

Dilatación de los espacios intercelulares en los subtipos de la enfermedad por reflujo gastroesofágico

J. C. Álvaro Villegas¹, S. Sobrino Cossío¹, A. Hernández-Guerrero¹, J. O. Alonso-Lárraga¹,
J. G. de la Mora-Levy¹, A. Molina Cruz², H. R. Domínguez-Malagón² y J. J. Herrera-Esquivel³

Servicios de ¹Endoscopia Digestiva y ²Microscopia Electrónica. Instituto Nacional de Cancerología. ³Servicio de Motilidad. Hospital General "Dr. Manuel Gea González". México

RESUMEN

Introducción: la dilatación de los espacios intercelulares mediante microscopia electrónica se considera un marcador morfológico temprano de daño tisular en la enfermedad por reflujo gastroesofágico. El grado de dilatación en el esófago de Barrett se desconoce actualmente.

Objetivos: determinar la frecuencia y grado de la dilatación de los espacios intercelulares en el esófago de Barrett.

Material y métodos: series de casos consecutivos con análisis transversal y prospectivo de pacientes con reflujo gastroesofágico. **Criterios de selección:** > 18 años, sintomáticos, ambos sexos. Se excluyeron aquellos con ingesta de IBP, antagonistas H-2, AINE y cirugía previa. Tomamos datos clínicos, cuestionario de Carlsson-Dent, endoscopia, pH-metría (no erosivos), y biopsias de la mucosa normal a 2 y 5 cm por encima de la unión escamo-columnar. La medición de la dilatación de los espacios intercelulares fue por microscopia electrónica. **Estadística:** descriptiva. Prueba de Chi-cuadrado con nivel de significancia de 0,05. Se compararon 4 grupos: a) enfermedad por reflujo no erosiva (n = 14); b) esofagitis erosiva (n = 5); c) esófago de Barrett (n = 13); y d) controles sanos (n = 5).

Resultados: hubo mayor dilatación de los espacios intercelulares en el esófago de Barrett (5 cm, $2,72 \pm 1,3 \mu\text{m}$ vs. 2 cm, $1,7 \pm 0,48 \mu\text{m}$) ($p = 0,001$). Los otros grupos mostraron menor dilatación y sin diferencias entre los sitios de toma de biopsias.

Conclusión: la dilatación de los espacios intercelulares fue mayor en el esófago de Barrett predominando a los 5 cm de la unión escamo-columnar.

Palabras clave: Esofagitis erosiva. Esófago de Barrett. Dilatación de los espacios intercelulares. Enfermedad por reflujo gastroesofágico.

Recibido: 04-11-09.
Aceptado: 11-01-10.

Correspondencia: J. C. Álvaro-Villegas. San Fernando 22, Tlalpan. CP 14080 México, D. F. e-mail: jc_alvarov@hotmail.com.

ABSTRACT

Background: dilatation of the Intercellular spaces by electron microscopy has been considered as an early morphological marker of tissue injury in gastroesophageal reflux disease. The degree of dilatation in Barrett's esophagus is currently unknown.

Objectives: to determine the frequency of dilated intercellular spaces in Barrett's esophagus.

Material and methods: cross-sectional and prospective analysis of consecutive patients with gastroesophageal reflux disease. We selected symptomatic patients > 18 years and both sexes. Patients with recent PPI use (< 14 days), H-2 antagonists, NSAID's or previous upper GI tract surgery were excluded. **Variables included:** clinical-demographic data, Carlsson-Dent score, conventional endoscopy findings, pH-metry results (in non-erosive) and normal mucosal biopsies at 2 and 5 cm above the squamocolumnar junction. Dilatation of intercellular spaces was measured by electron microscopy. **Statistics:** Chi square test with a significance level 0.05 was calculated. The following four groups were compared: a) non-erosive reflux disease (n = 14); b) erosive esophagitis (n = 5); c) Barrett's esophagus (n = 13); and d) healthy controls (n = 5).

