis. *Gastroenterology* 1981; 81: 376-394.
- 25.- Clemente G, Manni R, Vecchio F, Rizzo S, Zaccara A, Salia G, Pezzola F, Berruto A, Asole F. The importance of gastric emptying in reflux esophagitis: An experimental research on pigs. *J Surg Research* 1987; 42: 227-231.
26. Kaye MD, Showalter JP. Pyloric incompetence in patients with symptomatic gastroesophageal sphincter. *Gastroenterology* 1979; 76: 31-38.
- 27.- Dodds W, Dent J, Hogan W et al. Mechanisms of gastroesophageal reflux in patients with reflux esophagitis. *N Engl J Med* 1982; 307: 1547-1552.
- 28.- Boyle JT, Altschuler SM, Nixon TE, Tuchman DN, Pack AI, Cohen S. Role of the diaphragm in the genesis of lower esophageal sphincter pressure in the cat. *Gastroenterology* 1985; 88: 723-730.
- 29.- Mittal RK, Balaban D. The esophagogastric junction. *N Engl J Med* 1997; 336: 924-931.
- 30.- Mittal RK, Rochester DF, McCallum RW. Electrical and mechanical activity in the human lower esophageal sphincter during diaphragmatic contraction. *J Clin Invest* 1988; 81: 1182-1189.
- 31.- Klein WA, Parkman HP, Dempsey DT, Fisher RS. Sphincter-like thoracoabdominal high pressure zone after esophagogastrectomy. *Gastroenterology* 1993; 105: 1362-1369.
- 32.- Liebermann-Meffert D, Allgower M, Schmid P. Muscular equivalent of the esophageal sphincter. *Gastroenterology* 1979; 76: 31-38.

- 33.- Meyer GW, Castell DO. Physiology of the oesophagus. Clinics in gastroenterology, 1982; 11 (3): 439-451.
- 34.- Boyle JT, Cohen S. Does intrinsic LES tone increase as an adaptive response to increased intra-abdominal pressure? Dig Dis Sci 1984; 29: 760-761.
- 35.- Mittal RK, Fisher M, McCallum RW, Rochester DF, Dent J, Sluss J. Human lower esophageal sphincter pressure response to increased intraabdominal pressure. Am J Physiol 1990; 258: G624-G630.
- 36.- Roussos C, Macklem PT. The respiratory muscles. N Engl J Med 1982; 307: 786-797.
- 37.- Biancani P, Hillemeier C, Bitar KN, Makhoul GM. Contraction mediated by Ca^{2+} influx in esophageal muscle and by calcium release in the LES. Am J Physiol 1987; 253: G760-G766.
- 38.- Sengupta A, Paterson WG, Goyal RK. Atypical localization of myenteric neurons in the opossum lower esophageal sphincter. Gastroenterology 1979; 76: 31-38.
- 39.- Goyal RK, Rattan S. Nature of vagal inhibitory innervation to the lower esophageal sphincter. J Clin Invest 1975; 55: 1119-1126.
- 40.- Yamato S, Saha JK, Goyal RK. Role of nitric oxide in lower esophageal sphincter relaxation to swallowing. Life Sci 1992; 50: 1263-1272.
- 41.-Mittal RK, Holloway R, Dent J. Effect of atropine on the frequency of reflux and transient lower esophageal sphincter relaxation in normal subjects. Gastroenterology 1995; 109: 1547-1554.
- 42.- Mittal RK, Holloway RH, Penagini MR, Blackshaw LA, Dent J. Transient lower esophageal sphincter relaxation. Gastroenterology 1995; 109: 601-610.
- 43.- Barhman CP, Gotley DC, Mills A, Alderson D. Precipitating causes of acid reflux episodes in ambulant patients with gastro-

esophageal reflux disease. *Gut* 1995; 36: 505-510.

44.- Edwards AW. The anti-reflux mechanisms, its disorders and their consequences. *Clinics in gastroenterology*, 1982; 11 (3): 479-498.

45.- Eastwood GI, Castell DO, Higgs RH. Experimental esophagitis in cats impairs lower esophageal sphincter pressure. *Gastroenterology* 1975; 69: 146-153.

46.- Eastwood GL, Beck BD, Castell CO, Brown FC, Fletcher FR. Beneficial effect of indomethacin on acid-induced esophagitis in cats. *Dig Dis Sci* 1981; 26: 601-608.

47.- Wesdorp E, Bartelmann J, Pape D, Dedder W, Tythart GN. Oral cimetidine in reflux esophagitis: a double blind controlled trial. *Gastroenterology* 1978; 74: 821-824.

48.- Godsberg HI, Dodds WJ, Montgomery C. Controlled production of acute esophagitis. *Invest Radiol* 1970; 5: 254-256.

49.- Kahrilas PJ. Esophageal motor activity and clearance. *Gastroenterol Clin North Am* 1990; 19: 537-550.

50.- Helm JF, Dodds WJ, Riedel DR. Determinants of esophageal acid clearance in normal subjects. *Gastroenterology* 1983; 85: 607-612.

51.- Katz PO, Knuff TE, Benjamin SB, Castell DO. Abnormal esophageal pressures in reflux esophagitis: cause or effect? *Am J Gastroenterol* 1986; 81: 744-746.

52.- Allen ML, McIntosh DL, Robinson MG. Healing or amelioration of esophagitis does not result in increased lower esophageal sphincter or esophageal contractile pressure. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1331-1334.

