

Efectos de la terapia combinada del D-002 y el omeprazol sobre la esofagitis inducida por el reflujo gastroesofágico agudo en ratas.

Licet Mena- Valdés *, Zullyt Zamora-Rodriguez, Miriam Noa-Puig, Ambar Oyarzábal-Yera, Maikel Valle-Clara, Sonia Jiménez-Despaigne, José Alberto Medina-Pérez, Vivian Molina-Cuevas.

Centro de Productos Naturales, Centro nacional de Investigaciones Científicas. Calle 198 entre 19 y 21, Atabey, Playa, La Habana, Cuba. licet.mena@cnic.edu.cu

Recibido: 25 de octubre de 2016.

Aceptado: 9 de diciembre de 2016.

Palabras clave: D-002, omeprazol, reflujo gastroesofágico agudo, esofagitis.

Key words: D-002, omeprazole, gastroesophageal reflux, esophagitis.

RESUMEN. La enfermedad del reflujo gastroesofágico constituye uno de los desórdenes gastrointestinales más frecuentes afectando aproximadamente al 40% de la población mundial. El D-002 (alcoholes de cera de abejas) y el omeprazol (OMP) presentan efectos protectores en modelos de esofagitis inducida por reflujo. Este estudio evaluó el efecto de la terapia combinada de D-002+OMP en la esofagitis inducida por reflujo gastroesofágico agudo (RGEa). Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos: un control negativo y 4 grupos con RGEa: un control positivo, uno tratado con D-002 (10 mg/kg), uno con OMP (5 mg/kg) y uno con la combinación (D-002 + OMP). La administración de las monoterapias redujo moderada (48.91%) y significativamente el ILE, mientras que la terapia combinada presentó un efecto marcado (76.05 %) y significativo respecto al control positivo y a las monoterapias. El D-002, el OMP y la terapia combinada produjeron reducciones significativas del contenido de MDA en tejido esofágico (77.85, 48.62 y 66.45 % de inhibición, respectivamente) comparadas con el control positivo, sin beneficio adicional de la combinación respecto a las monoterapias. El D-002 no produjo cambios significativos en el volumen y la acidez del jugo gástrico (JG). El OMP y la combinación, si bien no modificaron el volumen del JG, redujeron marcada (71.39%, 58.26%, respectivamente) y significativamente la acidez del mismo. En conclusión, la administración con dosis orales únicas de D-002, OMP y la terapia combinada mostraron un efecto protector en la esofagitis inducida por RGEa en ratas, evidenciándose un efecto beneficioso adicional de la terapia combinada.

ABSTRACT. Gastroesophageal reflux disease is one of the most common gastrointestinal disorders affecting approximately 40% of the population worldwide. D-002 (beeswax alcohols) and omeprazole (OMP) present protective effects on experimental esophagitis induced by reflux. In this study, the effect of combined therapy D-002 + OMP on acute gastroesophageal reflux (GER) induced-esophagitis was evaluated. Rats were randomized into 5 groups: a negative control and 4 GER groups: a positive control, one D-002 (10 mg / kg), one OMP (5 mg / kg) and one combination (D-002 + OMP). The administration of monotherapies reduced moderately (48.91%) and significantly the ELI, while the combined therapy had a marked (76.05%) and significant inhibition compared with the positive control and with both monotherapies, respectively. Both, D-002 and OMP as well as combined therapy produced significant reductions in the MDA concentration in esophageal tissue (77.85, 48.62 and 66.45% inhibition, respectively) compared with the positive control, whereas no additional benefit of the combination was obtained compared with D-002 and OMP monotherapies. D-002 did not produce significant changes in the volume and acidity of gastric juice (GJ). OMP and the combined therapy did not change the volume of the GJ, although both reduced markedly (71.39%, 58.26%, respectively) and significantly the GJ acidity. In conclusion, the administration with single oral doses of D-002, OMP and the combined therapy exhibited a protective effect on GER induced-esophagitis in rats, being evident an additional beneficial effect of the combined therapy.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del reflujo gastroesofágico (ERGE) constituye uno de los desórdenes más frecuentes del tracto gastrointestinal. Se define como el reflujo del contenido gástrico hacia el esófago o el área orofaríngea, cuyo factor etiológico principal está relacionado con la disfunción del esfínter interno esofágico (EIE), dado la disminución de su