Results: the dilation of intercellular spaces was increasingly greater from non-erosive reflux to Barrett's esophagus and higher in biopsies taken at 5 cm than at 2 cm of the squamous columnar junction (2.72 ± 1.35 vs. $1.71 \pm 0.48 \mu\text{m}$) ($p = 0.001$). There was no difference between biopsies at 2 and 5 cm in the other groups.

Conclusion: dilatation of intercellular spaces was greater in Barrett's esophagus than in the other groups and higher at 5 cm from the squamocolumnar junction.

Key words: Erosive esophagitis. Barrett's esophagus. Dilated intercellular spaces. Gastroesophageal reflux disease.

Álvaro Villegas JC, Sobrino Cossío S, Hernández-Guerrero A, Alonso-Lárraga JO, de la Mora-Levy JG, Molina Cruz A, Domínguez-Malagón HR, Herrera-Esquivel JJ. Dilatación de los espacios intercelulares en los subtipos de la enfermedad por reflujo gastroesofágico. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102: 302-307.

INTRODUCCIÓN

Se define como enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) a las secuelas clínicas y/o histopatológicas del movimiento del contenido gastroduodenal hacia el esófago. La incidencia de la enfermedad depende del método para diagnosticarla que puede ser basado en síntomas, endoscopia, o mediante pH-metría esofágica de 24 horas (1,2).

Los pacientes con ERGE presentan mala calidad por la sintomatología además de presentar riesgo de complicaciones orgánicas por exposición esofágica al contenido gástrico prolongado caracterizado por la presencia de erosiones (esofagitis erosiva), estenosis péptica o esófago de Barrett diagnosticados endoscópicamente que permite asumir que son portadores de ERGE. Sin embargo, en un estudio endoscópico sin lesiones visibles, la pH-metría esofágica de 24 horas permite clasificar a los sujetos con ERGE no erosiva (ERNE) (3-5).

Los cambios histopatológicos asociados a ERGE son la elongación de las papilas, infiltrado eosinofílico y la hiperplasia de la basal. Uno de los cambios de daño observado mediante microscopia electrónica es la dilatación de los espacios intercelulares (DEIC) (3). La DEIC del epitelio esofágico es un marcador morfológico temprano de lesión tisular. Se presenta en el 20% de sujetos asintomáticos, 75% ERNE y 83,6% con EE; el diámetro de la DEIC oscila de 0,45 a 0,56 μm , 1,0 a 2,2 μm y de 0,80 a 2,27 μm , respectivamente (3,6,7).

La distribución de la dilatación de los espacios intercelulares no es homogénea y puede tener una distribución radial (diferentes cuadrantes) o axial (UEC). La DEIC es más frecuente en el cuadrante de las 3 y entre 1 y 2 cm por arriba de la unión escamo-columnar (3).

El mecanismo molecular responsable de la dilatación de los espacios intercelulares no está completamente comprendido. Se ha sugerido que la redistribución y los cambios en el complejo célula-proteínas juegan un papel importante en la ERGE, y los cambios en el metabolismo normal de la célula se asocian fuertemente a la presencia de reflujo gástrico o biliar, también se ha sugerido que este cambio morfológico se relaciona con una mayor intensidad de síntomas en pacientes ERNE (2,8-12).

Los objetivos de nuestro estudio fueron conocer la frecuencia de DEIC en el espectro de la ERGE (esofagitis erosiva, no erosiva y esófago de Barrett), y determinar si la DEIC del epitelio esofágico por arriba de la unión escamo-columnar se relaciona con una mayor intensidad de los síntomas ERGE.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal descriptivo de casos consecutivos en pacientes con ERGE clínico de marzo-septiembre de 2008 en el Instituto Nacional de Cancerología y la Unidad de Fisiología Digestiva del Hospital General "Dr.

Manuel Gea González". Los criterios de selección fueron: mayores de 18 años, ambos sexos, ERGE clínico y consentimiento informado por escrito. Se excluyeron pacientes con ingesta reciente < 14 días de inhibidores de la bomba de protones o antagonistas H-2, AINE, sucralfato o cirugía de hiato.