53.- Brown CM, Rees WD. Review article: factors protecting the esophagus against acid-mediated injury. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9: 251-262.

54.- Sonnenberg A, Steinkamp U, Weise A. Salivary secretion in reflux

- esophagitis. *Gastroenterology* 1982; 83: 889-895.
- 55.- Salo J, Kivilaakso E. Role of luminal H⁺ in the pathogenesis of experimental esophagitis. *Surgery* 1982; 92: 61-68.
- 56.- Bernstein LM, Baker LA. A clinical test for esophagitis. *Gastroenterology* 1958; 34: 760
- 57.- Orlando RC. Esophageal epithelial resistance. In: Castell DO, Wu WC, Ott DJ, eds. *Gastroesophageal reflux disease: Pathogenesis, diagnosis and therapy*. Mount Kisco, NY: Futura Publishing, 1985; 55-79.
- 58.- Konturek SJ. Review: Gastric cytoprotection. *Scand J Gastroenterol* 1985; 20: 543-553.
- 59.- Quigley EMM, Turnberg LA. pH of the microclimate lining human gastric and duodenal mucosa in vivo. Studies in control subjects and in duodenal ulcer patients. *Gastroenterology* 1987; 92: 1876-1884.
- 60.- Namiot Z, Sarosiek J, Rourk RM. Human esophageal secretion: Mucosal response to luminal acid and pepsin. *Gastroenterology* 1994; 106: 973-981.
- 61.- Sarosiek J, Namiot Z, Marcinkiewicz M, McCallum RW. Nitric oxide as a mediator of the esophageal mucin secretion under the impact of mechanical and chemical stimulation. *Gastroenterology* 1994.
- 62.- Elliott SN, Wallace JL. Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury. *J Gastroenterol* 1998; 33: 792-803.
- 63.- Hamilton BH, Orlando RC. In-vivo alkaline secretion by mammalian esophagus. *Gastroenterology* 1989; 97: 640-648.
- 64.- Orlando RC. Esophageal epithelial defenses against acid injury. *Gastroenterology* 1994; 89: S48-S52.
- 65.- Khalbuss WE, Marousis CG, Orlando RC. Effect of CIH on intracellular pH and membrane voltage in rabbit esophageal cells. *Gastroenterology* 1993; 104: A116.

- 66.- Tobey NA, Orlando RC. Mechanisms of acid injury to rabbit esophageal epithelium. Role of basolateral cell membrane acidification. *Gastroenterology* 1991; 101: 1220-1228.
- 67.- Orlando RC, Lacy ER, Tobey NA. Barriers to paracellular permeability in rabbit esophageal epithelium. *Gastroenterology* 1992; 102: 910-923.
- 68.- Tobey NA, Powell DW, Schreiner VJ et al. Serosal bicarbonate protects against acid injury to rabbit esophagus. *Gastroenterology* 1989; 96: 1466-1477.
- 69.- Layden TJ, Schmidt L, Agnone L et al. Rabbit esophageal cell cytoplasmic pH regulation: role of Na^+/H^+ antiport and Na^+ -dependent bicarbonate transport system. *Am J Physiol* 1992; 263 (3, Pt 1): G407-413.
- 70.- Tobey NA, Reddy SP, Khalbuss WE, Silvers SM, Cragoe EJ, Orlando RC Na^+ -dependent and -independent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchangers in cultured rabbit esophageal epithelial cells. *Gastroenterology* 1993; 104: 185-195
- 71.- DeBacker A, Haentjens P, Willems G. Hydrochloric acid: A trigger of cell proliferation in the esophagus of dogs. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 884-890.
- 72.- Dunkin BJ, McKie LD, Dunlap KW, Harmon JW, Bass BL. Esophageal mucosal repair after acid peptic injury. *Gastroenterology* 1994; 106: 864-872.
- 73.- Ismail-Beigi F, Horton PF, Pope CE. Histological consequences of gastroesophageal refluxes in man. *Gastroenterology* 1970; 58: 163-168.
- 74.- Jimenez P, Lanas A, Piazuolo E, Esteva F. Effects of extracellular pH on restitution and proliferation of rabbit esophageal epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 545-552.
- 75.- Sarosiek J, Hetzel DP, Yu Z, Piascik R, Li L, Rourk RM, McCallum. Evidence of secretion of epidermal growth factor by the esophageal mucosa in humans. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 1081-1087.
- 76.- Rourk RM, Namiot Z, Sarosiek J, Yu A, McCallum RW.

Impairment of salivary epidermal growth factor secretory response to esophageal mechanical and chemical stimulation in patients with reflux esophagitis. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 237-244.

77.- Tarnawski A, Stachman J, Durbin T. Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterol* 1992; 102: 695-698.

78.- Jankowski J, Hopwood D, Pringle R, Wormsley KG. Increased expression of epidermal growth factor receptors in Barrett's esophagus associated with alkaline reflux: A putative model for carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 402-408.

79.- Jiménez P, Esteva F, Piazuolo E, García MA, Lanas A. Prostaglandins and arachidonic acid metabolites produced by esophageal mucosal cells: Implications for mucosal defense. *Eur Sur Res* 1994; 26(S1): 35-36.

80.- Jiménez P, Lanas A, Piazuolo E, Esteva F. Effect of growth

factors and prostaglandin E2 on restitution and proliferation of rabbit esophageal epithelial cells. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2309-2316.