capacidad de contracción que provoca el decremento de la capacidad del aclaramiento esofágico, así como, la pérdida de funcionalidad de la barrera esofageal y la hipersensibilidad visceral.² La sintomatología clínica característica de esta enfermedad se basa en la aparición de sensación de ardor o quemazón del tracto esofágico, así como, la regurgitación del contenido ácido estomacal en ocasiones acompañado de dolor y disfagia.³ Su incidencia y prevalencia ha aumentado notablemente afectando alrededor del 40 % de la población mundial.⁴⁻⁶ Por otra parte, algunos autores refieren que se encuentra particularmente relacionada al desarrollo de la obesidad y el síndrome metabólico.⁷⁻⁹

La fisiopatología de la ERGE resulta compleja e involucra diversos factores tales como la disfunción de la denominada barrera anti-reflujo, encargada de proteger el esófago de un aumento en la frecuencia y/o cantidad del reflujo,⁵ así como el fallo de los mecanismos de defensa del tejido esofágico. En este sentido, ha sido referido que ocurre un desequilibrio entre los factores defensivos (barrera anti-reflujo, eliminación del ácido esofágico, resistencia del tejido esofágico) y los factores agresivos del estómago y el duodeno (ácido gástrico, la pepsina y el contenido duodenal), el cual tiende a favorecer la exacerbación de estos últimos conduciendo a la formación de severas lesiones en el tejido esofágico.¹⁰⁻¹³

Si bien los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan tal desequilibrio y provocan que estos factores agresivos superen a los sistemas defensivos de la mucosa esofágica induciendo la lesión del epitelio son complejos, se conoce que el detonante inicial de este proceso es el ataque del ácido presente en la luz esofágica sobre las estructuras intercelulares, incrementando la permeabilidad y produciendo dilatación de los espacios intercelulares del epitelio esofágico.^{14,15} Consecuentemente, los hidrogeniones son transportados al interior celular mediado por un intercambiador de membrana $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, resultando en la pérdida de la osmoregulación celular y el desarrollo de edema y necrosis celular.¹³⁻¹⁵

Adicionalmente, diversos autores han referido la implicación de los radicales libres en la patogénesis de la ERGE.¹⁶⁻¹⁸ A su vez, se ha demostrado que la esofagitis experimental inducida por RGE se acompaña de un marcado aumento de infiltración de neutrófilos y de la expresión de citocinas [factor de necrosis tumoral α (TNF- α , por sus siglas en inglés), la interleucina 1 (IL-1), la citocina inductora de quimiotaxis de neutrófilos (CINC-1, por sus siglas en inglés), moléculas de adhesión y el factor de crecimiento transformante- α (TGF- α , por sus siglas en inglés)] en la mucosa esofágica.^{19,20}

Entre las complicaciones clínicas asociadas con mayor frecuencia a la ERGE se encuentran: la estenosis esofágica, la hemorragia digestiva, la úlcera esofágica. Por otra parte, algunos autores han demostrado que el RGE y duodenal juegan un importante papel en la patogénesis del Esófago de Barret (EB) y el adenocarcinoma de esófago.^{14, 15, 21}

La endoscopia constituye el mejor método diagnóstico para valorar el grado de afectación de la mucosa esofágica por el reflujo. Esta, asociada con la histología obtenida mediante biopsias, ofrece la información necesaria acerca de la extensión e intensidad de las lesiones esofágicas.^{22, 23} Por otro lado, la manometría esofágica (ME) permite conocer la presión del esfínter esofágico inferior (EEI), así como su morfología y estudiar las repercusiones de la ERGE tanto en el cuerpo esofágico como en el esfínter esofágico superior (EES)^{22, 24}

El tratamiento de los pacientes diagnosticados de ERGE presenta cierto grado de complejidad debido al amplio rango de severidad y manifestaciones clínicas con que se puede presentar, a la presencia ocasional de complicaciones y a la diversidad de alternativas terapéuticas disponibles. Los objetivos fundamentales en el manejo y tratamiento de la ERGE son: el alivio de los síntomas y la curación de las lesiones, la prevención de las recidivas y complicaciones mayores, así como la mejora en la calidad de vida de los pacientes.²⁵