Se tomaron datos clínico-demográficos, edad, sexo, peso, talla, índice de masa corporal (IMC), cuestionario de síntomas Carlsson-Dent para ERGE (13). Se realizó endoscopia convencional (Olympus GIF-Q180Z) con biopsias de la mucosa esofágica para realizar el diagnóstico histológico y biopsias dirigidas a la mucosa sin alteraciones macroscópicas a 2 y a 5 cm por arriba de la unión escamo-columnar (UEC) para la evaluación de la dilatación de los espacios intercelulares. De acuerdo a los hallazgos endoscópicos, los pacientes se clasificaron en 4 grupos: I. esófago de Barrett; II. esofagitis erosiva; III. enfermedad por reflujo no erosiva (ERNE); y IV. controles sanos.

Las biopsias dirigidas a los 2 y 5 cm de la UEC (epitelio escamoso normal) fueron procesadas para determinar el grado de dilatación de los espacios intercelulares mediante microscopia electrónica a 10.000 aumentos (modelo JEOL JEM-1010); estas fueron hechas en forma automatizada por un microscopio con mantenimiento y calibración periódica, por lo que no ameritó una prueba de concordancia.

Definición operacional de las variables

— *Cuestionario de Carlsson-Dent* (13,14): cuestionario clínico que califica la sintomatología de pirois y regurgitación ácida, requiere al menos 4 puntos para establecer el diagnóstico de reflujo, tiene una sensibilidad del 70% y una especificidad del 40%.

— *Esófago de Barrett* (15,16): es la sustitución anormal de epitelio escamoso estratificado del esófago normal por un epitelio de tipo intestinal con presencia de células caliciformes.

— *Enfermedad por reflujo no erosiva* (16,17): reflujo patológico del contenido gástrico al esófago en cantidad suficiente para producir síntomas en ausencia de lesiones macroscópicas en el tercio distal esofágico.

— *Esofagitis erosiva* (16,17): inflamación de origen químico del esófago distal producida por el contacto crónico de la mucosa y el reflujo gástrico o biliar. Se reporta su presencia en el 2% de los pacientes con reflujo, manifestándose clínicamente por pirois y regurgitación en un 75% de los pacientes.

— *Dilatación de los espacios intercelulares* (3): aumento de los espacios intercelulares del epitelio queratinizado del esófago. Se comprende como dilatación de los espacios a una distancia intercelular por arriba 0,56 micras. Se presenta en el 20% de sujetos asintomáticos, 75% ERNE y 83,6% con EE.

— *Grupo control*: individuos sanos, asintomáticos, con endoscopia negativa para lesión, sin antecedentes de tabaquismo o alcoholismo, con cuestionario de Carlsson-Dent con puntaje de 0.

Tabla I. Características clínico-demográficas de los diferentes grupos

Variables	EB n = 13	EE n = 14	ERNE n = 5	Control n = 5	p
Edad promedio (IC 95%)	59,8 52,02-67,67	51,57 43,13-60,01	49,00 36,33-62,67	50,50 36,71-63,29	0,23
Desviación estándar	11,2	15,29	11,9	10,6	
Peso promedio (IC 95%)	66,76 60,20-73,33	64,64 58,22-71,06	65,40 56,15-76,65	73,40 62,23-84,57	0,36
Desviación estándar	11,7	12,77	8,36	5,46	
IMC promedio (IC 95%)	25,61 23,29-27,94	25,14 22,5-27,79	24,60 20,59-28,61	26,00 22,27-29,73	0,91
Desviación estándar	4,84	3,97	1,52	0,70	
Carlsson promedio (IC 95%)	7,07 5,19-8,90	6,57 4,89-8,25	6,8 3,64-9,95	0	0,82
Desviación estándar	3,7	2,77	4,82		

EB: esófago de Barrett; EE: esofagitis erosiva; ERNE: enfermedad por reflujo no erosiva; IC 95%: intervalo de confianza 95%; IMC: índice de masa corporal.

Estadística: descriptiva

Para variables nominales se usó la prueba de Chi-cuadrado con nivel de significancia de 0,05. ANOVA para diferencia entre grupos con IC 95%: a) enfermedad por reflujo no erosiva (ERNE); b) esofagitis erosiva (EE); c) esófago de Barrett (EB); y d) controles sanos.