81.- Hollwarth ME, Smith M, Kvietys PR. Esophageal blood flow in the cat. Normal distribution and effects of acid perfusion. *Gastroenterology* 1986; 90: 622-627.

82.- Bass BL, Schweitzer DJ, Harmon JW. H⁺ back diffusion interferes with intrinsic reactive regulation of esophageal blood flow. *Surgery* 1984; 96: 404-413.

83.- Feldman MJ, Morris GP, Dinda PK, Paterson WG. Mast cells mediate acid-induced augmentation of opossum esophageal blood flow via histamine and nitric oxide. *Gastroenterology* 1996; 110: 121-128.

84.- Sandler AD, Schmidt C, Richardson K, Murray J, Maher JW. Regulation of distal mucosal blood flow: The roles of nitric oxide and substance P. *Surgery* 1993; 114: 285-294.

85.- Bollman JC, Stalker LK, Mann FC. Experimental peptic ulcer produced by cincophen. *Arch Intern Med* 1938; 61: 36-43.

86.- Robert A, Lancaster C, Olafsson AS, Zhang W. Gastric adaptation to repeated administration of a necrotizing agent. In: Garner A, O'Brien PE, editors. *Mechanisms of injury, protection and repair of the upper gastrointestinal tract*. Wiley, 1991; 357-370.

87.- St John DJB, Yeomana ND, McDermott FT, de Boer WG. Adaptation of the gastric mucosa to repeated administration of aspirin in the rat. *Am J Dis* 1973; 18: 881-886.

88.- Graham DY, Smith JL, Spjut HJ, Torre T. Gastric adaptation. Studies in humans during continuous aspirin administration. *Gastroenterology* 1988; 85: 327-333.

89.- Konturek SJ, Brzozowski T, Stachura J, Dembinski A, Majka J.

Role of gastric blood flow, neutrophil infiltration, and mucosal cell proliferation in gastric adaptation to aspirin in the rat. *Gut* 1994; 35: 1189-1196.

90.- Konturek JW, Dembinski A, Stoll R, Domschke W, Konturek SJ. Mucosal adaptation to aspirin-induced gastric damage in humans. Studies on blood flow, gastric mucosal growth, and neutrophil activation. *Gut* 1994; 35: 1197-1204.

91.- Konturek SJ, Brzozowski T, Stachura J, Majka J. Role of neutrophils and mucosal blood flow in gastric adaptation to aspirin. *Eur J Pharmacol*. 1994; 253: 107-114.

92.- Olivero JJ, Graham DY. Gastric adaptation to non steroidal anti-inflammatory drugs in man. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27 (suppl 193): 53-58.

93.- Konturek S J, Brzozowski T, Majka J, Drozdowicz D, Stachura J. Adaptation of the Gastric Mucosa to Stress. Role of Prostaglandin and Epidermal Growth Factor. *Scand J*

Gastroenterol 1992; 27 (suppl 193): 39-45.

94- Tarnawski A, Lu SY, Stachura J, Sarfeh IJ. Adaptation of gastric mucosa to chronic alcohol administration is associated with increased mucosal expression of growth factors and their receptors. Scand J Gastroenterol 1992; 27 (suppl 193): 59-63.

95.- Chaudhury TK, Robert A. Prevention by mild irritants of gastric necrosis produced in rats by sodium taurocholate. Dig Dis Sci 1980; 25: 830-6.

96.- Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Davies JP, Field SO, Hancher AJ. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins. Am J Physiol 1983; 245: G113-121.

97.- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Ernst H, Stachura J, Hahn EG. Gastric adaptation to injury

by repeated doses of aspirin strengthens mucosal defence against subsequent exposure to various strong irritants in rats. Gut 1995; 37: 749-757.

98.- Hawkey CJ, Kemp RT, Walt RP, Bashkar NK, Davies J, Filipowicz B. Evidence that adaptive cytoprotection in rats is not mediated by prostaglandins. Gastroenterology 1988; 94: 948-954.

99.- Lugea A, Salas A, Guarner F, Malagelada JR. Adaptive cytoprotection of the rat duodenum is not dependent on nitric oxide-induced changes in blood flow. Am J Physiol 1993; 264: G 994-G1000.

100.- Jankowski J, Murphy S, Coghill G, Grant A, Wormsley KG, Sanders DS, Kerr M, Hopwood D. Epidermal growth factor receptors in the oesophagus. Gut 1992; 33: 439-443.

101.- Lanas A, Blas JM, Ortego J, Soria J, Sáinz R. Adaptation of the esophageal mucosa to acute acid and pepsin-induced damage. Role of nitric oxide and epidermal growth factor. *Dig Dis Sci* 1996; 5: 1003-1011.

102.- Ramos MV, Wyatt HR, Tobey NA, Orlando RC. Effect of CIH on the death of rabbit esophageal epithelial cells. *Gastroenterology* 1994; 107: 1102-1110.

103.- Jeong KX, Tobey NA, Wyatt HR, Orlando RC. The effect of extracellular acidification on intracellular pH in rabbit esophageal epithelial cells. *Gastroenterology* 1994; 107: 1134-1140.

104.- Orlando RC, Powell DW, Carney CN. Pathophysiology of acute acid injury in rabbit esophageal epithelium. *J Clin Invest* 1981; 68: 86-93.