Las terapias farmacológicas comúnmente empleadas en el tratamiento de la ERGE se sustentan en el uso de fármacos antiácidos, procinéticos y antisecretores.²⁶ Los inhibidores de la bomba de protones (IBP) constituyen los medicamentos de primera elección para su tratamiento, sin embargo, su uso prolongado se encuentra limitado por la ocurrencia de reacciones adversas,²⁷ tales como la hipomagnesemia e hipomagnesuria,²⁸⁻³² el desarrollo de adenocarcinomas por el incremento de la gastrina (hipergastrinemia),^{33,34} el incremento del pH del jugo gástrico, la ocurrencia de fracturas,³⁰ complicaciones renales,³⁴ neumonías comúnmente adquiridas,^{35,36} infecciones entéricas por *Clostridium difficile*, relacionadas con la supresión de ácido,^{37,38} la disminución de la biodisponibilidad de drogas dependientes del ácido gástrico.^{39,40}

Otros fármacos como baclofén y loxiglumide⁴¹ reducen el número de relajaciones transitorias y por tanto el número de episodios de reflujo, pero su eficacia en el control de los síntomas no ha sido confirmada. Por otra parte, se ha demostrado que algunos inhibidores selectivos de la COX-2 como celecoxib son capaces de disminuir la progresión de la esofagitis hacia la formación de EB a adenocarcinoma.^{42, 43}

Pese a la existencia de las terapias antes enunciadas, hasta el presente los resultados del uso de las mismas en la prevención y/o tratamiento de la ERGE no son completamente satisfactorios, ya sea por no lograr una alta eficacia o por los efectos adversos asociados.

El D-002 es una mezcla que contiene 6 alcoholes alifáticos primarios de alto peso molecular purificada de la cera de abejas (*Apis mellifera*), siendo el triacontanol el componente mayoritario seguido de hexacosanol, octacosanol, tetracosanol, dotriacontanol, y tetratriacontanol.⁴⁴

La administración de dosis orales únicas y repetidas de D-002 (25 - 200 mg/kg) protegió del desarrollo de la esofagitis inducida por RGE agudo en ratas, lo cual se asoció a la disminución de la peroxidación lipídica (contenido

de malondialdehído (MDA)) y de la oxidación proteica (grupos sulfhídricos (SH)) en el tejido esofágico, sin ocasionar modificaciones de la acidez del jugo gástrico.⁴⁵

Estos resultados constituyeron la primera evidencia del efecto esófago-protector del D-002. Un estudio posterior demostró la eficacia del D-002 (100 - 400 mg/kg) en la esofagitis inducida por RGE crónico, asociado a la disminución de la peroxidación lipídica y la infiltración de neutrófilos en el tejido esofágico.⁴⁶

Teniendo en cuenta los antecedentes del D-002 en la protección de la mucosa esofágica y la probada eficacia de los IBP en la ERGE, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la terapia combinada de D-002 y el OMP en el modelo de esofagitis inducida por RGEa en ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustancias de estudio: administración y dosificación

El D-002, sustancia de estudio, fue obtenido en la Planta de Producción de Productos Naturales (CNIC, La Habana, Cuba). El OMP, sustancia de referencia, fue suministrado por Laboratorios Novatec, La Habana, Cuba. Ambas sustancias se prepararon en forma de suspensión en un vehículo de goma acacia 1%. El vehículo a emplear fue seleccionado de acuerdo a las características de la sustancia de estudio y a la inocuidad que este posee. Los tratamientos (vehículo, D-002, OMP y la combinación D-002+OMP) se administraron por vía oral como dosis únicas 1 hora antes de inducir el RGE, efectuando para la combinación un esquema de administración distanciada de 1 hora entre ambas sustancias. Todos los tratamientos se administraron mediante entubación intragástrica (5 mL/kg) a dosis repetida, encontrándose dentro de los límites recomendados para esta especie y adecuándose a las características de la sustancia en estudio.

Animales: grupos experimentales y niveles de dosis.

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos (250-300 g de peso corporal) provenientes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana), las cuales se adaptaron durante 7 días a las condiciones de laboratorio (temperatura de 20 a 25°C, humedad relativa de 60 ± 10%, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas) con libre acceso al agua y la comida.

Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 5 grupos: un control negativo y 4 grupos a los cuales se les indujo experimentalmente el RGE: un control positivo (vehículo), un grupo tratado con D-002 (10 mg/kg), uno con OMP (5 mg/kg) y uno con la combinación D-002 + OMP.