RESULTADOS

Fueron 32 pacientes con ERGE (13 EB, 14 EE, 5 ERNE) y 5 controles sanos. *Grupo I* (EB n = 13): 8 hombres y 5 mujeres con edad promedio $59,8 \pm 11,2,3$ años (52,14-67,51). *Grupo II* (EE n = 14) 5 hombres y 9 mujeres con edad promedio $51,57 \pm 15,2$ años (43,13-60,01). *Grupo III* (ERNE n = 5) 2 hombres y 3 mujeres con edad promedio de $49,00 \pm 13,3$ años (35,33-62,67); y *grupo IV* (controles sanos n = 5): 2 hombres y 3 mujeres con edad promedio $50,50 \pm 10,6$ años (36,71-63,29).

La pirosis estuvo presente en 11/13 EB, 12/14 EE, 5/5 ERNE y 0/5 controles con cuestionario de Carlsson-Dent positivo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para edad ($p = 0,26$), peso ($p = 0,52$), IMC ($p = 0,91$), cuestionario estructurado de Carlsson ($p = 0,82$) (Tabla I).

Se reportó tabaquismo leve en 9, 4, 2 y 0 casos, respectivamente; y alcoholismo social en 4, 6, 2 y 0 casos, respectivamente. La endoscopia mostró hernia hiatal en 6/13 EB, 12/14 EE y 1/5 ERNE. La endoscopia evidenció las lesiones de la mucosa en los diferentes subgrupos (Fig. 1).

Los pacientes con ERNE mostraron un promedio en la calificación de DeMeester de $36,6\% \pm 19,9$ (IC 95%: 25,22-48,11).

Histológicamente se reportó esofagitis péptica en todos los casos de EE y ERNE, y metaplasia intestinal especializada con células caliciformes en los casos de esófago de Barrett. Los grados de dilatación de los es-

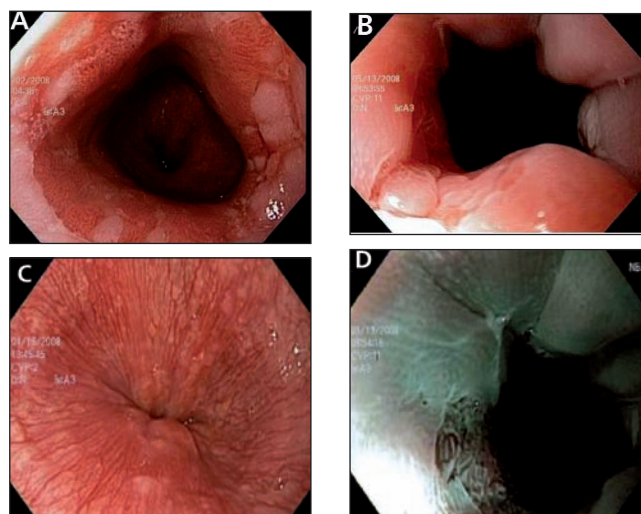


Fig. 1. A. Esófago de Barrett circunferencial. B. Esófago de Barrett de segmento corto (tinción con ácido acético). C. Imagen endoscópica convencional con erosiones esofágicas. D. Esófago de Barrett de segmento corto con cromoscopia digital (NBI).

pacios intercelulares se muestran en la tabla II y figura 2.

La DEIC fue mayor en pacientes con ERGE (n = 32) que en controles sanos (n = 5). A los 2 cm fue $1,7 \pm 0,45$ (IC95% 1,518-1,885) versus $1,09 \pm 0,5$ (IC 95% 0,6606, 1,515, $p = 0,011$), y a los 5 cm de $2,28 \pm 1,0$ (IC 95% 1,908, 2,651) versus $1,38 \pm 0,2$ (IC 95% 0,5150, 2,241, $p = 0,059$).

En pacientes con EB observamos mayor dilatación de los espacios intercelulares a los 5 cm que a los 2 cm de la UEC ($2,72 \pm 1,35 \mu\text{m}$ vs. $1,71 \pm 0,48 \mu\text{m}$, $p = 0,001$); por otra parte, se evidenció una menor DEIC en la variedad no erosiva y erosiva que en el EB, y no se mostraron diferencias entre los sitios de toma de las biopsias (Figs. 3 y 4).