105.- Wyatt HR, Ramos MV, Tobey NA, Orlando RC. Effect of CIH on rabbit esophageal epithelial cell volume. *Gastroenterology* 1994; 106: 653-661.

106.- Kuo YJ, Shanbour LL. Inhibition on ion transport by bile salts in canine gastric mucosa. *Am J Physiol* 1976; 231: 1433-1437.

107.- Barclay RL, Paterson WG, Dinda PK, Morris GP. Intraluminal acid perfusion induces histamine release from the opossum esophagus. *Clin Invest Med* 1991; 14 (suppl A): A46 (abstract).

108.- Barclay RL, Dinda PK, Morris GP, Paterson WG. Morphological evidence of mast cell degranulation in an animal model of acid-induced esophageal mucosal injury. *Dig Dis Sci* 1995; 8: 1651-1658.

- 109.- Parks D, Buckley G, Granger N. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract disease. *Surgery* 1983; 94: 415-422.
- 110.- Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91 (suppl 3C): 14S-22S.
- 111.- Phull PS, Green CJ, Jacyna MR. A radical view of the stomach: the role of oxygen-derived free radicals and anti-oxidants in gastroduodenal disease. *European J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 265-274.
- 112.- Nakamura K, Aoike A, Rokutan K, Hosokawa T, Koyama K, Kawai K. The role of oxygen radicals in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced in mice by feeding-restriction stress. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24(suppl 162): 47-50.
- 113.- Itoh M, Guth PH. Role of oxygen-derived free radicals in hemorrhagic shock-induced gastric lesions in the rat. *Gastroenterology* 1985; 88: 1162-1167.
- 114.- Salim AS. Role of oxygen-derived free radicals in the mechanisms of chronic gastric ulceration in the rat: implications for cytoprotection. *Digestion* 1989; 43: 113-119.
- 115.- Wetscher GJ, Hinder PR, Bagchi D, Perdakis G, Redmond EJ, Glaser K, Adrian TE, Hinder RA. Free radical scavengers prevent reflux esophagitis in rats. *Dig Dis Sci* 1995; 6: 1292-1296.
- 116.- Naya MJ, Pereboom D, Ortego J, Alda JO, Lanas A. Superoxide anion plays an important role in the pathogenesis of acid and pepsin-induced esophagitis in rabbits. *Gut* 1997; 40: 175-181.
- 117.- Olyae M, Sontag S, Salman W, Schnell T, Mobarhan S,

- Eiznhamer D, Keshavarzian A. Mucosal reactive oxygen species production in oesophagitis and Barrett's oesophagus. *Gut* 1995; 37: 168-173.
- 118.- Wetscher GJ, Hinder RA, Klinger P, Gadenstatter M, Perdikis G, Hinder PR. Reflux esophagitis in humans is a free radical event. *Dis Esophagus*. 1997; 10: 29-32.
- 119.- Robert A. Cytoprotection and adapted cytoprotection. En: Melis GF, Boeve J, Misiewicz JJ, eds. *Peptic ulcer disease: basic and clinical aspects*. Dordrecht, Boston, Lancaster, U.K.: Martinus Nijhoff, 1985:290-316.
- 120.- Eastwood GL, Beck BD, Castell DO, Brown FC, Fletcher JR. Beneficial effect of indomethacin on acid-induced esophagitis in cats. *Dig Dis Sci* 1981; 26: 601-608.
- 121.- Lillemoe KD, Johnson LF, Cogen MA, Bresch JR. Indomethacin protects against acid-induced esophagitis in rabbits. *Gastroenterology* 1992; 82: 1118.
- 122.- Lanas A, Sousa FL, Ortego J, Esteva F, Blas JM, Soria J, Sáinz R. Aspirin renders the esophageal mucosa more permeable to acid and pepsin. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 1065-1072.
- 123.- Molina M. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Zaragoza, 1997.
- 124.- Eastwood GL. Histologic changes in gastroesophageal reflux. *J Clin Gastroenterol* 1986; 8: 45-51
- 125.- Siegel CL, Hendrix TR. Esophageal abnormalities induced by acid perfusion in patients with heartburn. *J Clin Invest* 1963; 42: 686-695.
- 126.- Behar J, Shehan DC. Histologic abnormalities in reflux esophagitis. *Arch Pathol* 1975; 99: 387-391.