La selección de las dosis de D-002 y OMP se basó en los resultados de una serie experimental previa que caracterizó las dosis submáximas en las presentes condiciones experimentales (datos no mostrados).

La manipulación de los animales se realizó de acuerdo a los principios éticos para el uso de animales de laboratorio recomendados en los Lineamientos Internacionales y en la República de Cuba, en las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y en los aspectos específicos plasmados en el Manual de calidad y los Procedimientos Normalizados de Trabajo establecidos en el Centro de Productos Naturales.

Diseño experimental

Todos los animales se sometieron a 24 h de ayuno. Se administraron todos los tratamientos con dosis orales únicas y una hora después se realizó la inducción del RGEa. Transcurridas cuatro horas de la inducción del RGEa, se les practicó la eutanasia a las ratas mediante sobredosis de anestesia (halotano). Se les realizó laparotomía abdominal y se realizó otra ligadura otra en la zona superior del esófago. Posteriormente se extrajo la porción alta del sistema digestivo, delimitada por las ligaduras, para la cuantificación de las variables de eficacia.

Inducción del reflujo gastroesofágico (RGE) agudo

Los animales se anestesiaron con tiopental sódico (40 mg/kg) y se procedió a realizar la laparotomía mediante una incisión en la línea media, previo rasurado y desinfección del campo operatorio. Se realizaron dos ligaduras, una a nivel del píloro y otra en la zona de transición entre la porción glandular del estómago y el pre-estómago, utilizando un hilo de seda para sutura 2.0.⁴⁸ Se suturó la herida y se desinfectó la zona operada.

VARIABLES ANALIZADAS

Cuantificación del índice de lesiones esofágicas

Las lesiones en la mucosa esofágica fueron cuantificadas mediante un puntaje descrito por Konturek 2007⁴⁸ a ciegas por dos observadores independientes, como se describe a continuación:

0: No lesiones visibles.

1: Algunas erosiones y sangramiento.

2: Área total de lesiones < 15 mm².

3: Área total de lesiones < 30mm²

4: Área total de lesiones < 40 mm²

5: Área total de lesiones < 45 mm²

6: Perforación

Determinación de Sustancia Reactiva al Acido Tiobarbitúrico (SRATB)

Las muestras de tejido esofágico fueron homogeneizadas en baño de hielo con un homogenizador de cuchilla (Ultra-Turrax), en Buffer Tris-HCl (150 mmol/L y pH 7,4) y Buffer sacarosa-EDTA (0,25 mol/L).

La determinación de las SRATB en los homogenatos de tejido esofágico se calculó según las concentraciones de MDA, de acuerdo a la técnica de Ohkawa y col. (1979).⁴⁹ Para ello, tras la incubación se añadió a la mezcla de reacción 0.2 mL de SDS al 8.1%, 1.5 ml de ácido acético al 20 % ajustada a pH 3.5 y 1.5 mL de una solución acuosa de ácido tiobarbitúrico al 0.8%. La mezcla se calentó a 95°C durante 1 h. Con el objetivo de evitar la producción de aducios de ATB, se añadió BHT (1 mmol/L) al medio. Posteriormente se enfriaron las muestras, se añadieron 5 mL de una mezcla n-butanol: piridina (15:1 v/v), se agitó vigorosamente con ayuda de un vortex y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min. Se extrajo la capa orgánica y se realizó la lectura a 534 nm en un espectrofotómetro.

Los valores de MDA se reportaron como nmol de MDA/mg de proteína. Las concentraciones de proteínas totales en los homogenatos de tejido esofágico se determinaron según el método de Lowry.⁵⁰

Determinación del volumen y acidez del Jugo gástrico

Para la determinación del volumen y acidez del JG se cortó la ligadura superior y se vertió el contenido en un tubo de ensayo. Posteriormente el contenido de la porción esófago-estómago se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min y se realizó la medición del volumen de jugo gástrico (JG) en una probeta o tubo de centrífuga graduada. Se registraron los valores de volumen JG en mL, mientras que la acidez se reflejó en función del cálculo de la concentración de hidrogeniones (H⁺) contenidos en 1mL de JG. Para ello, se diluyó 1 ml del sobrenadante en 9 ml de agua destilada. A continuación, se tomaron 2 ml de esta dilución y se añadieron de 2 o 3 gotas del indicador fenolftaleína. Finalmente se realizó la titulación con NaOH 0.1N, tomando como punto estequiométrico el primer cambio de coloración evidente (rosa pálido). El volumen de NaOH consumido se correlacionó con la acidez total, la cual fue determinada y expresada en términos de mL de NaOH 0.1N/100 g de JG, equivalente a mEq/L.