Tabla II. Dilatación de los espacios intercelulares en dos sitios por arriba de la unión escamo-columnar en los diferentes grupos de ERGE y controles

DIEC (μm)	EB	EE	ERNE	Control	p
2 cm promedio (IC 95%)	1,71 1,10-2,76	1,68 1,45-1,91	1,02 0,58-1,47	0,61 0,22-0,99	0,001
Desviación estándar	$\pm 0,48$	$\pm 0,35$	$\pm 0,57$	$\pm 0,20$	
5 cm promedio (IC 95%)	2,72 2,08-3,11	1,97 1,48-2,47	1,12 0,39-1,85	0,70 0,12-1,52	0,001
Desviación estándar	$\pm 1,35$	$\pm 0,33$	$\pm 0,41$	$\pm 0,20$	

DIEC: dilatación de los espacios intercelulares; EB: esófago de Barrett; EE: esofagitis erosiva; ERNE: esofagitis no erosiva.

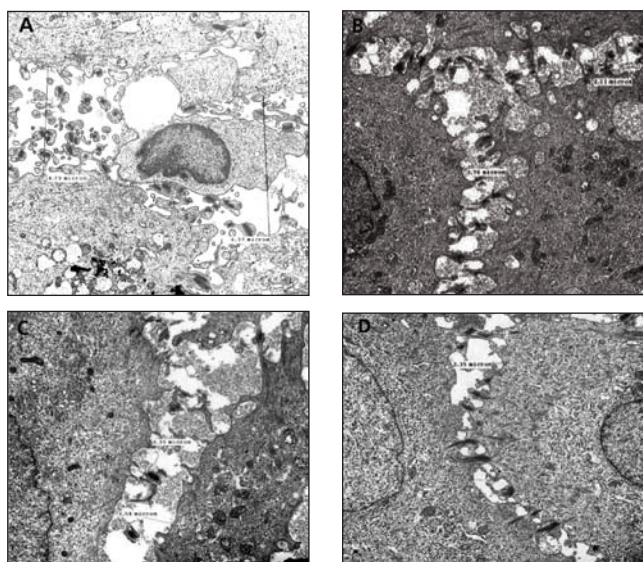


Fig. 2. A. Dilataciones de los espacios intercelulares en el esófago de Barrett a 5 cm (A) y 2 cm (B) por encima de la UEC. Dilataciones de los espacios intercelulares en esofagitis erosiva a 5 cm (C) y 2 cm (D) de la UEC.

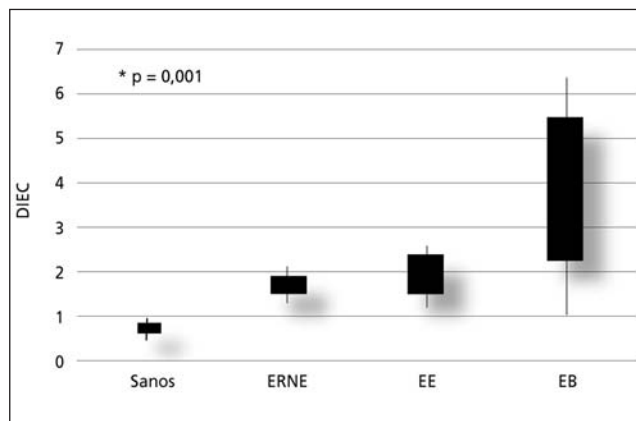


Fig. 4. Dilatación de los espacios intercelulares a 5 cm de la unión escamo-columnar en los diferentes subgrupos de ERGE. DIEC: dilatación espacios intercelulares (μm); ERNE: enfermedad por reflujo no erosiva; EE: esofagitis erosiva; EB: esófago de Barrett.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio, la dilatación de los espacios intercelulares fue evidente en todo el espectro de la ERGE (ERNE, EE y Barrett); fue mayor en el esófago de Barrett en los dos sitios de toma de biopsias predominando a los 5 cm ($2,72 \pm 1,35 \mu\text{m}$ vs. $1,71 \pm 0,48 \mu\text{m}$) ($p = 0,001$). Aunque existió DEIC en la variedad no erosiva y erosiva de la ERGE, esta fue menor, y sin diferencias entre los sitios de toma de las biopsias.