- 127.- Ismail-beigi F, Pope CE. Distribution of the histological changes of gastroesophageal reflux in the distal esophagus of man. *Gastroenterology* 1974; 66: 1109-1113.
- 128.- Livstone EM, Sheahan DG, Behar J. Studies of esophageal epithelial cell proliferation in patients with reflux esophagitis. *Gastroenterology* 1977; 73: 1315-1319.
- 129.- Johnson LF, Demeester TR, Haggitt RC. Esophageal epithelial response to gastroesophageal reflux. A quantitative study. *Dig Dis* 1978; 23: 498-509.
- 130.- Weinstein WM, Bogoch ER, Bowes KL. The normal human esophageal mucosa: A histological reappraisal. *Gastroenterology* 1975; 68: 40-44.
- 131.- Collins BJ, Elliott H, Sloan JM, McFarland RJ, Love AHG. Oesophageal histology in reflux oesophagitis. *J Clin Pathol* 1985; 38: 1265-1272.
- 132.- Jarvis LR, Dent J, Whitehead R. Morphometric assessment of reflux oesophagitis in fiberoptic biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1985; 38: 44-48.
- 133.- Collins JS, Watt PC, Hamilton PW, Collins BJ, Sloan JM, Elliott H, Love AHG. Assessment of oesophagitis by histology and morphometry. *Histopathology* 1989; 14: 381-389.
- 134.- Seefeld U, Krejs GJ, Siebenmann RE. Esophageal histology in gastroesophageal reflux. Morphometric findings in suction biopsies. *Dig Dis Sci* 1977; 22: 956-964.
- 135.- Winter HS, Madara JL, Stafford RJ, Grand RJ, Quinlan J, Galdman H. Intraepithelial eosinophils: a new diagnostic criterion for reflux esophagitis. *Gastroenterology* 1982; 83: 818-823.
- 136.- Ingram PR, Keswani RK, Muller WH. A correlative histopathologic study of experimental surgical reflux esophagitis. *Surg Gynecol Obstet* 1960; 11: 403-411.

- 137.- Shulze-Delrieu K, Mitros A, Sharazi S. Inflammatory and structural changes in the opossum esophagus after resection of the cardia. *Gastroenterology* 1982; 82: 276-283.
- 138.- Salo JA, Lehto VP, Kivilaakso E. Morphological alterations in experimental esophagitis. Light microscopic scanning and transmission electron microscopic study. *Dig Dis Sci* 1983; 8: 440-448.
- 139.- Geisinger KR, Cassidy KT, Nardi R, Castell DO. The histologic development of acid-induced esophagitis in the cat. *Mod Pathol* 1990; 3: 619-624.
- 140.- Mud HJ, Kranendenk SE, Van Houten H, Westbroek DL. Mural collagen in experimental reflux esophagitis in rats. *J Surg Research* 1985; 38: 97-104.
- 141.- Bozymski EM, Herlihy KJ, Orlando RC. Barrett's esophagus. *Ann Intern Med* 1982; 97: 103-107.
- 142.- Sjogren RW, Johnson LF. Barrett's esophagus. A review. *Am J Med* 1983; 97: 103-107.
- 143.- McDonald GB, Brand DL, Thorning DR. Multiple adenomatous neoplasms arising in columnar line (Barrett's) esophagus. *Gastroenterology* 1977; 72: 1317-1321.
- 144 Barrett NR. Chronic peptic ulcer of the esophagus and oesophagitis. *Br J Surg* 1950; 28: 175-182.
- 145- Paull A, Trier JS, Dalton MD, Camp RC, Loeb P, Goyal RK. The histologic spectrum of Barrett's esophagus. *N Engl J Med* 1976; 295: 476-480.
- 146.- Thomson JJ, Zinsser KR, Enterline HT. Barrett's metaplasia and adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Hum Pathol* 1983; 14: 42-61.
- 147.- Robbins AH, Hermos JA, Schimmel EM, Friedlander DM, Messian RA. The columnar lined esophagus. Analysis of 26 cases. *Radiology* 1977; 123: 1-7.
- 148.- Hamilton SR, Yardley JH. Regeneration of cardial type mucosa and acquisition of Barrett mucosa after

esophagogastrectomy. *Gastroenterology* 1977; 72: 669-675.

149.- Kortan P, Warren RE, Gardner J, Ginsberg RJ, Diamant EN. Barrett's esophagus in a patient with surgically treated achalasia. *J Clin Gastroenterol* 1981; 3: 357-360.

150.- Ponce J, Hinojosa J, De Jan M. Enfermedad por reflujo gastroesofágico. Hernia hiatal. En: Berenguer J. *Gastroenterología y Hepatología*. Zaragoza: Doyma Libros 1995: 112-125.

151.- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.

152.- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhury G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released by arteries and veins is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9259.

153.- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth

muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.

154.- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.

155.- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-Nitric oxide pathway. *N Engl J Med*; 1993; 329: 2002-2012.

156.- Bush PA, Gonzalez EN, Griscavage JM, Ignarro LJ. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-Arginine. *Biochem biophys Res Commun* 1992; 185: 960-966.

157.- Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5159-62

158.- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Bioch J* 1994; 298: 249-258.

- 159.- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9030-9033.
- 160.- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-685.
- 161.- Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca-dependent and Ca-independent nitric oxide synthases. *FEBS* 1991; 291: 145-149.
- 162.- Knowles RG, Merrett M, Salter M, Moncada S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Bioch J* 1990; 270: 833-836.
- 163.- Bredt DS, Hwang P, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for niric oxide. *Nature* 1990; 347: 768-770.
- 164.- de Giorgio R, Parodi JE, Brecha N, Brunicardi FC, Becker JM, Go VL, Sternini C. Nitric oxide producing neurons in the monkey and human digestive system. *The journal of comparative neurology* 1994; 342: 619-627.
- 165.- Aimi Y, Kinoshita T, Minami Y, Fujimura M, Vincent SR. Histochemical localization of nitric oxide synthase in rat enteric nervous system. *Neuroscience* 1993; 53: 553-560.
- 166.- Timmermans JP et al. Nitric oxide synthase immunoreativity in the enteric nervous system of the developing human digestive tract. *Cell and tissue research* 1994; 275: 235-245.
- 167.- Murray JA, Clark DE. Characterization of nitric oxide synthase in the opossum esophagus. *Gastroenterology* 1994; 106: 1444-1450.
- 168.- Tanoue K, Ohta M, Tarnawski A, Wahlstrom KJ, Sugimachi K, Sarfeh IJ. Portal hypertension activates the nitric oxide synthase genes in the esophageal mucosa of rats. *Gastroenterology* 1996; 110: 549-557.
- 169.- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells

synthesize nitric oxide from L-Arginine.
Nature 1988; 333: 664-666.