$$\text{Acidez} = \text{Volumen de NaOH} \times \text{normalidad del NaOH} / 0.1 \times 100 \text{ mEq/L}$$

Análisis estadístico

La comparación entre grupos se realizó con el test no paramétrico de la U de Mann Whitney. *A priori* se estableció un nivel de significación $\alpha = 0,05$ para la significación estadística. Los datos fueron procesados con el paquete de programas *Statistic* para *Windows* (Release 4.2).

RESULTADOS

La inducción del RGEa produjo un incremento significativo del ILE y el MDA, así como del volumen y acidez del contenido gástrico en los animales control positivo con respecto al grupo de animales control negativo.

La Tabla 1 muestra los resultados del efecto de dosis orales de D-002, OMP y su combinación sobre el ILE y el contenido de MDA.

Tabla 1. Efectos del D-002, el Omeprazol y la terapia combinada sobre la concentración de MDA y el índice de lesiones esofágicas en ratas con RGEa.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	ILE	I (%)	MDA (nmol/mg Pt)	I (%)
C-	-	0.00±0.00***	-	2.13±0.12**	-
C+	-	5.22±0.43	-	3.27±0.14	-
D-002	10	2.66±0.44**	48.91	2.38±0.17**	77.85
OMP	5	2.66±0.47**	48.91	2.71±0.13*	48.62
D-002+OMP	10+5	1.25±0.31*** a b	76.05	2.51±0.16*	66.45

Datos como Media ± EEM (error estándar de la media) I (%): porcentaje de inhibición, ILE: índice de lesiones esofágicas * p<0,05; ** p < 0,01; *** p< 0, 001 Comparación vs Control (+) a p<0,05 Comparación vs dosis similar de D-002 b p<0,01 Comparación vs dosis similar de Omeprazol (Test de la U de Mann Whitney)

La administración de dosis orales únicas de las monoterapias con D-002 (10 mg/kg) y OMP (5mg/kg), respectivamente, redujo de manera moderada (48.91%) y significativa (p< 0,01) el ILE, mientras que la terapia combinada presentó un efecto marcado (76.05 %) y significativo respecto al control positivo (p<0.001) y a las monoterapias (p<0.05). El D-002 inhibió marcada y significativamente (77.85 %) el contenido de MDA (p< 0,01), mientras que el OMP produjo una moderada y significativa inhibición (48.62%) de este marcador de daño oxidativo (p< 0,05) comparado con el grupo control positivo y la terapia combinada D-002+OMP no presentó un efecto adicional sobre este indicador.

La Tabla 2 refleja los efectos del D-002, el OMP y la combinación de ambos sobre el volumen y la acidez del JG de ratas con RGEa. La monoterapia con D-002 (10mg/kg) no produjo cambios significativos en ambas variables, en

tanto que la monoterapia con OMP (5mg/kg), si bien no modificó el volumen de JG, redujo de manera marcada (71.39%) y significativa ($p < 0.01$) la acidez del mismo. La terapia combinada redujo de manera marcada (58.26%) y significativa ($p < 0.05$) la acidez del JG, aunque no modificó la producción del mismo.

Tabla 2. Efectos del D-002, el omeprazol y la terapia combinada sobre el volumen y la acidez del jugo gástrico de ratas con RGEa.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	H ⁺ (mEq)	I (%)	JG (mL)	I (%)
C-	-	58.5±3.35**	-	0.25±0.15**	-
C+	-	122±8.91	-	3.48±0.19	-
D-002	10	120.0±40.7	3.14	2.56±0.56	27.55
OMP	5	76.7±4.4**	71.39	3.62±0.34	0
D-002+OMP	10+5	85.0±5.00*	58.26	3.27±0.51	5.11

Datos como Media ± EEM (error estándar de la media) I (%): porcentaje de inhibición, JG: jugo gástrico, H⁺: concentración de hidrogeniones * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ Comparación vs Control (+) (Test de la U de Mann Whitney)

DISCUSIÓN

La administración oral de dosis únicas de D-002 (10 mg/kg), OMP (5 mg/kg) y la terapia combinada (D-002+OMP) protegió significativamente el tejido esofágico de la esofagitis inducida por RGEa.