La ruptura de la barrera de la mucosa esofágica se manifiesta como dilatación de los espacios intercelulares, esta expresión se ha identificado como un marcador biológico temprano de daño esofágico (dilatación superior a $0,7 \mu\text{m}$) (3). Estudios recientes han demostrado la presencia de dilatación de los espacios intercelulares como una característica morfológica del paciente con ERGE, independientemente si existe o no enfermedad erosiva.

Existen diferencias en el sitio de toma de biopsias para evaluar la DEIC. Van Melestein y cols. (3) no reportaron diferencias en la DEIC a 2 cm de la UEC para la esofagitis erosiva ($0,80$ - $2,27 \mu\text{m}$) y la no erosiva ($1,00$ - $2,20 \mu\text{m}$) ($p = \text{NS}$); por su parte, Caviglia y cols. (2) tampoco encontraron

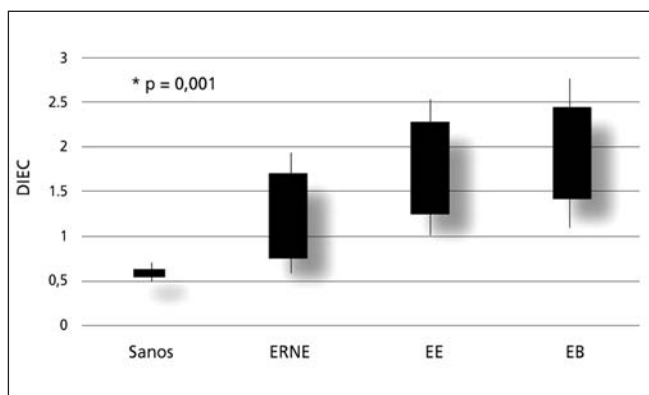


Fig. 3. Dilatación de los espacios intercelulares a 2 cm de la unión escamo-columnar en los diferentes subgrupos de ERGE. DIEC: dilatación espacios intercelulares (μm); ERNE: enfermedad por reflujo no erosiva; EE: esofagitis erosiva; EB: esófago de Barrett.

diferencias con la toma de biopsias a los 5 cm de la UEC (1,41-1,43 μm , $p = \text{NS}$). Así mismo este último autor reporta que en un grupo control de pacientes asintomáticos con pH-metría negativa la DEIC fue de 0,42-0,51 μm ($p = 0,001$). En nuestros casos, no se observaron diferencias en el grupo de pacientes con EE y ERNE siendo a los 2 cm (1,68 \pm 0,45 μm *versus* 1,18 \pm 0,51 μm) y a los 5 cm (1,97 \pm 0,33 μm *versus* 1,50 \pm 0,4 μm), respectivamente ($p = \text{NS}$); para el grupo control la DEIC fue a 2 cm de 0,61 \pm 0,20 (0,22-0,99) y a 5 cm de 0,70 \pm 0,20 (0,12-1,52) ($p = \text{NS}$) similar a lo reportado por Caviglia y cols.

Tobey y cols. (18) reportaron mayor DEIC a 5 cm de UEC con microscopía electrónica en pacientes con EE (0,80 \pm 0,12 μm) y ERNE (1,00 \pm 0,15 μm) que en el grupo control (asintomáticos) de 0,46 \pm 0,06 μm . A diferencia de este autor, la DEIC fue mayor en nuestro grupo de EE (1,97 \pm 0,33 μm), aunque fue similar en el grupo control (0,70 \pm 0,20 μm) y ERNE (1,12 \pm 0,4). Una limitación de nuestro estudio es que la mayoría de nuestros casos fueron grado B de la clasificación de Los Ángeles. Esta diferencia pudiera deberse a la magnitud de la exposición al ácido en el esófago y la cronicidad de la enfermedad. Sin embargo, Caviglia y cols. (2) reportan que no hay diferencias entre el grado de DEIC y el tiempo de exposición ácido del esófago en los pacientes no erosivos.