170.- Stark ME, Szurszewski JH.
Role of nitric oxide in gastrointestinal
and hepatic function and disease.
Gastroenterology 1992; 103: 1928-1949.

171.- Panza JA, Quyyumi AA,
Brush JE, Epstein SE. Abnormal
endothelium-dependent vascular
relaxation in patients with essential
hypertension. N Engl J Med 1990; 322:
22-27.

172.- Vallance P, Leone A,
Calver A, Collier J, Moncada S.
Accumulation of an endogenous
inhibitor of nitric oxide synthesis in
chronic renal failure. Lancet 1992; 339:
572-575.

173 - Petros A, Bennett D,
Vallance P. Effect of nitric oxide
synthase inhibitors on hypotension in
patients with septic shock. Lancet 1991;
338: 1557-1558.

174.- Vallance P, Moncada S.
Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a
role for nitric oxide? Lancet 1991; 104:
1750-1754.

175.- Pizcueta P, Piqué JM,
Bosch J, Rodés J. Effects of inhibiting
nitric oxide biosynthesis on the systemic
and splanchnic circulation of rats with
portal hypertension. Br J Pharmacol
1992; 105: 184-190.

176.- Casadevall M, Piqué JM et
al. Increased hemoglobin attenuates
splanchnic vasodilation in portal-
hypertensive rats by nitric oxide
inactivation. Gastroenterology 1996;
110: 1156-1165.

177.- Fernández M, Rodés J et
al. Evidence against a role for inducible
nitric oxide synthase in the
hyperdynamic circulation of portal-
hypertensive rats. Gastroenterology
1995; 108: 1487-1495.

178.- Radomski MK, Moncada
S. Biological role of nitric oxide in
platelet function. In: Moncada S, Higgs
EA, Berrazueta JR, eds. Clinical
relevance of nitric oxide in the
cardiovascular system. Madrid:
Edicomplet, 1991: 45-56.

179.- Kubes P, Suzuki M,
Granger DN. Nitric oxide: an

endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 1991; 88: 4651-4655.

180.- McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer R, Whittle B, Moncada S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 1989; 261: 293-296.

181.- Hibbs JB, Taintor R, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem biophys Res Commun* 1988; 157: 87-94.

182.- Paceli R et al. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *The journal of Experimental Medicine* 1995; 182: 1469-1479.

183.- Goyal RK, Peterson WG. Esophageal motility. In: Schultz SG, ed. *Handbook of physiology- the gastrointestinal system 1*. Bethesda, MD: American Physiological Society, 1989: 865-908.

184.- Yamato S, Spechler SJ, Goyal RK. Role of nitric oxide in

esophageal peristalsis in the opossum. *Gastroenterology* 1992; 103: 197-204.

185.- Anand N, Paterson WG. Role of nitric oxide in esophageal peristalsis. *Am J Physiol* 1994; 266: G123-G131.

186.- Preiksaitis HG, Tremblay L, Diamant EN. Nitric oxide mediates inhibitory nerve effects in human esophagus and lower esophageal sphincter. *Dig Dis Sci* 1994; 4: 770-775.

187.- Murray JA, Ledlow A, Launspach J, Evans D, Loveday M, Conklin JL. The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor function in humans. *Gastroenterology* 1995; 109: 1241-1248.

188.- Konturek JW, Gillessen A, Domschke W. Diffuse esophageal spasm: a malfunction that involves nitric oxide? *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 1041-1045.

189.- Abrahamsson H. Studies on the inhibitory nervous control of gastric motility. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 1973; 390:1-38.

- 190.- Plourde V, Quintero E, Suto G, Coimbra C, Taché Y. Delayed gastric emptying induced by inhibitors of nitric oxide synthase in rats. *European Journal of Pharmacology* 1994; 256: 125-129.
- 191.- Ward SM, Dalziel HH, Thornbury KD, Westfall DP, Sanders M. Non adrenergic- noncholinergic inhibition and rebound excitation in canine colon depend on nitric oxide. *Am J Physiol* 1992; 262: G237-G243.
- 192.- Stark ME, Bauer AJ, Szuryszewski JH. Effect of nitric oxide on circular muscle of the canine small intestine. *J Physiol* 1991; 444: 743-761.
- 193.- Burleigh DE. N^g-Nitro-L-Arginine reduces nonadrenergic noncholinergic relaxations of human gut. *Gastroenterology* 1992; 102: 679-683.
- 194.- Larson LT. Hirschsprung's disease. Immunohistochemical findings. *Histol Histopathol* 1994; 9: 615-629.
- 195.- Cortesini C, Cianchi F, Infantino A, Lise M. Nitric oxide synthase and VIP distribution in enteric nervous system in idiopathic chronic constipation. *Dig Dis Sci* 1995; 11: 2450-2455.
- 196.- Mourelle M, Guarner F, Moler X, Moncada S. Regulation of gallbladder motility by the arginine-nitric oxide pathway in Guinea pigs. *Gut* 1993; 34: 911-915.
- 197.- Mourelle M, Guarner F, Moncada S, Malagelada JR. The arginine-nitric oxide pathway modulates sphincter of Oddi motor activity in Guinea pigs and rabbits. *Gastroenterology* 1993; 105: 1299-1305.
- 198.- Thune A, Delbro DS, Nilsson B, Friman S, Svanvik J. Role of nitric oxide in motility of the feline hepatobiliary tract. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 715-720.
- 199.- Piqué JM, Esplugues JV, Whittle BJR. Endogenous Nitric Oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilatation during acid secretion. *Gastroenterology* 1992; 102: 168-174.
- 200.- Piqué JM, Brendan JR, Whittle JR, Esplugues JV. The vasodilator role of endogenous nitric oxide in the rat gastric microcirculation.