El daño inducido experimentalmente produjo en los animales control positivo una esofagitis aguda caracterizada por el incremento de los niveles de MDA en el tejido esofágico, debido al daño oxidativo que se desencadena sobre las estructuras lipídicas de la lámina propia y la submucosa, propiciando el desarrollo de lesiones esofágicas de aproximadamente 40-45 mm² de área, así como el incremento del volumen y acidez del JG. En total concordancia con estudios previos⁴⁵ este resultado sugiere que la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) está implicada en el desarrollo de las lesiones de la mucosa esofageal.

La administración de D-002 no provocó cambios significativos en el volumen y la acidez del J, lo cual valida y corrobora resultados obtenidos con anterioridad.^{45, 51} Sin embargo, tanto la administración del OMP y como de la terapia combinada, si bien no modificaron el volumen del JG, redujeron significativamente la acidez del mismo. Este resultado resulta lógico, teniendo en cuenta que el OMP por su mecanismo de acción actúa disminuyendo la acidez del JG.⁵² La disminución de la acidez del JG resulta crucial en el efecto esófago protector observado, considerando que el ácido presente en la luz esofágica actúa incrementando la permeabilidad de las membranas, lo cual provoca un aumento del influjo de hidrogeniones al interior de las células^{14,15} y la consecuente pérdida de la osmoregulación celular. Los trastornos en la regulación osmótica celular inducen la formación y el desarrollo de edema y necrosis celular, ambos implicados en el desarrollo y progresión de las lesiones en la mucosa esofageal.¹³⁻¹⁵

El D-002, el OMP y la terapia combinada redujeron marcadamente el ILE, demostrando un significativo efecto protector de la mucosa esofageal y observándose un efecto beneficioso adicional con el uso de la terapia combinada. Estos efectos pudieran estar sustentados por la marcada eficacia del OMP²⁷ y los efectos antioxidantes del D-002, dada su capacidad de reducir el contenido de MDA y la oxidación proteica⁴⁵ en el tejido esofágico.

CONCLUSIONES

La administración con dosis orales únicas de D-002, OMP y la terapia combinada mostraron un efecto protector en la esofagitis inducida por RGEa en ratas, evidenciándose un efecto beneficioso adicional de la terapia combinada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Isomoto H, Saenko V, Kanazawa Y y Nishi Y, Ohtsuru A, Inoue K y col. Enhanced expresin of interleukin-8 and expression of nuclear factor kappa-Bin endoscopy-negative gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2004; 99 (4): 589-597.
2. Yang L, Cai H, Tou J, Weizhong G, Xiaoli S, Ting Z y col. The role of the 5-hydroxytryptamine pathway in reflux-induced esophageal mucosal injury in rats. *World Journal of Surgical Oncology* 2012; 10 (1): 1.
3. Raghu C, Triadafilopoulos S, Triadafilopoulos G. Refractory gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology Report* 2015; 3: 41-53.
4. Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systemic review. *Gut* 2005; 54: 710-717.
5. Huerta F, Bielsa MV, Remes JM, Valdovinos MA, Tamayo JL. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad por reflujo gastroesofágico: recomendaciones de la Asociación Mexicana de Gastroenterología. *Rev Gastroenterol Mex* 2016; 81(4): 208-222.
6. El-Serag HB. Time trends of gastroesophageal reflux disease: a systemic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5 (1): 17-26.