Por otra parte, cuando la toma de biopsias fue a 5 cm por arriba de la UEC observamos un incremento en la DEIC de dos veces más para EB, menor para EE y sin cambios para ERNE y controles sanos.

Calabrese y cols. (19) reportaron con microscopía electrónica que la DEIC para el reflujo ácido (EE y ERNE) fue 2,27 \pm 0,47 μm y reflujo alcalino de 2,11 \pm 0,23 μm ; y para el grupo control fue de 0,56 \pm 0,09 μm . Se ha sugerido que la redistribución, los cambios en el complejo célula-proteínas juegan un papel importante y los cambios en el metabolismo normal de la célula se asocian fuertemente a la presencia de reflujo gástrico o biliar (10,15). Nosotros no realizamos la distinción del tipo de reflujo gastroesofágico (ácido o no), sin embargo Calabrese y cols. (19) no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos. Nuestros hallazgos muestran que los pacientes con EB presentan mayor dilatación que las variedades erosiva y no erosiva, probablemente esto sea una consecuencia de la mayor cronicidad de la ERGE.

Villanacci y cols. (20) incluyeron pacientes con EE y ERNE, donde las biopsias fueron analizadas con microscopía de luz y propusieron a la DEIC como un marcador histológico para la ERGE reportando la presencia de DEIC en un 100% para la EE y 71,4% para la ERNE. Este estudio tiene limitaciones ya que la microscopía de luz no permitió evaluar el grado de DEIC. Los autores no encontraron correlación entre la hiperplasia basal más la elongación de las papilas con el grado de lesión tisular. A su vez, Zentilin y cols. (7), con microscopía de luz, reportaron la presencia de DEIC en el 30% del grupo control, 94% EE, y 83% para la ERNE. Nosotros encontramos DIEC en todos los casos de ERGE.

La hipótesis de que la dilatación de los espacios intercelulares se relaciona con una mayor intensidad de síntomas ERGE al favorecer la permeabilidad de los iones de hidrógeno y activar los receptores quimiosensitivos (2,3,19), que ha sido sugerida para explicar los síntomas en la variedad no erosiva de la ERGE, consideramos que no puede ser aplicable para pacientes con esófago de Barrett. Ya que si bien esta entidad es parte del espectro de la ERGE y se ha demostrado que los pacientes tienen mayor exposición esofágica al ácido que pacientes con EE y ERNE (21), estos tienen una gran variabilidad en la intensidad de síntomas. En nuestro estudio, cuando comparamos pacientes con todas las variedades de ERGE contra los controles sanos, la DEIC fue mayor en los primeros. En la estratificación, la DEIC fue mayor en EB y sin embargo no hubo diferencias en la intensidad de los síntomas al aplicar el cuestionario de Carlsson-Dent en el espectro de la enfermedad (EB 7,07 \pm 3,7, EE 6,55 \pm 2,77, NERD 6,8 \pm 4,82, $p = 0,82$) (Figs. 3 y 4).

Ninguno de los estudios referidos anteriormente incluyó pacientes con esófago de Barrett. En la literatura no se han informado la frecuencia y el grado de DEIC en este grupo de pacientes que forma parte del espectro de la ERGE. Un dato importante en nuestro estudio es que en pacientes con EB se observa una mayor dilatación 5 cm por arriba de la UEC; y que la toma de biopsias dirigidas no es importante en pacientes con ERNE ya que la DEIC es homogénea.