European Journal of Pharmacology
1989; 174: 293-296.

201.- Masuda E et al.
Endogenous nitric oxide modulates
ethanol-induced gastric mucosal injury in
rats. *Gastroenterology* 1995; 108: 58-64.

202.- Whittle B, Lopez-
Belmonte J, Moncada S. Regulation of
gastric mucosal integrity by endogenous
nitric oxide: interactions with
prostanoids and sensory neuropeptides
in the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 99:
607-611.

203.- Peskar BM, Respondek M,
Muller KM, Peskar BA. A role for nitric
oxide in capsaicin-induced
gastroprotection. *European Journal of
Pharmacology* 1991; 198: 113-114.

204.- Kiraly A, Suto G, Taché Y.
Role of nitric oxide in the gastric
cytoprotection induced by central vagal
stimulation. *European Journal of
Pharmacology* 1993; 240: 299-301.

205.- Konturek SJ, Brzozowski
T, Majka J, Czarnobilski K. Role of
nitric oxide and prostaglandins in
sucralfate-induced gastroprotection.

European Journal of Pharmacology
1992; 211: 277-279.

206.- Konturek SJ, Brzozowski
T, Majka J, Pytko-Polonczyk, Stachura
J. Inhibition of nitric oxide synthase
delays healing of chronic gastric ulcers.
European Journal of Pharmacology
1993; 239: 215-217.

207.- Elliott SN, McKnight W,
Cirino G, Wallace JL. A nitric oxide-
releasing nonsteroidal anti-inflammatory
drug accelerates gastric ulcer healing in
rats. *Gastroenterology* 1995; 109: 524-
530.

208.- Yamada T, Sartor RB,
Marshall S, Specian RD, Grisham MB.
Mucosal injury and inflammation in a
model of chronic granulomatous colitis
in rats. *Gastroenterology* 1992; 103:
1260-1266.

209.- Roediger WEW, Lawson
MJ, Nance SH, Radcliffe BC.
Detectable colonic nitrite levels in
inflammatory bowel disease- mucosal or
bacterial malfunction? *Digestion* 1989;
35: 199-204.

210.- Stuehr DJ, Marletta M.
Mammalian nitrate biosynthesis: mouse

macrophage produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7738-7742.

211.- Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JD. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993; 341: 456-466.

212.- Aiko S, Grisham MB. Spontaneous intestinal inflammation and nitric oxide metabolism in HLA-B27 transgenic rats. *Gastroenterology* 1995; 109: 142-150.

213.- Ribbons KA et al. Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in rhesus macaques. *Gastroenterology* 1995; 108: 705-711.

214.- Miller MJS, Sadowska-Krowicka H, Chotinareumol S, Kakkis JL, Clark DA. Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264: 11-16.

215.- Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E. Sulphydril blocker-induced rat colonic inflammation is ameliorated

by inhibition of nitric oxide synthase. *Gastroenterology* 1995; 109: 98-106.

216.- Miller MJS, Clark DA et al. Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in Guinea pig ileitis. *Gastroenterology* 1995; 109: 1475-1483.

217.- Singer Y, Kawka D, Scott S, Weidner JR, Mumford R, Riehl T, Stenson WF. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996; 111: 871-885.

218.- Rachmilewitz D, Stamler JS, Karmeli F, Mullins ME, Singel DJ, Loscalzo J, Xavier RJ, Podolsky DK. Peroxynitrite-induced rat colitis- A new model of colonic inflammation. *Gastroenterology* 1993; 105: 1681-1688.

219.- Rachmilewitz D, Karmeli F, Eliakim R, Stalnikowicz, Ackerman Z, Amir G, Stamler JS. Enhanced gastric nitric oxide synthase activity in duodenal ulcer patients. *Gut* 1994; 35: 1394-1397.

220.- Wilson KT, Ramanujam KS, Mobley HLT, Musselman RF,

James SP, Meltzer SJ. Helicobacter pylori stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line. *Gastroenterology* 1996; 111: 1524-1533.

221.- Hutcheson IR, Whittle JR, Boughton-Smith NK. Role of nitric oxide in maintaining vascular integrity in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 815-820.

222.- Boughton-Smith NK, Hutcheson IR, Deakin AM, Whittle JR, Moncada S. Protective effect of S-nitroso-N-acetyl-penicillamine in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *European J Pharmacol* 1990; 19: 485-488.

223.- Caplan MS, Hedlund E, Hill N, MacKendrick W. The role of endogenous nitric oxide and platelet-activating factor in hypoxia-induced intestinal injury in rats. *Gastroenterology* 1994; 106: 346-352.