7. Lee YC, Yen AM, Tai JJ, Chang SH, Lin JT, Chiu HM y col. The effect of metabolic risk factors on the natural course of gastro-oesophageal reflux disease. *Gut* 2009; 58 (2): 174–181.
8. Tseng PH, Lee YC, Chiu HM, Huang SP, Liao WC, Chen CC y col. Prevalence and clinical characteristics of Barrett's esophagus in a Chinese general population. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42 (10): 1074–1079.
9. Wu YW, Tseng PH, Lee YC, Wang SY, Chiu HM, Tu CH y col. Association of Esophageal Inflammation, Obesity and astroesophageal Reflux Disease: From FDG PET/CT Perspective. *PloS ONE* 2014; 9(3): e 92001.
10. Tobey NA, Hossein SS, Argote CM, Dobrucali AM, Awayda MS y col. Dilated intercellular spaces and shunt permeability in nonerosive acid-damaged esophageal epithelium. *Am J Gastroenterol* 2004; 99 (1): 13-22.
11. VanMalensteen H, Farré R, Sifrim D. Esophageal dilated intercellular spaces (DIS) and nonerosive reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2008; 103 (4):1021–1028.
12. Theisen J, Peters J, Fein M, Hughes M, Hagen JA, Demeester SR y col. The Mutagenic Potential of Duodeno-esophageal Reflux. *Ann Surg.* 2005; 241(1): 63–68.
13. Rieder F, Biancani P, Harnett K, Yerian L, Falk GW. Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298 (5): 571–581.
14. Buskens CJ, Hulscher JB, van Gulik Tm, Fiebo J, VanLanschoot JJ. Histological evaluation of an animal model for Barrett's esophagus and adenocarcinoma of the distal esophagus. *J Surg Res* 2006; 135 (2):337-44.
15. Drahos J, Li L, Jick SS, Cook MB. Metabolic syndrome in relation to Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: Results from a large population-based case-control study in the Clinical Practice Research Datalink. *J Cancer Epidemiol* 2016; 42, 9-14.
16. Kahrilas PJ, Shaheen NJ, Vaezi MF. American Gastroenterological Association medical position statement on the management of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 2008; 135 (4):1392-1413.
17. Zamora-Rodríguez, Z. (2015). Reflujo gastroesofágico, características generales y modelos experimentales. *Rev CENIC* 2016, 46(1): 25-41.
18. Hayakawa T, Fujiwara Y, Hamaguchi M Sugawa T, Okuyama M, Sasaki E y col. Roles of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 in rat acid reflux oesophagitis. *Gut* 2006; 55 (4): 450-456.
19. Piazuolo E, Cebrián C, Jiménez J, Escartin A, Soteras F, Ortego J y col. Superoxide anion dismutase prevents the development of adenocarcinoma in a rat model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2003; 124 (4): 33.
20. Lanás A, Soteras F, Jimenez P, Fiteni I, Piazuolo E, Royo Y y col. Superoxide anion and nitric oxide in high-grade esophagitis induced by acid and pepsin in rabbits. *Dig Dis Sci* 2001; 46 (12): 2733-2743.
21. Csendes A, Velasco N, Godoy M. Evaluación de la utilidad de los diferentes exámenes para la detección del reflujo gastroesofágico. *Rev Med Chile* 1979; 107: 724-727.
22. Sala T, Pertejo V. La endoscopia en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad por reflujo gastroesofágico. En: Vilardell F, Berenguer J, eds. *Patología de la secreción gástrica. Vol I.* Barcelona: Ed Doyma. 1991: 49-60.
23. Manterola C. Enfermedad por Reflujo Gastroesofágico. *Int. J. Med. Surg. Sci* 2016; 3(1):795-809.
24. Manterola, C, Calderón C, Pérez O, Flores P, Hofmann E. Esofagitis por reflujo gastroesofágico y alteración de parámetros presivos esofágicos. *Acta Med Colomb* 1998; 23: 7-14.
25. Marzo M, Alonso P, Bonfill X, Fernández M, Fernández J, Martínez G y col. Guía de práctica clínica sobre el manejo del paciente con enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE). *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25 (2): 85-110.
26. Romero CM, Fass R. New and Future Drug Development for Gastroesophageal Reflux Disease. *J Neurogastroenterol Motil* 2014; 20(1): 6-16.
27. Sifrim D, Zerbib F. Diagnosis and management of patients with reflux symptoms refractory to proton pump inhibitors. *Gut* 2012; 61:1340-54. doi:10.1136/gutjnl-2011-301897
28. Shabajee N, Lamb EJ, Sturgess I, Sumathipala RW. Omeprazole and refractory hypomagnesaemia. *BMJ* 2008; 337 (7662): 173-175.
29. Cundy T, Dissanayake A. Severe hypomagnesaemia in long-term users of proton-pump inhibitors. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 69 (2):338–341.
30. Broeren MA, Geerdink EA, Vader HL, van den Wall Bake AW. Hypomagnesemia induced by several proton-pump inhibitors. *Ann Intern Med* 2009; 151 (4):755–756
31. Hoorn EJ, Van der Hoek J, Rob A, Kuipers EJ, Bolwerk C, Zietse, R. A case series of proton pump inhibitor-induced hypomagnesemia. *Am J Kidney Dis.* 2010; 56 (1):112–116.
32. Krishnamra T. Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. *World J Gastroenterol* 2011; 17 (12): 1574–1583.
33. Rindi G, Fiocca R, Morocutti A, Jacobs A, Miller N, Thjodleifsson B y col. Effects of 5 years of treatment with rabeprazole or omeprazole on the gastric mucosa. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17 (5): 559–566.