Podemos concluir diciendo que la dilatación de los espacios intercelulares se presentó en todos los subtipos de la ERGE (enfermedad por reflujo no erosiva, esofagitis erosiva y esófago de Barrett). En nuestro estudio, se observó una mayor dilatación de los espacios intercelulares en el esófago de Barrett (2,72 \pm 1,35 μm (5 cm) > 1,71 \pm 0,48 μm (2 cm), $p = 0,001$). La DEIC fue menor en las variedades erosiva y no erosiva, y no mostraron diferencias entre los sitios de la toma de las biopsias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kahrilas PJ. GERD pathogenesis, pathophysiology, and clinical manifestations. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2003; 70(Supl. 5): S4-19.
2. Caviglia R, Ribolisi M, Gentile M. Dilated intercellular spaces and acid reflux at the distal and proximal oesophagus in patients with non-erosive gastroesophageal reflux disease. *Alimentar Pharm Ther* 2007; 25: 629-36.
3. Malenstein H, Farré R, Sifrim D. Esophageal dilated intercellular spaces (DIS) and nonerosive reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1-8.
4. Rey E, Álvarez-Sánchez A, Rodríguez-Artalejo F, Moreno C, Almansa C, Díaz-Rubio M. Onset and disappearance rates of gastroesophageal reflux symptoms in the Spanish population, and their impact on quality of life. *Rev Esp Enferm Dig* 2009; 101: 477-82.
5. Pérez H, Urdiales G, Fernández J, España L, Rodríguez J, Martínez M, et al. Preoperative workup to assess indication for laparoscopic treatment in gastroesophageal reflux disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2008; 100: 405-10.
6. Fass R, Ofman JJ. Gastroesophageal reflux disease. Should we adopt a new conceptual framework? *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1901-9.
7. Zentilin P, Savarino V, Mastracci L, Spaggiari P, Dulbecco P, Ceppia P, et al. Reassessment of the diagnostic value of histology in patients

- with GERD, using multiple biopsy sites and an appropriate control group. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2299-306.
8. Caviglia R, Rivolsi M, Mariano N. Dilated intercellular spaces of esophageal epithelium in non-erosive reflux disease patients with physiological esophageal acid exposure. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 543-8.
 9. Tutuian R. Update in the diagnosis of gastroesophageal reflux disease. *J Gastrointest Liver Dis* 2006; 15: 243-7.
 10. Cappell MS. Clinical presentation, diagnosis, and management of gastroesophageal reflux disease. *Med Clin North Am* 2005; 89: 243-91.
 11. Armstrong D. Review article: gastric pH —the most relevant predictor of benefit in reflux disease? *Alimentar Pharm Ther* 2004; 20: 19-26.
 12. Tack J. Review article: the role of bile and pepsin in the pathophysiology and treatment of gastro-oesophageal reflux disease. *Alimentar Pharm Ther* 2006; 24: 10-6.
 13. Numans ME, De Wit NJ. Reflux symptoms in general practice: diagnostic evaluation of the Carlsson-Dent gastro-oesophageal reflux disease questionnaire. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1049-55.
 14. Carlsson R, Dent J, Bolling-Sternvald E, Johnsson F, Junghard O, Lauritsen K, et al. The usefulness of a structured questionnaire in the assessment of symptomatic gastroesophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 1023-9.
 15. Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballard DJ, Carney JA. Prevalence of columnar-lined (Barrett's) esophagus. Comparison of population-based clinical and autopsy findings. *Gastroenterology* 1990; 99: 918-22.
 16. Revicki DA, Wood M, Maton PM, Sorensen S. The impact of gastroesophageal reflux disease on health related quality of life. *Am J Med* 1998; 104: 252-8.
 17. Cappell MS. Clinical presentation, diagnosis, and management of gastroesophageal reflux disease. *Med Clin North Am* 2005; 89: 243-91.
 18. Tobey NA, Carson JL, Alkiek RA, Orlando RC. Dilated intercellular spaces: a morphological feature of acid reflux-damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterology* 1996; 111: 1200.
 19. Calabrese C, Fabbri A, Bortolotti M, Cenacchi G, Areni A, Scialpi C, et al. Dilated intercellular spaces as a marker of oesophageal damage: comparative results in gastro-oesophageal reflux disease with or without bile reflux. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 525-32.
 20. Villanacci V, Grigolato PG, Cestari R, Missale G, Cengia G, Klersy C, et al. Dilated intercellular spaces as markers of reflux disease: histology, semiquantitative score and morphometry upon light microscopy. *Digestion* 2001; 64: 1-8.
 21. Shapiro M, Green C, Faybush EM, Esquivel RF, Fass R. The extent of oesophageal acid exposure overlap among the different gastro-oesophageal reflux disease groups. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23(2): 321-9.