224.- Kubes P. Ischemia-reperfusion in feline small intestine: a role for nitric oxide. *Am J Physiol* 1993; 264: G143-G149.

225.- Wallace J, Steel G, Whittle BJR, Lagente V, Vargaftig B. Evidence for platelet-activating factor as a mediator of endotoxin-induced gastrointestinal damage in the rat. *Gastroenterology* 1987; 93: 765-773.

226.- Boughton-Smith NK, Evans SM, Laszlo F, Whittle BJR, Moncada S. The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability by endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 1189-1195.

227.- McCafferty DM, Mudgett JS, Swain MG, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterology* 1997; 112: 1022-1027.

228.- Nanji AA et al. Nitric oxide production in experimental alcoholic liver disease in the rat: Role in protection from injury. *Gastroenterology* 1995; 109: 899-907.

229.- Ma TT, Ischiropoulos H, Brass CA. Endotoxin-stimulated nitric oxide production increases injury and reduces rat liver chemiluminescence

during reperfusion. *Gastroenterology* 1995; 108: 463-469.

230.- Kuo PC, Abe KY. Interleukin 1-induced production of nitric oxide inhibits benzenetriol-mediated oxidative injury in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1995; 109: 206-216.

231.- Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide as antioxidant. *Arch Biochem Biophys* 1991; 289: 130-136.

232.- Cazevielle C, Muller A, Meynier F, Bonne C. Superoxide and nitric oxide cooperation in hypoxia/reoxygenation-induced neuron injury. *Free rad biol med* 1993; 14: 389-395.

233.- Karmeli F, Okon E, Rachmilewitz. Sulphydryl blocker induced gastric damage is ameliorated by scavenging of free radicals. *Gut* 1996; 38: 826-831.

234.- Beckman JS, Crow JP. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 330-334.

235.- Lanas A, Royo Y, Ortego J, Molina M, Sainz R. Experimental esophagitis induced by acid and pepsin in rabbits mimicking human reflux esophagitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 97-107.

236.- Schweitzer EJ, Bass BJ, Johnson LF, Harmon JW. Sulcrafate prevents experimental peptic esophagitis in rabbits. *Gastroenterology* 1985; 88: 611-619.

237.- Tay HP, Chaparala RC, Harmon JW, Huesken J, Saini N, Hakki FZ. Bismuth subsalicylate reduces peptic injury of the oesophagus in rabbits. *Gut* 1990; 31: 11-16.

238.- Jeressun J, Yardley JH, Giardiello FM, Hamilton SR. Intracytoplasmic proteins in distended esophageal squamous cell (balloon cells). *Modern Pathol* 1988; 1: 175-181.

239.- Brewre A, Smyrk TC, Bailey RT, Bonavina L, Eypasch EP, DeMeeter T. Drug-induced esophageal injury. Histopathological study in a rabbit model. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 1205-1210.

- 240.- Grisham MB, Johnson GG, Gautreaux MD, Berg RD. Measurement of nitrate and nitrite in extracellular fluids: a window to systemic nitric oxide metabolism. *Methods Enzymol* 1995; 7: 84-90.
- 241.- Ramis I, Lorente J, Rosello-Catafau J, Quesada P, Gelpí E, Bulbena O. Differential activity of nitric oxide synthase in human nasal mucosa and polyps. *Eur Respi J.* 1996; 9: 202-206.
- 242.- Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS letter* 1994; 350: 9-12
- 243.- Evans P, Kaur H, Mitchinson MJ, Halliwell B. Do human atherosclerotic lesions contain nitrotyrosine? *Bioch Biophys Res Comm* 1996; 226: 346-351.
- 244.- Zicari A, Corrado G, Cavaliere M, Frandina G, Rea P, Pontieri G, Cardi E, Cucchiara S. Increased levels of prostaglandins and nitric oxide in esophageal mucosa of children with reflux esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998 ; 26: 194-199.
- 245.- Nishida K, Ohta Y, Ishigura I. Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *FEBS Lett* 1998; 425 (2): 243-248.
- 246.- Nishida R, Ohta Y, Ishigura I. Role of gastric mucosal constitutive and inducible nitric oxide synthases in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Bioch Biophys Res Commun* 1997; 236: 275-279.
- 247.- Mendez A et al. Constitutive NOS isoforms account for gastric mucosal NO overproduction in uremic rats. *Am J Physiol* 1997; 272: G 849-901.
- 248.- Ohta M, Tanoue K, Tarnawski AS, Pai R, Itani RM, Sander K, Sarfeh II. Overexpressed nitric oxide synthase in portal hypertensive stomach of rat: a key to increased susceptibility to damage? *Gastroenterology* 1997; 112: 1920-1930.

249.- Gupta SK, Fitzgerald JF, Chong SK, Croffie JM, García JG. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in inflamed esophageal and colonic mucosa in a pediatric population. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 795-798.

250.- Akiba Y, Nakamura M, Mori M, Suzuki H, Oda M, Kimura H, Miura S, Tsuchiya M, Ishii H. Inhibition of inducible nitric oxide synthase delays gastric healing in the rat. *J Clin Gastroenterol* 1998; 27 (suppl 1): S64-73.

251.- Muijsers R, Folkerts G, Henricks P, Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp F. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sciences* 1997; 21: 1833-1845