34. Orlando LA, Lenard L, Orlando RC. Chronic hypergastrinemia: causes and consequences. *Dig Dis Sci* 2007; 52 (10): 2482–2489.
35. De Giorgi F, Palmiero M, Esposito I, Mosca F, Cuomo R. Pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2006; 26 (5): 241–246.
36. Laheij RJ, Sturkenboom MC, Hassing RJ y col. Risk of community-acquired pneumonia and use of gastric acid-suppressive drugs. *JAMA* 2004; 292 (16): 1955–1960.
37. Leonard J, Marshall JK, Moayyedi P. Systematic review of the risk of enteric infection in patients taking acid suppression. *Am J Gastroenterol* 2007; 102 (9): 2047–2056.
38. Rodríguez LA, Ruigómez A, Panés J. Use of acid-suppressing drugs and the risk of bacterial gastroenteritis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5 (12): 1418–1423.
39. Siller-Matula, JM, Spiel AO, Lang IM, Kreiner G, Christ G, Jilma B Siller JM. Effects of pantoprazole and esomeprazole on platelet inhibition by clopidogrel. *Am Heart J* 2009; 157 (1): 148.
40. Gilard M, Arnaud B, Cornily JC y col. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (omeprazole clopidogrel aspirin) study. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 51(3): 256-260.
41. Hirsch DP, Tygat GN, Boeckxstaens GE. Transient lower oesophageal sphincter relaxation- a pharmacological target for gastro-esophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16 (1): 17-26.
42. Hayakawa T, Fujiwara Y, Hamaguchi M, Sugawa T, Okuyama M, Sasaki E y col. Roles of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 in rat acid reflux o esophagitis. *Gut* 2006; 55 (4): 450-456.
43. Pawlik M, Pajdo R, Kwiecien S, Ptak-Belowska A, Sliwowski Z, Mazurkiewicz-Janik y col. Nitric oxide (NO)-releasing aspirin exhibits a potent esophago protection in experimental model of acute reflux esophagitis. Role of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62 (1):75-86.
44. Mas R. D-002: A product obtained from beeswax. *Drugs of the Future*, 2001; 26: 731-744.
45. Zamora Z, Molina V, Mas R, Ravelo Y, Perez Y, Oyarzabal. Protective effects of D-002 on experimentally induced gastroesophageal reflux in rats. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (8): 2085-2090.
46. Zamora Z, Molina V, Mas R y col. D-002 treatment attenuates esophagitis in a model of chronic gastro-esophageal reflux in rats. *IOSR Journal of Pharmacy* 2015; 5(9): 36-40.
47. Omura N, Kashiwagi H, Chen G y col. Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34(10):948-53.
48. Konturek SJ, Zayachkivska O, Havryluk XO. Protective influence of melatonin against acute esophageal lesions involves prostaglandins, nitric oxide and sensory nerves. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58 (2): 371-387.
49. Marxwell MA, Haas SM, Beiber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1987; 87 (1): 206-209.
50. Fujino K, de la Fuente SG, Takami Y, Takahashi T, Mantyh CR. Attenuation of acid induced oesophagitis in VR-1 deficient mice. *Gut* 2006; 55(1): 34–40.
51. Ohkawa Y, Ohishi J, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by the thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95 (2): 351-358.
52. Carbajal D, Molina V, Valdes S, Arruzazabala, L, Rodeiro I, Más R y col. Possible cytoprotective mechanism in rats of D-002 an anti-ulcerogenic product isolated from beeswax. *J Pharm Pharmacol* 1996; 48 (8):858-860.